

IAC-SEP[®]维生素 B₁₂ 免疫亲和柱

(产品编号: IAC315)

使用对象

IAC-SEP[®]维生素B₁₂亲和柱能够特异性的纯化样品中的维生素B₁₂，它采用了柱状琼脂糖凝胶作为固相载体，琼脂糖凝胶与维生素B₁₂抗体偶联形成免疫吸附剂，装柱制成免疫亲和柱。它能够特异性的纯化样品中的维生素B₁₂。维生素B₁₂亲和柱广泛地应用于饮料、牛奶和奶粉，饮料等样品的提取，该方法速度快、操作简单、准确性高，对提高食品的质量和安全性起到十分重要的作用。

原理

维生素B₁₂免疫亲和柱能够特异性的纯化样品中的维生素B₁₂，将样品与提取液混合、提取、过滤，然后将滤液通过免疫亲和柱。此时，维生素B₁₂物质键合在亲和柱中的抗体上。用蒸馏水将免疫亲和柱上的杂质除去。用甲醇通过分离柱，将维生素B₁₂从抗体上分离下来。最后，将过滤的甲醇溶液注入HPLC或LC-MS进行测定。

储存条件

该亲和柱保存在2-8 °C条件下，绝对不能冷冻，保质期为18个月。建议在室温（18-30°C）下使用。

实验溶液制备

磷酸盐溶液：50mmol/L KH₂PO₄（用磷酸调节 pH 至 3.5），过滤膜。

pH7.4 PBS 溶液：8.0 克 NaCl + 2.90 克 Na₂HPO₄ 12H₂O + 0.24 克 KH₂PO₄ + 0.2 克 KCl 加 990mL 纯水溶解，加纯水至 1 升。

液相色谱条件

色谱柱：Cloversil-C18,4.6×250mm (5um)

流动相：磷酸盐溶液:乙腈=85:15 (v/v)

流速：1.0 mL/min

检测器：紫外检测器，361nm

进样体积：20uL

分析步骤

1) 样品提取及稀释：

牛奶：量取牛奶样品25 mL于50 mL离心管中，4000 RPM离心15 min。准确移取吸取下层液20 mL，备用。

奶粉：称取 2.5 g(精确至0.01 g)试样，置于50 mL离心管中。将20mL 已预热到60 °C的水加入到乳粉中，用玻璃棒将其混合均匀。如果乳粉仍未完全溶解，将烧杯置于50°C的水浴中放置30 min。溶解后冷却至室温，用水定容至25mL，摇匀。4000 RPM离心15 min。准确移取吸取下层液20 mL，备用。

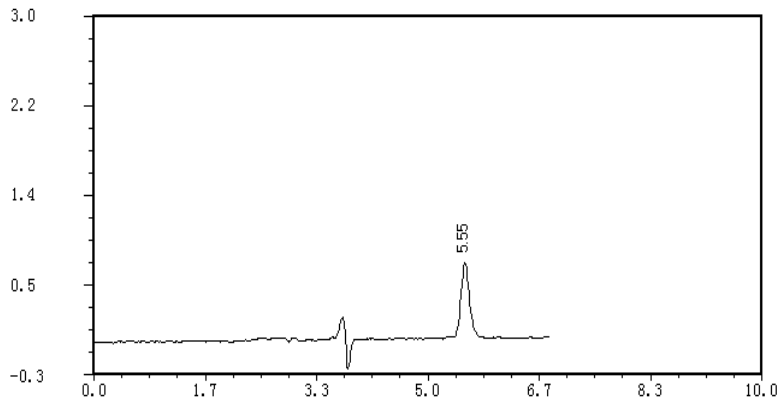
婴幼儿米粉：称取 2.5 g(精确至0.01 g)试样，置于50 mL 离心管中。加入20 mL已预热到60 °C的纯水，用玻璃棒将其混合均匀。冷却至室温，用水定容至25mL，摇匀。4000 RPM离心15 min。将上层液体用普通滤纸过滤。取20 mL滤液，备用。

饮料：准确量取样品25 mL，用 pH7.4 PBS溶液定容至50mL，调节PH值7-8左右（用10%氨水），混匀，备用。

2) 样品的净化

维生素B₁₂免疫亲和柱的柱容量(最大吸附维生素B₁₂)为200ng, 当样品中维生素B₁₂超过测定范围时, 请适当减小上柱体积, 使其在检测范围内, 计算出准确含量。

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下。将上述样品提取液注入(或分次注入)玻璃注射器中, 将空气压力泵与玻璃注射器连接, 调节压力使溶液以约 2mL/min (1-2 滴/秒) 流速缓慢通过免疫亲和柱, 直至液面下降到亲和柱管体(未完全流干)。以 2-3mL/min (1-2 滴/秒) 流速用 10.0mL 水淋洗, 弃去全部流出液, 并使 2mL~3mL 空气通过柱体。准确加入 1.0mL 色谱级甲醇洗脱, 流速为 1 mL/min ~2mL/min (1 滴/秒), 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 50 °C 下氮气浓缩吹干后, 用流动相定容至 0.5 mL, 供 HPLC 或 LC-MS 分析。



VB₁₂ 标准品谱图

(100ng/mL, Cloversil C18 反相色谱柱 4.6*250mm)

注意事项

- 1) 不要随便更改操作说明书中的操作步骤, 如需更改要和本公司技术部联系, 确认更改是否合理。
- 2) 操作步骤中, 样品过柱, 淋洗, 洗脱时, 一定要控制好流速, 不能太快, 否则会使检测结果偏低。
- 3) 如果将标准品直接过柱验证回收率时, 一定要确保标准上柱液中甲醇浓度不要超过 10%, 否则会影响柱子的吸附能力。
- 4) 试验中使用的玻璃仪器等, 一定要清洗干净, 尤其是用次氯酸等处理过的仪器。

需要准备的设备及试剂 (中检维康提供)

C/N 编号	物品
ZJ0612	Clover 六位泵流操作架 (配有 1 台空气泵, 6 个 10mL 针筒)
IAC315	维生素 B ₁₂ 免疫亲和柱 (25 支/盒)
※	维生素 B ₁₂ 标准品
31955	美国 vicam 微纤维滤纸 (1.5um, 100 张/盒)

31240	折叠式槽纹滤纸 (100 张/盒), 或中速定性滤纸
36010	一次性塑料烧杯(25/包)
34000	一次性测试管(250 支/包)
36020	塑料漏斗(10 个/包)
35016	色谱纯级的甲醇 (4 升/瓶)
C546150-U	Cloversil C18 反相色谱柱 4.6*150mm (5um)
C546250-U	Cloversil C18 反相色谱柱 4.6*250mm (5um)

联系人: 薛丽丽15010301983 (微信同号)

公司地址: 北京市顺义区牛栏山腾仁路22号闽京蒲工业园3号楼201

公司网址: <http://www.bioclover.com.cn>, www.clovertek.com.cn



400-6677-658