

## 维生素 A 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：BC4874

规格：50T/48S

### 产品简介：

维生素 A 是一种脂溶性维生素，具有重要的生理药理作用，是为人体维持正常代谢和机能所必需的重要营养素。其主要生理功能包括维持上皮组织的完整性，维持各种细胞与细胞器中膜结构的通透和完整性、维持视觉的正常、促进结缔组织中粘多糖的合成等。当**机体**缺乏维生素 A 时，可能会造成上皮组织增生、角质化。

维生素 A 在一定的光激发条件下具有荧光特性，可利用荧光检测器测定其含量。

### 试验中所需的仪器和试剂：

高效液相色谱仪（ZORBAX Extend C18 色谱柱（4.6×250 mm），荧光检测器（FLD））、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、混匀仪、EP 管、针头式过滤器（有机系）、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）、乙醚、甲醇（分析纯），无水乙醇。

### 产品内容：

试剂一：粉剂×2 瓶，4℃避光保存；每瓶临用前加入 10 mL 无水乙醇，充分溶解，4℃避光保存。

试剂二：液体 10 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃保存。

标准品：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加入 1 mL 无水乙醇配制成 5 mg/mL 维生素 A 标准溶液，-20℃密封保存，避免阳光直射。

### 实验前准备工作：

1. 将甲醇（色谱纯）用有机系滤膜抽滤作为流动相。
2. 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 A 标准溶液用甲醇分别稀释成 200 μg/mL、40 μg/mL、8 μg/mL、1.6 μg/mL、0.32 μg/mL 的维生素 A 标准溶液。-20℃避光保存（密封），测试前采用有机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 A 的提取：

称取**约** 0.2 g 样本，加入 0.4 mL 的试剂一，再加入 0.2 mL 的试剂二，混匀，密封，80℃水浴中避光放置 30 min，冰上冷却，在通风橱中加入 1 mL 乙醚，震荡混匀约 2 min，静置分层，取上层醚相，再加入 1 mL 乙醚到下层水相中，震荡混匀约 2 min，静置分层，取上层醚相（若醚相仍有颜色可再次加入乙醚萃取），合并醚相。加入 1 mL 蒸馏水到醚相中，震荡洗涤，静置分层去除下层水相（洗至水相约呈中性 pH 是 7??（约 3~4 次））。最后加入少量试剂三到醚相中以除去醚相中

残余的极少量水分，取出醚相于通风橱中 40°C 水浴挥发醚相至近干（注意：挥发很快，不能挥发至完全干燥），加入甲醇定容至 1 mL，震荡溶解，10000 rpm 离心 10 min，取上清液，测试前采用有机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、打开高效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  $\mu\text{L}$ ，柱温 30°C，流速为 0.6 mL/min，荧光检测器：Ex=330 nm，Em=480 nm。单个样本走样时间 12 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  $\mu\text{L}$ ，在 12 min 内可分离出维生素 A，维生素 A 的保留时间约为 7 min（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  $\mu\text{L}$ ，在相应的保留时间处检测维生素 A 的峰面积。

**注意：**单个样本测定完成后注意样本物质是否还有残留，必要时可相应延长后运行时间进行色谱柱的清洗。

## 三、维生素 A 含量计算

以标准品浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标 x，峰面积为纵坐标 y 绘制维生素 A 的标准曲线  $y=kx+b$ ，将样本的峰面积代入标准曲线，计算提取液中维生素 A 的浓度 x ( $\mu\text{g/mL}$ )。

维生素 A 的含量 ( $\mu\text{g/g}$ ) =  $x \times V_{\text{提取}} \div W \times F = x \div W \times F$

V 提取：溶解后样本体积，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。

## 注意事项

1. 测试完毕后，需要用高浓度的超纯水相清洗色谱柱（约 20-30 个柱体积），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。
2. 标准品的稀释倍数要根据样品中维生素 A 的浓度确定，样品中维生素 A 的浓度必须在标准品溶液的浓度范围之内，该标准品的稀释倍数只是一个参考。若样本中维生素 A 浓度过高，建议稀释后再测。
3. 若样本量过大，建议每天测试一次标准溶液（一个标准溶液即可），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。
4. 为了排除溶剂的影响，可进行一次空白对照试验检测。
5. 萃取与洗涤过程中若分层界限不明显需延长静置时间，充分分层。