

叶酸含量检测试剂盒（高效液相色谱法HPLC）

产品货号：BA2251

产品规格：50T/48S

产品说明：

叶酸为一种水溶性维生素，因绿叶中含量十分丰富而得名，又名喋酰谷氨酸。在自然界中有几种存在形式，其母体化合物是由喋啉、对氨基苯甲酸和谷氨酸3种成分结合而成。叶酸作为机体细胞生长和繁殖必不可少的维生素之一，缺乏会对人体正常的生理活动产生影响。

叶酸在210nm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(4.6×250mm)，紫外检测器(VWD))、30~50目筛、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管(1.5mL)、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30mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体5mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体1.5mL×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1mL 0.05mol/L KOH配制成5mg/mL叶酸标准溶液，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1000mL超纯水中，再加入0.55mL的试剂二，混匀，得到流动相A。
2. 将1000mL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0.22μm水系滤膜抽滤，甲醇采用0.45μm有机系滤膜抽滤)。
3. 将抽滤好的流动相超声20min，除去气泡。
4. 标准品的配制：将5mg/mL的叶酸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 的叶酸标准溶液。(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。

测定步骤：

一、叶酸的提取

样本：按质量(g):提取液体积(mL)1:5~10比例，建议称取0.1g样本(新鲜样本：剪碎；烘干样本：研磨过筛)，加入0.6mL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30min。冷却至室温，加入0.1mL试剂一，0.3mL蒸馏水，混匀，静置2min。10000rpm离心10min，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0.6mL提取液，超声破碎细胞(功率20%，超声3s，间歇9s，重复30次，总时间：6min)，密封混匀，置于60℃水浴锅中浸取30min。冷却至室温，加入0.1mL试剂一，0.3mL蒸馏水，混匀，静置2min。10000rpm离心10min，取上清液(若仍有浑浊，可



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 $^{\circ}$ C, 流速为1mL/min, 紫外检测器: 波长为210nm。单个样本走样时间25min, 设置完毕保存方法组。
2. 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。
3. 检测待测的标准品溶液, 进样量为10 μ L, 在25min内可分离出叶酸, 叶酸的保留时间为20.5min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)。
4. 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叶酸的峰面积。
5. 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 min	0	100
45 min	0	100

三、叶酸含量计算

以标准品浓度(μ g/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制叶酸的标准曲线, 将样本的峰面积代入标准曲线, 计算提取液中叶酸的浓度 x (μ g/mL)。

1. 组织样本

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

$V_{\text{提取}}$: 加入提取液总体积, 1mL; 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

$$\text{叶酸的含量}(\mu\text{g}/10^4\text{细胞}) = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量}(\text{cell } 10^4) \times F = x \div \text{细胞数量} \times F$$

$V_{\text{提取}}$: 加入提取液总体积, 1mL; 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。

注意事项:

1. 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。
2. 标准品的稀释倍数要根据样品中叶酸的浓度确定, 样品中叶酸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。若样本中叶酸浓度过高, 建议用蒸馏水稀释后再测。
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。
4. 为了排除梯度洗脱基线漂移的影响, 可进行一次空白检测。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com