

## 维生素 A 含量检测试剂盒（高效液相色谱法 HPLC）

产品货号：BA2222

产品规格：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（4.6×250mm），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 10mL 无水乙醇，充分溶解，4℃避光保存。

试剂二：液体 10mL×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 1mL 无水乙醇配制成 5mg/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 20min，除去气泡。
3. 标准品的配制：将 5mg/mL 的维生素 A 标准溶液用甲醇分别稀释成 200  $\mu$ g/mL、40  $\mu$ g/mL、8  $\mu$ g/mL、1.6  $\mu$ g/mL、0.32  $\mu$ g/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 0.4mL 的试剂一，再加入 0.2mL 的试剂二，混匀，密封，80℃水浴中避光放置 30min，冰上冷却，在通风橱中加入 1mL 乙醚，震荡混匀约 2min，静置分层，取上层醚相，再加入 1mL 乙醚到下层水相中，震荡混匀约 2min，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 1mL 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℃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 1mL，震荡溶解，10000rpm 离心 10min，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  $\mu$ L，柱



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

温：30°C，流速为 0.6mL/min，荧光检测器：Ex=330nm，Em=480nm。单个样本走样时间 12min，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 $\mu$ L，在 12min 内可分离出维生素 A，维生素 A 的保留时间为 7min 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 $\mu$ 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（ $\mu$ 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，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（ $\mu$ g/mL）。

维生素 A 的含量（ $\mu$ g/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，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。

#### 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。



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>