

甘露醇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: AC10723

规格:50T/48S;

产品简介:

甘露醇有类似蔗糖的甜味，具有利尿消肿的作用,可防治肾功能衰竭、老年性水肿、药物中毒等。

采用示差折光检测器测定甘露醇含量。

试验中所需的仪器和试剂:

高效液相色谱仪(ZORBAX NH₂ 色谱柱(4.6×250 mm, 氨基柱), 示差折光检测器(RID))、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管、针头式过滤器(有机系, 水系, 0.45 μm)、注射器、抽滤器、滤膜(有机系、水系)、棕色进样瓶(1.5 mL)、乙腈(色谱纯)、超纯水。

产品内容:

试剂一：液体 2.5 mL ×1 瓶，4°C 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4°C 保存。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解。

标准品：粉剂×1 瓶，4°C 避光保存。临用前每支加入 5 mL 蒸馏水配制成 20 mg/mL 甘露醇标准溶液，4°C 密封保存。现用现配。

实验前准备工作:

1. 将色谱纯乙腈用有机系滤膜抽滤，超纯水用有机系滤膜抽滤，利用抽滤过的乙腈和超纯水配置成 85% 的乙腈-水溶液作为流动相。(乙腈采用 0.45 μm 有机系滤膜抽滤，超纯水采用 0.22 μm 水系滤膜抽滤)。
2. 将配制好的流动相超声 20 min，除去溶剂中的气体。
3. 标准品的配制：将 20 mg/mL 的甘露醇标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成 10mg/mL、5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL 的甘露醇标准溶液。(配制的标准品浓度仅供参考，可根据实际样品浓度进行调整)。4°C 避光密封保存，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(测试前请提前放置至室温状态)。

操作步骤:

一、甘露醇的提取:

1. 几乎不含蛋白质类样本

固体样本：将供试的样本充分研磨，按质量(g):蒸馏水体积(mL)1:10~20 比例(建议称取 0.1 g 样品，加入 1 mL 蒸馏水)加入到 2 mL EP 管中，密封，混合均匀，然后放入超声波清洗机中，室温条件下超声提取 30 min。15000 rpm 离心 15 min，取上清液，滤渣再次加入 1mL 水复提，合并上清液，采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测。

产品仅供科研!



液体样本：按样本体积(mL):蒸馏水体积(mL)1:10~100 比例(建议称取 50 μ L 样品，加入 0.95 mL 蒸馏水)加入到 1 mL EP 管中，密封，充分震荡混合均匀，15000 rpm 离心 10 min，取上清液采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测(若上清液中仍存在浑浊可再次稀释离心)。

2. 富含蛋白质类样本：若样本中含有较多蛋白质，则在按上述方法提取或稀释后，取 900 μ L 上清液，加入 50 μ L 试剂一，50 μ L 试剂二，静置 10 min 后 15000 rpm 离心 15 min，取上清液，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：35 $^{\circ}$ C，流速为 1 mL/min，检测池温度为 35 $^{\circ}$ C，洗脱程序如下表，走样时间 25 min，设置完毕保存方法组。
2. 采用相应的流动相清洗柱子，采用准备好的流动相平衡柱子，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 μ L，在 25 min 内可分离甘露醇，甘露醇的保留时间约为 19 min 左右(柱子、流动相、温度等的差异可造成保留时间的偏差，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甘露醇的峰面积。

三、甘露醇含量计算

以标准品浓度(mg/mL)为横坐标，峰面积为纵坐标绘制甘露醇的标准曲线，将样本的峰面积代入标准曲线，计算样本中甘露醇的浓度 x(mg/mL)。

1. 几乎不含蛋白质类样本

固体样本：甘露醇的含量 (mg/g) = $x \times V_{\text{提1}} \div W = 2x \div W$

$V_{\text{提1}}$ ：固体样本加入水的总体积，2 mL；W：样本质量，g。

稀释后测试的样本，需要乘以相应的稀释倍数，再进行计算。

液体样本：甘露醇的含量 (mg/mL) = $x \times V_{\text{提2}} \div V_{\text{样}} = 20x$

$V_{\text{提2}}$ ：液体样本和水的总体积，1 mL； $V_{\text{样}}$ ：加入液体样本的总体积，0.05 mL。

稀释后测试的样本，需要乘以相应的稀释倍数，再进行计算。

2. 富含蛋白质类样本

固体样本：甘露醇的含量 (mg/g) = $x \times V_{\text{样总}} \div (V_{\text{上清}} \div V_{\text{提1}} \times W) = 2.222x \div W$

液体样本：甘露醇的含量 (mg/mL) = $x \times V_{\text{样总}} \div (V_{\text{上清}} \div V_{\text{提2}} \times V_{\text{样}}) = 22.222x$

$V_{\text{样总}}$ ：样本总体积，1 mL； $V_{\text{上清}}$ ：富含蛋白类样本取上清液的体积，0.9mL； $V_{\text{提1}}$ ：固体样本加入水的总体积，2 mL； $V_{\text{提2}}$ ：液体样本和水的总体积，1 mL；W：样本质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入液体样本的总体积，0.05 mL。

稀释后测试的样本，需要乘以相应的稀释倍数，再进行计算。

注意事项

1. 测试完毕后，关闭柱温箱、检测器加热系统降温，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甘露醇的浓度确定，样品中甘露醇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。若样本中甘露醇浓度过高，建议可稀释后再测。
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，所有待测溶液测试前必须放置至室温状态。
4. 必要时可检测一次空白样本，扣除试剂因素影响。

