

烟酸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: AC10752

规格:50T/48S

产品简介：

烟酸是一种水溶性 B 族维生素，又称为维生素 B₃，是人体必需的 13 种维生素之一，其天然品主要存在于动物内脏和肌肉组织中，广泛应用于饲料添加剂、医药中间体等领域。

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

试剂一：液体 5 mL ×1 瓶，4°C 保存。

试剂二：液体 1.5 mL ×1 瓶，4°C 保存。

试剂三：粉剂 ×2 瓶，4°C 保存。

标准品：粉剂 ×1 瓶，4°C 避光保存。临用前加入 1 mL 蒸馏水配制成 5 mg/mL 烟酸标准溶液，4°C 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 1000 mL 超纯水中，再加入 0.55 mL 的试剂二，混匀，得到流动相 A。
2. 将 1000 mL 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 0.22 μm 水系滤膜抽滤，甲醇采用 0.45 μm 有机系滤膜抽滤）。
3. 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 的烟酸标准溶液采用倍比稀释的方法用蒸馏水稀释成 500 μg/mL、100 μg/mL、20 μg/mL、4 μg/mL、0.8 μg/mL 的烟酸标准溶液。（标准品浓度仅供参考，可根据实际样品浓度进行调整）。4°C 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。

操作步骤：

一、烟酸的提取：

样本：按质量（g）:提取液体积（mL）1:5~10 比例，建议称取 0.1 g 样本，加入 0.6 mL 提取液，匀浆，密封，混合均匀，置于 60°C 水浴锅中浸取 30 min。冷却至室温，加入 0.1 mL 试剂一，0.3 mL 蒸馏水，混匀，静置 2 min。10000 rpm 离心 10 min，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 0.6 mL 提取液，冰浴超声破碎细胞（功率 20%，超声 3s，间歇 9s，重复 30 次，总时间：6 min），密封混匀，置于 60°C 水浴锅中浸取 30 min。冷却至室温，加入 0.1 mL 试剂一，0.3 mL 蒸馏水，混匀，静置 2 min。10000 rpm 离心 10 min，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。

血清：按血清体积（mL）:提取液体积（mL）1~5:1 比例，建议取 0.5 mL 血清，加入 0.1 mL 提取液，密封混匀，置于 60°C 水浴锅中浸取 30 min。冷却至室温，加入 0.1 mL 试剂一，0.3 mL 蒸馏水，混匀，静置 2 min。10000 rpm 离心 10 min，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。

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°C，流速为 1 mL/min，紫外检测器：波长为 210 nm。单个样本走样时间 10 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 A 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 μ L，在 10 min 内可分离出烟酸，烟酸的保留时间为 5.5 min 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）。
5. 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烟酸的峰面积。
6. 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
10 min	3	97
10.1 min	60	40
20 min	60	40
20.1 min	0	100
30 min	0	100

三、烟酸含量计算

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

1. 组织样本

烟酸的含量（ μ 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，1 mL（0.6mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水）； 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

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

$V_{\text{提取}}$ ：加入提取液总体积，1 mL（0.6mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水）；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。

3. 血清样本

烟酸的含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样本}} \times F = 2x \times F$

V 提取: 提取液总体积, 1 mL (0.5mL 血清+0.1mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水); V 样本: 加入样本体积, 0.5 mL; 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烟酸的浓度确定, 样品中烟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。若样本中烟酸浓度过高, 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。