

叶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: AC10751

规格:50T/48S

产品简介：

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啶、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 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))、30~50 目筛、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℃ 保存。

试剂一：液体 5 mL ×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 1.5 mL ×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 1 mL 0.05mol/L KOH 配制成 5 mg/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 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。

操作步骤：

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 0.1 g 样本(新鲜样本：剪碎；烘干样本：研磨过筛)，加入 0.6 mL 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 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，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℃ 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℃，流速为 1 mL/min，紫外检测器：波长为 210 nm。单个样本走样时间 25 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 25 min 内可分离出叶酸，叶酸的保留时间为 20.5 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叶酸的峰面积。
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
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

叶酸的含量(μ 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，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。

2. 细胞样本

叶酸的含量(μ g/ 10^4 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 提取：加入提取液总体积，1 mL；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。