

## 烟酸含量检测试剂盒（高效液相色谱法HPLC）

产品货号：BA2249

产品规格：50T/48S

### 产品说明：

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))、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蒸馏水配制成5mg/mL烟酸标准溶液，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的烟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℃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、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0.1g样本，加入0.6mL提取液，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0.5mL血清，加入0.1mL提取液，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10μL，柱温：30℃，流速为1mL/min，紫外检测器：波长为210nm。单个样本走样时间10min，设置完毕保存方法组。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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 $\mu$ L，在10min内可分离出烟酸，烟酸的保留时间为5.5min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 $\mu$ L，在相应的保留时间处检测烟酸的峰面积。
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
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( $\mu$ 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  $x$ ( $\mu$ g/mL)。

#### 1. 组织样本

烟酸的含量( $\mu$ 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 (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( $\mu$ g/10<sup>4</sup>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，1mL (0.6mL提取液+0.1mL试剂一+0.3mL蒸馏水)；细胞数量：单位 10<sup>4</sup>；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 ( $\mu$ 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，1mL (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，0.5mL；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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com