

## 维生素 B9 含量试剂盒说明书

### HPLC 法 50 管/48 样

#### 测定意义：

维生素是人和动物为维持正常的生理功能而必须从食物中获得的一类微量有机物质，在人和动物生长、代谢、发育过程中发挥着重要的作用。维生素大致可分为脂溶性和水溶性两大类，水溶性维生素主要包括维生素 C 和 B 族维生素。

维生素 B9 又叫叶酸（folic acid），是人体细胞生长和造血过程中所必需的营养物质。天然叶酸极不稳定，易被氧化，人类如缺乏叶酸可引起细胞性贫血以及舌炎，对孕妇尤其重要。

#### 测定原理：

维生素 B9 在 210 nm 下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

#### 需自备的实验用品：

高效液相色谱仪、低速离心机、溶剂抽滤装置、氮吹仪、涡旋振荡器、针头式过滤器（有机系，50 个，0.22 $\mu$ m）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45 $\mu$ m）、耐水 C18 柱（4.6  $\times$  250 mm）、可调式移液器、样品瓶（50 个，2mL）、内衬管（50 个，放置在样品瓶内用于微量样品进样）、乙腈（色谱级，100 mL）和超纯水。

#### 试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存（提取液）；

试剂二：液体 10mL $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存（0.01M NaOH）；

试剂三：维生素 B9 标准品 0.5mg $\times$ 1 支，-20 $^{\circ}$ C 保存。

#### 实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 1000 mL 和乙腈 100 mL 用 0.45  $\mu$ m 的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。（注：蒸馏水用水系滤膜抽滤，甲醇用有机系滤膜抽滤）。
- 2、流动相 A：0.05mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液（含 0.2%三乙胺，pH6.0）-乙腈（97:3），即 970mL 水+6.6g 磷酸二氢钾+1.94mL 三乙胺+30mL 三乙胺；流动相 B：甲醇。A 和 B 比例为 90:10。
- 3、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

#### 维生素 B9 的提取：

称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，冰水浴超声 30 min。8000g 离心 10min，取上清液，针头式过滤器过滤后待测。操作过程注意低温、避光。。

#### 标准品的配制：

在试剂三中加入 1mL 试剂一，配成 500 $\mu$ g /mL 母液，将母液用试剂一分别稀释成 40  $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g /mL 和 10  $\mu$ g /mL 的维生素 B9 标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

---

#### 维生素 B9 含量测定操作步骤：

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 10  $\mu\text{L}$ ，流速 0.8 mL/min，柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ，保留时间 10min，检测波长 210 nm，设置完毕保存方法组。
2. 用流动相过柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 加入标准品 10  $\mu\text{L}$ ，在 20min 内可分离维生素 B9，维生素 B9 的保留时间在 13min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的维生素 B9 标准品的峰面积。
4. 加入样品 10  $\mu\text{L}$ ，在相应保留时间处检测维生素 B9 的峰面积。

#### 维生素 B9 含量的计算：

以标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）为横坐标，峰面积为纵坐标计算维生素 B9 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品维生素 B9 含量。

#### 注意事项：

- 1、整个操作过程应注意低温、避光。
- 2、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 3、标准品的稀释倍数要根据样品中维生素 B9 浓度确定，样品中维生素 B9 的峰面积必须落在不同浓度的维生素 B9 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。