

维生素 D3 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: BC4884

规格: 50T/48S

产品简介：

维生素 D3 是一种脂溶性维生素。维生素 D3 的生物学功能与其代谢产物钙三醇密切相关，主要功能包括提高机体对钙和磷的吸收、促进新骨的生成及钙化、调节肝脏中钙结合蛋白质的合成等。

维生素 D3 在 265 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（ZORBAX Extend C18 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、混匀仪、EP 管、针头式过滤器（有机系）、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 60 mL ×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：粉剂 ×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加入 1 mL 甲醇配制成 5 mg/mL 维生素 D3 标准溶液，4℃ 密封保存，避免阳光直射。

实验前准备工作：

1. 将甲醇（色谱纯）用有机系滤膜抽滤。
2. 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 的维生素 D3 标准溶液用甲醇稀释成 1000 μg/mL、500 μg/mL、100 μg/mL、20 μg/mL、4 μg/mL、0.8 μg/mL 的维生素 D3 标准溶液。4℃ 避光保存（密封），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。

操作步骤：

一、维生素 D3 的提取：

按组织质量（g）：提取液体积（mL）1:5~10 比例进行提取，建议称取约 0.2 g 样本，加入 1 mL 提取液，冰浴匀浆，室温条件下密封避光漩涡剧烈震荡 30 min 后 10000 rpm 离心 10 min，取上清液，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。

二、测定步骤：

1. 开启电脑、打开高效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 μL，柱温 30℃，流速为 1 mL/min，紫外检测器波长为 265 nm。单个样本走样时间 15min，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 μL，在 15 min 内可分离出维生素 D3，维生素 D3 的保留时间约为 10 min（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 μL，在相应的保留时间处检测维生素 D3 的峰面积。

注意：单个样本测定完成后注意样本物质是否还有残留，必要时可相应延长后运行时间进行色谱柱

的清洗。

三、维生素 D3 含量计算

以标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标 x ，峰面积为纵坐标 y 绘制维生素 D3 的标准曲线，将样本的峰面积代入标准曲线 $y=kx+b$ ，计算提取液中维生素 D3 的浓度 x ($\mu\text{g/mL}$)。

$$\text{维生素 D3 的含量 } (\mu\text{g/g}) = x \times V_{\text{提取}} \div W \times F = x \div W \times F$$

$V_{\text{提取}}$ ：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。

注意事项

1. 测试完毕后，需要用高浓度的超纯水相清洗色谱柱（约 20-30 个柱体积），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维生素 D3 的浓度确定，样品中维生素 D3 的浓度必须在标准品溶液的浓度范围之内，该标准品的稀释倍数只是一个参考。若样本中维生素 D3 浓度过高，建议稀释后再测。
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，待测溶液测试前须放置至室温状态。
4. 为了排除溶剂的影响，可进行一次空白检测。