

维生素 D3 含量试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

注意：本试剂盒适用于维生素 D3 含量大于 1 μ g/mL 的待检样本的检测，正式测试之前请做预实验！

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，脂溶性维生素主要包括维生素 A、维生素 D、维生素 E 和维生素 K。

维生素 D3 是维生素 D 在自然界中最常见的一种，又叫胆钙化醇（Cholecalciferol），由大多数高级动物的表皮和真皮内含有的 7-脱氢胆固醇经紫外线（波长 265~228nm）照射转变而成。维生素 D3 也被看作是一种作用于钙、磷代谢的激素前体。

测定原理：

维生素 D3 在 254 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 μ m）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45 μ m）、C18 柱（4.6 ×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）、甲醇（色谱级，800 mL）和超纯水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 8mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂四：液体 75mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：维生素 D3 标准品 0.5mg×1 支，-20℃ 保存。

实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 100 mL 和甲醇 1000 mL 用 0.45 μ 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、流动相的配制：将甲醇和超纯水按照 98：2 的比例配成流动相，可取 980mL 甲醇和 20mL 超纯水混合，混匀。
- 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 D3 的提取：

- 1、血清的处理：取 0.1mL 血清，置于 1.5mL 有盖离心管中，加入 0.1mL 试剂一，涡旋 1min，加入 0.5mL 试剂二，涡旋 2min，8000g 离心 10min，分层后取上层液体于另一 1.5mL 离心管中，氮气吹干，加入 0.2mL 甲醇，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。
- 2、组织的处理：取 0.1g 组织，依次加入 0.1mL 试剂三和 1mL 试剂四，冰浴匀浆，转移到 2mL 有盖离心管中，涡旋 1min，70℃ 水浴 30min 并且震荡 6~8 次，冷却至室温，加入 1mL 试剂二，涡旋 1min，8000g 离心 5min，取上层液体至 1.5mL 离心管中，氮气吹干，加入 0.2mL 甲醇，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。

标准品的配制：

在试剂五中加入 1mL 甲醇，配成 500 μ g /mL 母液，将母液用甲醇分别稀释成 40 μ g/mL、30 μ g/mL、20 μ g /mL 和 10 μ g /mL 的维生素 D3 标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

维生素 D3 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 μ L，流速 1.2 mL/min，柱温 35 $^{\circ}$ C，保留时间 20min，检测波长 254nm，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 μ L，在 10min 内可分离维生素 D3，维生素 D3 的保留时间在 14min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的维生素 D3 标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μ L，在相应保留时间处检测维生素 D3 的峰面积。

维生素 D3 含量的计算：

以标准品浓度（ μ g/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标计算维生素 D3 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品维生素 D3 含量。

注意事项：

- 1、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 2、使用完毕时，用 50%的甲醇洗色谱柱 30min。
- 3、标准品的稀释倍数要根据样品中维生素 D3 浓度确定，样品中维生素 D3 的峰面积必须落在不同浓度的维生素 D3 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。