

20-羟基蜕皮酮（20E）含量测试盒说明书

HPLC 法 50 管/48

样

请客户正式实验前做预实验确定样本稀释倍数！注意事项必读！

测定意义：

20-羟基蜕皮酮（20E）是在调控昆虫或甲壳动物的生长、变态、繁殖和滞育方面具有重要作用的内源甾醇类化合物，广泛存在于昆虫等无脊椎动物体内。在昆虫中，除了诱导幼虫蜕皮外，蜕皮激素对成虫生殖、滞育及胚胎发生等也起到一定的调节作用。

测定原理：

20-羟基蜕皮酮在 254 nm 具有紫外吸收，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、氮吹仪、涡旋振荡器、溶剂抽滤装置、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 $\times$ 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）、甲醇（色谱级，600 mL）和超纯水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体一瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；

试剂二：液体一支，4 $^{\circ}$ C 保存；

试剂三：20-羟基蜕皮酮标准品 0.5 mg $\times$ 1 支，-20 $^{\circ}$ C 保存。

实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 400 mL 和甲醇 600 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 60：40 的比例混合配成流动相，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。

20-羟基蜕皮酮的提取：

- 1、血淋巴的处理：取 0.2 mL 血淋巴，置于 1.5 mL 有盖离心管中，加入 1 mL 试剂一，涡旋 2 min，4 $^{\circ}$ C 浸提过夜。8000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清，氮气吹干，加入 1 mL 水，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。
- 2、动物组织的处理：称取 0.5 g 供试品，加入适量液氮进行研磨，磨碎后加入 1 mL 试剂一，转移至 2.0 mL 有盖离心管中，4 $^{\circ}$ C 浸提过夜。8000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清，加入 500 μ L 试剂二，涡旋震荡 30 s，静置分层后弃去上层液体。将余下液体氮气吹干，加入 1 mL 水，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。

标准品的配制：

在试剂三中加入 1mL 甲醇，配成 500 μ g /mL 母液，将母液用甲醇分别稀释成 15 μ g/mL、

10 ug/mL、5 ug/mL 和 1 ug/mL 的 20-羟基蜕皮酮标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

20-羟基蜕皮酮含量测定操作步骤：

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 0.8 mL/min，柱温 30℃，保留时间 10 min，设置紫外检测器波长 254 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 μ L，在 10 min 内可分离 20-羟基蜕皮酮，20-羟基蜕皮酮的保留时间在 5.2 min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的 20-羟基蜕皮酮标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μ L，在相应保留时间处检测 20-羟基蜕皮酮的峰面积。

20-羟基蜕皮酮含量的计算：

以标准品浓度（ug/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标计算 20-羟基蜕皮酮标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品 20-羟基蜕皮酮含量。

注意事项：

- 1、本试剂盒检测限为 1 ug/mL，若 20E 含量低于该浓度需要对样品浓缩。
- 2、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 3、使用完毕时，用 100%的甲醇冲洗色谱柱 30min。
- 4、标准品的稀释倍数要根据样品中 20-羟基蜕皮酮浓度确定，样品中 20-羟基蜕皮酮的峰面积必须落在不同浓度的 20-羟基蜕皮酮标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。