

保幼激素 3 (JH3) 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：

保幼激素(juvenile hormone, JH)是一类高萜烯类化合物,它由昆虫的咽侧体分泌,具有控制变态和调节生殖器官发育的作用。大量的研究证实在昆虫的多型现象中(如社会性昆虫的多级现象,昆虫的不同型,体色、飞行肌及翅型分化等等),JH 起着重要的作用。大多数昆虫体内只有 JH3 存在。

测定原理：

保幼激素 3 在 218 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,800 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(甲醇：乙醚=1:1 或者流动相)；

试剂二：液体一支,4 $^{\circ}$ C 保存(正己烷)；

试剂三：保幼激素 3 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 200 mL 和甲醇 800 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 80：20 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。

保幼激素 3 的提取：

动物组织的处理：称取 0.1 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,超声提取 15min。加入 0.5mL 正己烷,继续超声提取 15min。8000g 离心 10min,取上层清液,氮气吹干。加入 150 μ L 流动相,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 流动相,配成 500 μ g/mL 母液,将母液用甲醇分别稀释成 5 μ g/mL、1 μ g/mL、0.75 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL 的保幼激素 3 标准品溶液。针头式过滤器过

滤后待测。

保幼激素 3 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 μL ，流速 0.8 mL/min，柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ，保留时间 15 min，设置紫外检测器波长 218 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 μL ，在 10 min 内可分离保幼激素 3，保幼激素 3 的保留时间在 12 min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的保幼激素 3 标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μL ，在相应保留时间处检测保幼激素 3 的峰面积。

保幼激素 3 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保幼激素 3 标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品保幼激素 3 含量。

注意事项：

- 1、本试剂盒检测限为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ，若 JH3 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保幼激素 3 浓度确定，样品中保幼激素 3 的峰面积必须落在不同浓度的保幼激素 3 标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。