

孕酮含量试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

注意：本试剂盒适用于孕酮含量大于 1ug/mL 的待检样本的检测，正式测试之前请做预实验！

测定意义：

孕酮又名黄体酮、助孕素，主要由黄体 and 胎盘产生，肾上腺皮质、睾丸和排卵前的卵泡也能产生少量的孕酮。孕酮是一种类固醇激素，极微量即可对生物体产生影响。

测定原理：

孕酮在 288 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、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，0.22μm）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45μm）、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 30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：孕酮标准品 0.5mg×1 支，-20℃保存。

实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 300 mL 和甲醇 800 mL 用 0.45 μm 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 75：25 的比例配成流动相，可取 750mL 甲醇和 250mL 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。

孕酮的提取：

- 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、药物的处理：称取 0.1g 供试品，加入 1mL 试剂三研磨溶解，转移至 1.5mL 有盖离心管中，超声 15min，加入 0.1mL 试剂一，涡旋 1min，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。

标准品的配制：

在试剂四中加入 1mL 甲醇，配成 500μg /mL 母液，将母液用甲醇分别稀释成 40 μg/mL、30μg/mL、20μg /mL 和 10 μg /mL 的孕酮标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

孕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 μL，流速 1.0 mL/min，柱温 30℃，保留时间 20min，检测波长 288nm，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 20min 内可分离孕酮，孕酮的保留时间在 18min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的孕酮标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μL ，在相应保留时间处检测孕酮的峰面积。

孕酮含量的计算：

以标准品浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）为横坐标，峰面积为纵坐标计算孕酮标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品孕酮含量。

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孕酮浓度确定，样品中孕酮的峰面积必须落在不同浓度的孕酮标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。