

褪黑素 (MT) 含量试剂盒说明书

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：

褪黑素 (melatonin, MT) 是广泛存在于包括人类在内的动物、原核生物、植物中的一种吲哚类小分子。在动物体内，褪黑素具有改善睡眠、减缓衰老、提高机体免疫力、预防和治疗抑郁症等多重功效。人体可以通过食用富含褪黑素的食物提高体内褪黑素水平。

测定原理：

褪黑素具有荧光吸收，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 (荧光检测器)、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, 400 mL) 和超纯水。

试剂的组成和配制：

- 试剂一：粉剂一瓶，室温保存；
- 试剂二：液体一支，室温保存；
- 试剂三：液体 60 mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；
- 试剂四：液体 60 mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；
- 试剂五：褪黑素标准品 0.5mg \times 1 支，-20 $^{\circ}$ C 保存。

实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 600 mL 和甲醇 400 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：依次称取 2.15 g 试剂一和量取 500 μ L 试剂二加入 600 mL 过滤后的超纯水中，充分混匀溶解。将甲醇和超纯水按照 40: 60 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。

褪黑素的提取：

- 1、血清的处理：取 0.4mL 血清，置于 1.5mL 有盖离心管中，加入 0.6 mL 试剂三，涡旋 3 min, 10000g 离心 10min, 分层后弃去上层水相，将余下液体氮气吹干，加入 0.2 mL 甲醇，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。
- 2、植物组织的处理：称取 1.0 g 供试品，加入适量液氮进行研磨，磨碎后加入 1 mL 试剂四，转移至 2.0 mL 有盖离心管中，25 $^{\circ}$ C 超声 30 min, 10000 g 离心 10 min, 分层后取上层液体于另一 2.0 mL 离心管中，氮气吹干，加入 0.2 mL 甲醇，涡旋震荡溶解，用针

头式滤器过滤后待测。

标准品的配制：

在试剂四中加入 1mL 甲醇，配成 500 μ g /mL 母液，将母液用甲醇分别稀释成 800 pg/mL、600 pg/mL、400 pg /mL 和 200 pg /mL 的褪黑素标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

褪黑素含量测定操作步骤：

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 $^{\circ}$ C，保留时间 18 min，设置荧光检测激发波长 280 nm、发射波长 340 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 25 min 内可分离褪黑素，褪黑素的保留时间在 18 min 左右，（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的褪黑素标准品的峰面积。
4. 加入样品 10 μ L，在相应保留时间处检测褪黑素的峰面积。

褪黑素含量的计算：

以标准品浓度（pg/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标计算褪黑素标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品褪黑素含量。

注意事项：

- 1、本试剂盒检测限为 200 pg/mL，若 cGMP 含量低于该浓度需要对样品浓缩，或选择 cGMP 含量 ELISA 试剂盒进行测定。
- 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，依次用 20%和 100%的甲醇各冲洗色谱柱 30min。
- 4、标准品的稀释倍数要根据样品中褪黑素浓度确定，样品中褪黑素的峰面积必须落在不同浓度的褪黑素标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。