

总生物碱含量测定试剂盒说明书

(货号: G0150W 微板法 96 样)

一、产品简介:

生物碱是存在于生物体内的含氮有机化合物, 大多数存在于植物中, 目前已分离到三千余种, 其中近百种具有很强的生理活性, 广泛应用于临床医疗。

利用生物碱与溴甲酚绿反应生成黄色物质, 该物质在 415nm 有特征吸收峰, 通过检测 415nm 的增加量即可得出样本中总生物碱含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	临用前按照二氯甲烷: 甲醇: 提取液(试剂盒提供)以 40:10:1 的比例混匀, 备用。
试剂一	A: 粉体 mg×1 支 B: 液体 1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂二	液体 9.4mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔 UV 板、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、二氯甲烷、甲醇。

四、总生物碱含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

样本经 60℃ 烘干, 打碎过筛, 取 0.05 g 过筛后样本至 2mLEP 管中, 加入 1mL 提取液, 室温震荡提取 30 min, 超声提取 30 min (间隔 3min 拿出震荡 1min 再继续超声); 最终用提取液补足至 1mL 液面位置, 然后室温 4000rpm 离心 10min, 取上清液测定。

2、上机检测:

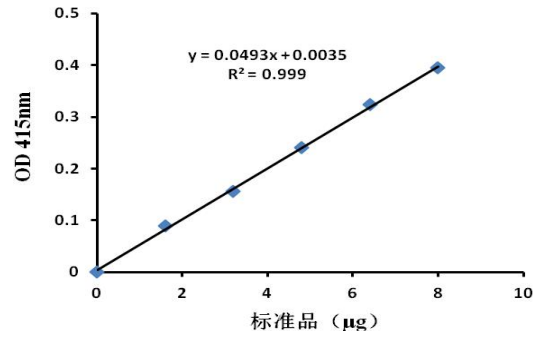
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 415nm。
- ② 临用前配置工作液: 取 0.6mL 试剂一 B 液至 A 中, 混匀完全溶解。再全部转移至试剂二中, 混匀备用。在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	40	
二氯甲烷	400	400
蒸馏水	200	200
工作液	80	80
上下震荡 (手动) 5min, 室温 (25℃) 静置 30min, 取下层 200μL 澄清液体至 96 孔 UV 板中, 于 415nm 处快速读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【注】:** 1. 若 ΔA 差值低于 0.01, 可增加样本取样质量 W 或加大样本体积 V1 (如增至 100μL, 则二氯甲烷相应减少), 则改变后的 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 A 测定大于 1, 可对样本上清用二氯甲烷稀释, 则稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0493x + 0.0035$ ；x 为标准品质量 (μg)；y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总生物碱含量}(\mu\text{g/g 重量}) &= [(\Delta A - 0.0035) \div 0.0493] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 507.1 \times (\Delta A - 0.0035) \div W \times D \end{aligned}$$

V---提取液的总体积，1mL；

V1---加入反应体系样本体积，0.04mL；

W---样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：向标准品 EP 管中加入 1mL 二氯甲烷溶解。
- 2 把母液用二氯甲烷稀释成以下浓度梯度的标准品：0，40，80，120，160，200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。