

尿素含量（二乙酰一肟法）检测试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

在加热和强酸条件下，尿素与二乙酰一肟及安替比林反应呈黄色，在波长460 nm 处有特征吸收峰。通过检测生成的黄色物质在460nm处的增加量进而得出样本中尿素含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，先加 2.4mL 蒸馏水溶解，再缓慢加 2.4mL 磷酸混匀，最后再加 4.8mL 硫酸混匀，冷却至室温备用。
标准管	粉体 mg×2 支	4°C保存	临用前每支加 1mL 蒸馏水溶解（4mg/mL），再用蒸馏水稀释 40 倍（1:39）成 0.1mg/mL。

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、移液器、离心机、蒸馏水。

四、尿素含量检测：

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：

- ① 组织样本：0.1g 组织样本，加 1mL 的蒸馏水研磨，超声萃取 10min 后定容至 1mL，室温静置 30min，12000rpm，常温离心 10min，上清液待测。
- ② 液体样品：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 37°C，设定波长到 460nm。
- ② 做实验前选取 2 个样本，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D。
- ③ 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	空白管 （仅做一次）	标准管 （仅做一次）
样本	50	50		
蒸馏水		20	50	
标准品				50
试剂一	20		20	20
试剂二	40	40	40	40
混匀，95°C沸水浴反应 20min				
蒸馏水	190	190	190	190
混匀，（若浑浊则 5000rpm 室温离心 5min 后取上清液测定）取 200μL 至 96 孔板中，于 460nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。				

【注】：测定管的 A 值若超过 1.5，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、按照组织质量计算：

尿素含量(mg/g)=(C 标准×V1)×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×W)×D=0.1×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷W×D

尿素含量(mg/kg)=(C 标准×V1)×10³×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×W)×D=100×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷W×D

尿素氮含量(μg/g)=(C 标准×V1)×ΔA÷(A 标准-A 空白)÷(V1÷V×W)×D×10³÷60.04×2×14

$$=46.64 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D$$

2、按照液体体积计算:

$$\text{尿素含量(mg/mL)} = (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V1 \times D = 0.1 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D$$

$$\begin{aligned} \text{尿素氮含量(mg/dL)} &= (C \text{ 标准} \times V1) \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div V1 \times D \times 100 \div 60.04 \times 2 \times 14 \\ &= 4.664 \times \Delta A \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---尿素标品浓度, 0.1mg/mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

60.04---尿素分子量;

2---一分子尿素含有 2 个氮元素;

14---氮元素分子量;

W---取样质量, g;

V---提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL。
