

咖啡因 (Caffeine) 含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

咖啡因是一种黄嘌呤生物碱化合物，是一种中枢神经兴奋剂，能够暂时的驱走睡意并恢复精力，临床上用于治疗神经衰弱和昏迷复苏。咖啡因广泛存在于咖啡、茶、软饮料及能量饮料中。

测定原理：

咖啡因易溶于水，去除干扰物质后，在 274nm 下测定吸光值计算其含量。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔 UV 板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 1.5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 3mL×1 瓶，4℃保存。

咖啡因提取：

样本烘干粉碎，取 0.01g 样本，加入 1.5mL 蒸馏水，沸水浴加热 45min，期间每隔 10min 震荡一次。取出冷却后 8000g 25℃离心 10min，取上清待测。

测定步骤：

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 274nm。
- 2、准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）
- 3、样本测定

按下表在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本上清	100	
蒸馏水		100
试剂一	40	40
试剂二	10	10
蒸馏水	850	850
充分混匀， 8000g 25℃离心 10min，取上清		

另取 2mL EP 管，加入 500μL 上一步上清，再加入 20μL 试剂三和 480μL 蒸馏水。充分混匀，8000g 25℃离心 10min，取上清 200μL 加入 96 孔 UV 板，274nm 下测定吸光值，分别记为 A 测定与 A 空白，空白管只需做一管。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$

咖啡因含量：

标准曲线为 $y = 23.68x + 0.1162$ ， $R^2 = 0.9992$ ；其中 x 为标准品浓度 mg/mL，y 为吸光值 ΔA
 咖啡因 (mg/g 干重) $= (\Delta A - 0.1162) \div 23.68 \times V_{\text{样}} \div W$

$$= 1.267 \times (\Delta A - 0.1162) \div W$$

V 样：样本总体积，30mL； W：样本质量，0.01g。