# 液相色谱法测定饮料中咖啡因、可可碱和茶碱

王嘉琦，贾丽，夏敏

（北京市理化分析测试中心，北京 100089）

**摘要：**采用高效液相色谱法同时测定饮料中的咖啡因、可可碱和茶碱。饮料样品经超声提取后，用高效液相色谱分离，二极管阵列检测器检测，建立标准工作曲线，以外标法定量。实验精密度为 0.58%~1.85%，添加回收率范围为 80.2%~96.4%。此方法快速，简便，准确，适用于饮料中咖啡因、可可碱和茶碱的测定。

**关键词：**咖啡因；可可碱；茶碱；高效液相色谱法

**文章篇号：**1673-9078(2011)1-114-116

# Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Drinks by HPLC

**WANG Jia-qi, JIA Li, XIA Min**

(Beijing Center for Physical & Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

**Abstract:** A method for the determination of caffeine, theobromine and theophylline in drinks by HPLC was established. The drinks were extracted with water, separated by HPLC and then detected by photo-diode-array detector. Quantitative analysis was performed with external standard method. The relative standard deviations and recovery range were obtained of 0.58%~1.85% and 80.2%~96.4%, respectively. This simple method was suitable to detect the concentration of caffeine, theobromine and theophylline in drinks.

**Key words:** caffeine, theobromine, theophylline, HPLC

咖啡因是可可碱甲基化后的产物，是一种黄嘌呤生物碱化合物，它具有提神醒脑等刺激中枢神经作用[1]。在可乐饮料中，为了调节和改善口味和延长保质期，加入了食品添加剂如苦味剂-咖啡因[2]。咖啡因能够暂时的驱走睡意并恢复精力，适度地使用有祛除疲劳、兴奋神经的作用，但是，大剂量或长期使用也会对人体造成损害。可可碱分子式 $C_7H_8N_4O_2$，和茶碱是同分异构体，医药上可可碱具有利尿、心肌兴奋、血管舒张、平滑肌松弛等作用。茶碱是甲基嘌呤类药物，具有强心、利尿、扩张冠状动脉、松弛支气管平滑肌和兴奋中枢经系统等作用。主要用于治疗支气管哮喘、肺气肿、支气管炎、心脏性呼吸困难。它们作为重要原料经常被添加到食品和饮料当中，当达到一定剂量后，会对人体产生危害。

目前饮料中咖啡因的测定方法有薄层色谱法、紫外分光光度法、气相色谱法和高效液相色谱法等[3]。咖啡因、可可碱和茶碱结构和性质都很相似，本文主要对这三种物质进行研究，建立一种快速，简便的测定方法，与薄层色谱法[4]相比，预处理简单，通过优化色谱条件，使得三种物质分离好，灵敏度高，此外精密度、检出限和回收率的实验验证，证明此方法准确可行。

收稿日期：2010-09-02

基金项目：北京市科技计划研发攻关项目（Z09090501040906）

作者简介：王嘉琦（1984-），男，研究实习员，研究方向：食品检测

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

咖啡因、可可碱和茶碱标准品均为分析纯；甲醇为色谱纯，水为二次去离子水；

仪器：Waters2695 高效液相色谱仪配二极管阵列检测器。

### 1.2 色谱条件

流动相：A 甲醇，B 水，梯度洗脱（见表 1）；进样量：10 L；柱温：25 ℃。

色谱柱：Zorbax $C_{18}$ （4.6×250 mm）；检测波长：271 nm；流速：1.0 mL/min；

### 1.3 样品预处理

准确量取 5.0 mL 饮料样品，用二次去离子水稀释定容至 50 mL，40 ℃超声提取，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，经高效液相色谱测定。

### 1.4 标准溶液的配制

分别准确称取 0.0100 g 咖啡因、0.0100 g 可可碱、0.0100 g 茶碱于 10.0 mL 容量瓶中，分别用甲醇定容至刻度，得标准储备液各 1000 g/mL，分别移取 1.0 mL 标准储备液于 10.0 mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度，得标准混合中间液 100 g/mL。

表 1 流动相比例

**Table 1 Design of the ratio of solvent A to**

| min | A | B |
|---|---|---|
| 0.0 | 25 | 75 |
| 3.0 | 25 | 75 |
| 5.0 | 40 | 60 |
| 10.0 | 40 | 60 |
| 10.5 | 25 | 75 |
| 12.0 | 25 | 75 |

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

#### 2.1.1 检测波长的选择

用紫外可见分光光度计对三种物质进行扫描，可可碱最佳波长为 270 nm；茶碱为 273 nm；咖啡因为 271 nm，因此确定检测波长为 271 nm。

#### 2.1.2 流动相的选择

本实验最初用等度洗脱，流动相比例为甲醇:水(40:60)，以市售饮料样品做加标回收实验，发现样品基质与标准物质峰重叠在一起无法分离，如图 1。

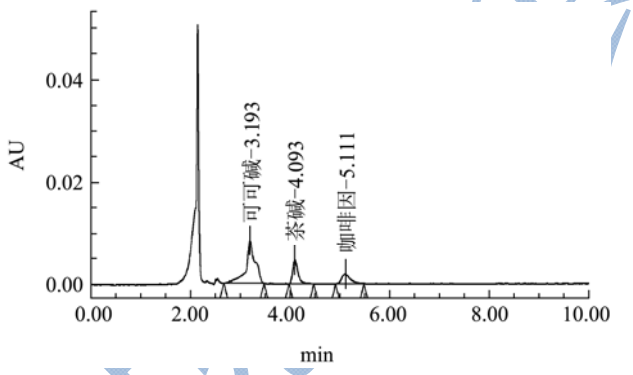



图 1 添加混合标准物质后样品色谱图

**Fig.1 HPLC chromatography of the sample containing standards**

尝试采用梯度洗脱，样品基质与标准物质很好的分离，无干扰影响，因此采用梯度洗脱方法，见图 2。

#### 2.1.3 柱温的选择

本实验分别采用 20 ℃、25 ℃、30 ℃、40 ℃的柱温进行实验，结果表明，随着温度的升高，所测物质的保留时间逐渐提前，为了节省分析时间、有利于色谱柱使用寿命并防止杂质峰的干扰，故实验选择 25 ℃柱温。

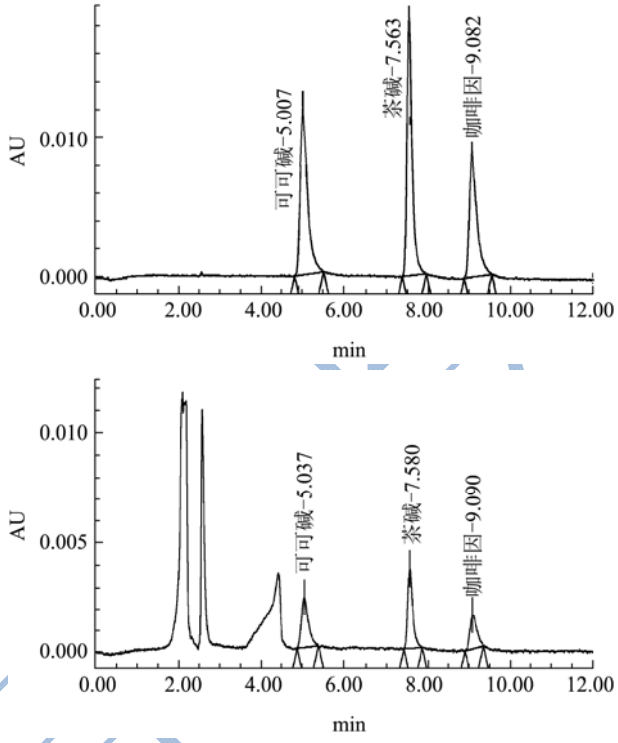



图 2 标准物质色谱图和添加混合标准物质后样品色谱图

**Fig.2 HPLC chromatography of the standards and the samples containing standards**

### 2.2 标准曲线的的绘制

用甲醇配制成咖啡因、可可碱和茶碱浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 g/mL 的混合标准系列，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标作标准曲线，外标法定量，得线性方程为：

咖啡因：y=22859x+31.25；相关系数：$r^2$=0.9995

可可碱：y=30519x-592.65；相关系数 $r^2$=1.0000

茶碱：y=32250x-251.91；相关系数 $r^2$=0.9999

### 2.3 检出限

用 0.1 g/mL 的标准溶液进样，以 3 倍信噪比求出最低检出限，以 1.0 g/mL 标准溶液进样测定，得该方法精密度(n=6)，测定结果见表 2。

表 2 各物质检出限及精密度

**Table 2 Detection limit and decision of the detected compounds**

| 物质名称 | 检出限/(g/mL) | 精密度/% |
|---|---|---|
| 咖啡因 | 0.08 | 1.8458 |
| 可可碱 | 0.05 | 0.8492 |
| 茶碱 | 0.05 | 0.5789 |

### 2.4 回收率

对市售样品健力宝分别加入混合标准对照品，按照 1.3 饮料样品预处理方法，经液相色谱检测，得到三种物质的回收率范围，结果见表 3。

2.5 样品测定

本文对市场上销售的若干个品牌饮料进行可可碱、茶碱和咖啡因检出情况调查，按照前处理方法，进行测试，结果部分运动饮料中检出有咖啡因。浓度达到 100~200 g/mL。

表 3 回收率实验结果（n=6）

**Table 3 Results of the recovery test**

| 物质名称 | 原有含量 /(g/mL) | 添加浓度 /(g/mL) | 检出浓度 /(g/mL) | 回收率 /% |
|---|---|---|---|---|
| 可可碱 | <0.050 | 0.100 | 0.0831 | 83.1~90.4 |
| | | 0.200 | 0.1745 | |
| | | 1.000 | 0.9043 | |
| 茶碱 | <0.050 | 0.100 | 0.0880 | 88.0~96.4 |
| | | 0.200 | 0.1835 | |
| | | 1.000 | 0.9642 | |
| 咖啡因 | <0.080 | 0.100 | 0.0802 | 80.2~90.8 |
| | | 0.200 | 0.1789 | |
| | | 1.000 | 0.9078 | |

## 3 结论

本方法应用高效液相色谱法，预处理超声脱气饮料中的二氧化碳，二氧化碳的大量存在会对测定结果产生影响。流动相为甲醇/水体系，成本较低。回收率范围 80.2~96.4%，相比于薄层色谱法，操作简便快速，重现性和精密度高。可做为测定饮料中咖啡因、可可碱和茶碱的检测方法。

## 参考文献

[1] 王春荣,张济,刘岚铮.反相高效液相色谱法测定饮料中的咖啡因[J].预防医学论坛.2005,11(1):59-60

[2] 张帆,贺学峰,汪学楷.高效液相色谱法测定饮料中食品添加剂的含量[J].四川大学学报(工程科学版),2000 34(4):56-58

[3] 沈其元.高效液相色谱法测定饮料中的咖啡因[J].环境与职业医学,2002,19(5):329

[4] 赵清岚,杨静,白冰,等.薄层扫描法同时测定绿茶中的EGCG、ECG 和咖啡因[J].河南大学学报（自然科学版）.2009,39(3):256-258

现代食品科技