拟反相色谱法测定儿童巧克力食品中的咖啡因含量

董丽丽，李敏，于玲，李东风
（邢台学院生物化学系，河北邢台 054001）

摘要：建立了儿童巧克力食品中咖啡因含量的快速检测新方法。采用拟反相色谱法以极性硅胶柱配以高水量的流动相，5 分钟内快速完成样品测定。其最佳测定条件为乙腈-甲酸钠溶液（0.03 mol/L，pH 2.9）（5:95）。在线性范围 0.2~1000 μg/mL 内，线性关系良好，r=0.9995（n=5），检出限（S/N=3）为 0.05 μg/mL。回收率范围为 96.5~104.3%，精密度测试结果 RSD%<4.8%。由于分析时间短，而且流动相中乙腈的比例只占 5%，极大降低了有机溶剂的消耗和排放，节约测试成本的同时减少了对环境的污染。将其用于多种巧克力食品中咖啡因含量的测定，结果快速、准确、选择性高，可用于食品中咖啡因含量的常规测定，尤其适合大批量样品的连续测定。同时还对咖啡因的保留机理进行了探讨。

关键词：咖啡因；巧克力食品；测定；拟反相色谱法；保留机理

文章篇号：1673-9078(2013)7-1730-1733

Rapid Determination of Caffeine in Children's Chocolate-containing Foods by Pseudo Reversed Phase Liquid Chromatography

DONG Li-li, LI Min, YU Ling, LI Dong-feng
(Department of Chemistry, Xingtai College, Xingtai 054001, China)

Abstract: In this paper, a rapid and sensitive method based on pseudo reversed phase liquid chromatography (pseudo-RPLC) was developed for analysis of caffeine in children's chocolate-containing foods. The samples were analyzed on a polar silica column using an aqueous-rich mobile phase (sodium formate 0.03 mol/L, pH 2.9-acetonitrile, *V/V*, 95:5). All the samples were tested within 5 min. In view of less organic modifier (only 5%) in mobile phase and shorter analysis time, it was not only economical, but also environment-friendly. In addition, the assay was validated in the concentration range of 0.2~1000 μg/mL. The proposed method was applied to chocolate-containing foods. Recoveries at the concentration of 20~60 μg/mL ranged from 96.5% to 104.3% with RSD< 4.8%. The present pseudo-RPLC technique proved to be a good alternative of reversed-phase liquid chromatography for the analysis of caffeine in popular chocolate-containing products with the advantages of fast-speed, low-cost and selectivity. Moreover, the retention mechanism of caffeine was discussed.

Key words: Caffeine; children's chocolate products; rapid determination; pseudo reversed phase liquid chromatography, retention mechanism

巧克力味道香醇，是众多小朋友喜爱的食品。制造巧克力的原料可可粉中含咖啡因。咖啡因是一种兴奋剂，同一种类等量的咖啡因对孩子的危害远远大于对成人的危害。加上儿童自我控制力差，对喜爱的食品毫无节制，因此对儿童食品中咖啡因的含量检测是非常必要的。在咖啡因的检测中，最常见的是咖啡、茶、饮料中咖啡因的测定[1~7]，对巧克力食品中咖啡因的检测则相对较少。已报道的测定咖啡因的方法有反相液相色谱法[3,6,7]、气相色谱法[8]、毛细管电泳法[9]、紫外分光光度法[6]等。这些方法中有的快速但准确度不高；有的分离效果好，但分析时间长，测试成本高。所以寻求高效、经济、快速的测定方法一直是研究者的追求目标。

本文根据咖啡因的性质，研究了咖啡因含量的新的液相色谱检验方法。拟反相色谱法[10]是以正相色谱所用的极性色谱柱为固定相，配以反相色谱的含水溶剂为流动相的色谱方法。近年来随着绿色分析化学概念的提出[11]，拟反相色谱由于其流动相中以水为主体，所含有机溶剂的比例极低（一般≤5%），在大量降低测试成本的同时，可减少对环境的污染，因此引起研究者的兴趣[12~14]。但现有的研究文献主要是对不同溶质色谱保留行为的探讨，而利用拟反相色谱进行实际样品分析应用的并不多见。本实验将建立的拟反相液相色谱法用于儿童巧克力食品中咖啡因含量的测定，系统评价了该方法的准确度、可靠性及实用性。本研究是对食品中咖啡因检测方法的补充，可用于样品的日

收稿日期：2013-03-23

作者简介，董丽丽，博士，讲师，主要研究方向为色谱在药物分析中的应用

常测定，同时也可以促进色谱机理的进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪配二极管阵列检测器。

咖啡因标准品由茶叶中提取升华提纯。取适量溶于甲醇制备成浓度为 5.133 mg/mL 标准储备液，使用时用流动相稀释至所需的浓度。

德芙醇黑巧克力、奥利奥巧克力味饼干、阿尔卑斯巧克溢糖、高乐高巧克力饮品均购自当地一家大型超市。

测定中所用乙腈、甲醇、异丙醇为色谱纯，其他试剂为分析纯，水为超纯水。

1.2 样品预处理

巧克力：称取 5.0014 g 巧克力样品于 250 mL 圆底烧瓶中，加入 150 mL 去离子水、2 g 氧化镁，摇匀后加热回流使溶液保持微沸 45 min。冷却至室温，转移至 250 mL 容量瓶中，用去离子水定容，摇匀。

饼干：称取 2.0003 g 粉碎到 20 目的样品置于 25 mL 具塞比色管中，加入 10 mL 甲醇，用去离子水定容，超声振荡 10 min。

糖果：选取 1 块糖果，称重为 6.4113 g，加入 250 mL 超纯水，超声溶解。

高乐高：称取 3.7715 g 高乐高巧克力粉，加 100 mL 水，超声溶解。

所有样品处理后，静置，取上层清液经 0.45 μm 滤膜过滤，稀释 10 倍，进样测定。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Inertsil® HPLC Column 100-5SIL, 150×4.6 mm I.D., 5 μm。

流动相为 0.03 mol//L 甲酸钠溶液（pH=2.9）-乙腈（95:5, *V/V*），流速：1.0 mL/min，进样量 10 μL。检测波长 274 nm。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 有机溶剂类型的影响

咖啡因，1,3,7-三甲基黄嘌呤，三个甲基为嘌呤环供电，使嘌呤环上的电子云密度增大，该分子稳定，极性小。本研究采用拟反相色谱法（极性硅胶柱，高水量流动相的色谱方法）来测定咖啡因。首先考察了流动相中有机溶剂类型对咖啡因保留的影响。分别以甲醇、异丙醇、乙腈3种有机溶剂与甲酸钠缓冲液（0.03 mol/L, pH=2.9）（5:95, *V/V*）为流动相，保持其它条件相同进行实验，所得色谱图见图 1。3 种有机溶剂对溶质的洗脱强度按以下顺序递增，即甲醇<异丙醇<乙腈。由图可见，有机溶剂的类型对咖啡因的保留有着重要的影响。本研究的目的是找到一种快速测定咖啡因的分析方法，由于在乙腈中洗脱时间最短，所得色谱峰最为尖锐、柱效高（n=31600/m），而且峰形对称性好(As=1.161)，而在其它两种体系中都有严重的拖尾现象，所以选择乙腈体系来测定咖啡因。

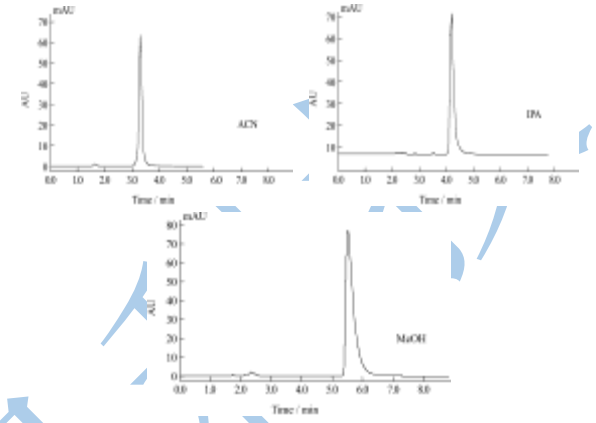


图 1 有机溶剂类型对咖啡因保留的影响

Fig.1 Influence of organic modifier on the retention of caffeine

2.1.2 有机溶剂浓度的影响

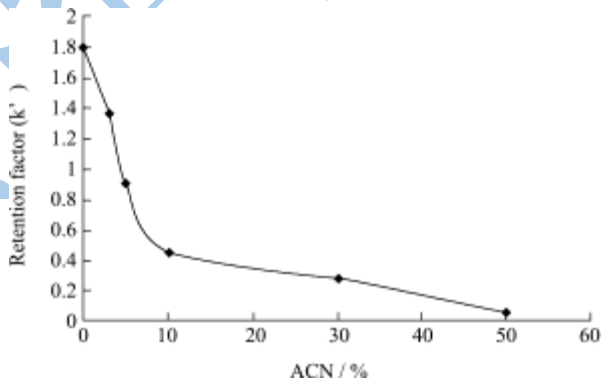


图 2 流动相中乙腈含量对咖啡因保留因子的影响

Fig.2 The effect of ACN content in mobile phase on the retention factors of caffeine

进一步考察了流动相中乙腈的含量对咖啡因保留值的影响（见图 2）。在乙腈含量小于 50%的范围内，随流动相中乙腈含量的增加，溶质的保留值下降，恰巧体现出类似反相色谱的特性。而且在乙腈含量<10%的范围内，乙腈含量的稍微降低却可导致咖啡因保留值急剧增加。通过以上考察实验，为了兼顾咖啡因的充足保留及快速测定，选择乙腈的含量为 5%。

2.1.3 缓冲溶液 pH 的影响

当 pH 值由 2.5 提高到 6.4 的过程中，咖啡因的洗脱时间先是随 pH 值的增加而延长，达到一最大值后，则随 pH 值的增加，保留反而减弱（见图 3），说明溶质的保留机理是混合机理，在 pH 值的变化过程中保

留机理发生了改变。固定相高纯硅胶填料表面的硅羟基其 pKa 为 4.2[15]，在低 pH 值时（pH<4.2），以-Si-OH 形式存在；而溶质咖啡因 pKa 为 10.4，此时以质子化的形式存在（带正电荷）。则咖啡因在色谱柱中保留依赖于其在硅羟基表面吸附水层和有机相之间的选择性分配；随 pH 值的增加硅羟基逐渐电离而带负电荷（-Si-O-），则溶质与固定相由于正负相吸产生静电引力，导致咖啡因洗脱时间的延长；但当 pH 值进一步增大时，咖啡因逐渐失去质子，正电荷数量减少，以致静电引力逐渐减小，咖啡因的保留值反而降低。从 pH 值对咖啡因保留值的影响结果可以看到，在拟反相色谱中溶质的保留除了分配作用，还存在一定的离子交换作用。也说明了，体系的 pH 值也是一个调节咖啡因保留值的重要因素。

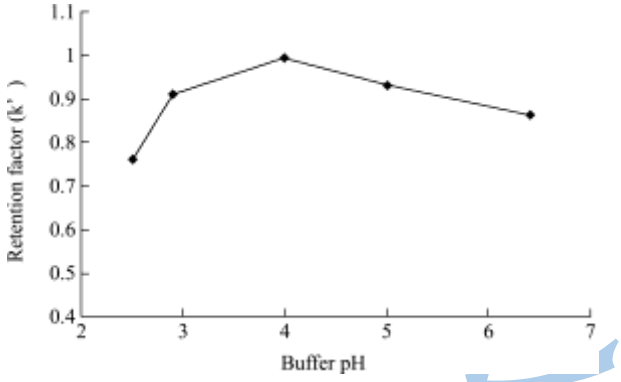


图 3 pH 值对咖啡因保留因子的影响

Fig.3 The effect of pH in mobile phase on the retention factors of caffeine

2.1.4 离子强度的影响

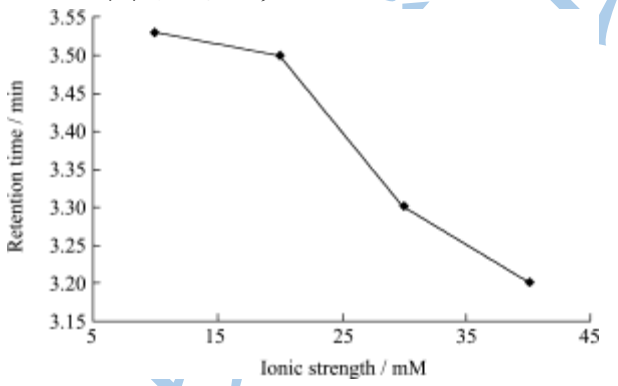


图 4 体系中离子强度对咖啡因保留时间的影响

Fig.4 The effect of ionic strength in mobile phase on the retention time of caffeine

为了验证上述结果，还进行了离子强度的影响实验，结果见图 4。可以看出随体系中甲酸钠浓度的增加（从 0.01 mol/L 增加到 0.04 mol/L），咖啡因的保留时间不断下降。说明离子强度增加时，体系中带正电荷的阳离子与质子化的咖啡因竞争固定相上的活性保留中心，导致溶质保留值的减弱。与上述由 pH 值影响推测拟反相色谱中溶质的保留机理除了分配作用外还存在一定程度的离子交换作用一致。

通过一系列考察实验，对咖啡因在拟反相色谱中的保留机理有了初步的认识，同时确定咖啡因的最佳色谱分析条件为：乙腈与甲酸钠缓冲液（0.03 mol/L，pH=2.9）的配比为 5:95。拟反相色谱中未键合硅胶较反相键合填料便宜，而流动相中有机相仅占 5%，因此拟反相色谱是特别适合测定极性化合物的一种简便，低耗的色谱模式。

2.2 线性范围、检出限、重现性和回收率

将配制好的一系列标准溶液（线性范围在 0.2~1000 μg/mL 区间），按上述的色谱条件进样，以峰面积对相应浓度（μg/mL）作回归分析。相关系数 r=0.9995（n=5）。检出限(S/N=3)为 0.05 μg/mL。我国目前的国标中尚没有对食品中咖啡因含量的规定（只有一个对于可乐饮料的咖啡因限定，含量不超过 0.15 g/kg）[16]。该方法较宽的线性范围完全可以满足不同食品中咖啡因含量的测定。

精密吸取浓度为 20 μg/mL 的咖啡因标准溶液 20 μL，进样 10 次平行测定，峰面积的相对标准偏差为 1.8%。保留时间的相对标准偏差为 1.6%，说明该测定方法重现性好。

取不含咖啡因的食品如阿尔卑斯原味糖、高乐高橙子口味、卡夫佳钙饼干作为空白试样的代表，分别配制低、中、高 3 个浓度水平（20、40 和 60 μg/mL）的样品溶液，按照 1.2 和 1.3 项的方法进行样品处理和测定，计算方法的回收率与精密度（见表 1）。本方法的平均回收率为 96.5~104.5%；相对标准偏差为 1.6~4.8%，说明本方法具有很好的准确度和精密度。

表 1 儿童食品中咖啡因的加标回收率与相对标准偏差（n=5）

Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of caffeine in children's foods

Added/(μg/mL)	Recovery/%			RSD/%		
	Candy	Gaolegao	Biscuit	Candy	Gaolegao	Biscuit
20	102.1	103.5	97.8	3.1	1.6	3.7
40	103.7	102.4	104.3	3.9	2.8	3.1
60	96.5	102.6	97.5	3.0	4.8	4.4

2.3 样品测定

以黑巧克力、巧克力饼干、巧克力糖果和巧克力饮品来检验方法的实用性。巧克力食品中的常见组分包括脱脂乳粉、可可脂、可可液块、乳脂肪、精炼食用植物油、乳糖、乳化剂(大豆磷脂)、食用香料等众多组份。如图 5 所示，尽管不同食品成份各异，但在选定实验条件下，每个样品中目标物咖啡因在短时间内可与基质中的共存干扰组份达到充分分离，证明了

该方法的高选择性。另外用该方法测定咖啡因不但方便而且快速，5 分钟即可完成一个样品的测定。而且由于是等度操作，容易实现高通量连续测定。如果按一个工作日 8 小时的标准工作量，每天可测定近百个样品，乙腈的消耗量仅仅是 24 mL。而反相色谱法，对于基质复杂的样品为了实现目标物的分离，往往采用梯度洗脱，最后用高比例（甚至 100%）有机相将基体中强保留杂质尽快去除，既消耗试剂又浪费时间。由此可以明显看到拟反相色谱分析咖啡因的速度和测试成本的优势。

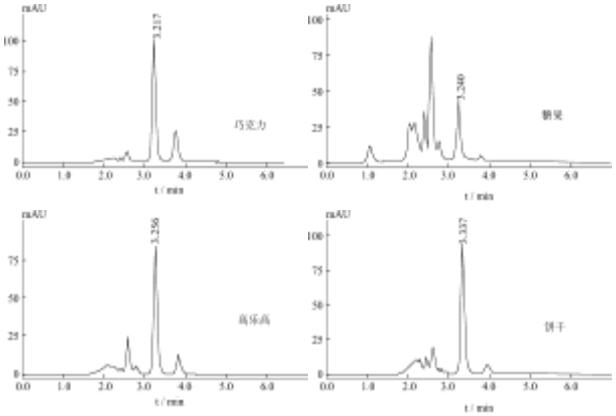


图 5 巧克力食品中咖啡因的分析色谱图

Fig.5 The chromatograms of caffeine in chocolate products

经测定黑巧克力、巧克力糖果、高乐高和巧克力饼干中咖啡因的含量分别为：2.55、0.26、2.33 及 1.25 g/kg。由此看来，每块标准大小的黑巧克力（43 g）内咖啡因含量高达 109.7 mg，相当于一罐 330 毫升可乐所含咖啡因（30~50 mg）的 2 倍多。而且液体饮料体积大易饱，不便多食。但固体食品如巧克力和饼干则不同，儿童自我控制力差，对喜爱的食品总想尽可能地多吃，很容易造成咖啡因的摄入量超标。所以作为家长的消费者应对儿童巧克力食品中咖啡因的含量有清醒的认识，才能更好地保护儿童的身体健康。

3 结论

本文建立了拟反相色谱法快速测定巧克力食品中咖啡因含量的新方法，系统地探讨了影响咖啡因保留的因素。与现在普遍采用的反相色谱法相比，最突出的优点是不但分析速度快，而且流动相中只需极少量的有机溶剂，总体上可实现快速高通量连续运行，极大节约了测试成本，对环境的污染也大为降低。该法线性范围宽，灵敏度好，用于多种食品中咖啡因的测定，回收率高，精密度好，同时分离效果好，选择性高，抗干扰能力强，具有很好的应用价值。对于拟反相色谱大家关注较少，相关资料也少，本文还就溶质的保留机理进行了初步探讨，认为其保留是基于分配和离子交换的双重作用。

参考文献

[1] Švorc L, Tomčík P, Svítková J, et al. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode [J]. Food Chemistry, 2012, 135 (3): 1198-1204

[2] Guo S J, Zhu Q Q, Yang B C, et al. Determination of caffeine content in tea based on poly(safranine T) electroactive film modified electrode [J]. Food Chemistry, 2011, 129 (3): 1311-1314

[3] 侯冬岩,回瑞华,李铁纯,等.高效液相色谱法测定黑茶中咖啡因含量[J].食品科学,2009,30(20):283-284
Hou D Y, Hui R H, Li T C, et al. HPLC Determination of Caffeine in Dark Green Tea [J]. Food Chemistry, 2009, 30(20): 283-284

[4] Injac R, Srdjenovic B, Prijatelj M, et al. Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals, and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Journal of Chromatographic Science, 2008, 46(2):137-143

[5] Hideki H, Atsushi N, Tomomi U, et al. Rapid determination of caffeine in tea leaves [J]. J Chromatogr A, 2002, 942(1/2): 271-273

[6] 宁丽峰,王慧萍,何轩.高效液相色谱法测定饮料中咖啡因的含量[J].中国卫生检验杂志,2009,19(3):560-562
Ning L F, Wang H P, He X. Determ ination of caffeine in beverages by HPLC [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(3): 560-562

[7] 王嘉琦,贾丽,夏敏.液相色谱法测定饮料中咖啡因、可可碱和茶碱[J].现代食品科技,2011,27(1):114-116
Wang J Q, Jia L, Xia M. Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Drinks by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(1):114-116

[8] Shrivas K, Wu H F. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1170 (1-2): 9-14

[9] Injac R, Srdjenovic B, Prijatelj M, et al. Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals, and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Journal of Chromatographic Science, 2008, 46(2):137-143

[10] Crommen J. Reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography of drugs and related compounds

using underivatized silica as the stationary phase [J]. J Chromatogr , 1979, 186: 705-724

[11] Santos P A, David F, Vanhoenacker G, et al. The acetonitrile shortage: Is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes? [J]. J Sep Sci, 2009, 32(12): 2001-2007

[12] Gritti F, Santos Pereira A, Sandra P, et al. Comparison of the adsorption mechanisms of pyridine in hydrophilic interaction chromatography and in reversed-phase aqueous liquid chromatography [J] J Chromatogr A, 2009, 1216(3): 8496-8504

[13] Gritti F, Santos Pereira A, Sandra P, et al. Efficiency of the same neat silica column in hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2010,1217(5): 683-688

[14] Li YY, Li J, Chen T, et al. Covalently bonded polysaccharide-modified stationary phase for per aqueous liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(11): 1503-1508

[15] Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography [J]. J. Chromatogr. A, 1997, 779(1/2): 29-71

[16] GB 2760-2011.食品添加剂使用卫生标准,中华人民共和国国家标准

Hygienic Standards for uses of food additives, National Standards of the People's Republic of China

现代食品科技