

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

文章编号: 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神经系统等作用。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, 此外精密密度、检出限和回收率的实验验证, 证明此方法准确可行。

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 μ L; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。

色谱柱: Zorbax C_{18} (4.6 \times 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 $^{\circ}$ C 超声提取, 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 经高效液相色谱测定。

1.4 标准溶液的配制

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, 研究实习生, 研究方向: 食品检测

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。

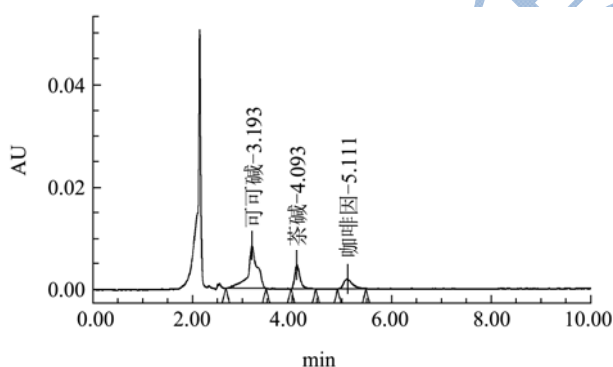


图 1 添加混合标准物质后样品色谱图

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 °C、25 °C、30 °C、40 °C 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 °C

柱温。

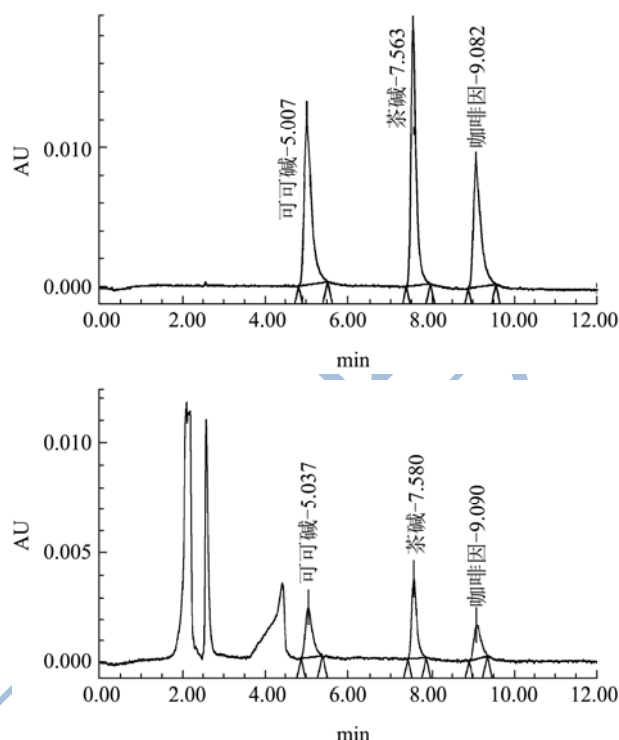


图 2 标准物质色谱图和添加混合标准物质后样品色谱图

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。可作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