

钛胶反相高效液相色谱法测定饮料中的咖啡因

包荣, 李荣, 姜子涛*

(天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

摘要: 建立了利用钛胶反相柱快速测定饮料中咖啡因的含量的高效液相色谱方法。色谱条件: 分离柱为 Titania Sachtopore - RP 柱 (250mm × 4.6mm i. d., 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相为水: 甲醇 = 83 : 17 (V/V), 流速 1mL/min, 检测波长 273nm。线性范围为 12 - 900 μ g/mL, 此范围内标准曲线线性良好 ($R^2 = 0.9998$)。最低检出限 (S/N = 3) 为 0.03 μ g/mL, 样品加标回收率范围为 98.6% ~ 102.2%, 精密度即相对标准偏差 (n = 9) 小于 0.23%。本法简单易操作、分析速度快, 精密度和准确度均取得满意效果, 适用于各种饮料样品中咖啡因的定量分析。本研究不仅是对食品中咖啡因检测方法的补充, 更重要的是发挥了钛胶固定相不可比拟的优势。

关键词: 咖啡因; 钛胶柱; 高效液相色谱法; 饮料

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1006 - 2513(2011)05 - 0214 - 05

Determination of caffeine in soft drinks by titania - based based reverse phase high performance liquid chromatography

BAO Rong, LI Rong, JIANG Zi-tao*

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134)

Abstract: A rapid method for the determination of caffeine in soft drinks by titania - based reverse phase high performance liquid chromatography was reviewed in this paper. The chromatographic separation conditions were as follow: a Titania Sachtopore - RP separated column (250 × 4.6 mm, 5 μ m) was used and column temperature was 30 $^{\circ}$ C; the mobile phase was a mixture of water and methanol in the ratio of 83 to 17 (V/V); the flow rate was 1 mL/min. The detection wavelength was 273nm. The method presented good linearity ($R^2 = 0.9998$) toward caffeine in the range of 12 ~ 900 μ g/mL. The limit of detection (S/N = 3) for caffeine was 0.03 μ g/mL. The recovery of spiked caffeine in samples ranged from 98.6% ~ 102.2%. The precision (RSD) for 9 replicate detections was less than 0.23%. The method is simple operation, quick analysis, accurate and precise. Meanwhile, it is applicable to the quantitative analysis of caffeine in drinks. This study is not only a supplement to the detecting methods for caffeine, but also takes the advantages of titania - based stationary phase.

Key words: caffeine; titania; high performance liquid chromatography; Soft drinks

咖啡因 (Caffeine) 又称咖啡碱、茶素、甲基可可碱, 是茶叶、咖啡豆、可可、可拉果等植物

体中主要生物碱, 具有较强兴奋神经作用的针状晶体, 属于甲基黄嘌呤的生物碱, 化学名为

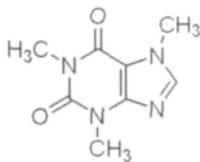
收稿日期: 2011 - 06 - 09

* 通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目 (项目编号: 20875069)。

作者简介: 包荣 (1985 -), 女, 硕士研究生, 主要从事食品添加剂研究。

1, 3, 7-三甲基黄嘌呤或 3, 7-二氢-1, 3, 7-三甲基-1H-嘌呤-2, 6-二酮, 溶于水、乙醇和氯仿等溶剂。其分子式为 $C_8H_{10}N_4O_2$, 相对分子质量为 194.19, 化学结构为:



咖啡因作为一种食品添加剂, 逐渐被人们所熟悉, 其应用范围正逐渐扩大, 广泛添加于食品、饮料中, 成为各种功能性饮品的重要成分之一。同时, 它也是多种抗癌药物和中枢神经药物的基础结构单元。咖啡因对人体具有兴奋作用, 其药理功能人们已熟知, 它具有强心、利尿、提神等作用。但是, 大剂量或长期使用也会对人体造成损害, 如影响睡眠, 引起局部缺血性心脏病, 降低女性受孕率, 提高孕妇自然流产率和致畸率, 引发阵发性惊厥和骨骼震颤, 损害肝脏、胃和肾等器官, 诱发呼吸道炎症和妇女乳腺癌等疾病等^[1]。而且它具有成瘾性, 一旦停用会出现精神萎靡、浑身疲乏等戒断症状。为保护人体健康, 防止其潜在危害, 其添加量应该受到严格监控, 为此, 研究快速、准确测定食品、药品中咖啡因含量的方法具有重要意义。

我国食品添加剂使用卫生标准 GB 2760-2007 规定, 在可乐型碳酸饮料中加入咖啡因的限量为 $150\text{mg}/\text{kg}$ ^[2]。而对于茶饮料、咖啡等食品来说, 咖啡因含量则是衡量其品质的重要指标之一, 如 GB/T 21733-2008 《茶饮料》规定果味茶饮料的咖啡因含量应大于 $35\text{mg}/\text{kg}$ ^[3]。目前关于咖啡因含量的测定方法较多, 已有薄层色谱法^[4]、紫外分光光度法^[5]、高效液相色谱法等^[6-12]方面的报道。但由于硅胶 ODS 柱本身固有的“第二效应”的存在, 常常导致咖啡因色谱峰对称性差, 影响分离效率, 色谱柱寿命降低。

钛胶基质固定相是近年发展起来的新型色谱填料, 其具有传统硅胶基质固定相不可比拟的优点, 不存在硅胶固定相对碱性化合物存在“不可逆吸附”的致命缺陷。并且钛胶具有极好的化学稳定性, 在 pH 1~14 的范围内都是非常稳定的,

而硅胶固定相则仅仅适用于 pH 3~9 的范围内。在现在的研究中, 我们应用钛胶基质 C_{18} 作为固定相, 17% 甲醇水溶液作为流动相, 建立了钛胶反相高效液相色谱法测定饮料中咖啡因含量的新方法, 并获得较高的灵敏度、精密度和准确度, 结果满意。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪, 安捷伦公司; 色谱柱 (Sachtopore - RP, $5\mu\text{m}$ diameter, 300\AA pore size, $250 \times 4.6\text{mm}$ i. d.), Zircrom 公司; FA1104N 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。

咖啡因标准品 (Aladdin, 99.0%), 配制成 $1.2\text{mg}/\text{mL}$ 标准贮备液: 称取 0.06g 咖啡因置于 50mL 容量瓶中, 用纯净水溶解并定容至刻度, 置于冰箱备用。甲醇 (色谱纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。茉莉花茶饮料、绿茶饮料、乌龙茶饮料、可乐、无糖可乐和功能性维生素饮料等六种饮料样品, 均购自天津市市内超市。

1.2 色谱条件

流动相为水: 甲醇 = 87:13 (V/V), 等梯度洗脱流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$, 柱温 30°C , 紫外波长扫描范围 $200 \sim 400\text{nm}$ 。以保留时间和紫外吸收谱图定性, 峰面积定量。

1.3 标准曲线的绘制

取 $1.2\text{mg}/\text{mL}$ 的标准贮备液, 稀释为 12、24、60、120、600、900 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别取 $20\mu\text{L}$ 进样, 以咖啡因浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线并计算线性回归方程。

1.4 样品前处理

取适量样品 (其中可乐样品需超声脱气 20min), 准确量取 5mL 至比色管 (10mL) 中稀释 2 倍, 用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后进样 $20\mu\text{L}$ 。根据咖啡因色谱峰面积, 通过回归方程计算得到样液中咖啡因浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

嘌呤类生物碱均具有共轭离域大 π 键结构,

在紫外光区具有强烈的光吸收特性。用紫外检测器在 200 ~ 400nm 范围内对标准溶液进行波长扫描, 由扫描结果可知: 咖啡因的最大吸收波长在 273nm 左右, 故选择 273nm 为检测波长。咖啡因的标准谱图见图 1, 色谱峰峰型对称, 无拖尾现象。

2.2 流动相中甲醇比例的选择

流动相中甲醇比例对峰形和保留时间影响较显著。分别配制甲醇体积分数为 10%、15%、17%、20%、30% 的流动相。通过液相色谱分析, 保留时间、半峰宽、塔板数与甲醇比例的关系见图 2。

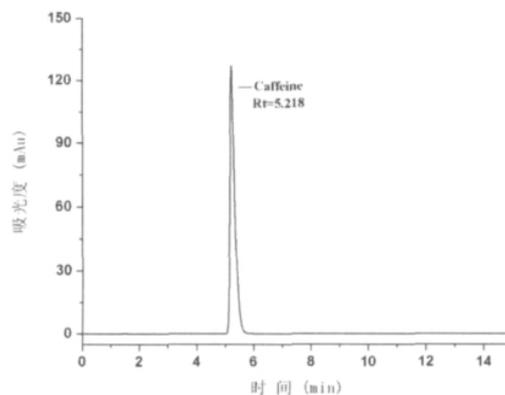


图 1 咖啡因标准色谱图

Fig. 1 Chromatogram of caffeine standard

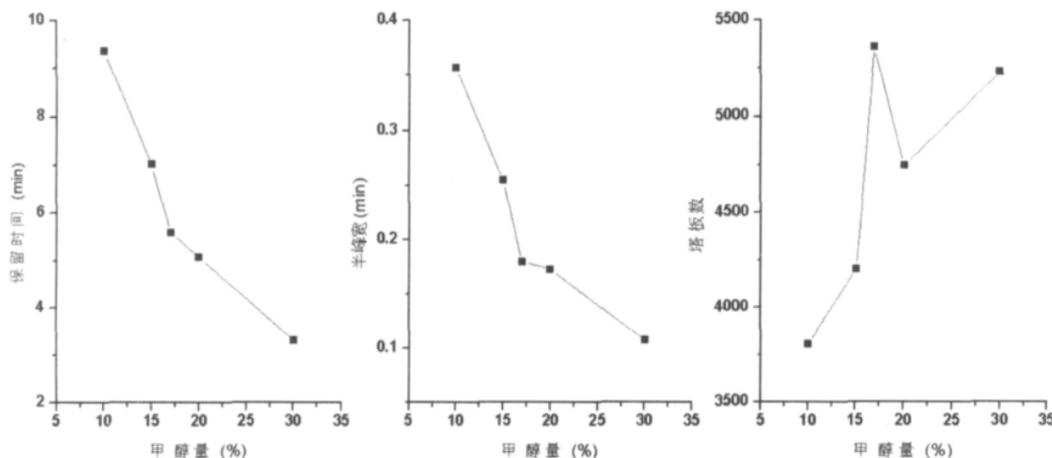


图 2 保留时间、半峰宽、塔板数与甲醇比例的关系

Fig. 2 Relations between retention time, peak width at half height, number of plates and the proportion of methanol

当甲醇体积分数为 10% 和 15% 时, 咖啡因出峰时间较长; 20% 和 30% 时出峰时间太短, 溶剂峰及无保留物质易产生干扰。而在 17% 时, 出峰时间适中, 峰形较好, 且可与样品中杂质分离。同时由图 2 可知, 流动相中甲醇量在 17% 时柱效较高, 虽然增加至 30% 时柱效也升至较高水平, 但此时出峰时间很短, 仅有 3.309min, 已接近死时间。

2.3 检出限及线性范围

以咖啡因在最低浓度时所产生的信号 (峰高) 为基线噪音 3 倍时, 即信噪比等于 3 ($S/N=3$) 时咖啡因的浓度为检出限 (Limit of detec-

tion, LOD), 测得此方法的 LOD 为 $0.03\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外, 我们也考察了此方法的线性范围, 当咖啡因浓度在 $12\sim 900\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时, 标准曲线线性良好, 线性回归方程为 $Y = 160.2568 + 58.8175X$ ($R^2 = 0.9998$)。

2.4 方法精密度和准确度

在选定的色谱条件下, 分别用 $24\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $60\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液重复进样 9 次, 计算得相对标准偏差小于 0.23%。在六个饮料样品中分别加入一定量的咖啡因标准品, 与样品一道处理后进样测定, 样品测定结果及方法回收率见表 1, 各样品色谱图见图 3、4。

表 1 样品测定结果和加标回收率

Table 1 Determination results of samples and spiked recoveries

样品名称	测定值 $\mu\text{g/mL}$	加标量 $\mu\text{g/mL}$	测得值 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	平均回收率%
茉莉花茶饮料	56.0	30	87.0	103.3	102.2
		60	117.8	103.0	
		90	146.4	100.4	
绿茶饮料	51.5	30	81.5	100.0	102.0
		60	112.7	102.0	
		90	145.2	104.1	
乌龙茶饮料	73.4	30	103.8	101.3	101.1
		60	134.1	101.2	
		90	164.0	100.7	
某可乐	48.6	30	78.4	99.3	101.2
		60	109.2	101.0	
		90	141.6	103.3	
无糖可乐	53.4	30	84.1	102.3	100.5
		60	113.7	100.5	
		90	142.1	98.6	
功能性维生素饮料	97.7	30	127.9	100.7	98.6
		60	156.6	98.2	
		90	184.9	96.9	

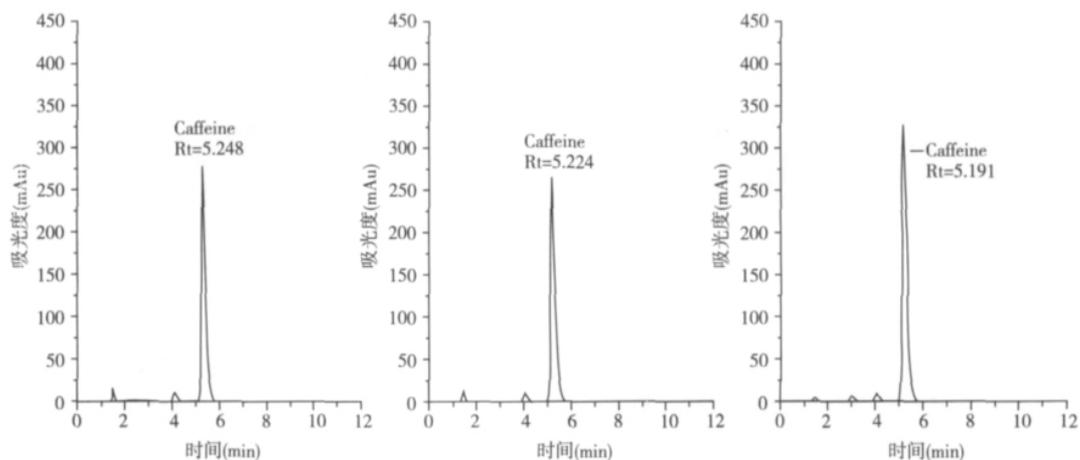


图 3 样品 1-3 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of samples 1-3

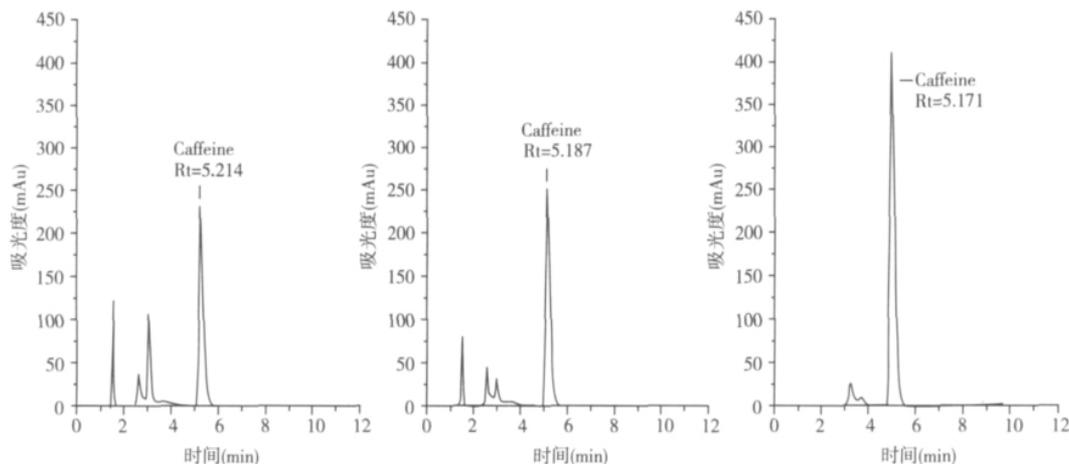


图4 样品4-6色谱图

Fig. 4 Chromatogram of samples 4-6

样品1~6分别为茉莉花茶饮料、绿茶饮料、乌龙茶饮料、可乐、无糖可乐、功能性维生素饮料。由表1可见,本法回收率范围为98.6%~102.2%,平均回收率为100.9%(本法标准溶液及样品测定结果均平行进样3次取平均值得到)。从分析结果看,所收集到的天津市市售含咖啡因饮料中咖啡因的含量均在国标所允许的范围内,符合国家标准的要求^[2-3]。

3 结论

钛胶基质 HPLC 固定相为近年来出现的新型色谱填料,其研究和应用有待于进一步深入,本研究结果显示:对于咖啡因(或其它生物碱)分析分离来说,无论是最低检出限、精密度、回收率还是线性范围等方面,钛胶柱明显优于硅胶柱,具有硅胶柱不可比拟的优势,因此钛胶固定相在分离碱性化合物方面有非常好的应用前景。本法简单易操作、分离效果好、分析速度快、线性范围宽、常见成分无干扰,精密度和准确度均取得满意效果,适用于各种食品样品中咖啡因的定量分析。从经济及环保角度讲,流动相采用甲醇-水体系,与乙腈相比毒性较小且节约成本,有实用价值,适于推广应用。

参考文献:

- [1] 宁丽峰,王慧萍,何轩,等. 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, 2009, 19 (3): 560 - 562.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂使用卫生标准 GB 2760-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 茶饮料 GB/T 21733-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [4] Sjoberg AM, Rajana J. Simple method for the determination of alkaloids in cocoa using paper chromatography and UV spectrometry [J]. J Chromatogr, 1984, 295 (1): 291 - 294.
- [5] 何倩琼, 郑理. 紫外分光法测定饮料中的咖啡因 [J]. 中华预防医学, 1994, 28 (1): 47 - 48.
- [6] 肖汉, 梁伟, 周博, 等. 超高效液相色谱法快速测定食品中的咖啡因研究 [J]. 现代农业科技, 2010 (9): 351 - 353.
- [7] 乐健, 洪战英. 高效液相色谱法测定绿茶和饮料中的咖啡因 [J]. 药物生物技术, 2003, 10 (3): 174 - 176.
- [8] 赵丹霞. HPLC 法测定焙烤咖啡中咖啡因的含量 [J]. 现代食品科技, 2008, 24 (1): 89 - 90.
- [9] 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.
- [10] 帅琴, 龚宇, 杨薇, 等. 反相高效液相色谱法测定可乐、茶叶中的咖啡因 [J]. 分析实验室, 2002, 21 (1): 68 - 70.
- [11] 李蔚, 苏黎, 陈金东. 食品中咖啡因含量的测定方法 [J]. 中国卫生检验, 2008, 18 (11): 2194 - 2196.
- [12] 徐明敏, 陈波, 杨毅华. 紫外液相色谱法测定可乐中咖啡因 [J]. 中国卫生检验, 2008, 18 (11): 2399 - 2400.