

反相高效液相色谱和超高效液相色谱法测定 饮料中咖啡因含量的比较研究

曾 诚, 赵文惠*

(新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 对原反相高效液相色谱(RP-HPLC)方法进行转化并优化, 建立超高效液相色谱(UPLC)方法, 为饮料中咖啡因的含量测定提供更快速、高效、灵敏和环保的方法。**方法** 分别采用 RP-HPLC 法和 UPLC 法测定饮料中咖啡因的含量, 并对比二者的精密度、稳定性、重复性和加标回收率。**结果** 2 种方法所得 8 种市售饮料中咖啡因的含量测定结果变化趋势一致, 但 UPLC 法含量测定结果比 RP-HPLC 法含量测定结果偏高, 二者精密度、回收率均符合要求。**结论** UPLC 法可以成功替代 RP-HPLC 法, 为饮料中咖啡因的快速定性定量分析与检测提供新的途径。

关键词: 反相高效液相色谱法; 超高效液相色谱法; 饮料; 咖啡因

Comparison of reversed high performance liquid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography on quantitative determination of caffeine in beverages

ZENG Cheng, ZHAO Wen-Hui*

(Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method to replace the reversed high performance liquid chromatography (RP-HPLC) for a faster, more sensitive and more environmental friendly detection for caffeine content in beverages. **Methods** Both RP-HPLC and UPLC methods were used in the determination of caffeine content in 8 kinds of beverages, and the precision, stability, repeatability and recovery rates of the 2 methods were compared. **Results** Caffeine content determined in 8 beverages by the 2 methods had a similar trend, but the content of caffeine determined by UPLC was higher than that by RP-HPLC. Both methods showed good precision and recovery rates. **Conclusion** UPLC method as a new detection method can replace RP-HPLC in the quantitative analysis of caffeine in beverages.

KEY WORDS: reversed high performance liquid chromatography; ultra-high performance liquid chromatography; beverages; caffeine

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2013I23)

Fund: Supported by Key Projects of Scientific Research Project of the Xinjiang Uygur Autonomous Region University (XJEDU2013I23)

*通讯作者: 赵文惠, 高级实验师, 主要研究方向为分析测试技术与新药研发。E-mail: whzhao2006@163.com

*Corresponding author: ZHAO Wen-Hui, Senior Experimentalist, Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China.

E-mail: whzhao2006@163.com

1 引言

咖啡因是存在于许多天然植物(如茶叶、咖啡豆、可乐果、可可豆等)中的一类属于甲基黄嘌呤的生物碱,也是一种中枢神经兴奋剂,为白色结晶粉末,无臭,味苦,有风化性,呈弱碱性^[1],其结构式如图1。咖啡因被广泛应用于食品、饮料等生产工艺中,适量食用咖啡因能够刺激中枢神经、增强大脑皮质的兴奋程度,从而达到减少疲劳感、提神醒脑等作用^[2]。然而,大剂量或长期使用则会对人体造成伤害,特别是它有成瘾性,一旦停用会使人出现精神萎靡、浑身困乏疲软等各种戒断症状^[3-5]。我国《食品添加剂使用标准》(GB 2760-2011)规定,在可乐型饮料中添加咖啡因,限量为0.15 g/kg^[6]。目前,测定咖啡因的方法很多,如紫外分光光度法,气相色谱法,高效液相色谱法^[7-10]和超高效液相色谱法^[11-15]等。其中,紫外分光光度法灵敏度低,气相色谱法样品需要较繁琐的前处理,而高效液相色谱法(HPLC)专属性、灵敏度和准确度高,适合微量样品含量测定。但普通液相色谱法仍有测定样品周期长,产生废液量大的缺点。故本文对原HPLC方法进行转化并优化,建立超高效液相色谱(UPLC)方法,为饮料中咖啡因的含量测定提供更快速、高效、灵敏和环保的方法。

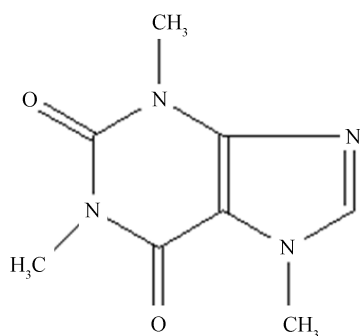


图1 咖啡因的分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of caffeine

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

咖啡因对照品(中国食品药品检定研究院,批号:171215-201211);可口可乐(青岛可口可乐饮料有限公司);百事可乐(济南百事可乐饮料有限公司);绿茶饮料(昆山统一企业食品有限公司);红牛(红牛维

他命饮料有限公司);雀巢咖啡(东莞雀巢有限公司);茉莉蜜茶(昆山统一企业食品有限公司);黑卡6小时(广州黑卡食品饮料有限公司);冰红茶(中国天津康师傅饮料有限公司);甲醇(色谱纯,美国天地公司);实验用水均为超纯水。

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-20AB); UV 检测器;超高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC);数控超声波清洗器 KQ-500DB(昆山市超声仪器有限公司);

2.2 实验方法

2.2.1 HPLC 色谱条件

色谱柱:依利特 C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相:甲醇:水=40:60(V:V), 测定波长 270 nm, 柱温:30 °C, 流速:1 mL/min, 进样量:10 μL, 柱温:30 °C。

2.2.2 UPLC 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相:甲醇:水=40:60, 测定波长 270 nm, 柱温:30 °C, 流速:0.3 mL/min, 进样量:2 μL, 柱温:30 °C。

2.2.3 对照品储备液的制备

精密称取干燥至恒重的咖啡因对照品 10 mg 于 10 mL 量瓶中,加水定容,制成 1 mL 含咖啡因 1 mg 的对照品溶液,在 HPLC 条件下咖啡因保留时间是 4.21 min,而在 UPLC 条件下咖啡因保留时间是 1.112 min,见图 2 和见图 3。

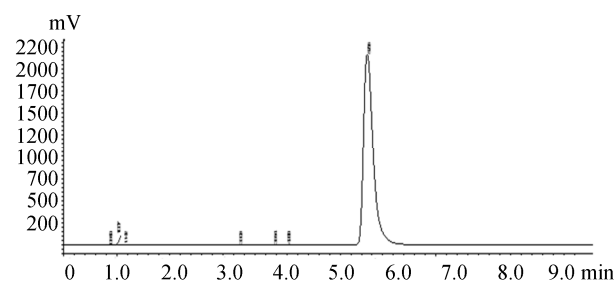


图2 咖啡因对照品(HPLC)

Fig. 2 HPLC chromatogram of caffeine reference

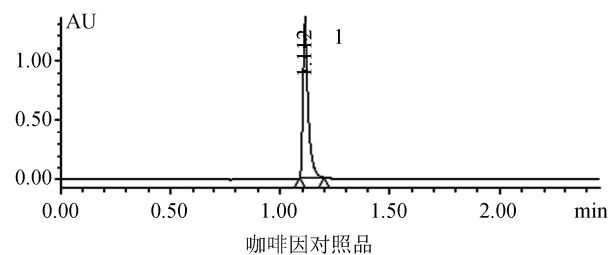


图3 咖啡因对照品(UPLC)

Fig. 3 UPLC chromatogram of caffeine reference

2.2.4 供试品溶液的制备

各饮料需经离心机 5000 r/min 离心 10 min, 超声脱气 15 min 后, 取试样 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 作为供试品溶液, 分别用 HPLC 和 UPLC 考察, 见图 4 和图 5。

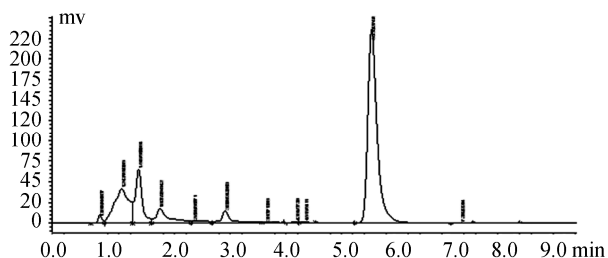


图 4 可口可乐样品色谱图(HPLC)
Fig. 4 HPLC chromatogram of Coca-Cola

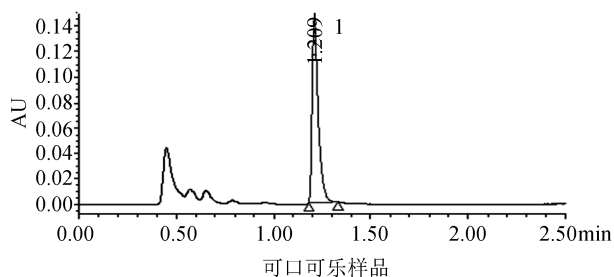


图 5 可口可乐样品色谱图(UPLC)
Fig. 5 UPLC chromatogram of Coca-Cola

2.2.5 标准曲线的绘制

在 HPLC 色谱系统下, 分别量取对照品贮备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 置于 10 mL 容量瓶, 稀释至刻度, 得到浓度为 10、20、40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列标准溶液。取上述系列浓度溶液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 注入 HPLC 色谱仪, 得到系列浓度的对应峰面积和保留时间。以标准溶液的质量浓度(X)为横坐标, 色谱峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 其线性方程为: $Y=30128X+17910$, 相关系数: $r=0.9999$, 表明咖啡因在 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。在 UPLC 色谱条件下, 分别量取对照品贮备液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 mL 置于 10 mL 容量瓶, 稀释至刻度, 得到浓度为 10、20、40、80、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列标准溶液。取上述系列浓度溶液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 注入 UPLC 色谱仪, 得系列浓度对应峰面积和保留时间。以标准溶液的质量浓度(X)为横坐标, 色谱峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 其线性方程为:

$Y=27352X+62156$, 相关系数: $r=0.9999$, 表明咖啡因在 10~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

3 结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度实验

分别吸取对照品溶液 10、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 各 10 μL 注入液相色谱仪, 分别重复测定 6 次, 峰面积 RSD 值分别为 1.23%、1.15%、0.92%, 均小于 2%。同法用超高效液相色谱仪测定, RSD 分别为 0.45%、0.37%、0.28%。表明 RP-HPLC 和 UPLC 仪器精密度良好。

3.1.2 稳定性实验

精密吸取各供试品溶液 10 μL , 分别于 0、2、4、8、10、12 h 注入液相色谱仪, 记录咖啡因的相对保留时间和相对峰面积, 测得各供试品溶液峰面积的 RSD 为 1.46%~2.21%。同法精密吸取各供试品溶液 2 μL , 注入超高效液相色谱仪, 测得各供试品溶液峰面积的 RSD 为 0.62%~0.83%, 结果均小于 3%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

3.1.3 重复性实验

取同一批饮料样品各 6 份, 按照 1.2.4 中所述方法处理, 按 2.2.1 和 2.2.2 中所述色谱条件进行测定, 所得结果咖啡因峰面积值 RSD 分别为 1.18%~2.66% 和 0.62%~0.96%, 均小于 3%, 表明方法重现性良好。

3.1.4 加标回收率实验

精密量取 22.26 μg 已知含量的同批样品共 9 份, 分别加入咖啡因对照品溶液 5、20、40 μg 各 3 份, 按 2.2.4 中所述制备方法制备后, 用 HPLC 测定, 记录峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。精密量取 25 μg 已知含量的同批样品共 9 份, 分别加入咖啡因对照品溶液 4、40、80 μg 各 3 份, 按 2.2.4 中所述制备方法制备后, 用 UPLC 测定, 记录峰面积, 计算回收率, 结果见表 2。

3.2 样品测定

取样品 3 批, 按照 2.2.4 中方法制备后, 分别用 RP-HPLC 和 UPLC 测定各饮料的咖啡因含量, 所得结果见表 3。

4 讨论

通过比较 RP-HPLC 和 UPLC 的分离情况、线性、精密度、稳定性、重复性和加标回收率结果, 发现两

表 1 RP-HPLC 回收率实验结果
Table 1 Results of recovery rates of RP-HPLC

样品含量(μg)	加入量(μg)	实测值(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
22.26	5	27.82	102.05		
22.26	5	27.29	100.12	100.74	1.12
22.26	5	27.27	100.06		
22.26	20	41.95	99.27		
22.26	20	42.23	99.94	99.91	0.42
22.26	20	42.27	100.04		
22.26	40	61.60	98.94		
22.26	40	62.06	99.68	99.38	0.39
22.26	40	61.96	99.52		

表 2 UPLC 回收率实验结果
Table 2 Results of recovery rates of UPLC

样品含量(μg)	加入量(μg)	实测值(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
25	4	28.77	99.22		
25	4	28.80	99.32	99.39	0.21
25	4	28.89	99.63		
25	40	64.52	99.28		
25	40	64.53	99.27	99.26	0.03
25	40	64.50	99.23		
25	80	105.28	100.27		
25	80	105.32	100.30	100.28	0.02
25	80	105.28	100.27		

表 3 RP-HPLC 和 UPLC 测定 8 种饮料中咖啡因含量比较($n=3$)

Table 3 Content of caffeine in 8 beverages determined by RP-HPLC and UPLC ($n=3$)

饮料名称	RP-HPLC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	UPLC($\mu\text{g}/\text{mg}$)
可口可乐	55.65 \pm 0.68 ^a	63.90 \pm 0.67 ^b
百事可乐	52.15 \pm 0.46 ^a	56.23 \pm 0.57 ^b
绿茶	81.01 \pm 0.27 ^a	86.92 \pm 0.22 ^b
红牛	120.8 \pm 0.38 ^a	173.88 \pm 0.45 ^b
咖啡	402.07 \pm 0.24 ^a	442.2 \pm 0.37 ^b
茉莉蜜茶	78.23 \pm 0.18 ^a	85.31 \pm 0.79 ^b
黑卡	132.74 \pm 0.86 ^a	168.62 \pm 0.62 ^b
冰红茶	88.18 \pm 0.52 ^a	97.45 \pm 0.39 ^b

注: 不同字母表示两种方法测定值之间存在显著差异, $P < 0.05$

种方法各有优缺点。HPLC 是现阶段最常用的分析方法, 具有精密度高、准确性好等特点, 但分析时间较长, 灵敏度相对较低, 且测定过程中流动相消耗大。而 UPLC 是近年来新兴的一种色谱技术, 它的色谱柱使用直径为 1.7 μm 的填料作为固定相, 能使塔板数和分离度大大提高, 并且缩短了分析时间。它在精密度、准确性等方面与 HPLC 相近, 但灵敏度高于 HPLC, 且分析时间短, 流动相消耗也较小。然而 UPLC 仪器和其色谱柱较为昂贵, 尚未得到较为广泛的普及和应用。

本实验分别采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)和超高效液相色谱法(UPLC)测定 8 种饮料中咖啡因的含量, 并对其方法学和测定结果进行了比较, 可以看出 2 种方法测定结果存在差异(UPLC 测定结果高于 RP-HPLC), 可能是由于 UPLC 色谱柱更小的填

料和更细的内径管路,从而增加了柱效。并且,UPLC具有更高的流速,使其分离效果、灵敏度和分辨率高于常规的HPLC。但2种方法所得含量测定结果变化趋势一致,UPLC法具有更加快速、灵敏、分离度更高优势,测定结果准确,节省分析时间,消耗流动相少,减小环境污染,如果长期大量分析检测某样品,其分析成本反而降低。在此意义上,UPLC法可以代替RP-HPLC法用于饮料中咖啡因的测定。

参考文献

- [1] Rahim AA, Nofrizal S, Saad B. Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column [J]. Food Chem, 2014, 147 (1):262-268
- [2] Sereshti H, Samadi S. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and 8 beverages [J]. Food Chem, 2014, 158 (1):8-13
- [3] Muller C, Vetter F, Richter E, *et al.* Determination of caffeine, myosmine, and nicotine in chocolate by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Sci, 2014, 79(2):251-255
- [4] 刘国美. HPLC 法测定可乐中的咖啡因含量[J]. 大众标准化, 2013,1(11):58-60.
Liu GM. Determination of caffeine in Cola by HPLC [J]. Pop Std, 2013, 1(11): 58-60.
- [5] 刘阳, 孙艳丽. 高效液相色谱法测定可乐中咖啡因的含量[J]. 山东化工, 2013,42(5):72-76.
Liu Y, Sun YL. Determination of caffeine in cola by high performance liquid chromatography [J]. Shandong Chem Ind, 2013, 42(5):72-76.
- [6] GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准 [S]. GB 2760-2011 National food safety standards, using food additives [S].
- [7] 沈丽, 龙丽娟. 高效液相色谱法测定饮料中咖啡因方法的讨论 [J]. 中国科技博览, 2009,1(1):99-100.
Shen L, Long LJ. The method of determination of caffeine in cola by high performance liquid chromatography[J]. Chin Sci and Technol Rev, 2009,1(1):99-100.
- [8] 丁瑞芳, 张敏娜, 朱军. 高效液相色谱法测定可乐中咖啡因含量[J]. 济宁医学院药学院, 2012, 35(2):106-108.
Ding RF, Zhang MN, Zhu J. Determination of caffeine in cola by high performance liquid chromatography [J]. J Jining Med Univ, 2012, 35(2):106-108.
- [9] 孙林超. 高效液相色谱法测定茶叶中咖啡因的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2136-2137.
Sun LC. Determination of caffeine concentration of tea by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(10): 2136-2137.
- [10] 刘少贤, 王小峰, 龙琪. 高效液相色谱测定饮料中的咖啡因[J]. 南京晓庄学院学报, 2008, 1(3): 122-124.
Liu SX, Wang XF, Long Q. Determination of caffeine in drinks by high performance liquid chromatography [J]. J Nanjing Xiaozhuang Colg, 2008,1(3):122-124.
- [11] 董悦涵. 高效液相色谱法测定饮料中咖啡因含量研究[J]. 现代农业科技, 2012,1(21):280-281.
Dong YH. Study on determination of caffeine content in beverage by HPLC [J]. Mod Agric Sci and Technol, 2012,1(21): 280-281.
- [12] 王峰. 超高效液相色谱法(UPLC)快速测定茶饮料中的咖啡因 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(11): 213-215.
Wang F. Determination of caffeine in tea-drink by ultra performance liquid chromatography (UPLC)[J]. Food & Ferment Ind, 2011, 37(11):213-215.
- [13] 张毅, 高展, 王蕊等. UPLC 测定普洱茶饮料中咖啡因的含量 [J]. 饮料工业, 2012, 15(1): 41-44.
Zhang Y, Gao Z, Wang X, *et al.* Determination of content of caffeine in Pu-erh tea drinks by UPLC [J]. Beverage Ind, 2012, 15(1): 41-44.
- [14] Zhao Y, Chen P, Lin L, *et al.* Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS [J]. Food Chem, 2011, 126: 1269-1277.
- [15] O'Driscoll DJ. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. MethodsX, 2014, 1: e264-e268.

(责任编辑: 卢 忆)

作者简介



曾 诚, 硕士研究生, 主要研究方向为药物新制剂及新剂型。

E-mail: wjzc0312@126.com



赵文惠, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为分析测试技术与新药研发。

E-mail: whzhao2006@163.com