

液相色谱法测定茶氨酸提取物中咖啡因的含量

陈彩云*, 蔡伟江, 陈宏璧

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立一种快速、简便测定茶氨酸提取物中咖啡因的液相色谱方法。**方法** 样品经过前处理, 以1-癸烷磺酸钠溶液(1.22 g→850 mL)+乙腈+磷酸=850+150+1(V:V:V)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 等度洗脱, 经 Agilent C₁₈ 柱分离, 于 280 nm 波长处检测, 以外标法定量。**结果** 用本方法进行检测, 能很好的分离咖啡因, 在浓度 0.001 mg/mL 至 0.05 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 方法的相关系数可达 1.000, 平均回收率为 100.2, 在 95%~105%之间, 相对标准偏差(RSD)为 1.0%, 定量限为 92.78 μg/g, 检出限为 29.03 μg/g。**结论** 该方法耗时短、操作简便、准确、重现性好、分离效果明显。可以应用于茶氨酸提取物中咖啡因含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 茶氨酸提取物; 咖啡因

Determination of caffeine in theanine extract by high performance liquid chromatography

CHEN Cai-Yun*, CAI Wei-Jiang, CHEN Hong-Bi

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a quick and simple method for the determination of caffeine in theanine extracts by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were pretreated and were separated by agilent C₁₈ column with gradient elution by a mobile phase of 1-decane sulfonic acid sodium solution(1.22 g→850 mL)-acetonitrile-phosphoric acid with 850+150+1(V:V:V), the flow rate at 1.0 mL/min, column temperature at 30 °C, injection volume at 10 μL, and detected at 280 nm, then quantified by external standard method. **Results** Caffeine can be separated well and had a good linearity in the range of 0.001~0.05 mg/mL ($r=1.000$), the recovery was 95%~105%, and RSD was 1.0%; the limit of quantitation was 92.78 μg/g, and the limit of detection was 29.03 μg/g. **Conclusion** The method is quick, simple and accurate, and has a good reproducibility and clear separation. It can be applied for the determination of caffeine in tea theanine extracts.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; theanine extracts; caffeine

1 引言

咖啡因又称咖啡碱、茶素, 是从茶叶、咖啡果中提炼出来的一种生物碱, 适度地使用有祛除疲劳、兴

奋神经的作用, 临床上用于治疗神经衰弱和昏迷复苏, 是世界上最普遍被使用的精神药品。但是, 大剂量或长期使用也会对人体造成损害, 特别是它也有成瘾性, 一旦停用会出现精神萎顿、浑身困乏疲软等

*通讯作者: 陈彩云, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 504990659@qq.com

*Corresponding author: CHEN Cai-Yun, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail:504990659@qq.com

各种戒断症状, 虽然其成瘾性较弱, 戒断症状也不十分严重^[1-3], 但由于药物的耐受性而导致用药量不断增加时, 咖啡因不仅作用于大脑皮层, 还能直接兴奋延髓, 引起阵发性惊厥和骨骼震颤, 损害肝、胃、肾等重要内脏器官, 诱发呼吸道炎症、妇女乳腺癌等疾病, 甚至导致吸食者下一代智力低下, 肢体畸形。因此, 为控制食品药品中咖啡因的含量, 各国制定了咖啡因在食品药品中的标准。目前测定咖啡因的方法很多, 如薄层色谱法^[4-6], 紫外分光光度法^[7-9]和高效液相色谱法^[10-14]等。薄层色谱法是一种微量分离方法, 其分析速度快, 成本较低, 但手动操作比较多, 人为因素影响大, 重现性不好。紫外分光光度法是利用咖啡因结构上的嘌呤环具有共轭双键体系, 因而具有独特的吸收光谱, 但紫外分光光度法测得实际是茶叶中嘌呤碱的总量, 较纯咖啡因的测定才可用紫外分光光度法。本文采用高效液相色谱法测定茶氨酸提取物中咖啡因的含量, 具有测定快速准确、预处理简便等特点, 具有很大的选择性, 高效、低耗、快速, 应用广泛。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(安捷伦, 型号: 1260, 配VWD); 超声波清器(昆山市超声仪器有限公司, 型号: EQ-500,); Agilent C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

咖啡因标准品(北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司; 批号: GBW(E)100174; 浓度: 0.50 mg/mL); 乙腈(色谱纯, 德国 CNW); 1-癸烷磺酸钠(离子对试剂, 国药集团化学试剂有限公司); 蒸馏水; 茶氨酸

提取物。

2.2 仪器条件

色谱柱: Agilent C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 1-癸烷磺酸钠溶液(1.22 g→850 mL)+乙腈+磷酸=850+150+1(V:V:V), 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测器: 紫外检测器 280 nm^[15]; 运行时间: 10 min。

2.3 测定方法

2.3.1 标准系列溶液的配制

分别精密吸取 0.50 mg/mL 咖啡因标准液制成 5 个对照浓度; 分别为 0.001、0.002、0.005、0.01、0.05 mg/mL 的工作标准液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 进样量为 10 μL, 以浓度 C(mg/mL)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

2.3.2 供试品溶液配制

称取茶氨酸提取物试样适量, 加入甲醇+水+磷酸=100+400+0.5(V:V:V)混合溶液适量, 超声 15 min 后以 3000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后待进样。

3 结果与讨论

3.1 色谱行为

采用高效液相色谱法能快速检测茶氨酸提取物中的咖啡因, 不会因为其他因素而影响检测。采用 1-癸烷磺酸钠溶液(1.22 g→850 mL)、乙腈和磷酸按一定的比例进行等度洗脱, 5 min 就能把样品中咖啡因流出, 流动相的比例也能让咖啡因不受其他杂质峰的影响, 达到准确的分离和定量。见图 1 和图 2, 空白溶剂谱图, 见图 3, 结果显示空白溶剂对样品检测无干扰。

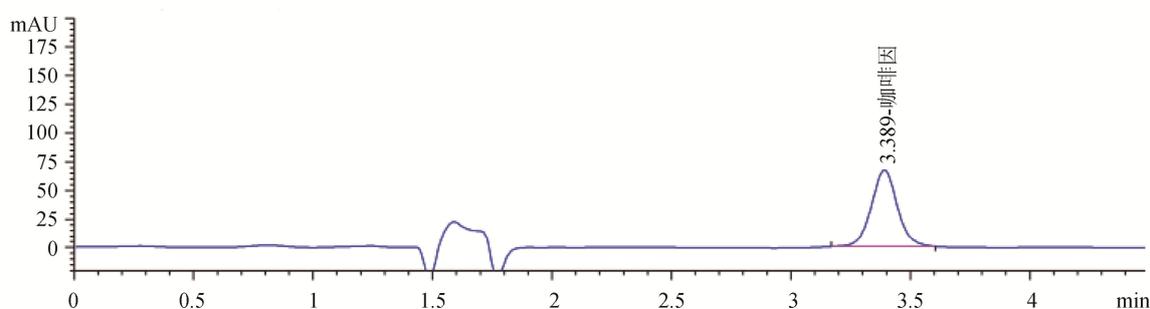


图1 咖啡因标准品的色谱图

Fig. 1 The chromatogram of caffeine standard solution

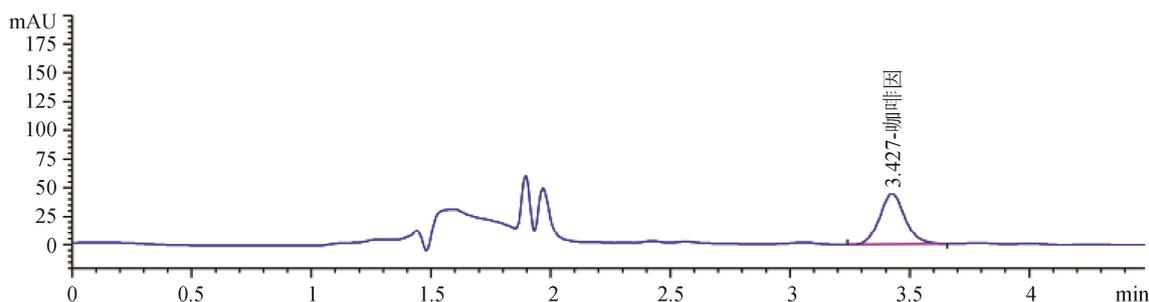


图 2 样品的色谱图

Fig. 2 The chromatogram of the sample

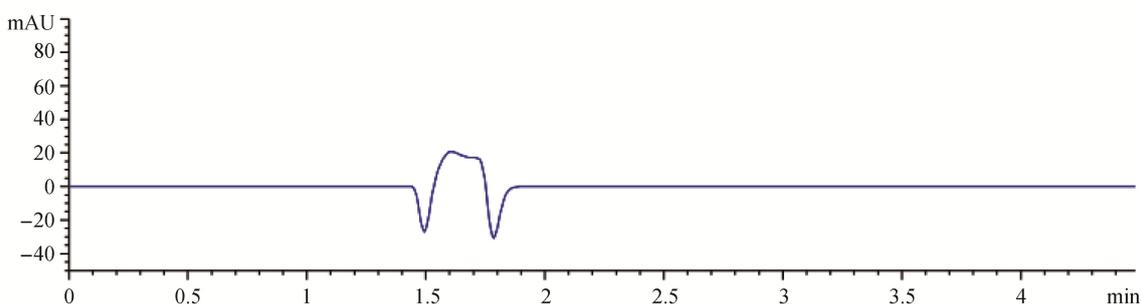


图 3 空白溶剂的色谱图

Fig.3 The chromatogram of blank samples

3.2 线性实验

线性实验结果如表 1 所示, 相关系数 r^2 为 1.0000, 所以用该方法测定咖啡因的含量, 在浓度为 0.0010 mg/mL~0.050 mg/mL 之间呈现良好的线性关系。

表 1 线性实验结果

Table 1 Linear experimental results

序号	浓度 C(mg/mL)	咖啡因峰面积(A)
STD1	0.0010	26.22766
STD2	0.0020	49.69597
STD3	0.0050	119.95182
STD4	0.010	236.94783
STD5	0.050	1195.28162
线性方程	$A=23878C+0.880$	
相关系数(r^2)	1.0000	

3.3 定量限和检出限

分析方法的检出限 DL 和定量限 QL 由信噪比

(S/N)计算。DL 定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析物浓度, QL 定义为 $S/N=10$ 时对应的分析物浓度。

3.3.1 定量限

精密吸取浓度为 0.50 mg/mL 的咖啡因标准溶液 1 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得浓度为 0.0050 mg/mL 的咖啡因标准溶液, 再从该浓度的咖啡因标准溶液吸取 3 mL 至 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得浓度为 0.00060 mg/mL 的咖啡因标准溶液, 最后从该浓度的咖啡因标准溶液吸取 3 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得浓度为 0.18 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 测得信噪比分别为 9.7, 取信噪比为(10:1), 方法的检测浓度为: QL(咖啡因)=0.18 $\mu\text{g/mL}$, 按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为: 0.18 $\mu\text{g/mL} \times 50 \text{ mL} / 0.1 \text{ g} = 92.78 \mu\text{g/g}$ 。

3.3.2 检出限

精密吸取浓度为 0.18 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡因标准溶液 3 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得浓度为 0.060 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡因标准品溶液, 测得信噪比分别为 3.1, 即取信噪比为(3:1), 方法的检测浓度

为: DL(咖啡因)=0.058 $\mu\text{g/mL}$, 按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为: 0.058 $\mu\text{g/mL} \times 50 \text{ mL} / 0.1 \text{ g} = 29.03 \mu\text{g/g}$ 。

3.4 稳定性实验

取同一批供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 其峰面积的 RSD=0.54%, 说明茶叶茶氨酸供试品溶液在 24 h 内较稳定。

3.5 精密度实验

精密称取样品 6 份, 按 1.3.2 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 RSD(%). 6 个样品的平均含量是 0.86 %, 相对标准偏差(RSD)为 0.20%, 具有良好的精密度, 结果见表 2。

3.6 加标回收率实验

精密称取约 0.10 g 样品 9 份, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入咖啡因标准品(浓度为 0.50 g/mL)1.40、1.70、2.00 mL, 加入甲醇+水+磷酸=100+400+0.5 (V:V:V)适量, 超声 15 min 后以 3000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后, 作为加标样品溶液, 按色谱条件进行检测, 结果见表 3。

从表 3 中可以看出, 在不同添加水平下, 茶氨酸提取物中咖啡因方法的回收率范围为 95.0~105.0%, 平均回收率为 100.2%, 相对标准偏差(RSD)为 1.0%。

表 2 精密度实验($n=6$)
Table 2 The precision of experiment ($n=6$)

序号	称样量(g)	浓度(mg/mL)	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
1	0.1154	0.0199324	0.865		
2	0.10986	0.0190170	0.865		
3	0.11342	0.0196129	0.864	0.86	0.20%
4	0.10859	0.0187361	0.862		
5	0.11294	0.0195542	0.865		
6	0.10862	0.0187627	0.863		

表 3 加标回收率实验结果($n=9$)
Table 3 Standard addition recovery experiment results ($n=9$)

序号	样品称样量(g)	样品浓度(mg/mL)	测得对照品量(mL)	加标量(mL)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.10712	0.0325303	1.41	1.40	100.71		
2	0.10554	0.0321299	1.39	1.40	99.28		
3	0.10490	0.0319375	1.38	1.40	98.57		
4	0.11610	0.0370482	1.69	1.70	99.41		
5	0.11701	0.0373141	1.71	1.70	100.59	100.2	1.0
6	0.11799	0.0373625	1.70	1.70	100.00		
7	0.11374	0.0397319	2.01	2.00	100.50		
8	0.11345	0.0398359	2.03	2.00	101.50		
9	0.11431	0.0399220	2.02	2.00	101.00		

3.7 样品的测定

采用本实验方法, 对茶氨酸提取物进行咖啡因含量的测定, 共测定了 3 批样品, 结果均符合要求, 表明此方法能用于日常检验, 样品的咖啡因的含量见表 4。

表 4 咖啡因的含量($n=3$)
Table 4 The content of caffeine ($n=3$)

样品批号	结果(%)	理论值(%)
20150301	0.86	0.86
20150302	0.88	0.90
20150303	0.87	0.88

4 小 结

本文通过高效液相色谱法对茶氨酸提取物中的咖啡因含量进行了测定, 该方法具有准确性好, 精密度高和重现性好等优点, 可用于茶氨酸提取物中咖啡因含量的检测。

参考文献

- [1] 李海霞, 陈榕, 周丹. 咖啡因的合成及其药理作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(2): 182-187.
Li HX, Chen R, Zhou D. The synthesis and the research progress of pharmacological effects of caffeine [J]. Pharm J West China, 2011, 26(2): 182-187.
- [2] Brice C, Smith A. The effect of caffeine on simulated driving, subjective alertness and sustained attention [J]. Hum Psychopharm, 2001, 16(7): 523-531.
- [3] Smitn AP, Maben A, Brockman P. The effects of caffeine and evening meals on sleep and performance, mood and cardiovascular functioning the following day [J]. J Psychopharma, 1999, 14(7): 203-206.
- [4] 黄丹. 薄层色谱法在药物分析中的应用研究[J]. 化学工程与装备, 2009, (8): 139.
Huang D. The application of thin layer chromatography in pharmaceutical analysis [J]. Chem Eng Equip, 2009, (8): 139.
- [5] 章育中. 薄层层析法和薄层扫描法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990.
Zhang YZ. Thin layer chromatography and thin layer scanning method [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1990.
- [6] 陶锐. 薄层色谱及其在食品卫生分析上的应用. 成都: 四川人民出版社, 1982.
Tao R. Thin layer chromatography and its application in food hygiene analysis [M]. Chengdu: The Sichuan People's Publishing House, 1982.
- [7] 孙延春, 张英. 紫外光谱法测定饮料中的咖啡因含量[J]. 化学研究, 2011, 22(1): 77-79.
Sun YC, Zhang Y. Ultraviolet spectrometry determination of caffeine in beverages [J]. Chem Res, 2011, 22(1): 77-79.
- [8] 丁明珍, 邹建凯. 离心萃取-紫外光谱法测定可乐饮料中咖啡因的含量[J]. 分析化学, 2008, 36(3): 381-384.
Ding MZ, Zhou JK. Centrifugal extraction-ultraviolet spectrometry determination of caffeine content in cola drinks [J]. Anal Chem, 2008, 36(3): 381-384.
- [9] 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.
Shuai Q, Gong Y, Yang W, et al. Reversed phase high performance liquid chromatography determination of coke, the caffeine in tea [J]. Anal Lab, 2002, 21(1): 68-70.
- [10] 董树国, 陆钊. 高效液相色谱法测定绿茶饮料中的咖啡因含量[J]. 广东化工, 2011, 38 (12): 136-137.
Dong SG, Lu C. High performance liquid chromatography determination of caffeine in green tea beverage [J]. Guangdong Chem, 2011, 38 (12): 136-137.
- [11] 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 JQ, Jia L, Xia M. Liquid chromatography determination of caffeine, theobromine and theophylline in drinks [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(1): 114-116.
- [12] 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.
Wang CR, Zhang J, Liu LZ. Reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of caffeine in beverages [J]. Prevent Med BBS, 2005, 11(1): 59 - 60.
- [13] GB/T 5009.197-2003 中咖啡因的测定[S].
GB/T 5009.197-2003 Determination of caffeine [S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈彩云, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 504990659@qq.com