

高效液相色谱法测定咖啡因的不确定度评定

魏鲜娥, 蔡伟江*, 李诗华, 李斌

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定咖啡因的不确定度的评估方法。**方法** 试样中的咖啡因用甲醇: 水: 磷酸=100:400:0.5(V:V:V)混合溶液进行提取, 在波长 280 nm 下, 经流动相洗脱, 色谱系统分离, 采用外标法测定咖啡因的含量, 然后依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》, 对标准物质、仪器重复测量、精密度和样品称量等因素引入的不确定度进行分析和计算。**结果** 当试样中咖啡因含量为 7.50%时, 在 95%的置信区间下, 其扩展不确定度为 $\pm 0.13\%$ ($k=2$)。实验过程中的不确定度主要来源于仪器测量、标准物质及人员操作。**结论** 该不确定度评定适用于高效液相色谱法测定咖啡因含量的过程分析, 对检测结果准确度的控制具有指导意义。

关键词: 不确定度; 咖啡因; 液相色谱法

Evaluation of uncertainty in the determination of caffeine by high performance liquid chromatography

WEI Xian-E, CAI Wei-Jiang*, LI Shi-Hua, LI Bin

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

ABSTRACT: Objective To establish an evaluation method for the uncertainty in the determination of caffeine by high performance liquid chromatography. **Methods** The caffeine in the sample was extracted with methanol: water: phosphoric acid=100:400:0.5(V:V:V) mixed solution, eluted by mobile phase at the wavelength of 280 nm, separated by chromatographic system, and determined by external standard method. Then according to JJF 1059.1-2012 *Evaluation and Expression of Measurement Uncertainty*, the uncertainty of standard substance, instrument measurement, precision and sample weighing were introduced conduct analysis and calculation. **Results** When the caffeine content was 7.498%, the expanded uncertainty was $\pm 0.13\%$ ($k=2$) at 95% confidence interval. The uncertainty in the experiment mainly came from instrument measurement, reference material and personnel operating. **Conclusion** The uncertainty evaluation is applicable to the process analysis of caffeine content determination by high performance liquid chromatography, which has guiding significance for the control of the accuracy of the detection results.

KEY WORDS: uncertainty; caffeine; high performance liquid chromatography

1 引言

咖啡因是一种黄嘌呤生物碱化合物, 溶于乙酸乙酯, 微溶于石油醚, 属于一种中枢神经兴奋剂, 用于治疗昏迷

复苏、神经衰弱。适量摄入有益于运动和神经功能, 可缓解疲劳, 醒脑提神; 当长期或大量使用会对人体产生危害。近年来咖啡因的检测研究引起了人们的高度重视, 尤其是在食品安全研究方面。目前咖啡因的测定方法主要有

*通讯作者: 蔡伟江, 工程师, 主要研究方向为保健食品安全检测。E-mail: 714524253@qq.com

*Corresponding author: CAI Wei-Jiang, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 714524253@qq.com

近红外光谱法^[1,2]、紫外分光光度法^[3,4]、拉曼光谱法^[5]、液相色谱法^[6-9]、气相-质谱法^[10]、液相-质谱法^[11,12]及超高效液相色谱法^[13,14]。本研究通过建立高效液相色谱法测定绿茶粉中咖啡因含量,并依据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[15],对实验过程中出现的各种不确定度因素进行研究和分析,明确各不确定度因素在检验过程中的影响,为保证检测结果的准确性,提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

咖啡因标准品(浓度 0.50 mg/mL,批号:GBW(E)100174,北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司);1-癸烷磺酸钠(离子对试剂,国药集团化学试剂有限公司);一级水;乙腈(色谱纯,上海安普实验科技股份有限公司);磷酸(分析纯,广州化学试剂厂);测定样品:绿茶粉(A公司)。

EQ-500 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm,北京迪马科技有限公司);LE203E 电子天平(感量 0.1 mg,瑞士梅特勒-托利多科学仪器有限公司)。

2.2 色谱条件

流动相:癸烷磺酸钠溶液(称取 1.22 g 癸烷磺酸钠,加水 850 mL 超声溶解):乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V);流速:1.0 mL/min;C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm);柱温:40 °C;进样量:10 μL;检测波长:280 nm。

2.3 标准溶液的配制

精密吸取咖啡因标准溶液 5.0 mL 于 25 mL 棕色容量瓶中,用甲醇:水:磷酸=100:400:0.5(V:V:V)混合溶液溶解并定容至刻度,摇匀,浓度约为 0.10 mg/mL,作为储备液。分别精密吸取咖啡因储备液稀释成 5 个浓度,分别为 0.01、0.02、0.05、0.08、0.10 mg/mL 的标准曲线浓度。

2.4 供试品溶液的配制

精密称取 30.00 mg 测定样品,置于 50 mL 容量瓶中,精确加入甲醇:水:磷酸=100:400:0.5(V:V:V)混合溶液,超声使其全部溶解,冷却,定容至刻度,离心,过滤,得供试品溶液,取供试品溶液 10 μL 进样检测测定样品的含量。

2.5 精密度实验

精密称取测定样品 6 份,按 2.4 供试品溶液的配制方法处理样品进行检测,计算出各测定样品含量,计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) (%)。

2.6 回收率实验

精密称取 30.00 mg 测定样品 9 份,置于 50 mL 容量瓶中,分成 3 组,每组 3 份,于每一组中分别精密加入相应体积的标准溶液,按 2.4 供试品溶液的配制方法处理样品进行检测,计算出每份样品中标准溶液的含量,与每份样品中标准溶液的实际含量进行比较,计算出回收率。

3 结果与分析

3.1 样品波长分析

经紫外 200~300 nm 扫描,咖啡因在 280 nm 处有最大的吸收,通过进样色谱系统,得记录色谱图,其基线平稳、分离度好及峰型符合要求,如图 1 所示。所以选择了 280 nm 作为检测波长。

3.2 标准曲线

检测咖啡因的标准溶液曲线如图 2 所示,其标准方程为 $Y=12954X+4.5728(r^2=1.0000)$,线性范围为 0.01~0.10 mg/mL,在此范围内线性关系良好。

3.3 精密度

检测咖啡因的精密度结果见表 1,6 个样品的含量范围为 7.444%~7.525%,平均含量 7.50%,相对标准偏差为 0.62%,表明该方法有良好的精密度。

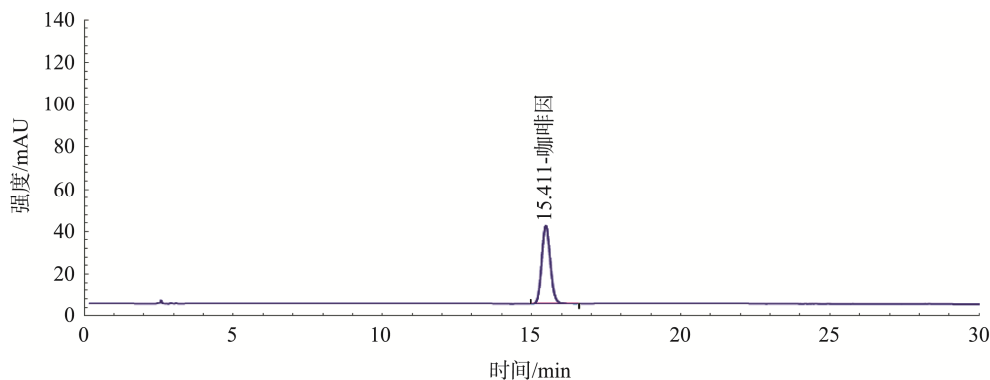


图 1 咖啡因标准品曲线图
Fig.1 Standard curve of caffeine

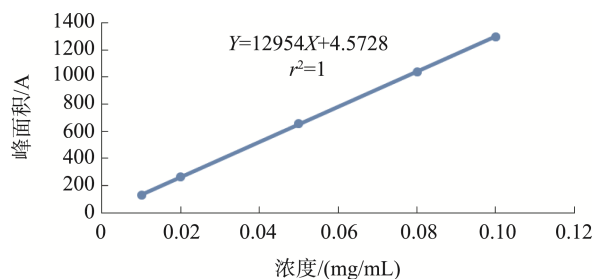


图 2 咖啡因标准品曲线图
Fig.2 Standard curve of caffeine

3.4 检出限和定量限

分析方法的检出限和定量限由信噪比(S/N)计算。检出限定义为 S/N=3 时, 定量限定义为 S/N=10 时, 分别通过计算得出。检出限: 将浓度为 0.04 μg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 S/N=3。按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为 0.033 mg/g; 定量限: 取信噪比=10:1 定为

检测浓度, 检测浓度 0.13 μg/mL, 按照实际样品的处理过程计算, 方法的定量限为 0.11 mg/g。

3.5 回收率

咖啡因的回收率实验结果见表 2, 3 个浓度下 9 个样品中的咖啡因平均回收率为: 99.7%, 相对标准偏差为 1.1%, 说明该方法的回收率较好。

3.6 不确定度来源评估

建立不确定度数学模型, 采用合成相对标准不确定度公式:

$$u_{rel}(x) = \sqrt{u_r(x_1)^2 + u_r(x_2)^2 + u_r(x_3)^2 + u_r(x_4)^2} \quad (1)$$

式中: $u_{rel}(x)$ 表示合成相对标准不确定度;
 $u_r(x_1)$ 表示由标准物质引入的相对标准不确定度;
 $u_r(x_2)$ 表示由仪器重复测量引入的相对标准不确定度;
 $u_r(x_3)$ 表示由人员操作引入的相对标准不确定度;
 $u_r(x_4)$ 表示由样品称量引入的相对标准不确定度。

表 1 精密度的实验结果
Table 1 Precision of the experimental results

序号	称样量/g	浓度/(μg/mL)	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	0.03254	0.0484458	7.444	7.50	0.62
2	0.03212	0.0484014	7.534		
3	0.03309	0.0499956	7.554		
4	0.03327	0.0500762	7.525		
5	0.03213	0.0480306	7.474		
6	0.03234	0.0482022	7.452		

表 2 加标回收率实验结果
Table 2 Standard addition recovery experiment results

序号	测得对照品量/μg	加标量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	39.20	40	98.00	99.7	1.1
2	39.59	40	98.97		
3	40.28	40	100.70		
4	49.82	50	99.64		
5	49.01	50	98.02		
6	50.14	50	100.28		
7	60.31	60	100.52		
8	60.37	60	100.62		
9	60.58	60	100.97		

3.6.1 标准物质引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_1)]$

标准物质影响因素主要有精密移液、配制过程及标准物质本身。其中(1)精密移液引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_a)]$: 用移液管精密移取咖啡因标准物质溶液 5.0 mL; 查移液管校准报告, 5 mL 移液管的扩展不确定度 $U=0.025$ mL, $k=2$; (2)配制过程引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_b)]$: 标准品溶液稀释定容至 25 mL 棕色容量瓶中, 查移液管校准报告, 实验中所用的 25 mL 容量瓶的扩展不确定度 $U=0.03$ mL, $k=2$; (3)标准物质本身引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_c)]$: 查咖啡因标准品证书, 咖啡因标准品纯度为 100%,

由咖啡因标准品纯度引入的标准不确定度忽略不计。

标准物质引入的相对标准不确定度 $(u_r(x_1))$ 为:

$$u_r(x_1) = \sqrt{u_r(x_a)^2 + u_r(x_b)^2 + u_r(x_c)^2} = \sqrt{\left(\frac{0.025}{5 \times 2}\right)^2 + \left(\frac{0.03}{25 \times 2}\right)^2} = \sqrt{0.0025^2 + 0.0006^2} = 0.00257 \quad (2)$$

3.6.2 仪器重复测量引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_2)]$

取同一样品, 连续进样 6 次, 记录其色谱峰面积, 其测量结果如下表 3:

表 3 重复进样 6 次峰面积的测量值
Table 3 Repeat the measured values of the six peak areas

序号	1	2	3	4	5	6	平均值
峰面积	631.5185	630.9423	651.6331	652.6788	626.1291	628.3563	636.8764

仪器重复测量引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_2)]$ 为:

$$u_r(x_2) = \frac{S_1}{\sqrt{n} \times X} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - X)^2}{(n-1)}}}{\sqrt{n} \times X} = \frac{11.958}{\sqrt{6} \times 636.8764} = 0.00766 \quad (3)$$

式中: S_1 : 仪器重复测量时的标准偏差;

X : 仪器重复测量时的平均峰面积

A_i : 仪器每一次测量时的峰面积;

n : 仪器重复测量次数。

3.6.3 人员操作引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_3)]$

从表 1 可知, 人员独立称量 6 份样品得出的检测结果是波动的, 其平均值结果是 $X=7.498\%$, 引起的不确定度为:

$$u_r(x_3) = \frac{S_2}{\sqrt{n} \times X} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (B_j - X)^2}{(n-1)}}}{\sqrt{n} \times X} = \frac{0.0465}{\sqrt{6} \times 0.07498} = 0.00253 \quad (4)$$

式中: S_2 : 人员多次称量时检测结果标准偏差;

X : 多份样品测量结果平均值;

B_j : 每份独立样品的检测结果;

n : 人员称量样品份数。

3.6.4 样品称量引入的相对标准不确定度 $[u_r(x_4)]$

用电子天平进行称量, 试样重量 $m=30$ mg, 查电子天平的校准报告, 天平的扩展不确定度 $U=0.02$ mg, $k=2$, 则有:

$$u_r(x_4) = \frac{U}{K \times 30} = \frac{0.02}{2 \times 30} = 0.000333 \quad (5)$$

3.6.5 合成相对标准不确定度 $U_{rel}(X)$:

$$u_{rel}(x) = \sqrt{u_r(x_1)^2 + u_r(x_2)^2 + u_r(x_3)^2 + u_r(x_4)^2} = \sqrt{0.00257^2 + 0.00766^2 + 0.00253^2 + 0.000333^2} = 0.0085 \quad (6)$$

取包含因子 $k=2$ (置信概率为 95%), 咖啡因测定的扩展不确定度为:

$$U = u_{rel}(x) \times k \times 7.50\% = 0.13\% \quad (7)$$

试样中的咖啡因含量的测量结果为:

即: $W=(7.50 \pm 0.13)\%$, ($k=2$)。

4 结 论

本文通过甲醇: 水: 磷酸=100:400:0.5(V:V:V)混合溶液对试样进行溶解, 采用癸烷磺酸钠溶液(1.22 g 到 850 mL): 乙腈:磷酸=850:150:1(V:V:V)等度洗脱作为流动相, 经 C_{18} 色谱柱, 采用 280 nm 波长, 对绿茶粉中咖啡因进行定量检测。通过测定其线性范围、精密度、检出限、定量限和回收率实验, 结果令人满意, 同时通过对方法过程中仪器重复测量、标准物质、人员操作及样品称量引起的不确定度评估, 确认了仪器测量是导入不确定度的最大因素, 其次是标准物质和人员操作, 在检测过程中需要对这些 3 项进行严格控制, 从而提高检验的准确性。

参考文献

- [1] 彭梦侠, 姚婉清, 陈梓云, 等. 近红外光谱法快速筛查减肥类保健品中的咖啡因[J]. 化学试剂, 2019, (4): 69-72.
Peng MX, Yao WQ, Chen ZY, et al. Rapid screening of caffeine in weight-loss health care products by near infrared spectroscopy [J]. Chem Reagent, 2019, (4): 69-72.
- [2] 雷毅, 罗卓雅, 王彩媚. 近红外光谱快速检测痰液净散中咖啡因的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, (6): 46-50.
Lei Y, Luo ZY, Wang CM. Rapid determination of caffeine in tankejing

- powder by near infrared spectroscopy [J]. *J Drug Anal*, 2011, (6): 46–50.
- [3] 展惠英. 紫外分光光度法测定饮料中的咖啡因含量[J]. 甘肃联合大学学报(自然科学版), 2013, 27(4): 51–53.
Zhan HY. Determination of caffeine in beverages by ultraviolet spectrophotometry [J]. *J Gansu Lianhe Univ (Nat Sci)*, 2013, 27(4): 51–53.
- [4] 张薇. 紫外分光光度法测定饮料制品中的咖啡因含量[J]. 山东化工, 2017, (14): 78–79.
Zhang W. Determination of caffeine content in beverage products by UV spectrophotometry [J]. *Shandong Chem Ind*, 2017, (14): 78–79.
- [5] 房若宇. 激光拉曼光谱结合紫外光谱检测茶水中的咖啡因[J]. 大学物理实验, 2013, (2): 17–19.
Fang RY. Detection of caffeine in tea by laser Raman spectroscopy combined with ultraviolet spectroscopy [J]. *Univ Phys Exper*, 2013, (2): 17–19.
- [6] 李国定, 陈舒香, 谭景遥. 高效液相色谱法测定保健食品和SD大鼠血清中咖啡因的浓度[J]. 现代食品, 2017, (2): 115–116.
Li GD, Chen SX, Tan JY. Determination of caffeine in health food and SD rat serum by HPLC [J]. *Mod Food*, 2017, (2): 115–116.
- [7] 黄姝娜. 高效液相色谱法测定黑茶中咖啡因含量分析[J]. 食品安全导刊, 2018, (33): 77–79.
Huang YN. Determination of caffeine in black tea by HPLC [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2018, (33): 77–79.
- [8] 黄现青. 高效液相色谱法测定茶饮料中的咖啡因[J]. 饮料工业, 2015, (1): 49–51.
Huang XQ. Determination of caffeine in tea drinks by HPLC [J]. *Bever Ind*, 2015, (1): 49–51.
- [9] 武开业. 反相高效液相色谱法测定可乐中咖啡因的含量[J]. 科技视界, 2014, (28): 351–352.
Wu KY. Determination of caffeine in Coke by RP-HPLC [J]. *Sci Technol Horizon*, 2014, (28): 351–352.
- [10] 丁明珍, 于海燕, 王丹. 气相色谱-质谱法测定可乐饮料中咖啡因含量[J]. 理化检验(化学分册), 2015, 51(12): 133–135.
Ding MZ, Yu HY, Wang D. Determination of caffeine content in cola beverage by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Phy Chem Test (Chem Vol)*, 2015, 51 (12): 133–135.
- [11] Ren HB, Chen YS, Wang HL, *et al.* Determination of caffeine, taurine and five water-soluble vitamins in tobacco products by HPLC-MS/MS [J]. *Chromatographia*, 2019, 82(11): 1665–1675.
- [12] 陈彩云, 魏鲜娥, 蔡伟江, 等. 液相色谱-串联质谱法测定巴西绿蜂胶制品中咖啡因的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2212–2216.
Chen CY, Wei XE, Cai WJ, *et al.* Determination of caffeine content in Brazilian green bee propolis products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(9): 2212–2216.
- [13] 蔡荣华, 张晓芳, 杜精精, 等. 超高效液相色谱紫外检测法同时测定绿咖啡豆提取物中的绿原酸和咖啡因含量[J]. 中国食品添加剂, 2014, (2): 181–184.
Cai RH, Zhang XF, Du JJ, *et al.* Simultaneous determination of chlorogenic acid and caffeine in green coffee bean extract by ultra high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *Chin Food Addit*, 2014, (2): 181–184.
- [14] 秦园, 王惠芳, 吴建兵, 等. 超高效液相串联质谱检测茶叶及茶饮料中咖啡因含量[J]. 食品工业科技, 2019, (10): 292–295.
Qin Y, Wang HF, Wu JB, *et al.* Determination of caffeine in tea and tea drinks by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Ind Technol*, 2019, (10): 292–295.
- [15] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and indication of measurement uncertainty [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品质量安全与检测。
E-mail: weixie@by-health.com



蔡伟江, 工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 714524253@qq.com