

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.02.007

高效液相色谱法测定可乐中咖啡因含量

丁瑞芳 张敏娜 朱 军

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘要 目的 用 HPLC 测定可乐中咖啡因的含量, 建立测定可乐中咖啡因含量的高效液相色谱法的最佳工作条件。**方法** 色谱柱采用 kromasilC18 柱 (250mm×4.6mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (40:60); 流速: 1.0ml/min; 检测波长为 275nm; 进样量 20 μ l; 柱温为室温。**结果** 咖啡因与其它杂质均能达到基线分离, 其色谱峰形好。咖啡因的浓度在 30~70 μ g/ml 时与峰面积成良好的线性关系 ($y=27498x+67325$, $r=0.9994$), 平均加样回收率为 100.1%, 方法精密度 RSD 为 1.2% ($n=6$)。**结论** 该方法准确、简便、快速, 适合可乐中咖啡因的含量测定。

关键词 高效液相色谱法; 可乐; 咖啡因

中图分类号: R927.2 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)04-106-03

Determination of caffeine in cola by high performance liquid chromatograph

DING Rui-fang, ZHANG Min-na, ZHU Jun

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826)

Abstract: Objective To determine the determination of caffeine in cola by high performance liquid chromatograph and optimize the HPLC separation conditions. **Methods** The chromatographic column kromasil C18 (250mm×4.6mm, 5 μ m) and Methanol/H₂O (40:60) as mobile phase were used. The flow rate was 1.0ml/min and the detective wavelength was 275nm. Injection volume was 20 μ l. The column temperature was room temperature. **Results** Caffeine and other peaks were separated well and the peak shape was presented well. There was a good linearity within the range of 30 to 70 μ g/ml of caffeine. The average recovery was 101.3%. The RSD was 1.15% ($n=6$). **Conclusion** This method is accurate, simple and quick. Therefore it is suitable for the determination of caffeine in cola.

Key words: High performance liquid chromatograph Cola Caffeine

咖啡因又称咖啡碱, 普遍存在于咖啡、茶叶等食品中, 也作为食品添加剂, 常添加于可乐型饮料中。食品中咖啡因的测定方法很多, 有离心萃取-紫外光谱法^[1]、紫外二阶导数光谱法^[2]、薄层色谱法和高效液相色谱法^[3]。紫外分光光度法需用氯仿萃取, 而薄层色谱法样品预处理也比较麻烦, HPLC 灵敏、快速、准确, 样品预处理简单, 可用于可乐中咖啡因的含量测定。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 (包括 LC-10ATVP 型输液泵; SPD-10AVP 型紫外-可见检测器), kromasilC18 (250mm×4.6mm, 5 μ m) 柱; C-R8A 高效

液相色谱积分仪; SHB-B 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); KQ-500DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

1.1.2 试剂与药品

甲醇 (色谱纯, 天津市永大化学试剂开发中心), 水为重蒸水; 咖啡因对照品 (中国药品生物制品检定所提供); 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)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱 kromasil C18 柱 (250mm×4.6mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水 (40:60); 检测波长:

275nm;流速:1.0ml/min;进样量 20 μ l,柱温为室温。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取咖啡因对照品 0.0125g 于 50ml 容量瓶中,加水溶解,定容至刻度,摇匀,作为对照品储备液(250 μ g/ml)。在该色谱条件下标准品(见图 1)无干扰,样品中咖啡因的峰与其它的峰可以得到良好的分离效果(图 2,图 3)。

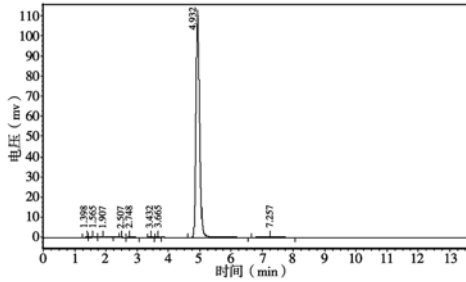


图 1 咖啡因标准品色谱图

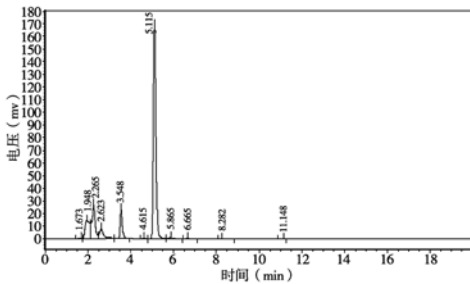


图 2 百事可乐中咖啡因色谱图

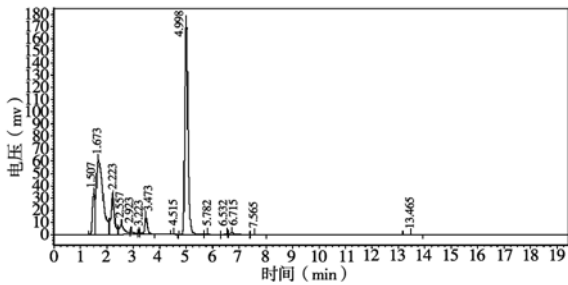


图 3 可口可乐中咖啡因色谱图

1.2.3 供试品溶液的制备

市售可乐饮料经超声脱气 20min 后,用普通漏斗过滤,取试样 25ml 于 50ml 容量瓶中,加水定容至刻度,作为供试品溶液。

1.2.4 线性关系的考察

精密吸取对照品溶液 3.00,4.00,5.00,6.00,7.00ml 分别置于 25ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,分别进样 20 μ l,按色谱条件进行分析测定,结果见表 1。以浓度(μ g/ml)为横坐标,峰面积

为纵坐标作标准曲线,如图 4 所示,得回归线性方程为 $y = 27498x + 67325$,相关系数 $r = 0.9994$,因此咖啡因在 30~70 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好。

表 1 线性关系的考察

标准品浓度(μ g/ml)	30	40	50	60	70
峰面积	892207	1181050	1417039	1726234	1994495

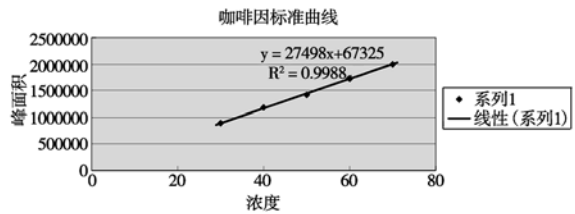


图 4 咖啡因标准曲线

1.2.5 精密度试验

在上述色谱条件下,精密吸取同一浓度(50 μ g/ml)的咖啡因对照品溶液,进样 20 μ l,连续测定 6 次,记录峰面积,结果见表 2,RSD=1.2%,表明精密度良好。

表 2 精密度试验

峰面积	平均值	RSD(%)
1374883	1395860	1.2
1413117		
1376665		
1396093		
1397363		
1417039		

1.2.6 重复性试验

分别取供试品(百事可乐)5 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定,记录峰面积,结果见表 3,平均含量为 92.38 μ g/ml,RSD=1.9%。

表 3 重复性试验

峰面积	测定结果(μ g/ml)	平均值(μ g/ml)	RSD(%)
1362142	94.18	92.38	1.9
1351911	93.43		
1323201	91.34		
1310612	90.42		
1339519	92.53		

1.2.7 稳定性试验

取供试品溶液(百事可乐)1 份,在上述色谱条件下,分别于制备的第 0、4、8、12 和 16 h,进样测定,记录峰面积,结果见表 4,RSD=0.09%,表明稳定性较好。

表4 稳定性试验

时间(h)	峰面积	平均值	RSD(%)
0	1433826	1433933	0.09
4	1435654		
8	1432056		
12	1434409		
16	1433718		

1.2.8 回收率试验

精密量取5份已知含量的可乐饮料5ml,分别精密加入咖啡因对照品溶液1.00ml(50 μ g/ml),按供试品溶液制备方法制得供试品溶液5份,在上述色谱条件下,分别进样测定,记录峰面积,计算得平均回收率=100.1%,RSD=0.46%,结果见表5。

表5 加样回收率

加入量(μ g)	测得量(μ g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
50.00	50.31	100.6	100.1	0.46
50.00	49.77	99.5		
50.00	50.17	100.3		
50.00	49.84	99.7		
50.00	49.89	99.8		
50.00	50.23	100.5		

1.2.9 样品的含量测定

取不同种类及不同批号的可乐饮料,按上述实验方法制备样品溶液,在上述色谱条件测定,记录峰面积,代入标准曲线测得饮料中咖啡因的含量,结果见表6。

表6 样品测定结果

样品	批号	峰面积	含量(μ g/ml)
可口可乐	20080715	1086558	74.13
可口可乐	20090412	1380628	95.52
可口可乐	20090502	1411025	97.73
百事可乐	20090330	1433283	99.35
百事可乐	20090413	1518601	105.6

2 结果与讨论

2.1 结果

咖啡因与其它杂质均能达到基线分离,其色谱峰形好。咖啡因的浓度在30~70 μ g/ml时与峰面积成良好的线性关系($y = 27498x + 67325$, $r = 0.9994$),平均加样回收率为100.1%,方法精密密度RSD为1.2%($n = 6$)。测定不同批号的可口可乐中咖啡因的含量分别为74.13 μ g/ml、95.52 μ g/ml、97.73 μ g/ml;不同批号的百事可乐中咖啡因的含量分别为99.35 μ g/ml、105.6 μ g/ml。

2.2 检测波长的选择

嘌呤类生物碱基均具有共轭离域大 π 键结构,在紫外光区具有强烈的光吸收特性。在210~400nm范围内,扫描并绘制了咖啡因的吸收光谱曲线,结果见图5,其最大吸收波长在275nm处,所以本文选用275nm为检测波长。

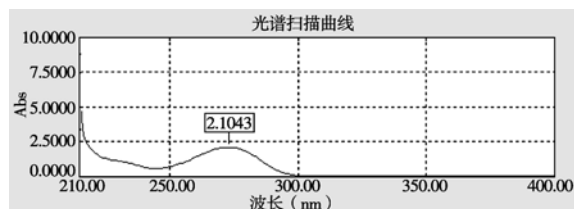


图5 咖啡因的吸收光谱曲线

2.3 流动相的选择

采用甲醇-水为流动相,考察了甲醇比例在40%、45%、50%、55%、60%范围变化对咖啡因保留时间的影响。结果表明,咖啡因和样品中其他成分的分离受流动相中有机相的比例影响较大,综合考虑分离效果,流动相成分的简易和分析时间,选用40%的甲醇为流动相,此时咖啡因的保留时间比较适宜,且分离效果较好。

2.4 不同种类的可乐饮料中咖啡因的含量比较

由测定结果可知,不同种类的可乐饮料中咖啡因的含量接近,百事可乐中咖啡因的含量更高,但都符合国家标准规定饮料中0.15mg/kg的最高限量。对于同一种类而批号不同的可乐其咖啡因的含量不太一致,可乐中咖啡因的含量随时间的延长而逐渐减少,这对于监控可乐生产工艺和分辨真伪可乐具有一定的意义。

本方法操作简单易行,灵敏度高,通过对不同浓度的甲醇-水溶液进行考察,选择了最佳色谱条件,提高了测定的精密密度,适合可乐型饮料中咖啡因的含量测定。通过对其中咖啡因进行准确测定,将有助于对饮料的生产工艺、产品质量进行准确监控,有利于产品真伪的辨别,同时也有利于引导人们对功能性饮品进行正确消费。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 朱强华,黄奕,张可扬. 紫外二阶导数光谱法测定可乐型饮料中咖啡因[J]. 中国公共卫生,2001,17(5):467.
- [3] 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.

(收稿日期 2012-03-25)