

咖啡因检测方法研究进展

王乐¹ 贾宗平² 赵文成³ 杨亚飞⁴

(1. 南京森林警察学院, 南京 210023; 2. 甘肃政法学院, 兰州 737100;
3. 青海民族大学, 西宁 810000; 4. 甘肃警察职业学院, 兰州 730046)

内容摘要: 咖啡因 (Caffeine), 属生物碱性化合物, 主要分布于茶叶、咖啡豆等植物的幼嫩组织部位。因作用于人体中枢神经系统, 使机体产生兴奋作用, 被广泛用于药物及食品中。作为国家管制精神药品物质的咖啡因, 其管制力度远低于其他滥用药物, 但近些年由于咖啡因摄入过量而造成的死伤案例逐渐增多。因此, 研究咖啡因的中毒机理及检测方法逐步成为国内外的研究重点, 尤其是其检测方法的研究在食品安全及法医鉴定中均具有重要的意义。为全面了解咖啡因的理化性质及在食品、药物与毒品研究领域的定性定量方法, 概述了咖啡因的性质及研究发展过程, 及咖啡因的检测方法和应用, 从光谱法、色谱法、电泳法、联用技术四个方面介绍了咖啡因检测的进展, 重点讨论了几类现代分析技术用于检测咖啡因的实验条件和效果。结合实际应用, 指出当前研究工作中的优劣, 并提出有待进一步研究的方向。

关键词: 咖啡因; 检测方法; 定性定量

中图分类号: D669.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672—6057 (2019) 01—19—09

一、引言

咖啡因 (Caffeine), $C_8H_{10}N_4O_2$, 1, 3, 7-三甲基黄嘌呤, 属生物碱性化合物。主要分布于茶叶、咖啡豆等植物的幼嫩组织部位, 纯品味苦, 白色粉状物质。咖啡因既被广泛用于药物中, 也常见于食品中, 如红牛等功能性饮料及茶叶、咖啡等饮品中都含有咖啡因成分。咖啡因作为精神活性物质在全世界范围内被广泛使用, 其作用于人体中枢神经系统, 使机体产生兴奋作用。咖啡因作为国家管制的精神药品物质, 其管制力度远低于其他滥用药物, 具有安全范围较大、不良反应轻微的特性。适量摄入有益于运动和神经功能, 可缓解疲劳, 醒脑提神。但若使用过量 (>400mg), 则出现紧张、多尿、失眠、烦躁、血压升高、呼吸加快、心率过快等症状。长期或大量使用会对机体产生以下危害: 一是作用于人体中枢神经系统并造成不同程度的损害; 二

是可能会引发心脏病和高血压等慢性疾病; 三是具有成瘾性, 一旦停用可表现短期或数日头痛或不适, 浑身乏力疲惫, 精神萎靡等各种戒断症状, 摄入中毒剂量可引起阵挛性惊厥, 严重者可致死亡, 长期大量摄入则产生重度成瘾性^①。

近些年, 因咖啡因摄入过量而造成的急诊抢救、死亡案例逐渐增多, 国内外也出现咖啡因中毒案件的报道。尤其是使用者在与乙醇混用后, 产生后果更为严重的中毒症状。因此, 咖啡因的中毒机理及检测方法逐步成为国内外的研究重点, 尤其是咖啡因的检测方法的研究在食品安全及法医鉴定中均具有重要的意义。

生物碱的传统检测方法有碘量法、纸层析法、重量法等。咖啡因研究最早采用的检测方法是碘量滴定法, 在待测液中加入定量标定的碘液, 利用氧化性和还原性, 酸性条件下咖啡因与碘生成不溶性过碘化物用硫代酸钠滴定剩余的碘后换算分析。传统方法操作复杂、误差大、准确

收稿日期: 2018-11-02

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (LGYB201808)。

作者简介: 王乐, 女, 南京森林警察学院刑事科学技术学院讲师, 研究方向为物证技术学。

贾宗平, 男, 甘肃政法学院证据科学学院副教授, 研究方向为物证技术学。

赵文成, 男, 青海民族大学法学院助教, 研究方向为刑事科学技术。

杨亚飞, 男, 甘肃警察职业学院公安学院助教, 研究方向为刑事科学技术。

① 杨洪国. GC/MS法测定毛发中咖啡因及其代谢物 [D]. 甘肃政法学院, 2013.

性较低。在仪器分析快速发展的背景下, 以操作简便、精确度高、检测限低等为目标仪器分析手段也逐步用于咖啡因的检测研究, 主要方法包括光谱法、色谱法、联用技术及毛细管电泳技术等。

二、光谱法

光谱法是通过物质内部量子化的能级因跃迁而产生的散射、辐射、发射及吸收的强度和波长进行分析的方法^①。根据咖啡因的物质性质, 适用于其检测的光谱法主要是紫外光谱法、红外光谱法等。

(一) 紫外光谱法

紫外光谱法应用于生物碱的测定较早, 其利用含有共轭双键的化合物在紫外光区吸收紫外光后, 易于被激发产生跃迁的特性, 对物质分子价电子从低能级向高能级跃迁的过程中在紫外光区形成不同特征性的特征峰而进行物质分析^②。由于紫外光谱法具有因人员操作不同影响准确度等弊端, 其使用范围有较大的局限性, 用于检测制剂中咖啡因含量的研究也相对较少。

孙延春等^③将市售的咖啡因类饮料, 先进行超声脱气 5min, 后加入三氯甲烷, 振荡、离心, 去上层有机层清液, 进行紫外可见光谱分析, 实验结果发现此种方法在市售饮料中咖啡因的浓度范围内线性良好, 相对标准偏差小于 4%, 回收率在 94% - 112% 之间。丁明珍^④通过微型化及背景校正对样品进行预处理, 用紫外光谱分析方法, 首次在仪器分析样品制备过程中使用大相比离心萃取方法, 使实验结果更加稳定可靠, 萃取率大大提高, 本法检测限为 0.001mg/L, 相对标准偏差为 0.97%, 回收率在 96.6% - 106.1% 之间。李楠等^⑤利用 756MC 分光光度计测定茶叶中

咖啡因的含量, 实验采用微波功率 500W、温度设定 180℃, 乙醇提取, 提取率 3.82%。2017 年张薇^⑥采用紫外可见分光光度法测定饮料制品中咖啡因的含量, 结果表明, 在 0-20mg/L 范围内线性良好, 相关系数为 $R^2 = 0.99911$, 检出限为 0.13mg/L, 回收率 97%, 实验证明, 该法重复性好, 灵敏度高, 其准确度、精密度均能满足工业生产的分析要求。谷苗苗^⑦对测定可乐中咖啡因含量样品前处理的方法探讨, 采用紫外分光光度法, 检测结果为在 200-400nm 范围内扫描, 得到咖啡因最大吸收波长为 276.1nm, 咖啡因吸光度 A-质量浓度 C 标准曲线回归方程为 $y = 0.0456x + 0.028$, 相关系数 $R = 0.9999$, 表明咖啡因在 1.0-40.0mg/L 范围内咖啡因吸光度-浓度呈良好的线性关系, 同时, 对比了 4 种前处理方法的相对误差: 离心、静置、干燥和静置后离心, 结果显示, 样品前处理的最佳方式是离心分离, 其可减少水滴散射带来的误差, 快速达到静置的效果并节约时间。武开业^⑧测定茶叶中咖啡因的方法, 采用紫外分光光度法, 茶叶经前处理后, 选取三氯甲烷为萃取液, 紫外检测波长为 276.5nm, 结果表明, 0-30ug/mL 的范围内咖啡因线性关系呈现良好, 线性回归方程为 $Y = 0.456X - 0.0019$, 相关系数为 0.9998, 方法检出限为 5mg/100g, 回收率为 96.9% - 99.8%, 结论: 紫外分光光度法测定茶叶中的咖啡因快速、准确, 能够满足茶叶中咖啡因含量检测的行业标准要求。高玲等^⑨测定溴咖合剂中咖啡因的含量, 选用紫外分光光度计法, 有机溶剂为氯仿, 提取溴咖合剂中待测组分咖啡因, 276.1nm 为波长最大吸收, 实验结果, 回收率为 99.08%, $RSD = 0.86\%$, 结果表明该方法结果可靠, 简便

① 吴性良, 朱万森. 仪器分析实验 [M]. 复旦大学出版社, 2008 年。

② 曹文静. 茶鲜叶主要茶用物质的初步研究 [D]. 扬州大学, 2014 年。

③ 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 (01) .

④ 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) .

⑤ 李楠, 孙晶晶, 杨静, 张俊稳. 微波提取茶叶中咖啡因工艺的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, (10) .

⑥ 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, 46 (14) .

⑦ 谷苗苗, 王尉嘉, 王迪, 周爱东. 紫外分光光度法测定可乐中咖啡因含量样品前处理方法探讨 [J]. 实验技术与管理, 2015, 32 (06) .

⑧ 武开业. 紫外分光光度法测定可乐中咖啡因的含量 [J]. 科技视界, 2014, (27) .

⑨ 高玲, 胡克勤, 高志华. 分光光度法测定溴咖合剂中咖啡因含量 [J]. 遵义医学院学报, 2007, (04) .

易行, 可在该制剂的质量控制中应用于基层医院药房。2011年孙爱霞^①测定可乐型饮料中咖啡因的含量, 采用紫外分光光度法, 实验中探索出最佳的测定条件为: 20ml×4 三氯甲烷萃取, 萃取温度以 20-40℃ 为宜, 采用 5g 无水硫酸钠过滤脱水, 在 276.5nm 波长下测其吸光度值, 紫外分光光度法的回收率为 96.3% - 105.9%, 变异系数为 3.2%, 萃取温度以 20-40℃ 为宜, 最大吸收峰在 276.5nm 处, 实验表明, 简单迅速, 适合一般实验室应用。林泽平^②采用紫外分光光度法对不同地域高度的凤凰茶中咖啡因含量的测定, 实验以测定不同地域高度、不同制作条件的凤凰茶的咖啡因含量为目的, 选用波长条件为 $\lambda = 276.5\text{nm}$, 测定结论得出, 茶叶种植的高度的不同、制取茶叶的发酵时间和温度的不同对茶叶中咖啡因的含量都具有一定的影响。2012年杨言言^③测定安徽罗汉尖老茶中咖啡因含量, 选用紫外分光光度法, 测定波长为 272-274nm, 以浓度对吸光度的回归方程为 $A = 0.048c + 0.028$, $R = 0.998$, 线性范围为 10-30ug/mL, 平均回收率为 97.7%, 结果显示, 该法灵敏度高, 操作简便, 可用于茶树老叶和粗老茶中咖啡因的含量测定。

(二) 红外光谱法

红外光谱法通过对化合物的红外光谱分析条件下进行有机官能团的鉴定, 是经典的有机结构分析方法之一, 其研究对象样品可由化合物转为复杂混合物^④。红外光谱法应用于毒物与毒品的检测, 国内最早可以追溯于九十年代, 具有无损检验、样品无须前处理、所需检材量小、分析速度快、操作简便等优点^⑤, 但其对于咖啡因物质的检测效果不佳等因素, 被应用于该领域的研究热度不高。

2005年芦永军等^⑥对茶多酚中咖啡因进行光谱及定量分析, 选用近红外光谱分析技术, 对样品的漫反射原始吸光度光谱进行导数、散射校正及相关分析, 结果咖啡因在近红外光谱波段的光谱特性清晰有效, 建立了快速稳健定标模型的条件, 该技术在近红外波段中用于分析咖啡因中各主要基团的吸收特性, 结合定标法定量, 快速检测咖啡因在茶多酚中的含量, 定标分析结果显示线性相关性良好, 相关系数 $R = 0.993$, 标准差 $SEC = 0.49\%$, 结果表明, 近红外光谱分析技术可用于快速分析茶多酚中咖啡因含量, 且方法可行性及优越性较佳。2009年赵晓辉等^⑦研究四种茶叶及其四种主要组分的光谱特征, 在 800-3800cm 中红外“指纹”区, 采集决定茶叶品质主要成份的咖啡因、谷氨酸和表儿茶素和花青素类物质的中红外光谱, 以不同产地的碧螺春和铁观音为对比, 以各特征光谱进行主成分分析建立模型拟合分析茶叶品种、产地差异与各主要成份含量的关系。2009年杨捷^⑧内标物选用铁氰化钾, 称取定量咖啡因对照品, 分别加入相同量的铁氰化钾和溴化钾, 充分研磨并混合均匀, 配制标准系列, 选择咖啡因中不受干扰的特征吸收峰羰基峰和铁氰化钾中的特征吸收峰氰基峰, 测定吸收光谱, 线性回归分析咖啡因特征峰吸光度与铁氰化钾特征峰的吸光度的峰高之比与其对应浓度, 绘制标准曲线, 再以相同方法测定咖啡因待测样品, 标准曲线得待测咖啡因的浓度, 线性范围 10-250mg/g, 相关系数 $R = 0.9953$; 采用该方法对样品进行测定的结果与 HPLC 方法比较得到较满意的结果, 平均回收率为 98.0% - 100.5%, 该方法准确、可靠, 可快速定量分析咖啡因及其他固体物质。

- ① 孙爱霞. 可乐型饮料中咖啡因的测定 [J]. 职业与健康, 2011, (16).
- ② 林泽平, 吴煜波, 张乐城, 李粉玲. 不同地域高度的凤凰茶中咖啡因含量的测定 [J]. 中国酿造, 2012, (04).
- ③ 杨言言, 张铁铭. 紫外分光光度法测定安徽罗汉尖老茶中咖啡因含量 [J]. 安徽中医学院学报, 2012, (03).
- ④ 张雪娟. 普洱茶中咖啡因含量的红外光谱法快速判别 [J]. 玉溪师范学院学报, 2016, (12).
- ⑤ 王继芬. 红外光谱法快速分析氯胺酮中的淀粉、葡萄糖和咖啡因. 中国光学学会、中国化学会. 第十六届全国分子光谱学学术会议论文集 [C]. 中国光学学会、中国化学会: 中国光学学会光谱专业委员会, 2010, (2).
- ⑥ 芦永军. 茶多酚中咖啡因的近红外光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2005, (08).
- ⑦ 赵晓辉. 茶叶及其组份的红外光谱研究 [J]. 光学学报, 2009, (02).
- ⑧ 杨捷, 宋继梅, 方芳. 红外光谱法测定咖啡因的含量 [J]. 安徽大学学报 (自然科学版), 2009, (01).

三、色谱法

色谱法是利用各组分在性质及结构上的差异, 以色谱体系中的固定相发生作用力的大小、强弱进行区分, 在同一力的推动作用下, 不同组分在固定相中的滞留时间长短, 以先后顺序从固定相中流出, 从而使各组分得到分离的分析方法^①。用于咖啡因的检测的色谱法主要分为液相色谱法和气相色谱法。

(一) 液相色谱法

液相色谱法运用于咖啡因的检测, 国内最早见于 20 世纪 80 年代。液相色谱法的流动相为液体, 具有检测限低、分离效果佳、定量准确性好、应用范围广等特点。因此, 液相色谱法检测咖啡因的研究受到广泛关注, 并呈逐年上升趋势, 2006 年左右达到研究高峰。目前, 液相色谱法测定咖啡因的含量在国内外应用较为广泛, 既是国际通用方法, 同时也为国家标准采用。同时, 检测目标物也从药物中的咖啡因检测逐渐转化为饮料或食品中的咖啡因检测, 可见, 对咖啡因的认识和关注得到了更为广泛的重视。

1986 年邓浩博^②利用反相高效液相色谱法分离测定了复方感冒宁片中的扑热息痛和咖啡因含量, 分析条件为色谱柱为 YWG-C₁₈; 流动相为甲醇:0.05M 磷酸液 (40:60, v/v, 磷酸液先用 40% NaOH 调 pH2.5), 流速为 0.7ml/min, 柱前压 78kg/cm², 紫外检测波长 254nm, 内标物为乙酰苯胺, 该法方法灵敏、快速、较准确, 适用于定性定量分析。1994 年陈继慈^③用反相高效液相色谱法测定了人血清中茶碱、咖啡因浓度, 色谱柱: Hyoprsll-ODS (200×2.1), 流动相: 醋酸-醋酸钠缓冲 (pH=4.5), 甲醇 (70:30v/v), 检测波长 270nm, 本文方法简便、快速。2002 年沈其元^④测定饮料中的咖啡因, 选用高效液相

相色谱法, 色谱柱 C₁₈, 流动相为甲醇/0.02mol/L 醋酸铵 (pH4.5) 25:75, 柱温, 室温, 量程 0.01 AUFS, 外标法定量, 咖啡因标准溶液浓度 (0.0-150.0μg/ml) 一峰面积经线性回归分析得直线回归方程式 $y = 88530 + 17468x$, $r = 0.9980$, 经改变溶剂后, 咖啡因在流动相中的出峰时间保持一致, 咖啡因在溶剂甲醇中的保留时间为 3.42 min, 在氯仿中保留时间为 3.26 min。黄静^⑤用 HPLC 法测定太极通天口服液中咖啡因含量, 采用 C₁₈柱, 以甲醇-乙腈-水 (25:5:70) 为流动相, 检测波长为 270nm, 咖啡因浓度在 0.107-0.968μg 范围内与峰面积线性关系良好, $R = 0.9998$, 回收率为 99.54%, 结果表明 HPLC 法可以用来测定太极通天口服液中咖啡因含量。2013 年凌爱霞^⑥测定复方氨酚烷胺胶囊中咖啡因和对乙酰氨基酚的含量, 采用高效液相色谱法 C₁₈ 色谱柱, 检测波长 273nm, 水-甲醇 (60:40) 为流动相, 流速 1.0ml/min, 进样量 20μl, 柱温为室温, 结果, 待测物质分离效果较好, 咖啡因在 0.0151-0.0755mg/ml 浓度范围内线性关系良好 ($R = 0.9996$), 平均加样回收率 99.7%, $RSD = 0.65%$; 对乙酰氨基酚在 0.2499-1.2495mg/ml 浓度范围内线性关系良好 ($R = 0.9995$), 平均加样回收率 99.7%, $RSD = 1.6%$, 经实验考察该方法准确、简便, 为测定复方氨酚烷胺胶囊中对乙酰氨基酚与咖啡因含量的较好方法, 可作为质量控制标准。禚学怡^⑦建立 pH/溶剂双梯度反相高效液相色谱法同时测定氨酚曲麻片中咖啡因等 5 种有效成分, 通过对溶剂梯度和 pH/溶剂双梯度体系的优化, 最佳分离 5 种成分, C₁₈ 色谱柱 (250mm×4.6mm, 5μm), 甲醇、0.05mol/L 醋酸铵水溶液和 0.08mol/L 醋酸水溶液组成三元流动相体系, pH/溶剂双梯度洗脱, 流速 1.0mL/min, 柱温为 30℃, 分段变

① 刘冬娴, 姚慧芳, 徐远清. 微量物证与毒物毒品分析 [M]. 中国人民公安大学出版社, 2013 年。

② 邓浩博. 高效液相色谱法测定复方感冒宁片有效成分的含量 [J]. 中成药研究, 1986, (08).

③ 陈继慈. 反相高效液相色谱法测定人血清中茶碱、咖啡因浓度 [J]. 中国医院药学杂志, 1994, (03).

④ 沈其元. 高效液相色谱法测定饮料中的咖啡因 [J]. 环境与职业医学, 2002, (05).

⑤ 黄静, 余佳文, 王琳, 岳廷哲. 高效液相色谱法测定太极通天口服液中咖啡因含量 [J]. 中国药业, 2002, (03).

⑥ 凌爱霞, 李淑玲. 高效液相色谱法测定复方氨酚烷胺胶囊中咖啡因和对乙酰氨基酚含量 [J]. 济宁医学院学报, 2013, (04).

⑦ 禚学怡. pH/溶剂双梯度反相高效液相色谱法同时测定氨酚曲麻片中 5 种有效成分 [J]. 色谱, 2013, (02).

波长检测, 25.5min 内 5 种成分达到基线分离, 咖啡因的线性范围分别 0.007-0.129g/L, 相关系数 $R > 0.9990$, 检出限为 0.02mg/L, 回收率为 97.9%-102.8%, 该方法实现短时间内同时分离酸性、中性和碱性化合物, 提高柱效, 减少半峰宽和拖尾, 可应用于氨酚曲麻片中 5 种成分的含量分析。2014 年李蔚^①不同饮品中的咖啡因含量检测, 使用高效液相色谱法, 用水提取可乐型饮料、含乳及不含乳的咖啡及茶叶液体制品、咖啡、茶叶及其固体制品等样品, 经不同前处理净化, 以 Sym-metryShieldC₁₈反相色谱柱 (3.9mm×150 mm×5μm) 分离, 二极管阵列检测器检测, 保留时间定性, 外标法定量分析, 咖啡因在 220ng/ml-439μg/ml 浓度范围内与峰面积呈良好线性关系 ($R = 0.9998$), 检出限 0.7ng (S/N = 3), 平均回收率为 90.2% - 107%, RSD = 0.37% - 3.8% (n=6), 方法灵敏度高、准确性好、重现性佳, 科学性、操作性好, 可用于测定不同饮品中咖啡因的含量。武开业^②测定可乐中咖啡因, 以反相高效液相色谱法 (HPLC) 法, 样品经前处理后, 用 DiomonsilC₁₈ 5u 色谱柱分离, 流动相为甲醇和水混合液, 紫外检测波长 286 nm, 10-150ug/mL 范围内咖啡因的线性关系良好, 回收率为 96.8% - 101.8%, 该方法对测定可乐饮料中的咖啡因有效, 检测结果准确、快速, 具备食品安全检测要求。张明月^③测定茶饮料中咖啡因含量的对比实验, 用高效液相色谱法, Waters600E - 2996 高效液相色谱仪, Hypersil250 mm×4.6 mm×5μmODS 柱, PDA 检测器, 外标法定量, 流动相为甲醇: 乙酸钠 (15:85), 流速 1.0ml/min; 检测波长 272nm, 以水作为溶剂与以甲醇作为溶剂同时溶解咖啡因标准溶液, 相同浓度下峰面积差异有统计学意义, $F = 1479.576$, 以水溶解的咖啡因标准溶液外标法测定茶饮料中的咖啡因含量结果准确; GB/T5009.139-2003 中以甲醇溶解的咖啡因标准溶

液外标法测定茶饮料中的咖啡因含量结果偏高, 与水溶解的咖啡因标准相比较, 其绝对差值为算术平均值的 8.51%, 不符合 GB/T5009.139-2003 中的精密度 5% 的要求, 结论建议统一国标中咖啡因含量的计量单位, 同时, GB/T5009.139-2003 增加相关的咖啡因鉴别实验。蔡荣华^④建立同时测定绿咖啡豆提取物中绿原酸和咖啡因含量的方法, 利用超高效液相色谱-紫外法, C₁₈ 色谱柱, 波长 274nm, 流动相为 0.6% 乙酸水-乙腈 (90/10, v/v), 流速 0.5mL/min, 结果表明, 6.06-101mg/L 浓度范围内绿原酸线性关系良好 ($R = 0.9998$), 检出限 0.30mg/L; 8.58-143mg/L 浓度范围内咖啡因线性关系良好 ($R = 0.9999$), 检出限 0.04mg/L, 回收率 99% - 101%, 方法灵敏、有效、准确、稳定。陈健^⑤测定复方氨酚烷胺片中种组分对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷胺、咖啡因和马酸氯苯那敏含量, 色谱柱为 C₁₈, 柱温为 30℃, 流动相为甲醇 (0.01mol/L) - 乙酸铵溶液 (13:87, pH=3.0), 流速为 1.0ml/min, 进样量 20μl, 检测波长 220nm, 5.1-102.0μg/ml 线性范围内咖啡因线性关系良好, 该方法方便、高效, 准确度、灵敏度、稳定性、回收率值均符合分析测定要求。2015 年张媛媛^⑥检测去痛片中氨基比林、非那西丁、咖啡因和苯巴比妥, 采用 UPLC 分析方法, 流动相超声提取样品, Waters ACQUITY UPLC BEHC₁₈ 色谱柱 (2.1mm×100mm, 1.7μm), 检测波长 214 nm, 柱温为 30℃, 流动相为 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇 (55:45, V/V), 流速 0.2ml/min, 进样量 5μl, 外标法定量, 在 0.6μg/ml-210μg/ml 线性范围内线性关系良好, $R = 0.9992 - 0.9995$, 检出限为 0.0126ng - 0.0357ng, 平均回收率 97.0% - 100.3%, RSD=1.15% - 1.55%, 方法适用于去痛片中 4 种成分的含量测定且快速、分离效果

- ① 李蔚, 李凤华, 赵秀香. 高效液相色谱法测定饮品中的咖啡因 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (19).
- ② 武开业. 反相高效液相色谱法测定茶叶中咖啡因的含量 [J]. 化学工程与装备, 2010, (05).
- ③ 张明月, 夏义平. 茶饮料中咖啡因检测存在问题的探讨和研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, (11).
- ④ 蔡荣华. UPLC 法测定咖啡豆中绿原酸和咖啡因的含量 [J]. 食品研究与开发, 2015, (18).
- ⑤ 陈健. 枸橼酸咖啡因与氨茶碱治疗早产儿呼吸暂停疗效对比分析 [J]. 吉林医学, 2015, (12).
- ⑥ 张媛媛. 超高效液相色谱法测定去痛片中 4 种成分的含量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, (19).

好、灵敏度高, 准确性和稳定性好, 日常检测中可缩短检测周期, 降低检测成本。于玲^①高效液相色谱法测定蜂蜜中的咖啡因, 结合超声辅助分散液相微萃取技术, 以水为溶剂配制成 100g/L 样品溶液, 取 7.5mL 加入甲醇 1.5mL 和三氯甲烷 120 μ L 混匀, 超声 5min, 离心, 吸取沉积相 5 μ L, WondsilTMC₁₈ 色谱柱分离, 流动相为甲醇, 紫外检测波长 274nm, 结果显示, 线性范围 10.0–500 μ g/L 的咖啡因检出限为 9 μ g/L, 标准偏差为 2.7%–4.1%, 回收率 96.6%–104%。黄现青^②以高效液相色谱法测定茶饮料中的咖啡因, 研究最佳波长、流动相、柱温、流速等条件, 结果最佳检测条件为: 柱温 20 $^{\circ}$ C, 波长 273nm, 流动相乙腈: 水 (20:80), 流速 1mL/min, 0–200 μ g/mL 的浓度范围内线性关系良好, 回收率为 99.69%, 建立的方法可用于测定茶饮料中的咖啡因含量。2016 李聪^③测定火锅汤底中咖啡因含量, 采用高效液相色谱法, 样品在碱性条件下经三氯甲烷提取, 采用 PhenomenexC₁₈ 色谱柱, 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 流动相为甲醇: 水: 乙酸 (10:89:1), 流速为 1.0 mL/min, 采二极管阵列检测器, 286nm 波长, 外标法定量, 结果在 1–100 mg/kg 浓度范围内咖啡因线性关系良好, R=0.9990, 检出限为 2.00 $\times 10^{-3}$ mg/kg, 该方法灵敏度高, 操作简单, 重复性好, 能够测定火锅汤底中的咖啡因。王丽琼^④ RP-HPLC 法同时测定复方酚咖伪麻胶囊中 5 种组分含量, XTerraRRP₁₈ 色谱柱 (250mm \times 4.6mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 215nm, 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.02mol/L 磷酸二氢钾溶液–三乙胺 (100:0.02), 流速 1.0mL/min, 结果表明, 复方酚咖伪麻胶囊中咖啡因的线性范围 12.62–126.20 μ g/mL (R=0.9999), 平均回收率 (n=9) 100.3%, 检测限 0.03 μ g/mL, RSD (n=7)

0.5%, 方法重复性好, 可用于评价复方酚咖伪麻胶囊的质量。2016 年刘圆圆^⑤高效液相色谱法测定盐酸异丙嗪咖啡因片的含量及溶出度, 色谱柱为 Agilent TCC₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长分别为 250 和 272nm, 流动相为甲醇–三乙胺水溶液 (浓度为 3%, 磷酸调至 pH2.3) = (50:50), 流速为 1.0 ml/min, 进样量 20 μ l (溶出度测定时进样量为 10 μ l), 温度 37 $^{\circ}$ C, 分别以 900ml pH1.2 盐酸、pH4.5 醋酸缓冲液、pH6.8 磷酸缓冲液及水为溶出介质, 溶出条件的筛选为 50、75 r/min, 4.0–400 μ g/ml 范围内咖啡因线性关系良好 Y=51.33X+68.88 (R=0.9999), 咖啡因检测限为 2ng/ml, 定量限为 10ng/ml, 平均回收率 99.42% \pm 1.07, 供试溶液在 12h 保持稳定, 溶出介质为盐酸 (900ml, pH=1.2), 桨法转速为 50r/min, 溶出时间 30min, 15min 内制剂在 4 种溶出介质中溶出度均达 85% 以上, 溶出不受 pH 影响, 条件适用于盐酸异丙嗪咖啡因片的溶出测定, 所建方法快速简便、灵敏有效、重现性好、结果准确, 可用于同时对盐酸异丙嗪及咖啡因进行含量及溶出度分析。2017 年李国定^⑥高效液相色谱法测定咖啡因, 安捷伦 ZORBAX SB–C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相乙腈和 0.05mol/L 磷酸二氢钾 (23:77), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 进样量 50 μ L, 0–99.898 μ g/mL 的浓度范围内咖啡因线性关系良好, 最低检出限 0.1 μ g/mL, 回收率为 (100.5 \pm 0.5)%, 本方法灵敏度高, 操作简便, 结果可靠, 可作为保健食品及血清中咖啡因的测定。2018 年王丽琼^⑦考察咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量均匀度, 建立 HPLC 法同时测定酚氨咖敏片 4 种组分含量, 色谱柱采用 XTerraRP₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 215nm, 甲醇为

① 于玲. 超声辅助分散液相微萃取-高效液相色谱法测定蜂蜜中的咖啡因 [J]. 理化检验, 2015, (07).

② 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, (01).

③ 李聪, 邱启东. 高效液相色谱法测定火锅汤底中的咖啡因 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, (12).

④ 王丽琼, 赵雪, 刘明容, 魏长勇, 吴晓燕. RP-HPLC 法同时测定复方酚咖伪麻胶囊 5 种组分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, (08).

⑤ 刘圆圆. 高效液相色谱法测定盐酸异丙嗪咖啡因片含量及溶出度 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, (02).

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, (02).

⑦ 王丽琼. 反相高效液相色谱法测定酚氨咖敏片的含量及其均匀度 [J]. 中国药业, 2018, (04).

流动相 A, 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺 (100:0.02) 为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 结果表明, 酚氨咖敏片中氨基比林、对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的分离度均符合要求, 咖啡因的质量浓度线性范围为 29.98-299.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R=0.9998$), 平均加样回收率为 99.38%, RSD 为 1.27% ($n=6$), 该方法准确, 快速简便, 利于样品质量控制用于酚氨咖敏片的含量及其均匀度测定。李泽夏琼^①采用高效液相色谱法, 以 4 种常见茶叶以及减肥茶中咖啡因的含量对比, 建立测定方法, 提供减肥茶中咖啡因是否非法添加以及限值规定的依据, 二极管阵列检测器, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 271nm, 流动相为甲醇-水 (1ml/min), 0.2058-4.116 μg 范围内咖啡因与峰面积呈良好线性关系 ($R=0.9999$), 平均回收率 100.5%, RSD=0.78% ($n=9$), 方法准确、重现性好, 快速简捷, 可用于测定茶叶中咖啡因的含量, 有效监控减肥茶中咖啡因的含量。

(二) 气相色谱法

气相色谱分析法是流动相为气体的色谱分析方法, 其具有高灵敏性和选择性、取样量少、分析快速、准确等特点, 但其对样本进样的条件较为严格, 经过长期发展气相色谱逐步成为毒品及微量检测重要方法之一。

2002 年许庆琴^②采用气相色谱法测定茶叶中的咖啡因和茶碱, 超声提取, 大口径毛细管, 实验考察 HP-1, HP-5, HP-1701, HP-20M 等不同极性的大口径毛细管对咖啡因的检测效果, 结果表明, 咖啡因和茶碱在极性和中性大口径毛细管柱上的响应值不高, 峰形拖尾, 而在非极性的固定相上, 不仅响应值高且出峰速度快, 最终检测出的咖啡因的检出限 2.00 mg/L, 平均回收率 96.7%, 相对标准偏差均小于 2.0%。2004 年陈春晓^③气相色谱法测定饮料中的咖啡因, 结

果显示, 浓度范围 0-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 咖啡因呈线性关系, $R=0.9998$, 最低检出限 1mg/kg (以 2 倍噪声计), 经检测, 含有咖啡因的饮料样品中多数含量为 0.10g/kg-0.25g/kg, 以可乐型饮料及功能型饮料为主, 且饮料中的其他成分对本实验均无干扰, 同一产品的咖啡因含量监测多年的结果基本稳定, 但不同产地的同一品牌饮料检测结果有较明显的差异。2007 年姚如心^④同时测定复方阿司匹林制剂中阿司匹林、对乙酰氨基酚、咖啡因及降解产物水杨酸, 采用大口径毛细管气相色谱法, 分别考察了不同极性的填充柱、石英毛细管柱和 530 μm 大口径毛细管对阿司匹林、对乙酰氨基酚、咖啡因和水杨酸的色谱效率, 结果表明, 大口径毛细管柱均好于填充柱和毛细管柱, 且分析时间仅为同等长度填充柱的五分之一, 柱长较短的非极性大口径毛细管柱不仅灵敏度高, 而且出峰速度快、分离效果好。赵志强^⑤用气相色谱法建立对乙酰氨基酚中毒患者血液中复方制剂成分定性、定量分析, 9790 型气相色谱仪, SE-54 毛细管柱, 氢火焰检测器测定, X-5 富集柱萃取, 内标为苯巴比妥, 结果表明, 在 0.03-0.24mg/ml 的范围内咖啡因, 平均回收率咖啡因 92.48% ($n=6$), RSD=1.36%, 该方法灵敏度高, 操作简便, 可快速准确地为临床提供诊断依据。2009 年郭琦^⑥同时测定酚氨咖敏颗粒中对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量, 毛细管气相色谱法, SE-30 大口径毛细管色谱柱 (30m \times 0.53mm, 1.0 μm), FID 检测器, 溶剂为无水乙醇, 直接进样, 内标为盐酸麻黄碱, 结果表明, 10-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的线性范围内咖啡因平均回收率为 98.9%-101.2%, RSD<2%, 结果表明, 此法精密度及准确度良好, 快速简便、有效准确, 可用于测定酚氨咖敏颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因、氨基比林和马来酸氯苯那敏的含量。

① 李泽夏琼, 石春梅. UPLC-MS 法测定减肥茶中的咖啡因 [J]. 食品安全导刊, 2018, (21).

② 许庆琴. 气相色谱法直接测定茶叶中的咖啡因和茶碱 [J]. 分析科学学报, 2002, (06).

③ 陈春晓, 仲岳桐, 康莉, 张红宇. 饮料中咖啡因的气相色谱快速测定法 [J]. 职业与健康, 2004, (06).

④ 姚如心. 大口径毛细管气相色谱法直接测定复方阿司匹林制剂 [J]. 分析科学学报, 2007, (03).

⑤ 赵志强. 血液中对乙酰氨基酚复方制剂的气相色谱测定法 [J]. 职业与健康, 2008, (11).

⑥ 郭琦. 毛细管气相色谱法同时测定酚氨咖敏颗粒中的 4 个组分含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, (12).

四、联用技术

联用技术分析具有分离分析效能高、速度快及灵敏度高、操作简便、成本相对低等特点, 使其在很多领域得以应用和推广^①。联用技术分析应用于茶叶、药物中咖啡因的检测, 具有较好的效果, 能够快速、准确的测定咖啡因的含量。

丁明珍^②建立自发溶剂微萃取的样品与气相色谱质谱联用分析饮料中咖啡因含量的分析方法, 使用自动进样器进样, 样品经自发混合萃取后取下层萃取液进样分析, 咖啡因的线性范围 0.001–20mg/L, $R=0.9999$, $RSD<2\%$, 检测限 0.0001mg/L, 回收率为 99.0%–104.8%, 该方法准确、简便, 样品溶剂消耗少, 能够实现自动化检测, 可用于批量测定咖啡因在饮料中的含量。Kelly 等^③在低于毫微摩尔的含量级别上的咖啡因体外代谢物, 以稳定的同位素稀释气质联用分析法进行测定, 该方法的定量检测限低于毫微摩尔。Hawthorne^④等用固相为萃取气质联用法分析可乐型饮料中的咖啡因的测定, 实验研究出无溶剂消耗的分析方法。王丽艳^⑤利用 GC/MS 联用技术检测茶饮料中咖啡因, 外标法定量, 选择离子扫描选取 m/z 为 67、82、109、194 四种离子, 结果表明, 定性结果准确, 定量方法可行, 回收率、精密度均在限定范围内。Tsuda^⑥等运用气质联用方法检测人体汗液中的咖啡因, 方法以采集人体拇指上的汗液为样本进行分析, 乙醇为萃取液, 经过处理制得样品进行分析。

Nishitani^⑦等运用新的分析方法在 40min 内对茶中的八种儿茶酚、咖啡因以及八种其他的酚类化合物进行了连续的分析。柴龙龙^⑧建立大鼠血浆中对乙酰氨基酚、咖啡因、异戊巴比妥的 LC-MS/MS 检测方法, 并应用于新复方大青叶片在大鼠体内的药代动力学研究, 其中咖啡因的线性范围 0.01–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测限为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 精密度和准确度在 15% 以内。Casal^⑨等以反相—光电二极管阵列检测的方法连续分析咖啡中的茶碱、尼克酸以及咖啡因, 分析结果中分离效果较好。

五、电泳法

毛细管电泳技术发展于 20 世纪 80 年代后期, 于 20 世纪 90 年代成为最重要的现代分离分析方法之一, 其是利用毛细管为分离通道, 驱动力是高压直流电场的液相分离技术, 具有分离效率高、操作简便等特点, 已被广泛地应用于医学、药学、分子生物学、材料学及食品、环保、化工等各个领域^⑩。

表明华^⑪测定茶叶中咖啡因含量的分析方法, 选用毛细管区带电泳法, 电压 25kV, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 电泳介质为含有 20mmol/L 硼砂和磷酸盐 ($\text{pH}=9.5$), 检测波长 210nm, 结果表明, 8min 内可将待测组分分离, 质量浓度与峰面积线性关系良好, $R=0.9944-0.9995$, 检测限 0.001–0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 回收率 89.98%–102.7%, 相对标准偏差 $<9.11\%$, 方法用于茶叶中咖啡因的检测具有满意的结果。韩双艳等^⑫用硼酸盐缓冲体系

- ① 林炳承. 毛细管电泳导论 [M]. 科学出版社, 1996 年.
- ② 丁明珍. 饮料中咖啡因的紫外光谱和气质联用分析方法研究 [D]. 浙江大学, 2008 年.
- ③ A. R. Kelly, N. H. William, M. P. Raimund, A. G. Carlos, L. K. Kent, D. N. Sidney, J. Chromatogr. B708 (1998).
- ④ S. B. Hawthorne, D. J. Miller, J. Chromatogr. 603 (1992).
- ⑤ 王丽艳. 气质联用仪在槐花等分析中的应用 [D]. 辽宁师范大学, 2008 年.
- ⑥ T. Tsuda, M. Bonerz, T. Schmidt, J. Chromatogr. A938 (2001).
- ⑦ E. Nishitani, Y. M. Sagesaka, J. Food Compos. Anal. 17 (2004).
- ⑧ 柴龙龙. 基于液质联用技术的新复方大青叶片药代动力学研究 [D]. 山东大学, 2016 年.
- ⑨ S. Casal, M. Beatriz Oliveria, M. A. Ferreira, Food chem. 68 (2000).
- ⑩ 曹琦. 毛细管电泳法测定饮料中食品添加剂 [D]. 复旦大学, 2013 年.
- ⑪ 表明华, 严赞开, 林燕如. 毛细管区带电泳法测定茶叶中咖啡因、茶氨酸、表儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯 [J]. 食品科学, 2012, 33 (24).
- ⑫ 韩双艳, 崔堂兵, 林小琼, 吴虹. 毛细管电泳在食品添加剂检测中的应用 [J]. 广东农业科学, 2009, (8).

来分离测定汽水中咖啡因、苯甲酸、山梨酸、糖精, 结果可在 12min 内使各组分发生分离。孙保国^①建立了胶束电动毛细管电泳法 (MECC) 检测饮料中山梨酸、苯甲酸、10-羟基癸烯酸、咖啡因和糖精钠五种添加剂, 对电压、缓冲溶液浓度和 pH 值、胶束浓度与分析结果的影响进行研究, 结果表明, 迁移时间和测定回收率的变异系数分别小于 1.5% 和 5%, 检测限分别为 10, 10, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。徐芳^②采用胶束电动毛细管电泳法对咖啡因等 6 种生物碱进行检测, 在 35mmol/L 十二烷基硫酸钠 (SDS) -10mmol/L 硼砂 (pH9.0) 运行缓冲液中进行电泳分离, 20 $^{\circ}\text{C}$, 18kv 电压, 检测波长 270nm, 6 种碱基 8min 内实现基线分离, 10-500mg/L 浓度范围内线性关系良好, $R = 0.9995 - 0.9999$, 检出限 12.5-100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 回收率为 96.1% -105.2%, 方

法灵敏度高, 快速简便, 可用于分析和测定药物和饮料中的生物碱。

六、研究展望

咖啡因的检测方法各有优劣, 从早期采用传统检测碘量法、纸层析法、重量法等检测方法到光谱分析法再发展到现代的色谱法及联用技术的测定, 技术层面上分析方法的结果准确性得到了很大的提高, 灵敏度也有大幅度的提升。但同时, 现代分析方法具有前期处理条件较为严格, 分析过程复杂, 耗时长及分析费用相对较高等特点。因此, 在分析方法发展迅速的背景下, 在原有检测方法基础上, 综合各方法的优势并加以利用, 发展一种高速、有效、操作简单且便于检测及监管的分析方法, 是咖啡因检测方法的发展重点。

(责任编辑 刘 敏)

① 孙保国, 侯鹏亮, 林雁飞, 张平. 胶束电动毛细管电泳同时测定饮料中的多种添加剂 [J]. 分析科学学报, 1999, (02).

② 徐芳, 陈波, 姚守拙. 胶束电动毛细管电泳法分离 6 种生物碱基 [J]. 药物分析杂志, 2008, (05).