

HPLC-DAD-CAD 法同时测定功能性饮料中牛磺酸和咖啡因含量

陈超¹, 宋玉梅², 梁慧², 朱桃玉³, 陈智勇^{1*}

(1. 中国广州分析测试中心, 广东广州 510070; 2. 广东省测试分析研究所, 广东省分析测试技术公共实验室, 广东广州 510070; 3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 广东广州 510030)

摘要 [目的] 无需衍生化样品, 建立同时快速测定功能性饮料中牛磺酸和咖啡因含量的分析方法。[方法] 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-电雾式检测器(HPLC-DAD-CAD)法, Poroshell 120 Hillic 色谱柱(3.0 mm × 150 mm, 2.7 μm), 乙腈和水不同比例梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 咖啡因的检测波长 273 nm, 建立标准曲线。功能性饮料经超声处理, 用水稀释后, 过滤膜, 直接上机测定。[结果] 试验表明, 通过 1 次进样, 同时测定了功能性饮料中牛磺酸和咖啡因的含量, 且线性关系良好($r = 0.998\ 4$ 和 $0.999\ 9$), 平均回收率为 86.5% ~ 104.4%, RSD 值为 0.4% ~ 4.0%, 牛磺酸和咖啡因的检出限分别为 28.0 ng 和 3.5 ng。[结论] 该方法简便、快速、灵敏, 适用于功能性饮料中牛磺酸和咖啡因的含量测定。

关键词 高效液相色谱-二极管阵列检测器-电雾式检测器联用法; 牛磺酸; 咖啡因; 功能性饮料

中图分类号 TS275.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-114-03

Simultaneous Determination of Taurine and Caffeine in Functional Drinks by HPLC-DAD-CAD

CHEN Chao¹, SONG Yu-mei², LIANG Hui², CHEN Zhi-Yong^{1*} et al (1. China National Analytical Center, Guangzhou, Guangdong 510070; 2. Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, Guangdong Institute of Analysis, Guangzhou, Guangdong 510070)

Abstract [Objective] To establish the rapid method for simultaneous determination of taurine and caffeine in functional drinks without derivatization samples. [Method] The high-performance liquid chromatography coupled with diode array and charged aerosol detector (HPLC-DAD-CAD) was conducted on Poroshell 120 Hillic column (3.0 mm × 150 mm, 2.7 μm) with gradient elution. The mobile phase was acetonitrile and water, the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength of caffeine was 273 nm. A standard curve was established. Functional drinks were diluted with water after ultrasonic treatment. After the membrane filtration, they were tested directly on the machine. [Result] The taurine and caffeine in functional drinks were simultaneously detected by a single injection, showing good linear relationship ($r = 0.998\ 4$ and $0.999\ 9$). The average recovery was 86.5% ~ 104.4%, RSD was from 0.4% to 4.0%. The limits of detection of taurine and caffeine were 28.0 and 3.5 ng, respectively. [Conclusion] The HPLC-DAD-CAD method is simple, rapid and sensitive, which can be applied to test taurine and caffeine in functional drinks.

Key words HPLC-DAD-CAD; Taurine; Caffeine; Content; Functional drinks

牛磺酸是一种具有广泛生理功能的含硫 β-氨基酸, 化学名为 2-氨基乙基氨基酸, 最早由牛的胆汁分离出来。Hayes 等发现, 猫缺乏牛磺酸会导致视网膜老化或失明^[1], 此后牛磺酸的营养价值才受到人们的重视。研究发现, 牛磺酸具有降血糖^[2]、抗纤维化效应^[3]、降低细胞内的钙水平^[4]、预防高血压^[5]等广泛的生物调节作用。我国于 1993 年批准牛磺酸在乳制品、婴幼儿食品及谷类制品、强化饮料中使用^[6]。目前有关牛磺酸含量测定的方法一般采用酸碱滴定法、气相色谱法、氨基酸自动分析法、高效液相色谱法、薄层色谱法等^[7], 其中高效液相色谱法应用最广泛。国标中采用的是高效液相色谱法和薄层色谱法, 由于牛磺酸本身几乎没有紫外吸收, 因此采用高效液相色谱法需要将其用衍生剂衍生后检测, 而这 2 种方法的操作过程都较为繁琐, 费时费力, 容易影响测定的灵敏度、准确性和重复性。

目前, 功能性饮料已成为人们日常生活中补充能量和抵抗疲劳的必需品之一, 而大多数功能性饮料中都会添加一定量的牛磺酸, 有些还会添加咖啡因。不管是牛磺酸还是咖啡因, 如果长期或大剂量摄入都会对人体造成一定的危害, 因此, 建立一种快捷、准确并同时检测功能性饮料中牛磺酸和咖啡因的定量方法具有重要意义。电雾式检测器(CAD)属

于质量型检测器, 能检测到大部分非挥发性和半挥发性的有机物, 其检测原理是液相洗脱液经氮气雾化后, 较大的液滴经废液管流出, 较小的溶质液滴在室温下干燥后形成溶质颗粒, 并与带正电荷的氮气颗粒反向碰撞而带上正电, 在气流和电场的作用下, 迁移率较大、颗粒粒度较小的氮气颗粒的电荷被中和, 而迁移率小的带电颗粒把它们的电荷转移给一个颗粒收集器, 从而产生信号电流, 该检测信号与溶质质量成正比关系。与蒸发光散射检测器(ELSD)相比, CAD 的动态范围更宽, 精密度更高, 适用于梯度洗脱^[8]。到目前为止, 仅有少数文献报道了同时检测功能性饮料中牛磺酸和咖啡因的方法^[9], 采用的是高效毛细管电泳-紫外-非接触式电导检测法, 该方法中牛磺酸和咖啡因的检出限分别为 24.0 和 4.0 mg/L。笔者建立了一种高效液相色谱-二极管阵列检测器-电雾式检测器(HPLC-DAD-CAD)联用直接同时测定功能饮料中牛磺酸和咖啡因含量的方法, 样品无需衍生化, 方法简单快速、灵敏准确。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及主要试剂。样品 a、b、c 为功能型饮料, 购自当地超市; 牛磺酸对照品(含量 99.4%, 中广测); 咖啡因对照品(浓度为 500 μg/mL, 农业部); 乙腈(色谱纯); 所用水为 Millipore 纯水。

1.1.2 主要仪器。UltiMate3000 型高效液相色谱(配二极管阵列检测器和电雾式检测器, Thermo Fisher Scientific 公司);

作者简介 陈超(1988-), 女, 湖北荆州人, 硕士, 从事对照品和标准物质的研制研究。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事药物杂质分析与合成的相关研究。

收稿日期 2016-05-06

Millipore 超纯水器(明澈-D24UV);MS105DU 分析天平(Mettler Toledo);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件。色谱柱:Poroshell 120 Hillic(3.0 mm × 150 mm,2.7 μm);柱温:30 ℃;流速:0.5 mL/min;流动相为乙腈和水;进样量:1 μL;检测波长:273 nm;Corona Ultra CAD 检测器,雾化气为氮气(纯度 99.0% 以上),雾化室温度 30 ℃,雾化气压 241.3 kPa,采样频率 10 Hz,过滤模式设为 3。梯度洗脱,洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间 Time//min	流速 Flow speed mL/min	乙腈 Acetonitrile %	水 Water %
0	0.5	95	5
5	0.5	95	5
10	0.5	80	20
15	0.5	80	20
16	0.5	95	5

1.2.2 对照品溶液配制。准确称取牛磺酸对照品 55.00 mg,用水溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀,得到浓度为 1 090 μg/mL 的牛磺酸对照品溶液。咖啡因对照品本身为水溶液,无需重新配置。准确称取牛磺酸对照品 5.50 mg 于 5 mL 容量瓶中,并加入 2.5 mL 咖啡因对照品溶液,用水定容至刻度,摇匀,即得混合对照品加标液,其中牛磺酸和咖啡因浓度分别为 1 090 和 250 μg/mL。

1.2.3 供试品溶液的配制。将样品 a、b、c 放在超声波清洗器中超声 30 min,冷却至室温后,分别量取 20、25、5 mL 于 3 个 100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,得到供试品溶

液 a、b、c,通过 0.45 μm 滤膜过滤后,待测。

1.2.4 标准曲线的绘制。取 3 个 10 mL 容量瓶和 2 个 5 mL 容量瓶,分别加入牛磺酸对照品溶液 0.1、0.5、1.0、1.0、2.0 mL 和咖啡因对照品溶液 0.1、0.5、1.0、1.0、2.5 mL,加水定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液,其中牛磺酸浓度分别为 10.9、54.5、109.0、218.0、436.0 μg/mL,咖啡因浓度分别为 5.0、25.0、50.0、100.0、250.0 μg/mL,现配现用。

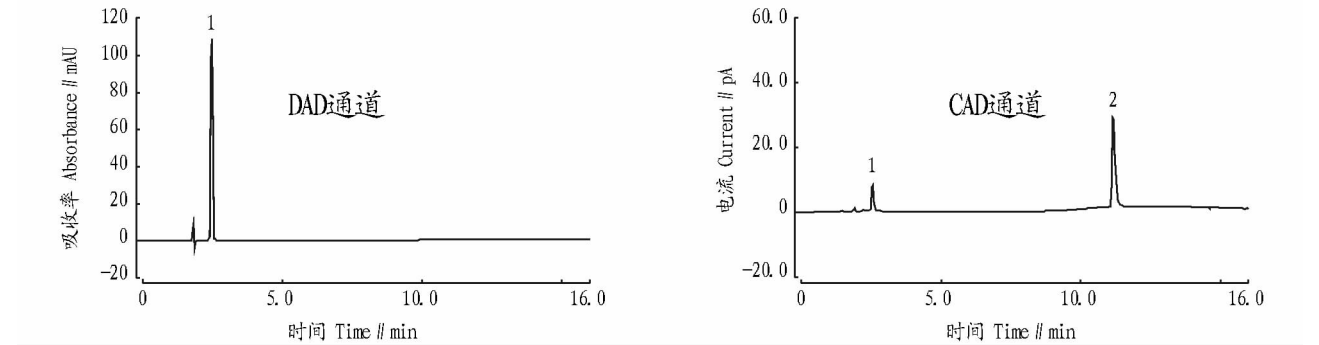
1.2.5 样品测定及精密度试验。按照前述色谱条件测定“1.2.3”项配制的样品 a、b、c 待测液,同一样品连续进样 6 次,6 次结果的平均值做为样品的测定结果。

1.2.6 加标回收率试验。按照“1.2.3”项中方法超声处理样品 c 后,从中分别精密量取 15 份样品于 15 个 10 mL 容量瓶中,每份 0.2 mL,分为高、中、低浓度 3 组,每组 5 份,按高、中、低浓度分别加入混合对照品加标液 2.0、1.0、0.4 mL,加水定容至刻度,摇匀,通过 0.45 μm 滤膜过滤后,按照前述色谱条件测定牛磺酸和咖啡因的加标回收率。

2 结果与分析

2.1 仪器条件优化 对不同的色谱柱进行了预试验,包括 Zorbax SB-Aq(4.6 mm × 150 mm,5 μm),Zorbax NH₂(4.6 mm × 150 mm,5 μm),Pursuit XRs C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm)和 Poroshell 120 Hillic(3.0 mm × 150 mm,2.7 μm)。结果表明,Poroshell 120 Hillic(3.0 mm × 150 mm,2.7 μm)分离功能性饮料中牛磺酸和咖啡因最好,缩短了检测时间,而且检测结果最稳定。

2.2 混合对照品及样品的高效液相色谱图 图 1 为混合对照品 2 个通道的色谱图,1 号峰咖啡因保留时间为 2.453 min,2 号峰牛磺酸保留时间为 10.993 min。图 2 为样品 a、b、c 2 个通道的色谱图。

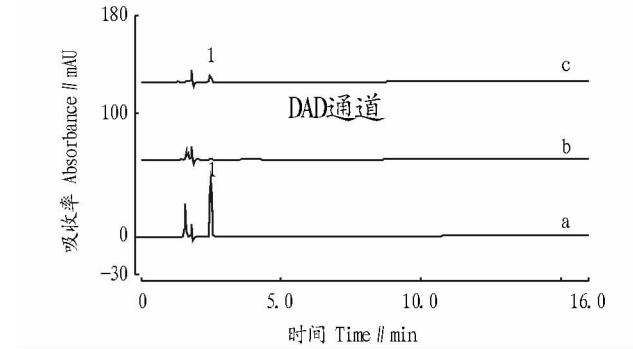


注:1 号峰为咖啡因,2 号峰为牛磺酸。
Note: Peak 1 was caffeine;and peak 2 was taurine.

图 1 混合对照品的 HPLC 测定图谱
Fig.1 HPLC of mixed reference substances

2.3 线性范围 按照前述色谱条件测定“1.2.4”项下配制的不同浓度的混合对照品溶液,分别以牛磺酸和咖啡因的浓度 X(μg/mL)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标做标准曲线,得回归方程。由于咖啡因在 DAD 通道的检出限更低,因此,咖啡因的测定采用 DAD 通道的数据,牛磺酸的测定采用 CAD 通道的数据。各回归方程呈良好的线性关系,数据见表 2。

2.4 加标回收率 按照前述色谱条件测定“1.2.6”项下配制的样品 c 加标后的溶液,分别计算牛磺酸和咖啡因回收率。试验结果表明,咖啡因的加标平均回收率为 86.5% ~ 104.4%,RSD 值为 0.8% ~ 4.0%;牛磺酸的加标平均回收率为 89.0% ~ 95.0%,RSD 值为 0.4% ~ 0.8%。数据结果见表 3。



注:1 号峰为咖啡因,2 号峰为牛磺酸。
Note: Peak 1 was caffeine;and peak 2 was taurine.

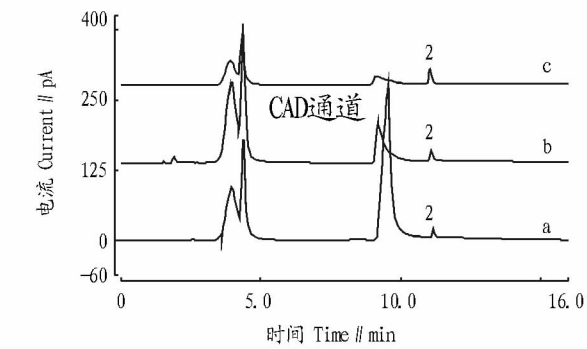


图2 样品 a、b、c 的 HPLC 测定图谱
Fig.2 HPLC of samples a,b and c

表 2 对照品的回归方程

Table 2 Regression equations of reference substances				
对照品 Reference substance	回归方程 Regression equation	<i>r</i>	线性范围 Liner range μg/mL	
咖啡因 Caffeine	$Y=0.092\ 5X+0.002\ 9$	0.999 9	5.0~250.0	
牛磺酸 Taurine	$Y=0.015\ 2X+0.259\ 2$	0.998 4	10.9~436.0	

表 3 加标回收率测定结果

Table 3 Detection results of the recovery rate					
成分 Component	样品量 Sample content μg	加入量 Added amount μg	测定平均值 Average measured value//μg	平均回收率 Average recovery rate//%	<i>RSD</i> %
咖啡因 Caffeine	1.84	50	54.0	104.4	0.8
	1.84	25	24.9	92.4	2.3
	1.84	10	10.5	86.5	4.0
牛磺酸 Taurine	76.20	200	283.3	95.0	0.4
	76.20	100	176.5	92.1	0.5
	76.20	40	115.0	89.0	0.8

表 4 实际样品测定结果

Table 4 Detection results of the actual samples				μg/mL
样品 Sample	项目 Item	咖啡因 Caffeine	牛磺酸 Caurine	
a	标注值	200.0	500.0	
	实测值	202.3	506.6	
b	标注值	—	400.0	
	实测值	—	404.1	
c	标注值	—	3 810.0	
	实测值	91.4	3 807.4	

2.5 检出限 由工作站分析得到的标准曲线中最高浓度混合对照品溶液的信噪比 S/N 来计算检出限 (LOD),公式为 $LOD=3Q/S/N$,其中 Q 为进样量。计算得牛磺酸的 LOD 为 28.0 ng,咖啡因的 LOD 为 3.5 ng。

2.6 样品测定及精密度试验结果 按照前述色谱条件测定“1.2.3”项配制的样品 a、b、c 待测液,根据标准曲线采用外标法定量,结果见表 4,样品 a 中牛磺酸和咖啡因的 RSD 分别为 0.4% 和 1.1%,表明精密度结果良好。

3 结论

该试验建立了一种适用于功能性饮料中牛磺酸和咖啡因同时检测的方法,即高效液相色谱-二极管阵列检测器-电雾式检测器联用检测技术,此法避免了样品复杂的前处理所导致的重复性和准确性偏低的因素,可以对样品进行直接测定。采用 Poroshell 120 Hillic(3.0 mm×150 mm,2.7 μm)色谱柱,使用传统的反向流动相,大大节省了检测时间,有效

地将牛磺酸与其他极性较大且与其相接近的成分分开,保证了检测结果的准确。试验结果表明,通过 1 次进样,同时测定了功能性饮料中牛磺酸和咖啡因的含量,平均回收率在 86.5%~104.4%, RSD 值为 0.4%~4.0%,牛磺酸和咖啡因的检出限分别为 28.0 和 3.5 ng。该方法操作简便快速,测定结果灵敏准确,为功能性饮料重要指标的质量控制提供了试验基础。

参考文献

[1] HAYES K C,PRONCZUK A,ADDESA A E. Taurine modulates platelet aggregation in cats and human[J]. Am J Glin Nutr,1989,49:1211-1232.
[2] LAMPSON W G,KRAMER J H,SCHAFFER S W. Potentiation of the actions of insulin by taurine[J]. Cana J Physiol Pharmacol,1983,61(5): 457-463.
[3] WANG T,YE F. Effects of taurine on the development of myocardial remodeling effects [J]. J Clin Pediatr,2005,23(2):115-116.
[4] 张晓丹,渠永清,张婷婷,等. 牛磺酸对舒张性心力衰竭大鼠心肌细胞钙超载的拮抗作用[J]. 中国中药杂志,2009,34(3):328-331.
[5] 徐兴莉,胡建民,杨建成,等. 牛磺酸对大鼠高血压预防作用的研究[J]. 现代预防医学,2006,33(6):870-872.
[6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 食品中牛磺酸的测定:GT/T 5009.169—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
[7] 方宏兵,王德强. 食品中牛磺酸的检测方法研究进展[J]. 粮油食品科技,2011,19(4):45-47.
[8] 刘路,高璇,杨永健. HPLC-电雾式检测器应用[J]. 中国医药工业杂志,2012,43(3):227-230.
[9] VOCHYÁNOVÁ B,OPEKAR F,T ŮMA P. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/photometry detection[J]. Electrophoresis,2014,35(11):1660-1665.