

信建豪,侯巧芝,邢建华,等. 直接电位法快速测定食品中的咖啡因[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):257-259.

直接电位法快速测定食品中的咖啡因

信建豪,侯巧芝,邢建华,王高峰,张启堂

(黄河科技学院医学院,河南郑州 450063)

摘要:由咖啡因与磷钨酸可形成的缔合物为电活性物质,研制咖啡因聚氯乙烯玻璃涂膜电极,用于食品中咖啡因含量的快速测定。试验表明,该电极在 pH 值 2.0 时显示良好的能斯特响应,响应范围为 $1 \times 10^{-2} \sim 3.0 \times 10^{-6}$ mol/L,斜率为 59.6 mV/pC;用于测定药物和食品中咖啡因,回收率在 91.1% ~ 107.1% 之间,测定快速、准确。

关键词:直接电位法;离子选择电极;快速测定;咖啡因

中图分类号: O657.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0257-03

咖啡因化学名为 3,7-三甲基-3,7-二氢-1H-嘌呤-2,6-二酮,常存在于一些天然食品中,适量食用有去除疲劳、兴奋神经、刺激垂体肾上腺皮质轴引起促肾上腺皮质激素和皮质醇合成增加等作用。但大量或长期摄取咖啡因有损人体健康,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,甚至导致下一代智能低下,肢体畸形^[1]。咖啡因含量是一些含咖啡因食品质量的一个重要指标,也是决定食品滋味的重要因素,所以测定食品中的咖啡因含量具有重要意义。目前测定茶叶中咖啡因的方法有紫外分光光度法^[2]、高效液相色谱法^[3]、气质联用法^[4]和电化学^[5]等,这些方法通常需要复杂的前处理,操作繁琐,使测定时间较长。由于食品具有特殊性,从生产到应用的时间

较短,若检测时间过长,无法完成对食品的实时监控。本研究建立了一种快速检测方法,采用咖啡因离子选择性电极,测定了茶叶和巧克力 2 种常用食品中的咖啡因含量,该方法简便快速,价格低廉,测定结果准确可靠。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: pH S-3C 型精密酸度计(上海理达有限公司); PXSJ-216 型离子活度计(上海雷磁);恒速磁力搅拌器。试剂:咖啡因原料药(东莞市永丰化工有限公司,纯度 98.4%);咖啡因对照品(中国药品生物制品检定所)。酸性溶剂: pH 值 2.00 的盐酸溶液(将重蒸馏水用盐酸调节 pH 值至 2.00,用 pH 计测定);咖啡因标准溶液:称取咖啡因原料药 1.061 0 g 用上述酸性溶剂溶解于 50 mL 容量瓶中定容,即为 0.1 mol/L 的咖啡因储备液。将此储备液逐级用酸性溶剂稀释,即得咖啡因系列标准溶液。其他试剂均为分析纯,试验用水为新蒸重蒸馏水。食品样品购于当地超市。

收稿日期:2013-03-15

作者简介:信建豪(1981—),男,河南镇平人,硕士,讲师,主要从事食品、药物的快速分析技术研究。E-mail: nilk4@163.com.

[7] Reddy T V, Viswanathan L, Venkatasubramanian T A. High aflatoxin production on a chemically defined medium[J]. Applied Microbiology, 1971, 22(3): 393-396.

[8] Keller N P, Nesbitt C, Sarr B, et al. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp [J]. Phytopathology, 1997, 87(6): 643-648.

[9] Lie J L, Marth E H. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a casein substrate at different pH values [J]. Journal of Dairy Science, 1968, 51(11): 1743-1747.

[10] Fanelli C, Fabbri A A, Finotti E, et al. Stimulation of aflatoxin biosynthesis by lipophilic epoxides [J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(6): 1721-1723.

[11] Jayashree T, Subramanyam C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 29(10): 981-985.

[12] Kim J H, Yu J, Mahoney N, et al. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 122(1-2): 49-60.

[13] Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, et al. Oxidant/antioxidant balance

in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis [J]. Mycotoxin Research, 2006, 22(1): 39-47.

[14] Shantha T, Murthy V S. Influence of tricarboxylic acid cycle intermediates and related metabolites on the biosynthesis of aflatoxin by resting cells of *Aspergillus flavus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42(5): 758-761.

[15] Gupta S K, Maggon K K, Venkatasubramanian T A. Effect of Zinc on tricarboxylic acid cycle intermediates and enzymes in relation to aflatoxin biosynthesis [J]. Journal of General Microbiology, 1977, 99(1): 43-48.

[16] Price M S, Connors S B, Tachdjian S, et al. Aflatoxin conducive and non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(6): 506-518.

[17] Maggio-Hall L A, Wilson R A, Keller N P. Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in plants [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2005, 18(8): 783-793.

[18] Klose J, de Sá M M, Kronstad J W. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis* [J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(3): 823-835.

1.2 试验方法

1.2.1 电活性物质的制备 称取 1.061 0 g 咖啡因 4 份于 4 个 100 mL 烧杯中,均加入浓盐酸 10 mL 使其各自完全溶解;分别在 4 个烧杯中滴加 0.1 mol/L 磷酸溶液、0.1 mol/L 碘离子溶液、0.1 mol/L 磷酸溶液、0.1 mol/L 四苯硼钠溶液 10 mL,边搅拌边滴加,即有沉淀生成;将生成的沉淀分别用双层滤纸抽滤,用重蒸馏水洗至滤液中无氯离子(用 AgNO_3 试液检验);最后将沉淀在红外灯下烘干,并置于干燥器中使其彻底干燥,即得到咖啡因电活性物质,并通过试验选择出响应最佳的电活性物质。

1.2.2 电极的制备 将洁净 pH 玻璃电极在水中浸泡 48 h,取出,用水冲洗,再用无水乙醇冲洗,吹干待用。称取聚氯乙烯(PVC)粉末 0.15 g,用四氢呋喃 10 mL 将其溶解,再加入选出的咖啡因电活性物质 20 mg、邻苯二甲酸二丁酯(DBP) 0.15 mL,搅拌溶解呈均匀透明溶液;室温下静置使其挥发成黏稠状液体,将 pH 玻璃电极浸入到该透明液中,缓慢取出,晾干后再浸入,如此反复 5 次,使玻璃电极表面均匀涂敷 1 层对咖啡因敏感的 PVC 膜,即得咖啡因选择性电极。

1.2.3 电极电位的测量方法 咖啡因电极使用前先在 1.0 mmol/L 咖啡因溶液中浸泡活化 1 h,用水冲洗后与饱和甘汞电极组成测量电池,连接离子活度计,测定水的空白电位值,待其稳定后即可测定试液。

1.2.4 样品分析 取食品样品适量,在烘箱中 120 °C 烘干,在研钵中研磨成细粉末,精确称取 1 g 样品粉末置于 50 mL 容量瓶中,加酸性溶剂定容,振荡后放置 5 min,取适量上清液在烧杯中测量电池电动势,按工作曲线法计算咖啡因含量。

2 结果与讨论

2.1 溶液 pH 值的选择

用 HCl 和 NaOH 溶液调节 0.1 mmol/L 咖啡因溶液的 pH 值,测量不同 pH 值下相应的电极电位,作电位 - pH 值曲线见图 1。由图 1 看出:当咖啡因溶液 pH 值 > 4.50 时,电位值已经与蒸馏水的电位值非常接近(约 -92 mV),说明在该 pH 值下已无明显响应。原因可能是咖啡因离子的 $\text{p}K_a \approx 0.7$,在 pH 值 > 4.50 时,溶液中的咖啡因主要以中性分子型体存在。应选择 pH 值小于 4.50,使溶液中的咖啡因主要以离子型体存在。为便于控制溶液 pH 值,选择 2.00 作为溶液测试所用 pH 值。溶液 pH 值需要用强酸进行控制,试验中选择了 H_2SO_4 、HCl 和 H_3PO_4 进行了试验,结果表明,在 HCl 溶液中电极的响应最佳,故选择 HCl 溶液控制溶液的 pH 值。

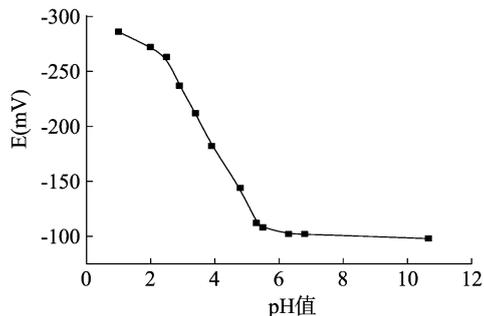


图1 咖啡因溶液pH值对电极电位的影响

2.2 电活性物质的选择

采用咖啡因 - 碘、咖啡因 - 四苯硼钠、咖啡因 - 磷酸、咖啡因 - 磷酸 4 种离子缔合物为电活性物质,制备出咖啡因离子选择性电极,对其性能进行测试,结果见表 1。由表 1 可知,以咖啡因 - 磷酸为电活性物质所制备出的离子选择性电极响应性能最佳,因此选用咖啡因 - 磷酸为电活性物质。

表 1 不同电活性物质所制备的咖啡因电极性能

电活性物质	平均斜率 (mV/pC)	线性范围 (mol/L)	检测限 (mol/L)	适用性
咖啡因 - 碘	50.3	$1.0 \times 10^{-2} \sim 5.0 \times 10^{-4}$	8.9×10^{-5}	在酸性溶液中不稳定
咖啡因 - 四苯硼钠	52.1	$1.0 \times 10^{-2} \sim 3.0 \times 10^{-5}$	9.1×10^{-6}	在酸性溶液中使用寿命短
咖啡因 - 磷酸	54.7	$1.0 \times 10^{-2} \sim 5.0 \times 10^{-6}$	1.3×10^{-6}	在酸性溶液中无不良影响
咖啡因 - 磷酸	59.6	$1.0 \times 10^{-2} \sim 3.0 \times 10^{-6}$	7.8×10^{-7}	在酸性溶液中无不良影响

2.3 电极 Nernst 响应曲线

按照“1.2.3”节方法依次测量咖啡因电极和甘汞电极在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ mol/L 咖啡因溶液中的电池电动势 E ,以电位 E 对咖啡因浓度的负对数 $\text{p}C$ 作图(图 2)。图 2 显示:在咖啡因浓度为 10 ~ 0.003 mmol/L 范围内, $E - \text{p}C$ 具有良好的线性关系。线性回归方程为 $E = -514.4 + 59.6\text{p}C$,能斯特响应斜率为 59.6 mV/pC,相关系数为 0.999 7。

2.4 电极的选择性

以独立溶液方法研究了电极对一些常见离子和样品中共存的其他化合物的选择性系数,结果见表 2。试验证明,该电极对常见的离子和样品中共存的其他化合物具有良好的选择性,无明显干扰物质存在。

2.5 电极的响应时间

在 10、1、0.1、0.005 mmol/L 的咖啡因溶液中,该电极的

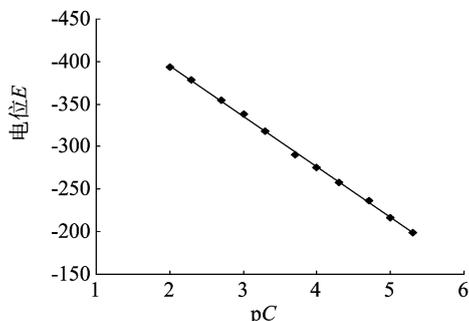


图2 电极Nernst响应曲线

静态响应时间均小于 50 s。

2.6 电极的重现性

在 10 ~ 0.1 mmol/L 的咖啡因溶液中,分别反复测定 12 次电位值,相对标准偏差小于 2.6%。

表2 选择性系数测定结果

干扰离子	K_{ij}	干扰离子	K_{ij}
Mg^{2+}	2.3×10^{-4}	Fe^{3+}	3.5×10^{-3}
K^+	4.7×10^{-5}	Al^{3+}	7.4×10^{-3}
Na^+	3.5×10^{-5}	Pb^{2+}	2.1×10^{-4}
Cu^{2+}	8.5×10^{-4}	Ca^{2+}	5.3×10^{-3}
SO_4^{2-}	4.7×10^{-4}	IO_4^-	7.7×10^{-3}
Br^-	1.9×10^{-3}	抗坏血酸	4.8×10^{-6}
Cl^-	7.2×10^{-5}	表儿茶素	3.9×10^{-3}
$C_2O_4^{2-}$	4.1×10^{-4}	可可碱	1.7×10^{-3}

2.7 电极使用寿命

试验中所使用的电极在室温下放置3个月后,重新检测

其 Nernst 响应线性范围及斜率,试验表明其线性范围及斜率无明显变化,说明电极使用寿命大于3个月。

2.8 测定时间

制作标准曲线后,从试样制备到结果计算完毕耗时小于30 min,测定速度显著高于其他咖啡因的测定方法。

3 样品测定及回收率试验

取市售的2种食品按“1.3”节方法进行测定,并用标准方法对照和标准加入法进行回收率试验,结果见表3。由表3可知,测定结果用标准方法对照和回收率试验证明其准确度令人满意。

表3 样品测定及回收率试验

样品		本法测得值 (mg/g)(n=5)	RSD (%)	标准方法测得值 (mg/g)	加入值 (mg/g)	测得值 (mg/g)	回收率 (%)
巧克力	样品1	0.349	2.10	0.332	0.15	0.145	103.4
					0.3	0.321	93.5
					0.6	0.659	91.1
	样品2	0.362	1.10	0.393	0.15	0.156	96.2
					0.3	0.280	107.1
					0.6	0.624	96.2
	样品3	0.387	1.7	0.392	0.15	0.155	96.8
					0.3	0.289	103.8
					0.6	0.651	92.2
茶叶	绿茶	27.6	1.6	27.5	10.0	9.84	98.4
					20.0	20.6	103
					30.0	28.8	96.0
	红茶	48.2	1.8	48.4	20.0	19.8	99.0
					40.0	40.2	100.5
					60.0	58.7	97.8
	铁观音	36.1	1.4	35.9	15.0	14.3	95.3
					35.0	34.8	99.4
					55.0	54.2	98.5

参考文献:

- [1]于新蕊,曲 军,丛月珠. 茶叶的化学成分及药理作用进展[J]. 中草药,1995,26(4):219-222.
- [2]刘晓庚. 用荷移光度新方法测定茶叶及茶饮料中咖啡因的含量[J]. 食品与发酵工业,2008,34(3):177-181.
- [3]侯冬岩,回瑞华,李铁纯,等. 高效液相色谱法测定黑茶中咖啡因含量[J]. 食品科学,2009(20):283-284.
- [4]郭亚东,丁颖洁. SFC 和 GC/MS 快速测定茶叶中咖啡因(英文)[J]. 食品科学,2005(06):215-217.
- [5]曹玉华,张 欣,丁祥欢,等. 毛细管电泳-电化学检测测定茶叶中咖啡因、表儿茶素和抗坏血酸[J]. 分析化学,2001,29(9):1072-1075.

欢迎订阅 2014 年《杂草科学》

《杂草科学》创刊于1983年,是国内唯一的有关杂草研究与防除的技术类期刊,是中国科技核心期刊、江苏省一级期刊。主要报道国内外杂草科学研究的最新动态、国内主要研究成果、农田果园等杂草防除技术、化学除草剂新品种及其使用技术等。辟有论坛与综述、研究报告、调查研究简报、除草技术应用与推广、信息荟萃等栏目。

《杂草科学》为季刊,大16开,72页,每期定价10.00元,全年40.00元。中国标准连续出版物号:CN32-1217/S;ISSN1003-935X。邮发代号:28-147,全国各地邮局均可订阅。错过订阅时间者可以直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:南京市孝陵卫钟灵街50号《杂草科学》编辑部

邮编:210014

电话:025-84390048

E-mail: zckx@jaas.ac.cn

网址: http://zckx.jaas.ac.cn