

# 用荷移光度新方法测定茶叶及茶饮料中咖啡因的含量

刘晓庚

(南京财经大学食品科学与工程学院应用化学系, 江苏南京, 210003)

**摘要** 用分光光度法研究了咖啡因作为电子给予体与电子接受体四氯对苯醌的荷移反应。确定了反应及测定的条件为:在硼砂与 NaOH 构成的缓冲溶液中,咖啡因分别与四氯对苯醌混匀于(20±1)℃的水浴中恒温 20 min,可形成 1:2 的稳定荷移络合物,其可见光区内的最大吸收波长为  $\lambda_{\max}=536\text{ nm}$ ,表观摩尔吸光系数  $\epsilon=1.684\times 10^4\text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ ,最低检测限为  $1.9\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,在  $1\times 10^{-5}\sim 3.0\times 10^{-4}\text{ mol/L}$  内符合比耳定律,线性方程为  $\Delta A=1.4856\times 10^4-0.0406\text{ } (r=0.997)$ 。该法对市售的茶叶和茶饮料中咖啡因含量测定的结果与 GB/T 16344-1996 法一致,回收率在 99.1%~102.8%,RSD 为 2.0%~3.3%,茶叶经热水浸泡处理和茶饮料的直接测定与  $\text{CHCl}_3$  萃取处理的效果一样,茶叶和茶饮料中共存的其他组分不干扰测定。

**关键词** 荷移反应,分光光度法,咖啡因,茶叶和茶饮料,四氯对苯醌

中国是世界咖啡因产销大国。咖啡因又名咖啡碱(化学名称为 1,3,7-三甲基-2,6 二氧嘌呤)是一种生物碱,在茶叶中含量为 1%~5%,是决定茶滋味、颜色等的主体成分<sup>[1]</sup>。咖啡因也是中枢神经兴奋药物,常用于解热镇痛药。大量的咖啡因用于饮料添加剂。近年来,以茶碱为基体开发了多种衍生物以改善其药物性能,其中咖啡因是规模效益型品种,具有良好前景。

咖啡因的测定方法主要有碘量法<sup>[2]</sup>、重量法<sup>[2]</sup>、比色法<sup>[2]</sup>、气相色谱-质谱(GC/MS)法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[4]</sup>、近红外(NIR)法<sup>[5]</sup>等。这些方法由于存在灵敏度太低、预处理繁琐、测定时间长、仪器

成本或测定成本过高等原因,使其受到限制。荷移光度法是近些年来发现的简便快捷准确的分析方法<sup>[6,7]</sup>。但将其运用于茶叶中咖啡因的测定却少有报道。段亚丽等人<sup>[7]</sup>研究了咖啡因与氯冉酸之间的荷移反应,但氯冉酸不易获得,且测定的稳定性不高。采用四氯对苯醌与咖啡因的荷移光度法测定,克服了这些不足,且操作简便,灵敏度高,重现性好,用于样品测定,结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原理

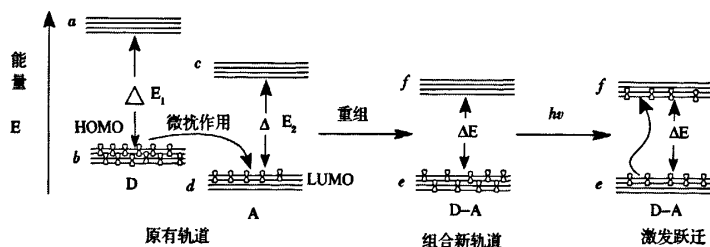


图 1 荷移络合物光度法(电子跃迁)的原理示意图

电荷转移络合物(charge transfer complex, CTC)又称电子给予受体络合物,是由电子相对富足的分子作为电子的给予体和电子相对缺乏的分子作为电子接受体之间通过分子间电荷转移而形成 CTC。在 CTC 形成的过程中伴随着电子跃迁的能量变化,若 CTC 吸收可见光的能量,则 CTC 就会因电

荷转移而显色,从而可实现在可见光区的测定分析。其原理如图 1 所示,先在微扰作用下电子从 D 原子(或分子)的最高能级轨道(HOMO b)转移至 A 原子(或分子)的最低能级轨道(LUMO d),形成新的 D-A 分子轨道 e、f,若  $\Delta E_1$  和  $\Delta E_2$  都大于  $\Delta E$ ,则电子从 e 轨道跃迁至 f 轨道的能差小,易在长波长区完成,因而 CTC 的吸收产生红移,可能生成有色物质;如果不形成 CTC,则电子发生在  $b\rightarrow a$  或  $d\rightarrow c$  跃迁,则能差

第一作者:硕士,教授。

收稿日期:2007-11-02,改回日期:2008-02-01

较大,也不使吸收峰产生红移<sup>[8]</sup>。

## 1.2 仪器与试剂

UV1102 紫外可见分光光度计(上海天美公司), THZ-82A 电恒温水浴器(常州国华电器有限公司), BS 224S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), SYC-15C 超级恒温水浴(南京桑力电子设备厂)。

咖啡因标准溶液:以绿茶为原料自制的咖啡因精品(液相色谱和红外测定的含量均 $\geq 99.9\%$ )做标准品,并将其配成浓度  $1.00 \times 10^{-3}$  mol/L 咖啡因乙醇溶液作为标准溶液;四氯对苯醌(上海化学试剂公司)储备液:用乙腈配成  $3.0 \times 10^{-3}$  mol/L 四氯对苯醌乙腈溶液;其他试剂均为分析纯;水为二次蒸馏水。

## 1.3 实验方法

取适量的咖啡因试样于 10 mL 具塞比色管中,加入一定量  $3.0 \times 10^{-3}$  mol/L 四氯对苯醌乙醇溶液,用无水乙醇稀释至约 9 mL,加入一定量的酸度调节液,继续用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,恒温  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  下反应一段时间。以试剂空白为参比,用 1 cm 的石英比色皿在 536 nm 处测定其吸光度值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验条件的选择

#### 2.1.1 吸收光谱

按实验方法将四氯对苯醌乙腈溶液(以乙腈参比)、咖啡因乙醇溶液(以乙醇参比)、咖啡因与四氯对苯醌络合物(以试剂空白为参比),在紫外可见分光光度计上扫描,测得光谱图如图 2 所示。

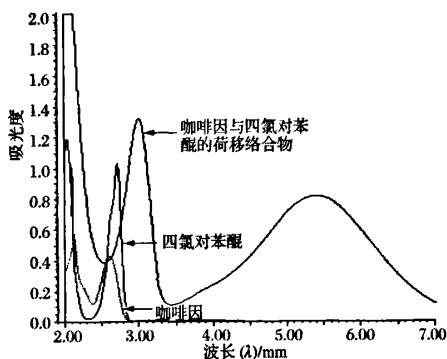


图 2 吸收光谱

图 2 表明,咖啡因、四氯对苯醌的吸收峰分别在 272、287 nm 处,而其 CTC 在 298 和 536 nm 处均有吸收,可见 CTC 产生了强烈红移。虽然荷移络合物在 298 nm 处吸收最强,但易被试剂四氯对苯醌干

扰,所以测定选用 536 nm 作为测定工作波长。

#### 2.1.2 溶剂的影响

为获得良好的测定溶剂,分别以甲醇、乙醇、乙腈、正丁醇、丙酮、环己烷、乙酸乙酯、水、乙醇水溶液等为溶剂进行试验。结果表明,只有在乙醇介质中咖啡因的水溶液才能和四氯对苯醌的乙腈液反应完全,且络合物与四氯对苯醌之间的吸收峰分得很开,否则难以形成 CTC,不出现 536 nm 吸收峰。因此,本实验用咖啡因水溶液和四氯对苯醌的乙腈液,并用乙醇作稀释剂。

#### 2.1.3 pH 的影响

分别以 2 mol/L 醋酸、1 mol/L 醋酸-醋酸钠、0.5 mol/L NaOH、0.1 mol/L 氢氧化钠+硼酸钠对反应体系进行 pH 从 0~13 的酸碱度影响试验。结果表明,在强酸性下无 CTC 形成,在 pH 2~7 时 CTC 不稳定,而在 pH 6~8 时还会出现沉淀或浑浊,而在 pH >8 的碱性下 CTC 的稳定性和测定的灵敏度均大大提高,而且以氢氧化钠+硼酸钠组成的调节剂调至 pH 9~10 时效果最佳。

#### 2.1.4 反应时间与温度的影响

其他条件不变,在 0~90 min 内考察反应时间对 CTC 的影响,结果如图 3 所示。由图 3 可知,10 min 已反应完全,且达到平衡,60 min 后 CTC 稳定性开始下降。因此,测定选在反应后 10~60 min 内完成。

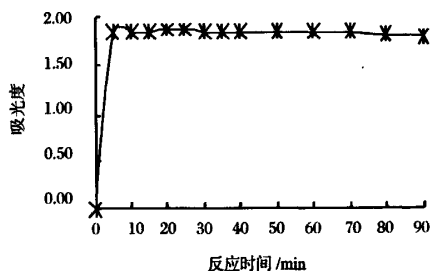


图 3 反应时间对吸光度的影响

按实验方法其他条件不变,分别在 10、20、30、40、50、60 $^\circ\text{C}$ ,恒温条件下进行试验,其结果如图 4 所示。结果表明在  $20^\circ\text{C}$  时效果最佳,稳定性高。

#### 2.1.5 试剂用量的影响

按实验方法其他条件不变,考察四氯对苯醌的用量对反应的影响。结果表明,在反应达到平衡前吸光度随四氯对苯醌用量的增加而增大,还会出现 287 nm 峰与 298 nm 峰重叠后的肩峰现象,当四氯对苯醌用量达到平衡量的 110% 左右测定结果最大且恒定,也不出现 287 nm 肩峰。因此,本实验选四氯对

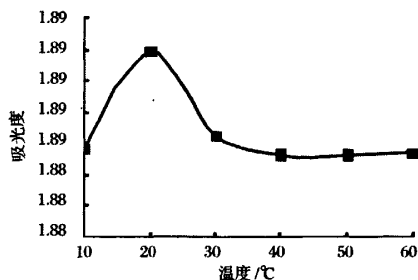


图4 反应温度对吸光度的影响

苯醌用量为其平衡量的 110% (即过量 10%)。

### 2.1.6 干扰因素的测定

按实验方法,向反应液中分别加入干扰组分后进行测定,在允许相对误差 $\leq 5\%$ 时,等量的蛋白质、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ , 5 倍的淀粉、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 10 倍的  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{NO}_2^-$ , 50 倍的果胶、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ , 100 倍的蔗糖、葡萄糖和果糖均对测定不产生干扰。而等量的氨基酸会产生影响,但加入  $\text{Fe}^{2+}$  后可消除干扰。因此,测定时应事先加入少量  $\text{FeCl}_2$  掩蔽氨基酸。另外,茶叶浸泡的茶水和市售的茶饮料中没有发现这些干扰因素对测定的不良影响。

### 2.2 线性范围的测定

在 2.1 确定的最佳实验条件下,通过浓度与吸光度的关系绘制工作曲线,咖啡因的线性方程为  $\Delta A = 1.4856 \times 10^4 C - 0.0406$  ( $r = 0.997$ ) (见图 5),表观摩尔吸光系数为  $\epsilon = 1.684 \times 10^4 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$ ,检测限为  $1.9 \mu\text{g/mL}$ ,咖啡因的浓度在  $(0.1 \sim 3.0) \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  范围内遵从比尔定律。

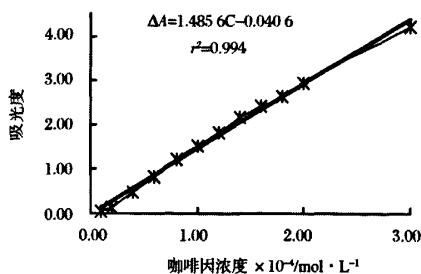


图5 线性方程

### 2.3 络合物组成的测定

采用等摩尔连续变化法<sup>[9]</sup>绘制曲线图(见图 6), 2 曲线外推的交点所对应的  $\text{cM}/\text{cR}$  值即为络合比。由图 6 可得,咖啡因与四氯对苯醌形成的 CTC 组成比为  $n_{\text{咖啡因}} : n_{\text{四氯对苯醌}} = 1 : 2$ 。

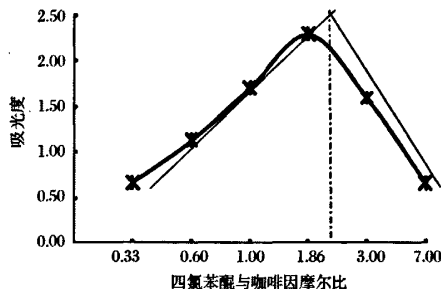
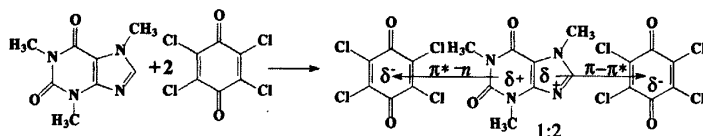


图6 连续变化法测得荷移络合物的组成

### 2.4 反应机理的初探

咖啡因分子中 N 原子上有一孤电子对可作为电子给予体,而缺电子体系四氯对苯醌作为  $\pi$  电子接受体,可形成  $n-\pi$  和  $\pi-\pi$  型 CTC。基于测得 CTC 组成比为 1:2,其荷移反应可表示为:



### 2.5 稳定常数及 Gibbs 自由能的测定

按参考文献<sup>[10]</sup>方法从回归方程算出咖啡因与四氯对苯醌形成 CTC 的稳定常数为  $K = 6.28 \times 10^2$  ( $r = 0.995$ )。结果表明所形成的 CTC 具有一定稳定性,但稳定性并不高。由公式  $\Delta_r G_m(T) = -RT \ln K$  可计算  $n$  或  $\pi$  电子给予体与  $\pi$  电子受体之间的荷移反应的 Gibbs 自由能变化  $\Delta_r G_m(T)$ , 计算结果为  $\Delta_r G_m(293\text{K}) = -11.92 \text{ kJ/mol}$ 。这表明该 CTC 的形成无需外界能量的推动,可自发形成。

### 2.6 精密度试验

取同一茶叶样品,在日间和日内分别平行测定 6 份,以考察方法的精密度。结果显示,在日间和日内测定的咖啡因含量的 RSD 分别为 3.3% 和 2.9%,符合分析对方法的要求。

## 3 实样的测定

### 3.1 样品制备

#### 3.1.1 样品处理方法的选择

为了寻找到简便快捷高效的样品处理方法,对所属测定茶叶及茶饮料作了如下 2 种处理:(1)茶叶和茶

饮料分别以  $\text{CHCl}_3$  为溶剂,进行抽提,脱溶后进行升华提纯得到纯咖啡因,再配制成试液进行测定。(2) 茶叶(含袋泡茶)直接用热水(95℃)浸泡 10 min,取水进行测定;茶饮料不处理直接测定,试验结果见

表 1 茶和茶饮料不同预处理方法的测定结果

样 品	处理方法	测定值	平均值	RSD/%	t 值	$t_{0.05,4}$
茶 叶	(1)	2.65%、2.57%、2.66%、2.72%、2.65 %	2.65%	2.0	0.97	2.776
	(2)	2.58%、2.76%、2.72%、2.66%、2.78 %	2.70%	3.0	5	
茶饮料	(1)	139.4、143.9、129.9、147.2、139.2 mg/L	139.9 mg/L	3.3	2.60	5
	(2)	134.8、133.2、138.9、131.6、142.6 mg/L	136.2 mg/L	3.3	5	

### 3.1.2 茶水的制备

准确称取 2.000 g 茶叶于 500 mL 碘量瓶中,准确加入 200 mL 95℃蒸馏水,盖上塞,在振荡下浸泡 10 min 后,过滤,滤液冷至 20℃定容至 200 mL,即成 1 次浸泡茶水液,备用。

将 1 次浸泡后的茶渣,再准确加入 200 mL 95℃蒸馏水,盖上塞,在振荡下浸泡 10 min 后,过滤,滤液冷至 20℃定容至 200 mL,即成 2 次浸泡茶水液,备用。

分别准确称取 2.000 g 茶叶于不同编号的碘量瓶中,分别准确加入 200 mL 30、60、95℃蒸馏水,盖上塞,浸泡 10 min 后,过滤,滤液冷至 20℃分别定容至 200 mL,即成不同温度下浸泡的茶水液,备用。

### 3.1.3 茶饮料

由苏果超市购得的 3 种品牌的茶饮料直接用于测定。

### 3.2 样品的测定

移取 2.00 mL 样液于 10 mL 的比色管中,加入 0.1 mL  $5 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{FeCl}_2$  溶液,再加入 1.00 mL  $3.0 \times 10^{-3}$  mol/L 四氯对苯醌乙腈溶液,用无水乙醇稀释至约 9 mL,再加入 0.3 mL 0.1 mol/L  $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  的缓冲溶液,继续加无水乙醇稀释至 10 mL,摇匀后在 20℃恒温下反应 10 min。以试剂空白为参比进行测定。其结果见表 2、表 3、表 4。

表 2 茶叶的第 1 次浸泡液和茶饮料中咖啡因含量的测定结果

品 名 <sup>1)</sup>	测定值 (n=7)	平均值	RSD / %	加标量	回收率/%	GB/T16344-1996 <sup>[11]</sup> 测定值	t 值 <sup>2)</sup>	$t_{0.05,6}$
茶 叶	A <sub>1</sub> / %	5.01, 5.03, 4.66, 4.82, 4.76, 4.97, 4.81	4.87	2.9	1.00%	99.2	4.89	0.38
	A <sub>2</sub> / %	2.96, 2.87, 3.01, 3.14, 2.52, 2.74, 2.84	2.88	4.4	2.00%	102.3	2.78	2.10
	B / %	3.96, 4.16, 4.21, 4.18, 4.22, 4.08, 4.14	4.14	2.2	1.00%	101.2	4.09	1.46
	C / %	2.67, 2.81, 2.73, 2.61, 2.59, 2.69, 2.76	2.69	2.9	2.00%	99.1	2.75	2.01 2.447
茶 饮 料	A / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	136.0, 140.0, 138.7, 148.6, 135.5, 137.9, 139.5	139.5	3.1	50.0 mg/L	102.8	138.2	0.79
	B / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	134.8, 143.7, 134.5, 134.8, 128.8, 136.2, 129.9	134.7	3.6	50.0 mg/L	99.1	133.5	0.65
	C / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	122.2, 124.9, 124.5, 126.8, 123.7, 121.6, 122.4	123.7	1.5	50.0 mg/L	101.0	122.4	1.91

注:1) A、B、C 分别代表为绿茶、红茶、乌龙茶,而 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 代表不同产地的绿茶;2) 以 GB/T 16344-1996 法的测定值为  $\mu$  值计。

表 3 茶叶的第 2 次浸泡液中咖啡因含量

样品编号	1	2	3	4	5
咖啡因含量/%	0.583	0.526	0.524	0.531	0.517

表 4 茶叶在不同温度下的浸泡液中咖啡因含量的测定结果

温度 /℃	30	60	95
咖啡因含量 / %	3.42	4.34	4.94

由表 2 可知,本法的精密度高(RSD 为 1.5%~4.4%)回收率比(99.1%~102.8%)准确度靠(本法的测定结果与国标法(GB/T 16344-1996)法的结果完全吻合,经 F 检验和 t 检验表明 2 种方法的测定结果均无显著差异),因此,用本法测定茶叶及茶饮料中咖啡因含量是可行的。表 2、表 3 的数据显示茶叶中的咖啡因经 1 次浸泡就能将绝大部分(85%以上)

咖啡因溶出,第2次溶出量仅为第1次的10.3%~12.5%,这说明咖啡因易溶于水;另外,表4的结果表明随温度升高,咖啡因溶出量增加,进一步说明咖啡因更易溶于热水。这一结果与凌云等人<sup>[12]</sup>的报道一致。

致谢:南京财经大学应用化学专业2007届毕业生刘宁同学参加了部分实验工作,在此表示衷心感谢。

### 参 考 文 献

- 1 于新蕊. 茶叶的化学成分及药理作用[J]. 中草药, 1995, 26(4): 219~221
- 2 廖晓玲. 茶叶功效成分—茶多酚, 咖啡因分析测定方法的研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2002. 16
- 3 邱涤非, 肖晓瑶. 超临界流体萃取和气相色谱/质谱法测定中国茶中咖啡因含量[J]. 色谱, 1995, 13(6): 450~451
- 4 Hidiki Horie. Rapid determination of caffeine in tea leaves [J]. Journal of Chromatography A, 2002(942): 271~273
- 5 Quansheng Chen. Simultaneous determination of total

polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy[J]. Microchemical Journal, 2006(83): 42~47

- 6 El-Mossalamy E H. Charge-transfer complexes of phenylephrine with nitrobenzene derivatives [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2004(60): 1 161~1 167
- 7 段亚丽. 荷移反应分光光度法测定咖啡因[J]. 山西师范大学学报(自然科学版), 2003, (1): 66~68
- 8 李 荣. 荷移跃迁与物质的颜色[J]. 集宁师学报, 1999, 21(4): 43~45
- 9 武汉大学主编. 分析化学(第四版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 236~237
- 10 高吉刚, 周 杰, 盛 锋, 等. 络合物稳定常数及有机试剂纯度的光度法测定[J]. 分析化学, 2002, 30(5): 594~597
- 11 GB/T 16344—1996 饮料中咖啡因的测定方法[S]
- 12 凌 云, 赵云峰, 李志军, 等. 茶叶及茶饮料中儿茶素和咖啡因的多组分 HPLC 分析方法[J]. 卫生研究, 2005, 34(2): 187~190

## Study on the Charge Transfer Reaction of caffeine in Tea and Its Beverage with Tetrachlorobenquinone by Spectrophotometry

Liu Xiaogeng

(Department of Applied Chemistry, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance & Economics, Nanjing 210003, China)

**ABSTRACT** The charge transfer reaction of caffeine with tetrachlorobenquinone in borax buffer forms a 1 : 2 complex with the apparent molar absorptivity of  $1.684 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$  and the minimum detectability of  $1.9 \mu\text{g/mL}$  at 536nm. Beer's law is obeyed in the range of  $1 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  with the relative standard deviation of 2.0%~3.3% and the recovery of 99.1%~102.8%. This method was successfully applied to the determination of caffeine content in tea and its beverage. The other components contained in tea and its beverage did not interfere in the assay. The results showed that this method is simple, rapid and accurate, the results were satisfactory.

**Key words** charge transfer reaction, spectrophotometry, caffeine, tea and tea beverage, tetrachlorobenquinone

### 信 息 窗

### 韩国科学家从西瓜中提取高纯度番茄红素

韩国科学家日前宣布,他们已成功从西瓜中提取番茄红素,番茄红素有抗癌和抗衰老的功效。

韩国食品研究所说,目前有些国外实验室和公司提取的番茄红素纯度只有1%到15%,而该研究所用新工艺提取的番茄红素纯度高达80%。

果蔬中所含的番茄红素是一种淡红色自然色素。研究结果显示,番茄红素不仅可有效抵抗癌症和心血管病等,还可延缓衰老。

研究人员称,过去生产的番茄红素制剂只能用油溶解,而用新工艺生产的番茄红素制剂可溶于水,从而增加了制剂的实用性。