

# 可可碱、咖啡因、茶碱的滤纸基质室温磷光测定

卫艳丽 董川\* 杨频

<sup>1</sup>(山西大学化学化工学院,分子科学研究所,太原 030006)

**摘 要** 以快速定量滤纸为基质,用 KI-NaAc 为重原子微扰剂,建立了测定痕量可可碱、咖啡因、茶碱的滤纸基质室温磷光(PS-RTP)分析法。该法取样量少,线性范围宽,可可碱、咖啡因、茶碱的线性范围分别为 14.4 ~ 576; 5.44 ~ 699; 7.21 ~ 360 ng/斑点;检出限分别为 1.14、0.78、1.80 ng/斑点。该方法用于巧克力中可可碱、茶叶中咖啡因、氨茶碱药片中茶碱的测定,操作简便快速,选择性好。标准回收率在 92.8% ~ 106% 之间;相对标准偏差 RSD < 5%。

**关键词** 室温磷光分析,可可碱,咖啡因,茶碱

## 1 引 言

可可碱(Theobromine)、咖啡因(Caffeine)、茶碱(Theophylline)是黄嘌呤甲基衍生物;可可碱与茶碱为同分异构体,比咖啡因少一个 -CH<sub>3</sub>,它们具有重要的药理功能。测定方法主要有与各种分离技术相结合的紫外可见分光光度法<sup>[1-6]</sup>。当其吸附在滤纸表面上,有重原子存在时能发出强的磷光<sup>[7]</sup>。Bateh 等<sup>[8]</sup>采用固体基质室温磷光法测定了药物中的茶碱和咖啡因。本文详细研究了 KI-NaAc 对可可碱、咖啡因、茶碱产生室温磷光的影响以及温度、酸度等适宜条件的选择。建立了测定痕量可可碱、咖啡因、茶碱的 PS-RTP 法。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂和仪器

可可碱、咖啡因、茶碱(SIGMA 公司)于 100℃ 下烘烤 1 h,配制成  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 的储备液,使用时皆用 pH = 5.1 的 Britton-Robinson 缓冲溶液稀释成  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 工作液。其它试剂均为分析纯,用二次重蒸馏水配制。市售氨茶碱药片(上海衡山药业公司)。市售巧克力(天津天利居食品有限公司)。普通市售青茶、绿茶、红茶、花茶。

日立 F-4500 型荧光分光光度计,附磷光配件。室温磷光样品架和红外灯干燥装置,本实验室自制。5  $\mu$ L 无存液进样器(上海医用激光仪器厂)。定量滤纸(杭州新华造纸厂)。

### 2.2 实验方法

将滤纸裁成 17 mm  $\times$  14 mm 的纸条,在光斑照射处刻一划痕,标记点样位置。用微量进样器取重原子 KI-NaAc 的混合溶液 5  $\mu$ L(KI-NaAc 的浓度比:对可可碱、咖啡因为 2/0.5 mol/L,对茶碱为 3/0.1 mol/L)一次加在点样位置,在红外灯(95℃)下预烘烤一定时间(可可碱为 20 s,茶碱、咖啡因为 30 s)后取出,再在同一位置点加样品溶液(pH = 5.1) 4  $\mu$ L,继续干燥一定时间(可可碱为 2 min,咖啡因、茶碱为 2.5 min)后取出,装上石英片立即置于室温磷光样品架上,在激发和发射通带均为 5 nm 下,进行 3 种黄嘌呤衍生物可可碱、咖啡因、茶碱的 PS-RTP 测量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 条件确定

**3.1.1 可可碱、咖啡因、茶碱的 PS-RTP 光谱** 如图 1。最大激发和发射波长分别为:可可碱 276/435 nm,咖啡因 279/432 nm,茶碱 274/427 nm。

**3.1.2 酸度效应** 在  $\text{pH} < 2$  和  $\text{pH} > 10$  时, 3 种磺吟化合物的 PS-RTP 被严重猝灭。这与嘌呤类化合物的 PS-RTP 一般性质有所不同<sup>[9]</sup>, 本实验选择  $\text{pH} = 5.1$  的测量酸度。

**3.1.3 重原子的选择** 当 KI 和 NaAc 混合使用时, 产生的重原子增强效应很高, 其增强因子  $f$  高达 7 ~ 11 ( $f$  为加微扰剂后的磷光强度与未加微扰剂磷光强度之比)。重原子物质的浓度对 3 种化合物的 PS-RTP 有显著影响。实验表明: KI/NaAc 对可可碱和咖啡因适宜的浓度比为 2/0.5 (mol/L); 对茶碱为 3/0.1 (mol/L)。

**3.1.4 干燥温度、预烘烤时间、烘烤时间及稳定性测定** 烘烤温度在 95℃ 时, 3 种化合物的 PS-RTP 强度值高且稳定。点样之前滤纸上的水分对磷光分子的刚性化有一定的影响<sup>[10]</sup>。实验表明: 可可碱的最佳预烘烤时间为 20 s, 茶碱、咖啡因均为 30 s。烘烤时间考察结果: 可可碱最佳烘烤时间为 2 min; 咖啡因、茶碱均为 2.5 min。PS-RTP 稳定性实验结果: 在 4 min 内其 PS-RTP 强度不发生变化。而 PS-RTP 法测定一个样品 1 ~ 2 min 即可完成, 在稳定时间内足以满足 3 种磷光体的测定。

### 3.2 方法建立

#### 3.2.1 分析特性 3 种化合物的分析特性列于表 1。

表 1 可可碱、咖啡因、茶碱的分析特性

Table 1 The analysis characteristics of theobromine, caffeine and theophylline

样品 Sample	线性范围 Linear range (ng/spot)	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit (ng/spot)	精密性 Precision (%)	回归方程 Regression equation
可可碱 Theobromine	14.10 ~ 576.5	0.994	1.14	4.80	$\lg I = 0.92 \lg C + 6.02$
咖啡因 Caffeine	5.44 ~ 699.1	0.999	0.78	1.56	$\lg I = 0.75 \lg C + 5.00$
茶碱 Theophylline	7.21 ~ 360.3	0.999	1.80	3.80	$\lg I = 0.80 \lg C + 4.95$

**3.2.2 标准回收率** 在已被测定含量的实际样品溶液中, 准确加入一定量的标准贮备液, 按实验方法测定其磷光强度, 代入回归方程计算, 测得值减去样品空白值, 与标准加入量相比较即可算出回收率。本文对可可碱在巧克力、咖啡因在不同茶叶、茶碱在氨茶碱药片中的 3 个标准浓度水平 20.0、50.0、100 ( $\mu\text{mol/L}$ ) 进行了标准回收实验, 结果表明: 可可碱的回收率在 95.2% ~ 106% 之间, 咖啡因的回收率在 92.8% ~ 101% 之间, 茶碱的回收率为 100%。

### 3.3 方法应用

样品处理后收集滤液, 按实验方法测定 PS-RTP 强度, 以回归方程求其含量。

**3.3.1 巧克力中可可碱含量的测定** 准确称取研磨后的巧克力样品 0.1026 g, 再加入 25 mL  $\text{pH} = 5.1$  的缓冲溶液, 搅拌, 使其充分溶解后过滤, 结果见表 2。

表 2 巧克力中可可碱含量的测定 ( $n = 6$ )

Table 2 The determination result of theobromine in chocolate ( $n = 6$ )

样品 Sample	测得值 Found (%)	相对标准偏差 RSD (%)	紫外分光光度法测定结果 Ultraviolet spectrophotometry (%)
巧克力 Chocolate	$0.145 \pm 0.01$	0.32	0.156

**3.3.2 中国名茶茶汤中咖啡因含量的测定** 准确称取茶叶样品 0.5000 g, 冲入 100 mL 煮沸的二次蒸馏水中, 浸泡 15 min, 中间搅拌 2 ~ 3 次。过滤, 初滤液 (约 20 ~ 30 mL) 弃去。测量时准确吸取适当体积的滤液 (0.5 mL) 于容量瓶中 (50 mL) 中, 用  $\text{pH} = 5.1$  缓冲溶液稀释至刻度, 结果见表 3。

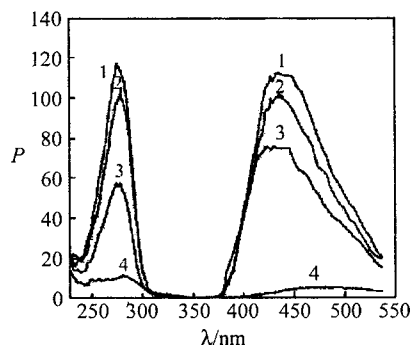


图 1 可可碱、咖啡因、茶碱的 PS-RTP 光谱  
Fig.1 Paper substrate-room temperature phosphorescence (PS-RTP) spectra of theobromine caffeine and theophylline

1. 可可碱 (theobromine); 2. 咖啡因 (caffeine); 3. 茶碱 (theophylline); 4. 背景 (background)。

表3 中国名茶茶汤中咖啡因含量的测定( $n=6$ )Table 3 The determination result of caffeine in different tea ( $n=6$ )

样品 Sample	测得值 Found (%)	相对标准偏差 RSD (%)	紫外分光光度法测定结果 Ultraviolet spectrophotometry (%)
绿茶 Green tea	3.27 ± 0.06	1.85	3.26
青茶 Blue tea	2.14 ± 0.04	2.10	2.92
红茶 Black tea	3.56 ± 0.03	0.83	3.50
花茶 Flower tea	2.20 ± 0.04	1.91	2.42

**3.3.3 氨茶碱药片中茶碱含量的测定** 取20片氨茶碱药片(每片含茶碱100 mg)研磨后,准确称取氨茶碱粉末0.1004 g,用pH=5.1的缓冲溶液配制成100 mL的溶液,测量时稀释。结果见表4。

表4 氨茶碱药片中茶碱含量的测定( $n=6$ )Table 4 The determination result of theophylline in aminophylline ( $n=6$ )

样品 Sample	测得值 Found (%)	相对标准偏差 RSD (%)	紫外分光光度法测定结果 Ultraviolet spectrophotometry (%)
氨茶碱 Aminophylline	34.29 ± 0.23	0.60	35.10

由以上测得结果看出:本法与紫外分光光度法测得值相吻合,滤纸基质室温磷光法可用于巧克力中可可碱、茶叶中咖啡因和氨茶碱药片中茶碱含量的测定,结果与标示量吻合。

## References

- 1 Li Bingyang(李炳阳), Tong Lu(童路), Zou Bentian(邹本田). *Sinica Pharmaceutica Acta*(药学报), 1985, 20(5):398~400
- 2 Chen Xiang(陈橡). *Collection of Publications on China Famous Tea*(中国名茶研究文集), 1985:247~249
- 3 Jiang Shuo(姜朔). *Chinese J. Pharmaceutical Analysis*(药物分析杂志), 1987, 7(1):50~52
- 4 Sha Xi(沙晰). *Sinica Pharmaceutica Acta*(药学报). 1986, 21(6):472~474
- 5 Wang Hui(王慧), Yan Heping(严和平), Wu Zhong(吴仲). *Chemical Reagents*(化学试剂), 1986, 8(3):189~190
- 6 Luo Guoan(罗国安), Luo Zhen(罗震), Wang Yiming(王义明). *Sinica Pharmaceutica Acta*(药学报), 1986, 2(7):521~523
- 7 Anaino M M, Delima C G, Winefordner J D. *Spectrochim. Acta*, 1987, 43A(3):427~437
- 8 Bateh R P, Winefordner J D. *Anal. Lett.*, 1982, 15(B4):373~383
- 9 Jin W J, Zhu R H, Shang X H, Dong C, Zhang W Y, Liu C S. *Spectrochim. Acta*, 1997, 53A:1735~1742
- 10 Mcaleese D, Dnlao R B. *Anal. Chem.*, 1984, 56(12):2244~2249

## Determination of Theobromine, Caffeine and Theophylline by Paper Substrate Room Temperature Phosphorimetry

Wei Yanli, Dong Chuan\*, Yang Pin

(Molecular Science Institute, Chemistry and Chemical Engineering College, Shanxi University, Taiyuan 030006)

**Abstract** Theobromine, caffeine and theophylline adsorbed on filter paper can emit strong room temperature phosphorescence (RTP) signal in the presence of heavy atom perturber, the RTP signal was used for the determination of these compounds. The method is based on using quantitative fast speed paper as a substrate and KI-NaAc as heavy atom perturber. Various factors affecting the RTP signal were discussed. The method is a combination of trace analysis with microtechnique using 4  $\mu$ L sample. The linear dynamic ranges for theobromine, caffeine and theophylline are from 14.4 to 576, 5.44 to 699 and 7.21 to 360 ng per spot, respectively. The recovery of standard added to commercial products of chocolate, tea and aminophylline is in the range 92.8% ~ 106%. Compared with the results obtained by standard methods, the experimental results are satisfactory. The method is simple, rapid and sensitive and can be applied to the analysis of commercial products without interference.

**Keywords** Room temperature phosphorescence, theobromine, caffeine, theophylline

(Received 6 April 2001; accepted 3 September 2001)