

青钱柳等几种别样茶中咖啡因、 可可碱和茶碱的检测[△]

何春年^{1,2}, 彭勇^{1,2}, 肖伟^{1,2}, 肖培根^{1,2*}

- (1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;
2. 国家教育部中草药物物质基础与资源利用重点实验室, 北京 100193)

[摘要] 目的: 对青钱柳甜茶等几种别样茶中咖啡因、可可碱和茶碱进行检测, 为别样茶的合理应用奠定基础。方法: 采用超快速液相色谱法(RSLC), Acclaim PA2 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.2 μm), 乙腈-水梯度洗脱; 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 检测波长: 273 nm, 柱温: 30 ℃。结果: 除加入绿茶的商品中检测到适量的咖啡因外, 青钱柳神茶、黄芩茶、多穗柯甜茶、悬钩子属甜茶, 以及甜叶菊叶和湖北海棠叶中均未检测出上述3种生物碱。结论: 相对于绿茶中含有较高含量的咖啡因、可可碱和茶碱, 别样茶中未检出上述3种成分, 为别样茶的科学应用提供指导。

[关键词] 别样茶; 青钱柳; 咖啡因; 可可碱; 茶碱; RSLC

咖啡因、可可碱和茶碱等嘌呤类生物碱广泛存在于全世界至少63种植物的叶、种子和果实中^[1], 在咖啡、可乐果和茶叶等世界三大饮料中含量较高, 也是重要的化学成分之一, 具有兴奋中枢系统的作用, 适度使用有祛除疲劳和兴奋神经的作用^[2-3]。但是大剂量或长期使用也会对人体造成损伤^[4], 如影响睡眠, 引起局部缺血性心脏病, 降低女性受孕率, 增强大脑皮质的兴奋程度, 减少疲乏感等生理功能。

除了茶叶(茶科茶属 *Camellia*) 作为最广泛、应用历史悠久的饮品外, 在我国广大民间, 特别是少数民族居住地区, 有很多植物作为茶饮料使用, 已有悠久的历史, 并沿用至今, 我们称之为别样茶(other kinds of tea)^[5], 如黄芩茶^[6]、青钱柳神茶、多穗柯甜茶等。这些别样茶具有多种生物活性和疗效, 是广大人民强身健体和治未病的良好保健饮料^[7]。据文献报道, 从青钱柳嫩叶(青钱柳神茶的原材料) 中分离出咖啡因^[8], 因此青钱柳神茶中咖啡因的检测对指导青钱柳神茶的合理、科学使用有重要意义。另外, 其他一些别样茶, 如黄芩茶、多穗柯甜茶、悬钩子属甜茶, 以及甜叶菊叶和湖北海棠叶虽然没有文献报道是否含有咖啡因、可可碱和茶

碱等生物碱, 对这几种成分进行检测同样可以指导它们的合理使用。

目前, HPLC 方法已成为检测食品和饮料中咖啡因、可可碱和茶碱的最常用和最有效的手段^[9], 本文在参考前人采取的方法基础上, 采取检测速度更快、灵敏度更高的超快速液相色谱法(RSLC) 对上述别样茶中3种生物碱进行检测。

1 仪器与试剂

戴安 Ultimate 3000 RSLC 超快速液相色谱仪, 包括 HPG3400RS 高压泵, SRD-3400 在线脱气系统, WPS-3000TRS 自动进样器, TCC-3000RS 柱温箱, DAD-3000RS 检测器, 变色龙色谱数据处理软件。

咖啡因、可可碱和茶碱对照品购自上海融禾医药科技公司。别样茶样品分别购自相应的产区(见表1)。乙腈为色谱纯(Fisher Scientific); 纯净水(杭州娃哈哈集团); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acclaim PA2 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.2 μm); 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 洗脱程序为: 0 min:

[△][基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30530860)

*[通讯作者] 肖培根, Tel: (010)62894462, E-mail: xiaopg@public.bta.net.cn

5%乙腈,线性变化到10 min;15%乙腈;流速:0.5 mL·min⁻¹;检测波长:273 nm,进样量:10 μL,柱温:30 ℃。

表1 别样茶样品来源

序号	名称	学名	产地	时间
1	青钱柳	<i>Cyclocarya paliurus</i>	福建漳浦	2010-05
2	青钱柳	<i>Cyclocarya paliurus</i>	福建龙岩	2011-04
3	青钱柳	<i>Cyclocarya paliurus</i>	湖南绥宁	2009-04
4	青钱柳	<i>Cyclocarya paliurus</i>	福建绥宁	2009-08
5	青钱柳	<i>Cyclocarya paliurus</i>	福建绥宁	2011-03
6	青钱柳	<i>Cyclocarya paliurus</i>	江西修水	2011-04
7	黄芩茶	<i>Scutellaria baicalensis</i>	河北承德	2010-07
8	甜茶	<i>Rubus suavisissimus</i>	广西瑶山	2011-04
9	多穗柯	<i>Lithocarpus litseifolius</i>	湖南辰溪	2010-04
10	甜叶菊	<i>Stevia rebaudiana</i>	河北安国	2010-10
11	湖北海棠	<i>Malus hupehensis</i>	湖北五峰	2010-09
12	绿茶	<i>Camellia sinensis</i>	湖北大悟	2010-06
13	绿茶	<i>Camellia sinensis</i>	江西宜春	2009-05

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取上述3种对照品适量,置10 mL量瓶中,加20%甲醇溶解并定容到刻度,混匀即得。

2.3 供试品溶液制备

参照文献对绿茶中咖啡因等成分的提取方法^[10],即精密称取约1.0 g已干燥的别样茶样品和阳性对照绿茶样品,置100 mL量瓶中,加入沸水,振摇提取5 min,用柠檬酸调pH值到3.2,取上清液过0.22 μm滤膜,取续滤液,进样10 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密量取各对照品溶液适量,置10 mL量瓶中,加20%甲醇稀释成一系列不同浓度的对照品溶液,取10 μL进样分析。以峰面积值和进样对照品浓度进行线性回归,结果见表2,结果表明各对照品在线性范围内线性关系良好。

表2 3种对照品的线性关系与最低检测限和最低定量限

对照品	线性方程	r	线性范围 /ng·μL ⁻¹	LOD /ng·μL ⁻¹	LOQ /ng·μL ⁻¹
可可碱	$Y=0.838X-0.0318$	0.9999	0.5450~10.90	0.055	0.218
茶碱	$Y=0.875X-0.0286$	0.9996	0.5625~11.25	0.056	0.225
咖啡因	$Y=0.869X-0.1002$	0.9997	1.2675~25.35	0.076	0.254

2.4.2 定量限和检测限 分别将各对照品溶液多次稀释,进行分析,得到各对照品的最小检测限(LOD)和最小定量限(LOQ)。最小检测限和最小定量限定义为信噪比分别等于3(S/N=3)和10(S/N=10)时对应的进样浓度,结果见表3。

表3 别样茶样品测定结果

序号	名称	样品处理	可可碱	茶碱	咖啡因
					/μg·g ⁻¹
1	青钱柳	晒干	nd ^b	nd	nd
2	青钱柳	袋泡茶 ^a	nd	nd	50.34
3	青钱柳	嫩叶,加工成商品	nd	nd	nd
4	青钱柳	老叶,加工成商品	nd	nd	nd
5	青钱柳	老叶,加工成商品	nd	nd	nd
6	青钱柳	袋泡茶 ^a	nd	nd	544.08
7	黄芩茶	商品	nd	nd	nd
8	甜茶	晒干	nd	nd	nd
9	多穗柯	瑶民土法采制	nd	nd	nd
10	甜叶菊	晒干	nd	nd	nd
11	湖北海棠	晒干	nd	nd	nd
12	绿茶	散装茶	409 1.26	tr ^b	213 57.88
13	绿茶	散装茶	129 5.55	tr	205 09.56

注:a.青钱柳叶与绿茶等多种植物加工成的复合袋泡茶
b.nd:未检出;tr:低于检测限

2.4.3 精密度试验 精密吸取3种对照品的混合溶液10 μL,重复进样6次,测定峰面积值和保留时间,RSD值均分别小于0.81%、0.43%。结果表明仪器精密度良好。

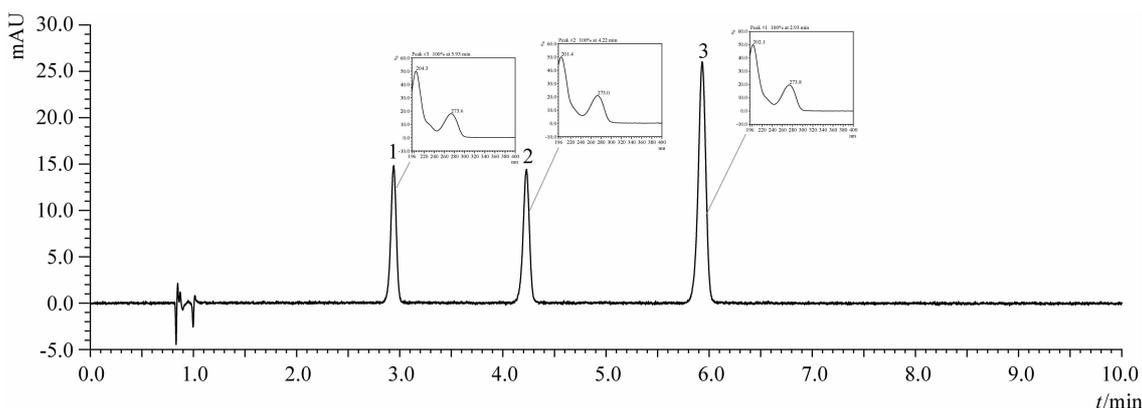
2.4.4 专属性检查 本实验采用的是DAD检测器,因此结合色谱峰的保留时间和紫外光谱图(图1)对所测样品中色谱峰进行判别。

2.5 样品测定

按上述建立好的方法对别样茶进行含量测定。结果见表2。代表性样品色谱图见图2。

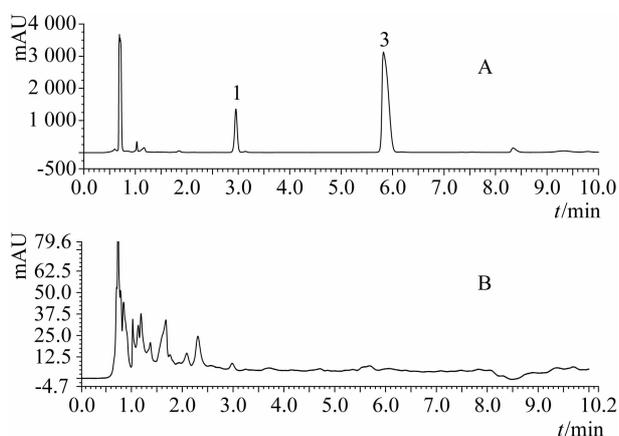
3 讨论

本文采用RSLC方法对青钱柳等6种茶饮品中咖啡因、可可碱和茶碱进行了检测,结果表明这6种植物中均未检测出上述3种物质,其中两份青钱柳袋泡茶(序号2和6)中检测出咖啡因,是由于其中添加了绿茶的缘故(产品说明书中标注含有绿茶等多种植物的复合袋泡茶)。因此,文献报道从江西修水县青钱柳嫩叶中分离得到咖啡因一文值得商榷,虽然植物样品与本文所用样品产地不完全一致。



1. 可可碱 2. 茶碱 3. 咖啡因

图1 3种对照品的色谱图与光谱图



A. 绿茶 B. 青钱柳甜茶

图2 代表性样品色谱图

本文实验结果说明咖啡因、可可碱和茶碱在青钱柳神茶、黄芩茶、多穗柯甜茶、悬钩子甜茶以及甜叶菊叶和湖北海棠中不含有或含量很低,在实际使用时可以不必考虑这3种物质的作用或副作用。另外,别样茶中的小叶苦丁茶和老鹰茶也没有检测到咖啡因的存在^[11]。

本实验采用超快速液相色谱对别样茶分析结果表明,方法的灵敏度和准确度均较好,采用等度洗脱能够在10 min内完成一份样品的快速测定,适合大批量样品的快速分析。

参考文献

[1] Andrews K W, Schweitzer A, Zhao C W, et al. The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the

US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients [J]. *Anal Bioanal Chem.* 2007, 389 (1): 231-239.

[2] Rao A, Hu H, Nobre A C. The effects of combined caffeine and glucose drinks on attention in the human brain [J]. *Nutr Neurosci*, 2005, 8(3): 141-53.

[3] McLellan T M, Kamimori G H, Voss D M, et al. Caffeine maintains vigilance and improves run times during night operations for Special Forces [J]. *Aviat Space Environ Med* 2005, 76(7): 647-54.

[4] Ramalakshmi K, Raghavan B. Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How? [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1999, 39(5): 441-456.

[5] 肖伟, 彭勇, 许利嘉, 等. 中国茶文化多样性的初步探索 [J]. *中国现代中药*, 2011, 13(10): 52-53, 59.

[6] 何春年, 彭勇, 肖伟, 等. 黄芩茶的应用历史与研究现状 [J]. *中国现代中药*, 2011, 13(6): 3-7, 19.

[7] 肖伟, 彭勇, 许利嘉, 等. 茶文化的起源及“咀饮”概念的提出 [J]. *中国现代中药*, 2011, 13(9): 45-46.

[8] 舒任庚, 徐昌瑞, 黎莲娘. 青钱柳化学成分的研究 I [J]. *中药材*, 1995, 18(7): 351-352.

[9] Shrivastava K, Wu H F. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1170(1-2): 9-14.

[10] Khokhar S, Magnusdottir S G. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(3): 565-570.

[11] 李丽, 许利嘉, 彭勇, 等. 绿茶与其他4种别样茶的比较 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(1): 5-10.

Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in the Leaves of *Cyclocarya paliurus* and Several Other Kinds of Tea

HE Chun-nian^{1,2}, PENG Yong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}, XIAO Pei-gen^{1,2}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine Peking Union Medical College, Ministry of Education, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To determine caffeine, theobromine, and theophylline contents in the leaves of *Cyclocarya paliurus* and several other kinds of tea by RSLC. **Methods:** The separation was carried out through a gradient elution using a Dionex Acclaim RSLC PA2 (150 mm × 2.1 mm, 2.2 μm) column and a mobile phase consisting of water and acetonitrile at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 273 nm. The column temperature was 30 °C. **Results:** Under the optimized conditions, all the 3 analytes were successfully separated within 10 min, and good linearity ($r > 0.9996$) was achieved. This method was also validated with respect to precision, specificity, and was successfully applied to simultaneous determination of 3 compounds in the leaves of *Cyclocarya paliurus* and several other kinds of tea including: Huang-qin tea, Duo-sui-ke tea, Xuan-gou-zi sweet tea, Tian-ye-ju tea, Hubei-hai-tang tea. The results indicate that the 3 compounds were not detected in the six species of plants. **Conclusion:** It can guide the application of science for other kinds of tea.

[Key words] *Cyclocarya paliurus*; Caffeine; Theobromine; Theophylline; RSLC

(收稿日期 2011-10-26)



中国将建立中药材储备和预警机制

第四届中国(玉林)中医药博览会举办期间,同期召开的首届中国中药材产业信息监测预警大会透露,中国正在规划建设中药材产业信息监测预警机制,以防止中药材价格的异常波动。

自2009年上半年以来,中国中药材价格出现多轮暴涨,七成以上中药材价格上涨,最高涨幅达到400%,野生中药材因资源量持续减少涨势更为凶猛。但自2011年下半年开始,中药材价格又急剧下降,部分品种甚至一度跌破成本价格。

中国商务部市场秩序司巡视员温再兴说,中药材价格“过山车”式的暴涨狂跌,对整个产业链造成很大冲击,严重影响中药产业的健康发展。“尽快加强中药材产业信息系统建设和监测预警工作十分重要和紧迫。”他说。

会议透露,目前,中国国家工信部已在搭建中药材产业信息监测预警平台。商务部也正在建设相关的公共信息服务平台,目前正在开发建设中药材重点品种流通分析系统,拟于今年上半年上线开通。

中国中药协会会长房书亭表示,针对当前中国中药材市场形势,应当加大执法力度,严厉打击市场上囤积居奇、哄抬药价的不法行为。同时加强对中药材生产的宏观规划和信息引导,建立完善中药材市场信息预警平台,通过信息引导生产,防止产销失衡。

(信息来源:搜狐网)