



УДК 543.544

Определение кофеина, теобромина и теофиллина в чае методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Андреева Е.Ю., Тан Цзянань, Дмитриенко С. Г., Золотов Ю.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 5.07.2010 г.

Аннотация

Исследовано хроматографическое поведение метилксантинов – кофеина, теобромина и теофиллина – в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Варьированием природы подвижной и неподвижной фаз и способа детектирования выбраны условия разделения и определения метилксантинов. Разработанная методика применена для определения кофеина, теобромина и теофиллина в различных образцах чая.

Ключевые слова: ВЭЖХ, определение, кофеин, теобромин, теофиллин, чай

Chromatographic behavior of methylxanthines – caffeine, theobromine and theophylline – at the conditions of reversed-phase high-performance liquid chromatography was studied. Conditions of methylxanthines separation and determination were chosen by the variation of mobile and stationary phase nature. Developed method was used for caffeine, theobromine and theophylline determination in the different tea samples.

Keywords: HPLC, determination, caffeine, theobromine, theophylline, tea

Введение

Определение биологически активных веществ, содержащихся в чае [1–4], представляет значительный интерес. Согласно данным обзора [5], с применением ВЭЖХ и капиллярного зонного электрофореза в чае чаще всего определяют аминокислоты, катехины, метилксантины, витамины и различные микроэлементы.

Известно, что стимулирующее действие чая во многом определяется содержащимися в нем метилксантинами – преимущественно кофеином и теобромином. Чаще всего в чае определяют кофеин [6, 7], в том числе в присутствии катехинов [8, 9] и других полифенольных соединений [10]. Совместному определению кофеина и теобромина посвящено значительно меньше работ [5, 11].

Цель настоящей работы – разработка экспрессной методики определения кофеина, теобромина и теофиллина в чае методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием отечественного хроматографа «Цвет-Яуза-04» без стадии пробоподготовки.

Эксперимент

Объекты исследования, реагенты и аппаратура. Объектами исследования служили кофеин (К), теofilлин (ТФ) и теобромин (ТБ). Исходные растворы метилксантинов (1×10^{-3} М) готовили растворением их точных навесок в воде. Рабочие растворы соединений готовили разбавлением исходных непосредственно перед использованием. В работе использовали фосфорную кислоту (ч.д.а.), метанол (х.ч.), ацетонитрил (HPLC-S gradient grade).

Хроматографическую часть работы выполняли на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза-04» со спектрофотометрическим ($\lambda = 280$ нм) и амперометрическим ($E = 1.3$ В) детекторами. Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографические колонки Luna 5u C18(2) (150×3.0 мм, 5 мкм) и Диасфер-110-C16 (150×4.0 мм, 6 мкм). В качестве подвижной фазы использовали водно-ацетонитрильные и водно-метанольные смеси с добавлением фосфорной кислоты. Объем пробы составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью петли дозатора. Скорость потока составляла 0.5 мл/мин.

Дистиллированную воду для приготовления элюента дополнительно очищали с помощью системы очистки воды Millipore. Элюент дегазировали в ультразвуковой ванне Branson 1510R-DTH (USA). Значения pH контролировали на иономере «Эксперт 001» (Россия).

Получение и обсчет хроматограмм. Перед получением хроматограмм колонку кондиционировали в течение 20 – 30 мин, промывая подвижной фазой. Аликвотную часть (20 мкл) растворов исследуемых соединений вводили в колонку при помощи петлевого дозатора (инжектора). Подача элюента происходила со скоростью 0.5 мл/мин. Определяли времена удерживания (t_r) разделяемых соединений.

При получении хроматограмм с удовлетворительным разрешением пиков рассчитывали исправленные времена удерживания (t_r'), коэффициенты емкости (k'), и число теоретических тарелок (N).

Методика проведения анализа чая. Брели навеску чая (0.3 г), заваривали в 100 мл воды на водяной бане при 80°C или в УЗ-ванне при 60 °C и фильтровали через складчатый бумажный фильтр. Полученный раствор разбавляли водой и анализировали методом ВЭЖХ.

Результаты и их обсуждение

Выбор неподвижной фазы. На первом этапе работы было изучено удерживание индивидуальных метилксантинов на обеих хроматографических колонках. Детектирование осуществляли с помощью спектрофотометрического детектора при 280 нм. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила и 0.1%-ного водного раствора H_3PO_4 (pH 3.5) с соотношением компонентов 10:90. Рассчитанные по полученным хроматограммам параметры приведены в табл. 1.

Анализ полученных данных показал, что определяющими взаимодействиями сорбатов с неподвижной фазой в исследуемых хроматографических системах, по-видимому, являются гидрофобные. Для соединений родственной структуры удерживание увеличивается по мере увеличения параметра гидрофобности соединений: теобромин < теofilлин < кофеин. Более всего удерживается кофеин: при использовании подвижной фазы, содержащей 10% ацетонитрила, время выхода этого соединения составляет 10 мин.

Таблица 1. Хроматографические параметры удерживания метилксантинов на колонках Luna 5u C18 и Диасфер-110-C16. Элюент: ацетонитрил – 0.1% водный раствор H_3PO_4 (10:90; pH 3.5). Скорость потока подвижной фазы – 0.5 мл/мин, $\lambda = 280$ нм

Соединение	lgP*	Колонка Luna 5u C18		Колонка Диасфер-110-C16	
		k'	N^{**}	k'	N^{**}
Теобромин	-0.7	0.38	48000	0.45	53700
Теofilлин	-0.2	0.96	58000	1.12	59400
Кофеин	-0.1	2.44	72700	2.89	68000

*Значения параметров гидрофобности LgP рассчитаны с помощью программы lgP(@ACD, Toronto, Canada); ** число теоретических тарелок на 1 м колонки

Из данных табл. 5, видно, что эффективность колонок сопоставима. В одинаковых условиях время анализа смеси на первой колонке – 15 мин, на второй – 10 мин, поэтому в дальнейших экспериментах для сокращения времени анализа использовали колонку Luna 5u C18 (2).

Выбор детектора. Изучена зависимость величины аналитического сигнала от потенциала рабочего электрода амперометрического детектора. Потенциал варьировался в диапазоне 0.8 – 1.3 В; дальнейшее увеличение потенциала не проводили в связи с возможностью окисления электрода. В этом диапазоне теобромин и кофеин сигналов не дают, сигнал теofilлина увеличивается с увеличением потенциала (рис. 1). В дальнейшей работе детектирование проводили при потенциале 1.3 В.

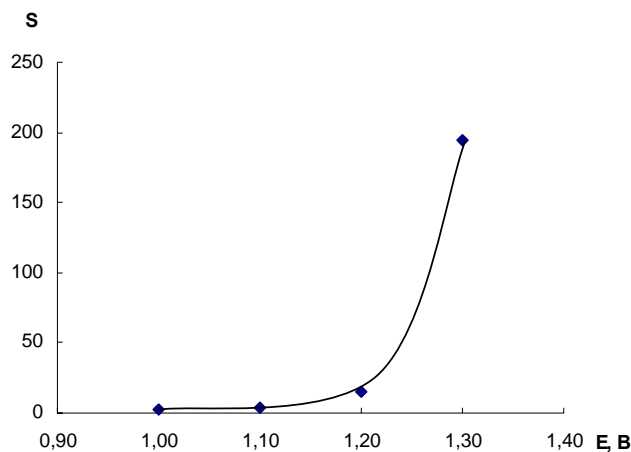


Рис. 1. Зависимости величины аналитического сигнала теofilлина (площади пика) от потенциала рабочего электрода. Элюент: ацетонитрил – 0.1% водный раствор H_3PO_4 (10:90, pH 3.5), скорость 0.5 мл/мин

Были построены градуировочные зависимости и рассчитаны метрологические характеристики определения теofilлина с использованием ультрафиолетового и амперометрического детекторов. В выбранных условиях более чувствительным оказался ультрафиолетовый детектор. Пределы обнаружения теofilлина составили 0.04 и 0.2 мкг/мл соответственно. Для дальнейших исследований был выбран ультрафиолетовый детектор, позволяющий осуществлять детектирование всех соединений.

Влияние природы и состава подвижной фазы на разделение метилксантинов.
Изучено влияние природы и состава подвижной фазы на разделение всех трех метилксантинов. В качестве элюентов использовали смеси ацетонитрила или метанола и 0.1%-ного водного раствора H_3PO_4 (pH 3.5) с соотношением компонентов 10:90. Как видно из табл. 2, при одинаковом содержании органического растворителя в подвижной фазе эффективность разделения выше при использовании подвижной фазы, содержащей ацетонитрил. Кроме того, при использовании подвижной фазы, содержащей 10 % ацетонитрила, метилксантины разделяются за 10 мин, а при использовании подвижной фазы, содержащей 10 % метанола – за 44 мин.

Таблица 2. Хроматографические параметры удерживания метилксантинов в зависимости от состава подвижной фазы. Колонка Luna 5u C18, скорость потока подвижной фазы – 0.5 мл/мин, $\lambda = 280$ нм

Соединение	Ацетонитрил – 0.1%-ный водный раствор H_3PO_4 (10:90; pH 3.5)		Метанол – 0.1%-ный водный раствор H_3PO_4 (10:90; pH 3.5)		Ацетонитрил – 0.1%-ный водный раствор H_3PO_4 (15:85; pH 3.5)	
	k'	N^*	k'	N^*	k'	N^*
Теобромин	0.38	48000	4.16	38600	0.16	24000
Теofilлин	0.96	58000	8.90	44200	0.54	28200
Кофеин	2.44	72700	19.91	41900	1.45	33700

* число теоретических тарелок на 1 м колонки.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, удерживание соединений уменьшается по мере увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе. При использовании элюента, содержащего 10% ацетонитрила, пики теобромина, теofilлина и кофеина хорошо разделяются, время анализа составляет 10 мин. При использовании элюента, содержащего 15% ацетонитрила, пики теofilлина и кофеина хорошо разделяются, время анализа составляет 5 мин, но определение теобромина затруднено, так как время выхода этого соединения совпадает с “мертвым” временем. При использовании элюента, содержащего 30% ацетонитрила, теобромин, теofilлин и кофеин не удерживаются. Таким образом, для разделения и определения теобромина, теofilлина и кофеина предпочтительно использовать подвижную фазу, содержащую 10% ацетонитрила.

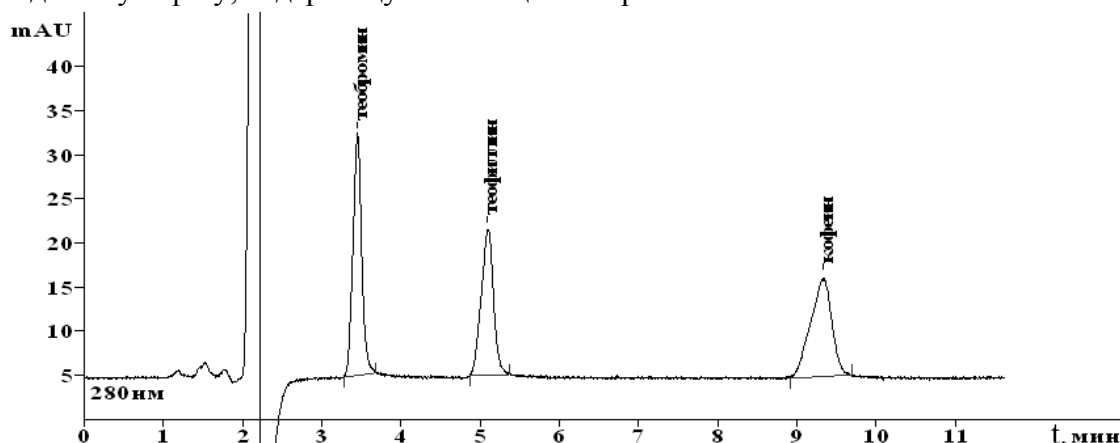


Рис. 2. Хроматограмма смеси метилксантинов, содержащей теобромин, теofilлин и кофеин. Колонка Luna 5u C18, $c=0.01$ мМ. Элюент: ацетонитрил – 0.1% водный раствор H_3PO_4 (10:90; pH 3.5), скорость потока 0.5 мл/мин. Детектор ультрафиолетовый, $\lambda = 280$ нм

В результате для разделения теобромина, теофилина и кофеина выбраны следующие условия: колонка Luna 5u C18 (2), ультрафиолетовый детектор ($\lambda = 280$ нм), элюент смесь ацетонитрил – 0.1% водный раствор H_3PO_4 (10:90, pH 3.5), скорость потока 0.5 мл/мин. Время анализа – 10 мин. Хроматограмма смеси в выбранных условиях приведена на рис. 2.

Метрологические характеристики определения метилксантинов методом ВЭЖХ. Для построения градуировочных графиков готовили серию водных растворов, содержащих от 0.2 до 20 мкг/мл каждого соединения, и в выбранных условиях проводили анализ полученных растворов методом ОФ ВЭЖХ. Уравнения градуировочных графиков и пределы обнаружения, рассчитанные по 3S-критерию, приведены в табл. 3.

Пределы обнаружения при использовании ультрафиолетового детектора составили 0.03, 0.04 и 0.07 мкг/мл для теобромина, теофиллина и кофеина соответственно. Правильность и воспроизводимость результатов определения подтверждена методом «введено-найдено». При введении 1.9, 1.9 и 2.0 мкг/мл теобромина, теофиллина и кофеина в смесь на основе дистиллированной воды найдено 1.92 ± 0.05 , 1.85 ± 0.06 и 2.03 ± 0.07 мкг/мл соответственно ($s_r = 0.01$).

Таблица 3. Характеристика методик определения теобромина, теофиллина и кофеина методом ВЭЖХ

Определяемый компонент	Уравнение градуировочного графика	Коэффициент корреляции	Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл	C_{min} , мкг/мл
Теобромин	$y=111.32c$	1	0.09–20	0.03
Теофиллин	$y=98.60c$	0.9999	0.1–20	0.04
Кофеин	$y=99.96c$	0.9997	0.2–20	0.07

Определение кофеина, теобромина и теофиллина в чае. Для оценки возможности практического применения методики было проведено определение кофеина, теобромина и теофиллина в различных образцах чая. На примере определения кофеина в черном чае «Riston» оптимизировали условия и продолжительность заваривания. Заваривание проводили нагреванием на водяной бане при $80^\circ C$ и нагреванием в УЗ-ванне при $60^\circ C$.

Как видно из рис. 3, степень извлечения кофеина практически не зависит от способа пробоподготовки. В дальнейшей работе заваривание проводили в течение 30 мин при нагревании на водяной бане при $80^\circ C$.

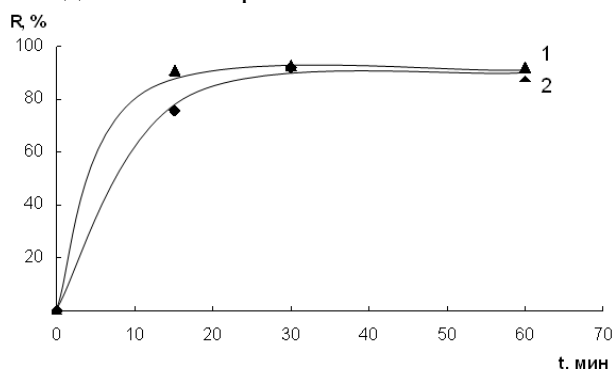


Рис. 3. Зависимость степени извлечения кофеина из чая от времени заварки 1– на водяной бане при $80^\circ C$; 2– в УЗ-ванне при $60^\circ C$. $V=100$ мл, $m=0.3$ г

Для проверки полноты извлечения метилксантинов навеску чая заваривали 3 раза по 30 мин. В табл. 4 приведена зависимость найденного содержания кофеина и теобромина в чае от номера заварки. Так как найденные по третьей заварке содержания кофеина и теобромина меньше соответствующих доверительных интервалов, для анализа других образцов чая навеска чая заваривалась 2 раза и полученные растворы объединялись. Результаты определения кофеина и теобромина в различных сортах чая представлены в табл. 5. Найденные значения согласуются с литературными данными о содержании метилксантинов в чае. Теофиллин в исследованных образцах чая не обнаружен.

Таблица 4. Зависимость найденного содержания кофеина и теобромина в чае от номера заварки. $V=100$ мл, $m=0.3$ г, $t=30$ мин

Соединение	с, г/100г		
	Первая заварка	Вторая заварка	Третья заварка
Теобромин	0.378	0.019	0.001
Кофеин	4.12	0.26	0.02

Таблица 5. Результаты определения кофеина и теобромина в различных образцах чая ($P=0.95$, $n=3$)

Образец чая	Содержание кофеина, г/100г	s_f	Содержание теобромина, г/100г	s_f
Чай черный крупнолистовой "Riston"	4.38±0.08	0.02	0.397±0.009	0.02
Чай зеленый крупнолистовой цейлонский "Хэйлис"	3.0±0.1	0.04	0.25±0.02	0.06
Чай черный "Золотые реснички"	4.01±0.08	0.02	0.227±0.006	0.03
Чай зеленый китайский "Оолонг"	2.45±0.07	0.03	0.039±0.001	0.04
Чай черный "Lipton" в пакетиках	2.7±0.1	0.04	0.16±0.01	0.06
Чай черный Greenfield "Golden Ceylon" в пакетиках	3.5±0.1	0.03	0.26±0.014	0.06
Холодный чай "Nestea"	67±2 мг/л	0.04	6.0±0.7 мг/л	0.12

Заключение

На основании проведенных исследований для разделения кофеина, теобромина и теофиллина выбраны следующие условия: колонка Luna 5u C18 (2), ультрафиолетовый детектор ($\lambda = 280$ нм), элюент смесь ацетонитрил – 0.1% водный раствор H_3PO_4 (10:90, pH 3.5), скорость потока 0.5 мл/мин. Время анализа – 10 мин. Пределы обнаружения метилксантинов в этих условиях составили 0.03 – 0.07 мкг/мл. В отличие от описанных ранее методик [12, 13] разработанная методика позволяет определять кофеин и теобромин в различных образцах чая без предварительной пробоподготовки.

Список литературы

1. Fernandez P.L., Martin M.J., Gonzalez A.G., Pablos F. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas // *Analyst*. 2000. V. 125. P. 421 – 425.
2. Fernandez P.L., Lopez A., Pablos F., Gonzalez A.G., Martin M. J. The use of catechins and purine alkaloids as descriptors for the differentiation of tea beverages // *Microchim. Acta*. 2003. V. 142. P.79– 84.
3. Шафигулин Р.В., Буланова А.В., Ро К.Х. Хроматографический анализ флавоноидов, содержащихся в чае // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2006. Т. 6. №5. С. 844 – 850.
4. Шафигулин Р.В., Буланова А.В., Ро К.Х. Качественное и количественное содержание катехинов в различных сортах чая // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2007. Т. 7. №21. С. 349 – 352.
5. Horie H., Kohata K. Analysis of tea by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 881. P. 425 – 438.
6. Horie H., Nesumi A., Ujihara T., Kohata K. Rapid determination of caffeine in tea leaves // *J. Chromatogr. A*. 2001. V.942. P. 271 – 273.
7. Yamauchi Y., Nakamura A., Kohno I., Hatanaka K., Kitai M., Tanimoto T. Quasi-flow injection analysis for rapid determination of caffeine in tea using the sample pre-treatment method with a cartridge column filled with polyvinylpyrrolidone // *J. Chromatogr. A*. 2008. V.1177. P. 190 – 194.
8. Weiss D., Anderton C.R. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2003. V.1011. P. 173 – 180.
9. Карцова Л.Ф., Алексева А.В. Использование селективного комплексообразования катехинов с ионами Fe^{3+} при определении кофеина в чае методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2009. Т. 64. № 9. С. 954 – 958.
10. Aucamp J.P., Hara Y., Apostolides Z. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2000. V.876. P. 235 – 242.
11. Chen Q., Mou S., Hou X., Ni Z. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in foods and pharmaceutical by using ion chromatography // *Anal. chim. acta*. 1998. V.371. P. 287 – 296.
12. Cardozo Jr. E. L., Ferrarese-Filho O., Filho L. C., Ferrarese M.L.L., Donaduzzi C.M., Sturion J.A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil // *J. Food Composition and Analysis*. 2007. V. 20. P. 553 – 558.
13. Nakakukia H., Horieb H., Yamauchib Yu., Kohata K. Rapid analysis of methylated xanthines in teas by an improved high-performance liquid chromatographic method using a polyvinylpyrrolidone pre-column // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 848. P. 523 – 527.

Андреева Елена Юрьевна – аспирантка 2 г/о кафедры аналитической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, тел. (495) 939-46-08

Andreeva Elena Yu. – post-graduate student, 2nd year of studies, division of analytical chemistry of Chemistry department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: andreevaeyu@yandex.ru

Тан Цзянань – студентка 4 курса химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Дмитриенко Станислава Григорьевна – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Золотов Юрий Александрович – академик РАН, зав. кафедрой аналитической химии химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Tang Jianan – student, 4^d course, Chemistry department of M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Dmitrienko Stanislava G. – D. Sc., professor of the division of analytical chemistry of Chemistry department of M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Zolotov Yuri A. – academic, head of the division of analytical chemistry of Chemistry department of M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow