

咖啡因中荧光物质的分析及脱除

岳金彩^{1*}, 李晓阳¹, 周波², 郑世清¹

(1. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042;

2. 青岛银科恒远化工过程信息技术有限公司, 山东 青岛 266042)

摘要:使用高压液相色谱和荧光检测器对咖啡因样品进行分离和荧光检测, 经过优化确定采用 220 nm 为激发波长、400 nm 为发射波长进行检测, 建立了相对于咖啡因的荧光物质含量的定量方法, 并对不同咖啡因样品进行分析。研究发现, 粗品咖啡因中荧光物质主要有 6 种, 合格成品咖啡因中荧光物质剩余 4 种, 确定保留时间为 17.29 min 的物质(简称物质 3)为导致产品荧光指标不合格的主要物质。采用工业上常用的高锰酸钾氧化、连二亚硫酸钠还原、活性炭吸附和重结晶咖啡因精制方法对回收的一浓品咖啡因进行了处理。结果表明, 重结晶能够有效脱除物质 3, 脱除效率为 89.5%, 其他方法都不能有效去除物质 3 且呈现出不同的影响趋势。

关键词:咖啡因; 荧光; 重结晶; 精制

中图分类号: TQ460.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2022)12-0269-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.12.049

Analysis and removal of fluorescent substances in caffeine

YUE Jin-cai^{1*}, LI Xiao-yang¹, ZHOU Bo², ZHENG Shi-qing¹

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;

2. Qingdao Yinke Hengyuan Chemical Process Information Technology Co., Ltd., Qingdao 266042, China)

Abstract: High pressure liquid chromatography and fluorescence detector are employed to separate and detect the fluorescence substances present in synthetic caffeine samples. After optimization, the excitation wavelength and emission wavelength are determined to be 220 nm and 400 nm, respectively. A quantitative method for analyzing the content of fluorescent substances relative to caffeine is established, and used to analyze different caffeine samples. It is found through research that there are 6 kinds of fluorescent substances in crude caffeine and 4 kinds in qualified finished caffeine. It is determined that the substance with retention time of 17.29 min (hereafter referred as "substance 3") is the main factor leading to the failure of fluorescent test. Several common industrial processing methods such as KMnO_4 oxidation, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduction, activated carbon adsorption and recrystallization are respectively used to treat with a recovered caffeine sample, and their effects on content of substance 3 are given. It is verified that recrystallization can effectively remove substance 3 with a removal rate of 89.5%. Other methods cannot effectively remove substance 3 and show different impact trends.

Key words: caffeine; fluorescence; recrystallization; refine

咖啡因化学名称为 1,3,7-三甲基黄嘌呤, 是具有重要药用价值的白色粉末状生物碱, 主要用于医药和食品行业^[1]。作为药物和饮食品添加剂, 咖啡因的用量很大, 因被直接摄入人体, 市场上对咖啡因的纯度、色泽要求很高, 直接影响其市场前景。

根据来源咖啡因主要分天然咖啡因和工业咖啡因 2 种。工业咖啡因制备路线有多条, 以氯乙酸或氰乙酸为原料, 经多步反应制咖啡因是主流方法^[2]。由于反应步骤多、原料纯度低等原因造成工业咖啡因粗品杂质含量多、色泽深, 需要经过精制处理才能达到要求, 其中色度和荧光是影响咖啡因产品质量的 2 个重要指标。

咖啡因精制工艺有升华法、萃取脱色法、氧化脱色法和还原脱色法等^[3]。升华法利用了咖啡因易升华的性质, 主要用于从茶叶中提取天然咖啡因的精制, 此法有效但不适用于工业上大批量咖啡因精制, 应用范围有限。萃取脱色法用氯仿、二氯甲烷等有机溶剂进行萃取、脱溶剂处理, 达到精制咖啡因的目的, 此法相对于升华法效率高、优势明显, 但加大了废水处理的难度, 需进一步改进。

目前国内工业咖啡因精制普遍采用氧化脱色法^[4-5], 氧化剂为高锰酸钾, 脱色剂为活性炭。处理后的咖啡因溶液趁热过滤, 滤去活性炭和二氧化锰, 滤液冷却结晶得到咖啡因产品, 此法能达到同时脱

收稿日期: 2022-01-15; 修回日期: 2022-10-06

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2020MB145)

作者简介: 岳金彩(1969-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为化学系统工程, 通讯联系人, yjc@putech.com.cn。

除颜色和荧光的目的。结晶后的产品母液还含有 1%~2% 的咖啡因,经过蒸发浓缩结晶得到质量较差的一浓品再去回收精制。

美国专利^[6]提出采用连二亚硫酸钠或锌粉的还原脱色法,以达到与氧化法同样的脱色效果。国内吉林舒兰公司^[7]公开了一种氧化与还原相结合的精制工艺。

以上这些精制方法都不能从根本上达到脱除荧光的目的。荧光是困扰国内外工业法合成咖啡因的一个普遍问题,一直无法彻底解决。国内陈启槐等^[8]用氯仿对荧光物质提取并进行薄层层析,在荧光灯下观察到 9 种荧光物质,并认为高锰酸钾氧化只能降低荧光强度不能减少荧光种类。张伟等^[9]使用氯仿和氨水处理合成咖啡因,用荧光分光光度法^[10]鉴别出合成咖啡因中特有的一种荧光物质。一般认为荧光物质主要来源为反应物中的杂质及反应过程产生的副产物^[11-12],但究竟有多少种类、具有何种理化性质至今都没有明确的研究结果。荧光物质种类多、含量少,受技术手段限制,这方面的研究一直没有进一步的成果。

本文中采用高效液相色谱-荧光检测技术^[13]对咖啡因样品中的荧光物质进行检测,实现了荧光物质的分离和定量,找到了导致产品不合格的主要荧光物质,并采用常见的咖啡因精制方法对一浓品中主要荧光物质进行脱除效果研究。

1 实验部分

1.1 样品和试剂

咖啡因粗品、合格品、不合格品、一浓品和活性炭由某制药公司提供。实验中的清洗、配料过程使用的高纯水取自超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。试剂高锰酸钾、连二亚硫酸钠、硫酸和氢氧化钠为分析纯。

1.2 仪器和设备

高效液相色谱(美国赛默飞 U3000,配置紫外检测器 RS-VWD 和荧光检测器 RS-FLD 检测器);色谱柱:赛默飞 Hypersil GOLD C18, 250 mm×4.6 mm, 5 μm;电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司);pH 计(PHS-25)。

1.3 咖啡因分析样品配制

对于固体样品,先将样品烘干研细,然后分别取样 0.05 g, 100 mL 容量瓶定容,使配制后的分析样品咖啡因质量分数在 500×10^{-6} 左右。实验处理后的咖啡因溶液样品也均定容到 500×10^{-6} 左右。

1.4 实验方法

根据影响咖啡因精制效果的主要因素^[4]及相关专利^[6-7],考察了高锰酸钾配比、连二亚硫酸钠配比、活性炭配比及重结晶等因素对导致咖啡因不合格的荧光物质 3 的脱除效果。实验所用样品为烘干后的一浓品。

1.4.1 高锰酸钾氧化

准确称取 13 g 一浓品于烧杯中,加 60 g 水,加热到 80℃ 充分溶解,使用稀硫酸调溶液 pH 到 3,转移至具塞锥形瓶中,分别加入质量为一浓品 1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的高锰酸钾,摇匀,置于水浴恒温振荡器上振荡,温度 80℃,震荡速率 150 r/min,反应时间 60 min。反应完成后准确取样 0.281 g,于 100 mL 容量瓶中定容,取样分析。

1.4.2 连二亚硫酸钠还原

准确称取 13 g 一浓品于烧杯中,加 60 g 水,加热到 80℃ 充分溶解,使用氢氧化钠溶液调 pH 到 10,转移至具塞锥形瓶中,加入质量为一浓品 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的连二亚硫酸钠,摇匀,其他条件如 1.4.1。反应完成后取样分析。

1.4.3 活性炭吸附

准确称取 13 g 一浓品于烧杯中,加 60 g 水,加热到 80℃ 充分溶解,转移至具塞锥形瓶中,加入质量为一浓品 1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 的活性炭,摇匀,其他条件如 1.4.1。吸附完成后取样分析。

1.4.4 重结晶

准确称取 13 g 一浓品于烧杯中,加 60 g 水,加热到 80℃ 充分溶解,室温下自然降温结晶 1 h,结晶后真空抽滤得到固体咖啡因,取少量水冲洗固体表面。固体咖啡因烘干后取样分析。

2 结果与讨论

2.1 荧光检测波长条件的确定

咖啡因粗品颜色较深,首先用高效液相色谱紫外吸收检测器进行分析。经优化,色谱条件如下:柱温 30℃;流量 1.0 mL/min;流动相 A 为质量分数 0.5% 乙酸水溶液, B 为甲醇;紫外检测波长 270 nm;进样量 20 μL。紫外吸收谱图如图 1 所示。图 1 中除了咖啡因外,并没有其他明显的杂质峰,面积归一化法含量为 99.56%,外标法得到咖啡因实际质量分数为 95.38%。根据生产工艺,粗品中的杂质应该主要是无机盐类物质及少量有机杂质,紫外吸收谱图并不能给出影响产品色号和荧光杂质的有用信息。

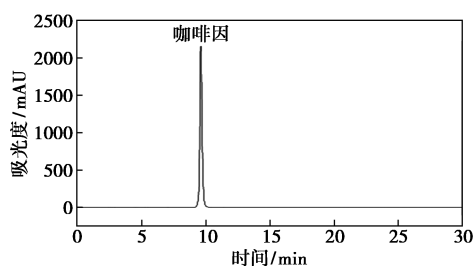


图1 咖啡因粗品的紫外吸收谱图

根据文献[8],粗咖中荧光物质种类较多,如果不进行预先分离,荧光光谱就会互相重叠,不易分辨。采用高压液相色谱对这些物质进行分离,固定激发波长得到发射光谱^[10]。经过条件优化,激发波长固定为 $E_x = 250 \text{ nm}$,扫描发射光谱波长范围为 $E_m = 300 \sim 650 \text{ nm}$,得到图2所示的粗品荧光发射光谱,图中横坐标为保留时间。一般认为咖啡因本身荧光较弱或不发射荧光^[8],对比图1的咖啡因保留时间和图2谱图,可以看出咖啡因其实有较明显的荧光发射,只是波长较短,主要在紫外区域。从图2还可分辨出粗咖中至少10种荧光物质。

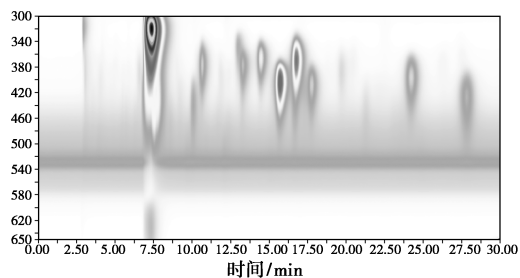


图2 咖啡因粗品的荧光发射光谱

2.2 荧光物质相对含量的确定

根据图2,固定激发波长 $E_x = 250 \text{ nm}$,优化发射波长为 $E_m = 400 \text{ nm}$,分别对咖啡因粗品、合格品、不合格品和一浓品进行荧光分析得到如图3~图6的谱图。

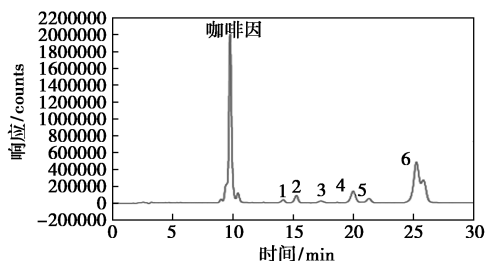


图3 咖啡因粗品荧光谱图

图3中主要峰的停留时间为:咖啡因9.78 min;物质1 14.18 min;物质2 15.27 min;物质3 17.29 min;物质4 14.99 min;物质5 21.29 min;物质6 25.80 min。

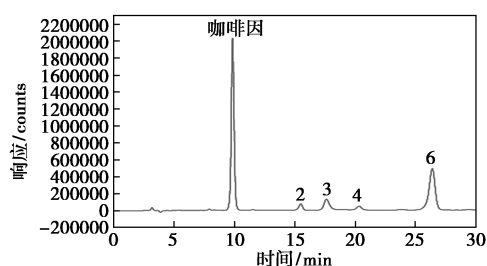


图4 咖啡因合格品荧光谱图

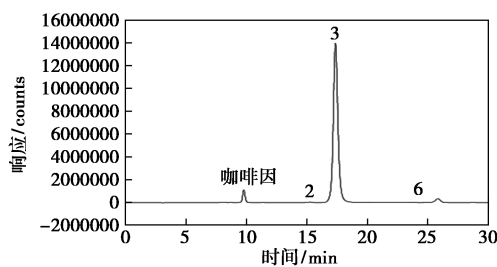


图5 咖啡因不合格品荧光谱图

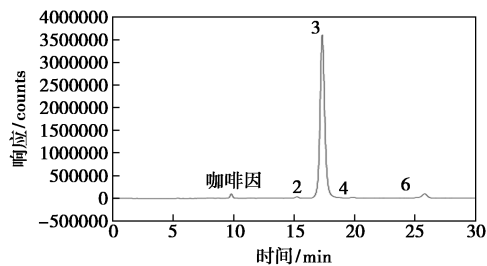


图6 一浓品样品的荧光谱图

结合图2、图3可看出粗咖中荧光物质种类较多,图3中标出了6种主要物质。粗咖精制得到的合格品(见图4)主要荧光物质减少到4种。图5为不合格品荧光谱图,可以看出不合格品中物质3的峰面积相对于咖啡因异常偏高,可以确认物质3含量高是导致产品荧光不合格的原因所在。由图6可知,产品母液浓缩回收的一浓品中物质3含量也异常高。

根据以上荧光谱图,无法给出各荧光物质的准确含量,本文中按杂质峰面积/咖啡因峰面积给出各杂质的相对含量,见表1。

表1 主要荧光物质的相对含量

| 峰名称 | 合格品 | 不合格品 | 一浓品 |
|-----|-------|-------|--------|
| 咖啡因 | 1 | 1 | 1 |
| 物质2 | 0.050 | 0.067 | 0.010 |
| 物质3 | 0.224 | 7.959 | 87.743 |
| 物质4 | 0.018 | 0.000 | 0.005 |
| 物质6 | 0.532 | 0.658 | 2.143 |

从表 1 可看出,不合格、一浓品中物质 3 含量分别是合格品的 35.5 倍和 391.7 倍,物质 3 应该是影响咖啡因不合格品荧光指标的主要物质。

2.3 荧光物质 3 的脱除

对一浓品分别进行高锰酸钾氧化、连二亚硫酸钠还原、活性炭吸附和重结晶实验,考察这 4 种处理方法对物质 3 的脱除效果。取样分析处理后的样品,按荧光物质 3 峰面积/咖啡因峰面积给出相对定量值。高锰酸钾氧化结果见图 7,连二亚硫酸钠还原结果见图 8,活性炭吸附结果见图 9。

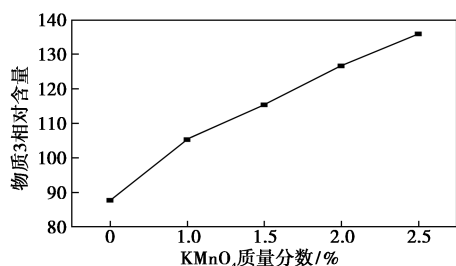


图 7 高锰酸钾加入量对荧光物质 3 的影响

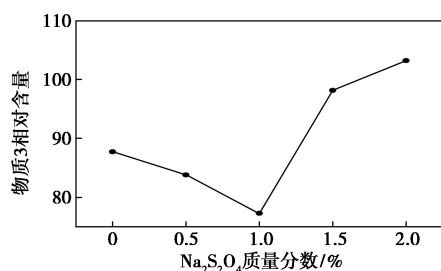


图 8 连二亚硫酸钠加入量对荧光物质 3 的影响

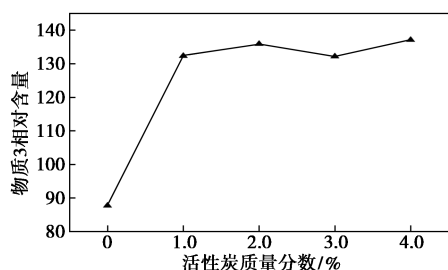


图 9 活性炭加入量对荧光物质 3 的影响

重结晶后咖啡因中的荧光物质 3 相对定量值为 9.221,重结晶对荧光物质 3 脱除效果明显,脱除率达 89.5%。说明物质 3 在水中溶解度较大,结晶时大部分留在了水相(母液)。

由图 7 可以看出,随着高锰酸钾加入量的增加,物质 3 含量呈现直线上升的趋势,说明在此过程中,物质 3 不但不能被氧化破坏,反而又有新的生成。图 8 中物质 3 的含量随着连二亚硫酸钠加入量增加,先降低后增加,存在一个最佳加入量,但效果也

不理想。图 9 中活性炭不能吸附脱除物质 3,反而使其含量有了比较大的增加,原因可能是活性炭对物质 3 的生成有催化作用。

3 结论

(1)建立了合成咖啡因的高效液相色谱荧光物质分析方法,给出了相对于咖啡因的荧光物质定量方法。

(2)咖啡因粗品中荧光物质至少有 10 种,合格产品中的荧光物质种类有所减少。导致咖啡因产品荧光不合格的原因是保留时间为 17.29 min 的物质 3 异常增加。

(3)高锰酸钾氧化、活性炭吸附对物质 3 的生成有促进作用,连二亚硫酸钠还原效果也不佳。重结晶脱除物质 3 效果明显,脱除率达 89.5%。

(4)关于荧光物质 3 的分子结构、来源、物化性质等需要进行更加深入的研究。

参考文献

- [1] 陈尧,周宏灏.咖啡因体内代谢及其应用的研究进展[J].生理科学进展,2010,41(4):256-260.
- [2] 韩佳宾,陈静,王静康,等.超临界二氧化碳萃取咖啡因的研究进展[J].现代化工,2003,23(3):25-27.
- [3] 孙培宾,刘平飞,尹进华.咖啡因的精制方法研究进展[J].精细石油化工进展,2011,12(4):53-56.
- [4] 马树祺,王斌.正交法对咖啡因提取与纯化工艺的优化研究[J].齐齐哈尔轻工学院学报,1994,10(3):85-88.
- [5] 任小雨,张琴芳,王天利.从茶叶中提取咖啡因实验方法的改进[J].实验室科学,2020,23(2):9-11.
- [6] Pierre H, Blaise P. Purification of caffeine: US4531003[P]. 1985-07-23.
- [7] 郭跃民,尹换新,李立冬.一种咖啡因的制备方法: CN102344451B[P]. 2013-07-24.
- [8] 陈启槐,赵淑范.合成咖啡因的荧光问题[J].药学学报,1966,13(3):235-235.
- [9] 张伟,唐明珠,邱安莹,等.咖啡因提取物及化合物的鉴定[J].中国药房,2002,13(12):751-754.
- [10] 许金钧,王遵本.荧光分析法[M].北京:科学出版社,2006.
- [11] 胡彦汝,魏鹏飞,唐甜,等.茶碱钠盐的甲基化反应研究[J].精细化工,2017,34(11):1316-1320.
- [12] 程乙真,江虹.荧光分析法测定药物及尿样中的氨曲南[J].现代化工,2019,39(4):53-56.
- [13] Núñez Nerea, Martínez Clara, Saurina Javier, et al. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection fingerprints as chemical descriptors to authenticate the origin, variety and roasting degree of coffee by multivariate chemometric methods [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(1):493-495. ■