

茶葉中咖啡因快速簡便測定法之研究

蔡 右 任 阮 逸 明

臺灣省茶業改良場 製茶課

摘 要

蔡右任、阮逸明。1987。茶葉中咖啡因快速簡便測定法之研究。臺灣茶業研究彙報 6:1~7。

本試驗利用PVPP處理去除茶湯中的多元酚類，其濾清液以波長 276nm 之紫外光測定 OD 值。本研究結果發現茶湯中咖啡因含量與 OD 值呈現良好的直線相關 ($r = 0.999$, $n=4$)，其含量可由下列直線方程式 $X = 21.8629 Y - 0.6895$ (X = 咖啡因含量， Y = OD 276 值) 求出。利用本方法測定茶湯中咖啡因含量之回收率為 101.25% 其變異係數 (C.V.) 為 1.27 %。

本方法分析值較HPLC分析值略高，但仍成顯著的直線相關 ($r = 0.953$, $n = 12$)，將本方法之分析值利用下列公式：

$Y = 0.7283 X - 0.3971$ (X = 本方法分析值， Y = HPLC分析值) 可換算成HPLC分析值。

關鍵字：咖啡因、PVPP、紫外線吸收光譜法

一、前 言

茶葉中咖啡因之定量法，一般可採用Bailey-Andrew method利用kjeldahl定氮法⁽²⁾，或紫外線吸收光譜法(Ultraviolet Spectro-photometric Method)⁽³⁾或氣體色層分析法(Gas Chromatographic Method)，或高效能液體色層分析法(Gas Performance Liquid Chromatographic Method)⁽⁴⁾來作分析方法，前三者皆須經過繁複之前處理，分離出咖啡因，才能進行測定，而高效能液體色層分析法，又因昂貴的設備成爲限制分析工作的子，本試驗之目的在於探討簡易快速分離茶湯中咖啡因，並利用紫外線吸收光譜測定茶葉中咖啡因的方法，以釐定一定量茶葉中咖啡因含量的方法。

二、材料與方法

一、取咖啡因標準液 (0.1mg/ml) 5ml，以去離子水定量至 25ml，再加入 0.8 克 PVPP (polyvinyl Pyrrolidone) 經常攪拌混合三十五分鐘，以 Whatman No. 41 濾紙過濾，定量至 100ml，濾液於寬 10 mm 石英測光管中以光譜測定儀掃描，測定波長 220 nm 至 440 nm 間之吸收值，以相同方法測定茶湯稀釋液之吸收值。

二、取咖啡因標準液 2.5, 5, 10, 15, 20ml，以上述方法處理後，分別以去離子水及 PVPP 處理過之去離子水作空白對照，以波長 276 nm 測定，作標準直線圖。

三、稀釋茶湯中加入不同量純咖啡因，經 PVPP 處理測定總咖啡因含量，計算回收率 (Recovery)，作兩重覆。

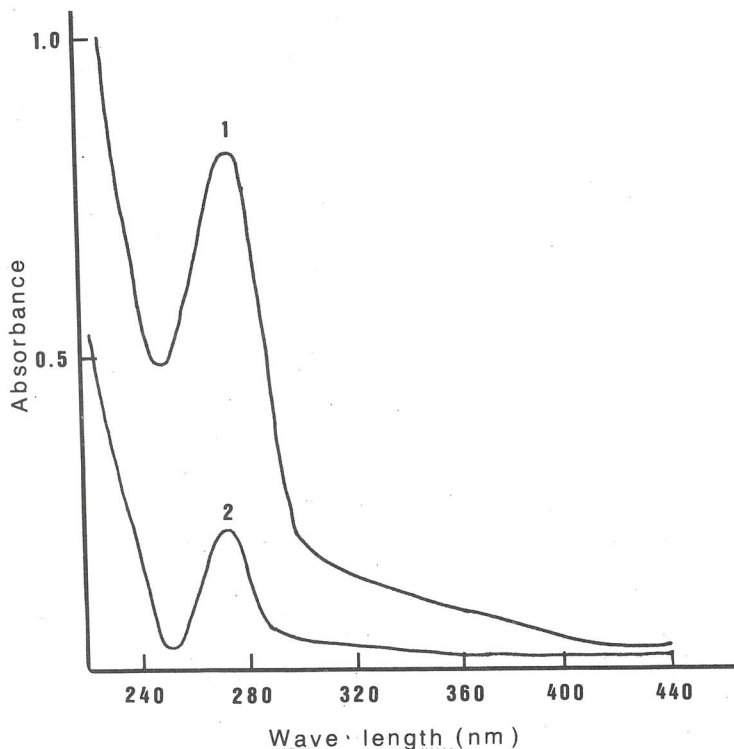
四、以稀釋茶湯及標準液經 PVPP 處理，作十重覆測定，求實驗變異係數。

五、以含咖啡因、Theobromine、Theophylline 之混合液及經 PVPP 處理之咖啡因標準液與稀釋茶湯，在壓力 2000 Psi，流速 2ml/min，移動相溶劑 $H_2O:CH_3CN:CH_3COOH=92:7:1(V/V/V)$ ，管柱 μ -Bondapak C18，長 30 公分，進行 HPLC 分析測定不同滯留時間 (Retention Time) 之波長 276 nm 吸收圖。

六、PVPP 處理過之茶湯，分別以吸收光譜測定儀及 HPLC 作定量分析，十二重覆，求其關係式。

三、結 果

一、純咖啡因及茶湯經過 PVPP 處理後，在波長 276 nm 具有相同之單一吸收高峯，如圖一所示，因此以後實驗中測定波長選定為 276 nm。



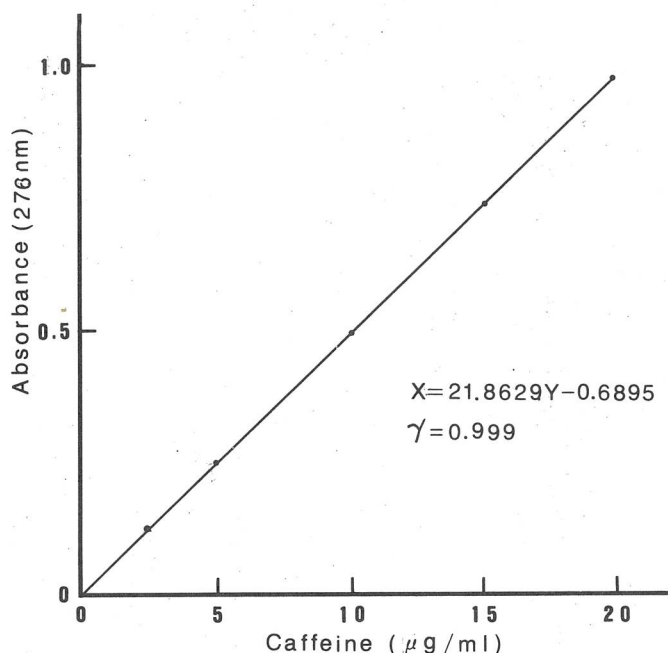
圖一、PVPP 處理後之純咖啡因溶液及茶湯之光譜吸收圖

1. 茶湯，2. 純咖啡因溶液

Fig. 1. Absorption spectra of pure caffeine solution and tea extract after PVPP treatment.

1: tea leaf extract, 2: pure caffeine solution

二、定量標準溶液直線圖，如圖二所示，得計算公式 $X = 21.8629Y - 0.6895$ (X ：咖啡因量 $\mu\text{g/ml}$ ， Y ：測得之吸收值)，相關係數 $r = 0.999$ ，須注意空白對照應以 PVPP 處理過之去離子水為空白，如以去離子水作空白，測得值作圖直線不經過原點。



圖二. PVPP 處理後純咖啡因之計算曲線圖

Fig. 2. The calibration curve of pure caffeine solution after PVPP treatment.

三、茶湯中添加不同量之咖啡因，測試不同濃度之平均回收率為 101.25%，如表一所示：

表一 咖啡因加入茶湯中之回收率

Table 1. The recovery of caffeine added in tea extract.

Sample	Caffeine content ($\mu\text{g/ml}$)			
	Added	Total	Found	(%)
1	0	11.93		
	2.5	14.43	14.51	100.6
	5.0	16.93	17.09	100.9
	7.5	19.43	19.58	100.8
2	0	3.55		
	2.5	6.05	6.11	101.0
	5.0	8.55	8.76	102.4
	7.5	11.05	11.25	101.8

四、測定方法之變異係數 (Coefficient of Variance)，如表二所示，純咖啡因為 1.36%，茶湯為 1.19%，平均為 1.27%。

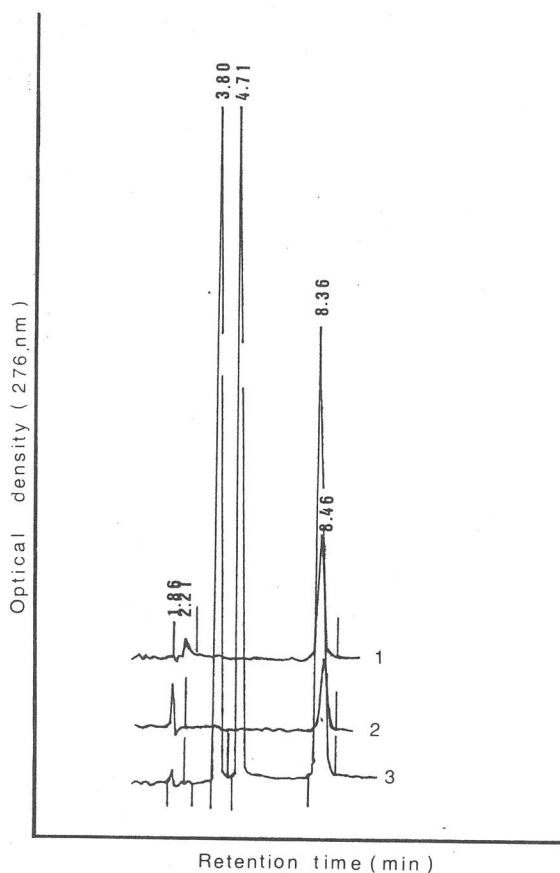
表二 PVPP—吸收光譜法測定咖啡因含量之變異係數

Table 2. The coefficient of variance of caffeine contents determined by PVPP-spectrophotometric method.

(based on 10 determinations)

Sample	Means ($\mu\text{g/ml}$)	C.V.(%)
Caffeine	5.12 ± 0.07	1.36
Tea leaf extract	6.85 ± 0.08	1.19

五純咖啡因及茶湯經 PVPP 處理後，HPLC 分析如圖三所示，都只在滯留時間 8.46 分時具有吸收高峯，而 Theobromine 及 Theophylline 之滯留時間分別為 3.80，4.70 分，由此可知以 PVPP 處理稀釋茶湯後，可直接作為咖啡因含量測定用，Theobromine 及 Theophylline 在茶湯中含量極少⁽¹⁾，經稀釋後以 HPLC 方法無法檢測出其含量。



圖三 植物鹼之高效能液相層析圖

1. 茶湯，2. 純咖啡因
3. 咖啡因、可可豆素及茶葉素混合液

Fig. 3. HPLC chromatograms of alkaloids.

- 1: tea extract, 2: pure caffeine, 3: mixture of caffeine, theobromine and theophylline

六相同樣品分別以吸收光譜儀及HPLC定量，吸收光譜儀測得值較HPLC測得值平均高出 27.25 %，兩者關係式為 $Y = 0.72823x - 0.3971$ (X：光譜儀測得計算含量值，Y：HPLC 測得含量值)，相關係數為 $r = 0.953$ ，如圖表三所示。

表三 比較PVPP—吸收光譜法及PVPP—高效能液相層析法測定咖啡因含量之關係

Table 3. Comparison of caffeine contents determined by PVPP -spectrophotometric method and PVPP-HPLC method.

Sample No	Caffeine content ($\mu\text{g/ml}$)	
	OD ₂₇₆	HPLC
1	6.81	4.73
2	6.66	4.83
3	6.68	4.75
4	6.77	4.88
5	7.09	5.13
6	8.62	6.10
7	7.60	5.44
8	6.88	4.99
9	7.90	5.93
10	7.07	5.27
11	7.57	5.60
12	7.75	5.96

$$Y = 0.72823X - 0.3971 \quad r = 0.953$$

Y : contents by HPLC

X : contents by OD₂₇₆

四、討 論

以 PVPP 處理吸收茶湯中之多元酚類後，直接以波長 276nm 測定咖啡因之吸收值(Y)，代入 $X = 21.8629Y - 0.6895$ ，求出咖啡因含量(X)，實驗變異係數在 1.27 以下，回收率在 101.25 %，又較 HPLC 測定值為高的原因，可能茶湯中胺基酸所造成的，在以 Fluorescamine 之胺基酸呈色定量反應中⁽⁵⁾，可發現 PVPP 處理過後之茶湯，確有胺基酸存在干擾因子，因此上式計算值(X)須再代入 $Y = 0.72823X - 0.3971$ ，求出咖啡因實際含量(Y)。

又此方法之前處理與胺基酸呈色反應之前處理相同⁽⁵⁾，故茶湯經 PVPP 處理後，可同時進行咖啡因及胺基酸定量，為一簡便、快速之測定方法。

誌 謝

本試驗 HPLC 分析承蒙張如華、古碧玉小姐協助，在此一併致謝。

參考文獻

1. 張如華 • 1983 • 利用高效能液相層析儀分析紅茶製造過程中植物鹼之含量分析 • 台灣茶業改良場 68 年年報 P.59 ~ 60 。
2. A.O.A.C. 1984. Modified Bailey-Andrew method. 15.046.
3. A.O.A.C. 1984. Ultraviolet spectrophotometric and gas chromatographic methods. 15.047-15.052.
4. Herath, N.L., and Roberts, G.R. 1981. The rapid measurement of caffeine content of beverages using HPLC. Proc. of SLAAS. p60.
5. Watanabe, I., and Ishigaki, K. 1980. A rapid method of colormetric determination of total amino acid contents using fluorescamine. 茶葉技術研究 59:23-26.
6. Weerasinghe, P.B. 1982. A convenient, rapid estimation of caffeine in tea. Tea Q. 51(4): 175-179.

A Convenient and Rapid Method for Determination of Caffeine in Tea Leaf

You-Zenn Tsai¹ I-Ming Juan²

The polyphenolic substances were precipitated from tea extracts by PVPP (Polyvinyl Polypyrrolidone) treatment, then filtrated with What-man No. 41 filter paper. The OD₂₇₆ values of the filtrate were read by a spectrophotometer.

The values of OD₂₇₆ have a good linear function of concentration of caffeine. The linear regression equation: $X = 21.8629Y - 0.6895$ (X: caffeine concentration, Y: OD₂₇₆ values) $r = 0.999$. The recovery of caffeine determined by this method is 101.25% and the coefficient of variation (C.V.) of the determination is 1.27%.

The caffeine content determined with new method had a good lilarity to that determined by HPLC. The linear regression equation is $Y = 0.7283X - 9.3971$ (Y: HPLC values, X: new method values) $r = 0.953$.

Key word: Caffeine, PVPP, UV.

-
1. Assistant Chemist, Taiwan Tea Experiment Station, Yangmi, Taoyuan Hsien, Taiwan, 324, R.O.C.
 2. Agrochemist, Taiwan Tea Experiment Station, Yangemi, Taoyuan Hsien, Taiwan, 324, R.O.C.