

液相色谱-稳定同位素质谱联用鉴定 咖啡饮料中咖啡因天然来源

丁博^{*1,2,3} 王志元^{1,2} 陈文锐^{1,2} 谢建军^{1,2} 余志刚³

¹(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

²(广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广州 510623) ³(中山大学化学学院, 广州 510275)

摘要 建立了液相色谱-稳定同位素质谱联用 (LC-IRMS) 检测咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 分析方法, 用于鉴定咖啡饮料中咖啡因天然来源的真实性。样品中咖啡因经液相色谱分离纯化, 色谱条件为: XBridge Shield RP C_{18} 色谱柱 (50 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm), 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为超纯水, 流速 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; 再通过 LC-IsoLink 实现目标物全部氧化为 CO_2 气体, 最终以气态形式进入稳定同位素质谱仪, 直接检测样品中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 。检测 44 个不同产地来源的咖啡豆样品中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$, 其范围是 -25.3‰ ~ -30.9‰, $\delta^{13}\text{C}$ 平均值 $\delta_{\text{average}} = -27.9\text{‰}$, 标准偏差 $s = 1.3\text{‰}$, 以 3 倍 $\delta^{13}\text{C}$ 标准偏差 s 为判断依据, 检测 16 个咖啡饮料样品的咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$, 结果表明, 1 个咖啡饮料样品中咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 在 3 倍标准差线附近 ($\delta_{\text{average}} - 3s$, -31.7‰), 判别其咖啡因为非咖啡豆来源。LC-IRMS 同位素质谱测定咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 的分析方法, 可用于鉴别咖啡饮料天然来源的真实性。

关键词 液相色谱-稳定同位素质谱联用; 咖啡饮料; 咖啡因

1 引言

咖啡和咖啡饮料是常见的饮品^[1], 具有提神的作用, 其主要功效成分是咖啡因^[1]。适量摄入咖啡因能振作精神、增强思考能力、提高心脏功能、缓解肌肉疲劳^[2,3]。饮用天然咖啡因比人工合成咖啡因更加健康, 因为人工合成咖啡因可能会导致焦虑症、睡眠失调等副作用^[4,5]。伴随着天然咖啡因需求量增大, 其导致价格越来越高, 一些不法厂商以人工合成咖啡因替代天然咖啡因。如何鉴别天然咖啡因与人工合成咖啡因, 是咖啡饮料天然成分鉴定的关键技术难题。

稳定同位素技术是食品掺杂和溯源分析领域一项重要技术, 尤其是特定化合物同位素分析技术开发应用的完善, 使同位素质谱技术在食品领域得到迅速的发展^[6,7]。气相色谱-同位素质谱 (GC-IRMS) 与液相色谱-同位素质谱 (LC-IRMS) 是两种主要的特定化合物同位素分析技术, 广泛应用于环境科学和食品科学等领域^[8]。GC-IRMS 由于具有良好的接口串联技术, 在食品掺杂与溯源分析领域应用广泛, GC-IRMS 主要适用于挥发性或半挥发性目标物同位素质谱分析^[9,10]。与 GC-IRMS 同位素质谱技术相比, LC-IRMS 同位素质谱技术可应用于非挥发性有机物的测定, 尤其是不需要衍生化直接进行同位素质谱分析^[11]。自 2004 年赛默飞公司推出第一款市场化的 LC 与 IRMS 串联接口 LCisoLink^[12] 以来, LC-IRMS 同位素质谱技术开始应用于考古学、地球化学、环境科学、食品鉴定等领域。McCullagh 等^[13] 采用 LC-IRMS 检测人和动物骨头中氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$, 利用复合型色谱柱, 硫酸溶液为流动相, 室温条件下分离 15 种氨基酸, IRMS 测定氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$, 最终重现古代人和动物的饮食结构; Powers 等^[14] 运用 LC-IRMS 检测天然水中碳同位素比, 以此定量分析水体中溶解无机碳含量, 以及水体中溶解有机碳光化学作用的转化率。Basler 等^[15] 利用 LC-IRMS 检测土壤中单糖的 $\delta^{13}\text{C}$, 通过单糖碳同位素比探讨土壤不同碳水化合物动态变化; Cabañero 等^[16] 运用 LC-IRMS 检测蜂蜜中蔗糖、果糖和葡糖糖的 $\delta^{13}\text{C}$, 结合 EA-IRMS 检测蜂蜜中蛋白质的 $\delta^{13}\text{C}$, 鉴别 C3 植物蜂蜜是否掺杂 C4 植物糖。尽管 LC-IRMS 同位素质谱技术已在地球科学和食品科学领域得到应用, 但是 LC-IRMS 同位素质谱技术在应用中仍然存在很大问题, 如色谱流动相必须为纯水体系、不能用有机流动相、液相色谱柱选择受限, 严重影响 LC-IRMS 同位素质谱技

2017-07-17 收稿; 2018-09-22 接受

本文系广东省科技厅省级科技计划项目 (No. 2016A040403091) 和广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室开放课题 (No. 2017A09) 资助

* E-mail: dingbo@mail2.sysu.edu.cn

术的实际应用。

为了克服 LC-IRMS 同位素质谱技术必须采用水相流动相而导致色谱分离洗脱能力低的问题,研究者通过提高色谱柱柱温的方式增大水溶液的洗脱效率。Godin 等^[17]首先将此方法用于 LC-IRMS 中,利用磺化聚苯乙烯-苯二乙烯聚合柱和多孔石墨化柱两根色谱柱高温分离对香豆酸和阿魏酸等酚类化合物,聚合柱温度保持在 90℃,多孔石墨化柱最高温度升至 170℃,IRMS 测定酚酸特定化合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 。Zhang 等^[18]在 150 ~ 200℃ 高温条件下,采用 Xbridge、Acquity、Triart 和 Zirchrom PBD 等不同厂家反相 C_{18} 色谱柱,以纯水为流动相,分离苯酚和咖啡因等化合物,用 IRMS 检测这些特定化合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 。Kujawinski 等^[19]利用 LC-IRMS 检测磺胺类药物的 $\delta^{13}\text{C}$,选择 Xbridge C_{18} 色谱柱,柱温 60 ~ 100℃,磷酸盐缓冲溶液为流动相,洗脱磺胺类药物。研究表明,反相 C_{18} 色谱柱在高温纯水流动相条件下,色谱峰扩展甚至趋于扁平, C_{18} 色谱柱不能长时间在高温条件下使用^[20,21]。

20 世纪 60 年代,科研人员通过放射性碳同位素分析鉴别饮料中咖啡因天然或人工合成来源^[22]。2003 年, Richling 等^[24]利用 EA-IRMS 离线检测瓜拉纳饮料、茶叶、咖啡饮料咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$,样品首先通过分析型液相色谱仪分离提取获得的咖啡因单体化合物,纯咖啡因化合物引入 EA-IRMS 同位素质谱仪,测定获得咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$,从而鉴别饮料中咖啡因是否为天然来源。2012 年,Zhang 等^[18,24]利用 LC-IRMS 同位素质谱仪在线检测饮料中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$,选择 Xbridge C_{18} 色谱柱,柱温 30 ~ 180℃,检测咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 。本研究基于高温液相色谱联用 LC-IRMS 同位素质谱技术^[17,18],探讨 LC-IRMS 同位素质谱在线检测咖啡豆、咖啡饮料中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 。结果表明,Xbridge C_{18} 色谱柱柱温超过 70℃ 后,色谱峰变宽而扁平,色谱柱寿命锐减,因此,选择在纯水流动相和恒温条件下,以 Xbridge shield RP C_{18} 色谱柱分离咖啡因,优化色谱柱的长度与粒径,获得最佳 LC-IRMS 在线分析条件,用于天然咖啡豆和咖啡饮料中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定,分析咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 数据,判断咖啡饮料中咖啡因天然来源的真实性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Dionex UltiMate3000 型高效液相色谱仪、DELTA V Advantage 同位素质谱仪和 FINNIGAN LC IsoLink 接口(美国 Thermo Scientific 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); SW 30H 型超声波仪(瑞士 SONO 公司); SIGMA 3-30KS 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); Sartorius BT 223S 天平(德国赛多利斯公司)。

咖啡因同位素标准物质为 IAEA-600($\delta^{13}\text{C} = -27.77\text{‰} \pm 0.04\text{‰}$, 购于国际原子能机构); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 H_3PO_4 等均为分析纯(美国 Sigma-Aldrich 公司); 实验用水为超纯水(18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

合成咖啡因样品(1000 mg/L 于甲醇,上海安谱公司); 咖啡豆样品和饮料购于广州市大型超市。

2.2 样品前处理

咖啡豆用玛瑙钵研磨粉碎,准确称量 0.500 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 25 mL 超纯水,振荡 1 min 使其混合均匀,超声提取 30 min,10000 r/min 离心 5 min,取约 1 mL 上清液,过 0.45 μm 滤膜至 1.5 mL 样品瓶,用超纯水稀释 5 倍,进行 LC-IRMS 测试。

取 5 mL 咖啡饮料样品,用超纯水稀释至 50 mL,10000 r/min 离心 5 min,取约 1 mL 上清液,过 0.45 μm 滤膜至 1.5 mL 样品瓶,待 LC-IRMS 测试。

2.3 LC-IRMS 检测方法

液相色谱条件:使用 Waters XBridge Shield RP C_{18} 色谱柱(50 mm \times 2.1 mm \times 3.5 μm); 流动相为超纯水,流速 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; 柱温为 50℃; 进样量 10 μL 。

LC-IsoLink 气液分离条件:样品从 LC 色谱洗脱分离出来,在氧化反应管中与 4% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液和 4% H_3PO_4 溶液混合,在 98.5℃ 条件下,目标化合物全部氧化为 CO_2 ,经过气液在线膜分离单元分离后导入 IRMS 中。

同位素质谱条件:离子源电压为 3.05 kV,电流为 0.72 mA;载气为高纯氦气,压力为 150 kPa;参考气 CO_2 压力为 190 kPa;真空度 1.5×10^{-4} Pa,法拉第杯检测器接收质量数为 44、45 和 46 目标离子。

2.4 $\delta^{13}\text{C}$ 值的计算方法

样品测定时,每个样品的分析起始阶段和结尾阶段通入高纯 CO_2 参考气体作为内标,然后用已知 $\delta^{13}\text{C}$ 值的咖啡因标准溶液标定高纯 CO_2 参考气体的 $\delta^{13}\text{C}$,再以 CO_2 参考气体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为标准,对样品中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值进行计算。采用 Isodat3.0 软件对数据进行分析。

咖啡因标准溶液的 $\delta^{13}\text{C}$ 的计算基于国际标准物质 VPDB,计算公式为^[25]:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{caffeine STD}} = (R_{\text{caffeine STD}} - R_{\text{VPDB}}) / R_{\text{VPDB}} \times 1000\text{‰}$$

其中, R 为同位素比率 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $R_{\text{VPDB}} = 0.0112372$ 。

2.5 统计分析

采用 Origin 8.5 软件(美国 OriginLab 公司)分析咖啡样品检测所得的 $\delta^{13}\text{C}$ 数据,咖啡、咖啡豆、生咖啡豆、咖啡粉和咖啡饮料等不同类别样品的咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 利用 SIMCA 14.0 软件(瑞士 Umetrics 公司)进行主成分分析。

3 结果与讨论

3.1 分离条件优化

3.1.1 色谱柱的选择

LC-IRMS 同位素质谱分析中,液相色谱柱的选择是关键因素,文献[26]研究了 XBridge BEH C_{18} 、Acquity UPLC BEH、Triart C_{18} 和 Zirchrom 共 4 种型号液相色谱柱,在高温纯水流动相条件下,其中 Waters 公司的 XBridge C_{18} 的色谱柱对样品中 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定影响最小。本研究选择 XBridge BEH C_{18} 和 Xbridge shield RP C_{18} 两种类型的色谱柱分离咖啡豆及咖啡饮料中咖啡因,比较不同长度以及填料粒径(XBridge BEH C_{18} (50 mm × 2.1 mm, 2.5 μm)、XBridge BEH C_{18} (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)、XBridge BEH C_{18} (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) 和 XBridge shield RP C_{18} (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)) 4 种规格的色谱柱。结果表明,4 种规格色谱柱均能实现咖啡因的分离。柱温恒定条件下,选择 XBridge BEH C_{18} 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 2.5 μm) 分离咖啡因时,系统压力过大,连续检测样品时,常发生压力过大导致液相泵停止工作的情况;XBridge BEH C_{18} (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) 和 XBridge BEH C_{18} (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) 分离咖啡因时,咖啡因保留时间较长,尤其是后者,色谱分离时间甚长,批量检测样品耗时,影响样品检测效率。Xbridge shield RB C_{18} 类型色谱柱适合纯水流动相体系,色谱分离水溶性化合物分离度高,保留时间短。因此,选择 XBridge shield RP C_{18} 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) 在恒温纯水流动条件下分离咖啡因 (图 1)。

3.1.2 流速与柱温的选择

LC-IRMS 同位素质谱测定目标化合物的稳定碳同位素比,要求色谱流动相不含甲醇或乙腈有机洗脱液,因此实验选择超纯水为流动相。LC Isolink 气液分离单元允许最大流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$,其中氧化剂和酸化剂总流速最大值为 100 $\mu\text{L}/\text{min}$,因此,选择咖啡因色谱分离流动相流速为 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

高温条件下,纯水可以达到甲醇和乙腈有机溶剂的洗脱能力^[27],因此通过提高纯水流动相的色谱柱柱温,实现咖啡因目标物的分离。XBridge shield RP C_{18} 耐受最高温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,柱温选择 50 $^{\circ}\text{C}$,以纯水流动相分离咖啡因目标物,长时间使用后,咖啡因同位素质谱目标峰未变宽。因此,LC-IRMS 检测咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 分析条件为: XBridge shield RP C_{18} 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)、柱温 50 $^{\circ}\text{C}$,纯水为流动相。

3.2 天然咖啡因同位素质谱分析

从市场随机购买 44 种咖啡豆与咖啡样品,分别是 18 种咖啡饮品、11 种咖啡豆、7 种生咖啡豆和 8 种咖啡粉,用 LC-IRMS 同位素质谱分析,咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定结果见表 1。咖啡豆及咖啡天然来源的咖啡

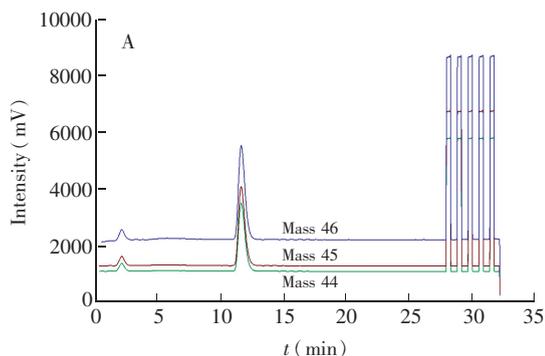


图 1 XBridge shield RP C_{18} 色谱柱上咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 离子流色谱图

Fig. 1 Ion chromatograms of caffeine $\delta^{13}\text{C}$ with Xbridge shield RP C_{18} column (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm)

因 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围在 $-25.3\text{‰} \sim -30.9\text{‰}$ 之间, 利用 t 分布统计学分析 44 种样品的咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值 -27.9‰ , 标准偏差 $s=1.3\text{‰}$ 。同时检测人工合成咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-35.8\text{‰} \sim -38.5\text{‰}$ 之间。Weinkauff 等^[22] 采用 EA-IRMS 检测天然来源茶叶咖啡因, $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-27.7\text{‰} \sim -31.7\text{‰}$ 之间, 天然来源咖啡中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-26.5\text{‰} \sim -27.5\text{‰}$ 之间, 天然来源瓜拉纳种子中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-26.7\text{‰} \sim -28.7\text{‰}$ 之间, 人工合成咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-37.9\text{‰} \sim -40.0\text{‰}$ 之间。因此, 本方法检测天然来源及人工合成咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 数据与文献^[22] 报道数据一致。

由图 2 可知, 咖啡、咖啡豆、咖啡粉和生咖啡豆中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 2 倍标准偏差范围之内, 生咖啡豆或烘烤不同类别样品中咖啡因保持一定稳定性。因此, 可以根据天然来源咖啡产品的咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值分布规律鉴别咖啡饮料中咖啡因是否来源于天然咖啡豆。

表 1 咖啡豆、咖啡中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值
Table 1 Caffeine $\delta^{13}\text{C}$ of coffee bean and coffee

序号 No.	名称 Name	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	序号 No.	名称 Name	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	咖啡豆 1 Cffee bean 1	-27.8	23	咖啡 9 Coffee 9	-29.9
2	咖啡豆 2 Coffee bean 2	-27.9	24	咖啡粉 7 Coffee powder 7	-26.4
3	咖啡豆 3 Coffee bean3	-26.1	25	咖啡 10 Coffee 10	-29.8
4	咖啡豆 Coffee bean 4	-27.1	26	咖啡 11 Coffee 11	-27.1
5	咖啡豆 Coffee bean 5	-27.8	27	咖啡 12 Coffee 12	-27.8
6	咖啡豆 Coffee bean 6	-27.8	28	咖啡 13 Coffee 13	-28.2
7	咖啡豆 Coffee bean 7	-28.3	29	咖啡 14 Coffee 14	-26.6
8	咖啡粉 1 Coffee powder 1	-29.6	30	咖啡 15 Coffee 15	-27.2
9	咖啡粉 2 Coffee powder 2	-28.1	31	生咖啡豆 1 Raw Coffee bean 1	-28.7
10	咖啡粉 3 Coffee powder 3	-30.9	32	生咖啡豆 2 Raw Coffee bean 2	-28.7
11	咖啡粉 4 Coffee powder 4	-27.9	33	生咖啡豆 3 Raw Coffee bean 3	-27.3
12	咖啡豆 8 Coffee bean 8	-27.9	34	生咖啡豆 4 Raw Coffee bean 4	-27.9
13	咖啡粉 Coffee powder 5	-28.1	35	生咖啡豆 5 Raw Coffee bean 5	-26.9
14	咖啡 1 Coffee 1	-28.7	36	生咖啡豆 6 Raw Coffee bean 6	-26.4
15	咖啡粉 Coffee powder 6	-29.3	37	生咖啡豆 Raw Coffee bean 7	-25.3
16	咖啡 2 Coffee 2	-29.9	38	咖啡 16 Coffee 16	-29.7
17	咖啡 3 Coffee 3	-29.3	39	咖啡粉 8 Coffee powder 8	-29.2
18	咖啡 4 Coffee 4	-29.8	40	咖啡豆 9 Coffee bean 9	-29.4
19	咖啡 5 Coffee 5	-26.3	41	咖啡豆 10 Coffee bean 10	-26.4
20	咖啡 6 Coffee 6	-27.4	42	咖啡 17 Coffee 17	-26.6
21	咖啡 7 Coffee 7	-27.9	43	咖啡豆 11 Coffee bean 11	-25.8
22	咖啡 8 Coffee 8	-29.9	44	咖啡 18 Coffee 18	-26.6

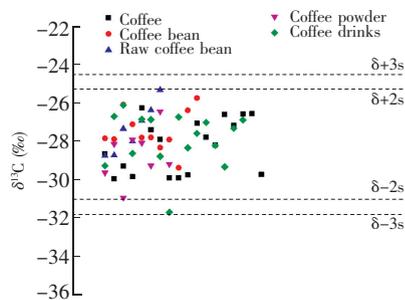


图 2 不同类别样品咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 分布图

Fig. 2 Distribution of caffeine $\delta^{13}\text{C}$ in different samples

3.3 咖啡饮料中咖啡因的测定

采用建立的 LC-IRMS 同位素质谱测定咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 分析方法, 测定市售的 16 种咖啡饮料中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ (表 2)。由表 2 可知, 16 种咖啡饮料中咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值与咖啡豆、咖啡等天然来源咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值比较相一致, 咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 1 倍标准偏差下限值范围之内, 其中只有 1 种香浓咖啡饮料的咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -31.7‰ , $\delta^{13}\text{C}$ 值在咖啡豆、咖啡等天然来源咖啡因的 1 倍标准偏差和 3 倍标准偏差之间, 接近 3 倍标准偏差下限临界值 (-31.8‰), 人工成咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 -35.8‰ 以下, 推断此香浓咖啡饮料中咖啡因是非咖啡豆天然来源的咖啡因。

将 44 个样品分为咖啡豆、咖啡粉、生咖啡豆和咖啡 4 种天然来源产品, 以及 1 种咖啡饮料产品, LC-IRMS 测试所得咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值按照 5 种类别产品类别进行主成分分析 (图 3)。由主成分分析结果可

知,不同类别咖啡产品的咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值相对聚集,其中咖啡豆、生咖啡豆和咖啡 3 种产品相对聚集在一起,咖啡粉与咖啡饮料 2 种类别产品聚集在一起,由此推测,咖啡饮料为糊状悬浮液与咖啡粉产品加工工艺程序比较接近,碳稳定同位素分馏效应相似,导致它们咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值相对分布集中。

4 结论

建立了 LC-IRMS 同位素质谱直接测定咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值的分析方法,用于咖啡、咖啡豆天然来源咖啡因和咖啡饮料中咖啡因的测定。

以天然来源咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分布范围为依据,用于鉴别咖啡饮料中咖啡因是否为天然来源。LC-IRMS 同位素质谱技术在食品溯源及品质鉴定中具有良好的应用前景。

表 2 咖啡饮料中咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 值

Table 2 Caffeine $\delta^{13}\text{C}$ of coffee drinks

序号 No.	名称 Name	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	序号 No.	名称 Name	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	饮料 01 Drink 01	-29.3	9	饮料 08 Drink 08	-26.7
2	饮料 02 Drink 02	-26.7	10	饮料 09 Drink 09	-28.3
3	饮料 03 Drink 03	-26.1	11	饮料 10 Drink 10	-27.6
4	饮料 04 Drink 04	-28.6	12	饮料 11 Drink 11	-27.2
5	饮料 05 Drink 05	-26.9	13	饮料 12 Drink 12	-28.2
6	饮料 06 Drink 06	-26.9	14	饮料 13 Drink 13	-29.3
7	饮料 06 Drink 06	-28.8	15	饮料 14 Drink 14	-27.3
8	饮料 07 Drink 07	-31.7	16	饮料 15 Drink 15	-26.9

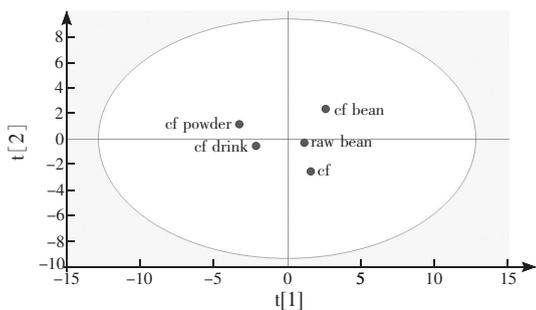


图 3 不同类样品中咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 值主成分分析

Fig. 3 Caffeine $\delta^{13}\text{C}$ for principal component (PCA) analysis in different samples

References

- McLellan T M, Lieberman H R. *Nutr. Rev.*, **2012**, 70(12): 730-744
- Rawel H M, Kulling S E. *J. Verbrauch. Lebensm.*, **2007**, 2(4): 399-406
- Yang C S, Landau J M. *J. Nutr.*, **2000**, 130(10): 2409-2412
- Nawrot P, Jordan S B, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. *Food Addit. Contam. A*, **2010**, 20(1): 1-30
- Modi A A, Feld J J, Park Y, Kleiner D E, Everhart J E, Liang T J, Hoofnagle J H. *Hepatology*, **2010**, 51(1): 201-209
- Muccio Z, Jackson G P. *Analyst*, **2009**, 134(2): 213-222
- Seoane J R, Xavier L X. *Handbook of Instrumental Techniques for Materials, Chemical and Biosciences Research*. Barcelona: Centres Científics i Tecnològics Universitat de Barcelona, **2012**, ChT08, 1-7
- Benson S, Lennard C, Maynard P, Roux C. *Forensic Sci. Int.*, **2006**, 157(1): 1-22
- Schmidt T, Zwank L, Elsner M, Berg M, Meckenstock R, Haderlein S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378(2): 283-300
- Elsner M. *J. Environ. Monit.*, **2010**, 12(11): 2005-2031
- Godin J P, McCullagh J S O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25(20): 3019-3028
- Krummen M, Hilker A, Juchelka D, Duhr A, Schluter H, Pesch R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18(19): 2260-2266
- McCullagh J S O, Juchelka D, Hedges R E M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20(18): 2761-2768
- Powers L C, Brandes J A, Miller W L, Stubbins A. *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **2017**, 15(1): 103-115
- Basler A, Dyckmans J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2013**, 27(22): 2546-2550
- Cabañero A I, Recio J L, Rupérez M. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(26): 9719-9727
- Godin J P, Hopfgartner G, Fay L. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(18): 7144-7152

- 18 Zhang L, Kujawinski D M, Jochmann M A, and Schmidt T C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25 (20): 2971–2980
- 19 Kujawinski D M, Zhang L, Schmidt T C, Jochmann M A. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(18): 7656–7663
- 20 Wolcott R G, Dolan J W, Snyder L R, Bakalyar S R, Arnold M A, Nichols J A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 869(1): 211–230
- 21 Thompson J D, Brown J S, Carr P W. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(14): 3340–3347
- 22 Weinkauff O J, Radue R W, Keller R E, Crane H R. *J. Agric. Food. Chem.*, **1961**, 9(5): 397–401
- 23 Richling E, Höhn C, Weckerle B, Heckel F, Schreier P. *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216(6): 544–548
- 24 Zhang L, Kujawinski D M, Federherr E, Schmidt T C, Jochmann M A. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(6): 2805–2810
- 25 Werner R A, Brand W A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15(7): 501–519
- 26 Zhang L. Duisburg: Universität Duisburg–Essen, **2014**: 35–67
- 27 Teutenberg T, Lerch O, Götze H J, Zinn P. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(16): 3896–3899

Identification of Natural Caffeine Source in Coffee Drinks by Liquid Chromatography Coupled with Isotope Ratio Mass Spectrometry

DING Bo^{*1,2,3}, WANG Zhi-Yuan^{1,2}, CHEN Wen-Rui^{1,2}, XIE Jian-Jun^{1,2}, SHE Zhi-Gang³

¹(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China)

²(Guangdong Key Laboratory of Import and Export technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China)

³(School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Coffee and coffee drinks are products preferred by a number of consumers in their daily life. However, it is lack of viable methods for identification of natural coffee source. A new method of liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry (LC-IRMS) was developed for determination of caffeine $\delta^{13}\text{C}$ value for discrimination of natural and synthetic caffeine source in the coffee drinks. Caffeine in samples was separated by reversed-phase liquid chromatography with An XBridge Shild PR C_{18} (2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm). The column temperature was 50°C and the water flow rate was 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Target analytes were converted to CO_2 in the oxidation reactor of the LC-IsoLink interface. Finally the caffeine $\delta^{13}\text{C}$ value was directly detected with a Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer. On the basis of the carbon isotope analysis of 44 coffee soybean samples by LC-IRMS, it was concluded that there was one distinguishable group of $\delta^{13}\text{C}$ -values: -25.3‰ to -30.9‰ in natural coffee soybean. The average of $\delta^{13}\text{C}$ -values (δ_{average}) was -27.9‰ , and the standard deviation (s) was 1.3‰ . The samples were discriminated for unnatural coffee soybean source, when the caffeine $\delta^{13}\text{C}$ -value was less than or approached $\delta_{\text{average}} - 3s$ (-31.7‰). This method was applied to identify the caffeine source in 16 kinds of coffee drinks, in which one sample was discriminated to have unnatural coffee soybean source.

Keywords Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry; Coffee drinks; Caffeine

(Received 17 July 2017; accepted 22 September 2018)

This work was supported by the Science & Technology Plan Project of Guangdong Province of China (No. 2016A040403091) and the Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food Project of Science & Technology Planning (No. 2017A09).