

液相色谱法检测速溶奶茶中咖啡因含量

魏艳艳*, 周亮, 任波

(重庆开州区疾病预防控制中心, 重庆 405499)

摘要: 目的 建立一种新的奶茶中咖啡因含量的液相色谱法, 检测本区速溶奶茶咖啡因含量, 提出健康影响建议。**方法** 采用 waters 高效液相色谱 Symmetry C18 (5 μm ×150 mm×4.6 mm) 柱进行测定, 以甲醇水 (30+70) 为流动相, 流速为 1 mL/min, 检测波长 272 nm, 柱温为 35°C。**结果** 1~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内, 相关系数 $r=0.9999$, 回收率为 97.2%~99.5%, 方法精密度 0.54%。**结论** 该方法采取亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀离心, 能够迅速提取奶茶中咖啡因有效成分, 并能去除蛋白质的干扰, 缩短了前处理时间, 优化了色谱条件, 加速了咖啡因的检测。**关键词:** 高效液相色谱; 奶茶; 咖啡因

Determination of caffeine content in instant milk tea by liquid chromatography

WEI Yan-Yan*, ZHOU Liang, REN Bo

(Kaizhou Disease Prevention and Control Center, Chongqing 405499, China)

ABSTRACT: Objective To establish a new liquid chromatographic method for caffeine content in milk tea, to detect the caffeine content of instant milk tea in the region, and to make recommendations on health effects. **Methods** The determination was carried out on a Waters high performance liquid chromatography Symmetry C18 column (5 μm ×150 mm×4.6 mm), the mobile phase was methanol-water (30+70) at a flow rate of 1 mL/min, the detection wavelength of 272 nm, and the column temperature was 35°C. **Results** The correlation coefficient was $r=0.9999$ over the linear range of 1-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the recoveries were 97.2%-99.5%, and the method precision was 0.54%. **Conclusion** The method adopts potassium ferrocyanide and zinc acetate precipitation centrifugation, which can rapidly extract the effective components of caffeine in milk tea and remove the interference of proteins, shorten the pretreatment time, optimize the chromatographic conditions, and accelerate the detection of caffeine.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; milk tea; caffeine

0 引言

咖啡因 ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) 作为一种中枢神经系统兴奋剂^[1], 入口后可被机体快速吸收。研究表明, 大剂量或长期使用咖啡因可导致“咖啡因中毒”^[2], 而戒除或脱瘾会引起头痛等症状, 对人体的急性毒性^[3]、对心血管和骨骼^[4-5]、行为及生殖发育^[6-7]等方面都有不良影响。

根据《中国居民膳食咖啡因摄入量及其风险评估(摘要)》, 我国成年人咖啡因摄入量贡献率由高到低依次为茶叶、茶饮料、奶茶和咖啡; 未成年人则依次为奶茶、茶饮料、茶叶和巧克力^[8], 因此, 对奶茶中咖啡因含量的深入研究显得尤为重要, 现状奶茶中咖啡因的前处理提取方法有直接上机法^[9]、离心提取^[10]、乙酸乙酯提取法^[11]及《食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定》(GB 5009.139-2014) 国家标准中的氧化镁法^[12], 奶茶中乳含量

* 通信作者: 魏艳艳, 主管技师, 检验员, 研究方向为理化检验。E-mail: 765198900@qq.com

*Corresponding author: Wei Yan-Yan, undergraduate, Technologist-in-Charge, Inspector, Chongqing Kaizhou District Disease Control and Prevention Center, Chongqing 405499, China. E-mail: 765198900@qq.com

过高, 直接上机、离心提取、国标氧化镁法提取效果不佳, 检测时出峰较慢, 所以本研究预优化国标中前处理-高效液相色谱测定奶茶中咖啡因含量的检测方法, 建立一种新的奶茶中咖啡因含量的液相色谱法, 检测某地速溶奶茶咖啡因含量, 提出健康影响建议。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(带光电二极管阵列检测器): e2695 美国 Waters 公司; 色谱柱: Symmetry C18 (5 μm ×150 mm×4.6 mm) 美国 Waters 公司; 离心机: Sorvall ST 16R 美国 Thermo 公司; 移液枪:(200 μL 、1 mL、10 mL) 德国 eppendorf 公司; 旋涡混合器: XH-B 型江苏康健医疗有限公司; 电子天平: AE200 瑞士梅特勒托利多; 超纯水机: Milli-QDirect16 美国 Millipore 公司; 0.22 μm 微孔水相滤膜: 津腾公司; 甲醇: 色谱纯 Honeywell 公司; 乙酸锌: 分析纯重庆博艺化学试剂有限公司; 亚铁氰化钾: 分析纯汕头市光华化学厂; 咖啡因标准品溶液: 北京海岸鸿蒙标准物质技术有限公司。

1.2 速溶奶茶

样品主要来源超市。常见 3 个(A、B、C)品牌, 每个品牌 5 种不同口味(香芋、原味、草莓味、麦香、咖啡味), 一个口味 3 个不同生产批号共 45 个样品。

1.3 测定方法

1.3.1 样品制备与提取

本研究购买的速溶盒装奶茶的食用方法说明大约一袋 40 g 奶茶粉溶解在 200 mL 的沸水(85°C 以上)中, 因此本研究实验每个样品都是通过沸水溶解一袋奶茶粉定容至 200 mL 来制备。移取 2.5 mL 制备好的奶茶样品至 50 mL 的聚丙烯离心管中, 并加入 0.5 mL 亚铁氰化钾(106 g/L)和 0.5 mL 乙酸锌(220 g/L)以澄清样品, 涡旋混合溶液 2 min, 用纯水定容至 50 mL, 然后 4000 转/分的速度将溶液离心 10 min, 用注射器取上清液过 0.22 μm 微孔水相滤膜, 滤液上机待测。

1.3.2 色谱条件

色谱柱 C18 (5 μm ×150 mm×4.6 mm), Waters, 流动相等度洗脱: 甲醇-水(30-70)溶液, 柱温: 35°C, 进样量: 10 μL , 流速: 1 mL/min, 检测波长: 272 nm。

1.3.3 样品的测定

把制备好的样品按“1.3.2”色谱条件进样 10 μL , 保留时间定性, 峰面积定量。

1.3.4 准确度实验

方法准确度以加标回收率来判定, 精确取出 2.5 mL 已制备好的已知咖啡因含量的奶茶样品 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每组分别加入 0.1、0.4、0.8 mL 咖啡因标准储备液溶液

(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 加标浓度分别为 2、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按“1.3.2”色谱条件进行检测, 记录峰面积, 计算回收率。

1.3.5 精密度实验

取某一个奶茶样品按“1.3.2”色谱条件、重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算相对偏差 RSD。

1.3.6 数据处理

数据统计采用 Excel 2007 计算实验数据。SPSS 27.0 软件进行多因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 样品前处理的优化

主要与《食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定》(GB 5009.139-2014)国家标准^[12]比较, 国标中前处理方法对含乳的咖啡、茶叶及固体制品, 称取 1 g 经粉碎低于 30 目的均匀样品, 大批样处理时, 盒装奶茶样品碾磨需要花费大量时间, 直接将全部样品称量溶解至 200 mL 沸水中, 制备成均匀样品, 样品中乳含量较高, 用铁氰化钾、乙酸锌沉淀蛋白质, 比氧化镁提取时间短、效果好。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 检测波长的选择

在 210 nm~400 nm 之间对咖啡因标准进行光谱扫描, 在 272 nm 处有最大吸收波长。

2.2.2 流动相的比例选择

15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的咖啡因标准溶液分别在 3 种不同比例甲醇-水(20-80)、甲醇-水(24-76)、甲醇-水(30-70)流动相条件下进样检测, 色谱图见图 1-3, 实验结果表明选择流动相甲醇-水(30-70), 咖啡因的峰面积最大、峰型最好、出峰时间最合适。

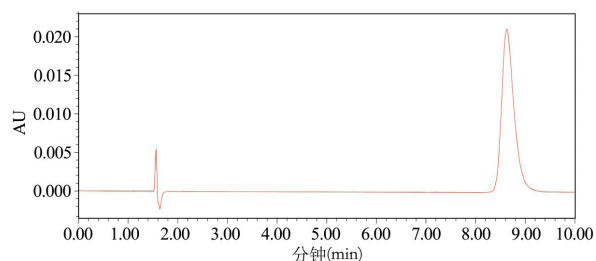


图 1 甲醇-水(20-80)

Fig.1 Methanol-water (20-80)

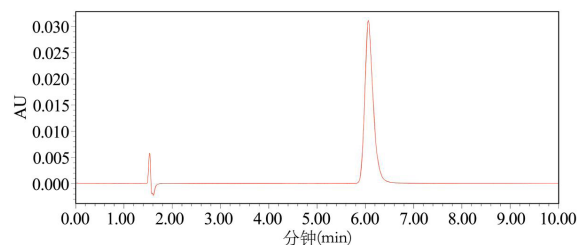


图 2 甲醇-水(24-76)

Fig.2 Methanol-water (24-76)

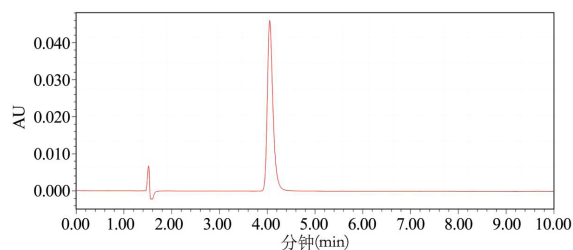


图3 甲醇-水(30-70)

Fig.3 Methanol-water (30-70)

2.2.3 流动相的流速选择

将流动相的流速分别设置为0.8、1.0、1.2 mL/min, 进样15 µg/mL的咖啡因标准溶液, 实验结果显示, 流速为1.0 mL/min时咖啡因的峰面积最大、出峰时间最好。

在选定的流动相、流动相比、流速的仪器条件下, 再进样15 µg/mL的咖啡因标准溶液, 得到咖啡因标准色谱图, 见图4。

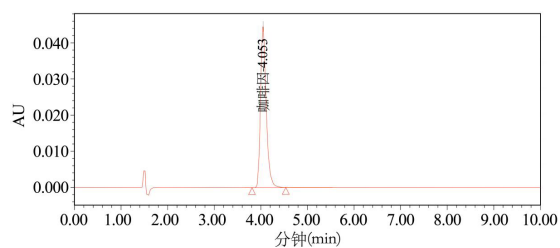


图4 15 µg/mL的咖啡因标准溶液色谱图

Fig.4 Chromatogram of a standard solution of caffeine at 15 µg/mL

2.3 方法线性关系、精密度

按1.3.2的方法对标准溶液咖啡因含量测定, 绘制标准曲线。校准曲线见图5, 咖啡因在1-30 µg/mL范围内, 线性回归方程 $y=2.51 \times 10^4 x - 1.46 \times 10^3$, 相关系数 $r=0.9999$, 精密度为0.54%, 见表1。

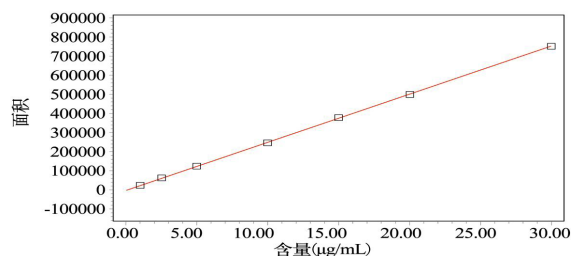


图5 校准曲线图

Fig.5 Calibration curve diagram

表1 方法的精密度

Table 1 Precision of the method

测定次数	保留时间	咖啡因含量 (µg/mL)
1	4.052	7.254
2	4.052	7.143
3	4.052	7.202
4	4.053	7.186
5	4.052	7.159
6	4.052	7.173
平均值	4.052	7.186
RSD (%)	4.052	0.54

2.4 检出限和定量限

咖啡因检出限以3倍信噪比计算为0.05 mg/kg, 定量限以10倍信噪比计算为0.2 mg/kg。

2.5 样品加标回收率

对奶茶样品按上述方法进行低、中、高3水平加标回收测定, 计算咖啡因的平均回收率, 结果见表2, 咖啡因的平均加标回收率为97.2%~99.5%, 说明此法咖啡因的回收率高。

表2 方法的回收率

Table 2 Recovery rate of the method

物质	本底值 (µg/mL)	加标量 (µg/mL)	测定值 (µg/mL)	平均回收率 (%)
咖啡因	7.186	2.0	9.130	97.2
	7.186	8.0	15.042	98.2
	7.186	16.0	23.106	99.5

2.6 样品结果分析

对不同速溶奶茶的咖啡因进行测定, 结果见表3, 样品色谱图见图6。

表3 速溶奶茶中的咖啡因检测结果表

Table 3 Results for caffeine in instant milk tea

口味	A品牌 咖啡因 (mg/kg)	B品牌 咖啡因 (mg/kg)	C品牌 咖啡因 (mg/kg)
香芋味	1722.41	924.87	1005.46
	1683.85	882.06	968.53
	1757.72	920.31	916.47
原味	1688.65	1298.44	1502.04
	1571.77	1263.04	1488.26
	1597.82	1243.02	1438.23
草莓味	1330.09	686.24	784.01
	1211.24	728.46	826.70
	1247.14	676.31	779.56
麦香味	935.45	841.66	909.30
	878.43	897.30	877.94
	890.67	862.77	931.55
咖啡味	1278.31	522.74	587.73
	1186.47	484.35	630.55
	1240.84	475.89	594.33

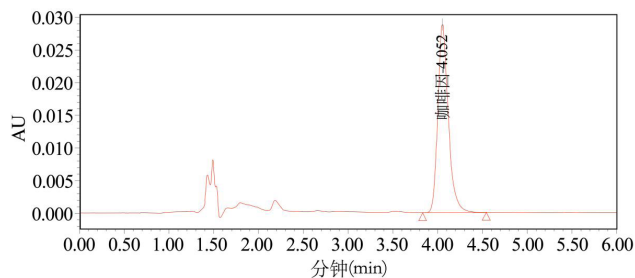


图6 奶茶样品色谱图

Fig.6 Chromatogram of instant milk tea sample

2.6.1 奶茶中咖啡因总体检测结果分析

样品中咖啡因的检出率为100%,奶茶中咖啡因的平均含量 1048.20 ± 359.64 mg/kg,所有样品中咖啡因的含量均符合国家对茶饮料的咖啡因质量标准(GB/T 21733-2008)^[13]奶茶饮料中咖啡因含量 ≥ 35 mg/kg。

2.6.2 不同品牌奶茶中咖啡因的检出结果分析

对我区市售速溶奶茶样品进行抽样检测,对所有样本数据进行多因素方差分析,种类(处理组间) $F=770.31$, $P<0.05$ 具有统计学意义,可以看出不同品牌的咖啡因含量不同,A品牌的平均含量为 1348.06 ± 307.16 mg/kg,B品牌的平均含量为 847.16 ± 266.27 mg/kg,C品牌的平均含量为 949.38 ± 301.92 mg/kg。

2.6.3 不同口味奶茶中咖啡因的检出结果分析

对我区市售速溶奶茶样品进行抽样检测,对所有样本数据进行多因素方差分析,口味(区组间) $F=497.94$, $P<0.05$ 具有统计学意义,可以看出不同口味的奶茶咖啡因含量不同,香芋味的平均含量为 1197.96 ± 394.47 mg/kg,原味的平均含量为 1454.59 ± 157.53 mg/kg,草莓味的平均含量为 918.86 ± 264.02 mg/kg,麦香味的平均含量为 891.68 ± 30.72 mg/kg,咖啡味的平均含量为 777.91 ± 347.44 mg/kg。

3 结论

本研究中,选择高效液相色谱法检测速溶杯装奶茶粉中咖啡因的含量,具有一定的实践价值与参考意义。样品采取亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀离心,能够迅速提取咖啡因有效成分,并能去除蛋白质的干扰,缩短了前处理时间,优化了色谱条件,加速了咖啡因的检测。

本次抽样检测我区奶茶中咖啡因的平均含量 1048.20 mg/kg,最高含量 1757.72 mg/kg(换算成 71 mg/杯),不同品牌及不同口味奶茶中咖啡因的含量也有差异,可能和厂家生产工艺及加工材料有关。目前我国仅对可乐型碳酸饮料有咖啡因含量限值规定,按照《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014)^[14]使用限量要求为 ≤ 150 mg/kg,奶茶一类《茶饮料》(GB/T 21733-2008)^[13]规定奶茶饮料中咖啡因含量 ≥ 35 mg/kg,没有限值规定。参考欧洲食品安全局(EFSA)^[15]认为健康成年人咖啡因的安全摄入量为 400 mg/d,孕妇安全摄入量为 300 mg/d,儿童咖啡因安全摄入量为 2.5 mg/kg BW^[16],儿童体重按照 30 kg计算,安全摄入量为 75 mg/d。根据包装说明杯装奶茶一盒大约 40 g,奶茶饮料中咖啡因的平均含量计算可知,健康成年人每天可以饮用速溶杯装奶茶 9 杯,孕妇每天可以饮用速溶杯装奶茶 7 杯,儿童每天可以饮用速溶杯装奶茶 1 杯,鉴于推算时采用奶茶中的咖啡因平均含量,因此奶茶的每日消费量应进一步减少。咖啡因超量的症状可能因人而异,但常见的表现包括焦虑、烦躁、失眠、心悸、胃部不适、恶心、

呕吐、颤抖、多尿等。如果出现这些症状中的一种或多种,那么可能表明摄入的咖啡因量已经超出了安全范围。除了孕妇和儿童,有心脏病、高血压、睡眠障碍的朋友,能不喝就不喝,以免加重病情。咖啡因也会增加钙流失,老年朋友尽量控制咖啡因的摄入量,以免增加骨质疏松的风险。对于咖啡因特别敏感的朋友,需要格外注意,尽量把每天咖啡因的摄入量减少到最低。

欧盟要求如果一升饮料中咖啡因含量超过 150 mg,则需要在标签上标注为高含量咖啡因,且需标注每 100 mL中的咖啡因含量^[17]。从健康考虑,建议在我国产的杯装速溶奶茶标签参照欧盟标准,标明每杯奶茶中的咖啡因含量,消费者根据自己的需求和偏好做出合适的选择,规避带来的健康风险,并且建议相关监管部门提升监管力度,加强公众对此类信息的宣传与教育,以确保消费者的健康与安全。

参考文献

- [1] VIRENDRA T, AKANKSHA M, SONU S, *et al.* Caffeine improves memory and cognition via modulating neural progenitor cell survival and decreasing oxidative stress in Alzheimer's rat model [J]. *Current Alzheimer Research*, 2023, 20(03): 175-189.
- [2] NAOYUKI Y, NOBUYUKI O, CHIKA H, *et al.* A Case of Caffeine Intoxication, in which the Theophylline Level Served as an Indicator of the Treatment Course and the Caffeine Level could be Measured [J]. *Internal Medicine*, 2024. DOI:10.2169/internalmedicine.1730-23.
- [3] TSUJI T, MORITA S, SAITO T, *et al.* Serum potassium level as a biomarker for acute caffeine poisoning [J]. *Acute Medicine Surgery*, 2020, 7(01): e568.
- [4] CHAMI M, PRIMIO DS. Energy drink consumption can induce cardiovascular events, two case reports and a literature review [J]. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 2024, 36(01): 43-61.
- [5] LI YHG, TANG MC, WU MS, *et al.* Causal association of genetically determined caffeine intake from tea or coffee with bone health: a two-sample Mendelian randomization study [J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2024. DOI:10.1093/postmj/qgae051.
- [6] PARK G, TURGEON MS. Chronic caffeine decreases anxiety-like behavior in the marble burying task in adolescent rats [J]. *Behavioural Pharmacology*, 2024, 35(04): 156-160.
- [7] HERMAN PA, TOMCZYK M, WÓJCIK M, *et al.* Effect of Caffeine on the Inflammatory-Dependent Changes in the GnRH/LH Secretion in a Female Sheep Model [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(05): 2663.
- [8] 国家食品安全风险评估中心. 中国居民膳食咖啡因摄入水平

- 及其风险评估(摘要)[EB/OL]. [2021-05-26]. <https://www.cfsa.net.cn/fxpg/fxpgbg/sptjj/2023/6140.shtml> [2024-04-20].
- [9] 梁远祥. HPLC法分析奶茶中的咖啡因含量[J]. 现代食品, 2023, 29(04): 159-161.
- [10] 董丽丽, 于玲, 李敏, 等. 拟反相液相色谱法快速测定奶茶中咖啡因含量的研究[J]. 分析测试学报, 2013, 32(06): 742-746.
- [11] 徐皖玉, 冯珣, 宋曼铜, 等. 高效液相色谱法测定奶茶中表儿茶素和咖啡因的含量[J]. 沈阳医学院学报, 2022, 24(01): 90-93.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.139-2014 食品安全国家标准 饮料中咖啡因的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21733-2008 茶饮料[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 2760-2014 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [15] EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific opinion on the safety of caffeine [J]. EFSA Journal, 2015, 13(05): 4102.
- [16] WIKOFF D, WELSH BT, HENDERSON R, *et al.* Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children [J]. Food Chem. Toxicol., 2017, 109(01): 585-648.
- [17] 食品伙伴网. 欧盟规定能量饮料应突出咖啡因警告标志[EB/OL]. [2014-9-30]. <http://news.foodmate.net/2014/09/277898.html> [2024-04-20].

作者简介



魏艳艳, 主管技师, 检验员, 研究方向为理化检验。