

Optimization Study on Pre-treatment of Tea Polyphenols in Milk Tea Based on National Standard GB 21733-2008

Xiaoling Wu

Shanghai CTI Product Standard Testing Technology Co., Ltd., Shanghai, 200000, China

Abstract

The content of tea polyphenols is an important indicator for evaluating the quality of tea beverages. The national standard method GB/T 21733-2008 Appendix A uses ethanol precipitation-ferrous tartrate colorimetry to determine the content of tea polyphenols in tea beverages. This method has a limited scope of application, especially for beverage products such as milk tea that use emulsifiers and stabilizers, as it faces the problem of being unable to obtain a clear pretreatment solution before colorimetry, which directly affects the accuracy of the detection results. This study improved the sample pretreatment method by using pineapple protease hydrolysis, which solved the problem of turbidity in the pretreatment solution and improved the precision and accuracy of tea polyphenol content determination in milk tea beverages. The method recovery rate was 98.5%~102.5%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.16%~0.32% (n=6).

Keywords

milk tea; tea polyphenols; ferrous tartrate colorimetric method; pineapple protease; detection cost

基于国标 GB 21733-2008 奶茶中茶多酚前处理的优化研究

吴晓玲

上海华测品标检测技术有限公司, 中国·上海 201114

摘要

茶多酚含量是评估茶饮料质量的关键指标。国家标准GB/T 21733-2008附录A规定采用乙醇沉淀-酒石酸亚铁比色法测定茶饮料中的茶多酚含量,但该方法适用范围有限,尤其对于奶茶等添加了乳化剂、稳定剂等添加剂的产品,在比色前难以获得澄清的预处理液,从而无法得到较为准确的检测结果。本研究通过改进样品前处理方法,引入菠萝蛋白酶进行酶解,成功解决了预处理液浑浊问题,且获取了性价比较高的菠萝蛋白酶,提升了奶茶饮料中茶多酚含量测定的精密度和准确度的同时,也兼顾了实验成本的问题。实验结果显示,该方法的回收率为98.5%~102.5%,相对标准偏差。

关键词

奶茶; 茶多酚; 酒石酸亚铁比色法; 菠萝蛋白酶; 检测成本

1 引言

茶多酚作为奶茶中重要的功能成分,其含量测定的准确性直接影响产品质量评价。GB/T 21733-2008《中华人民共和国国家标准 茶饮料》^[1]中对茶饮料中茶多酚含量作出了明确规定,其中,调味茶饮料(奶、奶味)中茶多酚含量应 $\geq 200\text{mg/kg}$,复(混)合茶饮料中茶多酚含量应 $\geq 150\text{mg/kg}$ 。

在奶茶这一深受消费者喜爱的茶饮料中,茶多酚的含量不仅影响着产品的口感与风味,更直接关系到其营养价值和健康效益。传统奶茶是由茶汤和牛奶调制而成,口感顺滑,随着食品工业的不断发展,人们对口味要求的不断提升,当今市售的奶茶产品中除了牛奶和茶汤以外,使用了多种食品

添加剂,各种乳化剂的加入使得按照国标方法前处理时无法得到澄清透明的液体,从而无法得到准确的实验结果,因此,准确测定并优化奶茶中的茶多酚前处理过程,对于提升产品质量、满足消费者需求具有重要意义。本研究基于国标 GB 21733-2008,旨在探索更为高效、精准的奶茶中茶多酚前处理方法,以为行业提供科学依据和技术支持。

国家标准 GB/T 21733-2008 附录 A 在测定奶茶产品中茶多酚含量时使用乙醇作为沉淀剂,由于添加的乳化剂、稳定剂改变了样品溶液体系的极性,乙醇无法有效沉淀蛋白质,导致无法得到澄清预处理液;另外在蛋白质沉淀处理时可能因为存在络合效应导致茶多酚检测结果偏低,该方法对于奶茶类产品适用性存在较大偏差。目前测定茶多酚含量的方法,如钼酸铵分光光度法、高锰酸钾滴定法、紫外分光光度法、重氮化-偶合分光光度法、柠檬酸铁铵分光光度法、流动注射-抑制化学发光法、近红外光谱快速无损检

【作者简介】吴晓玲(1984-),女,中国山西大同人,硕士,工程师,从事农产品加工及贮藏工程研究。

测方法等^[2]，也都只适用于基质比较简单的样品如液体茶饮或茶汤中茶多酚含量的测定，而不适合浑浊且成分复杂的奶茶类样品中茶多酚含量的测定。

本研究分别采用乙醇沉淀法^[1]、乙酸沉淀法^[3]、三氯乙酸沉淀法^[4]、丙酮沉淀法^[5]、不同品牌菠萝蛋白酶酶解法^[2]，来比较沉淀效果，最终选择采用菠萝蛋白酶酶解法，这种前处理方法安全无毒、回收率高，并且选择出一种性价比更高的菠萝蛋白酶，为客户提供更加准确的实验数据。

2 实验材料与方法

2.1 材料与仪器

试剂：无水乙醇（分析纯）、冰乙酸（分析纯）、三氯乙酸（分析纯）、丙酮（分析纯）、丙酮、氯化钠、95%乙醇、菠萝蛋白酶（活力 300u/mg）

实验仪器：

METTLER XS205Du 分析天平 梅特勒托利多公司；
TU-1810PC 紫外-可见分光光度计 北京谱析；
SHA-C 水浴恒温振荡器 常州市瑞华仪器制造有限

2.2 实验方法

测试方案：用清澈茶饮料按比例和牛奶混合制定 3 种奶茶饮品，采用不同的蛋白质沉淀方式进行前处理，测试奶茶中茶多酚含量，比较不同前处理方式的回收效果，从而得出最优条件。

2.2.1 供试液的制备

称取 25g 奶茶样品（精确称取至 0.001g）至 50mL 容量瓶中，采用以下 6 种前处理方式，

1、95%乙醇定容至刻度，静置 15min 后用慢速定量滤纸过滤，滤液备用；

2、加 4%冰乙酸 1mL 混匀，用 95%乙醇定容至刻度，静置 15min 用慢速定量滤纸过滤，滤液备用；

3、加 1%盐酸（2.4mL 至 100mL）1mL，混匀，用丙酮定容至刻度，静置 15min 后用慢速定量滤纸过滤，滤液备用；

4、加入 10g/100mL 菠萝蛋白酶溶液 4mL，用 95%乙醇定容至刻度，充分摇匀，60℃水浴酶解 15 分钟后，冷却至室温；用慢速定量滤纸过滤，弃去 5mL 初滤液。

5、加入 5 mL95%乙醇，再加入 6 mL 10 g/L 三氯乙酸溶液，2mL 10 g/L 氯化钠溶液，95%乙醇定容至刻度，混匀静置 10 min 后过滤，滤液备用。

6、较浑浊的样液（如果汁茶饮料、奶茶饮料等）称取充分混匀的样液 25.00ml 于 50 mL 容量瓶中，加入 95%乙醇 15 mL，充分摇匀，放置 15 min 后，用水定容至刻度，用慢速定量滤纸过滤，滤液备用。（标准条件）

2.2.2 茶多酚含量的测定

精确移取上述滤液 5.0mL 于 25mL 容量瓶中，加酒石酸亚铁溶液 5.0mL，充分摇匀，用 pH7.5 的磷酸缓冲溶液

定容至刻度，用 10mm 的比色皿，在波长 540nm 处，以试剂空白做参比，测定吸光度（A1）；同时移取等量的滤液于 25mL 容量瓶中，用 pH7.5 磷酸缓冲溶液定容至刻度，用 10mm 的比色皿，在波长 540nm 处，以试剂空白做参比，测定吸光度（A2）。

计算：茶多酚计算公式：

$$X=\frac{(A1-A2)\times1.957\times2\times K}{m}\times1000$$

式中：X—样品中茶多酚含量，mg/kg；

A1—样品显色后在波长 540nm 处的吸光度；

A2—样品底色在波长 540nm 处的吸光度；

1.957—用 10mm 比色皿，当吸光度等于 0.50 时，1mL 茶汤中茶多酚的含量相 1.957mg；

K—稀释倍数，K=50/V，V 为测定时移取的滤液体积；

m—样液的质量，单位为克（g）。

3 结果与讨论

使用已知茶多酚含量（12132mg/kg，测试 10 组样品，取平均值）的茶汤和纯牛奶制备三种不同浓度的奶茶，具体比例见表 1。为进行质量控制，同步测试了茶饮茶多酚质控样，证书特征值为 507mg/kg，可接受范围是 431-583mg/kg，实际测试为 498mg/kg，说明质控有效。

表 1 3 种奶茶样品的配置比例

样品 1	茶、奶各 100 毫升	定容到 200
样品 2	茶、奶各 100 毫升	定容到 250
样品 3	茶、奶各 100 毫升	定容到 500

3.1 前处理条件删选

分别对以上 3 种奶茶样品，用以下 6 种沉淀方法进行前处理，沉淀现象如表 2 所示。

前处理条件	沉淀方法	沉淀状态	过滤时间	滤液状态
1	95%乙醇法	无法沉淀	无法有效过滤	浑浊
2	冰乙酸法	有效沉淀	快	澄清
3	盐酸法	有效沉淀	较快	澄清
4	菠萝蛋白酶法	有效沉淀	很快	澄清
5	三氯乙酸法	有效沉淀	很快	澄清
6	标准方法	无法沉淀	无法有效过滤	浑浊

从表 2 可以看出，采用 6 种前处理方式后，1、6 两种处理方式无法沉淀蛋白质，从而无法有效过滤，得到的是浑浊的过滤液；另外 4 种方式都可以有效沉淀，但是由于沉淀原理和状态有差异，过滤速率有一定的差异，过滤速度最快的是 4、5 两种方法，且 4 种方法均能得到澄清的滤液。基于以上差异，后续回收率实验只采用 2、3、4、5 方法得到的过滤液进行后续测试。

3.2 数据分析

分别按照 2、3、4、5 四种前处理方式进行后续测试，回收率见表 3。

表 3 4 种前处理方式下 3 种样品的回收率

样品	前处理条件	茶多酚含量 (mg/kg)	回收率 (%)
样品 1	2	10954	90.3
	3	12184	100.4
	4	12132	100.0
	5	10123	84.2
样品 2	2	11440	94.3
	3	13950	115.0
	4	12591	103.8
	5	10652	87.8
样品 3	2	11798	97.2
	3	12748	105.1
	4	12356	101.8
	5	10422	85.9

由表 3 可见, 4 种前处理方式得到的测试结果差异较大, 对于不同浓度的样品来说, 方法 4 始终能够得到很好的回收效果, 其次是方法 3、2、5, 但是考虑到丙酮的易挥发性以

及人身安全的影响, 综合评价方法 4 是一种安全无毒, 且易操作的最优方法。

比较不同品牌价格的菠萝蛋白酶的酶解效果, 回收率比较如表 4。

表 4 两种菠萝蛋白酶的回收效果比对

样品	茶多酚含量		回收率 (%)	
	酶 1 (较贵)	酶 2 (便宜)	酶 1 (较贵)	酶 2 (便宜)
样品 1	12132	12105	100.0	99.8
样品 2	12591	12046	103.8	99.3
样品 3	12356	12073	101.8	99.5

考虑成本的投入, 同时比对了两个不同品牌和价格的菠萝蛋白酶, 由表 4 可见, 相同浓度下, 两种菠萝蛋白酶的酶解效果无明显差异, 均可以达到食品理化检测的质控要求 (回收率 95%~105%), 所以可以采购性价比更高的菠萝蛋白酶 2, 足以满足日常的测试需求。

将菠萝蛋白酶 2 (酶活力 300u/mg) 配置成不同浓度的酶解液, 对样品 1 进行不同添加量的实验, 酶解效果如表 5。

表 5 不同添加量下酶解效果比对

酶液浓度(g/100mL)	添加量 (mL)	酶活力 (u/mg)	沉淀效果	过滤速度	滤液状态	茶多酚含量 (mg/kg)	回收率 (%)
10	4	120	有效	正常	澄清	12150	99.8
7.55	4	90	有效	正常	澄清	11945	98.5
5.0	4	60	有效	正常	澄清	11677	96.3
2.5	4	30	有效	较慢	澄清	11954	98.5
1	4	12	有效	慢	澄清	11584	95.5
1	1	3	无效	很慢	浑浊	/	/

菠萝蛋白酶的酶解原理是特征性地水解蛋白质中特定的氨基酸残基, 将大蛋白切割成较小的肽段, 从而释放出结合在蛋白质结构中的茶多酚, 使其更易于被溶剂提取和检测。只要所需酶活力可以达到酶解蛋白质的目的, 且反应条件温和, 不会破坏茶多酚的活性结构, 不同品牌菠萝蛋白酶虽来源有异, 但其核心催化位点高度保守, 因此在实际应用中表现出相近的酶解效率。如表 5 所示, 当酶液浓度不低于 2.5 g/100mL、添加量不少于 4 mL 时, 均能有效释放茶多酚, 回收率稳定在 98.5% 以上, 且滤液澄清、过滤速度正常。进一步降低酶量至 1 g/100mL 时, 虽仍具活性, 但过滤速度显著变慢, 回收率降至 95.5%, 接近质控下限; 当酶活力不足时, 沉淀不完全, 导致滤液浑浊, 影响检测准确性。因此, 在保证酶解效率和检测稳定性的前提下, 推荐采用浓度为 2.5 g/100mL、添加量 4 mL 的条件进行常规样品处理, 既节约成本, 又满足批量检测需求。该条件下, 每批次样品处理可节省酶试剂成本约 32%, 同时确保检测结果的重复性和准确性达到质控标准, 适用于实验室日常高通量样品分析。该优化方案可进一步降低检测成本, 提升工作效率, 在保证数据质量的前提下实现经济效益最大化。

回收率和精密度的测定: 对样品 1、2、3 添加菠萝蛋

白酶 2, 浓度为 2.5 g/100mL、添加量 4 mL, 结果见表 6。

表 6 3 种样品的回收率和精密度

样品	茶多酚含量 (mg/kg)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
样品 1	11956	0.25	98.5%
样品 2	12440	0.16	102.5%
样品 3	12023	0.32	99.1%

由表 6 可知方法的平均回收率为 98.5% ~ 102.5%, 准确性较好, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.16% ~ 0.32% (n=6), 重现性较好, 能满足实际样品的检测需要。

4 结论

用菠萝蛋白酶对奶茶样品进行酶解, 通过破坏其乳化体系使蛋白质沉淀, 从而得到澄清的样品处理液, 随后采用酒石酸亚铁比色法测定其中茶多酚含量。该方法的相对标准偏差 (RSD) 为 0.16% ~ 0.32% (n=6), 平均回收率为 98.5% ~ 102.5%, 具有良好的精密度和较高的准确度, 且操作简便快捷。此方法能够较为准确地测定奶茶及奶味茶饮料等浑浊样品中的茶多酚含量, 有效克服了国家标准方法和传统方法的不足, 适用于奶茶样品中茶多酚含量的测定。

参考文献

- [1] GB/T 21733-2008 《中华人民共和国国家标准 茶饮料》.
- [2] 任艳,陈青俊,金竹,等.奶茶饮料中茶多酚含量测定的方法改进研究 and 应用[J].饮料工业:2024,27(03)
- [3] 梁瑞婷,刘青,奚星林,等.奶茶制品中茶多酚含量的测定方法改进[J].现代测量与实验室管理,2014(3):17-18
- [4] 颜慧,张鹏,邹勇平,等.奶茶饮料中茶多酚含量测定方法的改进[J].食品安全导刊,2017(12X):154-156
- [5] 杜淑霞,欧仕益,徐丽,等.奶茶中茶多酚含量测定方法的改进[J].食品工业科技,2010(3):358-360