绿茶浓缩汁中不可逆沉淀形成的研究

许勇泉[1,2]，陈根生[1]，胡雄飞[1,2]，杜祺珍[2]，洪志勇[1,2]，尹军峰[1]
（1. 国家茶产业工程技术研究中心，中国农业科学院茶叶研究所，浙江杭州 310008）
（2. 浙江工商大学食品与生物工程学院，浙江杭州 310035）

摘要：为研究绿茶浓缩汁中不可逆沉淀的化学组成及其形成过程，本文分析了茶浓缩汁中不可逆沉淀与可逆沉淀的主要化学组成，及低温条件下不同贮藏阶段（0~20 d，20~180 d，180~250 d）不可逆沉淀与可逆沉淀的形成情况。研究结果表明，不可逆沉淀含有大量金属元素和草酸根离子，而可逆沉淀主要由茶多酚、碳水化合物、咖啡碱、蛋白质及黄酮化合物组成；浓缩汁沉淀以可逆沉淀为主，不可逆沉淀较少；随着贮藏时间延长，沉淀量逐渐增加，但大部分可逆与不可逆沉淀都在 0~20 d 形成；元素 Mg、Mn、Ga、Ni 和 Zn 主要是在 0~20 d 参与不可逆沉淀形成，Fe 和 Cu 主要在 20~180 d，而 Al 和 Ca 主要是在 180~250 d。另外，本文还验证了鞣花酸能与蛋白质结合产生不可逆沉淀。本文结果说明绿茶浓缩汁不可逆沉淀主要是不溶性草酸盐。

关键词：绿茶浓缩汁；不可逆沉淀；形成；化学组成
文章篇号：1673-9078(2014)1-33-37

Irreversible Sediment Formation in Green Tea Concentrate

XU Yong-quan[1,2], CHEN Gen-sheng[1], HU Xiong-fei[1,2], DU Qi-zhen[2], HONG Zhi-yong[1,2], YIN Jun-feng[1]
(1.Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)
(2.College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: In order to study the chemical constitutes and forming process of irreversible sediment in green tea concentrate, the main chemical components and the forming of irreversible and reversible sediment at different storage periods (0~20 d, 20~180 d, 180~250 d) under low-temperature conditions were studied and compared. The results showed that irreversible sediment contained large amounts of mineral elements and oxalic ion, while reversible sediment was comprised of polyphenols, carbohydrates, caffeine, protein and flavones. Most of sediment in green tea concentrate was reversible tea sediment. During storage of green tea concentrate, sediment contents increased, and most of the reversible and irreversible tea sediment were formed during 0~20 d. Elements as Mg, Mn, Ga, Ni and Zn mainly were participated in the formation of irreversible sediment during 0~20 d, Fe and Cu were during 20~250 d, and Al and Ca were during 180~250 d. In addition, the combination of ellagic acid and protein were also confirmed to form irreversible sediment. This research revealed that irreversible sediment was mainly composed by insoluble oxalates.

Key words: green tea concentrate; irreversible sediment; forming; chemical constitute

近年来，我国茶饮料呈快速增长的趋势，从2007年的500万t到2011年的1200万t，约占同期全国液体饮料的10%，年均增长超过20%[1]。然而，我国茶饮料仍然面临沉淀问题的困扰，特别是茶浓缩汁，由于其相对速溶茶粉而言加工过程中没有经过高温干燥处理，风味品质更好地得到保留，加工成本也更低，但是贮藏过程中沉淀产生一直无法得到有效解决。

绿茶浓缩汁贮藏过程中产生的沉淀主要由黑色的可逆沉淀和白色的不可逆沉淀组成[2]，其中可逆沉淀为主体，但是由于不可逆沉淀无法通过加热升温重新溶解，具有不可逆性，严重影响茶浓缩汁中有效成分的利用。对于此类沉淀，目前国内外茶饮料企业主要采用物理去除方法进行解决，不仅大量损失茶叶功能性成分，降低其保健价值，而且会造成茶汁外观品质和内质风味的明显下降，然而相关研究较少。

咖啡碱、蛋白质、茶多酚、黄酮化合物及钙离子等化学组分被报道是绿茶沉淀的主要组成成分，其中咖啡碱与酯型儿茶素是绿茶沉淀形成的关键化学成分

收稿日期：2013-09-13
基金项目：国家自然科学基金项目（31070615）；浙江省茶产业技术创新战略联盟专项资金项目（2010LM201-16）及浙江省茶叶加工工程重点实验室开放课题（2010K1004）
作者简介：许勇泉（1983-），男，助理研究员，在读博士研究生，主要从事茶叶加工与茶叶化学研究
通讯作者：尹军峰（1968-），男，研究员，主要从事茶叶加工与茶叶化学研究

[3]。Niino 等[4]采用 Diaion HP-20 色谱柱分离绿茶饮料沉淀物，发现鞣花酸可与蛋白质结合形成不可逆的沉淀物。有研究[5]指出单宁成分（水解单宁）会与蛋白质形成强烈而不可逆的结合，而茶汤中的多酚类物质（缩合单宁）并没有这种能力。我们前期研究发现，在高浓度（30~60 Brix）的绿茶浓缩汁中[2]，贮藏过程中有肉眼可见的白色的不可逆沉淀产生，通过分析发现不可逆沉淀中含有大量的金属元素，包括钙、镁、锰和锌等，还初步提出不可逆沉淀含量受茶汁中酯型儿茶素、咖啡碱、钙、锰、钠等含量的影响[6]，然而对其形成原因和形成过程却不明确。因此，本实验开展绿茶浓缩中不可逆沉淀化学组成及其形成过程研究，为揭示茶汤沉淀的形成机理和探索有效调控手段提供理论指导。



图 1 绿茶浓缩汁不可逆沉淀

Fig.1 Irreversible sediment separated from green tea concentrate

1 材料与方法

1.1 茶叶原料

福鼎大白茶鲜叶原料（1 芽 3、4 叶）于 2010 年 5 月在武义汤记高山茶业有限公司经摊放、杀青、揉捻、烘干，加工成传统烘青绿茶，4 ℃低温冷藏待用。

1.2 茶浓缩汁制备、贮藏及沉淀分离

茶叶→浸提（茶水比 35 g:350 mL，时间 30 min，温度 75 ℃）→粗滤（双层，300 目滤布）→冷却（水冷，至室温）→精滤（离心 4000 r/min，10 ℃，15 min）→旋转蒸发浓缩（固形物浓度达到 30%，*m/V*）→灭菌（95 ℃，5 min）→灌装（于 50 mL 离心管中灌装 45 mL，每个处理灌装 6 支）→4 ℃低温冷藏→分别于不同贮藏阶段取出浓缩汁样品→离心分离沉淀（8000 r/min，4 ℃，15 min）→倒出浓缩汁上清液，得底部沉淀（茶汁总沉淀）→添加 60 ℃纯水到离心管中至 45 mL 刻度→60 ℃水浴搅拌 30 min，溶解可逆沉淀→冷却至室温→离心分离沉淀（8000 r/min，4 ℃，15 min）→倒出上清液，定容至 45 mL，获得可逆沉淀溶液，底部沉淀物为不可逆沉淀；将可逆沉淀与不可逆沉淀（图 1）通过冷冻干燥后分析化学组成

浓缩汁于贮藏 20 d 后分离出底部沉淀 A（0~20 d），上清液继续低温冷藏直到 180 d 后分离出底部沉淀 B（20~180 d），上清液继续低温冷藏直到 250 d 后分离出底部沉淀 C（180~250 d），底部沉淀进一步分离成可逆沉淀和不可逆沉淀。

以上每个处理制备 6 支离心管茶汤样品（重复），其中 3 支离心管茶汤样品用于分析茶汁可逆沉淀量与不可逆沉淀量，3 支离心管茶汁样品用于分析可逆与不可逆沉淀化学组成。

1.3 可逆沉淀与不可逆沉淀分离

茶浓缩汁经低温贮藏后产生冷后浑，冷后浑经过一定时间的沉降后形成沉淀，部分沉淀在 60 ℃下水浴 30 min 后可重新溶解形成茶汤，即为可逆沉淀，而不能加热重新溶解的沉淀即为不可逆沉淀。

1.4 茶汁沉淀量测定

茶汤经离心后，倒出上清液，得底部沉淀，底部沉淀进一步分离成可逆沉淀与不可逆沉淀，然后用纯水分别将沉淀洗出至蒸发皿中，先蒸干，然后于 105 ℃下烘干，冷却，称量，计算得可逆沉淀量与不可逆沉淀量。

1.5 茶汤与沉淀中化学成分分析

1.5.1 茶多酚、黄酮化合物、碳水化合物及蛋白质含量测定

茶多酚含量采用酒石酸亚铁比色法[7]，黄酮化合物总量测定采用三氯化铝比色法[7]，碳水化合物采用蒽酮比色法[7]，蛋白质采用 Bradford 酶标仪比色法[8]。

1.5.2 金属元素及 C、N 元素含量测定

金属离子含量检测采用 ICP-OES 检测[9]，分析条件如下：检测器：CID，低波长最大间隔时间：15 s；高波长最大间隔时间：5 s；喷雾器压力：193 kPa；泵速率：100 r/min；辅助气体：中速（1 L/min）；RF 功率：1150 W。并在每种金属有其特定的分析波长下，测定各标准液，试剂空白及样品，计算样品中所测元素的含量。C、N 元素含量测定采用德国的碳氮元素分析仪 Vario MAX 测定。

1.5.3 儿茶素及咖啡碱含量测定

用 0.22 μm 微孔滤膜（有机膜）过滤，滤液待检测。Waters E2695 高效液相色谱仪（Waters 公司生产），VWD 检测器；色谱柱：ZORBAX SB-C18 ODS，5 μm，4.6 mm×250 mm；流动相：A 为 0.5%甲酸，流动相 B 为 100%乙腈，流速 1 mL/min，柱温 40 ℃，检测波长 280 nm，进样量：10 μL，梯度洗脱，流动相 B 在 16 min 内由 6.5%线性梯度变化到 25%，25 min 回到初始状

态，平衡 10 min。

1.6 数据分析

结果以平均值表示，每个处理采用三个重复，标准偏差分析等采用 SPSS 11.5 分析软件。

2 结果与讨论

2.1 可逆沉淀与不可逆沉淀化学组成比较

表 1 绿茶浓缩汁中可逆沉淀与不可逆沉淀的化学组成

Table 1 Chemical components of reversible and irreversible tea sediment in green tea concentrate after storage

Num	Element		Irreversible tea sediment	Reversible tea sediment
1	Al	mg/kg	3002.42±30.19[a]	802.23±73.12[b]
2	Ca		15464.97±4561.11[a]	194.43±12.33[b]
3	Cu		438.23±53.41[a]	11.02±2.45[b]
4	Fe		221.69±5.05[a]	55.72±9.18[b]
5	Ga		10905.09±389.15[a]	253.95±18.24[b]
6	Mg		35940.56±3422.44[a]	1509.37±141.74[b]
7	Mn		15215.13±601.46[a]	415.59±16.13[b]
8	Zn		1214.54±28.09[a]	35.23±4.78[b]
9	P		2940.32±419.11[a]	2005.45±243.60[b]
10	S		2591.48±68.32[a]	9488.45±325.14[b]
11	C	%	20.78±0.06[a]	49.95±0.21[b]
12	N		1.04±0.02[a]	4.83±0.18[b]
13	茶多酚		/	42.56±0.37
14	黄酮化合物		/	4.77±0.30
15	咖啡碱		/	10.82±0.04
16	蛋白质		/	8.17±0.40
17	碳水化合物		/	24.17±0.75
18	草酸根($C_2O_4^{2-}$)		44.14±2.35[a]	2.09±0.88[b]

注：Data are means (± SD) of 3 replicates. [a,b]The same letters in a row are not significantly different (P≥0.05)。

绿茶浓缩汁低温贮藏过程中容易产生大量的沉淀，其中大部分沉淀是可逆沉淀，而少量沉淀是不可逆沉淀，两者化学组成具有显著差异，如表 1 所示。不可逆沉淀中的 Al、Ca、Cu、Fe、Ga、Mg、Mn、Na、Zn 和 P 含量显著高于可逆沉淀中的含量，而 K、S、C 和 N 含量显著低于可逆沉淀中的含量。不可逆沉淀中主要金属离子含量达到 9.13%，显著高于可逆沉淀中的含量 2.64%，其中 Ca（1.55%）、Mg（3.59%）、Mn（1.52%）、Ga（1.09%）含量都超过 1.0%。不可逆沉淀中含有大量的草酸根（$C_2O_4^{2-}$），含量达到 44.14%，是可逆沉淀中的 20 多倍。因此，我们推测不可逆沉淀主要是由不溶性草酸盐组成，主要包括草酸钙、草酸镁、草酸锰和草酸镓，全部按草酸钙计算，草酸盐占到不可逆沉淀总量的 65%。其中部分草酸盐可能是以水合物存在的，如草酸钙单水合物、草酸镁二水合物等。白色不可逆沉淀也曾被报道出现在胡萝卜汁中[10]，通过分析发现主要是由草酸盐、苹果酸盐和柠檬酸盐组成。浓缩汁中可逆沉淀主要以茶多酚、碳水化合物、咖啡碱、蛋白质和黄酮化合物等为主，而不可逆沉淀由于溶解性问题，检测不到这些成分的含量。P、S 及 N 元素是如何参与不可逆沉淀形成的，还有待进一步分析。尽管不可逆沉淀与可逆沉淀的化学组成具有很大差异，但是这些差异是如何形成的，我们将作进一步分析。

2.2 不同贮藏阶段不可逆沉淀的形成

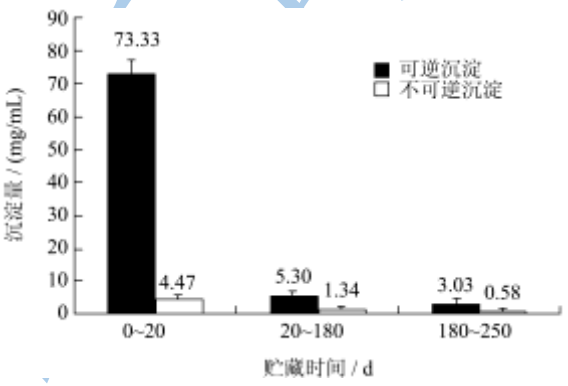


图 2 不同阶段绿茶浓缩汁沉淀量

Fig.2 Sediment amount in green tea concentrate during different storage periods

在长期低温贮藏过程中，可逆沉淀与不可逆沉淀的形成过程具有显著区别。在 250 d 的贮藏期内，我们将浓缩汁沉淀分三阶段（0~20 d，20~180 d，180~250 d）进行分离，随着贮藏时间的延长，沉淀量呈逐渐增加的趋势，但是大部分可逆沉淀（89.79%）和不可逆沉淀（70.01%）都是在贮藏期第一阶段（0~20 d）形成，而第二阶段（20~180 d）和第三阶段（180~250 d）形成量较少（图 2）。可逆沉淀三个阶段形成量分别为 89.79%、6.4%和 3.72%，而不可逆沉淀三个阶段形成量分别为 70.01%、20.93%和 9.06%。相对而言，可逆沉淀形成速度更快，而不可逆沉淀形成速度相对缓慢。

不同金属元素参与可逆沉淀及不可逆沉淀形成的过程明显不同（表 2）。元素 Al、Ca 都是随着贮藏期的延长，参与不可逆沉淀的浓度升高，元素 Cu 和 Fe 则具有先增后降的趋势，而 Ga、Mg、Mn、Ni 和 Zn 是呈逐渐下降的趋势。因此，可见元素 Al、Ca 主要是贮藏后期参与不可逆沉淀形成，元素 Fe 和 Cu 主要在中后期参与，而元素 Ga、Mg、Mn、Ni 和 Zn 主要

是在贮藏前期参与不可逆沉淀的形成。而这些元素在可逆沉淀中大部分随着贮藏时间的延长呈下降趋势，只有 Cu 和 S 略有上升；说明不可逆沉淀中金属元素有一部分是来自于可逆沉淀。

表 2 可逆沉淀与不可逆沉淀在不同贮藏阶段的形成情况（mg/kg）

Table 2 Formation of reversible and irreversible tea sediment in green tea concentrate during different storage periods

Component		Irreversible sediment			Reversible sediment		
		0~20 d	20~180 d	180~250 d	0~20 d	20~180 d	180~250 d
1	Al	1281.21±22.77^{a}	2541.33±16.23^{b}	18775.46±2213.12^{c}	1326.51±52.43^{a}	1132.23±29.90^{b}	957.03±11.21^{c}
2	Ca	5206.40±73.35^{a}	11625.21±177.43^{b}	29600.32±3408.60^{c}	582.51±55.02^{a}	595.40±173.19^{a}	550.08±15.31^{a}
3	Cu	94.90±5.03^{a}	646.01±168.42^{b}	357.82±5.00^{c}	30.91±0.05^{a}	45.33±4.04^{b}	45.08±2.40^{b}
4	Fe	335.22±12.68^{a}	495.45±18.20^{b}	444.44±7.08^{c}	212.62±20.15^{a}	164.08±27.27^{b}	122.45±11.67^{c}
5	Ga	28965.08±488.21^{a}	14420.24±240.55^{b}	1110.02±204.56^{c}	933.09±50.43^{a}	457.67±4.88^{b}	266.07±70.56^{c}
6	Mg	71435.31±3670.87^{a}	43585±1068.33^{b}	3724.29±103.69^{c}	4329.25±78.89^{a}	2783.02±168.41^{b}	1884.84±43.50^{c}
7	Mn	34216.33±487.29^{a}	20635.08±544.10^{b}	1746.40±292.22^{c}	1528.10±74.33^{a}	810.59±36.00^{b}	475.37±76.81^{c}
8	Ni	126.03±7.32^{a}	99.24±8.46^{b}	10.19±5.45^{c}	20.04±1.23^{a}	15.34±3.29^{b}	15.55±1.21^{b}
9	Zn	4423.34±258.20^{a}	3263.15±768.46^{b}	126.25±13.29^{c}	249.20±14.18^{a}	155.48±43.25^{b}	88.39±14.56^{c}

注：Data are means (± SD) of 3 replicates. $^{a, b, c}$ The same letters in a line are not significantly different ($P \geq 0.05$)

2.3 鞣花酸参与不可逆沉淀形成

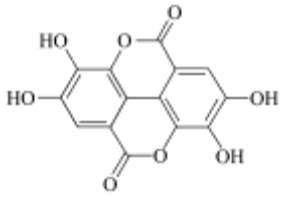


图 3 鞣花酸分子式

Fig.3 Molecular formula of ellagic acid

有研究报道[3]，绿茶饮料中木麻黄素（Strictinin）受热水解产生的鞣花酸（Ellagic acid）会与蛋白质结合产生不可逆沉淀。然而，由于不可逆沉淀不易溶解于水，因此也无法直接分析不可逆沉淀中的鞣花酸和蛋白质。鞣花酸是一种天然多酚组分，是没食子酸的二聚衍生物（图 3），是一种多酚二内酯，不仅能以游离的形式存在，而且更多的是以缩合形式（如鞣花单宁、苷等）存在于自然界[11]。本研究通过比较鞣花酸与蛋白质（BSA）、绿茶汁反应前后含量的变化，从而验证鞣花酸确实可以与蛋白质（BSA）和茶汤中水溶性蛋白结合产生不可逆沉淀。从图 4 可见，鞣花酸（图 4a）与蛋白质（BSA）、绿茶汁反应后，含量大幅度下降，分别下降了 96.58%（图 4b）和 42.23%（图 4c）。因此，初步验证了鞣花酸与蛋白质结合产生不可逆沉淀。由于鞣花酸的水解前体木麻黄素在普通绿茶中含量也只有 0.6%左右[3]，因此其不是产生不可逆沉淀的主要化学成分。木麻黄素在乌龙茶和红茶做青和发酵等加工过程中容易发生反应而消失[3]，因此其在茶饮料加工过程中不容易出现并产生不可逆沉淀。有研究报道[12]，鞣花酸及鞣花单宁也是葡萄中的重要酚类物质，其同样会引起葡萄酒中不可逆沉淀的产生。

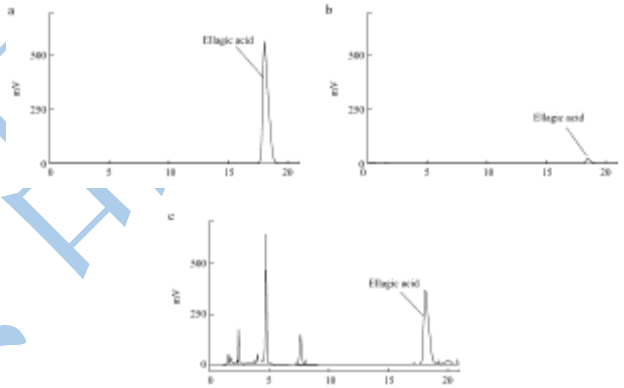


图 4 鞣花酸与牛血清蛋白和茶汤蛋白结合前后的液相色谱图

Fig.4 HPLC profiles of ellagic acid after combining with BSA and protein in green tea infusion

注：a 是鞣花酸结合前，b 是鞣花酸与牛血清蛋白结合后，c 是鞣花酸与茶汤蛋白结合后，a、b、c 峰面积分别为 17929741 mV、613034 mV 和 10357693 mV。

3 结论

3.1 本研究通过比较不可逆沉淀与可逆沉淀的化学组成及其不同贮藏阶段的形成情况，初步明确不可逆沉淀主要是由不溶性草酸盐组成，包括草酸钙、草酸镁、草酸锰、草酸镓等；而可逆沉淀主要是由茶多酚、碳水化合物、咖啡碱、蛋白质及黄酮化合物等相互结合产生。

3.2 随着贮藏时间的延长，可逆沉淀量与不可逆沉淀量都呈逐渐增加趋势，但是大部分可逆沉淀（89.79%）与不可逆沉淀（70.01%）都是在贮藏期第一阶段（0~20 d）形成的，而在贮藏中后期（20~250 d）沉淀形成速

度明显放缓。

3.3 本研究初步验证了鞣花酸与蛋白质结合可以产生不可逆沉淀。然而，由于茶汤中鞣花酸含量很低，其与蛋白质结合产生的沉淀并不是茶浓缩汁不可逆沉淀的主体成分。

参考文献

[1] 赵亚利.中国茶与咖啡饮料发展趋势探讨[J].中国饮料,2012,6:100-102
ZHAO Ya-li. Analysis of the Development Trend of Tea and Coffee Beverage in China [J]. China Beverage, 2012, 6: 100-102

[2] XU Yong-quan, CHEN Su-qin, YUAN, Hai-bo, et al. Analysis of Cream Formation in Green Tea Concentrates with Different Solid Concentrations [J]. Journal of Food Science and Technology, 2012, 49(3): 362-367

[3] XU Yong-quan, CHEN Su-qin, SHEN Dan-yu, et al. Effects of Chemical Components on the Amount of Green Tea Cream [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(6): 969-974

[4] NIINO Hitoshi, SAKANE Iwao, OKANOYA Kazunori, et al. Determination of Mechanism of Flock Sediment Formation in Tea Beverages [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53: 3995-3999

[5] 杨贤强,王岳飞,陈留记.茶多酚化学[M].上海:上海科学技术出版社,2003
YANG Xian-qian, WANG Yue-fei, CHEN Liu-ji. Tea Polyphenols Chemistry [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2003

[6] XU Yong-quan, CHEN Gen-shen, WANG Qiu-shuang, et al. Irreversible Sediment Formation in Green Tea Infusions [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(3): 298-302

[7] 钟萝.茶叶品质理化分析[M].上海:上海科学技术出版社,1989
ZHONG Luo. Methods of Chemical and Physical Evaluation of Tea Quality [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989

[8] ZHU Shao-hua, JIN Jing, WANG Yan, et al. The Endoplasmic Reticulum Stress Response is Involved in Apoptosis Induced by Aloe-emodin in HK-2 Cells [J]. Food chemistry Toxicology, 2012, 50: 1149-1158

[9] 余优军,吕飞,杨培玉,等.微波消解 ICP-MS 法同时测定凉茶中的六种重金属元素[J].现代食品科技,2012,28(11):1603-1605
YU You-jun, LV Fei, YANG Pei-yu, et al. Simultaneous Determination of 6 Heavy Meta Elements in Herbal Tea by ICP-MS with Microwave Digestion [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(11): 1603-1605

[10] 肖维,张燕,吴继红,等.胡萝卜汁中白色沉淀主要成分的分析和鉴定[J].食品工业科技,2008,29(9):73-76
XIAO Wei, ZHANG Yan, WU Ji-hong, et al. Analysis and Identification of Major Components in White Sediment from Carrot Juice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(9): 73-76

[11] 刘振平,陈祥贵,彭海燕,等.RP-HPLC 法测定石榴汁中的 4 种多酚类成分[J].中国食品学报,2013,1:183-187
LIU Zhen-ping, CHEN Xiang-gui, PENG Hai-yan, et al. Determination of Four Polyphenols in the Pomegranate Juice by RP-HPLC [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 1: 183-187

[12] LEE, Joon-hee, TALCOTT Stephen T. Ellagic acid and Ellagitannins Affect on Sedimentation in Muscadine Juice and Wine [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(14): 3971-3976