

文章编号:1001-6880(2016)10-1607-06

柿叶茶及其加工过程中体外抗氧化活性研究

韩卫娟,杜改改,孙 鹏,刁松锋,傅建敏*

国家林业局泡桐研究开发中心 中国林业科学研究院经济林研究开发中心,郑州 450003

摘要:为了了解柿叶茶的抗氧化活性及其加工过程中的变化,采用DPPH[·]、ABTS^{·+}、还原能力(Fe^{3+} 和 Cu^{2+})和金属络合能力(Fe^{2+} 和 Cu^{2+})等方法进行体外抗氧化活性检测,同时采用分光光度法对加工过程中黄酮、总酚含量变化规律进行研究。结果表明,柿叶茶具有显著的抗氧化活性,主要通过清除自由基、络合过渡金属离子这两种途径实现;杀青、浸泡、做形、晾干和炒制等步骤不同程度提高了柿叶茶抗氧化活性,其中炒制后ABTS^{·+}清除和 Cu^{2+} 还原能力显著提高,DPPH[·]清除、 Fe^{3+} 还原、 Cu^{2+} 络合能力与柿叶无显著性差异,但 Fe^{2+} 络合能力显著下降;黄酮、总酚含量炒制后与柿叶无显著性差异,且与抗氧化能力有极显著的相关性,含量越高,抗氧化能力越强。

关键词:柿叶茶;加工过程;抗氧化活性;黄酮;总酚

中图分类号:S665.2;S713

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.020

Antioxidant Activity of Processed Persimmon (*Diospyros*) Tea Leaves

HAN Wei-juan, DU Gai-gai, SUN Peng, DIAO Song-feng, FU Jian-min*

Non-timber Forestry Research & Development Center, Chinese Academy of Forestry; Paulownia Research

& Development Center of China, State Forestry Administration, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Antioxidant activity of processed persimmon (*Diospyros*) leaves was determined by DPPH, ABTS free radical scavenging, reducing power (Fe^{3+} and Cu^{2+}), and metal-chelating assays (Fe^{2+} and Cu^{2+}). Total flavonoids and polyphenols contents were also determined spectrophotometrically. Persimmon leaf tea showed excellent *in vitro* antioxidant activity as determined by both chelating metal ions and scavenging free radicals. Processing steps (fixation, infusion, shaping, drying and frying) improved the antioxidant activity of persimmon (*Diospyros*) tea leaves to different extent depending on the assay. Thus, the ABTS^{·+} scavenging ability and the Cu^{2+} -reducing power were significantly improved by processing; whereas, the Fe^{2+} -chelating ability was significantly decreased. On the other hand, the DPPH[·] scavenging ability, the Fe^{3+} -reducing power, and the Cu^{2+} -chelating ability of persimmon leaves were not affected by tea processing. There were no significant differences in total flavonoids and polyphenols contents between fresh and processed persimmon tea leaves, and values were significantly correlated with antioxidant activity.

Key words: persimmon (*Diospyros*) leaf tea; manufacturing processes; antioxidant activity; flavonoids; polyphenols

人体在氧的利用过程当中,会因各种因素而产生活性氧及其它自由基,生理状态下,它们会被人体内抗氧化酶类清除^[1]。日益恶化的自然环境以及高强度、快节奏的生活,导致越来越多的现代人步入亚健康状态,从而致使体内抗氧化酶类物质和超氧化物歧化酶等活性下降,引起自由基过量堆积,破坏生物膜,损伤细胞功能,进而出现衰老乃至疾病^[2]。研究表明,通过补充外源性抗氧化剂或能恢复机体内源性抗氧化水平的药物可以改善这一状况^[3]。

近年来,由于合成抗氧剂的潜在毒性,天然抗氧化剂的开发利用已成为新的发展方向^[4]。许多天然植物中富含抗氧化成分,能有效的避免人工合成的抗氧化剂的潜在毒性^[5],在崇尚自然、回归自然的要求下,受到越来越多研究者的青睐。

茶被誉为“万病之药”(唐陈藏器《本草拾遗》),现代研究表明,茶是一种能有效预防多种常见病的保健食品^[3]。我国是世界上最早饮茶和制茶的国家,有悠久的制作保健茶的历史^[6]。柿叶为柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros*)植物的新鲜或干燥叶,多酚、维生素、香豆素等化学成分含量丰富,具有抗氧化、抗菌、止血、活血化瘀、抗癌等多种保健医

疗功效^[7]。以柿叶为原材料开发的柿叶茶是一种传统的保健茶,长期饮用具有抗衰老、降血压、降胆固醇、降血脂、软化血管、抗肿瘤等作用^[8],加之风味独特,柿叶产量巨大,具有广阔的市场开发前景。

目前关于柿叶茶的报道较少,主要集中在采收时期选择、加工工艺研究等方面^[9-11],而少量对柿叶茶抗氧化活性的研究中茶的处理方式以有机溶剂提取为主^[8,12],与柿叶茶实际饮用过程中采用开水浸泡有实质性的差别,此外,柿叶茶加工过程中黄酮、总酚等活性成分以及抗氧化活性变化规律的研究尚未见到文献报道。本研究通过对柿叶茶茶水的抗氧化活性研究,揭示其抗氧化能力,并对加工过程中黄酮、总酚、抗氧化活性变化规律进行研究,分析其变化规律,探讨不同加工步骤对柿叶茶的影响,为柿叶茶的开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品、试剂与仪器

样品:选择完全甜柿品种‘阳丰’柿叶为供试材料,试样采自新乡市原阳县原武镇靳屋村(中国林业科学研究院经济林研究开发中心原阳实验基地),每一单株从东南西北4个方向分别在枝条的中部采集典型叶片,选择生长一致,无病虫害的叶片进行实验。

试剂:DPPH、Trolox、ABTS、Ferrozine、neocuproine、murexide、Folin-ciocalteu 试剂购自美国 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

仪器:紫外可见分光光度计(Agilent CARY300);HT-300BQ 型数控超声波清洗器(济宁恒通超声电子设备有限公司);AL204 电子天平[海特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 实验方法

1.2.1 柿叶茶加工及取样

柿叶采集→挑选、清洗、去杂→杀青→浸泡→整形→晾干→炒制→包装^[13],对加工步骤中的柿叶、杀青、浸泡、整形、晾干、炒制等6个步骤分别取样,低温冷藏带回实验室备用。

1.2.2 柿叶茶抗氧化活性研究

样品提取:精密称取 1.2.1 中柿叶茶成品 0.5000 g,25 mL 开水浸提 5 min,弃去茶叶后 10000 rpm 离心 10 min,上清液-20 ℃保存备用。

抗氧化活性采用 DPPH[·]、ABTS⁺⁺,还原能力(Fe^{3+} 和 Cu^{2+}),金属络合能力(Fe^{2+} 和 Cu^{2+})等体

外活性指标进行测定,其中 DPPH[·] 和 ABTS⁺⁺ 自由基清除能力实验参考韩卫娟的方法^[6],还原能力(Fe^{3+} 和 Cu^{2+})实验参考 Han WJ^[14] 等的方法,金属络合能力(Fe^{2+} 和 Cu^{2+})参考 Li XC^[15] 等的方法。

1.2.3 不同加工步骤中柿叶茶黄酮、总酚含量及抗氧化活性变化规律研究

样品提取:将 1.2.1 中不同加工步骤柿叶茶样品 60 ℃ 干燥至恒重,粉碎后过 0.3 mm 筛。精密称取 2.000 g,用 50 mL 60% 乙醇超声波萃取 30 min,减压抽滤后定容至 100 mL,4 ℃ 冰箱保存备用。

总黄酮含量的测定采用 AlCl_3 -(HAc-NaAc) 显色法^[16],以芦丁为标准品,400 nm 处测定其吸光度,样品中的总黄酮含量以芦丁的含量表示,mg/g (DW)。

总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法^[17],以没食子酸为标准品,765 nm 处测定其吸光度,样品中总酚含量以没食子酸计,mg/g (DW)。

抗氧化活性测定同 1.2.2。

1.3 数据统计与分析

利用 Excel 软件计算平均值、标准偏差等指标;利用 SPSS 20.0 进行方差分析、Turkey HSD 多重比较($P < 0.05$ 水平)和 Pearson 相关分析;采用 Origin 6.0 计算线性回归方程和制图。

2 结果与分析

2.1 柿叶茶抗氧化能力实验

2.1.1 清除自由基活性实验

柿叶茶对自由基的清除作用采用 DPPH[·] 和 ABTS⁺⁺ 法测定。如图 1 所示,柿叶茶具有很强的自由基清除能力,在所给浓度范围内,柿叶茶能显著的清除 DPPH[·] 和 ABTS⁺⁺ 自由基且呈量效关系,清除率为 50% 时所需要的样品量分别为 21.11 μL 和 5.32 μL ,说明清除 ABTS⁺⁺ 自由基的能力 > DPPH[·] 自由基。

2.1.2 还原能力实验

由图 2 可知,柿叶茶能够有效的还原 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} ,且还原力与样品加入量呈正相关,还原率为 50% 时所需的样品量分别为 23.19 μL 和 41.12 μL ,说明还原清除 Fe^{3+} 能力 > Cu^{2+} 离子。由还原能力实验可知,柿叶茶中的某种成分是很好的电子供体,具有良好的还原能力,可以还原氧化过程中的中间氧化产物,因而具有很强的抗氧化能力。

2.1.3 络合能力实验

由图3可知,柿叶茶具有金属络合能力,能够有效的络合 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 离子,络合能力与样品量呈正相关,络合率为50%时所需的样品量分别为300.93 μL 和321.62 μL 。金属离子的络合能力是评价抗氧化活性的一个重要指标,金属离子通过与过氧化

物等活性氧反应生成毒性更大的羟基自由基,引发生物膜发生脂质过氧化反应。由以上分析可知,柿叶茶可以作为抗氧化剂与金属离子发生络合反应,降低介质中金属离子的有效浓度,从而减轻自由基对生物膜的氧化损伤作用。

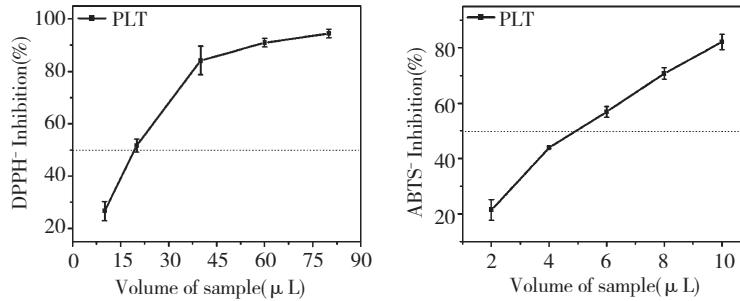


图1 柿叶茶清除DPPH[·]及ABTS⁺[·]自由基能力

Fig. 1 DPPH[·] and ABTS⁺[·] radical-scavenging abilities of persimmon leaf tea

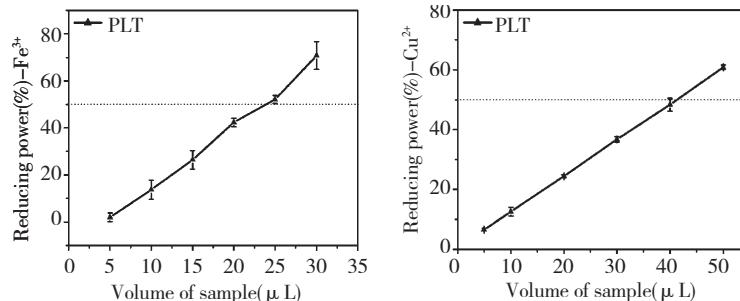


图2 柿叶茶对 Fe^{3+} 及 Cu^{2+} 的还原能力

Fig. 2 Reducing power of persimmon leaf tea on $\text{Fe}^{3+}\rightarrow\text{Fe}^{2+}$ and $\text{Cu}^{2+}\rightarrow\text{Cu}^+$

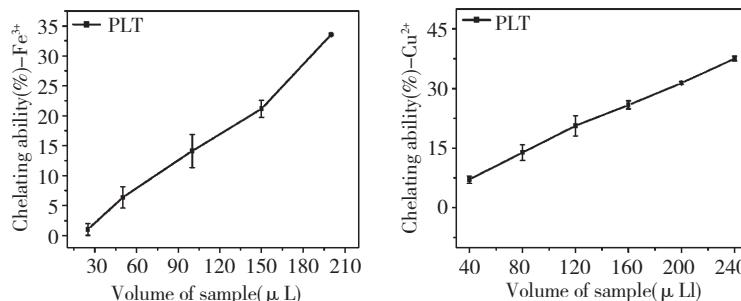


图3 柿叶茶 Fe^{2+} 及 Cu^{2+} 络合能力

Fig. 3 Fe^{2+} and Cu^{2+} chelating ability of persimmon leaf tea

2.2 柿叶茶加工过程中抗氧化能力变化规律

柿叶茶加工过程中清除DPPH[·]和ABTS⁺[·]自由基能力的变化规律如表1所示,杀青、浸泡、做形、晾干等步骤可以显著提高柿叶茶清除DPPH[·]自由基活性,但炒制后其清除能力与柿叶抗氧化能

力无显著性差异;柿叶茶清除ABTS⁺[·]自由基的能力在杀青、浸泡、做形、晾干和炒制过程中均有不同程度的提高,炒制后的柿叶茶成品清除ABTS⁺[·]自由基能力相对于柿叶显著提高。由表1可知,柿叶茶能够有效的还原 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} ,且还原力在加工

过程中有不同程度的提升,炒制后 Fe^{3+} 离子还原能力与柿叶无显著差异, Cu^{2+} 离子还原能力有显著性提高。此外,柿叶茶具有金属络合能力,杀青、浸泡、

做形、晾干等步骤中均可有效的提高其络合能力,但炒制后 Fe^{2+} 离子络合能力显著下降,而 Cu^{2+} 离子络合能力与柿叶无显著性差异。

表 1 柿叶茶加工过程中抗氧化指标变化规律

Table 1 The antioxidant activity of persimmon leaf tea during manufacturing processes ($\mu\text{mol eq. Trolox/g}$)

指标 Assays	柿叶 Persimmon leaves	杀青 Fixation	浸泡 Infusion	做形 Shaping	晾干 Drying	炒制 Frying
DPPH ·	58.85 ± 3.52 ^a	90.51 ± 1.21 ^c	89.96 ± 0.24 ^c	75.11 ± 5.29 ^b	89.66 ± 1.74 ^c	65.24 ± 2.29 ^a
ABTS + ·	110.56 ± 3.89 ^a	227.11 ± 16.37 ^c	238.09 ± 12.59 ^c	154.88 ± 2.73 ^b	248.84 ± 2.69 ^c	137.53 ± 8.94 ^b
Reducing power (Fe^{3+})	93.74 ± 2.39 ^a	207.63 ± 6.13 ^c	199.07 ± 9.15 ^c	123.97 ± 2.02 ^b	210.46 ± 10.03 ^c	103.48 ± 2.76 ^a
Reducing power (Cu^{2+})	124.34 ± 3.12 ^a	324.50 ± 7.53 ^d	292.39 ± 5.38 ^d	172.35 ± 4.56 ^c	315.96 ± 8.06 ^e	142.96 ± 3.27 ^b
Chelating Fe^{2+} *	9.49 ± 0.46 ^a	14.38 ± 0.46 ^c	22.98 ± 1.16 ^d	10.39 ± 0.68 ^{a,b}	11.70 ± 0.22 ^b	5.23 ± 0.56 ^e
Chelating Cu^{2+} *	29.10 ± 3.29 ^a	90.05 ± 3.32 ^d	78.45 ± 0.90 ^c	43.22 ± 0.33 ^b	81.41 ± 1.09 ^c	34.49 ± 2.83 ^a

注:所有数据均平行测定 3 次并进行了方差分析和 Tukey HSD^a 多重比较,同行中 a-e 表示在 5% 多重比较结果,同样的字母表示差异不显著; * 标准物质用柠檬酸钠代替 Trolox。

Note: All values were mean ± SD ($n = 3$). Results were analyzed by ANOVA and Tukey HSD^a. Value with a-e, represented significantly different at $P < 0.05$; * the standard was sodium citrate, instead of Trolox.

2.3 柿叶茶加工过程中黄酮、总酚含量变化规律

柿叶茶加工过程中黄酮、总酚含量变化规律如表 2 所示。不同的加工步骤间黄酮、总酚含量变化规律基本一致,杀青、浸泡、做形、晾干等步骤黄酮、总酚含量与柿叶差异性显著,炒制后黄酮、总酚含量

与柿叶无显著性差异,从柿叶原材料到柿叶茶成品未造成损失,说明加工工艺能很好的保存原材料中黄酮与多酚类物质,不会造成主要活性成分因高温等加工工艺而损失。

表 2 柿叶茶加工过程中黄酮、总酚类物质含量

Table 2 The total flavonoids and polyphenols content of persimmon leaf tea during manufacturing processes

加工过程 Manufacturing processes	黄酮含量 Total flavonoids content (mg/g)		多酚含量 Total polyphenols content (mg/g)
柿叶 Persimmon leaves	6.20 ± 0.47 ^a		82.24 ± 8.17 ^a
杀青 Fixation	17.33 ± 1.11 ^b		219.18 ± 3.85 ^b
浸泡 Infusion	19.79 ± 0.02 ^c		204.72 ± 5.88 ^b
做形 Shaping	9.15 ± 0.83 ^d		116.60 ± 4.54 ^c
晾干 Drying	15.11 ± 0.84 ^e		206.22 ± 9.67 ^b
炒制 Frying	6.55 ± 0.62 ^a		87.92 ± 7.02 ^a

注:所有数据均平行测定 3 次并进行了方差分析和 Tukey HSD^a 多重比较,同列中 a-e 表示在 5% 多重比较结果,同样的字母表示差异不显著。

Note: All values were mean ± SD ($n = 3$). Results were analyzed by ANOVA and Tukey HSD^a. Value with a-e, represented significantly different at $P < 0.05$.

2.4 柿叶茶加工过程中黄酮、总酚与抗氧化能力的相关性分析

柿叶茶加工过程中黄酮、总酚含量与抗氧化能力的相关性分析见表 3,可以看出,柿叶茶的抗氧化

能力(包括 DPPH ·, ABTS + ·, Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 还原能力, Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 络合能力)与黄酮、总酚的含量具有极显著的正相关性,表明黄酮、总酚含量越高,抗氧化能力越强。

表 3 柿叶茶加工过程中总酚、黄酮与抗氧化活性 Pearson 相关性分析

Table 3 Pearson correlation coefficients analysis between antioxidant activity and total flavonoids, polyphenols contents of persimmon leaf tea during manufacturing processes

	DPPH ·	ABTS + ·	Reducing power (Fe^{3+})	Reducing power (Cu^{2+})	Chelating Fe^{2+}	Chelating Cu^{2+}
黄酮 Total flavonoids	0.930 **	0.923 **	0.940 **	0.930 **	0.789 **	0.939 **
多酚 Total polyphenols	0.967 **	0.967 **	0.988 **	0.989 **	0.832 **	0.993 **

注:Pearson 相关性分析中所用数据为各加工步骤对应数值; ** 代表在 0.01 水平上显著差异, * 代表在 0.05 水平上显著差异。

Note: The values used for Pearson analysis were at different sampling time; ** indicated that there was significantly difference at 0.01 level, * indicated that there was significantly difference at 0.05 level

3 结论与讨论

范金波等^[18]的研究表明,维生素C清除DPPH·和ABTS+·自由基的IC₅₀值(半抑制浓度,half-inhibition concentration)分别为0.039、0.21 mg/mL;通过计算可知柿叶茶IC₅₀值分别为0.14、0.35 mg/mL,说明柿叶茶具有很强的清除DPPH·和ABTS+·自由基活性。此外,柿叶茶可以显著的还原氧化过程中的中间氧化产物Fe³⁺和Cu²⁺离子,有效的络合Fe²⁺和Cu²⁺离子,阻断金属离子与过氧化物等活性氧反应生成毒性更大的羟基自由基。综上所述,柿叶茶具有显著的抗氧化能力,主要通过清除自由基、络合过渡金属离子这两种途径实现。因此,柿叶茶作为一种天然的抗氧化剂,长期饮用不仅能够有效的清除体内有害自由基,防止脂质过氧化,防止自由基对生物大分子的氧化损伤,保证细胞结构与功能的正常,并且能有效的避免人工合成的抗氧化剂的潜在毒性。

加工过程中抗氧化活性研究结果表明,柿叶茶清除DPPH·和ABTS+·自由基能力、还原Fe³⁺和Cu²⁺离子能力变化规律基本相似,在杀青、浸泡、做形、晾干和炒制能过程中均有不同程度的提高,炒制后清除ABTS+·自由基和还原Cu²⁺离子能力相对于柿叶显著提高,但DPPH·自由基清除和Fe³⁺离子还原能力与柿叶无显著差异;络合能力在杀青、浸泡、做形、晾干等步骤中也有不同程度的提升,但Fe²⁺离子络合能力经过炒制后较柿叶显著下降,而Cu²⁺离子络合能力与柿叶无显著性差异。

黄酮、总酚类物质是柿叶茶多种保健功能的物质基础,并对柿叶茶的色、香、味品质形成有重要作用^[19]。杀青、浸泡、做形和晾干等加工步骤不同程度的提升了黄酮、总酚含量,一方面可能是由于黄酮、总酚类物质能够耐受100℃的高温而不会分解,另一方面与加工过程增加了柿叶茶细胞破损率,有利于黄酮、多酚类物质的溶出有关。此外,晾干不仅可以使柿叶茶的色、香、味更加醇厚,且不经过高温,能够保持较高的柿叶茶黄酮和总酚含量。柿叶茶炒制后黄酮和总酚含量与柿叶无显著性差异,说明加工工艺能很好的保存原材料中黄酮与多酚类物质,不会造成主要活性成分因高温等加工工艺而损失,此外,炒制时应注意火候和时间,在炒制过程中要不断翻动,防止炒焦、炒糊。

柿叶茶的抗氧化能力(包括DPPH·,ABTS+·,

Fe³⁺和Cu²⁺还原能力,Fe²⁺和Cu²⁺络合能力)与黄酮、总酚的含量具有极显著的正相关性,表明黄酮、总酚含量越高,抗氧化能力越强。文献研究表明,天然抗氧化剂主要来源于植物多酚^[20],黄酮是植物界分布较广泛的一类天然酚类化合物^[21],因此,柿叶茶卓越的抗氧化活性可能主要来源于内含的酚类物质,尤其是黄酮类物质。

我国柿品种近1000种,分布范围广泛,除黑龙江、内蒙、新疆、宁夏和青海等地外,其他省(区)均有柿栽培与分布^[22]。柿资源以果用为主,柿叶虽然在中国已有千年食用历史,但随着人民生活水平的提高,柿叶的食用逐渐被人们遗忘,一般当作饲料或燃料使用,造成了严重浪费,因此,柿叶资源开发利用潜力巨大。关于柿叶茶的研究尚处于起步阶段,不同(品)种柿资源叶片加工成的柿叶茶之间口感及活性成分的比较尚未见到文献报道,今后可在柿属植物资源收集的基础上,系统全面地研究柿叶茶,为柿叶茶的开发和推广奠定理论基础,促进柿产业的健康快速发展。

参考文献

- 1 Ling GT (凌关庭). Antioxidant food and health (抗氧化食品与健康). Beijing: Chemical Industry Press, 2004, 52-60.
- 2 Xie XM (谢学明), Li XC (李熙灿), Zhong YS (钟远声), et al. Study of antioxidant activities of *Plastrum testudinis* in vitro. *China Pharm* (中国药房), 2006, 17: 1368-1370.
- 3 Li L (李磊). Comparative research on antioxidant activity of some kinds of natural antioxidants and antioxidant healthy functions of tea polyphenol. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), MSc. 2008.
- 4 Zhong JJ (钟建军), Chen DM (陈达美), Wang YM (汪言满), et al. The development of extraction of tea polyphenols. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2001, 28(3): 8-10.
- 5 Jiang HB (姜红波), Zhao WX (赵卫星), Wen PH (温普红). Application of natural antioxidants-tea polyphenols. *Appl Chem Ind* (应用化工), 2010, 39: 1578-1581.
- 6 Han WJ (韩卫娟). Protective effect and mechanism of aloeswood tea against hydroxyl radical-induced DNA damage. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), MSc. 2013.
- 7 Han WJ (韩卫娟), Liang YQ (梁玉琴), Zhang JJ (张嘉嘉), et al. Review on the quantitative analysis methods of polyphenols and flavonoids in the leaf of persimmon. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2014, 30(31): 52-56.

(下转第1539页)