DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250929006
引用格式: 张诗琪, 刘延岭, 邓林, 等. 高效液相色谱法检测不同酶促终止方式茶黄素类物质的浓度[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 68–73.
ZHANG SQ, LIU YL, DENG L, *et al*. Detection of the concentration of theaflavins with different enzymatic termination methods by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 68–73. (in Chinese with English abstract).

高效液相色谱法检测不同酶促终止方式茶黄素类物质的浓度

张诗琪[1*], 刘延岭[1], 邓　林[1], 徐　毅[1], 李宇豪[2]
(1. 四川工商职业技术学院轻工工程学院, 都江堰　611800; 2. 西昌学院农业科学学院, 西昌　513401)

摘　要: 目的　分析不同终止方式对茶黄素类物质产量的影响。**方法**　通过马铃薯多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)酶促制备茶黄素, 利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测茶黄素类物质, 分析 6 种不同终止方式对茶黄素类物质产量的影响。**结果**　经过微波中火、微波高火、100 ℃水浴及 3 种抑制剂处理后, 分别对茶黄素类物质浓度进行检测, HPLC 结果显示 100 ℃水浴处理后茶黄素类浓度最高, 其中茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(theaflavin-3,3'-gallate, TFDG)的质量浓度为 32.47 μg/mL, 茶黄素类物质质量浓度为 119.12 μg/mL。**结论**　经过 100 ℃水浴处理后茶黄素类物质的质量浓度最高, 研究结果可对茶黄素的快速检测和工业化生产提供一定的参考价值。

关键词: 茶黄素; 高效液相色谱法; 多酚氧化酶; 酶促反应; 终止条件

Detection of the concentration of theaflavins with different enzymatic termination methods by high performance liquid chromatography

ZHANG Shi-Qi[1*], LIU Yan-Ling[1], DENG Lin[1], XU Yi[1], LI Yu-Hao[2]
(1. *School of Light Industry Engineering*, *Sichuan Technology Business College*, *Dujiangyan* 611800, *China*;
2. *College of Agricultural Sciences*, *Xichang University*, *Xichang* 513401, *China*)

ABSTRACT: Objective　To analyze the effects of different termination methods on the yield of theaflavins. **Methods**　Theaflavins were prepared through the enzymatic action of potato polyphenol oxidase (PPO). A high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was conducted to detect theaflavin compounds. The effects of 6 kinds of different termination methods on theaflavin yield were then analyzed. **Results**　Following treatment with microwave medium power, microwave high power, a 100 °C water bath and 3 kinds of inhibitors, the concentration of theaflavins was measured. The results of the HPLC analysis indicated that the 100 °C water bath treatment resulted in the highest theaflavin content, with theaflavin-3,3'-gallate (TFDG) reaching 32.47 μg/mL and theaflavin substances at 119.12 μg/mL. **Conclusion**　The concentration of theaflavins is highest after treatment in a 100 °C water bath.

收稿日期: 2025-09-29
基金项目: 四川工商职业技术学院自然科学类校级项目(2024NC02)
第一作者/*通信作者: 张诗琪(1998—), 女, 硕士, 实验师, 主要研究方向为功能性食品。E-mail: 724429047@qq.com

The research findings may provide valuable reference for rapid detection and industrial-scale production of theaflavins.

KEY WORDS: theaflavins; high performance liquid chromatography; polyphenol oxidase; enzymatic reaction; terminal condition

0　引　言

茶黄素类物质(theaflavins substances, TFs)是红茶中的天然生物活性物质, 其中茶黄素(theaflavin, TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(theaflavin-3-gallate, TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(theaflavin-3'-gallate, TF-3'-G)、茶黄素-3,3'-没食子酸酯(theaflavin-3,3'-gallate, TFDG)是红茶中发现的 4 种主要 TFs, 对改善茶叶品质特性等多方面起着决定性作用[1]。TFs 是一类由茶多酚氧化形成的具有多个酚羟基或者羟基的苯并卓酚酮化合物[2–3], 具有抗氧化[4–5]、抗炎症[6]、降血糖血脂[7]等多种功能。研究表明 TFs 的抗氧化作用与其前体儿茶素和没食子酸酯上酚羟基有关, 酚羟基能够保证具有提供质子的能力[3]。酚羟基越多, TF 的抗氧化性更强[8]。有研究表明 TFDG 是有效的生物抗氧化剂和生物抗癌活性类化合物[9–12]。目前针对 TFDG 的制备与活性成分的研究还较少。

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定 TFs 具有分离效果好, 准确度高的特点, 是检测 TFs 的常用方法[13–14]。酶促制备 TF 主要是指多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)在有氧作用下催化儿茶素生成 TF[15], 因其催化效能优异而得到广泛应用。然而, 在酶促过程中为防止 TF 向茶褐素转化, 因此在反应进行到一定程度时需要终止酶活性。研究发现微波高火[16–18]、高温[19–20]、加入抑制剂[16]等条件终止特定 PPO 酶促反应都具有良好的效果。本团队前期研究发现, 不同终止条件对马铃薯 PPO 酶促制备 TF 的产量有一定的影响[17,20]。因此, 探索适合马铃薯 PPO 酶促制备 TF 后的终止条件成为本研究的研究重点。

在酶促反应过程中, PPO 与多酚类物质接触, 在氧气的参与下, 催化儿茶素类发生氧化反应, 生成一系列具有苯并卓酚酮结构的化合物[21]。本研究基于实验室前期建立的 HPLC 条件, 检测 4 种 TFs, 采用微波中高火、100 ℃水浴和加入抑制剂对酶促反应体系进行处理, 使 PPO 失去活性, 通过建立的色谱条件对酶促反应后所生成的 TFs 进行检测, 以 TFDG 与 TFs 的生成量为评判标准, 选择出适合马铃薯 PPO 酶促反应终止的方法, 为后续工业化生产 TF 提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　试　剂

TF、TF-3-G、TF-3'-G、TFDG(标准品纯度均大于 98%, 成都德思特生物技术有限公司); 马铃薯(市场购买); 马铃薯 PPO 酶(实验室制得); 茶多酚(上海麦克林生化科技有限公司); 柠檬酸、磷酸氢二钠、邻苯二酚、抗坏血酸、*L*-半胱氨酸(分析纯, 成都科隆化学品有限公司)。

1.2　仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪、EC-C_{18} 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 2.7 μm)(美国 Agilent 科技有限公司); N5000PLUS 紫外分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司); HZ1500L 恒温培养摇床(武汉瑞华仪器仪表有限公司); TG16 高速离心机(上海卢湘离心机仪器有限公司); M1-L23B 美的微波炉(广东美的厨房电器制造有限公司); BSA124S 电子天平(精度 0.0001 g, 上海右一仪器有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　马铃薯 PPO 制备

马铃薯 PPO 的提取采用匀浆浸提法, 参考崔晓颖等[21]提取芋头 PPO 方法进行修改。称取去皮切块的马铃薯 200 g 于高速组织匀浆机中, 并加入 400 mL 含 1% 交联聚乙烯吡咯烷酮(crosslinked polyvinylpyrrolidone, PVPP)的预冷磷酸盐缓冲液中(0.05 mol/L pH 7.6)混合, 用组织匀浆机捣碎 5 min。将匀浆液放入 4 ℃冰箱中低温浸提 12 h, 用纱布挤压进行粗过滤挤出滤液, 去滤渣后将滤液放入高速冷冻离心机中, 在保持 4 ℃的温度下以 8500 r/min 的转速离心 30 min, 离心后以上清液做马铃薯 PPO 酶液。

1.3.2　HPLC 分析条件

采用 EC-C_{18} 色谱柱, 流动相分别为 0.1%甲酸溶液和乙腈溶液, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 280 nm。梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1　梯度洗脱程序

Table 1　Gradient elution program

时间/min	流动相体积分数/%	
	流动相 A	流动相 B
0.0	95.0	5.0
5.0	80.0	20.0
8.0	75.0	25.0
30.0	75.0	25.0
31.0	95.0	5.0
32.0	95.0	5.0
32.1	72.0	28.0
38.0	72.0	28.0
38.1	95.0	5.0
40.0	95.0	5.0

1.3.3 TFs 标准曲线的建立

称取 100 mg 的 TF 标准品, 用甲醇溶解并定容至 1000 mL, 即得 TF (100 mg/L)、TF-3-G (100 mg/L)、TF-3'-G (100 mg/L)和 TFDG (100 mg/L) 4 种标准品母液。将混合母液进行稀释, 其质量浓度分别为 5、10、20、35、50、100 mg/L, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后即得梯度标准品工作液。利用 HPLC 测定 TF 单体生成量, 以此建立各 TF 单体的标准曲线。

1.3.4 不同终止条件对 TFs 产量的影响

(1) PPO 酶促合成 TFs

参考 TENG 等[22]和吴光亮等[16]对茶叶 PPO 进行酶促反应生成 TF 方法。称取 0.50 g 茶多酚于 100 mL 柠檬酸盐缓冲溶液中摇匀作为反应液, 向反应液中加入 15 mL 的马铃薯 PPO 溶液, 构成酶促反应体系。设置摇床温度为 30 ℃、转速为 1300 r/min, 反应时间为 90 min。待反应结束后, 采用不同的方法对 PPO 进行处理使其失活, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行过滤, 采用 0.22 μm 微孔滤膜, 对滤液进行 HPLC 测定。

(2)微波对 TFs 产量的影响

在酶促反应完成后, 将反应溶液分别放入微波炉中以中火 20 s、高火 20 s。在终止反应后进行酶活力测定和 HPLC 测定。

(3) 100 ℃水浴对 TFs 产量的影响

在酶促反应完成后, 将反应溶液在 100 ℃水浴中加热 5 min。在终止反应后进行酶活力测定和 HPLC 测定。

(4)不同抑制剂对 TFs 产量的影响

在酶促反应完成后, 将反应溶液分别加入 0.8 mg/mL 抗坏血酸、0.8 mg/mL 柠檬酸、0.8 mg/mL *L*-半胱氨酸混匀。在终止反应后进行酶活力测定和 HPLC 测定。

1.3.5 PPO 酶活力测定

PPO 酶活力测定使用课题组前期建立的方法进行[16], 使用紫外分光光度计进行 PPO 酶活力测定。取 1.5 mL 缓冲液和 0.5 mL PPO 酶液于 25 ℃水浴中 4 min 后, 迅速加入 0.5 mL 邻苯二酚溶液, 记录 30 s 内 420 nm 处吸光度的相对变化, 重复 3 次, 空白对照以灭活酶代替。酶活力定义: 在 420 nm 处吸光度 1 min 内变化 0.001 为一个酶活力单位(U)。计算见公式(1):

$$\text{酶活力}=\frac{\Delta OD_{420}}{0.001t}\times V_1/V_2 \quad (1)$$

式中: ΔOD_{420} 为反应时间内吸光度变化值; t 为反应时间, min; V_1 为 PPO 酶提取液总体积, mL; V_2 为取样比色体积, mL。

1.4 数据处理

HPLC 进行 3 次重复, 使用 IBM SPSS Statistics 27.0 对数据进行处理和多重比较(Waller-Duncan 法), 使用 Origin 2021 绘图。

2 结果与分析

2.1 建立 TF 标品标准曲线

通过配制质量浓度为 5~100 mg/L 的 TF 标准工作液, 得到 4 条标准曲线。结果如表 2 所示, 4 条标准曲线的 r^2 均大于 0.99, 表明各单体组分的相对质量浓度和色谱峰面积具有良好稳定的线性相关性。

表 2 TF 标准曲线
Table 2 Standard curves of TF

TF 单体	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
TF	5~100	Y=11.564X–12.387	0.9995	4.75	15.83
TF-3-G	5~100	Y=16.154X–25.888	0.9991	3.16	10.53
TF-3'-G	5~100	Y=23.916X–44.895	0.9957	2.67	8.90
TFDG	5~100	Y=19.884X–54.569	0.9912	3.30	11.00

注: Y 代表含量; X 代表对应的色谱峰面积。

2.2 PPO 酶活力测定结果

对终止后的马铃薯 PPO 进行酶活力测定, 结果如表 3 所示, 由表 3 可知, PPO 初始酶活力为 297.39~303.25 U, PPO 酶活力较高且不存在显著性差异(P>0.05); 经过不同终止方式处理后的酶活力为 0 U, 表明经过不同方式处理后, PPO 酶失去活性, 不会再继续催化生成 TFs。

表 3 PPO 酶活力(n=3)
Table 3 PPO enzyme activity (n=3)

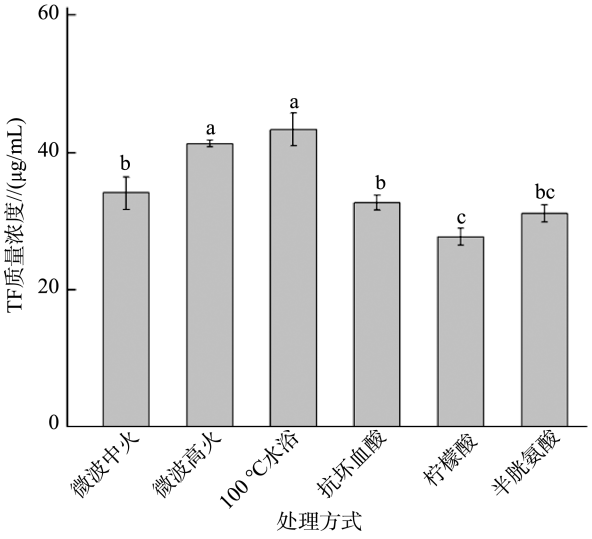
处理方式	初始酶活力/U	处理后酶活力/U
中火	302.33±0.89^a	0.00
高火	299.01±1.30^a	0.00
100 ℃水浴	297.39±1.56^a	0.00
抗坏血酸	303.25±0.67^a	0.00
半胱氨酸	298.66±0.31^a	0.00
柠檬酸	299.47±0.62^a	0.00

注: 表中同列不同小写字母表示存在显著性差异(P<0.05)。

2.3 不同终止方式对 TF 质量浓度的影响

在酶促反应结束后, 采用不同终止方式对反应体系

进行处理, 通过 HPLC 检测 TF 产量, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 使用 100 ℃水浴处理得到的 TF 质量浓度最高, 为 43.36 μg/mL, 100 ℃水浴处理与微波高火处理 TF 质量浓度无显著性差异(P>0.05)。使用微波中火、抗坏血酸与半胱氨酸处理相互间对 TF 质量浓度无显著性差异, 但与高火和使用 100 ℃水浴处理间存在显著性差异(P<0.05)。在 6 种处理方式中, 使用柠檬酸终止反应的TF质量浓度最低, 为27.65 μg/mL。



注: 不同小写字母表示差异显著, P<0.05, 下同。

图 1　不同终止方式对 TF 质量浓度影响

Fig.1　Effects of different termination methods on TF concentration

2.4　不同终止方式对 TF-3-G 质量浓度的影响

不同终止方式对 TF-3-G 产量的影响结果如图 2 所示, 使用100 ℃水浴终止反应, TF-3-G 质量浓度最大, 为23.70 μg/mL, 与其他处理方式 TF-3-G 生成量存在显著性差异(P<0.05)。使

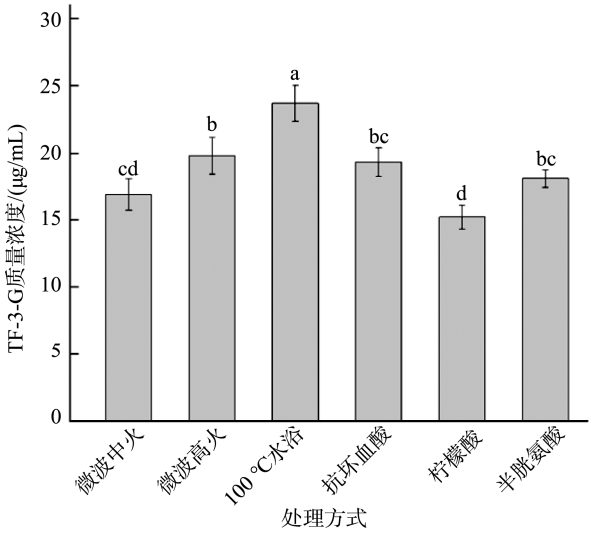


图 2　不同终止处理方式的 TF-3-G 质量浓度影响

Fig.2　Effects of different termination methods on TF-3-G concentration

用微波中火、抗坏血酸与半胱氨酸处理相互间对 TF-3-G 的生成量无显著性差异(P>0.05)。在 6 种处理方式中, 待测样品中加入柠檬酸来终止反应, 其 TF-3-G 的生成量最少, 为 15.62 μg/mL。

2.5　不同终止方式对 TF-3’-G 质量浓度的影响

不同终止方式对 TF-3’-G 质量浓度的影响结果如图 3 所示, 使用 100 ℃水浴终止反应, TF-3’-G 生成量达到最大值, 为 19.69 μg/mL, 采用100 ℃水浴处理和半胱氨酸处理对 TF-3’-G 质量浓度无显著性差异, 与其他处理方式存在显著性差异(P<0.05)。使用中火、高火与抗坏血酸处理相互间对 TF-3’-G 的生成量无显著性差异。在 6 种处理方式中, 待测样品中加入柠檬酸来终止反应, 其TF-3’-G的质量浓度最低, 为12.05 μg/mL。

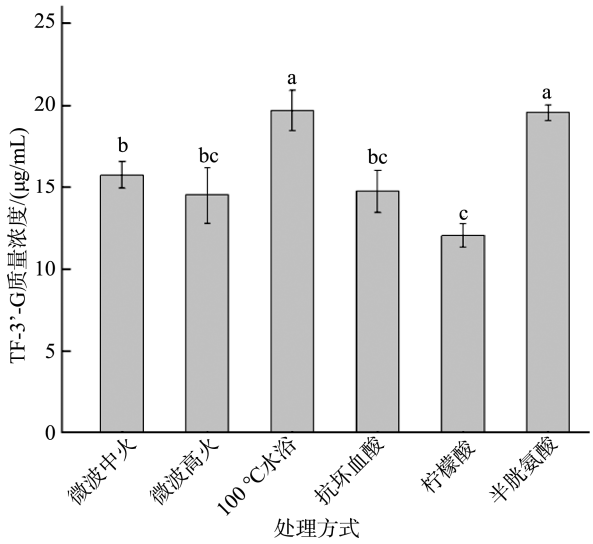


图 3　不同终止处理方式的 TF-3’-G 质量浓度影响

Fig.3　Effects of different termination methods on TF-3’-G concentration

2.6　不同终止方式对 TFDG 质量浓度的影响

在酶促反应后对样品进行不同终止反应的处理, TFDG 的质量浓度如图 4 所示, 使用100 ℃水浴处理时, TFDG 质量浓度最高, 为 32.47 μg/mL, 与其他处理方式相比 TFDG 产量存在显著性差异(P<0.05)。在 6 种处理方式中, 待测样品中加入抗坏血酸来终止反应, 其 TFDG 的质量浓度最低, 为 16.00 μg/mL。

2.7　不同终止方式对 TFs 质量浓度的影响

在酶促反应后对样品进行不同终止反应的处理。TFs 的质量浓度如图 5 所示: 在使用 100 ℃水浴结束反应时, TFs 质量浓度达到最大值, 为 119.12 μg/mL, 均与其他处理方式存在显著性差异。其中使用中火、加入抗坏血酸和半胱氨酸来处理之间 TFs 的质量浓度无显著性差异(P>0.05)。在 6 种处理方式中, 待测样品中加入柠檬酸来终止反应, 其 TFs 的质量浓度最低, 为 71.70 μg/mL。

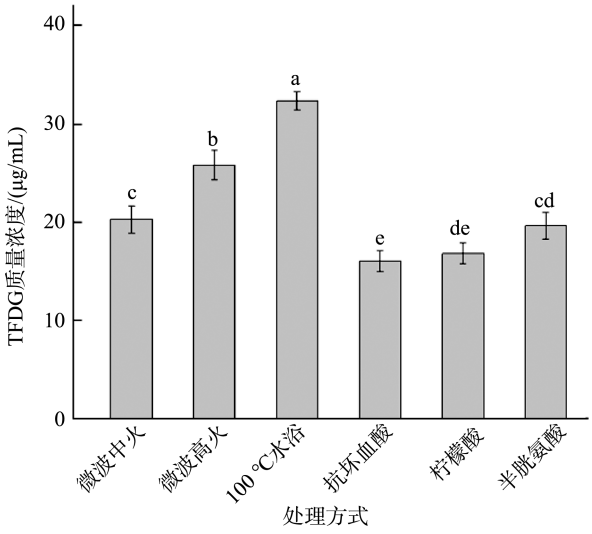


图 4 不同终止处理方式的 TFDG 质量浓度影响

Fig.4 Effects of different termination methods on TFDG concentration

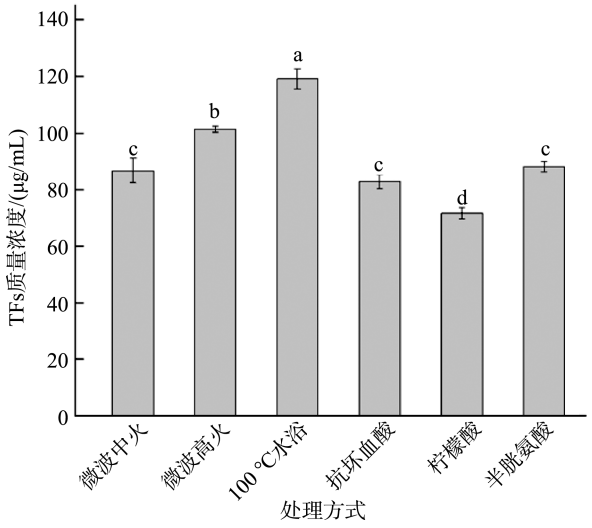


图 5 不同终止处理方式的 TFs 质量浓度影响

Fig.5 Effects of different termination methods on TFs concentration

3 讨论与结论

现有研究[23–24]发现高温影响酶蛋白分子的三维结构和活性中心，直接影响 PPO 酶活力。在 100 ℃水浴下能够使 PPO 酶失去活性，阻止残留酶进行酶促反应，且高温会影响反应体系中氧气含量[25]，可能会促使 TFs 向其他茶色素转变。TFs 不耐高温[26]，但在短时间内不会造成对已经生成的 TFs 极大的破坏作用，这也是使用 100 ℃水浴高温处理方式，TFs 生成量相比较最多的原因。对于微波处理，有研究指出随着微波时间与功率的延长，对多酚氧化酶的抑制作用越来越显著，酶活性也在减小，最后直至钝化，达到抑制酶活的效果[27–28]。使用微波处理方式来终止反应，中火与高火 TFs 总生成量与此次研究类似，功率越大，酶抑制效果更好，酶促反应结束更彻底。HPLC 结果显示，加入 3 种抑制剂终止酶促反应后，TFs 的产量明显降低，半胱氨酸处理和抗坏血酸处理后 TFs 产量差异不显著，与柠檬酸处理后 TFs 产量存在显著性差异(P<0.05)，可能是由于抑制剂的作用机理不同导致的，研究[29]发现 0.8 mg/mL 的 *L*-半胱氨酸能够非竞争性抑制黄金梨多酚氧化酶，使黄金梨多酚氧化酶失去活性，抗坏血酸可做为螯合剂抑制酶促反应的发生[30]，研究指出，抗坏血酸的抑制效果与其浓度存在直接关系[31]，后续可详细研究不同浓度的抗坏血酸对酶促反应的抑制效果。柠檬酸具有良好的抗褐变能力，可通过降低体系 pH 来抑制 PPO 活性，达到终止酶促反应的目的[32]。

通过 HPLC 对 4 种 TF 进行测定，建立了标准曲线，各单体的总质量浓度和色谱峰面积具有良好的线性相关性；检测并分析了不同终止方式对 TFs 产量的影响，结果发现经过 100 ℃水浴处理后，TFDG 的产量最高为 32.47 μg/mL，TFs 产量最高为 119.12 μg/mL，与其他处理方式得到的产量存在显著性差异，通过对比不同终止方式下 TFS 产量，表明 100 ℃水浴处理是适合马铃薯 PPO 酶促终止反应方法，研究结果期望为工业化制备 TFs 提供理论基础和实践指导。

参考文献

[1] LIU YF, WANG DY, LI J, *et al*. Research progress on the functions and biosynthesis of theaflavins [J]. Food Chemistry, 2024, 30(450): 139285.

[2] 王志远, 赵亚飞, 吴泽平, 等. 茶黄素类化合物的氧化制备方法及其生物活性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 83–93.
WANG ZY, ZHAO YF, WU ZP, *et al*. Research progress on oxidation preparation methods and biological activity of theaflavins [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 83–93.

[3] 刘昌伟, 张梓莹, 王俊懿, 等. 茶黄素生物学活性研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(19): 318–329.
LIU CW, ZHANG ZY, WANG JY, *et al*. Progress in research on the bioactivity of theaflavins [J]. Food Science, 2022, 43(19): 318–329.

[4] ARSLAN A, FARHANA N, MUHAMMAD UA, *et al*. Isolation and antioxidant characterization of theaflavin for neuroprotective effect in mice model [J]. Food Science & Nutrition, 2023, 11: 3485–3496.

[5] GAO XQ, XIA LY, FAN YQ, *et al*. Evaluation of coloration, nitrite residue and antioxidant capacity of theaflavins, tea polyphenols in cured sausage [J]. Meat Science, 2022, 192: 108877.

[6] 左灵妮, 刘康, 马晓勤, 等. 茶黄素通过调控 miR-190 表达对 LPS 诱导的结肠上皮细胞炎症损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(17): 2087–2092.
ZUO LN, LIU K, MA XQ, *et al*. Effect of theaflavins on LPS induced inflammation of colon epithelial cells by regulating miR190 expression [J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, 37(17): 2087–2092.

[7] XU SY, CHEN Y, GONG YS. Improvement of theaflavins on glucose and lipid metabolism in diabetes mellitus [J]. Foods, 2024, 13(11): 1763.

[8] 张洪丽, 钟书平, 蒋雨心, 等. 热改性 *β*-乳球蛋白对茶黄素-3,3'-双没食子酸酯稳定性及生物可及性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(18): 45–51.
ZHANG HL, ZHONG SP, JIANG YX, *et al*. Effects of thermal modification *β*-lactoglobulin on the stability and bioavailability of

theaflavin-3,3'-digallate [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(18): 45–51.

[9] ZHOU L, ZHAO PY, ZHANG JW, *et al*. Theaflavins enhances laying hen production performance and egg antioxidant capacity via improving antioxidant status and regulating lipid metabolism [J/OL]. Frontiers in Veterinary Science, 1-10. [2025-06-18]. DOI: org/10.3389/fvets.2025.1566580

[10] 钟书平. 预热处理的 *β*-乳球蛋白对茶黄素 3-3'-双没食子酸酯理化特性和生物可及性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2024.
ZHONG SP. Effects of preheated *β*-lactoglobulin on the physicochemical properties and bioaccessibility of theaflavin-3,3'-digallate [D]. Chongqing: Southwest University, 2024.

[11] TAKEMOTO M, TAKEMOTO H. Synthesis of theaflavins and their functions [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2018, 23(4): 918–918.

[12] PEREIRA-CARO G, MORENO-ROJAS JM, BRINDANI N, *et al*. Bioavailability of black tea theaflavins: Absorption, metabolism and colonic catabolism [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(26): 5365–5374.

[13] ZHOU BX, WANG ZH, YIN P, *et al*. Impact of prolonged withering on phenolic compounds and antioxidant capability in white tea using LC-MS-based metabolomics and HPLC analysis: Comparison with green tea [J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130855.

[14] 费璠, 张梓莹, 胡松, 等. HPLC 同时检测红茶中儿茶素和茶黄素含量[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 275–280.
FEI P, ZHANG ZY, HU S, *et al*. Simultaneous determination of catechins and theaflavins in black tea based on HPLC [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 275–280.

[15] 张朝阳, 陈娥, 马世龙, 等. HPLC 法测定藤茶中 5 种黄酮类物质的含量[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(6): 54–61.
ZHANG CY, CHEN E, MA SL, *et al*. Determination of five flavonoids contents in vine tea by HPLC [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2024, 50(6): 54–61.

[16] 吴光亮, 刘新涛, 胡冰, 等. 茶黄素双没食子酸酯的酶法合成条件优化与纯化[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 296–301.
WU GL, LIU XT, HU B, *et al*. Optimization of enzymatic synthesis and purification of theaflavin-3,3'-O-digallate [J]. Food Science, 2018, 39(14): 296–301.

[17] 李洁媛, 李东, 童凯, 等. 马铃薯多酚氧化酶的分离纯化、酶学性质及酶促合成茶黄素性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 26–31.
LI JY, LI D, TONG K, *et al*. Enzymatic properties of purified polyphenol oxidase from potato and its ability to enzymatic synthesis of theaflavins [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(11): 26–31.

[18] 徐洪梅. 梨多酚氧化酶生物催化合成茶黄素及其在茶叶深加工中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
XU HM. Study on the pear polyphenol oxidase biocatalytic synthesis of theaflavins and the application in the tea extraction [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.

[19] 黄莹捷, 伍梦瑶, 姚燕妮, 等. 不同反应条件对勐库大叶种多酚氧化酶合成茶黄素的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 54–59.
HUANG YJ, WU MY, YAO YN, *et al*. Effects of different conditions on theaflavins synthesis by polyphenol oxidase of *Camellia sinensis* var. *assamica cv.* Mengku [J]. Food Science, 2017, 38(22): 54–59.

[20] 李东, 张诗琪, 陶迎梅, 等. 马铃薯多酚氧化酶酶学性质及酶促合成茶黄素能力对比[J]. 中国调味品, 2023, 48(2): 188–194.
LI D, ZHANG SQ, TAO YM, *et al*. Enzymatic properties of potato polyphenol oxidase and comparsion of enzymatic synthesis ability of theaflavins [J]. China Condiment, 2023, 48(2): 188–194.

[21] 崔晓颖, 彭新颜, 贺红军, 等. 芋头多酚氧化酶的分离纯化与酶学特性[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 107–115.
CUI XY, PENG XY, HE HJ, *et al*. Separation, purification and enzymatic characterization of polyphenol oxidase from taro [J]. Food Science, 2021, 42(12): 107–115.

[22] TENG J, GONG ZH, DENG YL, *et al*. Purification, characterization and enzymatic synthesis of theaflavins of polyphenol oxidase isozymes from tea leaf (*Camellia sinensis*) [J]. LWT, 2017, 84: 263–270.

[23] 袁斌, 周诗雨, 刘昌伟, 等. 多酚氧化酶的提取工艺与活性测定研究[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(2): 291–296.
YUAN B, ZHOU SY, LIU CW, *et al*. Study on extraction process and activity determination of polyphenol oxidase [J]. Journal of Tea Communication, 2020, 47(2): 291–296.

[24] SAMANTA T, CHEENI V, DAS S, *et al*. Assessing biochemical changes during standardization of fermentation time and temperature for manufacturing quality black tea [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(4): 2387–2393.

[25] 张帅, 曹庸, 梁晓莹, 等. 黑曲霉 N5-5 单宁酶的纯化及酶学性质测定[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 142–146.
ZHANG S, CAO Y, LIANG XY, *et al*. Purification and enzymatic properties of tannase from *Aspergillus niger* N5-5 [J]. Food Science, 2017, 38(6): 142–146.

[26] 李东, 李洁媛, 雷雨, 等. 植物外源多酚氧化酶酶促合成茶黄素的研究进展[J]. 茶叶通讯, 2021, 48(3): 399–404.
LI D, LI JY, LEI Y, *et al*. Research progress on the enzymatic synthesis of theaflavins by exogenous polyphenol oxidase from plants [J]. Journal of Tea Communication, 2021, 48(3): 399–404.

[27] 滑金杰, 袁海波, 姚月凤, 等. 温度对茶发酵叶色泽及茶色素含量的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(12): 300–308.
HUA JJ, YUAN HB, YAO YF, *et al*. Effect of temperature on color and tea pigment content of fermented tea leaves [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(12): 300–308.

[28] 张婷婷, 蒲云峰, 刘懿, 等. 微波预处理条件对苹果汁品质的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 168–175.
ZHANG TT, PU YF, LIU Y, *et al*. Effects of the microwave pretreatment on quality of apple juice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 168–175.

[29] 李媛, 彭帅, 和玉军, 等. 微波和热力处理对莲藕多酚氧化酶活性的影响[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(24): 23–26.
LI Y, PENG S, HE YY, *et al*. Effect of microwave and heat treatments on the polyphenol oxidase activity from lotus root [J]. Food Research and Development, 2015, 36(24): 23–26.

[30] ZHOU XR, XIAO YJ, MENG XH, *et al*. Full inhibition of Whangkeumbae pear polyphenol oxidase enzymatic browning reaction by *L*-cysteine [J]. Food Chemistry, 2018, 266: 1–8.

[31] 李彩云, 李洁, 严守雷, 等.抗坏血酸处理对鲜榨莲藕汁酶促褐变和品质特征的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 151–158.
LI CY, LI J, YAN SL, *et al*. Effects of ascorbic acid treatment on enzymatic browning and quality characteristicsof fresh lotus rhizome juice [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(10): 151–158.

[32] 额日赫木, 张琪, 崔娜, 等.柠檬酸-超声波复合处理对鲜切马铃薯 PPO 和 POD 活性的抑制效果[J]. 农产品加工, 2019(11): 32–36.
ERI HM, ZHANG Q, CUI N, *et al*. Inhibition effect of citric acid-ultrasonic combination treatment on PPO and POD activity of the fresh-cut potato. [J]. Farm Products Processing, 2019(11): 32–36.

(责任编辑: 蔡世佳　安香玉)