

# 不同储存时间对普洱茶有机溶剂萃取物清除自由基活性的影响

刘通讯, 谭梦珠

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文以半数抑制浓度  $IC_{50}$  的大小研究了十种茶叶(不同年份的生普和熟普)有机溶剂萃取物的体外抗氧化活性。结果表明, 生茶有机溶剂萃取层清除 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧自由基的  $IC_{50}$  最小分别可达 0.339 mg/mL、0.074 mg/mL、1.206 mg/mL, 熟茶清除 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧自由基的  $IC_{50}$  最小分别可达 0.554 mg/mL、0.164 mg/mL、1.927 mg/mL, 生茶的抗氧化能力明显优于熟茶; 各种普洱茶对自由基的清除能力主要取决于各萃取液中的多酚和黄酮含量。生茶乙酸乙酯层的茶多酚萃取量最多, 在 7.33~9.57% 之间, 正丁醇层的黄酮类物质的萃取量最多在 7.08~10.99% 之间, 熟茶正丁醇层的茶多酚含量和黄酮类物质的含量在个有机溶剂层中均是最高, 分别在 3.62~5.73% 之间和 4.75~5.83% 之间, 乙酸乙酯层和正丁醇层的萃取化合物具有较多的羟基, 具有较强的清除自由基的能力; 茶叶的储存时间对各萃取液的抗氧化能力无显著影响。

**关键词:** 普洱茶; 茶多酚; 黄酮; 抗氧化性

**文章编号:** 1673-9078(2013)10-2372-2377

## Impact of Different Storage Time on Antioxidant Activity of Organic Solvent Extracts of Pu-erh Teas

LIU Tong-xun, TAN Meng-zhu

(College of Light and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The antioxidant activity of different organic solvent extracts of pu-erh teas (raw and ripened pu-erh which produced in different years) was evaluated by half-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ). Results showed that the  $IC_{50}$  value of raw teas to scavenge DPPH free radical and superoxide radical were 0.339 mg/mL, 0.074 mg/mL and 1.206 mg/mL, respectively. And the  $IC_{50}$  of ripe teas to the above-mentioned radicals were 0.554 mg/mL, 0.164 mg/mL and 1.927 mg/mL, respectively. Raw teas had higher antioxidant activity than ripe ones. The extracts by different organic solvents showed different scavenging abilities to different free radicals, which depended on the content of tea polyphenol and flavonoids. The highest content of tea polyphenol in raw teas was extracted by ethyl acetate, ranged from 7.33% to 9.57% and the extract from butyl alcohol had the largest amount of flavonoids (7.08~10.99%). For the ripe tea, the highest contents of tea polyphenol and flavonoids were 3.62% to 5.73% and 4.75% to 5.83%, respectively, which were all extracted by butyl alcohol. In conclusion, the extracts by ethyl acetate and butyl alcohol had higher capacity of scavenging free radicals due to the higher content of hydroxyl; and the storage time of teas showed little effect on the antioxidant activity from different extracts.

**Key words:** pu-erh tea; tea polyphenols; flavonoids; antioxidant

自由基是带不成对电子的离子、原子或分子, 化学性质十分活泼, 是人体生命活动中生物化学反应重要的中间产物。在正常情况下, 这些自由基的产生和被清除处于动态平衡中, 因而不表现为机体的损伤。但在病理情况下, 自由基的产生和清除失去平衡, 导致细胞结构受到破坏, 则自由基会在分子水平、细胞水平以及器官水平上给机体造成损伤<sup>[1]</sup>。因此, 寻找

收稿日期: 2013-06-07

作者简介: 刘通讯 (1965-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 为粮食、油脂及植物蛋白工程

外源性的自由基清除剂和抗氧化剂已经引起了人们的重视。

近年来, 普洱茶因降血压、降血脂、抑菌抗龋及抗癌防癌等多种保健功效而备受关注, 而大量研究都认为抗氧化是茶叶保健的重要机理。理论上茶叶中具有抗氧化活性内含物占干物质的95%以上, 已确证黄酮类、多酚类、花青素、香豆素、维生素、生物碱、萜类、烯类蒽醌、多糖、多肽等都具有直接或间接的抗氧化活性<sup>[2]</sup>。除多酚类以外, 茶的活性成分如茶色素、茶皂素、茶多糖等的化学性质与结构也在不断被阐述。

陈朝银等<sup>[3]</sup>对普洱茶多糖清除超氧自由基的活性进行了研究, 结果证明茶多糖抗氧化活性是Vc活性的98%左右。吴晓鹏<sup>[4]</sup>等证明苦丁茶多糖对羟自由基、超氧阴离子自由基, DPPH自由基具有一定的清除作用。此外茶叶中含有抗氧化的VE, 与生物类黄酮类物质起着相互保护的作用。近年来, 普洱茶的抗氧化等生物活性已开始受到人们的重视, 并且对这一功能特性的研究和应用越来越广泛。然而, 茶叶中各组分的溶解性不同, 其抗氧化活性的评价工作极为繁杂。此外, 由于普洱生茶和熟茶的工艺不同, 在茶叶发酵及储存的过程中由于多酚类羟基的氧化、偶联作用, 多酚羟基数量大大减少, 其抗氧化能力相应降低<sup>[5]</sup>。

本文的主要目的是探索同一产地不同年份生产的普洱生茶及熟茶在不同有机溶剂萃取下(乙醇、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇)萃取物的抗氧化性的差别, 以期茶叶中各组分的抗氧化活性的评价提高有益的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

云南七子饼茶(01、03、05、07、09年产生普洱熟普, 中国云南西双版纳勐海国营黎明茶厂出品); 2,2-二苯代苦味酰基(DPPH)购自美国Sigma公司, 茶多酚(TP)为实验室自制(纯度>95%), 邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、30%双氧水、铁氰化钾、抗坏血酸等均为国产分析纯。

SpectrumLab 22PC 可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 富华420型三用水箱, 金坛市富华仪器有限公司; SS350多功能食物搅拌机, 佛山市顺德区容桂家成电器厂; GXZ-9070MBE电热恒温鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; UV-2100紫外可见分光光度计, 广州广一科学仪器有限公司; ALPHI-4真空冷冻干燥仪, 德国托普公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 水浸提物和各有机溶剂提取物制备

称取5g磨碎试样按照1:10加入沸蒸馏水, 沸水浴浸提20min。浸提完毕后立即趁热减压过滤。同样方法浸提四次, 合并滤液, 冷冻干燥得普洱茶水浸提物。

将磨碎普洱茶10g按照1:10加入沸蒸馏水浸提10min, 浸提完毕后立即趁热减压过滤, 滤渣重复浸提一次, 抽滤, 合并水浸提液。滤渣中加入50mL 95%乙醇浸提两次, 每次10min, 减压抽滤, 得乙醇浸提

液。水浸提液经氯仿脱色素和咖啡碱后, 分别用乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 有机溶剂100mL, 分三次萃取, 每次萃取于分液漏斗中振摇5min, 合并萃取液, 旋转蒸发浓缩至干, 再溶于蒸馏水中冷冻干燥。按浸提顺序得乙醇层(P1)、氯仿层(P2)、乙酸乙酯层(P3)、正丁醇层(P4)和剩余层(P5)五种有机溶剂萃取成分。

#### 1.2.2 茶多酚、黄酮含量测定

总茶多酚采用酒石酸铁比色法测定(GB8313-2002), 黄酮含量测定采用三氯化铝法<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.3 普洱茶浸提物对DPPH自由基的清除实验<sup>[7]</sup>

0.1mL蒸馏水加入3.9mL 0.2mmol/L 95%乙醇配制的DPPH, 室温避光放置30min, 以95%乙醇作为空白, 紫外-可见分光光度计进行全波长扫描, 确定最佳吸收波长。0.1mL不同浓度的样品稀释液中(生茶0.4、0.3、0.2mg/mL, 熟茶0.8、0.5、0.3mg/mL)加入3.9mL 0.2mmol/L 95%乙醇配制的DPPH, 室温避光反应30min, 以95%乙醇作为空白, 测定样品在最佳吸收波长下的吸光度。空白样吸光度(A<sub>0</sub>), 样品吸光度(A<sub>1</sub>), 则清除率(R')计算公式为:

$$R' = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

#### 1.2.4 普洱茶浸提物对超氧(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)自由基的清除实验<sup>[8]</sup>

0.2mL不同浓度的样品稀释液中(1.25、2.5、5mg/mL)加入4.6mL 0.1mol/L Tris-HCl(pH 8.2)震荡混匀, 25℃水浴10min加入0.2mL 3mmol/L邻苯三酚(25℃预热)。迅速混匀并开始计时, 325nm测定吸光度, 每隔30s读取A<sub>325</sub>, 4min后结束。空白对照组以0.2mL蒸馏水代替样品, 作吸光度随时间变化的回归方程, 其斜率为V。

$$\text{抑制率}(\%) = (V_{\text{对照}} - V_{\text{Test}}) / V_{\text{对照}} \times 100\%$$

#### 1.2.5 普洱茶浸提物对羟基自由基的清除实验<sup>[9]</sup>

取1mL蒸馏水, 依次加入0.75mmol/L邻二氮菲1mL, 150mmol/L pH 7.4的PBS缓冲液2mL, 充分混匀后加入0.75mmol/L FeSO<sub>4</sub> 1mL, 混匀, 最后加1mL 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。37℃保温60min, 测定536nm吸光度为A<sub>P</sub>, 95%乙醇代替H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为A<sub>B</sub>, 不同浓度的样品液1mL代替蒸馏水为A<sub>S</sub>。

$$\text{清除率}(\%) = (A_S - A_P) / (A_B - A_P) \times 100\%$$

### 1.3 数据分析

用Microsoft Excel 2007对数据进行处理与作图。

采用用 SPSS17.0 进行方差分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 普洱茶各萃取组分中茶多酚和黄酮含量

普洱茶各萃取组分中茶多酚和黄酮含量见表 1 和表 2。在生茶各萃取层中, 乙酸乙酯层茶多酚含量最高(9.57%), 其次是乙醇层 (9.56%), 在熟茶各萃取层中, 正丁醇层茶多酚含量最高, (5.73%), 其次是乙酸乙酯层 (3.83%)。无论是在生茶或是熟茶中, 乙酸乙酯、乙醇、正丁醇三种有机溶剂都取得了较好的茶多酚萃取效果, 剩余层列第四位, 氯仿层含量最低。

生茶熟茶剩余层茶多酚含量相当, 除剩余层外, 生茶各萃取层的茶多酚含量都显著地高于熟茶。熟茶正丁醇层的多酚含量显著的高于乙酸乙酯层, 这主要是因为加工过程的不同, 熟茶的后发酵过程会导致茶叶内含成分上的差异。这可能是熟茶中简单多酚以及黄酮类物质发生了复杂的化学反应, 生成了一部分多酚聚合物, 因此造成乙酸乙酯层多酚含量的下降, 而生成的多酚聚合物很可能在正丁醇层中被萃取出来, 已有研究表明, 普洱熟茶后发酵过程中的茶多酚会被氧化成茶色素(茶黄素、茶红素、茶褐素)等酚类聚合物<sup>[10]</sup>。对此, 需要对熟茶的正丁醇萃取组的成分进行进一步分析。

表 1 普洱茶各萃取液中茶多酚含量 (%) (M±SD, n=3)

Table1 Tea polyphenol contents of pu-erh teas extracts

样品种类	茶多酚				
	P1	P2	P3	P4	P5
2009-raw	7.23±0.08 <sup>c</sup>	2.63±0.01 <sup>b</sup>	9.57±0.15 <sup>e</sup>	7.45±0.21 <sup>d</sup>	2.45±0.13 <sup>a</sup>
2007-raw	9.56±0.35 <sup>e</sup>	2.77±0.10 <sup>b</sup>	8.59±0.11 <sup>d</sup>	7.59±0.26 <sup>c</sup>	2.26±0.22 <sup>a</sup>
2005-raw	7.72±0.47 <sup>d</sup>	2.12±0.21 <sup>a</sup>	7.86±0.39 <sup>d</sup>	6.61±0.21 <sup>c</sup>	2.56±0.20 <sup>b</sup>
2003-raw	7.72±0.12 <sup>d</sup>	2.21±0.13 <sup>a</sup>	7.51±0.23 <sup>c</sup>	8.09±0.17 <sup>e</sup>	2.65±0.19 <sup>b</sup>
2001-raw	7.31±0.33 <sup>b</sup>	2.51±0.47 <sup>a</sup>	7.33±0.52 <sup>b</sup>	7.30±0.32 <sup>b</sup>	2.47±0.38 <sup>a</sup>
2009-ripe	2.29±0.09 <sup>a</sup>	2.24±0.01 <sup>a</sup>	3.83±0.11 <sup>c</sup>	4.56±0.09 <sup>d</sup>	2.59±0.14 <sup>b</sup>
2007-ripe	2.20±0.26 <sup>a</sup>	2.02±0.18 <sup>a</sup>	3.25±0.27 <sup>c</sup>	5.63±0.16 <sup>d</sup>	2.52±0.24 <sup>b</sup>
2005-ripe	2.83±0.17 <sup>c</sup>	1.83±0.21 <sup>a</sup>	3.59±0.29 <sup>d</sup>	3.62±0.31 <sup>d</sup>	2.18±0.15 <sup>b</sup>
2003-ripe	3.38±0.08 <sup>c</sup>	1.77±0.15 <sup>a</sup>	3.68±0.06 <sup>d</sup>	5.73±0.22 <sup>e</sup>	2.43±0.09 <sup>b</sup>
2001-ripe	2.10±0.01 <sup>b</sup>	1.28±0.08 <sup>a</sup>	2.98±0.19 <sup>c</sup>	4.25±0.06 <sup>d</sup>	2.21±0.32 <sup>b</sup>

注: 相同指标同列, 小写字母不同表示差异显著。

表 2 普洱茶各萃取液中黄酮含量 (%) (M±SD, n=3)

Table2 Tlavanoids contents of pu-erh teas extracts

样品种类	黄酮类				
	P1	P2	P3	P4	P5
2009-raw	7.14±0.19 <sup>d</sup>	2.99±0.27 <sup>c</sup>	2.00±0.07 <sup>b</sup>	8.48±0.15 <sup>e</sup>	1.50±0.19 <sup>a</sup>
2007-raw	6.42±0.26 <sup>d</sup>	2.56±0.39 <sup>b</sup>	3.16±0.38 <sup>c</sup>	7.18±0.17 <sup>e</sup>	1.65±0.21 <sup>a</sup>
2005-raw	8.12±0.35 <sup>d</sup>	2.53±0.42 <sup>b</sup>	2.60±0.37 <sup>b</sup>	7.08±0.29 <sup>c</sup>	1.46±0.23 <sup>a</sup>
2003-raw	6.25±0.21 <sup>c</sup>	3.38±0.14 <sup>b</sup>	3.27±0.22 <sup>b</sup>	9.02±0.18 <sup>d</sup>	1.75±0.19 <sup>a</sup>
2001-raw	5.33±0.43 <sup>d</sup>	2.63±0.29 <sup>b</sup>	2.89±0.38 <sup>c</sup>	10.99±0.31 <sup>e</sup>	1.36±0.41 <sup>a</sup>
2009-ripe	1.25±0.07 <sup>c</sup>	0.77±0.12 <sup>b</sup>	2.23±0.19 <sup>d</sup>	4.80±0.03 <sup>e</sup>	0.33±0.13 <sup>a</sup>
2007-ripe	2.39±0.15 <sup>c</sup>	0.86±0.22 <sup>a</sup>	2.05±0.18 <sup>b</sup>	5.25±0.25 <sup>d</sup>	0.68±0.18 <sup>a</sup>
2005-ripe	2.17±0.09 <sup>c</sup>	0.95±0.19 <sup>b</sup>	2.94±0.17 <sup>d</sup>	4.75±0.24 <sup>e</sup>	0.46±0.25 <sup>a</sup>
2003-ripe	2.39±0.11 <sup>d</sup>	0.55±0.05 <sup>b</sup>	2.10±0.01 <sup>c</sup>	5.83±0.16 <sup>e</sup>	0.28±0.19 <sup>a</sup>
2001-ripe	1.08±0.07 <sup>c</sup>	0.64±0.13 <sup>a</sup>	2.89±0.09 <sup>d</sup>	5.08±0.16 <sup>e</sup>	0.86±0.23 <sup>b</sup>

注: 相同指标同列, 小写字母不同表示差异显著。

生茶各萃取层的黄酮类含量均显著高于熟茶。而在生茶和熟茶内部, 黄酮类化合物主要富集于正丁醇层和乙醇层。正丁醇层等有机溶剂层的黄酮含量较高,

主要原因是黄酮及黄酮醇一般都难溶于水, 易溶于乙醇、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂, 所以在水浸提液茶叶过程中, 一部分黄酮类物质保留在茶叶滤渣中未



被提取,进而在95%乙醇浸提茶渣的过程中被萃取出来。尽管乙酸乙酯萃取先于正丁醇萃取,正丁醇层的黄酮含量仍然是最高的,高于乙酸乙酯层,这说明黄酮类物质在乙酸乙酯中的溶解性并不强,反而在正丁醇层中得到了更好的萃取。此外,熟茶的氯仿层和剩余层中黄酮的含量极少,正丁醇层最多,乙酸乙酯层其次,乙醇层第三。普洱生茶的茶多酚和黄酮类物质的含量明显普遍高于熟茶,而不同年份之前茶叶的茶多酚和黄酮类物质的含量均在一定范围内波动,没有呈现出一定规律性。

## 2.2 普洱茶各萃取成分清除 DPPH 自由基作用

表3为各萃取液清除羟基自由基的IC<sub>50</sub>,十种普洱茶不同溶剂萃取成分对DPPH自由基均表现出显著的清除效果。各萃取液清除DPPH自由基效果均较阳性对照品茶多酚,Vc弱。除了剩余层外,生茶DPPH自由基清除能力明显强于熟茶,而茶叶的出品年限及储存时间对DPPH自由基清除能力无显著相关。

表3 普洱茶不同萃取液清除 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> (mg/mL) (M±SD, n=3)

Table 3 IC<sub>50</sub> of DPPH radicals scavenging of pu-erh tea extracts

样品种类	P1	P2	P3	P4	P5
2009-raw	0.46±0.05 <sup>b</sup>	0.73±0.06 <sup>d</sup>	0.34±0.09 <sup>a</sup>	0.48±0.04 <sup>c</sup>	1.49±0.05 <sup>e</sup>
2007-raw	0.47±0.03 <sup>b</sup>	0.58±0.02 <sup>d</sup>	0.39±0.03 <sup>a</sup>	0.56±0.05 <sup>c</sup>	1.32±0.11 <sup>e</sup>
2005-raw	0.43±0.05 <sup>a</sup>	0.99±0.09 <sup>c</sup>	0.44±0.06 <sup>a</sup>	0.54±0.08 <sup>b</sup>	1.30±0.09 <sup>d</sup>
2003-raw	0.42±0.04 <sup>a</sup>	0.89±0.06 <sup>b</sup>	0.40±0.05 <sup>a</sup>	0.43±0.07 <sup>a</sup>	1.06±0.07 <sup>c</sup>
2001-raw	0.46±0.06 <sup>b</sup>	0.68±0.08 <sup>c</sup>	0.43±0.06 <sup>a</sup>	0.46±0.04 <sup>b</sup>	1.09±0.06 <sup>d</sup>
2009-ripe	1.37±0.10 <sup>d</sup>	3.59±0.11 <sup>e</sup>	0.93±0.04 <sup>b</sup>	0.69±0.04 <sup>a</sup>	1.13±0.14 <sup>c</sup>
2007-ripe	1.49±0.06 <sup>c</sup>	3.15±0.10 <sup>e</sup>	1.04±0.10 <sup>b</sup>	0.60±0.06 <sup>a</sup>	1.68±0.07 <sup>d</sup>
2005-ripe	0.82±0.03 <sup>a</sup>	3.29±0.13 <sup>d</sup>	0.96±0.07 <sup>b</sup>	0.95±0.01 <sup>b</sup>	1.64±0.10 <sup>c</sup>
2003-ripe	0.73±0.04 <sup>b</sup>	3.83±0.07 <sup>e</sup>	0.95±0.08 <sup>c</sup>	0.55±0.08 <sup>a</sup>	1.28±0.02 <sup>d</sup>
2001-ripe	1.22±0.09 <sup>b</sup>	5.20±0.15 <sup>e</sup>	1.26±0.11 <sup>c</sup>	0.93±0.04 <sup>a</sup>	1.92±0.10 <sup>d</sup>
IC <sub>50</sub> =0.20±0.01(Vc), IC <sub>50</sub> =0.15±0.02(茶多酚)					

注:相同指标同列,小写字母不同表示差异显著。

## 2.3 普洱茶各萃取成分清除羟基自由基作用

如表4所示,十种普洱茶不同溶剂萃取成分对羟基自由基均表现出显著的清除效果,生茶对羟基自由基的清除能力大于熟茶。各萃取液清除羟基自由基效果均较阳性对照品Vc强,较茶多酚弱,这是由于,对于Vc与茶多酚来说,茶多酚对羟基自由基的清除能力比Vc强很多(Vc的IC<sub>50</sub>=0.614,茶多酚的IC<sub>50</sub>=0.057),所以普洱生、熟茶的各有机溶剂萃取液的羟基自由基清除能力比Vc强,比茶多酚对照品弱,

生茶DPPH自由基清除能力的排序与其茶多酚含量顺序一致:乙酸乙酯层>乙醇层>正丁醇层>氯仿层>剩余层,熟茶DPPH自由基清除能力的排序与其茶多酚含量顺序基本一致:正丁醇层>乙酸乙酯层>乙醇层>剩余层>氯仿层。茶多酚是茶叶中最主要的抗氧化物质,茶多酚在个有机溶剂萃取层中的含量于该层清楚DPPH自由基的能力密切相关,所以生、熟茶各层的DPPH自由基清除能力的排序均与茶多酚含量顺序基本一致。例外的是,在熟茶中茶多酚含量较剩余层更为丰富的氯仿层反而表现出较差的抗氧化性,这可能是因为熟茶剩余层中还含有茶多酚以外的对抗氧化性有贡献的物质,如多酚类多聚体、游离单糖、氨基酸及其他一些未知成分等。吴晓鹏等<sup>[3]</sup>的研究表明,苦丁茶粗多糖对DPPH自由基抑制的效果明显优于对超氧阴离子和羟基自由基的清除效果。很可能由于后发酵的原因,使熟茶这类物质的含量明显高于其在生茶剩余层中的含量,因此表现出抗氧化性的差异。生茶的乙酸乙酯层、熟茶的正丁醇层在各萃取层中表现出最强的DPPH清除能力,这与其含有的多酚类物质有关。

所以普洱茶各有机溶剂萃取层的羟基自由基清除能力也是和其茶多酚含量相关的。生茶羟基自由基清除能力的排序与其茶多酚含量顺序基本一致:乙酸乙酯层>正丁醇层>乙醇层>氯仿层>剩余层,所不同的是乙醇层茶多酚含量较正丁醇层更为丰富,但表现出相对较差的抗氧化性,这可能是因为正丁醇层的黄酮类含量较乙醇层丰富。研究表明黄酮类化合物清除自由基的能力大于Vc和VE。熟茶羟基自由基清除能力的排序与其茶多酚含量顺序基本一致,乙醇层>正丁醇层>乙酸乙酯层>剩余层>氯仿层,但乙醇层的茶多酚含量

和黄酮类物质含量都比正丁醇层和乙酸乙酯层少, 却表现出更好的羟基自由基清除能力, 这可能是因为普洱熟茶经过发酵后生成了某种对羟基自由基清除能力

很强的醇溶性物质, 因此有必要对熟茶乙醇层的组分进行进一步的鉴定。

表 4 普洱茶各萃取液清除羟基自由基的 IC<sub>50</sub> (mg/mL) (M±SD, n=3)

Table 4 IC<sub>50</sub> of hydroxyl radicals scavenging of pu-erh tea extracts

样品种类	P1	P2	P3	P4	P5
2009-raw	0.13±0.04 <sup>a</sup>	0.54±0.04 <sup>b</sup>	0.07±0.05 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>a</sup>	0.51±0.06 <sup>b</sup>
2007-raw	0.09±0.05 <sup>a</sup>	0.45±0.01 <sup>b</sup>	0.08±0.04 <sup>a</sup>	0.14±0.02 <sup>a</sup>	0.45±0.02 <sup>b</sup>
2005-raw	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.63±0.02 <sup>c</sup>	0.09±0.04 <sup>a</sup>	0.14±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.01 <sup>b</sup>
2003-raw	0.11±0.05 <sup>a</sup>	0.61±0.03 <sup>c</sup>	0.09±0.03 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>b</sup>
2001-raw	0.10±0.04 <sup>a</sup>	0.51±0.03 <sup>b</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.06 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>b</sup>
2009-ripe	0.16±0.02 <sup>a</sup>	0.69±0.01 <sup>d</sup>	0.25±0.03 <sup>b</sup>	0.25±0.03 <sup>b</sup>	0.38±0.02 <sup>c</sup>
2007-ripe	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.56±0.04 <sup>d</sup>	0.28±0.04 <sup>b</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.41±0.07 <sup>c</sup>
2005-ripe	0.16±0.04 <sup>a</sup>	0.61±0.03 <sup>c</sup>	0.26±0.01 <sup>c</sup>	0.21±0.03 <sup>b</sup>	0.41±0.03 <sup>d</sup>
2003-ripe	0.17±0.05 <sup>a</sup>	0.54±0.02 <sup>d</sup>	0.32±0.06 <sup>b</sup>	0.19±0.02 <sup>a</sup>	0.41±0.04 <sup>c</sup>
2001-ripe	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.70±0.01 <sup>d</sup>	0.31±0.03 <sup>b</sup>	0.21±0.03 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>c</sup>
		IC <sub>50</sub> =0.62±0.02(Vc),		IC <sub>50</sub> =0.06±0.01(茶多酚)	

注: 相同指标同列, 小写字母不同表示差异显著。

### 2.4 普洱茶各萃取成分清除超氧自由基作用

表 5 为各萃取液清除超氧自由基的 IC<sub>50</sub>, 生茶对超氧自由基的清除能力强于熟茶。生茶乙酸乙酯层的超氧自由基清除效果与茶多酚相当, 正丁醇层的清除效果略低于茶多酚, 乙醇层清除效果又略低于正丁醇

层, 但清除效果都高于 Vc, 剩余层和氯仿层的清除效果不及 Vc。熟茶各萃取液清除超氧自由基以正丁醇层效果最佳, 近似 Vc, 氯仿层最差。普洱生茶、熟茶各有机溶剂萃取层的超氧自由基清除能力排序和其茶多酚的含量排列顺序基本一致, 因此普洱茶中对超氧自由基起到清除作用的主要物质是茶多酚。

表 5 普洱茶各萃取液清除超氧自由基的 IC<sub>50</sub> (mg/mL) (M±SD, n=3)

Table 5 IC<sub>50</sub> of superoxide radicals scavenging of pu-erh tea extracts

样品种类	P1	P2	P3	P4	P5
2009-raw	1.43±0.05 <sup>b</sup>	4.82±0.01 <sup>d</sup>	1.21±0.04 <sup>a</sup>	1.33±0.03 <sup>ab</sup>	3.37±0.02 <sup>c</sup>
2007-raw	1.51±0.03 <sup>a</sup>	4.49±0.02 <sup>c</sup>	1.36±0.05 <sup>a</sup>	1.39±0.01 <sup>a</sup>	3.37±0.02 <sup>b</sup>
2005-raw	1.42±0.02 <sup>a</sup>	5.47±0.01 <sup>c</sup>	1.39±0.06 <sup>a</sup>	1.42±0.04 <sup>a</sup>	2.91±0.04 <sup>b</sup>
2003-raw	1.43±0.05 <sup>a</sup>	5.42±0.03 <sup>c</sup>	1.39±0.01 <sup>a</sup>	1.43±0.01 <sup>a</sup>	3.24±0.05 <sup>b</sup>
2001-raw	1.47±0.03 <sup>a</sup>	4.33±0.07 <sup>c</sup>	1.40±0.03 <sup>a</sup>	1.45±0.02 <sup>a</sup>	3.45±0.01 <sup>b</sup>
2009-ripe	2.62±0.02 <sup>c</sup>	7.44±0.02 <sup>e</sup>	2.17±0.04 <sup>b</sup>	1.81±0.04 <sup>a</sup>	4.98±0.01 <sup>d</sup>
2007-ripe	2.48±0.06 <sup>b</sup>	6.60±0.03 <sup>d</sup>	2.41±0.04 <sup>b</sup>	1.88±0.02 <sup>a</sup>	5.20±0.04 <sup>c</sup>
2005-ripe	2.05±0.01 <sup>a</sup>	6.81±0.02 <sup>d</sup>	2.49±0.08 <sup>b</sup>	1.96±0.02 <sup>a</sup>	5.14±0.02 <sup>c</sup>
2003-ripe	1.93±0.03 <sup>a</sup>	8.00±0.01 <sup>e</sup>	2.50±0.02 <sup>b</sup>	2.73±0.05 <sup>c</sup>	5.42±0.05 <sup>d</sup>
2001-ripe	3.91±0.07 <sup>c</sup>	7.69±0.01 <sup>e</sup>	2.55±0.03 <sup>b</sup>	2.25±0.01 <sup>a</sup>	4.55±0.06 <sup>d</sup>
		IC <sub>50</sub> =1.99±0.03 (Vc),		IC <sub>50</sub> =1.31±0.01(茶多酚)	

注: 相同指标同列, 小写字母不同表示差异显著。

### 3 结论

3.1 各种普洱茶(生茶、熟茶)的不同有机溶剂萃取液对不同的自由基表现出不同强度的清除作用。自由基的清除能力主要在于各萃取成分化学物质的组成和含量。根据茶叶中不同成分在各有机溶剂中的溶解性,

乙醇层主要包含不溶于水的物质, 如黄酮醇及其糖苷类、酚酸类、绝大部分黄烷醇和茶黄素存留于乙酸乙酯层中, 大部分茶红素和一部分茶黄素, 一些黄酮类以及皂甙等成分被萃取至正丁醇层。剩余层主要是多酚类多聚体、游离蛋白质、核酸游离单糖、氨基酸及其他一些未知成分等物质。从化合物的萃取情况来看,

乙酸乙酯层和正丁醇层的萃取化合物具有较多的羟基, 具有较强的清除自由基的能力。另外, 以对自由基清除的  $IC_{50}$  计, 普洱茶各萃取层对羟基自由基表现出最强的清除能力, 对 DPPH 自由基表现出较差的清除效果。

3.2 从发现葡萄籽提取物-原花青素卓越的抗氧化作用后, 对儿茶素寡聚体的研究引起了科学家的关注。普洱茶中可能存在特异多酚类物质 (如儿茶素的寡聚体等), 因此, 有必要从化学组成和结构及抗氧化机理等方面对其进行进一步的研究。

### 参考文献

- [1] Chung S K, et al. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*) [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, 61 (1): 118-123
- [2] 肖纯,张凯农. 茶内含物抗氧化作用机理的研究概况[J]. 福建茶叶, 1994, 2: 39-41  
Xiao C, Zhang K N. Research about the antioxidation mechanism of tea inclusions [J]. *Tea in Fujian*, 1994, 2: 39-41
- [3] 陈朝银,叶燕,熊向峰,等. 普洱茶多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(4): 13-15  
Chen C Y, Ye Y, Xiong X F, et al. Preliminary study of the extract and antioxidant activity of pu'er tea polysaccharide [J]. *Food research and development*, 2008, 29(4): 13-15
- [4] 吴晓鹏,王一飞,刘秋英,等. 苦丁茶多糖抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 34-36  
Wu X P, Wang Y F, Liu Q Y, et al. Research on bitter butyl tea polysaccharide antioxidant activity [J]. *Food and fermentation industries*, 2008, 34(2): 34-36
- [5] 陈小夏,何冰. 茶多酚清除氧自由基与抗脂质过氧化作用[J]. 中药材, 1998, 21(3): 141-143  
Chen X X, He B. The ability of tea polyphenols to clear oxygen free radical and anti lipid peroxidation [J]. *J Chin Med Mater*, 1998, 21(3): 141-143
- [6] 何书美,刘敬兰. 茶叶中总黄酮含量测定方法的研究[J]. 分析化学研究简报, 2007, 35(9): 1365-1368  
He S M, Liu J L. Study of determination method of total content of flavonoids in the tea [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(9): 1365-1368
- [7] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51(12): 3661-3667
- [8] Yu W L, Zhao Y P, Xue Z, et al. The antioxidant properties of lycopene concentrate extracted from tomato paste [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2001, 78(7): 697-701
- [9] de Avellar I G, Magalhães M M, Silva A B, et al. Reevaluating the role of 1, 10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1675: 46-53
- [10] 钱金晶. 茶叶中生物高分子活性中心元素的量子统计分布与其清除自由基能力的关系研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2009  
Qian J J. The relationship between the distribution of the Polymer active center elements and radical scavenging activity in tea [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2009