

红雪茶总酚酸提取工艺优化及其抗氧化活性研究

周怡伶, 罗丰霞, 冯士令, 丁春邦*

四川农业大学生命科学院, 雅安 625000

摘要:以红雪茶为试验材料, 利用醇提法并结合 Box-Behnken 设计, 对红雪茶总酚酸提取工艺进行优化。结果显示: 当液料比 30 mL/g, 乙醇浓度为 82%, 提取时间为 1.8 h 时, 总酚酸得率最高, 为 13.43 ± 0.56 mg/g ($n = 3$)。抗氧化试验显示, 总酚酸提取物 DPPH 自由基清除率和总还原能力活性较低, 但其体内抗氧化能力较高, 0.05 mg/mL 总酚酸提取物显著提高热应激损伤秀丽线虫存活率 ($15.73\% \pm 4.89\%$, $P < 0.01$)。研究表明红雪茶提取物具有较好的热应激保护力, 可以被开发成具有抗氧化功能食品或饮品。

关键词:红雪茶; 总酚酸; 优化提取; 秀丽线虫; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0084-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.012

Optimal extraction and antioxidant activity of total phenolic acids from *Lethariella* spp.

ZHOU Yi-ling, LUO Feng-xia, FENG Shi-ling, DING Chun-bang*

College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China

Abstract: The extraction process on total phenolic acids from *Lethariella* spp. was optimized using Box-Behnken design. The result showed that the highest yield of total phenolic acid was 13.43 ± 0.56 mg/g ($n = 3$) under the optimal extraction condition that the liquid to solid ratio was 30 mL/g, the ethanol concentration was 82%, and the extraction time was 1.8 h. *In vivo* antioxidant assays demonstrated that total phenolic acids from *Lethariella* spp. could scavenge DPPH free radical to some degree and also possess a certain total reducing power. Moreover, the total phenolic acids extract could significantly increase the survival rate ($15.73\% \pm 4.89\%$, $P < 0.01$) of *Caenorhabditis elegans* under thermal stress at 0.05 mg/mL. The finding suggested that the total phenolic acids extract from *Lethariella* spp. was a potential natural antioxidant that could be developed into a novel functional product.

Key words: *Lethariella* spp.; total phenolic acid; optimal extraction; *Caenorhabditis elegans*; antioxidant activity

红雪茶 (*Lethariella* spp.) 又名鹿心雪茶、金丝茶, 是梅花衣科金丝属地衣植物, 主要分布于四川、云南、陕西和青藏高原等海拔 4 000 m 及以上的雪域高山之上^[1,2]。红雪茶的食用历史可追溯到明代^[3]。在我国西南地区, 当地居民将其作为保健茶饮, 具有镇静、止痛、消炎、清热解渴和止渴生津等功效^[4,5]。现代医学研究表明, 红雪茶含有酚酸、多糖、氨基酸、维生素和微量元素, 对神经衰弱、咽喉炎、高血压、脂肪肝和糖尿病等有极好的疗效^[6-8]。目前对红雪茶的研究多集中在其有效成分的分离鉴定^[4,9], 但对其富含酚酸物质提取及生物活性研究

尚未见报道。

秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是一种经典的活体模型, 具有子代多、周期短、通体透明、结构简单、易于培养、易于观察与人类基因保守性高等优势, 在植物提取物的抗氧化活性研究中被广泛应用^[10-12]。Wu 等^[13] 研究表明银杏叶提取物通过增强秀丽线虫的抗氧化系统, 使正常饲养条件下的线虫寿命提高 25%, 使热胁迫和氧化胁迫下的线虫寿命分别提高 25% 和 33%。Pietsch 等^[14] 发现抗氧化剂咖啡酸不仅使 *mev-1* 线虫突变株的寿命延长 10%, 也能增强野生型线虫抗氧化能力, 降低脂褐素的积累。

本研究考察了料液比、乙醇浓度和提取时间对红雪茶总酚酸得率的影响, 结合响应面法优化其提

取工艺,并探究了红雪茶总酚酸提取物对秀丽线虫热应激的保护作用,以期为完善红雪茶的生物学功能研究奠定基础,为开发红雪茶抗氧化功能食品或饮品提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

红雪茶:购自藏曦堂,产地西藏。

秀丽线虫野生型株系 N2 和大肠杆菌尿嘧啶缺陷型(*Escherichia coli*, OP50),均购自美国线虫遗传学中心(*Caenorhabditis Genetics Center*, CGC)。

1.1.2 仪器与试剂

仪器:高速冷冻离心机(德国 Thermo 公司);Spectramax M2 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);LGJ-10 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);AIR TECH 超净工作台(苏净集团安康公司);RE-2000B 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器);DNP-9082 线虫恒温培养箱(上海三发科学仪器有限公司);SZX16 体视显微镜(日本 OLYMPUS 公司);THZ-100 恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司)。

试剂:琼脂粉、蛋白胨、酵母浸出粉购于北京索莱宝科技有限公司,无水乙醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、磷酸缓冲液、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、过氧化氢、水杨酸、硫酸亚铁、抗坏血酸、氯化钠、硫酸镁、氯化钙均购自成都科龙试剂厂,所有试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 材料预处理

红雪茶 60 °C 烘干、粉碎并 100 目过筛,-20 °C 保存备用。

1.2.2 红雪茶酚酸的提取与测定

1.2.2.1 测定波长的确定

根据 Li 等^[15]的方法,略做修改。以 70% 乙醇为溶剂,配制 0.1 mg/mL 的原儿茶酸标准品溶液。取标准品溶液 0.1 mL 于 2 mL 离心管中,加入 0.4 mL 70% 乙醇,0.2 mL 0.3% 十二烷基磺酸钠,以及 0.1 mL 0.9% 铁氰化钾与 0.1 mL 0.6% 三氯化铁混合溶液,混合均匀,暗处放置 5 min 后,0.1 mol/L 盐酸定容至 2 mL,避光反应 20 min,以 70% 乙醇溶液代替原儿茶酸为空白对照,于 400 ~ 800 nm 波长下扫描,确定最大吸收波长为 753 nm。

1.2.2.2 原儿茶酸标准曲线的绘制

取 0.1、0.075、0.05、0.025、0.012 5 mg/mL 标

准品溶液各 0.1 mL 于 2 mL 离心管中,按“1.2.2.1”方法于 753 nm 测定吸光度值。以标准品溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y = 13.324x - 0.0041$ ($R^2 = 0.9932$),总酚酸以原儿茶酸计在 0.100 0 ~ 0.012 5 mg/mL 与吸光度具有良好线性关系。

1.2.3 单因素优化试验

以红雪茶总酚酸提取率为考察指标,分别测试提取时间、乙醇浓度、料液比三个因素对其影响,确定提取红雪茶总酚酸最佳参数。按“1.2.2.1”方法以 0.1 mL 红雪茶提取液于 753 nm 测定吸光度值,所有试验重复三次。红雪茶总酚酸提取率按以下公式计算:

$$\text{红雪茶总酚酸提取率}(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times 5}{0.2}$$

式中:C 为红雪茶稀释提取液总酚酸浓度(mg/mL);V 为红雪茶未稀释前提取定容体积(mL);5 为稀释倍数;0.2 为红雪茶干粉质量(g)。

1.2.3.1 液料比对红雪茶总酚酸提取率的影响

称取 0.2 g 红雪茶,以 60% 乙醇按液料比 15、20、25、30、35 mL/g 进行定容,60 °C 恒温水浴提取 1.5 h。根据结果计算提取率,筛选最佳液料比。

1.2.3.2 乙醇浓度对红雪茶总酚酸提取率的影响

称取 0.2 g 红雪茶,分别以 20%、40%、60%、80%、100% 乙醇按液料比 25 mL/g 进行定容,60 °C 条件下提取 1.5 h。根据结果计算提取率,筛选最佳乙醇浓度。

1.2.3.3 提取时间对红雪茶总酚酸提取率的影响

称取 0.2 g 红雪茶,以 60% 乙醇按液料比 25 mL/g 定容,60 °C 恒温水浴下分别提取 0.5、1、1.5、2、2.5 h。根据结果计算提取率,筛选最佳提取时间。

1.2.4 响应面试验设计

以单因素试验结果为基础,采用 Box-Behnken 试验法,选取提取过程中对得率影响较大的 3 个变量因素:液料比(mL/g)、乙醇浓度(%)、提取时间(h),以红雪茶总酚酸提取率为响应值(Y),设计 3 因素 3 水平试验,每组试验重复 3 次,试验设计如表 1。应用 Design expert 软件对红雪茶总酚酸响应面提取优化试验结果进行分析。

1.2.5 红雪茶总酚酸体外抗氧化活性测定

1.2.5.1 红雪茶总酚酸提取

使用响应面试验所得红雪茶总酚酸最佳提取条件对红雪茶总酚酸进行提取,提取液蒸发浓缩,冷冻

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	A:液料比 Liquid-solid ratio(mL/g)	B:乙醇浓度 Ethanol concentration(%)	C:时间 Extraction time(h)
-1	20	60	1
0	25	80	1.5
1	30	100	2

干燥, -20 ℃冻存备用。

1.2.5.2 DPPH 自由基清除率测定

根据 Sharma 等^[16]的方法,测定红雪茶总酚酸的 DPPH 自由基清除能力,略做修改。0.1 mL 样液与 0.1 mL 0.4 mmol/L DPPH 乙醇溶液混匀,暗处放置 30 min, 517 nm 处测定吸光度 A_1 ; 0.1 mL 样液与 0.1 mL 蒸馏水混匀,测定本底值 A_2 ; 0.1 mL 蒸馏水与 0.1 mL DPPH 溶液混匀,测定吸光度 A_3 ,以 Vc 做阳性对照,DPPH 自由基清除能力可用以下公式表示:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_3 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100\%$$

1.2.5.3 总还原能力测定

根据 Zhang 等^[17]的方法,测定红雪茶总酚酸的总还原能力,略做修改。配制不同浓度红雪茶总酚酸提取液,取 0.5 mL 提取液,加入 0.5 mL 0.2 mmol/L PBS 和 0.5 mL 1% (W/V) 铁氰化钾混匀,50 ℃水浴 20 min 后,快速冷却。加入 0.5 mL 10% (W/V) 三氯乙酸,混合后离心,取 1.0 mL 上清液加入 0.8 mL 蒸馏水和 0.2 mL 0.1% (W/V) 三氯化铁混匀,10 min 后于 700 nm 处测定吸光值,以蒸馏水作空白对照。以总酚酸浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制总还原能力图,以 Vc 做阳性对照。吸光值越大,表示其还原力越强。

1.2.6 热应激试验

1.2.6.1 线虫培养

采用 Brenner 的方法,将野生型 N2 线虫接种于含 OP50 的 NGM 线虫标准培养基上,置于 20 ℃恒温培养箱中进行日常培养^[18]。

1.2.6.2 线虫的同步化

当大量秀丽线虫进入妊娠状态时,用 M9 缓冲液将其冲洗至 10 mL 试管中,收集 3.5 mL 虫液,加入 1 mL 5 mol/L NaOH 与 0.5 mL 5% NaClO 溶液,旋涡震荡 3.5 min, 3 000 rpm 离心 1 min,去上清,再

次加入 M9 冲洗,离心。反复冲洗 5 次后留适量缓冲液于试管中。将虫卵接种在含 OP50 的 NGM 板上,20 ℃下培养,待虫卵孵出即可获得同步化线虫。

1.2.6.3 热应激试验

将同期化的 L1 线虫接种到含或不含红雪茶总酚酸提取物(0.05、0.10、0.15 mg/mL)的 NGM 平板中,每组 40 条,在 20 ℃下培养 48 h 后,将线虫转移至 35 ℃培养箱中进行热应激试验。每隔 2 h 对线虫的存活数目进行记录,直至对照组线虫全部死亡为止。用铂丝轻触线虫头部或尾部,若其无反应,记为死亡;试验过程中钻到琼脂中或爬到板壁上死亡的线虫记为逃逸。试验重复 3 次。

1.3 统计学分析

所有试验组均重复 3 次,以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示,采用 Graphpad Prism 7.0 及 SPSS 19.0 对试验结果进行统计分析并作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 液料比对红雪茶总酚酸提取率的影响

由图 1 可知,液料比在 15 mL/g 到 25 mL/g 范围内,总酚酸提取率呈上升趋势,在 25 mL/g 到 30 mL/g 间总酚酸提取率无显著差异。在 30 mL/g 后总酚酸提取率显著下降。这可能是由于当溶剂量过

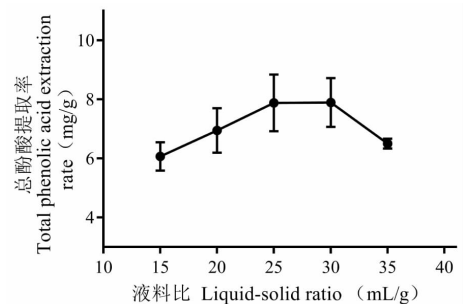


图 1 液料比对总酚酸提取率的影响

Fig. 1 Effect of single factor liquid-solid ratio on total phenolic acid extraction yield

少,溶液达到饱和,有效成分不能完全溶出;随着溶剂量的增加,红雪茶与溶剂的接触面积、浓度梯度增大,利于有效成分的溶出,当液料比达到一定值时,提取率达到最高;溶剂量继续增加,有效成分被红雪茶吸附不易溶出,且杂质析出增加,导致提取率的降低^[19]。因此,选用 25 mL/g 为响应面优化的中心点。

2.1.2 乙醇浓度对红雪茶总酚酸提取率的影响

由图2可知,乙醇浓度在 20% ~ 80% 之间时,红雪茶总酚酸提取率逐渐增加,在浓度为 80% 时达到最大,之后略有下降。这可能是由于酚酸在结构上是一种含有酚环的有机酸,易溶于乙醇、甲醇等有机溶剂,但随着乙醇含量升高,溶液极性降低,导致一些弱极性的杂质溶出,从而降低了提取率^[20]。故以乙醇浓度 80% 为响应面优化的中心点。

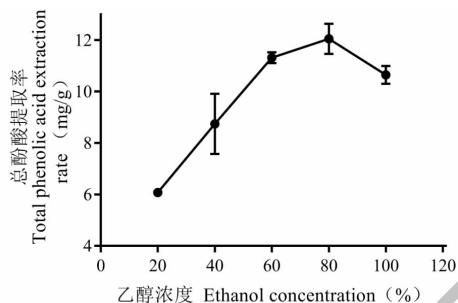


图2 乙醇浓度对总酚酸提取率的影响

Fig. 2 Effect of single factor ethanol concentration on total phenolic acid extraction yield

2.1.3 提取时间对红雪茶总酚酸提取率的影响

由图3可知,提取时间在 0.5 ~ 1.5 h 之间时,红雪茶总酚酸提取率呈现显著上升的趋势,在 1.5 ~ 2.0 h 之间,提取率略有上升,但并无显著差异,之后提取率缓慢下降。表明在一定范围内延长提取时间可以提高总酚酸的提取率,但当提取时间过长,总酚酸提取率有所下降,可能是由于时间过长有些酚酸发生了降解,从而使总酚酸提取率降低^[21]。因此,考虑到省时和实际操作,选择提取时间 1.5 h 为中心点进行响应面优化。

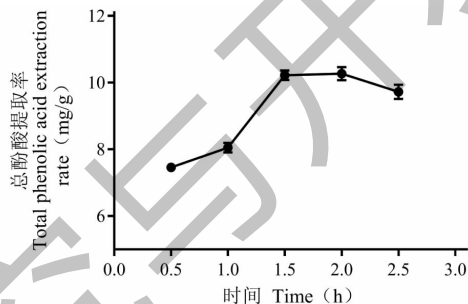


图3 提取时间对总酚酸提取率的影响

Fig. 3 Effect of single factor extraction time on total phenolic acid extraction yield

2.2 响应面优化红雪茶总酚酸提取

2.2.1 响应面试验结果

以红雪茶总酚酸提取率为响应值,考察了液料比(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)对红雪茶总酚酸提取率的影响,试验设计及结果见表2。

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-behnken test design and results

序号 No.	液料比 Liquid to solid ratio (mL/g)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	时间 Time (h)	总酚酸提取率 Total phenolic acid extraction rate (mg/g)
1	0	1	-1	8.87
2	-1	0	1	10.22
3	1	0	-1	11.09
4	0	0	0	12.14
5	0	0	0	12.60
6	1	1	0	11.41
7	-1	0	-1	8.95
8	1	0	1	13.41
9	0	0	0	12.41
10	1	-1	0	11.67
11	0	0	0	13.02
12	-1	-1	0	8.71

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	液料比 Liquid to solid ratio (mL/g)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	时间 Time (h)	总酚酸提取率 Total phenolic acid extraction rate (mg/g)
13	0	1	1	11.87
14	-1	1	0	9.93
15	0	0	0	12.44
16	0	-1	-1	9.71
17	0	-1	1	10.04

2.2.2 回归模型建立及方差分析

利用 Design-Expert 10 软件对表 2 的数据结果进行多元回归拟合分析,得到红雪茶总酚酸提取率二次多元回归方程: $Y = 12.522 + 1.22125A + 0.24375B + 0.865C - 0.37AB + 0.2625AC + 0.6675BC - 0.6485A^2 - 1.4435B^2 - 0.956C^2$ 。

对试验结果进行多元二次模型方差分析结果见表 3,可知模型 F 值为 54.41, $P < 0.0001$,说明模型在本试验的范围内具有统计学意义,即模型适用于此试验。失拟项为 0.7976 > 0.05 ,模型的失拟

项不显著,即模型成立。且 $R^2 = 0.9859$, $R_{Adj}^2 = 0.9678$, $CV = 2.47$,可见本试验模型可靠。

此外,拟合回归方程中一次项系数的绝对值大小反映了各考察因素对响应值的影响水平,系数的正负则反映了对响应值影响的方向^[22]。由方程和表 3 可以看出 A 、 B 、 C 、 AB 、 BC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对总酚酸提取率影响显著。在所选试验范围内,3 个因素对红雪茶总酚酸提取率的影响排序为:液料比 $>$ 提取时间 $>$ 乙醇浓度。

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance results

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	36.86	9	4.10	54.41	$< 0.0001^{***}$
A	11.93	1	11.93	158.53	$< 0.0001^{***}$
B	0.48	1	0.48	6.32	0.0402*
C	5.99	1	5.99	79.53	$< 0.0001^{***}$
AB	0.55	1	0.55	7.28	0.0308*
AC	0.28	1	0.28	3.66	0.0972
BC	1.78	1	1.78	23.68	0.0018*
A^2	1.77	1	1.77	23.53	0.0019*
B^2	8.77	1	8.77	116.57	$< 0.0001^{***}$
C^2	3.85	1	3.85	51.13	0.0002*
残差 Residual	0.53	7	0.075		
失拟项 Lack of fit	0.11	3	0.036	0.34	0.7976
纯误差 Pure error	0.42	4	0.10		
总和 Cor total	37.38	16			

注: $R^2 = 0.9859$; $R_{Adj}^2 = 0.9678$; $CV\% = 2.47\%$ 。* 差异显著, $P < 0.05$; *** 差异极显著 ($P < 0.001$)。

Note: $R^2 = 0.9859$; $R_{Adj}^2 = 0.9678$; $CV\% = 2.47\%$. * Significant difference, $P < 0.05$; *** Extremely significant difference, $P < 0.001$.

2.2.3 响应面分析

为了说明各试验因素本身及其相互作用对红雪茶总酚酸提取率的影响的强弱,采用 Design Expert 10 软件绘制出 3D 曲面图和等高线图。3D 曲面图曲面越陡,说明响应值对试验因素的变化越敏感,而

等高线图则反映了各变量间的相互作用的显著性,等高线图越接近于椭圆形表示变量之间的交互作用越显著,反之,等高线图越接近于圆形表示变量间的交互作用可以忽略不计^[23,24]。如图 4 显示,椭圆形等高线图表明液料比与乙醇浓度、乙醇浓度与提取

时间的交互作用对红雪茶总酚酸提取率影响显著 ($P < 0.5$)。而圆形的等高线图表明红雪茶总酚酸提取率对液料比与提取时间的交互作用不敏感。

通过 Design-Expert 软件分析确定出红雪茶总酚酸最佳提取工艺条件为:液料比为 30.00 mL/g,乙醇浓度 82.03%,提取时间 1.81 h,此时红雪茶总酚酸的理论得率值为 13.44 mg/g。为方便实际操

作,调整最佳提取条件为液料比为 30 mL/g,乙醇浓度 82%,提取时间 1.8 h,对结果进行了 3 次平行验证试验,在此条件下红雪茶总酚酸的提取率平均值为 13.43 ± 0.56 mg/g。结果表明,经过响应面回归方程拟合出的理论值与实际值相差不大,与理论值符合,验证了方程的可靠性。

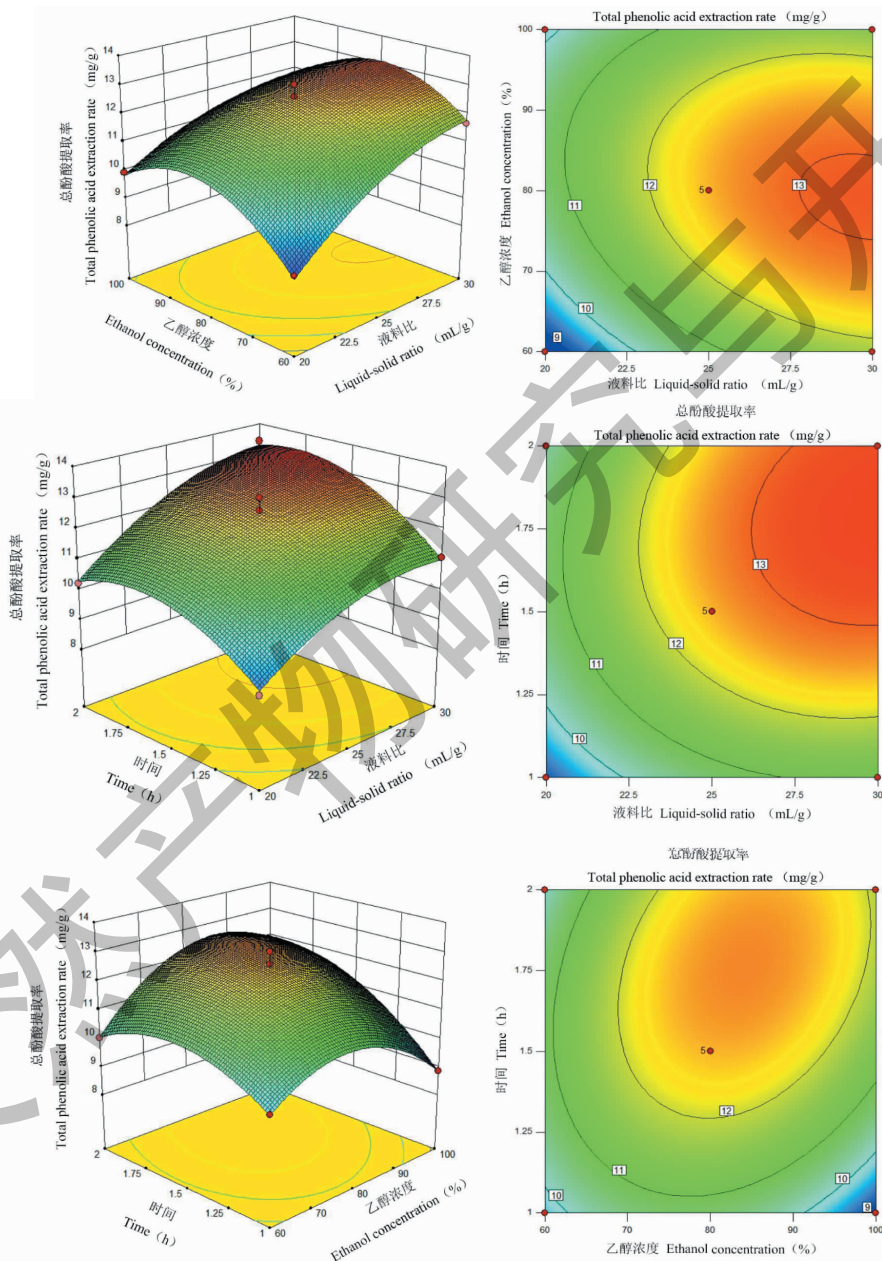


图 4 任意两变量对总酚酸提取率影响的 3D 曲面图和等高线图

Fig. 4 3D response surface and contour line for the effect of any two variables on extraction rate of total phenolic acid

2.3 体外抗氧化活性

2.3.1 DPPH 自由基清除能力

从图 5 中可见,DPPH 自由基清除率随红雪茶

总酚酸提取液浓度的升高逐渐升高,呈现明显的量效关系。当总酚酸浓度为 6 mg/mL 时,清除率达到最高为 96.16%。通过计算可得,其 IC_{50} 为 1.05

mg/mL,说明红雪茶酚酸提取物具有一定的 DPPH 自由基清除能力。

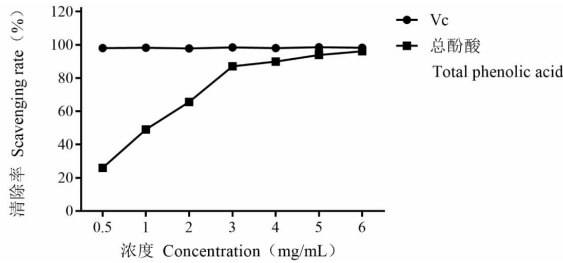


图5 总酚酸对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 5 The scavenging effect of total phenolic acid on DPPH radical

2.3.2 总还原能力

从图6可以看出,当红雪茶总酚酸提取物浓度较低时,其吸光值较低,总还原力较低。随着提取液质量浓度的增加,其吸光值也随之增加,在6 mg/mL时达到最大为1.24,与相同质量浓度的Vc吸光值相近。显示出红雪茶总酚酸提取物具有一定的体外抗氧化活性。

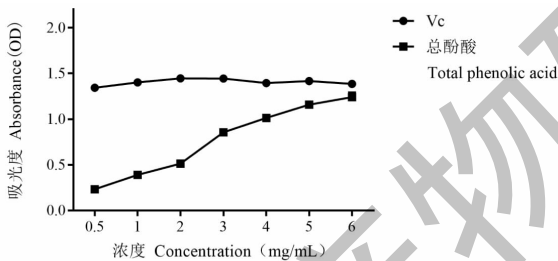


图6 总酚酸的总还原能力

Fig. 6 The total reductive ability of total phenolic acid

2.4 热应激试验

与对照组相比较,经过红雪茶总酚酸提取物预处理48 h的N2线虫在热应激条件下存活率均明显提高。如图7所示,当对照组N2线虫全部死亡时,经0.05 mg/mL红雪茶总酚酸提取物处理过后的N2线虫存活率最高,达到 $15.73\% \pm 4.89\%$,与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$);而在0.1 mg/mL条件处理下的N2线虫存活率稍低,为 $13.66\% \pm 1.17\%$,与对照组相比也具有显著性差异($P < 0.01$)。在0.15 mg/mL条件处理下的N2线虫存活率与对照组相比无显著性差异。结果充分说明了红雪茶总酚酸提取物能显著增强线虫抵抗热胁迫能力。

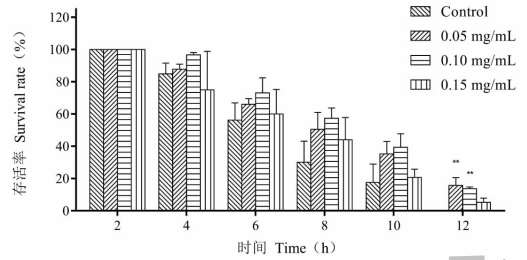


图7 总酚酸对线虫热应激存活率的影响

Fig. 7 Effects of total phenolic acids on survival rate of heat stress in *C. elegans*

3 讨论与结论

本研究采用 Box-Behnken 试验设计,优化了醇提红雪茶总酚酸的工艺。考察了提取时间、乙醇浓度、液料比三个因素对总酚酸得率的影响。试验所设计的响应面模型科学合理,具有高度的显著性,能正确反映各个因素与响应值之间的作用。通过 Design-Expert 软件分析确定出红雪茶总酚酸最佳提取工艺条件为:在液料比为30 mL/g,乙醇浓度82%,提取时间1.8 h时,此时总酚酸提取率理论值为13.44 mg/g,进行三次平行验证试验得总酚酸实际提取率为 13.43 ± 0.56 mg/g。结果表明,经过响应面回归方程拟合出的理论值与实际值相差不大,验证了方程的可靠性。

体外抗氧化试验结果显示,DPPH 自由基清除率与总还原能力与提取液质量浓度呈现明显的量效关系。当红雪茶总酚酸浓度为6 mg/mL时,DPPH 自由基清除率可达到96.16%,总还原能力与同浓度Vc效果相近,而Chen等^[25]研究发现,土三七总酚酸50%还原力值为0.054 mg/mL,DPPH半数清除率为0.057 mg/mL。表明红雪茶总酚酸提取物具有一定的体外抗氧化活性,但抗氧化活性不强。这可能是由于红雪茶中酚酸种类较多,不同酚酸单体对总酚酸体外抗氧化活性的贡献不同。且在提取过程中各种酚酸物质可能发生了复杂的反应,导致红雪茶总酚酸的体外抗氧化活性不强。

生物体寿命与应对外界的不良环境胁迫的抵抗能力密切相关^[26]。热应激可以诱导线虫体内自由基的产生,过量自由基的积累可能引起氧化损伤,增加线虫的死亡率。Wilson等^[27]发现,给线虫饲喂蓝莓多酚,可以使热应激条件下线虫的存活率增加2.5倍。Kim等^[28]发现原儿茶酸不仅可以显著延长秀丽线虫的寿命,还可以提高线虫在热应激和氧化应激条件下的存活率。本试验发现在不影响线虫生

长发育的红雪茶总酚酸提取物的浓度下,通过0.05、0.1、0.15 mg/mL的红雪茶提取物总酚酸处理线虫后,都能提高热应激条件下线虫的存活率,其中0.05 mg/mL的红雪茶总酚酸提取物对热应激损伤线虫的保护作用最好,其存活率达到 $15.73\% \pm 4.89\%$ ($P < 0.01$)。结果表明红雪茶总酚酸提取物具有显著的体内抗氧化活性,但其体外抗氧化活性不高,暗示总酚酸的生物活性可能不是通过直接清除自由基,而可能是激活机体内抗氧化系统,降低自由基含量,缓解氧化应激。综上所述,红雪茶总酚酸提取物具有极好的抗氧化药用价值,有潜力开发成一种天然抗氧化剂。

参考文献

- Zhan GF, Lu SM, Qu GF, et al. Analysis of volatile components in hongxue tea and baixue tea by SDE-GC-MS method [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2008, 20: 657-661.
- Tang L, Yang L, Ma Y, et al. Ethnobotanical study of Tibetan medicine Icetea [J]. J Minzu Univ China: Nat Sci(中央民族大学学报:自科版), 2009, 18(2): 83-86.
- Han BQ, Peng Y. Application history and research status of Icetea [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2012, 14(6): 63-67.
- He LJ, Tian SM, Dong WM. Research progress on chemical constituents and health effects of Lijiang Icetea [J]. Newslett Seric Tea(蚕桑茶叶通讯), 2014(2): 24-26.
- Ma ZM, Chen XR. Chemical constituents of *Thamnia vermicularis* [J]. Lishixhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12: 872-872.
- Fu H, Wang LS, Chen YH, et al. A study on nutritional components of two different lichen teas from Yunnan [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2005, 17: 340-343.
- Mao GY, Zhuang XW, Cai GM, et al. Study of prevention and treatment effects of *Lethariella cladonioides* polysaccharide on hyperlipidemic fatty liver in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2012, 28: 1479-1480.
- Gao XL, Zhang RP. Studies on chemical constituents of *Lethariella cladonioides* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35: 370-371.
- Wu Y, Yang QS, Zhao HM, et al. Optimization of water-insoluble dietary fiber extraction from *Lethariella* spp. residue by the acid treatment technology [J]. J Yunnan Minzu Univ: Nat Sci(云南民族大学学报:自科版), 2017, 26: 185-188.
- Gao DW, Li WG, Gao Y, et al. *Caenorhabditis elegans*: a model organism for studies of antioxidant activity of plant extracts [J]. Mil Med Sci(军事医学), 2013, 37: 315-317.
- Zhang N. The review of human disease model studies using *Caenorhabditis elegans* [J]. Chin J Food Hyg(中国食品卫生杂志), 2014, 26: 398-403.
- Ji JJ, Dong J, Wang BB, et al. Application of *Caenorhabditis elegans* in the field of traditional Chinese medicine research [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2016, 18: 526-530.
- Wu Z, Smith JV, Paramasivam V, et al. *Ginkgo biloba* extract EGb761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans* [J]. Cell Mol Biol, 2002, 48: 725-731.
- Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, et al. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin, caffeic acid and rosmarinic acid mediated life extension in *C. elegans* [J]. Biogerontology, 2011, 12: 329-347.
- Li GS, Wang GX, Zhao NH. The assaying of the component of total phenolic acidity in danshen oral liquid [J]. Lishixhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12: 683-683.
- Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited [J]. Food Chem, 2009, 113: 1202-1205.
- Zhang Y, Yu ZY, Geng FN, et al. Content determination of total phenolic acids in extract of *Taraxacum mongolicum* [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2018, 39(3): 123-126.
- Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 1974, 77(1): 71-94.
- Wu Y, Sheng ZL, Gao LF, et al. Optimization of extraction process of total phenolic acids from *Syringa oblata* Lindl. leaves by response surface methodology [J]. Food Sci Technol(食品工业科技), 2015, 36: 286-290.
- Tian M, Li DX, Qian J, et al. Optimization of extraction for composition from *Laurocerasus phaeosicta* leaf by response surface methodology—total polyphenols, total flavonoids and DPPH radical scavenging activity [J]. J Cent China Norm Univ: Nat Sci(华中师范大学学报:自科版), 2018, 52(5): 69-75.
- Zhang BX, Guo QM, Wang ZZ, et al. Optimazation of extraction process of total phenolic acid from *Lonicerae Japonicae* Flos by response surface methodology [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35: 2144-2148.
- Fan MX, Qin KM, Ding F, et al. Optimization of the extraction technology of phenolic acids in *Cimicifugae foetidae* by using box-behnen response surface methodology combined with multi-index comprehensive weighted method [J]. China Pharm(中国药房), 2016, 27: 1835-1838.