

信阳毛尖茶多酚超声辅助深共熔溶剂提取及抗氧化活性和对肠道菌群的影响

宋巧英, 赵宝怡, 刘子晴

(安阳工学院 生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000)

摘要: 采用单因素实验和正交实验对超声辅助深共熔溶剂 (DESs) 提取信阳毛尖茶多酚 (简称茶多酚) 提取工艺进行了优化, 测试了茶多酚体外抗氧化活性和细胞抗氧化活性, 通过血清指标测定、肠道菌群相对丰度统计分析, 评估了茶多酚对衰老小鼠体内外抗氧化能力和对肠道菌群的调控作用。结果表明, 在以 $n(\text{氯化胆碱}) : n(\text{乙酸}) = 1 : 3$ 制备的 DES-4 为提取溶剂、DES-4 含水率 (质量分数) 30%、超声温度 40 °C、超声时间 25 min、超声功率 115 W、料液比 (g : mL) 1 : 35 的最佳条件下, 茶多酚得率为 $78.65\% \pm 3.44\%$; 质量浓度为 5 g/L 茶多酚对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基、羟基自由基和 2,2-联氨-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基的清除率分别为 $86.3\% \pm 1.59\%$ 、 $86.46\% \pm 2.19\%$ 和 $75.13\% \pm 3.88\%$, 细胞抗氧化活性值 63.2 ± 1.85 。茶多酚可显著 ($P < 0.05$) 降低血清中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 水平, 并升高高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的水平, 对 D-半乳糖致衰小鼠脏器官具有一定的保护作用; 茶多酚可升高促炎因子白细胞介素-12 (IL-12)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平, 降低抗炎因子白细胞介素-10 (IL-10) 水平, 改善 D-半乳糖致衰小鼠的炎症反应; 茶多酚可提高血清中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的酶活, 降低丙二醛水平, 增加小鼠体内抗氧化能力; 茶多酚通过改变肠道菌群的相对丰度和多样性, 特别是增加有益菌乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、假丝酵母菌属 (*Candidatus Saccharimonas*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 的相对丰度, 降低有害菌 *Muribaculaceae* 和脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 的丰度, 从而改善紊乱的 D-半乳糖致衰小鼠肠道菌群至正常运行水平。

关键词: 信阳毛尖茶; 茶多酚; 深共熔溶剂; 抗氧化活性; 肠道菌群; 中药现代化技术
中图分类号: TS272.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 05-1051-12

Extraction of polyphenols from Xinyang Maojian tea with ultrasonic-assisted deep eutectic solvent and study on its antioxidant activity and effects on intestinal flora

SONG Qiaoying, ZHAO Baoyi, LIU Ziqing

(College of Biotechnology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, Henan, China)

Abstract: The extraction process of polyphenols from Xinyang Maojian tea (tea polyphenols for short) with ultrasonic-assisted eutectic solvent was optimized *via* single factor experiment and orthogonal experiment. The antioxidant activity of tea polyphenols both *in vitro* and *in vivo* was analyzed, the antioxidant capacity on aging mice and the regulation on intestinal flora *in vitro* and *in vivo* were further evaluated by serum index determination and relative abundance statistical analysis of intestinal flora. The results showed that under the optimal extraction conditions of DES-4 prepared with $n(\text{choline chloride}) : n(\text{acetic acid}) = 1 : 3$ as extraction solvent, DES-4 moisture content (mass fraction) 30%, ultrasonic temperature 40 °C, ultrasonic time 25 min, ultrasonic power 115 W, solid-liquid ratio (g : mL) 1 : 35, the yield of tea polyphenols

reached 78.65%±3.44%. The scavenging rates of tea polyphenols with a mass concentration of 5 g/L on 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazide free radicals, hydroxyl free radicals and 2,2-diazo-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid)diammonium salt free radicals were 86.3%±1.59%, 86.46%±2.19% and 75.13%±3.88%, respectively. The cell antioxidant activity value was 63.2±1.85. The results of mice experiments showed that tea polyphenols could significantly reduce the levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) in serum, and increase the level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), which had a certain protective effect on the organs of D-galactose-induced aging mice. Moreover, tea polyphenols could increase the levels of pro-inflammatory factors interleukin-12 (IL-12), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and reduce the levels of anti-inflammatory factor interleukin-10 (IL-10), thus improving the inflammatory response in D-galactose-induced of aging mice. Tea polyphenols also increased the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in serum, while decreased the level of malondialdehyde, thereby increasing the *in vivo* antioxidant capacity of mice. Tea polyphenols also could change the abundance and diversity of intestinal flora, especially increase the abundance of beneficial bacteria *Lactobacillus*, *Candidatus_Saccharimonas* and *Corynebacterium*, and decreased the abundance of harmful bacteria *Desulfovibrio* and *Muribaculaceae*, thereby improving the disorder of intestinal flora in D-galactose-induced aging mice, and thus effectively regulating the normal operation of metabolic pathways in mice.

Key words: Xinyang Maojian tea; tea polyphenols; deep eutectic solvent; antioxidant activity; intestinal flora; modern technology of Chinese medicine

随着人们对健康生活需求的不断提高,茶叶中的茶多酚被人们发现,并逐渐加工为保健品或药品,这既是对维护人体健康的有益补充,也是茶叶深加工的一种新方法。研究表明,茶多酚具有较全面的保健功能,如抗氧化、预防动脉粥样硬化、抗癌、抑菌等^[1-2]。

深共熔溶剂(DESs)具有环境友好、成本低、安全性高等优点^[3],在生物及材料科学领域具有广泛的用途,近年来逐渐成为研究热点。付佳乐等^[4]利用微波辅助 DESs 提取沙棘黄酮,提取率可达 20.82 mg/g。OZTURK 等^[5]也采用同样的方法提取橙皮中的多酚类物质。目前,鲜有关于 DESs 提取茶叶内活性成分的研究报道。

信阳毛尖作为中国传统名茶之一,不仅所泡茶水口感醇厚,更因其独特的活性成分而备受关注。近年来,关于信阳毛尖活性成分的研究逐渐增多。信阳毛尖含有丰富的茶多酚、氨基酸、矿物质等活性成分^[6],其中,茶多酚是信阳毛尖最为主要的活性成分之一,是茶叶中多酚类物质的总称,主要包括儿茶素类、黄酮类、黄酮醇类和酚酸类等化合物^[7-8],这些化合物赋予了信阳毛尖茶独特的口感和香气,同时也为人体健康带来了诸多益处。

本文拟利用深共熔溶剂对信阳毛尖中茶多酚进行提取,并对提取率进行工艺优化,评估茶多酚体内外抗氧化能力及对肠道菌群的影响,以期信阳毛尖茶多酚在食品加工及药理领域的开发奠定理论基础。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

信阳毛尖,河南省信阳市;人肝癌细胞(HepG2 细胞),武汉普诺赛生命科技有限公司实验动物中心;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测试盒、谷草转氨酶(AST)测试盒、谷丙转氨酶(ALT)测试盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒、白细胞介素-12(IL-12)测试盒、白细胞介素-6(IL-6)测试盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)测试盒、白细胞介素-10(IL-10)测试盒,南京建成生物工程研究所。

氯化胆碱、无水乙醇、1,2-丙二醇、甘油、乙二醇、无水碳酸钠、苹果酸、柠檬酸、乳糖、乙酸、木糖醇、尿素、果糖、氢氧化钠,分析纯,上海源叶生物科技有限公司;福林酚试剂,天津市光复精细化工研究所;抗坏血酸(V_C),国药集团化学试剂有限公司;胎牛血清、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS, pH=6.8),美国 GIBCO 公司;D-半乳糖、槲皮素标准品,上海麦克林生化科技股份有限公司。

健康雄性 C57BL/6 小鼠 [7~8 周, (340±10) g], 中国北京斯贝福生物科技有限公司,动物许可证号: SYXK: 2019-0002。

动物福利和实验程序按照相关法律和《实验动物护理和使用指南》(中国科学技术部, 2020)进行。

动物保护与使用委员会伦理批准 (No. IRM-DWLL-2022250)。实验前,所有 C57BL/6 小鼠均保持在温度 23~25 °C、相对湿度 40%~65% 的特定环境中,以适应环境。

FSH-2A 型可调高速均质机,常州市亿能实验仪器厂;UV1901pcs 型双光束紫外-可见分光光度计 (UV-Vis),青岛精诚仪器仪表有限公司;PHSJ-6L 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;JIDI-20 型台式多用途高速离心机,广州吉迪仪器有限公司;Infinite 200 PRO 型多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司。

1.3 方法

1.3.1 DESs 的制备

以氯化胆碱为氢键受体,根据 $n(\text{氯化胆碱}) : n(\text{氢键供体}) = 1 : 3$,将氯化胆碱和氢键供体混合加热,搅拌至完全溶解,即制得 DESs。将以尿素、甘油、乳糖、乙酸、蔗糖、乙二醇、1,2-丙二醇为氢键供体制得的 DESs 分别记为 DES-1~DES-7。

1.3.2 茶多酚的提取

甲醇提取法:将干燥的信阳毛尖放入小型粉碎机中粉碎后得到信阳毛尖粉末。称取信阳毛尖粉末 50 g,按料液比 (g : mL,下同) 1 : 30 加入体积分数为 80% 的甲醇水溶液,40 °C 下超声 20 min 进行信阳毛尖茶多酚 (简称茶多酚) 的提取。

超声辅助 DESs 提取法:称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在超声温度 40 °C、料液比 1 : 30、超声功率 120 W、DESs 含水率 (质量分数,下同) 30% 的条件下超声提取 20 min。

1.3.3 茶多酚得率的计算

以没食子酸为标准品采用酒石酸亚铁比色法,以没食子酸标准溶液浓度 (g/L) 为横坐标,540 nm 处吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得到的拟合方程为 $y = 0.486x + 0.0086$, $R^2 = 0.9993$ 。

将信阳毛尖粉末加入不同体积分数的乙醇,超声提取后在 4000 r/min 的条件下离心 10 min,取上清液。然后,用酒石酸亚铁溶液滴定上清液,直至溶液颜色由棕褐色变成灰青色。最后,用 UV-Vis 在 540 nm 处测量吸光度^[9]。根据式 (1) 计算茶多酚得率:

$$R/\% = m_1/m_2 \times 100 \quad (1)$$

式中: R 为茶多酚得率,%; m_1 为茶多酚质量, g; m_2 为信阳毛尖粉末质量, g。

1.4 单因素实验

1.4.1 DESs 类型的影响

称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在超声温度 40 °C、料液比 1 : 30、超声功率 120 W、DESs 含水率 30% 的条件下超声提取 20 min。考察 DESs 类型 (DES-1~DES-7) 对茶多酚得率的影响。每个实验

平行进行 3 次。

1.4.2 DES-4 含水率的影响

称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在超声温度 40 °C、料液比 1 : 30、超声功率 120 W、超声时间 20 min 的条件下,考察 DES-4 不同含水率 (20%、30%、40%、50%、60%) 对茶多酚得率的影响。每个实验平行进行 3 次。

1.4.3 料液比的影响

称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在超声温度 40 °C、DES-4 [$n(\text{氯化胆碱}) : n(\text{乙酸}) = 1 : 3$ 制备] 含水率 30%、超声功率 120 W、超声时间 20 min 的条件下,考察料液比 (1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50、1 : 60) 对茶多酚得率的影响。每个实验平行进行 3 次。

1.4.4 超声温度的影响

称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在料液比 1 : 30、DES-4 含水率 30%、超声功率 120 W、超声时间 20 min 的条件下,考察超声温度 (20、30、40、50、60 °C) 对茶多酚得率的影响。每个实验平行进行 3 次。

1.4.5 超声时间的影响

称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在料液比 1 : 30、DES-4 含水率 30%、超声功率 120 W、超声温度 40 °C 的条件下,考察超声时间 (10、20、30、40、50 min) 对茶多酚得率的影响。每个实验平行进行 3 次。

1.4.6 超声功率的影响

称取信阳毛尖粉末 0.5 g,在料液比 1 : 30、DES-4 含水率 30%、超声时间 20 min、超声温度 40 °C 的条件下,考察超声功率 (80、90、100、110、120、130 W) 对茶多酚得率的影响。每个实验平行进行 3 次。

1.5 正交实验

在单因素实验结果的基础上,选取超声温度 (A)、超声时间 (B)、超声功率 (C) 和料液比 (D) 为因素,以茶多酚得率为指标,设计四因素三水平的正交实验。正交实验设计见表 1。

表 1 正交实验因素水平表
Table 1 Orthogonal test factor level table

因素	水平		
	1	2	3
超声温度 (A) / °C	35	40	45
超声时间 (B) / min	15	20	25
超声功率 (C) / W	115	120	125
料液比 (D) / (g : mL)	1 : 25	1 : 30	1 : 35

1.6 茶多酚体外抗氧化活性测试

参照文献[10]方法,以 V_C 为阳性对照,比较超声辅助 DESs 法和甲醇提取法提取的茶多酚对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基、羟基自由基和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐

(ABTS⁺) 自由基的清除能力, 测定茶多酚的体外抗氧化活性。

1.7 茶多酚细胞抗氧化活性测试

利用细胞抗氧化活性 (CAA) 法^[11]测定茶多酚在细胞水平的抗氧化能力。取对数生长期的 HepG2 细胞, 调整细胞密度 2×10^4 个/mL, 接种至 96 孔板中, 每孔 100 μ L 培养 24 h。贴壁后, 将细胞分为 5 组: 模型组、阳性对照组 (槲皮素标准品)、高剂量组 (质量浓度 0.5 g/L)、中剂量组 (质量浓度 0.3 g/L) 和低剂量组 (质量浓度 0.1 g/L)。培养 1 h 后移除培养基, 加入 100 μ L 2-乙酰基-4-丁酰胺基苯酚后测量其在 538 和 485 nm 下的荧光强度, 每间隔 5 min 测量 1 次, 测定时长为 180 min。根据式 (2) 计算 CAA 值:

$$CAA \text{ 值} = 100 - (S_{SA} / S_{CA}) \times 100 \quad (2)$$

式中: S_{SA} 为茶多酚荧光-时间曲线下的积分面积; S_{CA} 为槲皮素荧光-时间曲线下的积分面积。

1.8 茶多酚对衰老小鼠的抗氧化作用

60 只健康雄性 C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 6 组, 每组 10 只。分组名称及给药方案如表 2 所示。给药前, 除空白组外, 其余各组小鼠用 D-半乳糖以 50 mg/kg BW 的剂量腹腔注射, 每次注射量均为 0.1 mL/10 g, 每日 1 次, 连续造模 6 周^[12]。当小鼠血清抗氧化酶活力明显降低时, 表明造模成功, 然后按表 2 进行给药。在给药期间, 每周测定各组小鼠体重并记录。给药 8 周后, 禁食不禁水 12 h, 眼球取血, 迅速冷冻离心收集上清液利用相关试剂盒进行血清生化指标检测, 包括 LDL-C、HDL-C、AST、ALT; 血清免疫指标, 包括 IL-12、IL-6、TNF- α 和 IL-10; 血清氧化指标, 包括 GSH-Px、SOD 和 MDA 等。

颈椎脱臼法处死小鼠后, 摘取肾脏和肝脏, 迅速用生理盐水洗净称重, 计算各组小鼠脏器指数^[13]。同时收集各组小鼠盲肠内容物于 -80 $^{\circ}$ C 下, 利用 16S rRNA 基因高通量测序进行聚类分析。并使用 Usearch 软件对每组小鼠肠道菌群分类学及微生物多样性进行分析^[14]。

表 2 给药方案
Table 2 Dosage regimen

组别	给药成分	剂量/(mg/kg BW)
空白组 (NC)	生理盐水	10.0
模型组 (MC)	生理盐水	10.0
阳性对照组 (PC)	V _c	2.0
茶多酚低剂量组 (LTP)	茶多酚	5.0
茶多酚中剂量组 (MTP)	茶多酚	10.0
茶多酚高剂量组 (HTP)	茶多酚	20.0

1.9 数据处理

每组实验均进行 3 次重复, 结果均以“平均值 \pm

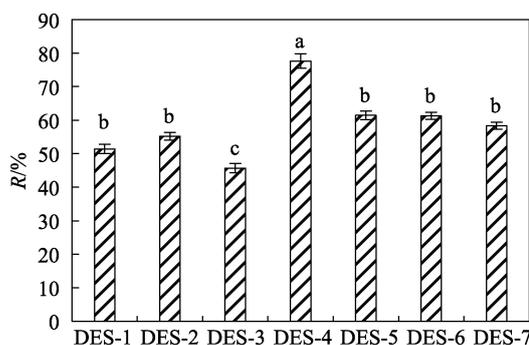
标准差”的形式表示。实验结果均用 SPSS 软件进行计算。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 DESs 类型对茶多酚得率的影响

图 1 为 DESs 类型对茶多酚得率的影响。



肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

图 1 DESs 类型对茶多酚得率的影响

Fig. 1 Effect of DESs types on extraction yield of tea polyphenols

从图 1 可以看出, 以 DES-4 为提取溶剂, 茶多酚得率最大, 为 $75.92\% \pm 0.18\%$ 。这可能是因为, 乙酰基 DES 具有更强的极性, 更适合提取茶多酚等极性较强的化合物。这与 SAHA 等^[15]采用氯化胆碱和草酸为基础的 DESs 对柑桔中的酚类化合物提取的结果相近。因此, 茶多酚提取的最佳溶剂为 DES-4。

2.1.2 DES-4 含水率对茶多酚得率的影响

水分可改变 DESs 的黏度等物理性质和对活性物质的提取性能。图 2 为 DES-4 含水率对茶多酚得率的影响。

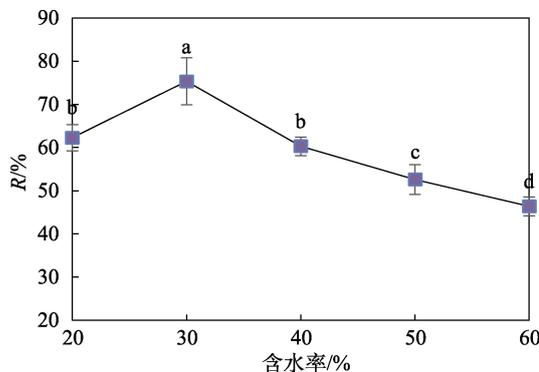


图 2 DES-4 含水率对茶多酚得率的影响

Fig. 2 Effect of water content of DES-4 on extraction yield of tea polyphenols

当 DESs 含水率为 30% 时, 茶多酚得率最大, 为 $74.68\% \pm 3.49\%$ 。这可能是因为, 溶剂的增加提高了溶液与毛尖茶的接触面积, 从而有利于提高茶多

酚得率。然而, 随着溶剂体积的进一步增加, 茶多酚得率逐渐下降, 这是因为, 在一定时间内, 溶剂体积的增加会消耗过多的超声波能量, 从而降低了茶多酚的得率^[16]。

2.1.3 料液比对茶多酚得率的影响

图 3 为料液比对茶多酚得率的影响。

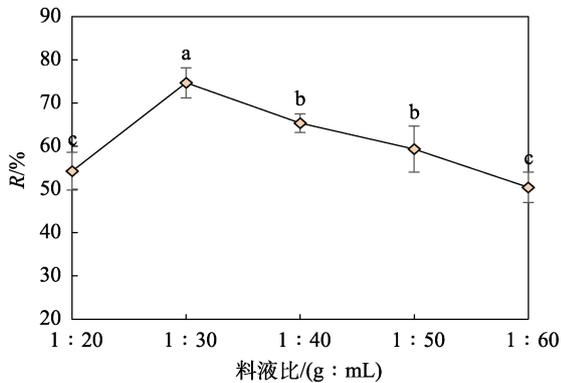


图 3 料液比对茶多酚得率的影响

Fig. 3 Effect of material-liquid ratio on extraction yield of tea polyphenols

由图 3 可知, 在一定的料液比 (1 : 20~1 : 60) 范围内, 随着料液比的减小, 即提取溶剂 DES-4 的体积增加, 茶多酚得率呈先增加后减小的趋势。这可能是因为, 溶剂的增加会提高接触面积, 从而有利于提高茶多酚得率, 但过多的溶剂会过度消耗超声波能量, 从而降低茶多酚的得率^[17]。当料液比为 1 : 30 时, 茶多酚得率最大, 为 74.68%±3.49%。因此, 茶多酚提取最佳料液比为 1 : 30。

2.1.4 超声温度对茶多酚得率的影响

图 4 为超声温度对茶多酚得率的影响。

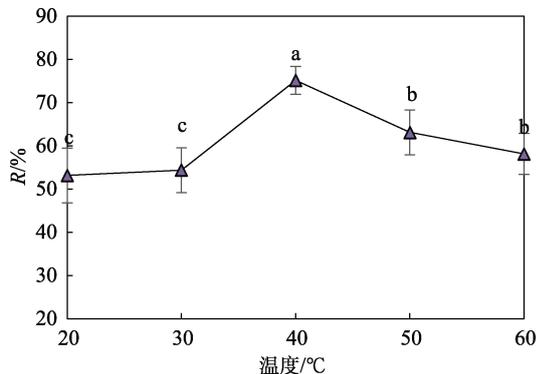


图 4 超声温度对茶多酚得率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic temperature on extraction yield of tea polyphenols

从图 4 可以看出, 随着超声温度的增加, 茶多酚得率呈先增加后减小的趋势。这是因为, 温度的升高加剧了溶液中分子的运动速率, 从而提高了茶多酚的溶解度, 但过高的温度会降解部分热敏性的

茶多酚, 从而降低了茶多酚得率^[18]。当超声温度为 40 °C 时, 茶多酚得率最大, 为 75.16%±3.24%。因此, 茶多酚提取最佳超声温度为 40 °C。

2.1.5 超声时间对茶多酚得率的影响

图 5 为超声时间对茶多酚得率的影响。

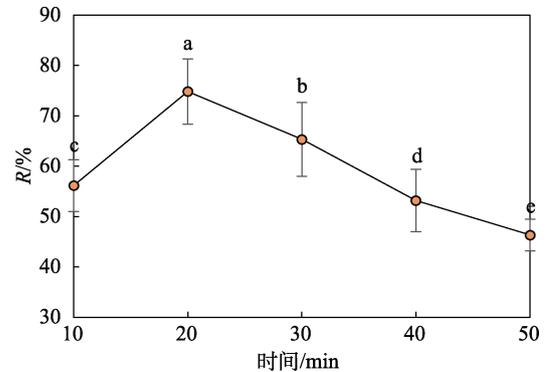


图 5 超声时间对茶多酚得率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic time on extraction yield of tea polyphenols

从图 5 可以看出, 随着超声时间的增加, 茶多酚得率呈先增加后下降的趋势。当超声时间为 20 min 时, 茶多酚得率最大, 为 74.83%±6.48%。这是因为, 超声时间的增加会使茶多酚被溶剂充分溶解, 但超声时间过长, 部分茶多酚受外界因素的影响会被氧化降解, 从而降低茶多酚得率^[19]。因此, 茶多酚提取最佳超声时间为 20 min。

2.1.6 超声功率对茶多酚得率的影响

图 6 为超声功率对茶多酚得率的影响。

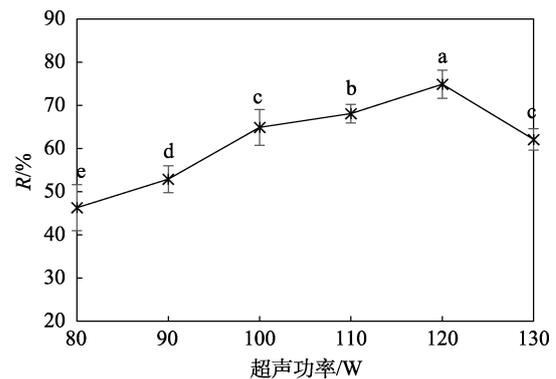


图 6 超声功率对茶多酚得率的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic power on the yield of tea polyphenols

从图 6 可见, 随着超声功率的增加, 茶多酚得率呈先增大后减小的趋势, 这是因为, 随着超声功率的增加, 超声波的能量会破坏毛尖茶细胞结构, 使更多的茶多酚释放并被提取溶剂溶解, 但超声功率过高, 会造成部分茶多酚被降解, 从而降低茶多酚得率^[20]。当超声功率为 120 W 时, 茶多酚得率最

大, 为 74.90%±3.26%。因此, 茶多酚提取最佳超声功率为 120 W。

2.2 正交实验结果

表 3 为正交实验结果。

表 3 正交实验结果
Table 3 Orthogonal test design and results

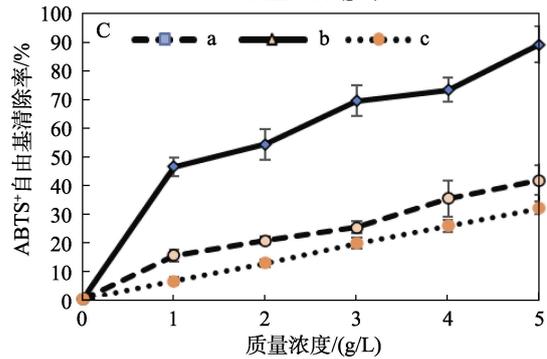
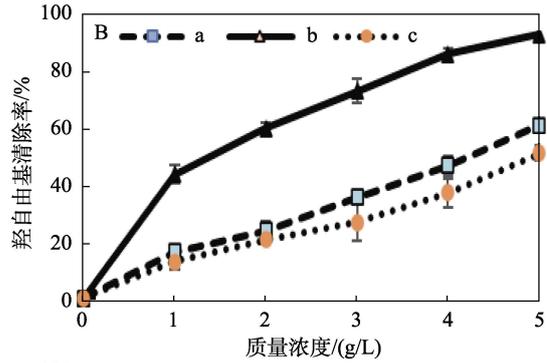
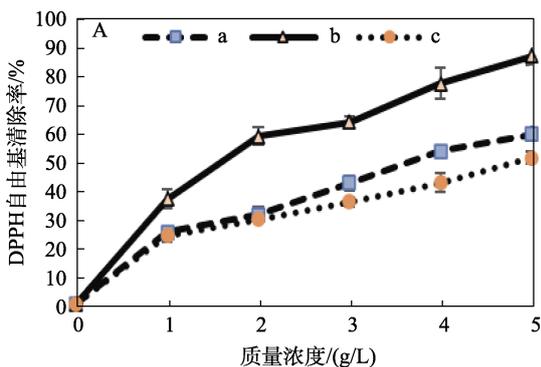
实验序号	A/°C	B/min	C/W	D/(g : mL)	茶多酚得率/%
1	35	15	115	1 : 25	69.95±2.16 ^d
2	35	20	120	1 : 30	70.14±3.24 ^c
3	35	25	125	1 : 35	72.64±2.39 ^a
4	40	15	120	1 : 35	68.34±3.15 ^e
5	40	20	125	1 : 25	72.13±2.43 ^b
6	40	25	115	1 : 30	73.26±1.06 ^a
7	45	15	125	1 : 30	65.32±2.15 ^f
8	45	20	115	1 : 35	72.34±1.35 ^b
9	45	25	120	1 : 25	70.46±2.64 ^c
K_1	212.73	203.61	215.55	212.54	
K_2	213.73	214.61	208.94	208.72	
K_3	208.12	216.36	210.09	213.32	
k_1	70.91	67.87	71.85	70.85	
k_2	71.24	71.54	69.65	69.57	
k_3	69.37	72.12	70.03	71.11	
极差 R	1.87	4.25	2.20	1.54	
因素主次	B>C>A>D				
最佳方案	$A_2B_3C_1D_3$				

从表 3 的极差分析可以看出, 茶多酚得率的影响因素高低顺序为: 超声时间 (B) > 超声功率 (C) > 超声温度 (A) > 料液比 (D)。

最优组合为 $A_2B_3C_1D_3$, 即超声温度 40 °C、超声时间 25 min、超声功率 115 W、料液比 1 : 35。由于该组合不在正交表的设计范围内, 所以需进行验证实验。验证实验结果显示, 此条件下茶多酚得率为 78.65%±3.44%, 均高于单因素和正交实验实验结果, 表明 $A_2B_3C_1D_3$ 具有可行性。

2.3 茶多酚体外抗氧化活性分析

图 7 为茶多酚体外抗氧化活性测试结果。



a—传统乙醇提取茶多糖抗氧化活性; b—DESs 提取茶多酚抗氧化活性; c—Vc 抗氧化活性

图 7 茶多酚对 DPPH 自由基 (A)、羟自由基 (B) 及 ABTS⁺ 自由基 (C) 的清除率

Fig. 7 Scavenging rate of tea polyphenols on DPPH free radicals (A), hydroxyl free radicals (B) and ABTS⁺ free radicals (C)

从图 7 可以看出, 随着茶多酚质量浓度 (0~5 g/L) 的增加, DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率均逐渐增加, 呈现显著的剂量依赖效应。当茶多酚质量浓度为 5 g/L 时, DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 86.3%±1.59%、86.46%±2.19% 和 75.13%±3.88%。

这可能是因为, 茶多酚可通过抑制氧化酶与诱导氧化的金属离子螯合而达到抑制自由基的产生, 并具有对类胡萝卜素等抗氧化剂的保护作用, 从而能够保护和修复机体抗氧化体系^[21]。与甲醇提取法相比, 超声辅助 DESs 法提取的茶多酚具有更好的抗氧化活性。这可能是因为, 茶多酚是一类复杂的混合物, 包括儿茶素、黄酮类、酚酸类等多种化合物, 每种化合物都有其独特的抗氧化活性。不同的溶剂 (DESs 或甲醇) 由于其化学性质不同, 对茶多酚中各组分的溶解能力也有所差异。

2.4 茶多酚细胞抗氧化活性分析

图 8 为茶多酚细胞抗氧化活性测试结果。

从图 8 可以看出, CAA 值随着茶多酚质量浓度的增加而逐渐升高, 呈剂量依赖效应。当茶多酚质量浓度为 5 g/L 时, CCA 值可达到 63.2±1.85, 与王育川等^[22]茶多酚添加在饲料中可提高空肠的抗氧化能力的结果相近。

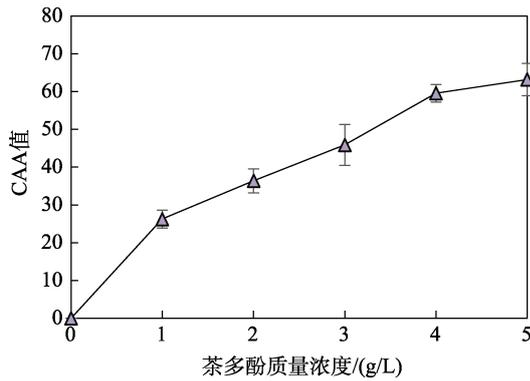


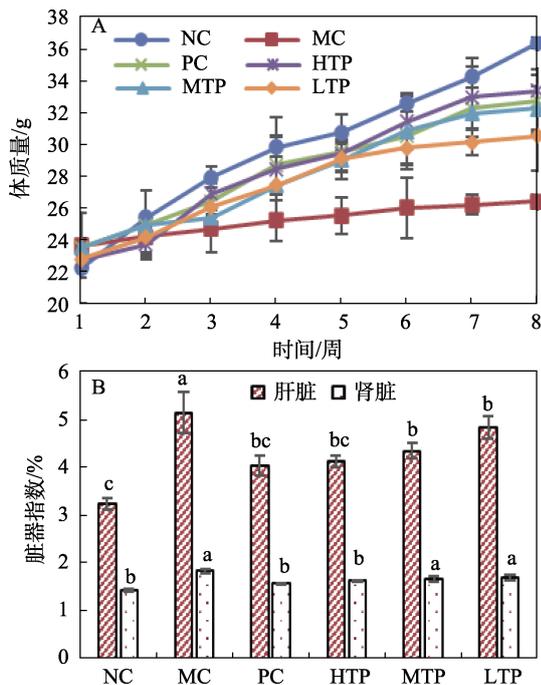
图 8 茶多酚的细胞抗氧化活性

Fig. 8 Antioxidant activity of tea polyphenols at cellular level

2.5 茶多酚对衰老小鼠的抗氧化作用分析

2.5.1 小鼠体质量及脏器指数分析

小鼠体质量和脏器指数可反映小鼠营养状况和衰老情况^[23]。图 9 为茶多酚对小鼠体质量及脏器指数的影响。



不同小写字母代表数据间具有显著差异 ($P < 0.05$)，下同

图 9 茶多酚对小鼠体质量及脏器指数的影响

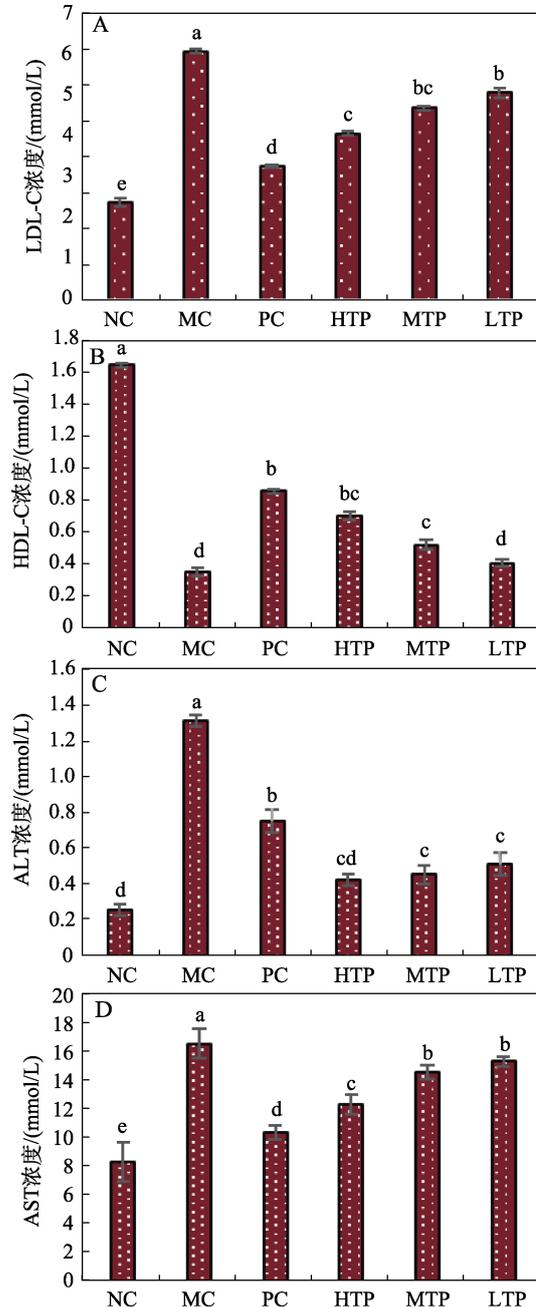
Fig. 9 Effects of tea polyphenols on body mass and organ index of mice in each group

从图 9A 可以看出, MC 组小鼠体质量最低, 表明氧化损伤小鼠建模成功。随着喂养时间的延长, LTP 组、MTP 组和 HTP 组小鼠的体质量逐渐升高, 均高于 MC 组, 并呈剂量依赖效应。从图 9B 可以看出, MC 组小鼠的肝脏和肾脏脏器指数最高, 表明器官发生肿大和硬化。茶多酚干预后, 小鼠的肝脏和肾脏脏器指数均有所下降, 且 HTP 组小鼠的脏器指数和 MC 组具有显著性差异, 表明茶多酚对衰

老小鼠脏器具有一定的保护作用^[24]。

2.5.2 小鼠血清的生化指标分析

图 10 为茶多酚对各组小鼠体血清生化指标 (LDL-C、HDL-C、AST 和 ALT 浓度) 的影响测试结果。



A—LDL-C 浓度; B—HDL-C 浓度; C—AST 浓度; D—ALT 浓度

图 10 茶多酚对小鼠体血清生化指标的影响

Fig. 10 Effects of tea polyphenols on serum biochemical indexes of mice in each group

LDL-C 在机体中扮演着重要的角色, 可将胆固醇运送至肝外。LDL-C 的升高可引发慢性炎症, 从而加速衰老^[25]。从图 10A 可以看出, MC 组小鼠 LDL-C 浓度最大, 与其他组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 经茶多酚的干预治疗后, LTP、MTP 和 HTP 组小鼠 LDL-C 浓度明显下降, 比 MC 组小鼠分别下降

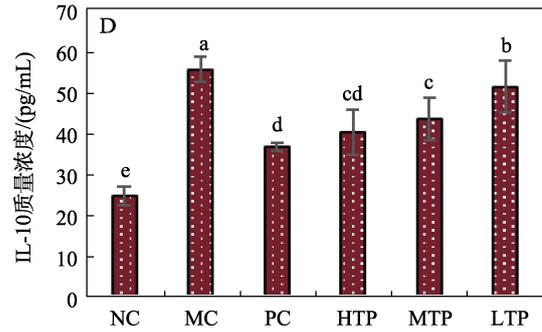
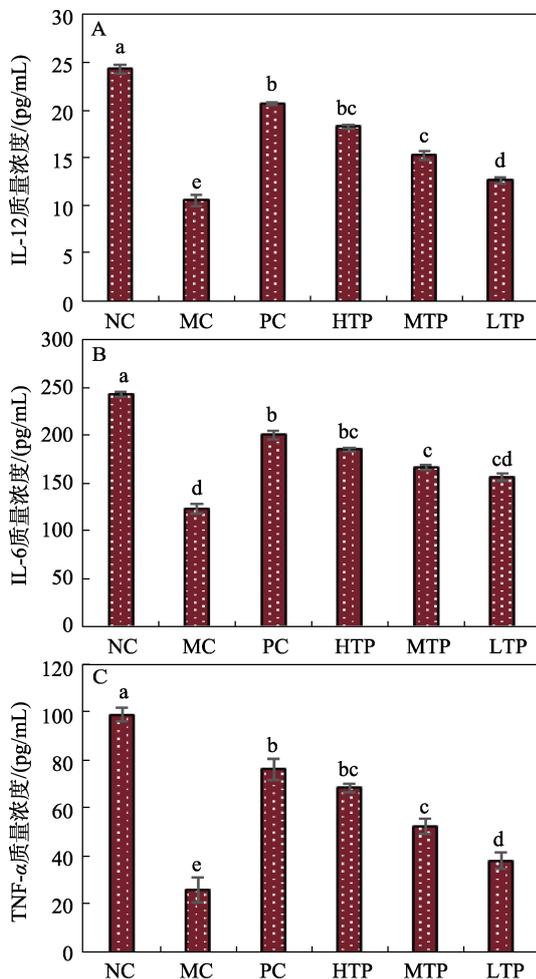
16.48%、22.77%和 33.02%，呈一定的剂量依赖效应。

HDL-C 可通过促进胆固醇的酯化降低血浆中游离胆固醇含量，因此对人体健康至关重要^[26]。从图 10B 可以看出，MC 组小鼠 HDL-C 水平最低，而茶多酚干预治疗后 LTP、MTP 和 HTP 组小鼠 HDL-C 水平比 MC 组分别升高 15.47%、46.96%和 96.69%，具有一定的剂量依赖效应。表明茶多酚可显著降低小鼠血清中 LDL-C 的水平并可升高 HDL-C 的水平，从而使小鼠血脂代谢达到平衡。

AST 和 ALT 常用于评估肝脏损伤情况。血清中 AST 和 ALT 的升高意味着肝细胞存在损伤或坏死。从图 10C、D 可以看出，MC 组小鼠血清中 AST 和 ALT 浓度最高，表明 D-半乳糖导致衰老小鼠肝脏的损伤。经茶多酚干预治疗后，LTP、MTP 和 HTP 组小鼠血清中 AST 和 ALT 浓度逐渐降低，与 MC 组具有显著差异 ($P < 0.05$)，并呈剂量依赖效应，表明茶多酚对衰老小鼠肝损伤具有一定的恢复作用^[27]。占心侖等^[28]研究发现，归芍茶多酚可降低 D-半乳糖氧化损伤小鼠血清中 AST 和 ALT 水平，这与本结果一致。

2.5.3 小鼠血清免疫指标分析

图 11 为茶多酚对各组小鼠血清免疫指标 (IL-12、IL-6、TNF- α 、IL-10 质量浓度) 的影响测试结果。



A—IL-12 质量浓度；B—IL-6 质量浓度；C—TNF- α 质量浓度；D—IL-10 质量浓度

图 11 茶多酚对各组小鼠血清免疫指数的影响

Fig. 11 Effects of tea polyphenols on serum immune index of mice in each group

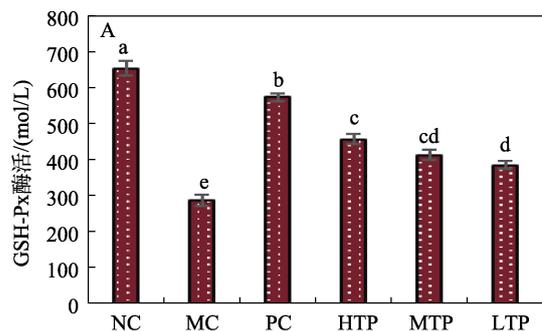
从图 11 可以看出，MC 组小鼠促炎因子 IL-12、IL-6 和 TNF- α 质量浓度均较其他组低，但对抗炎因子 IL-10 质量浓度最高，表明 D-半乳糖致衰小鼠体内存在炎症反应。

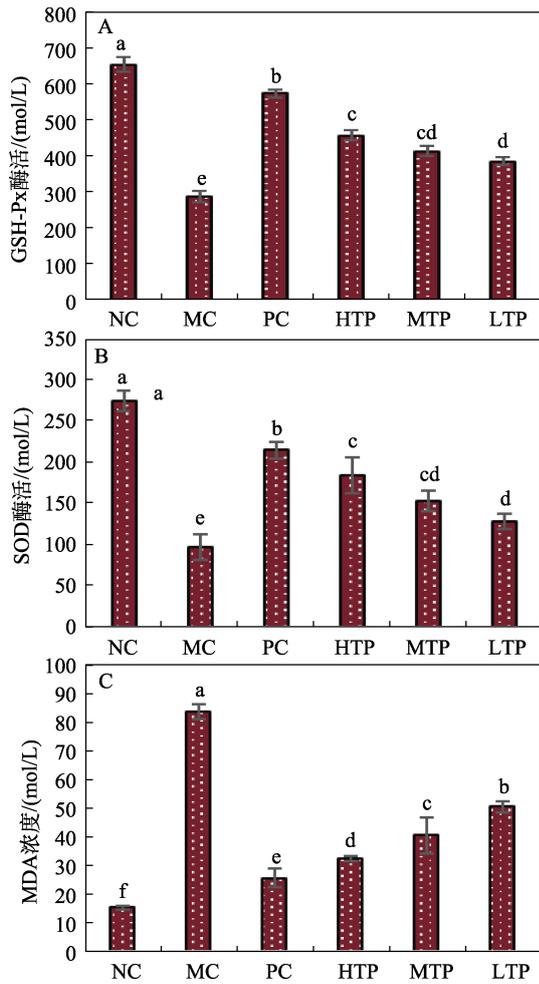
与 MC 组小鼠相比，茶多酚干预治疗后，LTP、MTP 和 HTP 组小鼠 IL-12、IL-6 和 TNF- α 质量浓度显著升高 ($P < 0.05$)，IL-10 质量浓度显著性降低 ($P < 0.05$)，表明茶多酚对 D-半乳糖致衰小鼠的炎症反应具有一定的改善作用，这与胡秀芳等^[29]研究结果一致。

2.5.4 小鼠血清抗氧化指标测定分析

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶，可增强机体抗氧化损伤的能力^[30]；SOD 是一种源于生命体的活性物质，其在生物体内的水平为衰老与死亡的直观指标^[31]；MDA 对细胞膜和细胞中的许多生物功能分子均有破坏作用。因此，MDA 的水平反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度，可间接反映细胞损伤程度^[32]。图 12 为茶多酚对各组小鼠血清抗氧化指标 (GSH-Px 酶活、SOD 酶活、MDA 浓度) 的影响测试结果。

从图 12 可以看出，MC 组小鼠血清中 GSH-Px 和 SOD 的酶活最低，而 MDA 浓度最高，与其他组均存在显著性差异 ($P < 0.05$)，表明 D-半乳糖致衰小鼠体内抗氧化能力减弱。





A—GSH-Px 酶活; B—SOD 酶活; C—MDA 浓度

图 12 茶多酚对各组小鼠血清抗氧化指标的影响

Fig. 12 Effects of tea polyphenols on serum antioxidant index of mice in each group

茶多酚干预治疗后, LTP、MTP 和 HTP 组小鼠的 GSH-Px 和 SOD 的酶活逐渐增加, MDA 浓度也逐渐下降, 与 MC 组均存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表明茶多酚可通过增加小鼠血清中抗氧化酶 (GSH-Px 和 SOD) 活力从而减少氧化应激对机体的损伤。许嘉文等^[33]研究发现, 金花茶多酚可提高线虫体内 SOD 酶活, 降低 MDA 水平, 降低氧化应激的损伤, 与本结果一致。

2.5.5 小鼠肠道菌群分析

小鼠盲肠内容物高通量测序分析^[34]可以帮助探究茶多酚对衰老小鼠肠道菌群的影响。图 13 为各组小鼠盲肠内容物高通量测序分析结果。

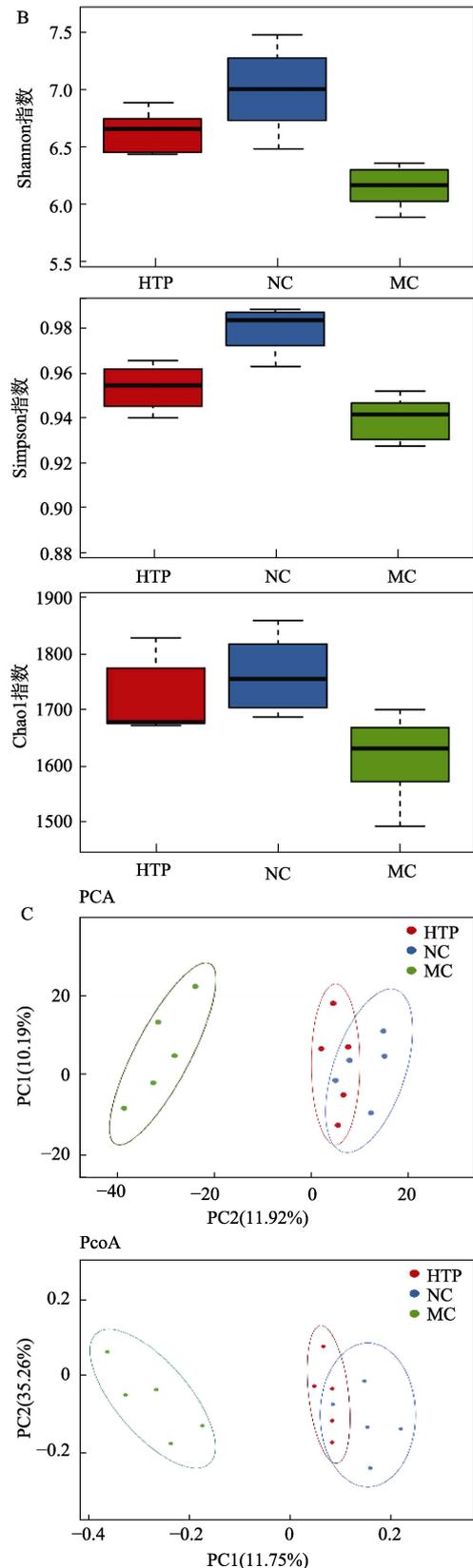
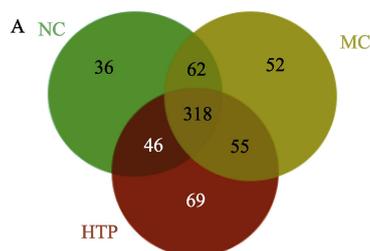


图 13 OTUs 韦恩图 (A); 小鼠肠道菌群 α (B) 和 β (C) 多样性分析图

Fig. 13 OTUs Venn diagram (A), analysis of α (B) and β (C) diversity in mice intestinal flora

从图 13A 可以看出, 对 NC、MC 和 HTP 组 3 组小鼠进行的 OTUs 聚类划分共得到 638 个 OTUs。

NC 组、MC 组和 HTP 组分别有 36、52 和 69 个特有的 OTUs，表明 3 组小鼠肠道菌群差异性较大。

从图 13B 可以看出,MC 组中 Shannon、Simpson 和 Chao1 指数最低,表明 D-半乳糖致衰小鼠肠道菌群的稳态被打破,从而导致肠道菌群失调。而 HTP 组中这 3 个指数都有所回升,表明茶多酚可有效恢复衰老小鼠肠道菌群的丰度和多样性,从而调节微生物整体组成。

从图 13C 可以看出,主成分分析(PCA)方面,PC1 和 PC2 分别占菌群总体差异的 10.19%和 11.92%,且 MC 组表现出极大的离散性,与 NC 组和 HTP 组的分布明显不同,表明 D-半乳糖致衰小鼠肠道菌群发生了改变,而 NC 组和 HTP 组的分布较为相近。在主坐标分析(PcoA)方面,PC1 和 PC2 分别占菌群总体差异的 11.75%和 35.26%,MC 组小鼠肠道菌群与 NC 组和 HTP 组的分布相差较大,且 NC 组和 HTP 组的分布较为接近,表明经茶多酚干预治疗后,原本紊乱的衰老小鼠肠道菌群接近正常水平^[35]。

图 14 为基于分类学的各组小鼠肠道菌群在目、科和属水平的相对丰度统计结果。

从图 14A 可以看出,在目水平上,MC 组中乳杆菌目(*Lactobacillales*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)、*Saccharimonadales* 和红蝽菌目(*Coriobacteriales*)相对丰度显著下降($P < 0.05$)。茶多酚干预治疗后,HTP 组的 *Lactobacillales*、*Bacteroidales*、*Saccharimonadales* 和 *Coriobacteriales* 相对丰度显著提高,且与 NC 组均不存在显著性差异($P > 0.05$)。

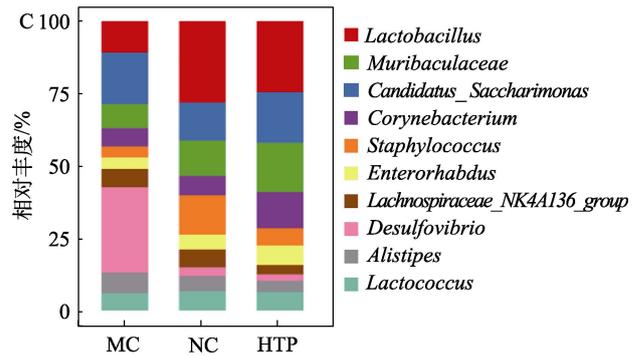
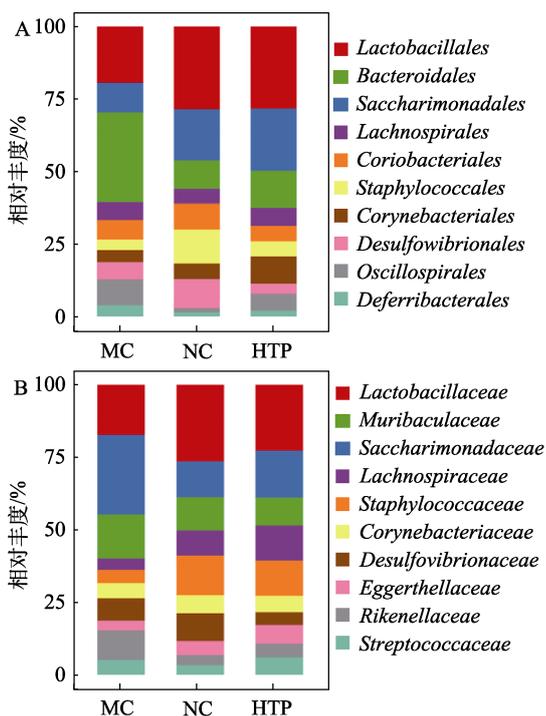


图 14 各组小鼠肠道菌群在目(A)、科(B)、属(C)水平的相对丰度

Fig. 14 Relative abundance of intestinal flora in each group at order (A), family (B), and genus levels (C)

从图 14B 可以看出,在科水平上,MC 组中乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)和葡萄球菌科(*Staphylococcaceae*)相对丰度下降,而 *Muribaculaceae* 和 *Saccharimonadaceae* 相对丰度逐渐升高。茶多酚干预治疗后,HTP 组中 *Lactobacillaceae*、*Lachnospiraceae* 和 *Staphylococcaceae* 相对丰度有所升高, *Muribaculaceae* 和 *Saccharimonadaceae* 相对丰度降低,且与 NC 组无显著差异($P > 0.05$)。

从图 14C 可以看出,在属水平上,茶多酚的干预使有益菌乳杆菌属(*Lactobacillus*)、假丝酵母菌属(*Candidatus_Saccharimonas*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)相对丰度升高,有害菌脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)相对丰度降低。

上述表明,茶多酚可通过增加有益菌相对丰度,降低有害菌相对丰度,从而改善 D-半乳糖引起的衰老小鼠肠道菌群的紊乱,从而提高小鼠体内的抗氧化能力^[36-37]。

小鼠肠道菌群进行 STAMP 差异性分析^[38]可反映小鼠肠道菌群功能基因在代谢途径中的变化。图 15 为各组小鼠肠道菌群 STAMP 差异性分析结果。

从图 15A 可以看出,D-半乳糖改变了 MC 组 23 个小鼠肠道菌群功能基因平均比例和平均比例差异,其中增加了 17 个,降低了 6 个,主要涉及到氨基酸代谢、核苷酸代谢和脂质代谢等代谢系统,以及神经系统、内分泌系等方面。同时,一些复杂性的疾病,如免疫疾病、神经变性疾病、心血管疾病等和信号转导、细胞活性及其他方面也发生了改变,表明 D-半乳糖的诱导改变了小鼠肠道菌群的代谢能力。

从图 15B 可以看出,茶多酚干预治疗后,HTP 组小鼠肠道菌群有 11 个功能基因平均比例和平均比例差异发生了显著变化,其中有 7 个显著升高,4 个显著降低,涉及到氨基酸代谢、脂质代谢、运输

和分解代谢和碳水化合物代谢等代谢系统, 还包括心血管疾病等重大疾病, 这和图 15A 涉及到的 MC 组小鼠肠道菌群功能基因变化吻合。

上述表明, 茶多酚在小鼠体内代谢后改变了小鼠肠道菌群的类型和平均比例和平均比例差异, 从而调控小鼠抗氧化能力^[39]。

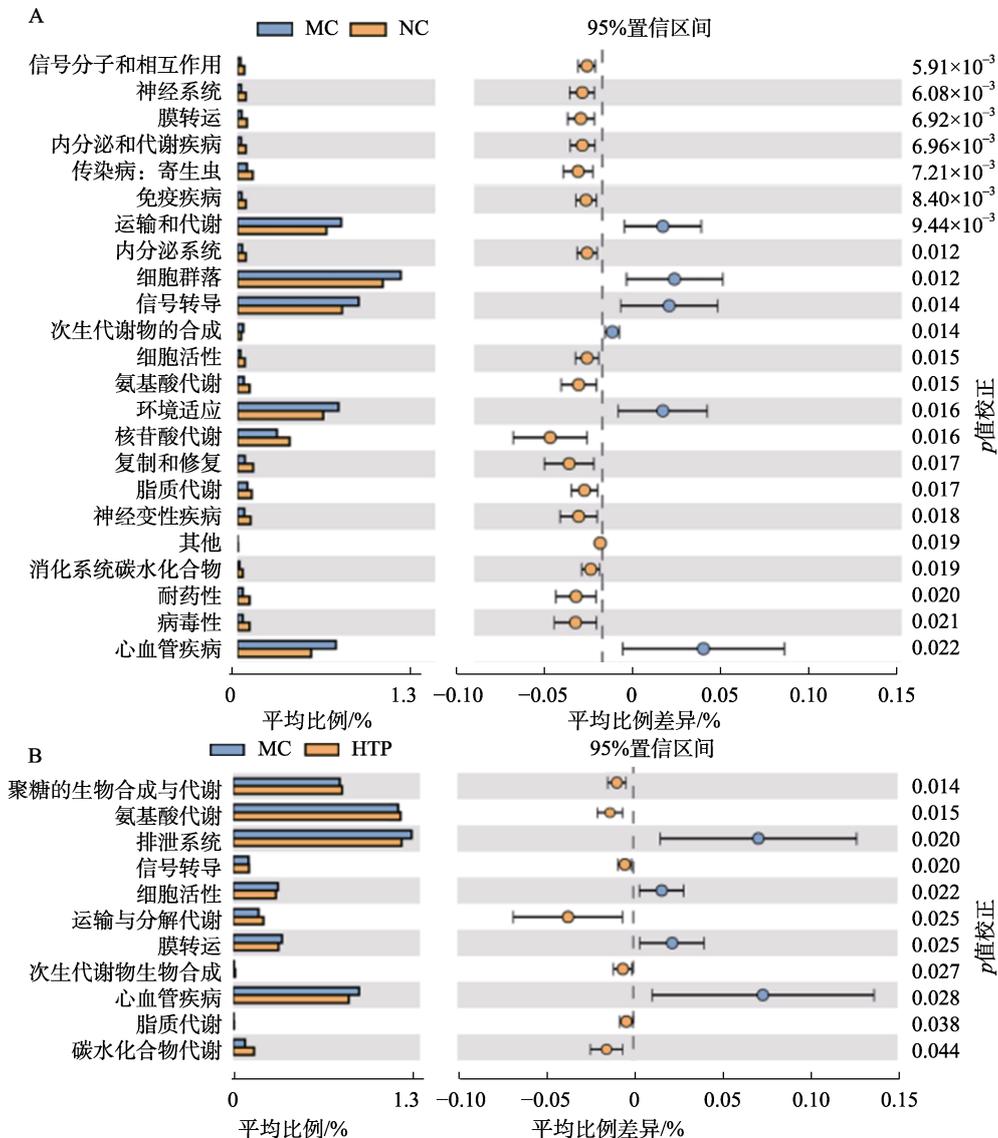


图 15 D-半乳糖 (A) 和茶多酚 (B) 对小鼠肠道菌群功能基因平均比例和平均比例差异的影响

Fig. 15 Effects of D-galactose (A) and tea polyphenols (B) on mean proportion and difference in mean proportion of functional genes of intestinal flora in mice

3 结论

通过超声辅助 DESs 法提取信阳毛尖茶多酚, 采用单因素实验和正交实验对提取工艺进行了考察和优化, 评估茶多酚体内外抗氧化和对肠道菌群的调控作用。

(1) 超声辅助 DESs 法提取茶多酚最佳工艺为: 以 $n(\text{氯化胆碱}) : n(\text{乙酸}) = 1 : 3$ 制备的 DES-4 为提取溶剂、DES-4 含水率 30%、超声温度 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 25 min、超声功率 115 W、料液比 1 : 35, 在此条件下, 茶多酚得率为 $78.65\% \pm 3.44\%$ 。

(2) 超声辅助 DESs 法提取的茶多酚具有较强的抗氧化活性, 可显著降低血清中 LDL-C, AST 和 ALT 水平, 并升高 HDL-C 的水平, 对衰老小鼠脏器具有一定的保护作用。

(3) 超声辅助 DESs 法提取的茶多酚可升高促炎因子 IL-12、IL-6 和 TNF- α 的水平, 降低抗炎因子 IL-10 的水平, 改善致衰小鼠的炎症反应。

(4) 超声辅助 DESs 法提取的茶多酚可提升血清中 GSH-Px 和 SOD 的酶活, 降低 MDA 水平, 从而增加小鼠抗氧化能力。

(5) 超声辅助 DESs 法提取的茶多酚通过改变

肠道菌群的相对丰度和多样性,特别是增加有益菌 *Lactobacillus*、*Candidatus_Saccharimonas*、*Corynebacterium* 相对丰度,降低有害菌 *Muribaculaceae* 和 *Desulfovibrio* 相对丰度,从而调控紊乱的 D-半乳糖致衰小鼠肠道菌群达到正常运行。

本文通过超声辅助 DESs 法提取的茶多酚具有较强的体外抗氧化活性,并可缓解衰老小鼠脏器损伤、平衡血脂代谢、降低氧化应激的损伤及恢复肠道菌群稳态,可以为信阳毛尖产品的开发提供理论依据。

参考文献:

- [1] ZHANG G Z (张国洲), SONG L S (宋丽莎). Breeding of native tea varieties of Duyun Maojian tea[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学), 2010, 38(3): 1229-1234.
- [2] WANG Y W (王亚维), XIE W B (谢维斌), GU J S (顾静生), et al. Study on native tea tree of Duyun Maojian[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学), 2011, 39(9): 5378-5379, 5382.
- [3] ABBOTT A P, BOOTHBY D, CAPPER G, et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids[J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(29): 9142-9147.
- [4] FU J L (付佳乐), GENG Z (耿直). Research progress in extraction of flavonoids with green deep-eutectic solvent[J]. Chemistry & Bioengineering (化学与生物工程), 2022, 39(7): 8-12.
- [5] OZTURK B, PARKINSON C, GONZALEZ-MIQUEL M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents[J]. Separation and Purification Technology, 2018, 206: 1-13.
- [6] GUO G Y (郭桂义), HU K F (胡孔锋), YUAN D (袁丁). Study on chemical constituents of Xinyang Maojian tea[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2006, 27(12): 162-164, 167.
- [7] ALTUNKAYA A, GÖKMEN V, SKIBSTED L H. pH dependent antioxidant activity of lettuce (*L. Sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 25-32.
- [8] YUAN P Y (袁佩颖), YANG X J (杨潇剑), WU Z W (吴振威), et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of tea polyphenols from defective products of Xinyang Maojian tea[J]. Tianjin Agricultural Sciences (天津农业科学), 2022, 28(10): 54-59, 72.
- [9] LIU Y M (刘玉明), LI K X (李珂娴), HE Y (何颖), et al. Determination of total phenols content in water extract of flowers of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. by Folin-Ciocalteu colorimetric method[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (时珍国医国药), 2017, 28(4): 838-840.
- [10] XUE Y T (薛宇彤), ZHENG J X (郑锦秀), SHAO Y (邵莹), et al. Preparation technology of Chinese medicine dietary preparations with total flavonoids from hawthorn leaves[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2022, 36(20): 3689-3694.
- [11] LU W (卢薇), FEI J J (费建军), SHEN X M (沈晓梅), et al. Phenolic profiles, antioxidant and antiproliferative activities towards tumor cells of five fruit juices[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2022, 43(6): 365-371.
- [12] CHEN P (陈鹏), WU Y (吴玥), ZHOU B H (周本宏). Studies on the effect of tannins from *Sanguisorba officinalis* L. on antioxidant and antiinflammation in mouse aging model induced by D-galactose[J]. China Pharmacist (中国药师), 2018, 21(4): 562-565.
- [13] ZHANG L M (张丽梅), CHENG Y Q (程永强), SONG S H (宋曙辉). Effect of purple yam polysaccharide on the liver and brain of D-galactose induced aging rats[J]. Food Science (食品科学), 2017, 38(13): 196-200.
- [14] CAO Z P (曹志鹏), SUO L S Z (索朗斯珠), SHANG Z D (商镇达), et al. Analysis on the characteristics of fecal microflora of Tibetan piglets at different growth stages[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine (黑龙江畜牧兽医), 2020, 20: 43-47, 157.
- [15] SAHA S K, DEY S, CHAKRABORTY R, et al. Effect of choline chloride-oxalic acid based deep eutectic solvent on the ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Aegle marmelos*[J]. Journal of Molecular Liquids, 2019, 287(1): 110956.
- [16] BI W T, TIAN M L, ROW K H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1285: 22-30.
- [17] OZTURK B, PARKINSON C, GONZALEZ-MIQUEL M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents[J]. Separation and Purification Technology, 2018, 206: 1-13.
- [18] LI B (李斌), LEI Y (雷月), MENG X J (孟宪军), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using response surface methodology and their antioxidant capacity[J]. Food Science (食品科学), 2015, 36(22): 33-39.
- [19] HUANG W (黄武), LI Y J (李亚杰), KANG S (亢帅), et al. Ultrasonic-assisted extraction of proanthocyanidins from peanut skin[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2021, 42(10): 112-117.
- [20] ZHAO L (赵璐), ZHANG L (张蕾). Study on the new technology of ultrasonic-assisted reflux extraction of *Sapindus saponins*[J]. Technology and Innovation Management (技术与创新管理), 2021, 42(3): 275-280, 347.
- [21] ZHANG R G (张瑞刚), ZHANG T (张桃), LIU X (刘璇). Effects of tea polyphenols on the quality and antiseptic and antioxidant capacity of jelly[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2022, 35(9): 141-144.
- [22] WANG Y C (王育川), LIN T (林桐), CHEN A L (陈艾玲), et al. Effects of dietary tea polyphenols on jejunum morphology, antioxidant capacity and expression of tight junction protein-related genes in magang geese[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition (动物营养学报), 2022, 34(12): 7833-7843.
- [23] GUAN B T (关百婷), LI W (李伟), ZHAO F (赵菲), et al. Protective effects of giant salamander bioactive peptides on D-galactose induced oxidative damage in mice[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2021, 42(16): 344-352.
- [24] XIE H R (谢皓然), FENG W J (冯文娟), WANG X (王希), et al. Tea polyphenols improves depression-like behavior in aged type 2 diabetes rats by regulating microglia polarization[J]. Journal of Hygiene Research (卫生研究), 2024, 53(1): 71-76, 87.
- [25] LI J X (李佳雪), LI C (李程), SONG X B (宋晓兵), et al. Improvement in the glycolipid metabolism of diabetic mice induced by high-fat diet with streptozotocin supplemented with *Ganoderma lucidum* polysaccharide drinks[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 45(19): 9-16.
- [26] CAO W D (曹文丹), WEI J R (韦佳汝), LI S Q (李圣淇), et al. Research progress on the extraction and purification, structure analysis and biological activity of bamboo leaf polysaccharides[J]. Journal of Food Safety and Quality (食品安全质量检测学报), 2024, 15(3): 240-247.
- [27] LYU C H (吕晨慧), SHI M Q (石梦茜), KOU J (寇婕), et al. Mechanism of tea polyphenols improving conditioned learning and memory in aging type 2 diabetic male rats[J]. Modern Preventive Medicine (现代预防医学), 2022, 49(19): 3506-3511, 3523.