田基黄总黄酮提取工艺优化、降血糖活性评价及成分分析Δ

周志红*，胡　勤，肖明明[中南大学湘雅医学院附属儿童医院（湖南省儿童医院）药学部，长沙　410007]

中图分类号　R284.2；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）16-1972-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.16.06

摘　要　目的　优化田基黄总黄酮的超声波辅助提取-低共熔溶剂提取工艺，评价其体外降血糖活性，并初步分析其化学成分。**方法**　以氢键受体及供体组成、摩尔比、含水量为考察因素，以总黄酮得率为响应值，筛选田基黄总黄酮提取的最适低共熔溶剂；以液料比、超声功率、超声温度、超声时间为考察因素，以总黄酮得率为响应值，结合单因素实验和Box-Behnken响应面法优化田基黄总黄酮的提取工艺并验证；以阿卡波糖为阳性对照，测定田基黄总黄酮对α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶的体外抑制活性；采用超高效液相色谱法，通过对比对照品分析其化学成分。**结果**　最适低共熔溶剂为氯化胆碱-草酸（摩尔比1∶1，含水量30%）；最优提取工艺为液料比52∶1（mL/g）、超声温度54 ℃、超声功率240 W、超声时间42 min，3次验证实验的总黄酮得率为（73.26±2.48）mg/g，与理论值（73.48 mg/g）的相对误差为－0.30%。田基黄总黄酮对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的半数抑制浓度分别为0.73、0.44 mg/mL，均高于阿卡波糖的0.23、0.15 mg/mL。田基黄总黄酮提取物中含有异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷、槲皮素。**结论**　优化所得田基黄总黄酮提取工艺稳定、可行，其提取物具有一定的体外降血糖活性，含有异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷等成分。

关键词　田基黄总黄酮；超声波辅助提取；低共熔溶剂；响应面法；降血糖活性；成分分析

Optimization of extraction technology, evaluation of hypoglycemic activity and component analysis of total flavonoids from *Hypericum japonicum*

ZHOU Zhihong, HU Qin, XIAO Mingming[Dept. of Pharmacy, the Affiliated Children's Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University (Hunan Children's Hospital), Changsha 410007, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To optimize the ultrasound-assisted extraction-deep eutectic solvents technology of total flavonoids from *Hypericum japonicum*, evaluate its hypoglycemic activity *in vitro*, and analyze its chemical compositions preliminarily. **METHODS** The most suitable deep eutectic solvent for total flavonoids from *H. japonicum* was screened using the composition of hydrogen bond acceptor and donor, molar ratio, water content as factors, and the total flavonoid yield as the response value. Using liquid-solid ratio, ultrasonic power, ultrasonic temperature and ultrasonic time as factors, the yield of total flavonoids as response value, the extraction technology of total flavonoids from *H. japonicum* was optimized by single-factor experiments combined with Box-Behnken response surface method, and the optimum extraction technology was validated. Taking acarbose as the positive control, the inhibitory activities of total flavonoids from *H. japonicum* on α-amylase and α-glucosidase *in vitro* were determined. The chemical constituents of total flavonoids from *H. japonicum* were analyzed by UPLC combined with comparing the reference substances. **RESULTS** The most suitable deep eutectic solvent was choline chloride-oxalic acid (the molar ratio of 1∶1, the water content of 30%). The optimum extraction technology was as follows: the ratio of liquid-solid was 52∶1 (mL/g), the ultrasonic temperature was 54 ℃, the ultrasonic power was 240 W, and the ultrasonic time was 42 min; the total extraction yield of total flavonoids from *H. japonicum* in 3 validation tests was (73.26±2.48) mg/g, the relative error of which with the theoretical value (73.48 mg/g) was −0.30%. The total flavonoids from *H. japonicum* could inhibit α-amylase and α-glucosidase with IC_{50} values of 0.73 and 0.44 mg/mL, respectively, which were higher than those of acarbose (0.23 and 0.15 mg/mL). UPLC analysis showed that the total flavonoids from *H. japonicum* contained isoquercetin, quercitrin, quercetin-7-*O*-α-L-rhamnoside and quercetin. **CONCLUSIONS** The optimized extraction technology of total flavonoids from *H. japonicum* is stable and feasible, and the extract has certain hypoglycemic activity *in vitro* and contains isoquercetin, quercitrin and quercetin-7-*O*-α-L-rhamnoside, etc.

KEYWORDS　total flavonoids from *Hypericum japonicum*; ultrasound-assisted extraction; deep eutectic solvents; response surface method; hypoglycemic activity; component analysis

田基黄为藤黄科金丝桃属植物地耳草*Hypericum japonicum* Thunb.的干燥全草，具有清热利湿、散瘀止痛之效[1]。现代研究表明，田基黄主要含有异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷、槲皮素等黄酮类化合物，具有保肝护肝、抗炎、抗氧化及降血糖等生物活性[2—4]，备受学者关注。可见，就其黄酮类化合物开展提取工艺及生物活性研究，对该药的资源开发及高值化应用具有重要意义。目前，田基黄总黄酮的提取方法以传统有机

Δ**基金项目**　湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ40279）；湖南省卫生健康委科研立项课题（No.202113011086）

＊**第一作者**　主管药师，硕士。研究方向：天然产物活性成分。E-mail：531180319@qq.com

溶剂提取为主，有机溶剂易挥发、易污染环境，且存在毒性大、提取效率低等缺点[5]，故筛选绿色、安全、高效的田基黄总黄酮提取工艺是非常必要的。

低共熔溶剂（deep eutectic solvents，DESs）作为一种新型绿色溶剂，具有安全性高、无污染、易于制备等优点，已被广泛应用于天然产物提取领域[6-7]。超声波辅助提取（ultrasonic-assisted extraction，UAE）可利用超声振动破坏植物组织结构，同时可结合其热效应加速植物内功能性成分的溶出，具有提取时间短、功能性成分得率高的特点[8]。UAE-DESs技术结合了上述两种方法的优点，是天然产物活性成分提取领域的常用技术[9]。基于此，本研究以田基黄为原料，以总黄酮得率为评价指标，筛选田基黄总黄酮提取的最适DESs体系，再以单因素实验和Box-Behnken响应面法优化总黄酮提取的UAE-DESs工艺条件，初步评价所提总黄酮的体外降血糖活性并分析其化学成分，以期为田基黄的综合利用及开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BioTek Synergy2型酶标仪（美国BioTek公司）、HWCL-3型集热式恒温加热磁力搅拌器（郑州长城科工贸有限公司）、SN-HH-6型数显恒温水浴锅（上海尚仪仪器设备有限公司）、KQ-400DE型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、Waters ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱（ultra performance liquid chromatography，UPLC）仪（美国Waters公司）、Agilent Cary 60型紫外-可见分光光度计（美国Agilent公司）等。

1.2 主要药品与试剂

田基黄药材（产地湖南吉首，批号220102121）购自长沙市雨花区九芝堂大药房，经长沙学院生物与化学工程学院唐伟卓教授鉴定为藤黄科金丝桃属植物地耳草*H. japonicum* Thunb.的干燥全草。

异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷、槲皮素、芦丁、阿卡波糖对照品（批号分别为J12H13165348、J14H08186308、Y09S11L123847、K22N9R75247、K07J1-2R136826、S30N12T105698，纯度均不低于98%）和α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶（批号分别为S10002、S10050，活性均不低于50 U/mg）均购自上海源叶生物科技有限公司；AB-8型大孔吸附树脂（粒径0.30～1.25 mm，批号02J9X64576）购自江苏东鸿化工有限公司；氯化胆碱、乙二醇、丙三醇、1，2-丙二醇、1，4-丁二醇、柠檬酸、草酸、乙酸、乳酸、葡萄糖、果糖、尿素、乙酰胺、对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷（*p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside，pNPG）和3，5-二硝基水杨酸（3，5-dinitrosalicylic acid，DNS）试剂均为分析纯，甲醇、甲酸均为色谱纯，水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 DESs的制备

DESs由氯化胆碱（氢键受体）与不同氢键供体按照一定摩尔比混合，经加热搅拌而得：分别称取适量的氢键受体及供体，置于100 mL烧杯中，于80 ℃下用磁力搅拌器搅拌，直至得到无色透明液体，随后冷却至室温，即得DESs。为降低所得液体的黏度，加入20%（体积分数，下同）的水[10]。所得DESs均存贮于玻璃瓶中，在室温下存放。不同类型DESs的组成见表1。

表1 不同类型DESs的组成

溶剂简称	氢键受体	氢键供体	摩尔比	含水量/%
DES-1	氯化胆碱	乙二醇	1:2	20
DES-2	氯化胆碱	丙三醇	1:2	20
DES-3	氯化胆碱	1,2-丙二醇	1:2	20
DES-4	氯化胆碱	1,4-丁二醇	1:2	20
DES-5	氯化胆碱	柠檬酸	1:2	20
DES-6	氯化胆碱	草酸	1:2	20
DES-7	氯化胆碱	乙酸	1:2	20
DES-8	氯化胆碱	乳酸	1:2	20
DES-9	氯化胆碱	葡萄糖	1:2	20
DES-10	氯化胆碱	果糖	1:2	20
DES-11	氯化胆碱	尿素	1:2	20
DES-12	氯化胆碱	乙酰胺	1:2	20

2.2 田基黄总黄酮的提取

取田基黄药材，切段，粉碎，过60目筛，得田基黄粉末，密封后置于4 ℃冰箱中保存，备用。取上述药材粉末0.50 g，与不同溶剂[60%乙醇和12种自制DESs]20 mL充分混合，超声（温度40 ℃，功率200 W，频率40 kHz）处理30 min，即得。

2.3 田基黄总黄酮的含量及得率测定

2.3.1 芦丁标准曲线绘制

参考刘敏卓等[11]的方法并稍作修改：准确称取芦丁对照品15 mg，置于50 mL容量瓶中，加入60%乙醇超声溶解并定容，摇匀，即得质量浓度为0.30 mg/mL的对照品溶液。依次吸取上述对照品溶液0、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mL置于10 mL具塞比色管中，加入5%亚硝酸钠溶液0.50 mL，摇匀后静置8 min；加入10%硝酸铝溶液0.50 mL，摇匀后静置8 min；加入4%氢氧化钠溶液5 mL，摇匀后用60%乙醇定容至10 mL，静置15 min。以未加芦丁对照品溶液的反应溶液为空白对照，在510 nm波长处分别测定其余各反应溶液的吸光度（A）值。以A值为纵坐标、芦丁对照品溶液质量浓度（c）为横坐标，得回归方程为$A=5.905\ 2c+0.048\ 2$（$R^2=0.999\ 4$），芦丁检测质量浓度的线性范围为0.015～0.090 mg/mL。精密度、准确度、回收率等方法学考察均符合2020年版《中国药典》（四部）的相关要求。

2.3.2 田基黄总黄酮含量及得率测定

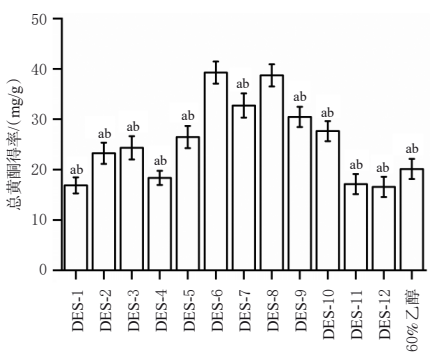
取“2.2”项下所得田基黄总黄酮提取液以水定容至50 mL，以8 000 r/min离心5 min，取上清液过滤，收集滤液；精密吸取上述滤液3 mL，置于10 mL具塞比色管中，按“2.3.1”项下方法处理后，测定其A值，利用回归方程

计算总黄酮质量浓度（以芦丁计）并按下式计算总黄酮得率：总黄酮得率（mg/g）=$c\times V\times N/M$（式中，c为样品中总黄酮质量浓度，V为提取液定容的最终体积，N为稀释倍数，M为田基黄样品的取样量）。

2.4 最适DESs的筛选

（1）DESs种类：精密称取田基黄粉末0.50 g，置于50 mL离心管中，分别加入60%乙醇和12种自制DESs（DES-1～DES-12）20 mL，将其置于超声波清洗器中，设定超声功率为200 W，超声频率为40 kHz，于40 ℃下处理30 min。超声完成后，离心，取上清液过滤，取滤液按“2.3.2”项下方法测定田基黄总黄酮含量并计算其得率，各溶剂平行操作3次。采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，检验水准$\alpha=0.05$（统计学方法后同）。

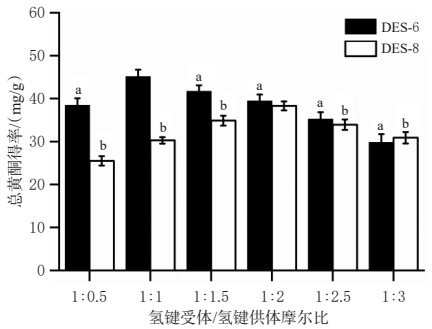
结果（图1）显示，当以DES-6（氯化胆碱-草酸，摩尔比1∶2）和DES-8（氯化胆碱-乳酸，摩尔比1∶2）为溶剂时，田基黄总黄酮得率均显著高于其余DESs（$P<0.05$）；与传统溶剂（60%乙醇）相比，DES-6、DES-8的总黄酮得率分别提高了95.03%、92.29%（$P<0.05$）。另外，DES-6的总黄酮得率虽略高于DES-8，但组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。因此，本研究选择DES-6和DES-8进行后续实验。



a：与DES-6比较，$P<0.05$；b：与DES-8比较，$P<0.05$。

图1 不同组成DESs和60%乙醇对田基黄总黄酮得率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

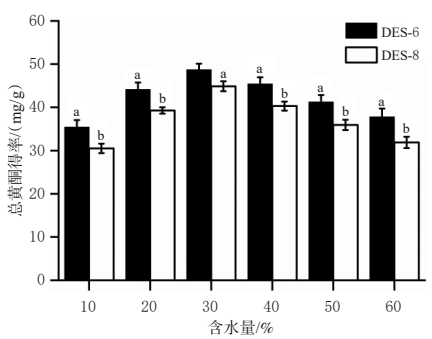
（2）DESs摩尔比：本研究进一步考察了DES-6、DES-8中氢键受体与供体不同摩尔比（1∶0.5、1∶1、1∶1.5、1∶2、1∶2.5、1∶3）对田基黄总黄酮得率的影响，各摩尔比平行操作3次。结果（图2）显示，当DES-6中氯化胆碱与草酸的摩尔比为1∶1时，该DESs组成下的田基黄总黄酮得率最高[（45.68±1.84）mg/g]，且显著高于DES-6其余摩尔比（$P<0.05$）；当DES-8中氯化胆碱与乳酸的摩尔比为1∶2时，该DESs组成下的田基黄总黄酮得率最高[（39.54±1.76）mg/g]，且显著高于DES-8其余摩尔比（$P<0.05$）。因此，本研究选择DES-6（氯化胆碱-草酸，摩尔比1∶1）和DES-8（氯化胆碱-乳酸，摩尔比1∶2）进行后续实验。



a：与DES-6（1∶1）比较，$P<0.05$；b：与DES-8（1∶2）比较，$P<0.05$。

图2 不同摩尔比DES-6、DES-8对田基黄总黄酮得率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

（3）DESs含水量：DESs的含水量可影响DESs的黏度和极性，对目标产物得率有很大影响[8]，因此需要对不同含水量（10%、20%、30%、40%、50%、60%）进行考察，各含水量平行操作3次。结果（图3）显示，当含水量为30%时，DES-6、DES-8这两种溶剂的田基黄总黄酮得率都达到最大值，且DES-6的最高得率显著高于DES-8（$P<0.05$）。需注意的是，当含水量为10%～30%时，田基黄总黄酮得率呈明显的上升趋势，可能是因为当含水量较低时，随着DESs含水量的增加，其黏度变小，从而使得总黄酮得率明显提升[12]；而当含水量超过30%后，田基黄总黄酮得率呈下降趋势，可能是因为含水量过高，不利于氢键形成，使DESs的极性偏离适宜范围，从而导致总黄酮得率降低[13]。



a：与DES-6（含水量30%）比较，$P<0.05$；b：与DES-8（含水量30%）比较，$P<0.05$。

图3 不同含水量DES-6、DES-8对田基黄总黄酮得率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

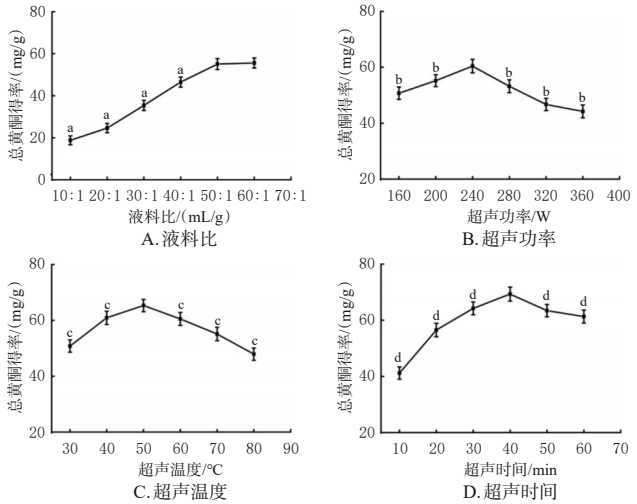
综合上述筛选结果，本研究选择DES-6（氯化胆碱-草酸，摩尔比1∶1，含水量30%）作为田基黄总黄酮的提取溶剂。

2.5 田基黄总黄酮提取工艺优化

2.5.1 单因素实验

按照“2.2”项下提取方法，本研究以DES-6（氯化胆碱-草酸，摩尔比1∶1，含水量30%）为溶剂，分别考察不同液料比（10∶1、20∶1、30∶1、40∶1、50∶1、60∶1，mL/g）、超声功率（160、200、240、280、320、360 W）、超声温度（30、40、50、60、70、80 ℃）和超声时间（10、20、30、40、50、60 min）[14]对田基黄总黄酮得率的影响，各条件平行操作3

次。结果（图4）显示，当液料比为50∶1（mL/g）、超声功率为240 W、超声温度为50 ℃、超声时间为40 min时，均可获得最大总黄酮得率。



a：与液料比50∶1（mL/g）比较，$P<0.05$；b：与超声功率240 W比较，$P<0.05$；c：与超声温度50 ℃比较，$P<0.05$；d：与超声时间40 min比较，$P<0.05$。

图4　田基黄总黄酮提取工艺优化的单因素实验结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2.5.2　Box-Behnken响应面实验

根据单因素实验结果，本研究以液料比（*A*）、超声功率（*B*）、超声温度（*C*）、超声时间（*D*）为考察因素，以总黄酮得率（*Y*）为响应值，采用Box-Behnken响应面法优化UAE-DESs提取工艺，各条件组合均平行操作3次。Box-Behnken响应面实验因素与水平见表2，设计方案与结果见表3。

表2　Box-Behnken响应面实验因素与水平

水平	*A*/(mL/g)	*B*/W	*C*/℃	*D*/min
−1	40∶1	200	40	30
0	50∶1	240	50	40
1	60∶1	280	60	50

本研究采用Design-Expert 10软件对表3数据进行拟合，得二次多元回归方程为$Y=3.840+3.120A+0.630B+1.240C-0.750D-0.680AB+1.250AC-0.046AD+0.550BC-0.015BD+0.028CD-0.350A^2-0.170B^2-0.230C^2-0.520D^2$。方差分析结果见表4。

由表4中模型的*P*值（<0.000 1）可知，其拟合度良好。模型的决定系数（R^2）为0.991 2，调整决定系数（R^2_{adj}）为0.984 6，说明该模型能较好地反映各考察因素与响应值的关系，可用于田基黄总黄酮提取工艺参数的初步分析和预测。由各一次、二次项的*P*值可知，各因素对田基黄总黄酮得率均有显著影响（$P<0.05$）；由各交互项的*P*值可知，*AB*、*AC*、*AD*对田基黄总黄酮得率均有显著影响（$P<0.05$）；由各一次项的*F*值可知，各因素对田基黄总黄酮得率影响从大到小为：*A*（液料比）>*C*（超声温度）>*B*（超声功率）>*D*（超声时间）。

表3　Box-Behnken响应面实验设计方案与结果（$n=3$）

试验号	*A*/(mL/g)	*B*/W	*C*/℃	*D*/min	$Y(\bar{x}\pm s)$/(mg/g)
1	40∶1	280	50	40	58.24±2.01
2	50∶1	280	40	40	62.56±2.12
3	50∶1	240	60	30	65.84±2.11
4	50∶1	200	40	40	62.48±2.04
5	50∶1	280	50	30	63.76±2.06
6	50∶1	240	40	50	63.28±2.21
7	50∶1	200	60	40	66.56±2.24
8	50∶1	240	50	40	70.28±2.45
9	50∶1	240	60	50	65.22±2.21
10	50∶1	240	50	40	70.28±2.45
11	50∶1	200	50	30	63.60±2.22
12	50∶1	280	60	40	62.85±2.26
13	60∶1	200	50	40	63.68±2.02
14	40∶1	240	50	50	58.96±2.04
15	50∶1	240	40	30	62.96±2.11
16	50∶1	240	50	40	70.28±2.45
17	50∶1	280	50	50	61.76±2.11
18	60∶1	240	40	40	61.52±2.06
19	40∶1	200	50	40	58.16±2.01
20	40∶1	240	40	40	59.12±2.04
21	40∶1	240	60	40	61.52±2.08
22	60∶1	280	50	40	62.16±2.13
23	60∶1	240	50	50	63.72±2.08
24	50∶1	240	50	40	70.28±2.45
25	50∶1	200	50	50	62.16±2.01
26	50∶1	240	50	40	70.28±2.45
27	60∶1	240	50	30	64.48±2.11
28	60∶1	240	60	40	64.24±2.13
29	40∶1	240	50	30	62.96±2.12

表4　Box-Behnken响应面实验结果的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	348.16	14	24.87	35.35	<0.000 1
A	36.19	1	36.19	51.45	<0.000 1
B	6.02	1	6.02	8.56	0.011 1
C	17.06	1	17.06	24.26	0.000 2
D	2.35	1	2.35	3.34	0.029 0
AB	6.64	1	6.64	9.91	0.036 4
AC	8.26	1	8.26	18.36	0.001 5
AD	2.62	1	2.62	3.73	0.033 9
BC	1.59	1	1.59	2.10	0.070 3
BD	0.08	1	0.08	0.11	0.743 5
CD	0.22	1	0.22	0.31	0.584 1
A^2	187.02	1	187.02	265.85	<0.000 1
B^2	115.42	1	115.42	164.07	<0.000 1
C^2	56.29	1	56.29	80.01	<0.000 1
D^2	53.69	1	53.69	76.32	<0.000 1
残差	9.85	14	0.70		
失拟项	9.85	10	0.98	1.92	0.360 4
纯误差	0.04	4	0.02		
总离差	358.01	28			

为进一步评价各因素交互作用对田基黄总黄酮得率的影响，本研究采用Design-Expert 10软件绘制响应面图。结果（图5）显示，*A*与*B*、*A*与*C*、*A*与*D*交互作用的响应面坡度较陡，说明这3组交互作用对田基黄总黄酮得率的影响较为明显；而*B*与*C*、*B*与*D*、*C*与*D*交互作用的响应面坡度相对较缓，说明这3组交互作用对田基

黄总黄酮得率的影响不明显。上述结果与方差分析结果一致。本研究采用Design-Expert 10软件求解上述二元多次回归方差，得田基黄总黄酮最优提取工艺为液料比52.32∶1（mL/g）、超声温度53.84 ℃、超声功率238.42 W、超声时间41.65 min，预测田基黄总黄酮的理论得率为73.48 mg/g。考虑实际生产情况，本研究将最优提取工艺调整为液料比52∶1（mL/g）、超声温度54 ℃、超声功率240 W、超声时间42 min。

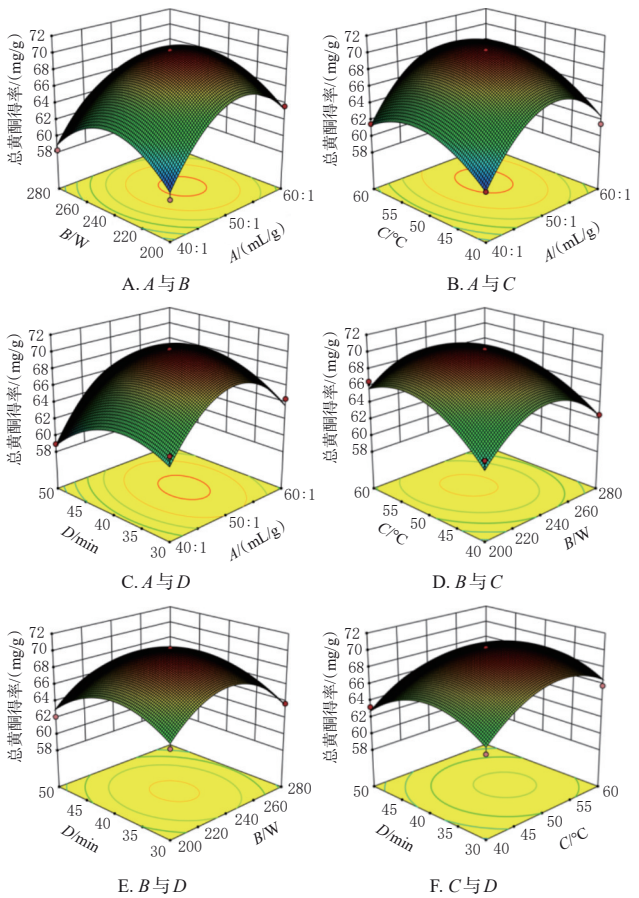


图5　各因素交互作用对田基黄总黄酮得率的影响

2.5.3　验证试验

精密称取田基黄药材粉末5.0 g，按“2.5.2”项下最优工艺平行操作3次，所得田基黄总黄酮得率为（73.26±2.48）mg/g，与预测值的相对误差为−0.30%。同时，采用“2.3.2”项下方法测定所得提取液中总黄酮含量为（24.21±0.84）%。

2.6　田基黄总黄酮的富集、纯化

参照文献[15]方法，采用大孔吸附树脂法对提取的田基黄总黄酮进行富集、纯化。取田基黄药材20.0 g，平行3份，按“2.5.2”最优工艺提取得田基黄总黄酮提取液，经减压浓缩除去所含水分，再将该浓缩液加至AB-8型大孔吸附树脂柱（60 mm×800 mm）中，以每小时1倍柱体积的流速过柱；待吸附平衡后，依次用水、70%乙醇洗脱，收集70%乙醇洗脱液，浓缩得干浸膏（平均得率为4.56%）。采用“2.3.2”项下方法测定总黄酮含量，结果显示，经大孔吸附树脂富集、纯化后，田基黄总黄酮含量为（66.28±2.42）%。

2.7　田基黄总黄酮的体外降血糖活性研究

2.7.1　α-淀粉酶抑制活性

精密称取阿卡波糖和按“2.5.2”项下最优工艺提取、按“2.6”项下方法富集、纯化的田基黄总黄酮适量，用磷酸盐缓冲液（PBS，pH=6.80，下同）配制成不同质量浓度（0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mg/mL）的样品溶液。参照李雨鸿等[16]的方法并稍作修改：取5.00 U/mL的α-淀粉酶溶液（以PBS为溶剂）40 μL和不同质量浓度的田基黄总黄酮或阿卡波糖样品溶液40 μL，置于3 mL离心管中，混匀，于37 ℃下孵育10 min；随后，加入1%淀粉溶液80 μL，于37 ℃下继续孵育10 min；最后，加入DNS试剂160 μL终止反应，于沸水浴中放置10 min后，迅速转入冰水浴中静置5 min，以水2 mL稀释。以阿卡波糖作为阳性对照，以PBS代替酶溶液作为空白对照，以PBS代替样品（田基黄总黄酮或阿卡波糖）作为阴性对照，使用酶标仪于540 nm波长处检测A值，计算α-淀粉酶抑制率及半数抑制浓度（IC_{50}）。α-淀粉酶抑制率（%）=[(A_1-A_2)−(A_3-A_4)]/(A_1-A_2)×100%（式中，A_1为不加样品加酶溶液的A值，A_2为不加样品不加酶溶液的A值，A_3为加样品加酶溶液的A值，A_4为加样品不加酶溶液的A值）。各溶液平行操作3次。

结果（图6A）显示，当质量浓度为0.05～3.00 mg/mL时，田基黄总黄酮对α-淀粉酶的抑制率（平均值12.01%～82.33%）呈明显的上升趋势；当质量浓度大于3.00 mg/mL时，田基黄总黄酮对α-淀粉酶的抑制率趋于平缓。田基黄总黄酮、阿卡波糖抑制α-淀粉酶活性的IC_{50}值分别为0.73、0.23 mg/mL。由此可知，田基黄总黄酮对α-淀粉酶活性具有一定的体外抑制作用，但不如阿卡波糖。

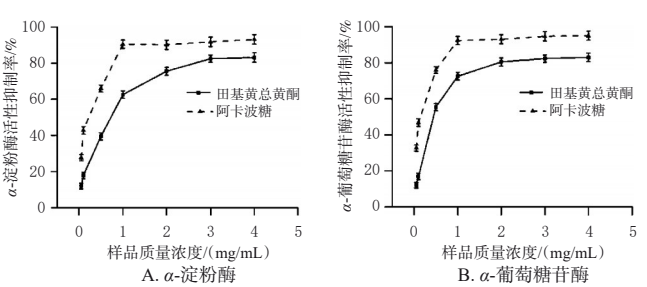


图6　田基黄总黄酮和阿卡波糖对α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2.7.2　α-葡萄糖苷酶抑制活性

精密称取阿卡波糖和按“2.5.2”项下最优工艺提取、按“2.6”项下方法富集、纯化的田基黄总黄酮适量，用PBS配制成不同质量浓度（0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mg/mL）的样品溶液。参照李雨鸿等[16]的方法并稍作修改：取0.24 U/mL的α-葡萄糖苷酶溶液（以PBS为溶剂）0.20 mL、不同质量浓度的田基黄总黄酮或阿卡

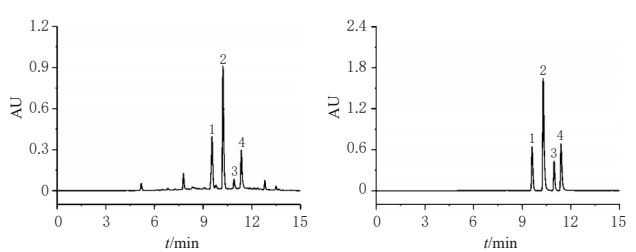
波糖样品溶液0.20 mL和PBS 1.40 mL，置于3 mL离心管中，混匀，于37 ℃下孵育10 min；随后，加入2.50 mmol/L的pNPG溶液（以PBS为溶剂）0.20 mL，于37 ℃下继续孵育60 min；最后加入0.20 mol/L的碳酸钠溶液0.80 mL终止反应。以阿卡波糖作为阳性对照，以PBS代替酶溶液作为空白对照，以PBS代替样品（田基黄总黄酮或阿卡波糖）作为阴性对照，使用酶标仪于405 nm波长处检测A值，计算α-葡萄糖苷酶抑制率及IC_{50}。α-葡萄糖苷酶抑制率（%）：$=[(A_1-A_2)-(A_3-A_4)]/(A_1-A_2)\times 100\%$（式中，$A_1$为不加样品加酶溶液的$A$值，$A_2$为不加样品不加酶溶液的$A$值，$A_3$为加样品加酶溶液的$A$值，$A_4$为加样品不加酶溶液的$A$值）。各溶液平行操作3次。

结果（图6B）显示，当质量浓度为0.05～2.00 mg/mL时，田基黄总黄酮对α-葡萄糖苷酶的抑制率（平均值12.11%～80.47%）呈明显的上升趋势；当质量浓度大于2.00 mg/mL时，田基黄总黄酮对α-葡萄糖苷酶的抑制率趋于平缓。田基黄总黄酮、阿卡波糖抑制α-葡萄糖苷酶活性的IC_{50}值分别为0.44、0.15 mg/mL。由此可知，田基黄总黄酮对α-葡萄糖苷酶活性具有一定的体外抑制作用，但不如阿卡波糖。

2.8 田基黄总黄酮提取物的成分分析

参照文献[2]的方法对田基黄总黄酮提取物中的成分进行分析。以60%乙醇为溶剂，配制质量浓度均为100 μg/mL的异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷、槲皮素的对照品溶液。精密吸取上述各对照品溶液0.50 mL，置于5 mL离心管中，混匀，即得总黄酮对照品混合液。取按“2.5.2”项下最优工艺提取、按“2.6”项下方法富集、纯化的田基黄总黄酮适量，用60%乙醇溶解，配制成质量浓度为2.00 mg/mL的田基黄总黄酮供试溶液。

采用UPLC法检测。色谱柱为Waters ACQUITY BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相为甲醇（A相）-0.4%甲酸溶液（B相）（梯度洗脱，0～15 min，10%A→100%A），柱温为30 ℃，检测波长为360 nm，流速为0.20 mL/min，进样量为2 μL。取总黄酮对照品混合液和田基黄总黄酮供试溶液，按上述条件进样分析，记录色谱图。结果（图7）显示，田基黄总黄酮提取物中各主要色谱峰的出峰时间与混合对照品中1、2、3、4号色谱峰的出峰时间基本一致，其紫外吸收特征也基本一致，故初步判断田基黄总黄酮提取物中含有异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷、槲皮素。



A.田基黄总黄酮供试溶液　B.混合对照品混合液

1：异槲皮苷；2：槲皮苷；3：槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷；4：槲皮素。

图7 田基黄总黄酮和混合对照品的UPLC图

3 讨论

DESs作为一种绿色、高效的传统有机溶剂替代品，已被广泛应用于各种天然产物（包括多酚类、多糖、苯乙醇苷类等）的提取[6－9]。首先，本研究考察了DESs不同种类、不同氢键受体与供体摩尔比、不同含水量对田基黄总黄酮得率的影响，筛选出最适DESs体系为氯化胆碱-草酸（摩尔比1∶1，含水量30%）。然后，本研究采用单因素实验和Box-Behnken响应面实验优选得田基黄总黄酮UAE-DESs最优工艺为：液料比52∶1（mL/g）、超声温度54 ℃、超声功率240 W、超声时间42 min。在该条件下，3次验证实验的田基黄总黄酮得率为（73.26±2.48）mg/g，与理论预测值73.48 mg/g接近（相对误差为－0.30%），表明该工艺可行，可为田基黄总黄酮的绿色高效制备提供参考。

本研究采用大孔吸附树脂法对提取的田基黄总黄酮进行了富集、纯化。结果显示，经AB-8型大孔吸附树脂富集、纯化后，提取物中田基黄总黄酮的平均含量从24.21%提高到了66.28%，提示AB-8型大孔吸附树脂能较好地去除田基黄总黄酮粗提物中的糖类和色素等杂质，实现对田基黄总黄酮的有效富集、纯化。

α-淀粉酶是能水解淀粉的活性酶之一，抑制其活性可减少淀粉的代谢从而达到降血糖的目的[17]。α-葡萄糖苷酶是消化碳水化合物和释放葡萄糖的关键酶，抑制其活性可防止餐后血糖水平升高，对于防治糖尿病具有积极作用[18]。本研究初步评价了提取纯化所得田基黄总黄酮对α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶的体外抑制活性，结果显示，田基黄总黄酮对α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶均有一定的抑制作用，但均弱于阳性对照阿卡波糖。

研究指出，田基黄中主要含有黄酮类、间苯三酚类、双苯吡酮类等成分[3]。本研究采用UPLC技术结合对照品比对法对提取纯化所得田基黄总黄酮提取物进行了初步的成分分析，结果显示，其中主要含有异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷和槲皮素，与熊丽等[2]的研究结果基本一致。

综上所述，本研究优化所得的田基黄总黄酮提取工艺稳定、可行，其提取物中主要含有异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素-7-*O*-α-L-鼠李糖苷和槲皮素等成分，且具有一定体外降血糖活性。

参考文献

[1] 程丽娟，王凯. 田基黄化学成分及其抗骨质疏松活性[J]. 中成药，2023，45（7）：2234-2238.
CHENG L J，WANG K. Chemical constituents from *Hypericum japonicum* and their anti-osteoporotic activities [J]. Chin Tradit Pat Med，2023，45（7）：2234-2238.

[2] 熊丽，陈晓辉，梁健. RP-HPLC法同时测定田基黄中4种黄酮成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报，2010，27（8）：639-642，668.
XIONG L，CHEN X H，LIANG J. Simultaneous determination of contents of four flavonoids in Herba Hyperici Ja-

ponici by RP-HPLC[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2010, 27(8): 639-642, 668.

[3] 欧淑芬, 谭沛, 徐冰, 等. 田基黄成分及药理应用研究进展[J]. 药学研究, 2015, 34(5): 296-299.
OU S F, TAN P, XU B, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effect of *Hypericum japonicum*[J]. J Pharm Res, 2015, 34(5): 296-299.

[4] 陈银花, 胡国新, 刘龙辉, 等. 初探田基黄对湿热证糖尿病患者血糖的影响[J]. 中国医学创新, 2021, 18(7): 94-97.
CHEN Y H, HU G X, LIU L H, et al. A preliminary study of the effect of *Hypericum japonicum* on blood sugar in patients with dampheat type diabetes mellitus[J]. Med Innov China, 2021, 18(7): 94-97.

[5] 易运红, 吴功庆, 黎燕芸, 等. 正交试验法优选田基黄中总黄酮提取工艺[J]. 化工技术与开发, 2010, 39(12): 20-22.
YI Y H, WU G Q, LI Y Y, et al. Study on optimum extraction of total flavonoids from *Hypericum japonicum* Thunb [J]. Technol Dev Chem Ind, 2010, 39(12): 20-22.

[6] 董佳妮, 赵龙山, 薄彧坤, 等. 响应曲面法联合遗传算法优化天然低共熔溶剂提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的工艺[J]. 中国药房, 2022, 33(13): 1605-1611.
DONG J N, ZHAO L S, BO Y K, et al. Optimization of natural deep eutectic solvent extraction of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by response surface methodology coupled with genetic algorithm[J]. China Pharm, 2022, 33(13): 1605-1611.

[7] QIN G F, ZHANG F, REN M D, et al. Eco-friendly and efficient extraction of polyphenols from *Ligustrum robustum* by deep eutectic solvent assisted ultrasound[J]. Food Chem, 2023, 429: 136828.

[8] 姚瑞祺, 胡家栋, 王锋, 等. 山茱萸粗多糖的超声辅助提取及抗氧化活性研究[J]. 西北药学杂志, 2022, 37(2): 11-15.
YAO R Q, HU J D, WANG F, et al. Study of ultrasonic assisted extraction and antioxidant activity of crude polysaccharides from *Cornus offcinalis*[J]. Northwest Pharm J, 2022, 37(2): 11-15.

[9] LIU Y J, LOU L, HUANG Q, et al. Ultrasonic extraction and purification of scutellarin from Erigerontis Herba using deep eutectic solvent[J]. Ultrason Sonochem, 2023, 99: 106560.

[10] 仝洺慧, 朱越, 李佳凝, 等. 低共熔溶剂对黄连中生物碱绿色提取工艺的优化[J]. 中成药, 2023, 45(9): 3014-3017.
TONG M H, ZHU Y, LI J N, et al. Optimization of green extraction process of alkaloids from Coptidis Rhizoma by deep eutectic solvents[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(9): 3014-3017.

[11] 刘敏卓, 张小月, 张灵芝, 等. 竹茹总黄酮超声波处理与纤维素酶协同提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 221-229.
LIU M Z, ZHANG X Y, ZHANG L Z, et al. Optimization of ultrasonic wave and cellulase synergistic extraction technology of total flavonoids from *Bambusae caulis* in Taeniam and their antioxidant capacity *in vitro*[J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(20): 221-229.

[12] 都宏霞, 刘宴秀, 严忠杰, 等. 超声波辅助-绿色低共熔溶剂提取茉莉花黄酮的工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1): 199-206.
DU H X, LIU Y X, YAN Z J, et al. Optimization of ultrasonic assisted-green deep eutectic solvent extraction of flavonoids from jasmine[J]. Mod Food Sci Technol, 2021, 37(1): 199-206.

[13] DAI Y T, WITKAMP G J, VERPOORTE R, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications[J]. Food Chem, 2015, 187: 14-19.

[14] 韦福忠. 超声辅助低共熔溶剂提取诺丽果渣黄酮及抗小鼠运动疲劳研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(3): 105-113.
WEI F Z. Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Noni pomace by deep eutectic solvents and its anti-fatigue in mice[J]. China Food Addit, 2023, 34(3): 105-113.

[15] 巫永华, 王解语, 黄莉莉, 等. 牛蒡多酚超声波辅助低共熔溶剂提取工艺优化、生物活性评价及组分分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 171-179.
WU Y H, WANG J Y, HUANG L L, et al. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction process, biological activities and components of burdock polyphenols[J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(21): 171-179.

[16] 李雨鸿, 殷朝敏, 范秀芝, 等. 桑黄提取物的体外抗氧化、降血糖及降尿酸活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 71-80.
LI Y H, YIN C M, FAN X Z, et al. *In vitro* anti-oxidant, hypoglycemic, and hypouricemic activities of *Sanghuangporus vaninii* extracts[J]. Mod Food Sci Technol, 2022, 38(5): 71-80.

[17] 王育红, 张晓宇, 钱志伟. 响应面优化低共熔溶剂提取黄精黄酮工艺及其生物活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(4): 116-123.
WANG Y H, ZHANG X Y, QIAN Z W. Optimization of extraction of flavonoid from *Polygonatum kingianum* with deep eutectic solvent by response surface method and its bioactivity[J]. China Food Addit, 2023, 34(4): 116-123.

[18] ZHANG L, ZHU M F, TU Z C, et al. A-glucosidase inhibition, anti-glycation and antioxidant activities of *Liquidambar formosana* Hance leaf, and identification of phytochemical profile[J]. S Afr J Bot, 2017, 113: 239-247.

（收稿日期：2024-02-23　修回日期：2024-06-16）
（编辑：张元媛）