

超声波辅助提取仙人草总黄酮工艺及其降血糖活性分析

杨斐然¹, 崔善华¹, 陈积宏¹, 罗轩全¹, 张迪^{1,2*}, 吉宏武^{1,2}, 刘书成^{1,2}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088) (2. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋食品工程技术研究中心, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 为优化仙人草中总黄酮的提取工艺, 并评估其降血糖功效。通过单因素和响应面法优化提取条件, 确定最佳提取工艺: 乙醇体积分数 86%, 料液比 1:18 (g/g), 超声时间 36 min, 超声温度 66 °C。在此条件下, 理论总黄酮得率为 2.15%, 实际得率 2.17%, 相对误差 0.93%。4 种因素对仙人草总黄酮提取率的影响程度为: 超声时间 > 超声温度 > 乙醇体积分数 > 料液比, 超声时间与超声温度间的交互作用对总黄酮提取率的存在显著影响 ($P < 0.05$)。体外降血糖实验表明, 6.0 mg/g 仙人草总黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率为 72.18% 和 8.0 mg/g 仙人草总黄酮对 α -淀粉酶活性的抑制率为 64.57%; 10 μ g/g 仙人草黄酮能显著 ($P < 0.05$) 提高肝脏细胞 HepG2 的葡萄糖消耗量, 并促进肝脏细胞糖原的合成 (提高 45.4%)。这表明仙人草黄酮具有良好的辅助降血糖功效, 该研究结果可为仙人草总黄酮的开发和利用提供理论依据。

关键词: 仙人草; 黄酮; 响应面分析; 工艺优化; 降血糖活性

文章编号: 1673-9078(2025)11-193-200

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1075

Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Mesona chinensis* and Its Hypoglycemic Activity

YANG Feiran¹, CUI Shanhua¹, CHEN Zhihong¹, LUO Xuanquan¹, ZHANG Di^{1,2*}, JI Hongwu^{1,2}, LIU Shucheng^{1,2}

(1. Guangdong Ocean University, College of Food Science and Technology, Zhanjiang 524088, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Guangdong Marine Food Engineering Technology Research Center, Guangdong Key Laboratory of Aquatic Products Deep Processing in Universities, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The extraction process of total flavonoids from *Mesona chinensis* Benth was optimized, and their hypoglycemic efficacy was evaluated. The optimum extraction conditions were explored using single-factor tests and response surface methodology. The optimum conditions were determined as follows: ethanol concentration, 86%; liquid-solid ratio, 1:18 g/g; ultrasonic extraction time, 36 min; and ultrasonic extraction temperature 66 °C. Under the above optimum conditions, the predictive extraction rate of total flavonoids from *M. chinensis* was 2.15%, while the actual extraction rate was 2.17%, with a relative error of 0.93% between the actual and predictive yields. The effects of the four factors on the extraction rate of total flavonoids from *M. chinensis* were as follows: ultrasonic extraction time > ultrasonic extraction temperature > ethanol concentration > solid-liquid ratio. Additionally, the interaction between ultrasonic extraction time and ultrasonic extraction temperature had a significant ($P < 0.05$) effect on the extraction rate of total flavonoids. The results of *in vitro* hypoglycemic test showed that the effect of total flavonoids (6.0 mg/g) on the inhibition

引文格式:

杨斐然, 崔善华, 陈积宏, 等. 超声波辅助提取仙人草总黄酮工艺及其降血糖活性分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(11): 193-200.

YANG Feiran, CUI Shanhua, CHEN Zhihong, et al. Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Mesona chinensis* and its hypoglycemic activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 193-200.

收稿日期: 2024-07-24; 修回日期: 2024-11-02; 接受日期: 2024-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072340); 广东海洋大学博士启动项目 (060302042107)

作者简介: 杨斐然 (2004-), 女, 本科, 研究方向: 水产品高值化利用, E-mail: 15848035315@163.com

通讯作者: 张迪 (1991-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 水产品高值化利用的研究, E-mail: zjs578180838@sina.com

rate of α -glucosidase activity was 72.18%, whereas the effect of total flavonoids (8.0 mg/g) on the inhibition rate of α -amylase activity was 64.57%. In addition, 10 μ g/g of total flavonoids could significantly ($P<0.05$) increase the glucose consumption of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line cells and promote liver glycogen synthesis (increased by 45.4%). These findings indicated that the total flavonoids from *M. chinensis* exert a notable auxiliary hypoglycemic effect. The results in this study could provide a theoretical basis for further exploration and potential utilization of the total flavonoids from *M. chinensis*.

Key words: *Mesona chinensis*; flavonoids; response surface methodology; process optimization; hypoglycemic activity

统计数据表明, 2022 年全球糖尿病的患者总数达到了 4.63 亿, 中国的患者人数约为 1.2 亿, 在全球范围内位居首位^[1]。糖尿病对人类健康构成了严重威胁, 血糖水平无法得到有效降低, 主要是因为胰岛 β 细胞功能受损, 从而减少了胰岛素的分泌^[2,3]。在人体的糖分代谢过程中, α -葡萄糖苷酶与 α -淀粉酶^[4]扮演着至关重要的角色。针对这两种酶的活性抑制, 已成为治疗和预防高血糖症状的关键方法^[5]。尽管目前市面上的药物, 如拜糖平和阿卡波糖, 已经显示出对这些酶活性的抑制效果, 但它们的生产成本相对较高, 并且长期使用可能会引发毒性反应和耐药性问题, 对患者的健康产生不利影响^[6]。因此, 探索那些既安全又高效, 且副作用较小的天然降血糖成分, 已经成为营养学和医学研究的热点领域^[7]。食源性黄酮, 一类从可食用的动植物中提取的多酚类化合物, 因其多样的生理活性, 包括抗氧化、抗肿瘤、降压和降脂等, 而受到越来越多的关注^[6]。目前人们已用西蓝花^[8]、莲子^[9]、金华茶花^[10]、洋葱^[11]、花生衣^[12]及枸杞叶^[13]等食源性产品中制备得到了食源性黄酮。

仙人草 (*Mesona chinensis* Benth) 也被称作尖萼鱼黄草等, 属于唇形科, 是一种一年生的草本植物, 在中国的广西、广东、浙江、福建^[14]等地区有广泛的种植, 总面积约为 11.6 万公顷, 它既是药材也是食材^[15]。仙人草含有化学成分, 如氨基酸、多糖、酚类、萜类和黄酮类化合物^[16], 具有清热、利尿、抗氧化^[17]和降血糖的功效^[18]。中国岭南地区食用仙人草历史悠久, 通常将其熬制取汁制作成各种清热解暑又美味营养的食物。仙人草具有成本低、总黄酮含量高、加工方便等优点, 是制备食源性黄酮的优质原料, 在保健食品和消暑饮品行业有着广阔的应用前景^[19]。尽管如此, 目前对于仙人草中黄酮类化合物的提取及其生理活性的研究还相对有限, 特别是其降血糖作用的研究并不多见, 这限制了仙人草的进一步开发和应用。本研究以仙人草为原料, 以总黄酮提取率为考察的指标, 运用单因素试验结合响应面分析法优化仙人草总黄酮的最佳提取工艺, 并评价仙人草总黄酮的降血糖活性, 以期对仙人草的高值化利用以及开发降血糖食品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

仙人草, 均采摘于广东省长寿蕉岭仙人草种植基地; 芦丁标准品、二甲双胍 (均为色谱纯), 均购于国药集团化学试剂有限公司; α -葡萄糖苷酶 (>50 U/mg)、 α -淀粉酶 (>10 U/mg)、牛血清白蛋白, 购于美国 Sigma 公司; 人肝脏细胞 HepG2, 来源于中国科学院细胞库; 葡萄糖试剂盒, 来源于南京建成生物工程研究所; 无水乙醇、亚硝酸溶液、硝酸铝、碳酸钠、氢氧化钾 (均为国产分析纯), 均购于湛江科铭科技有限公司; 磷酸盐缓冲溶液、3,5-二硝基水杨酸, 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液, 蒽酮试剂, 均购于湛江科铭科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

Nunc EasYDish 细胞培养箱, 美国 Thermo Fisher 公司; Cary 60 型紫外可见分光光度计, 安捷伦科技有限公司; KQ-50DE 型数控超声波清洗器, 上海爱朗仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 仙人草总黄酮的提取方法

称取一定量的仙人草粉末放入圆底烧瓶。向其中加入无水石油醚以去除脂肪, 并通过干燥过程将溶剂蒸发掉, 得到的粉末可用于后续步骤。将 6.0 g 经过脱脂处理的仙人草粉末转移到提取容器中。在设定的乙醇浓度、固体与液体的比例、超声波处理的时间以及温度条件下, 开始提取过程。提取过程结束后, 将液体进行 12 min 的 6 000 g 离心处理, 以分离出上清液。利用旋转蒸发的方法来移除溶剂, 从而获得仙人草总黄酮的提取物。

1.3.2 仙人草总黄酮含量的测定

1.3.2.1 标准曲线的绘制

参考 Kong 等^[20]的方法, 稍作修改。准确称取 50.0 mg 芦丁标准品, 用体积分数为 50% 乙醇溶解标准品并将其定容至 50 mL 容量瓶中, 配制成 1.00 mg/mL

的芦丁标准溶液。精密量取 0、3.0、6.0、9.0、12.0、15.0 mL 的芦丁标准溶液于 20 mL 容量瓶中，分别加入 0.4 mL 5% 亚硝酸钠溶液，静置 5 min，再加入 0.4 mL 的 10% 硝酸铝溶液充分混匀，静置 10 min，加入 50% 的乙醇溶液定容，显色 10 min，显色完成后在 510 nm 处下测得芦丁标准溶液的吸光度建立标准线性回归方程。

1.3.2.2 仙人草总黄酮提取率的测定

精确地量取 2 mL 的仙人草黄酮类化合物提取物，将其转移到一个 20 mL 的容量瓶中。按照 1.3.2.1 所描述的步骤，测定仙人草提取物中黄酮类化合物的吸光度。利用所获得的标准曲线方程，计算出仙人草提取物中黄酮类化合物的具体含量。

计算公式为：

$$X = \frac{m}{M} \times 100\%$$

(1)

式中：

X——总黄酮提取率，%；
m——仙人草总黄酮质量，g；
M——仙人草质量，g。

1.3.3 仙人草总黄酮提取的单因素试验

1.3.3.1 乙醇体积分数

称量 6.00 g 脱脂仙人草粉末，在固定其它提取工艺条件不变的情况下 [料液比为 1:20 (g/g)、超声时间为 35 min、超声温度为 65 ℃]，探究不同的乙醇体积分数 (65%、70%、75%、80%、85%、90%) 对仙人草总黄酮提取率的影响。

1.3.3.2 料液比

称量 6.00 g 脱脂仙人草粉末，在固定其它提取工艺条件不变的情况下 (乙醇体积分数根据 1.3.3.1 的结果、超声的时间为 35 min、超声的温度为 65 ℃)，探究不同的料液比 (1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60, g/g) 对仙人草总黄酮提取率的影响。

1.3.3.3 超声时间

称量 6.00 g 的脱脂仙人草粉末，保持其他提取参数不变 (乙醇浓度依据 1.3.3.1 的实验结果确定、固液比依据 1.3.3.2 的实验结果确定、超声处理温度恒定在 65 ℃)，本研究旨在研究不同超声处理时间 (25、30、35、40、45、50 min) 对仙人草中总黄酮提取效率的影响。

1.3.3.4 超声温度

精确测量出 6.00 g 的去脂仙人草粉末。在保持其他提取参数恒定的条件下 (乙醇的体积比依据 1.3.3.1 的实验数据、固液比依据 1.3.3.2 的实验数据、超声处理时间依据 1.3.3.3 的实验数据)，本实验旨在探讨不同超声处理温度 (温度分别为 45、50、55、60、65、

70 ℃) 对于提取仙人草中总黄酮的效率有何影响。

1.3.3.5 响应面法优化提取工艺

依据单因素实验所呈现的结果，响应面设计选择了对仙人草总黄酮提取率存在影响的自变量，以仙人草总黄酮提取率为响应值，根据 Box-Behnken 设计方法进行了 4 个因素 3 个水平组合试验，得到最佳的仙人草总黄酮提取工艺条件。因素与水平见表 1。

表 1 响应面因素与水平设计
Table 1 Response surface factors and level design

水平	因素			
	A 超声 温度/℃	B 超声 时间/min	C 料液比 (g/mL)	D 乙醇 体积分数/%
-1	60	30	1:10	80
0	65	35	1:20	85
1	70	40	1:30	90

1.3.4 仙人草总黄酮的降血糖功效评价

1.3.4.1 总黄酮对α-淀粉酶活性抑制率的影响

参考龙林等^[21]的方法，稍作修改。将仙人草总黄酮提取液制备成 0.5~10 mg/g 的一系列样品溶液，然后分别配制 2.0 mg/g 的淀粉溶液和 0.5 mg/g α-淀粉酶溶液 (使用 pH 值 6.5 的磷酸盐缓冲液)，分别取 100 μL 的样品溶液与 α-淀粉酶溶液混合均匀后，保温于 37 ℃ 水浴中反应 30 min；然后再加入 100 μL 淀粉溶液，保温于 37 ℃ 水浴中反应 30 min，最后加入 200 μL 3,5- 二硝基水杨酸进行沸水浴反应 5 min，在 535 nm 处测得其吸光度；以拜糖平做阳性对照 (低剂量: 0.01 mg/g 拜糖平、中剂量: 0.1 mg/g 拜糖平、高剂量: 1 mg/g 拜糖平)。

计算公式为：

$$Y = (1 - \frac{A_1}{A_2}) \times 100\%$$

(2)

式中：

Y——α-淀粉酶活性的抑制率，%；
A₁——样品溶液吸光度；
A₂——不加样品的空白溶液吸光度。

1.3.4.2 总黄酮对α-葡萄糖苷酶活性抑制率的影响

参考龙林等^[21]的方法，稍作修改。将仙人草总黄酮提取液制备成 0.5、1、2、4、6、8、10 mg/g 的样品溶液，分别取 100 μL 仙人草总黄酮样品溶液和 0.01 mg/g α-葡萄糖苷酶溶液混合均匀，保温于 37 ℃ 水浴中反应 10 min，然后再加入 100 μL 2.5 mmol/kg 对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷溶液，保温于 37 ℃ 水浴中反应 10 min，加入 6 mL 0.1 mol/kg 碳酸钠溶液使其停止反应，在 410 nm 处测得其吸光度；以二甲双胍做阳性对照 (低剂量: 0.1 mg/g 二甲双胍、中剂量: 1.0 mg/g 二甲双胍、高剂量: 5.0 mg/g 二甲双胍)。

计算公式为:

$$Z = (1 - \frac{A_1}{A_2}) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Z —— α -葡萄糖苷酶活性的抑制率, %;

A_1 ——样品溶液吸光度;

A_2 ——不加样品的空白溶液吸光度。

1.3.4.3 总黄酮对肝脏细胞HepG2葡萄糖消耗量的影响

依照 Yan 等^[22]所描述的实验步骤, 并对其进行适当调整, 本实验制备了不同质量浓度的仙人草总黄酮溶液, 分别为 0.5、1、10、20 和 50 mg/g。选取处于对数生长期的 HepG2 肝脏细胞, 并将其接种于 96 孔微孔板中, 每孔接种 5 000 个细胞。经过 24 h 的培养后, 去除培养液, 接着向各孔中加入相应浓度的仙人草总黄酮溶液, 继续培养 24 h。培养结束后, 收集培养液, 并利用葡萄糖检测试剂盒对葡萄糖的消耗量进行定量分析。实验中, 未添加任何处理的组别作为空白对照组, 而添加了 0.5 $\mu\text{g/g}$ 二甲双胍的组别则作为阳性对照组。

1.3.4.4 总黄酮对肝脏细胞HepG2糖原合成的影响

基于 Yan 等^[22]的实验方法, 并进行了细微调整, 在 1.4.3 的实验数据指导下, 本研究采取了以下步骤: 将 HepG2 肝脏细胞以每孔 2×10^5 个的数量接种于 6 孔细胞培养板中。经过 24 h 的培养, 去除培养液, 随后向各孔中加入仙人草总黄酮的样品溶液, 继续培养 24 h。培养完成后, 收集培养液。接下来, 去除培养基, 向每个孔中加入 0.5 mL 的 30% 氢氧化钾溶液, 并进行煮沸处理 15 min。然后, 加入 2 mL 无水乙醇, 以 12 000 g 的转速离心 12 min, 随后去除上清液。将沉淀物溶解于 0.5 mL 的蒸馏水中, 并加入 0.2% 的蒽酮试剂, 20 min 后在 620 nm 处测量吸光度。利用葡萄糖溶液的标准曲线作为参照, 实验测定了糖原的浓度。实验中, 未经任何添加的样本被设定为空白对照, 与此同时, 含有 0.5 $\mu\text{g/g}$ 二甲双胍的样本被选为阳性对照。

1.4 数据处理

所有试验从提取仙人草总黄酮开始重复 3 次, 每次样品测试重复 3 次以上, 结果用“平均值 $\pm$ 标准差”进行表示。采用 JMP Pro 14.0 软件对数据进行分析, 使用 Tukey 多重检验进行显著性差异检验, $P < 0.05$ 表示显著性差异。采用 Origin 2020 软件进行图形的绘制。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 不同的乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

在保持其他提取参数恒定的情况下, 本研究旨在

探讨变化的乙醇浓度对从仙人草中提取总黄酮效率的影响。根据图 1 的数据显示, 乙醇体积分数在 65% 至 80% 之间时, 总黄酮的提取效率由 1.22% 增至 1.90%。进一步增加乙醇浓度至 85%, 观察到提取效率达到峰值 2.11%。然而, 当乙醇浓度继续上升, 提取效率却降至 1.92%。这可能是因为适宜的乙醇浓度有助于仙人草内总黄酮成分的溶解, 而过高的乙醇浓度则可能引起其他可溶性成分的析出, 这不仅降低了总黄酮的提取效率, 也可能对后续的降血糖效果评估产生影响^[23]。因此, 实验结果表明, 85% 的乙醇浓度是实现最佳提取效果的条件。

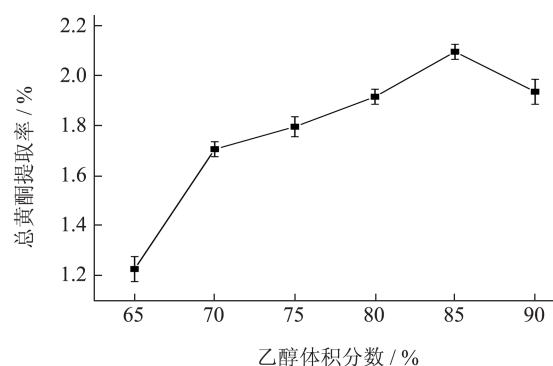


图 1 仙人草总黄酮提取率在不同乙醇体积下的影响

Fig.1 Effect of ethanol volume fraction on the yield of total flavonoids

2.1.2 不同的料液比对总黄酮提取率的影响

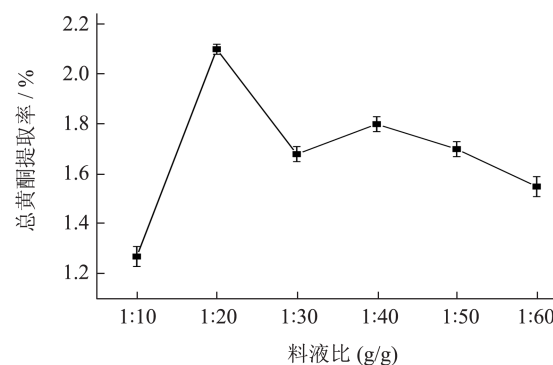


图 2 不同的料液比对仙人草总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on the yield of total flavonoids

在本实验中, 保持了除料液比之外的所有提取参数不变, 以评估料液比变化对仙人草中总黄酮提取效率的影响。根据图 2 的观察结果, 当料液比从 1:10 (g/g) 逐步增加至 1:20 (mg/g) 时, 可以注意到总黄酮的提取效率也随着逐步增加。具体来说, 在 1:20 mg/g 的料液比下, 提取效率达到了最高点, 为 2.09%。但是, 当料液比超过这一阈值时, 提取效率降低至 1.56%。这一现象可能源于较低的料液比导致提取溶剂量不足, 从而限制了总黄酮的溶解效率。相反, 过高的料液比可能使得提取液在蒸发过程中过度浓缩, 这不仅可能

损害总黄酮的分子结构，还可能引起其他可溶性成分的析出，进而降低了总黄酮的提取量^[23]。基于这些发现，从而得出结论，1:20 (g/g) 的料液比是实现最有效提取的最优条件。

2.1.3 不同的超声时间对总黄酮提取率的影响

在本研究中，维持了所有其他提取参数的恒定，以探讨超声处理时间的变动对仙人草中总黄酮提取效率的作用。观察图 3 的数据显示，当超声处理时间介于 25 至 30 min 之间时，总黄酮的提取效率从 1.51% 逐步增加至 1.90%。进一步延长超声时间至 35 min，可以观察到提取效率达到峰值 2.08%。然而，超声时间超过这一时段后，提取效率降至 1.77%。这一现象可归因于超声处理在初期阶段通过其空化和剪切作用促进了总黄酮的释放，但过度的超声处理可能导致黄酮类物质的结构受损，同时加速了其他非极性物质的溶解，从而影响了提取效率的降低^[24]因此，基于实验结果，可以认为 35 min 为适宜超声提取的最佳持续时间。

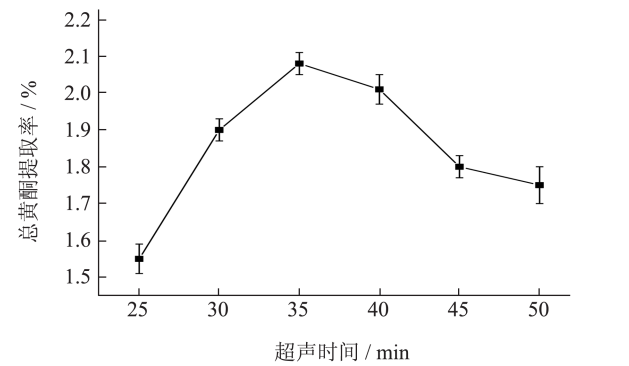


图 3 不同的超声时间对仙人草总黄酮提取率的影响
Fig.3 Effect of ultrasonic time on the yield of total flavonoids

2.1.4 不同的超声温度对总黄酮提取率的影响

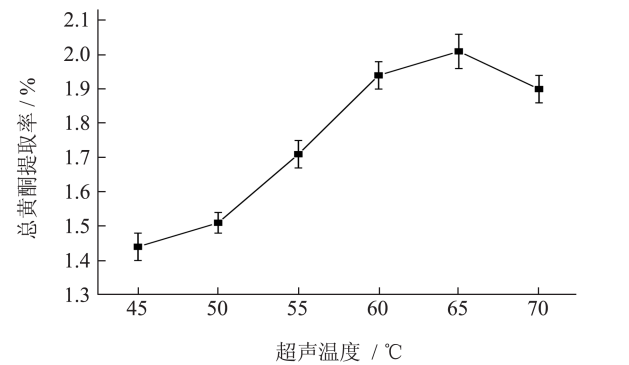


图 4 不同超声温度对仙人草总黄酮提取率的影响
Fig.4 Effect of ultrasonic temperature on the yield of total flavonoids

在本实验中，保持了除超声温度外的所有提取参数固定，以探究超声温度变化对仙人草中总黄酮提取效率的影响。根据图 4 的分析结果，进而发现当超声

温度设定在 45 至 60 °C 区间时，总黄酮的提取效率由 1.44% 逐步提升至 1.94%。进一步将超声温度提升至 65 °C，观察到提取效率达到最高点 2.02%。但是，当超声温度继续升高，提取效率却有所下降，降至 1.89%。这可能是因为适宜的超声温度能够通过空化效应和剪切力，以及热能的辅助作用，加速总黄酮从仙人草中向提取溶剂中的转移和溶解。然而，当温度设置过高时，可能会导致总黄酮分子的氧化，损害其分子结构，进而减少提取效率^[25]。基于这些观察，进而可以得出结论，65 °C 的超声温度是实现最高提取效率的最优选择。

2.2 响应面法优化提取工艺

2.2.1 响应面法优化提取工艺的结果分析

表 2 响应面设计方案及结果					
Table 2 Design and result of response surface analysis					
序号	因素				总黄酮提取率/%
	A	B	C	D	
1	-1	-1	0	0	1.58 ± 0.08
2	1	-1	0	0	1.78 ± 0.11
3	-1	1	0	0	1.55 ± 0.07
4	1	1	0	0	1.74 ± 0.13
5	0	0	-1	-1	1.90 ± 0.14
6	0	0	1	-1	1.84 ± 0.09
7	0	0	-1	1	1.95 ± 0.16
8	0	0	1	1	1.94 ± 0.05
9	-1	0	0	-1	1.65 ± 0.11
10	1	0	0	-1	1.72 ± 0.10
11	-1	0	0	1	1.88 ± 0.07
12	1	0	0	1	1.80 ± 0.15
13	0	-1	-1	0	1.82 ± 0.09
14	0	1	-1	0	1.96 ± 0.03
15	0	-1	1	0	1.78 ± 0.02
16	0	1	1	0	1.95 ± 0.16
17	-1	0	-1	0	1.65 ± 0.08
18	1	0	-1	0	1.94 ± 0.09
19	-1	0	1	0	1.64 ± 0.14
20	1	0	1	0	1.73 ± 0.05
21	0	-1	0	-1	1.61 ± 0.16
22	0	1	0	1	1.91 ± 0.05
23	0	-1	0	-1	1.69 ± 0.17
24	0	1	0	1	2.02 ± 0.04
25	0	0	0	0	2.14 ± 0.03
26	0	0	0	0	2.03 ± 0.11
27	0	0	0	0	2.09 ± 0.05
28	0	0	0	0	2.08 ± 0.07
29	0	0	0	0	2.20 ± 0.09

依据单因素实验所呈现的结果，确定自变量，以仙人草总黄酮提取率为响应值，根据 Box-Behnken 设计方法为前提，进行了 4 个因素 3 个水平组合试验，得到最佳的仙人草总黄酮提取工艺条件。响应面设计方案及其结果如表 2 所示。

利用 Design Expert 软件对试验结果进行分析，得到仙人草总黄酮得率 /% (Y) 对超声温度 /℃ (A)、超声时间 /min (B)、料液比 (g/g) (C)、乙醇体积分数 /% (D) 模型的回归方程为：

$$Y=2.108+0.063A+0.072\ 5B-0.028C+0.054\ 2D-0.002\ 5AB-0.05AC-0.037\ 5AD+0.007\ 5BC+0.007\ 5BD+0.012\ 5CD-0.264A^2-0.173B^2-0.084C^2-0.108D^2$$

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Variance analysis of the regression equation

来源	自由度 df	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14	0.739 2	0.052 8	6.1	0.000 9	**
A	1	0.048 1	0.048 1	5.56	0.033 4	*
B	1	0.063 1	0.063 1	7.29	0.017 3	*
C	1	0.009 6	0.0096	1.11	0.309 3	
D	1	0.035 2	0.035 2	4.07	0.063 3	
AB	1	0.003 89	0.003 89	0.002 9	0.957 9	
AC	1	0.01	0.01	1.16	0.300 6	
AD	1	0.005 6	0.005 6	0.649 8	0.433 7	
BC	1	0.000 2	0.000 2	0.026	0.874 2	
BD	1	0.000 2	0.000 2	0.026	0.874 2	
CD	1	0.000 6	0.000 6	0.072 2	0.792 1	
A ²	1	0.453 5	0.453 5	52.39	<0.000 1	**
B ²	1	0.194 5	0.194 5	22.47	0.000 3	**
C ²	1	0.046 2	0.046 2	5.34	0.036 6	*
D ²	1	0.075 9	0.075 9	8.77	0.010 3	*
残差	14	0.121 2	0.009			
失拟项	10	0.104 5	0.013 2	2.25	0.224 3	不显著
纯误差	4	0.016 7	0.005 9			
总和	28	0.860 4				

注：**表示差异极显著 ($P<0.01$)，*表示差异显著 ($P<0.05$)。

如表 3 所示，对回归方程进行结果分析。通过 P 值能够判断该模型及各考察因素对试验结果影响的显著程度， $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 分别表示该模型及各考察因素对试验结果具有差异显著和差异极显著的影响。从表 3 可以看出，以仙人草总黄酮提取率为响应值， $P=0.000\ 9<0.01$ ，表示此模型表现为差异极显著；失拟值用来表示所建立的回归方程模型与实验结果之间

的拟合程度，该模型的失拟值为 $P=0.224\ 3>0.05$ ，表明该模型为失拟不显著，该建立的数学回归方程能够有效的预测仙人草总黄酮提取率。根据 F 值的大小，可以来判断 4 种因素对仙人草总黄酮提取率的影响程度，即为：超声时间 (B)>超声温度 (A)>乙醇体积分数 (D)>料液比 (C)。

2.2.2 最优工艺确定与验证

为了得到总黄酮提取最佳工艺方案，对所得回归方程解方程组后可得：超声温度 (A) 为 65.60℃，超声时间 (B) 为 36.05 min，料液比 (C) 为 1:18.24 (g/g)，乙醇体积分数 (D) 为 86.13%，在此条件下仙人草总黄酮提取率为 2.13%。结合实际操作条件情况，将仙人草总黄酮提取的最佳工艺条件调整为：超声温度 66℃，超声时间 36 min，料液比 1:18 (g/g)，乙醇体积分数 86%。在最佳工艺条件下进行平行实验 3 次来验证回归方程预测仙人草总黄酮提取条件的可靠性。在最佳工艺条件下，实际测得仙人草总黄酮提取率上表所示 ($P>0.05$)，与理论值的平均误差为 1.62%，表明了该回归方程具有良好的可靠性。

2.3 仙人草总黄酮的降血糖功效评价

2.3.1 总黄酮对 α -淀粉酶活性的抑制率

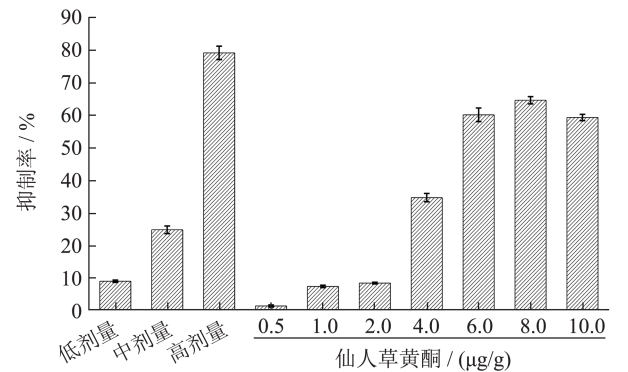


图 5 不同的仙人草总黄酮浓度对 α -淀粉酶活性的抑制率
Fig.5 Inhibition rate of total flavonoids on α -amylase activity

在糖类物质的代谢过程中， α -淀粉酶起着关键作用，它负责将食物中的淀粉分解为糊精、低聚糖以及最终的单糖。因此，控制这一酶的活性对于减少人体对葡萄糖的吸收至关重要，这不仅有助于预防也是治疗血糖水平过高的有效策略^[26]。根据图 5 的实验数据，发现仙人草总黄酮对 α -淀粉酶的抑制效果与其浓度成正比关系，但这种效果在浓度增加到一定水平后会出现下降。特别是在 8.0 mg/g 的浓度下，仙人草总黄酮显示出了最佳的抑制效果，抑制率达到了 64.57%，尽管这略低于高剂量拜糖平 1 mg/g 的效果，但结果仍然证明了仙人草总黄酮在抑制 α -淀粉酶活性方面的潜力，

这对于控制血糖上升具有积极意义。

2.3.2 总黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率

α -葡萄糖苷酶对于人体的糖分代谢过程至关重要,其高活性可能导致血糖水平的快速上升,从而对血糖控制产生不利影响^[27]。抑制此酶的活性对于减缓血糖水平的增长至关重要。图6的数据显示,仙人草总黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果与其浓度成正比,但这一效果达到一定浓度后会下降。特别地,在仙人草总黄酮浓度为6.0 mg/g时,观察到对 α -葡萄糖苷酶活性的最大抑制率,高达72.18%,这一效果与阳性对照组(5 mg/g的二甲双胍)标准药物相当,从而证实了仙人草总黄酮在控制血糖方面的潜在应用价值。

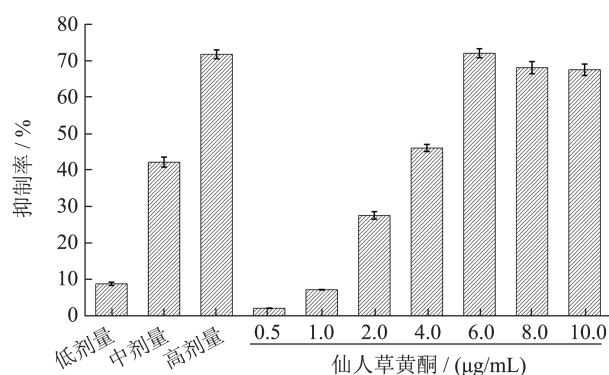


图6 不同的仙人草总黄酮浓度对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率

Fig.6 Inhibition rate of total flavonoids on α -glucosidase activity

2.3.3 总黄酮对肝脏细胞HepG2的葡萄糖消耗量的影响

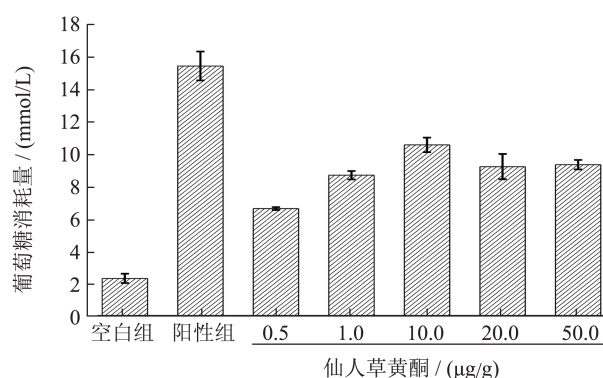


图7 不同的仙人草总黄酮浓度对肝脏细胞 HepG2 的葡萄糖消耗量的影响

Fig.7 Effect of total flavonoids on the glucose consumption of HepG2 in liver cells

肝脏在处理葡萄糖并维持血糖稳定方面起着决定性的作用。然而,肝脏功能受损可能导致其代谢葡萄糖的能力下降,从而可能导致血糖升高,进而引发糖尿病^[28]。因此,探索一种天然的活性成分,以增强受损肝脏细胞的葡萄糖代谢能力,对于控制血糖水平和

改善糖尿病症状具有重要意义。根据图7的数据显示,仙人草中的总黄酮成分对促进 HepG2 肝脏细胞的葡萄糖代谢具有显著效果,尤其是在 10 μ g/g 的浓度下,其降低葡萄糖含量的效果尤为明显,肝脏细胞的葡萄糖消耗量达到了 10.55 mmol/L,这一数值接近于阳性对照组 (15.42 mmol/L)。这些结果表明,仙人草总黄酮能够显著提高肝脏细胞 HepG2 对葡萄糖的代谢效率,对于降低血糖水平具有潜在的积极作用。

2.3.4 总黄酮对肝脏细胞HepG2糖原合成的影响

在对 2.3.3 的实验结果进行分析时,特别关注了两种浓度的仙人草总黄酮 (10 μ g/g 和 20 μ g/g),它们在显著提升 HepG2 肝脏细胞葡萄糖消耗量方面表现出色。为了深入探究其促进肝脏细胞葡萄糖消耗的潜在机制,故进行了进一步的实验验证。根据图8的实验数据,研究发现,与未处理的空白组相比,10 μ g/g 和 20 μ g/g 的仙人草总黄酮分别增强了 HepG2 肝脏细胞糖原合成的能力,提升幅度分别为 45.4% 和 59.4%。这一效果与阳性对照组的数据 (6.42 mg/g) 相比较,显示出了明显的接近性。研究指出,仙人草总黄酮可能通过增强肝脏细胞合成糖原的能力,提升了细胞对葡萄糖的代谢作用,这可能有助于减缓血糖水平的上升。

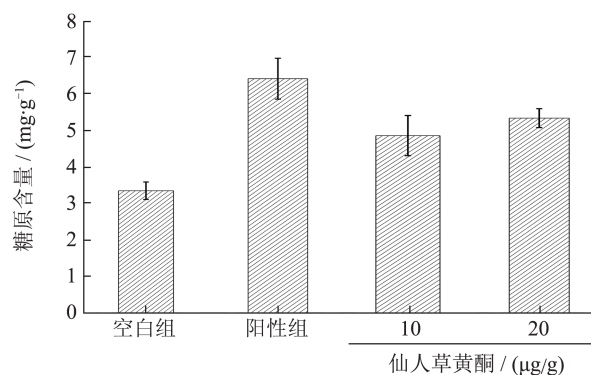


图8 不同的仙人草总黄酮浓度对肝脏细胞 HepG2 的糖原含量的影响

Fig.8 Effect of total flavonoids on the glycogen content of HepG2 in liver cells

3 结论

为了获取具有高效降血糖功效的仙人草总黄酮提取液,本研究运用了单变量试验与响应面法的结合,旨在以总黄酮的提取效率作为评价标准,从而确定最优的仙人草总黄酮提取技术。经过验证,最终确定了最佳的提取条件:乙醇的体积比为 86%,原料与溶剂的比例为 1:18 (g/g),超声处理时间为 36 min,以及超声处理温度为 66 $^{\circ}$ C;在此条件下,仙人草总黄酮具有较高提取率为 2.17%。仙人草总黄酮能够显著抑制 α -

葡萄糖苷酶的活性和 α -淀粉酶的活性,从而有利于缓解血糖浓度的上升;10 $\mu\text{g/g}$ 仙人草黄酮能显著提高肝脏细胞 HepG2 的葡萄糖消耗量和促进糖原的合成,证明了仙人草黄酮具有良好的辅助降血糖功效。与现有文献作比,本研究在提取效率和降血糖活性方面均显示出显著优势。此外,研究还初步探讨了仙人草总黄酮的降血糖机制,为未来的深入研究奠定了基础。并且在研究过程中还认识到需要进一步的体内研究和临床试验的结果来评估仙人草总黄酮的长期应用效果和安全性。本研究同时还考虑了提取工艺的可行性与环境因素,指出实现可持续生产与应用的潜力。该研究结果可为仙人草高值化利用及其开发保健食品和消暑饮品领域的研究提供科学的理论依据,特别是对于研究提高公众健康以及糖尿病的管理和预防具有重要的社会和公共卫生意义。

参考文献

- [1] 李洁,蒋运兰,彭寒梅,等.中国2型糖尿病患者心理痛苦横断面研究的meta分析[J].中国心理卫生杂志, 2023,37(4):312-317.
- [2] VAN L V, PHAM E C, NGUYEN C V, et al. *In vitro* and *in vivo* antidiabetic activity, isolation of flavonoids, and *in silico* molecular docking of stem extract of *Merremia tridentata* (L.) [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 146: 112611.
- [3] 张晓玉,潘宇翔,王佳,等.玉米须中正丁醇萃取物的活性成分分析及其降血糖作用[J].食品研究与开发,2022,43(14):52-61.
- [4] 吉惠杰,杨艳俊,沈启慧,等.超声辅助酶解法提取仙人草多糖的工艺研究[J].粮油食品科技,2017,25(2):74-77.
- [5] 汪凡,张旭,汪本宗,等.超声辅助法提取当归总黄酮工艺优化研究[J].云南化工,2023,50(10):31-34.
- [6] 陈文娟,陈建福,张铭霞,等.超声波辅助提取美人蕉叶总黄酮工艺及其抗氧化活性研究[J].湖北民族大学学报(自然科学版), 2023,41(2):147-155.
- [7] ZAMAN A, ALEEM Q, AHMED R. Reducing cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Medicine*, 2019, 47(2): 72-76.
- [8] MOZAFFARIAN D, WU J H Y. Flavonoids, dairy foods, and cardiovascular and metabolic health: A review of emerging biologic pathways [J]. *Circulation Research*, 2018, 122(2): 369-384.
- [9] 黄修晴,初众,房一明,等.植物多酚降血糖机制的研究进展[J].食品工业科技,2021,42(18):461-469.
- [10] 陈建福,施伟梅.响应面法优化纤维素酶辅助提取西兰花总黄酮[J].四川农业大学学报,2014,32(3):298-304.
- [11] 李慧,潘思铁,徐晓云.莲子心水提物中黄酮类化合物的结构及其对RAW264.7小鼠巨噬细胞NO生成的影响[J].中国食品学报,2018,18(2):44-54.
- [12] 徐嘉鸿,刘美美,戚滇杰,等.金花茶总黄酮双水相提取工艺优化及其抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2022,43(3):155-161.
- [13] 肖连冬,王莹,于海彦,等.响应面法优化乙醇/硫酸铵双水相体系萃取洋葱黄酮的研究[J].中国食品添加剂,2019,30(8):80-85.
- [14] 吉惠杰,曹雪玲,郑凤梅,等.仙人草多糖提取及分离纯化工艺研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2017,38(4):64-69+85.
- [15] 蒋新龙,蒋益花,何星谷.双水相法制备花生衣高纯度黄酮及其抗氧化的研究[J].中国粮油学报,2021,36(3):135-139.
- [16] 步琳,张朝辉,侯虎,等.喜盐草总黄酮超声波辅助提取工艺的优化[J].食品科技,2015,40(5):238-242.
- [17] 吉惠杰,程振玉,薛俊礼,等.仙人草总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2016,12:133-138.
- [18] 缪文玉,李冠文,殷孝莹,等.新鲜枸杞叶中黄酮提取工艺的优化及抗氧化性分析[J].山西农业科学,2022,50(5):762-770.
- [19] 董伟,马生健,马文欣,等.凉粉草多糖的理化性质及其体外抗氧化活性[J].食品研究与开发,2023,44(9):52-58.
- [20] KONG F, DING Z, ZHANG K, et al. Optimization of extraction flavonoids from *exocarpium citri grandis* and evaluation its hypoglycemic and hypolipidemic activities [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 262: 113178.
- [21] 龙林,黄盼,程佩佩,等.青稞秸秆总黄酮提取工艺优化及降血糖活性研究[J].湖南师范大学自然科学学报,2022,45(4):137-143,158.
- [22] YAN F, ZHANG J, ZHANG L, et al. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG2 cells [J]. *Food & Function*, 2016, 7(1): 425-433.
- [23] 鲍涛,王治,孙崇德,等.黑苦荞米黄酮提取工艺优化及其降血糖活性研究[J].农业工程学报,2016,32(S2):383-389.
- [24] 朱姝枚,郭璐,张少冰,等.超声波辅助乙醇提取忍冬桑黄菌丝体中黄酮的研究[J].食品科技,2022,47(2):239-244.
- [25] HOU M, HU W, WANG A, et al. Ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *pteris cretica* L.: Process optimization, HPLC analysis, and evaluation of antioxidant activity [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 425.
- [26] 钟雨坤,王历琼,韩小丹,等.正交试验优化超声波辅助同时提取桑叶总黄酮、单宁工艺[J].食品科学,2015,36(12):44-48.
- [27] 王斯慧,白银花,黄琬凌,等.苦荞黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J].食品科技,2012,2:24-26.
- [28] ZHANG H, WU Q, QIN X. *Camellia nitidissima* Chi flower extracts inhibit α -amylase and α -glucosidase: *In vitro* by analysis of optimization of addition methods, inhibitory kinetics and mechanisms [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 86: 177-185.