

# 超声辅助深共熔溶剂提取栀子黄酮及其对 HepG2 细胞的降血糖作用

宋巧英

(安阳工学院 生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000)

**摘要:** 采用超声辅助深共熔溶剂 (DES) 对栀子黄酮进行了提取, 通过单因素实验、正交实验优化了提取工艺, 测试了提取的栀子黄酮溶液对人肝脏胚胎肿瘤细胞 (HepG2 细胞) 的降血糖能力。结果表明, DES 含水量 (以加水前 DES 的体积计, 下同) 对黄酮得率的影响最大。在以  $n(\text{氯化胆碱}) : n(1,2\text{-丙二醇})=1 : 3$  制备的 DES 为提取溶剂、含水量 30%、料液比 (g : mL, 下同) 为 1 : 33、超声 (功率 120 W、时间 40 min、温度 60 °C) 的最佳工艺条件下, 栀子黄酮得率最高, 为 32.70 mg/g。中 (250.0 mg/L)、高 (1000.0 mg/L) 质量浓度的栀子黄酮可显著降低甘油三酯含量。栀子黄酮可通过增加 IR-HepG2 细胞内己糖激酶、丙酮酸激酶含量, 降低甘油三酯的含量而促进糖代谢, 从而达到降血糖效果。

**关键词:** 深共熔溶剂; 栀子黄酮; HepG2 细胞; 超声辅助提取; 降血糖作用; 中药现代化技术

中图分类号: TQ28; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 10-2223-08

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Extraction of *Gardenia* flavone with ultrasound-assisted deep eutectic solvents and its hypoglycemic effect on HepG2 cells

SONG Qiaoying

(School of Biology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, Henan, China)

**Abstract:** Ultrasound-assisted deep eutectic solvent (DES) was used for extraction of *Gardenia* flavone, with the extraction process optimized by single factor experiments and orthogonal experiments. The *Gardenia* flavone obtained was then evaluated for its hypoglycemic effect on human hepatocellular carcinomas (HepG2 cells). The results showed that the water content (based on the volume of DES before adding water, the same below) in DES exhibited the greatest influence on the flavone yield. Under the optimum conditions of  $n(\text{choline chloride}) : n(1, 2\text{-propylene glycol})=1 : 3$  as extraction solvent, water content 30%, solid-liquid ratio (g : mL, the same below) 1 : 33, ultrasound conditions (power 120 W, time 40 min, temperature 60 °C), the yield of *Gardenia* flavone reached the highest (32.70 mg/g). Medium (250.0 mg/L) and high (1000.0 mg/L) mass concentrations of *Gardenia* flavone could significantly reduce the content of triglyceride. *Gardenia* flavone could promote glucose metabolism by increasing the content of hexokinase and pyruvate kinase in IR-HepG2 cells, reducing the content of triglyceride, and thus achieving hypoglycemic effect.

**Key words:** deep eutectic solvents; *Gardenia* flavone; HepG2 cells; ultrasound-assisted extraction; hyperglycemic effect; modernization technology of traditional Chinese medicines

栀子, 茜草科植物栀子 (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) 的果实, 形状为圆形或椭圆形, 颜色呈深红

色, 有独特气味, 微甜, 最早发现记载于《神农本草经》, 在《伤寒论》、《普济方》等书中均有记录<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2023-10-11; 定用日期: 2023-11-14; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230857

基金项目: 安阳工学院博士启动基金项目 (BSJ2021026)

作者简介: 宋巧英 (1993—), 博士, 女, E-mail: 969354025@qq.com。

栀子是一种优良的中药材,既可以作为中医常用药,也可以作为营养保健品的原料,是国家批准的药食同源植物,具有副作用小、功效明显的优点<sup>[2]</sup>。栀子中含有丰富的营养物质,如多糖、蛋白质、黄酮、多酚等,有着抗氧化、抗炎、保肝利肝、调节血糖的作用<sup>[3]</sup>。所以,开发利用栀子及其副产品具有极大的意义。

大量研究表明,栀子提取物具有一定的降血糖功效。如栀子黄色素类单体可缓解淀粉负荷和蔗糖负荷糖尿病小鼠的高血糖症状<sup>[4]</sup>;栀子苷具有降低血糖,改善糖尿病并发症病理的作用<sup>[5]</sup>;栀子豉汤对糖尿病模型大鼠进行干预,可显著提高胰岛素敏感指数<sup>[6]</sup>。黄酮是栀子的主要活性成分之一,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖等功效<sup>[7]</sup>。目前,提取黄酮的方法主要有微波辅助提取法、超声辅助提取法、乙醇提取法等。但微波辅助提取法提取周期长,操作过程繁琐;超声辅助提取法操作压力高,能量消耗大,产业化制备成本高;乙醇提取法提取效率低,易造成原材料的浪费。

深共熔溶剂(DES)是根据物质的量比或质量比混合而成的多元混合物,其中一部分为氢键受体(HBA,如季铵盐、碱类等),另一部分为氢键供体(HBD,如尿素、羧酸、多元醇、氨基酸、糖类等)。DES多组分之间建立的氢键相互作用降低了混合物的熔点,改变了其理化性质。因此,制备合适的DES,利用相似相容原理可增加活性物质的提取率。同时,DES具有较低的挥发性和较高的溶解度,这有利于提取黄酮等化合物。大量学者构建了不同的DES体系提取天然成分,WANG等<sup>[8]</sup>研究发现,超声波辅助DES〔 $n(\text{乙二醇}):n(\text{氯化胆碱})=1:1$ 配制〕可高效提取红花中的黄酮类化合物;王帆等<sup>[9]</sup>利用微波辅助DES〔 $n(\text{乙酰丙酸}):n(\text{氯化胆碱})=2:1$ 配制〕提取厚朴渣中木脂素类化合物,提取率是传统甲醇法提取率的4.95倍;PAN等<sup>[10]</sup>利用DES〔 $n(\text{草酸}):n(\text{氯化胆碱})=1:2$ 配制〕提取的羊肚菌多糖的含量是传统水提法的4.5倍。因此,DES提取法可能会在栀子黄酮的提取上获得良好的效果。

本文拟以江西栀子为材料,采用DES提取法对栀子黄酮的提取条件进行优选,确立最佳提取工艺。同时通过建立IR-HepG2模型,测定甘油三酯(TG)、己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)、糖原含量等指标,对栀子黄酮降血糖活性进行研究,为栀子活性成分的开发和应用提供理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

栀子,2022年3月采自江西;芸香叶苷、氯化

胆碱、硝酸铝、1,2-丙二醇,分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;丙三醇、尿素、柠檬酸,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;二甲双胍、重组人胰岛素、葡萄糖检测试剂盒,上海源叶生物科技有限公司;人肝脏胚胎肿瘤细胞(HepG2细胞),中国科学院上海生命科学研究院细胞库;胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司;DMEM高糖培养基,生工生物工程(上海)股份有限公司;细胞增殖与毒性检测试剂盒(CCK-8),美国APEX-BIO生物科技有限公司;甘油三酯(TG)检测试剂盒、丙酮酸激酶(PK)检测试剂盒、己糖激酶(HK)检测试剂盒、糖原检测试剂盒,南京建成生物工程研究所。

SS-1022型粉碎机,武义海纳电器有限公司;DM0412型离心机,上海通善生物科技有限公司;T9型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;DF-101S型集热式恒温磁力搅拌器,郑州卓成仪器科技有限公司;VGT-1990QTD型超声波清洗机,上海色谱仪器有限公司;GZX-9140MBE型电热恒温鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司;HWS-24型电热恒温水浴锅,上海恒科学仪器有限公司;WH-SCI-01二氧化碳细胞培养箱,上海丙林电子科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DES的配制

称取适量HBA氯化胆碱和HBD,按照 $n(\text{HBA}):n(\text{HBD})=1:3$ 混合均匀,密封后保持80℃搅拌3h,形成均一透明液体,即为所需DES,放置阴凉干燥处密封备用。

分别以1,2-丙二醇、丙三醇、柠檬酸、尿素和葡萄糖5种HBD制备的DES对应命名为DES-1~DES-5。

#### 1.2.2 栀子黄酮的提取

取20g栀子,置于55℃电热恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重,粉碎后过400目筛,得到栀子粉;称取栀子粉1g,加入30mL的DES,超声功率120W进行超声提取,随后以4000r/min离心20min取上清液,其中,料液比(g:mL,下同)为1:30。采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,根据芦丁标准曲线测定栀子中黄酮得率(mg/g),用式(1)计算<sup>[11]</sup>:

$$\text{黄酮得率} = \frac{\rho \times v \times v_0}{m \times v_1} \quad (1)$$

式中: $\rho$ 为上清液中黄酮的质量浓度,g/L; $v$ 为定容后得到的提取液体积,mL; $v_0$ 为样品的总体积,mL; $m$ 为栀子粉的加入量,g; $v_1$ 为测定用的体积,mL。

采用固定剂沉淀法去除样品中残留的DES。在100mL含有DES的栀子黄酮溶液中加入50mg磷

酸钠, 搅拌均匀静置 10 min 使 DES 稳定沉淀, 离心分离出沉淀。重复操作 3~5 次, 最后的上清液即为无 DES 的栀子黄酮溶液。

### 1.2.3 黄酮标准曲线的制作

芦丁标准溶液的配制: 称取 20 mg 芸香叶苷标准品溶于体积分数 70% 乙醇中, 定容至 100 mL, 得到质量浓度为 0.20 g/L 的芦丁标准溶液<sup>[12]</sup>。

标准曲线的制作: 准备 6 个 50 mL 容量瓶, 分别加入 0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mL 质量浓度为 0.20 g/L 的芦丁标准溶液; 再分别加入 2 mL 质量分数 10% 的硝酸铝水溶液和 2 mL 质量分数 5% 的 NaNO<sub>2</sub> 水溶液, 置于暗处静置 5 min; 然后, 分别都加入 20 mL 质量分数 4% NaOH 水溶液; 最后, 用体积分数 70% 乙醇定容至容量瓶刻度线, 暗处静置 20 min 后, 用紫外-可见分光光度计于 510 nm 处测量溶液的吸光度。

以芦丁标准溶液的质量浓度 ( $x$ , g/L) 为横坐标, 吸光度 ( $y$ ) 为纵坐标绘制芦丁标准曲线, 并拟合曲线得到回归方程  $y=12.057x+0.0021$  ( $R^2=0.997$ )。

## 1.3 超声辅助 DES 提取栀子黄酮工艺优化

### 1.3.1 单因素实验

在单因素实验前, 先对 5 种 DES 进行选取: 按照 1.2.2 节提取方法, 在超声时间 50 min、超声温度 60 °C、30 mL 含水量 (以加水前 DES 的体积计, 下同) 20% 的 DES 条件下进行提取实验, 以黄酮得率最高的 DES (暂定为 DES- $x$ ) 为单因素实验使用的提取溶剂。

#### 1.3.1.1 料液比的影响

按照 1.2.2 节提取方法, 以含水量 20% 的 DES- $x$  为提取溶剂, 采用超声提取温度 60 °C、提取时间 40 min, 考察不同料液比 (1:20、1:25、1:30、1:35、1:40) 对黄酮得率的影响<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.1.2 DES 含水量的影响

按照 1.2.2 节提取方法, 以 30 mL DES- $x$  为提取溶剂, 采用超声提取温度 60 °C、提取时间 40 min, 考察 10%、20%、30%、40%、50% 的 DES 含水量对黄酮得率的影响<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.1.3 超声时间的影响

按照 1.2.2 节提取方法, 以 30 mL 含水量 20% 的 DES- $x$  为提取溶剂, 采用超声提取温度 60 °C, 考察超声时间 (20、30、40、50、60 min) 对黄酮得率的影响<sup>[15]</sup>。

#### 1.3.1.4 超声温度的影响

按照 1.2.2 节提取方法, 以 30 mL 含水量 20% 的 DES- $x$  为提取溶剂, 采用超声提取时间 40 min, 考察超声温度 (30、40、50、60、70 °C) 对黄酮得率的影响<sup>[16]</sup>。

### 1.3.2 正交实验设计

将超声与 DES 相结合, 可以提升提取栀子黄酮的效果, 为了明确最佳提取工艺, 以单因素实验结果为依据, 以  $A$  (超声时间)、 $B$  (超声温度)、 $C$  (含水量)、 $D$  (料液比) 为因素, 以黄酮得率为指标, 设计四因素四水平的正交实验 (表 1) 进一步优化超声辅助 DES 提取栀子黄酮的工艺。

表 1 正交实验设计表  
Table 1 Orthogonal test design table

因素	水平			
	1	2	3	4
$A/\text{min}$	35	40	45	50
$B/^\circ\text{C}$	55	60	65	70
$C/\%$	25	30	35	40
$D/(\text{g}:\text{mL})$	1:27	1:30	1:33	1:36

## 1.4 栀子黄酮降血糖活性测试

### 1.4.1 胰岛素浓度对细胞活力的影响

将 HepG2 置于 DMEM 高糖培养基中, 于二氧化碳细胞培养箱中进行培养, 设置培养条件为 37 °C、体积分数 5% 二氧化碳培养至细胞融合 80% 左右。将细胞数调整至  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度后, 接种于 96 孔板中进行培养, 接种量为 100  $\mu\text{L}$ 。细胞贴壁后, 更换为 100  $\mu\text{L}$  无血清培养液饥饿 10 h, 再分别加入 10  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 胰岛素的无血清培养基中, 每个浓度进行 6 次平行实验, 孵育 8 h 后每孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h 后, 在 450 nm 处测定其吸光度。同时设置空白组 (无细胞的血清培养基)、对照组 [有细胞 ( $2 \times 10^5$  个/mL, 接种量为 100  $\mu\text{L}$ ), 无胰岛素]。按照式 (2) 测定细胞存活率, 以评价细胞活力大小<sup>[17]</sup>:

$$\text{细胞存活率}/\% = (A_1 - A_2) / (A_3 - A_2) \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  分别为胰岛素组、空白组、对照组的吸光度。

### 1.4.2 IR-HepG2 细胞模型的构建

将细胞数调整至  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度后接种于 96 孔板中进行培养, 接种量为 100  $\mu\text{L}$ 。细胞贴壁后, 更换为 100  $\mu\text{L}$  无血清培养液饥饿 10 h, 再分别加入 10  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 胰岛素的无血清培养基中。同时设置空白组, 分别诱导 24、48 和 72 h 后, 测定葡萄糖含量, 从而构建 IR-HepG2 细胞模型<sup>[18]</sup>。

### 1.4.3 栀子黄酮对细胞增殖的影响

将细胞数调整至  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度后接种于 96 孔板中进行培养, 接种量为 100  $\mu\text{L}$ 。设置空白组和样品组, 样品组中分别加入 10  $\mu\text{L}$  质量浓

度为 62.5、250.0、1000.0 mg/L 的栀子黄酮完全培养液，孵育 24 h 后进行细胞增殖的测定。

#### 1.4.4 栀子黄酮对 IR-HepG2 细胞生理指标的影响

将细胞数调整至  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度后接种于 96 孔板中进行培养，接种量为 100  $\mu$ L。设置空白组、模型组、阳性对照组以及栀子黄酮高、中、低剂量组。除空白组外，其他组加入 10  $\mu$ L 浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素的无血清培养基孵育 48 h。空白组、模型组加入 10  $\mu$ L 无血清培养基，阳性对照组加入 10  $\mu$ L 质量浓度 1000 mg/L 的二甲双胍的无血清培养基，栀子黄酮低、中、高剂量组分别加入 10  $\mu$ L 质量浓度为 62.5、250.0、1000.0 mg/L 的栀子黄酮的无血清培养液。收集细胞，离心弃上清，加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4) 重悬后分为两部分：一部分冰水浴超声破碎 (超声功率 60 W, 每次超声 3~5 s, 两次间隔 30 s, 共超声 3~5 次)，参照 HK、PK、TG 试剂盒说明书进行操作；另一部分加入 NaOH 溶液 0.225 mL，沸水浴 20 min，加双蒸水 0.225 mL，混匀后沸水浴 5 min，冷却后于 620 nm 处测定其吸光度。以此评价栀子黄酮对 IR-HepG2 细胞糖原合成的影响<sup>[19]</sup>。

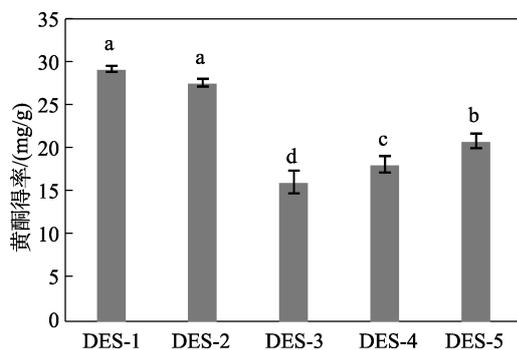
#### 1.5 数据处理

每组实验都进行 3 次重复，结果采用 SPSS 软件进行计算，以“平均值 $\pm$ 标准差”的形式表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DES 的选择

按照 1.3.1 节提取条件，考察 5 种 DES 在超声辅助下提取栀子黄酮的黄酮得率，结果见图 1。



不同字母之间表示存在差异性 ( $P < 0.05$ ), 下同

图 1 不同种类 DES 提取栀子黄酮的黄酮得率

Fig. 1 Flavonoids yield of *Gardenia flavone* extracted by different kinds of DES

由图 1 可知，黄酮得率从高到低的 DES 排序为：DES-1 > DES-2 > DES-5 > DES-4 > DES-3。这是因为，氯化胆碱含有较多的烷基，黏度低，具有疏水性，有利于黄酮与溶剂之间的良好接触，醇类物质

中的羟基可与黄酮类物质形成氢键，从而提高了黄酮的得率；另外根据相似相容原理，5 种 HBD 中，1,2-丙二醇具有较高的极性，更适合黄酮类极性较强物质的提取。所以，后续的单因素实验选用的最佳 DES 为 DES-1。

### 2.2 单因素实验分析

#### 2.2.1 料液比的影响

按照 1.3.1.1 节提取条件，考察不同料液比对黄酮得率的影响，结果见图 2。

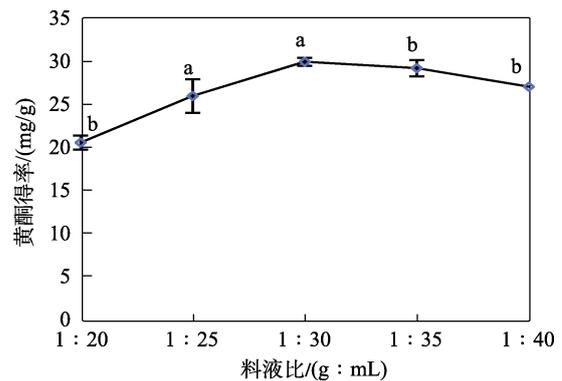


图 2 不同料液比对黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of different ratio of feed to liquid on flavone yield

由图 2 可知，随着料液比的减小，黄酮得率呈先增加后减小的趋势。当料液比为 1 : 30 时，黄酮得率最高，为 30.01 mg/g。这是因为，在提取过程中，随着溶剂用量的增加，溶剂与样品的接触面积增大，可以在短时间内提取出更多的栀子黄酮，黄酮得率因而增加；但随着提取溶剂用量的继续增大，在一定时间内消耗超声波能量增多，从而造成黄酮得率下降<sup>[20]</sup>。

#### 2.2.2 DES 含水量的影响

按照 1.3.1.2 节提取条件，考察不同含水量对黄酮得率的影响，结果见图 3。

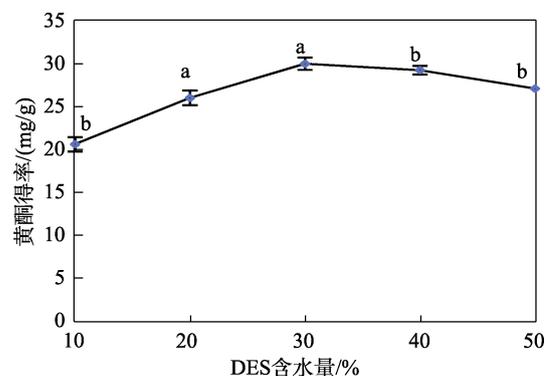


图 3 不同 DES 含水量对黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of different DES water content on flavone yield

DES 通常具有很高的黏度, 在提取过程中不能充分地 与样品进行有效的接触, 从而 影响提取过程中目标组分的溶解, 导致提取时间过长、提取不充分等问题。在 DES 中加入水, 可以降低其黏度和表面张力, 从而提高组分的提取率。由图 3 可知, 当含水量由 10% 增加到 30% 时, 可显著增加黄酮得率, 在含水量为 30% 时, 黄酮得率达到最高, 为 29.56 mg/g; 随着含水量的进一步增大 (40% 和 50%), 黄酮得率有所下降, 这是因为, 水分对 DES 与栀子黄酮之间的相互作用产生了影响<sup>[21]</sup>。

2.2.3 超声时间的影响

按照 1.3.1.3 节提取条件, 考察不同超声时间对黄酮得率的影响, 结果见图 4。

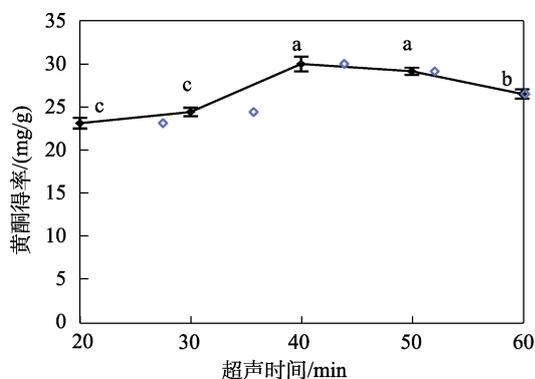


图 4 不同超声时间对黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of different ultrasonic time on flavone yield

由图 4 可知, 超声时间对黄酮得率的影响不太明显, 当超声时间为 40 min 时得率最高, 为 30.07 mg/g, 此后随着超声时间的增加, 黄酮得率略有下降。这是因为, 在一定的时间内, 当物料与溶液充分相容后, 超声波空化作用将完全闭合, 时间延长对黄酮得率的影响相对微弱<sup>[22]</sup>。

2.2.4 超声温度的影响

按照 1.3.1.4 节提取条件, 考察不同超声温度对黄酮得率的影响, 结果见图 5。

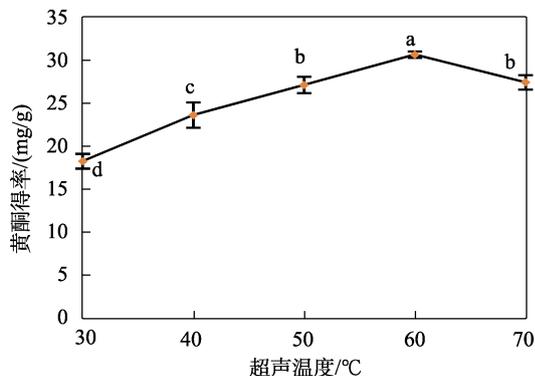


图 5 不同超声温度对黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of different ultrasonic temperature on flavone yield

由图 5 可知, 超声温度对栀子黄酮组分的提取率影响很大。在 30~60 °C 范围内, 黄酮得率与温度呈正相关。这是因为, 随着温度的升高, DES 的黏度下降, 体系传质增强, 因此, 黄酮得率随温度升高而提高。当温度继续提高至 70 °C, 黄酮得率有一定的降低, 这是由于过高的温度不仅会破坏栀子黄酮, 而且还会导致影响黄酮得率的杂质组分溶出增多<sup>[23]</sup>。

综合单因素实验, 以 DES-1 为提取溶剂, 最佳的提取条件为: 料液比为 1 : 30、DES 含水量 30%、超声时间 40 min、超声温度 60 °C。在单因素实验基础上, 通过正交实验确定最佳提取条件。

2.3 正交实验结果分析

表 2 为正交实验的结果。

表 2 正交实验结果  
Table 2 Orthogonal test results

序号	因素				黄酮得率/(mg/g)
	A 超声时间/min	B 超声温度/°C	C DES 含水量/%	D 料液比/(g : mL)	
1	35	55	25	1 : 27	29.79±2.16 <sup>c</sup>
2	35	60	30	1 : 30	32.57±1.26 <sup>a</sup>
3	35	65	35	1 : 33	28.55±0.49 <sup>cd</sup>
4	35	70	40	1 : 36	23.88±2.18 <sup>e</sup>
5	40	55	30	1 : 33	30.81±3.46 <sup>b</sup>
6	40	60	25	1 : 36	28.22±2.79 <sup>d</sup>
7	40	65	40	1 : 27	27.79±5.14 <sup>c</sup>
8	40	70	35	1 : 30	29.22±1.06 <sup>c</sup>
9	45	55	35	1 : 36	21.27±2.41 <sup>h</sup>
10	45	60	40	1 : 33	31.69±0.79 <sup>b</sup>
11	45	65	25	1 : 30	28.06±2.48 <sup>d</sup>
12	45	70	30	1 : 27	28.70±5.17 <sup>c</sup>
13	50	55	40	1 : 30	21.87±3.40 <sup>h</sup>
14	50	60	35	1 : 27	26.81±3.76 <sup>f</sup>
15	50	65	30	1 : 36	31.45±2.49 <sup>b</sup>
16	50	70	25	1 : 33	30.19±3.64 <sup>b</sup>
K <sub>1</sub>	114.79	103.74	116.26	113.08	
K <sub>2</sub>	116.04	119.29	123.52	111.72	
K <sub>3</sub>	109.72	115.85	105.84	121.24	
K <sub>4</sub>	110.32	111.99	104.24	104.08	
k <sub>1</sub>	28.70	25.93	29.06	28.27	
k <sub>2</sub>	29.01	29.82	30.88	27.93	
k <sub>3</sub>	27.43	28.96	26.46	30.31	
k <sub>4</sub>	27.58	28.00	26.31	26.20	
R	1.58	3.89	4.57	4.11	
因素主次	C>D>B>A				
最优水平	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub>				

从表 2 正交实验结果可以看出,因素 A:  $K_2 > K_1 > K_4 > K_3$ ; 因素 B:  $K_2 > K_3 > K_4 > K_1$ ; 因素 C:  $K_2 > K_1 > K_3 > K_4$ ; 因素 D:  $K_3 > K_1 > K_2 > K_4$ 。根据表中显示的平均值的极差 (R), 可得出正交实验所考察的 4 个因素对黄酮得率的影响程度高低为  $C > D > B > A$ , 即含水量 > 料液比 > 超声温度 > 超声时间。这是因为, DES 中含水量可有效增加栀子和溶剂之间的接触面积, 增加了 DES 对栀子黄酮的溶解效率, 因此, DES 含水量对黄酮得率影响较大<sup>[24]</sup>。经正交实验确定,  $A_2B_2C_2D_3$  为最优提取条件, 即超声时间 40 min、超声温度 60 °C、含水量 30%、料液比为 1 : 33 (g : mL) 时, 黄酮得率最高, 以此工艺条件进行栀子黄酮的提取, 进行了 3 次平行验证实验, 黄酮得率分别为 (32.49±0.16)、(32.96±0.34)、(32.66±0.46) mg/g, 平均值为 32.70 mg/g。

## 2.4 栀子黄酮降血糖活性分析

### 2.4.1 胰岛素浓度对细胞活力的影响

图 6 为胰岛素浓度对 HepG2 细胞存活率的影响。

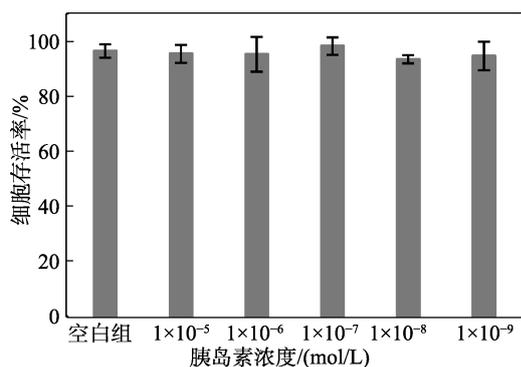


图 6 胰岛素浓度对 HepG2 细胞存活率的影响  
Fig. 6 Effects of different concentrations of insulin on survival rate of HepG2 cells

由图 6 可知, 胰岛素浓度在  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-9}$  mol/L 的范围内, 其处理 HepG2 细胞的存活率均在 95% 以上。因此, 可选择此浓度范围作为建模的胰岛素安全浓度范围。

### 2.4.2 IR-HepG2 细胞模型的构建

图 7A 为胰岛素浓度对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响。

由图 7A 可知, 当 HepG2 细胞在含有浓度为  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-9}$  mol/L 胰岛素的无血清培养基培养时, 与空白组相比, 对葡萄糖的消耗量有所降低。当胰岛素浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 时, HepG2 细胞对葡萄糖的消耗量最低, 相比空白组下降了 40.48%, 因此, 将  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素浓度作为构建模型的最佳浓度。

图 7B 为不同处理时间对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响。由图 7B 可知, HepG2 细胞在  $1 \times$

$10^{-7}$  mol/L 胰岛素浓度下分别处理 24、48 和 72 h, 处理 48 h 时, HepG2 细胞葡萄糖消耗量最低, 与空白组相比下降了 58.70%。

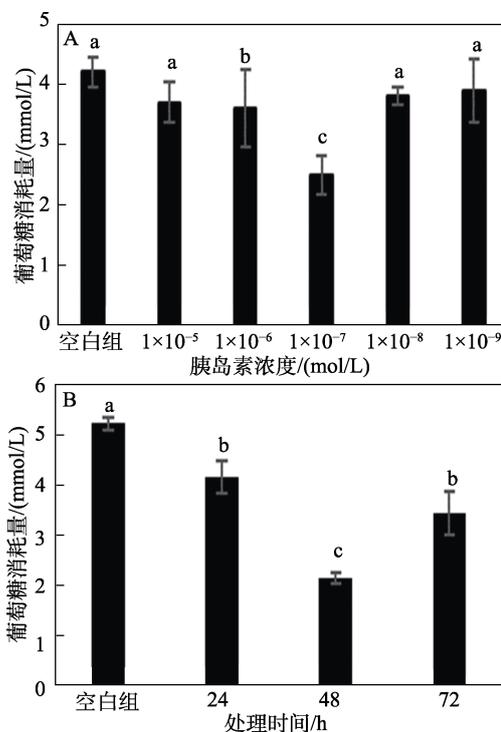


图 7 胰岛素浓度 (A) 和处理时间 (B) 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响  
Fig. 7 Effects of insulin concentrations (A) and treatment time (B) on glucose consumption of HepG2 cells

综上所述, 选择  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素浓度、处理时间 48 h 作为构建 IR-HepG2 细胞模型的最佳条件。

### 2.4.3 栀子黄酮对细胞增殖的影响

图 8 为栀子黄酮质量浓度对 HepG2 细胞存活率的影响; 图 9 为质量浓度为 1000 mg/L 的栀子黄酮对 HepG2 细胞处理后的 SEM 图。

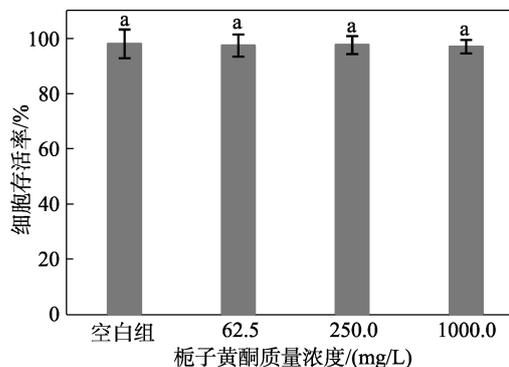
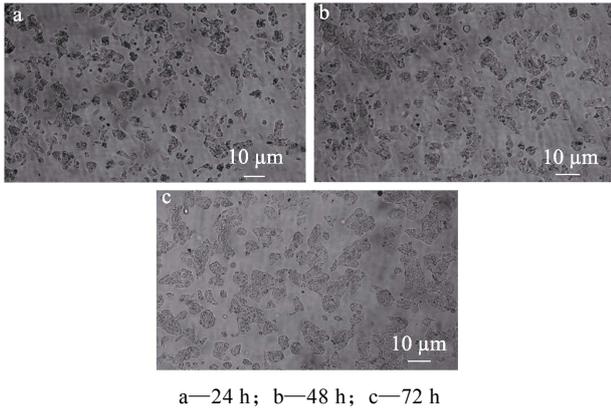


图 8 栀子黄酮质量浓度对 HepG2 细胞存活率的影响  
Fig. 8 Effect of *Gardenia* flavone mass concentration on survival rate of HepG2 cells



a—24 h; b—48 h; c—72 h

图 9 栀子黄酮处理不同时间 HepG2 细胞 SEM 图  
Fig. 9 SEM images of HepG2 cells treated with *Gardenia* flavone at different times

由图 8 可知, 在不同质量浓度 (62.5、250.0、1000.0 mg/L) 的栀子黄酮处理下, HepG2 细胞的存活率均达到 95% 以上。由图 9 可知, 质量浓度 1000.0 mg/L 的栀子黄酮分别处理 HepG2 细胞 24、48、72 h 后, HepG2 细胞没有出现不规则形态, 均表现为正常形态, 表明栀子黄酮对细胞无毒性, 可进行后续实验。这是因为, 黄酮类化合物具有显著的抗氧化活性, 可延缓细胞衰老, 对细胞无毒性。

#### 2.4.4 栀子黄酮对 IR-HepG2 细胞生理指标的影响

图 10 为栀子黄酮对 IR-HepG2 细胞生理指标的影响。

由图 10 可知, 空白组中 HK、PK 和 TG 含量分别为 43.20、106.32 和 0.036 nmol/mg prot, 均处于正常水平, 而模型组分别与空白组和阳性对照组 (二甲双胍) 之间存在显著性差异, 表明造模成功。

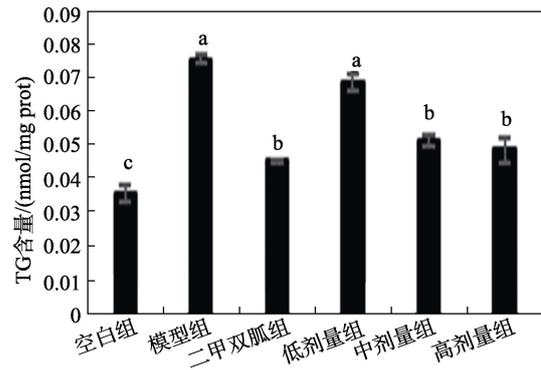
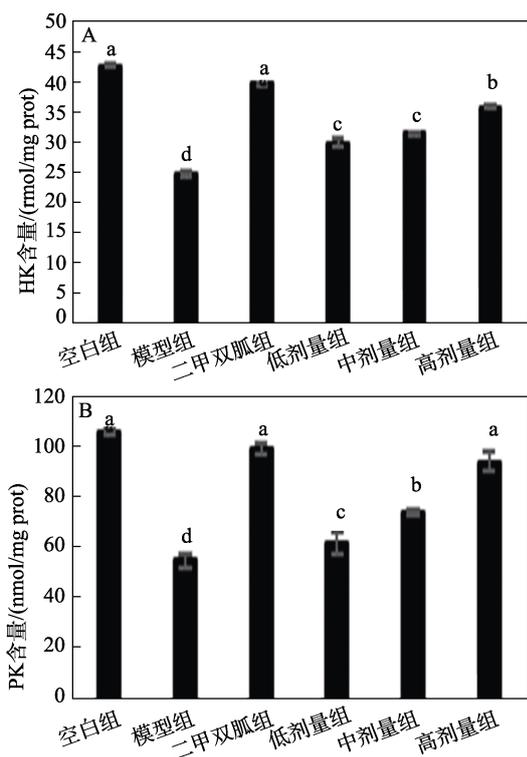


图 10 栀子黄酮对 IR-HepG2 细胞 HK (A)、PK (B)、TG (C) 含量的影响

Fig. 10 Effects of *Gardenia* flavone on HK (A), PK (B) and TG (C) contents in IR-HepG2 cells

由图 10A、B 可知, 与模型组相比, 低、中、高栀子黄酮组可显著增加 HK、PK 的含量, 且随着栀子黄酮质量浓度的增加, HK、PK 的含量也增加; 由图 10C 可知, 与模型组相比, 中、高剂量组可显著降低 TG 含量, 同时, TG 含量呈现对栀子黄酮质量浓度依赖性 (负相关)。这是因为, HK、PK 是促进糖代谢过程的重要反应物, 而 TG 含量的下调可有效改善胰岛素抵抗<sup>[25]</sup>。由此可知, 栀子黄酮可通过增加 IR-HepG2 细胞内 HK 和 PK 含量、降低 TG 含量而促进糖代谢, 从而达到降血糖效果。

### 3 结论

通过利用 DES 提取栀子黄酮, 并进行单因素实验和正交实验优化提取工艺, 同时评估栀子黄酮对 HepG2 细胞的降血糖作用。栀子黄酮提取最佳工艺为: 以  $n(\text{氯化胆碱}) : n(1,2\text{-丙二醇}) = 1 : 3$  制备的 DES 为提取溶剂、含水量 30%、料液比为 1 : 33 (g : mL)、超声辅助 (功率 120 W、超声时间 40 min、超声温度 60 °C)。在上述条件下, 黄酮得率为 32.70 mg/g。栀子黄酮的降血糖活性测试结果显示, 中 (250.0 mg/L)、高 (1000.0 mg/L) 质量浓度的栀子黄酮可显著降低 TG 含量。栀子黄酮可通过增加 IR-HepG2 细胞内 HK 和 PK 含量、降低 TG 含量而促进糖代谢, 从而达到降血糖效果。

本文提供了一种绿色、高效的从栀子中提取黄酮的方法, 且该黄酮在一定程度上具有降血糖活性, 有望为 DES 提取栀子黄酮的进一步深入研究和产业化奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] SHI Y P (史永平), KONG H T (孔浩天), LI H N (李昊楠), *et al.* Research progress on chemical composition and pharmacological

- effects of *Gardenia jasminoides* and predictive analysis on quality marker (Q-marker)[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2019, 50(2): 281-289.
- [2] ZHOU W (周文). Application of *Gardenia jasminoides* and general introduction of the refining methods of the gardenia yellow pigment[J]. Journal of Lanzhou Polytechnic College (兰州工业高等专科学校学报), 2009, 16(1): 58-61.
- [3] LIU C L (刘春雷), LIU Y Q (刘燕琴), CHEN A M (陈艾萌), et al. Phytochemical analysis of biologically active constituents content variations in different *Gardenia jasminoides* strains[J]. Chinese Traditional Patent Medicine (中成药), 2021, 43(2): 436-440.
- [4] LI Y S (黎砚书), XU L Y (徐丽璞), ZHOU Y Y (周艳艳), et al. The Hypoglycemic effect of gardenia yellow monomers on diabetic mice[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine (实验动物与比较医学), 2018, 38(5): 387-389.
- [5] ZHU D N (朱迪娜), XIN W F (辛文锋), ZHANG W S (张文生). Research progress on the molecular mechanism of geniposide for diabetes and its complications treatment[J]. Global Traditional Chinese Medicine (环球中医药), 2015, 8(5): 624-628.
- [6] TIAN Y L (田义龙), ZHAO J (赵静), REN Y Q (任艳青), et al. Effect and mechanism of *Gardeniae* and *Sojiae Praeparati* decoction on improving insulin resistance[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica (中药药理与临床), 2010, 26(6): 5-7.
- [7] YANG J (杨菁), LIU D D (刘顶鼎), CHEN T (陈滕), et al. Extraction process optimization and antioxidant, anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Aletris spicata* (Thunb.) Franch.[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 45(2): 192-200.
- [8] WANG X H, WANG J P. Effective extraction with deep eutectic solvents and enrichment by macroporous adsorption resin of flavonoids from *Carthamus tinctorius* L.[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 176: 112804.
- [9] WANG F (王帆), JIAN Y T (简雅婷), ZHANG Y (张宇), et al. Extracting the lignanoids from *Magoblia Bark* residues by deep eutectic solvent[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (农业工程学报), 2022, 38(3): 304-310.
- [10] PAN X, XU L J, MENG J L, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction of polysaccharides from *Morchella importuna*: Optimization, physicochemical properties and bioactivities[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 912014.
- [11] HOU M N (侯敏娜), HOU S P (侯少平), PENG X J (彭修娟), et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from *Fritillaria taipaiensis* by composite enzyme method and its antioxidant activity[J]. China Food Additives (中国食品添加剂), 2023, 10: 50-56.
- [12] WANG J L (王俊龙), LIN Y G (蔺永刚), CHEN F X (陈凤霞), et al. Extraction and antioxidant and hypoglycemic activity of total flavonoids from *Hypericum benthamii*[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2024, 41(5): 1050-1059, 1083.
- [13] LEI Q Q (雷秋琪), YE S J (叶诗洁), HUANG Y K (黄永康), et al. Optimization of extraction process of flavonoids from water chestnut shell and effect on anti-tumor cell proliferation activity[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2022, 43(14): 224-232.
- [14] JING Z X (井中旭), LIU Y W (刘雨薇), JIANG H B (姜海波), et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Hypericum attenuatum* by central composite design response surface method and fingerprint research[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2022, 53(16): 5010-5019.
- [15] FU X M (傅贤明), LU S (卢诗), HUANG X (黄欣), et al. Study on ultrasonic extraction and antioxidant capacity of total flavonoids from Fuding white tea[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2022, 35(12): 114-118, 122.
- [16] YANG G L (杨观兰), ZHONG C L (钟朝玲), ZHANG Q (张强), et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Choerospondias axillaris* leaves by response surface methodology and analysis of antioxidant activity[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2022, 35(9): 133-137.
- [17] CHEN S, WU Q G, LI X L, et al. Characterization of cytochrome P450s (CYP)-overexpressing HepG2 cells for assessing drug and chemical-induced liver toxicity[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part C, Toxicology and Carcinogenesis, 2022, 39(1): 68-86.
- [18] CHEN G L, XU Y B, WU J L, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Moringa oleifera* leaves and their functional chemical constituents[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127478.
- [19] CHENG J W, SONG J L, WEI H L, et al. Structural characterization and hypoglycemic activity of an intracellular polysaccharide from *Sanghuangporus sanghuang* mycelia[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 3305-3314.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] HUANG W R (黄文睿), TANG C F (唐超凡), TAO Y F (陶雨峰), et al. Extraction of flavonoids from *Chrysanthemum indicum* L. by green deep eutectic solvents[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(3): 569-576.
- [25] ZHAO Q H (赵清辉), WANG L (王琳), CHEN H F (陈慧芳), et al. Glucometabolism of Jiangtangning capsules on HepG2 cells and its mechanism[J]. Chinese Traditional Patent Medicine (中成药), 2015, 37(3): 483-487.