

# 响应面法优化金莲花总酚酸的提取工艺及其美白活性研究

杜若君<sup>1</sup>, 石召华<sup>1</sup>, 詹志来<sup>2</sup>, 胡俊杰<sup>1\*</sup>, 郑国华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; <sup>2</sup> 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700

**摘要:**采用响应面分析法中 Box-Behnken 设计实验优化乙醇回流提取金莲花总酚酸的工艺条件, 同时研究了金莲花总酚酸对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除能力、还原能力及其对酪氨酸酶的抑制作用。结果表明, 金莲花总酚酸的最佳提取工艺为乙醇浓度 60%, 回流时间 90 min, 回流温度 60 °C, 液料比 40:1 (mL/g); 在此条件下金莲花总酚酸得率为 92.245 mg/g。此外, 其对 DPPH 自由基、羟基自由基具有一定的清除能力和还原能力, 并且能够显著性地抑制酪氨酸酶活性。本研究所得的提取工艺稳定可靠, 金莲花总酚酸具有一定的体外抗氧化活性和酪氨酸酶抑制作用, 为进一步科学合理开发利用金莲花奠定基础。

**关键词:**金莲花; 总酚酸; 响应面; 抗氧化; 酪氨酸酶; 美白

中图分类号: TQ28; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)6-0915-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.6.001

## Optimization of the extraction process of total phenolic acid from *Trollii Flos* by response surface methodology and study on its whitening activity

DU Ruo-jun<sup>1</sup>, SHI Zhao-hua<sup>1</sup>, ZHAN Zhi-lai<sup>2</sup>, HU Jun-jie<sup>1\*</sup>, ZHENG Guo-hua<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

<sup>2</sup> Traditional Chinese Medicine Resource Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**Abstract:** Box-Behnken design experiments in response surface analysis were used to optimize the process conditions for the ethanol reflux extraction of total phenolic acid from *Trollii Flos*, and the scavenging ability of total phenolic acid from *Trollii Flos* on DPPH radicals and hydroxyl radicals and its inhibitory effect on tyrosinase were also studied. The results showed that the optimum extraction process of total phenolic acid from *Trollii Flos* was: ethanol concentration 60%, reflux time 90 min, reflux temperature 60 °C, liquid to solid ratio 40:1 (mL/g). The yield of total phenolic acid from *Trollii Flos* under these conditions was 92.245 mg/g. In addition, it had certain scavenging ability to DPPH radicals and hydroxyl radicals, and could significantly inhibit tyrosinase activity. The extract method is stable and reliable, and the total phenolic acid from *Trollii Flos* has certain *in vitro* antioxidant activity and tyrosinase inhibitory effect, which lays the foundation for further scientific and rational development and utilization of *Trollii Flos*.

**Key words:** *Trollii Flos*; total phenolic acid; response surface; antioxidation; tyrosinase; whitening

金莲花是毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花, 又名金芙蓉、旱地莲、金梅草、金疙瘩<sup>[1]</sup>。主要分布在我国山西省、河南省北部, 河北省西北部, 内蒙古自治区东部, 辽宁省和吉林省的西部。金莲花始载于《本草纲目拾遗》, 书中记载有金莲花“味滑苦, 无毒, 性寒”<sup>[2]</sup>。1977 年版《中华人民共和国药典》(一部) 最开始收录金莲花药材, 记

载其性味“苦, 微寒”, 功能主治为“抗菌消炎, 用于上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎、中耳炎、急性结膜炎、急性淋巴管炎”<sup>[3]</sup>。金莲花不仅被用作药材, 也被称作“塞外龙井”, 民间还有“宁品三朵花, 不饮二两茶”的说法, 冲泡后色泽如金, 口感清爽。长期饮用, 可清咽润喉、消暑祛火、提神醒脑, 是居家必备、待客、馈赠亲朋上佳之品。现代药理学研究表明金莲花具有多种生物活性, 如抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、解热镇痛等<sup>[4-6]</sup>, 其化学成分主要包括黄酮类, 酚酸类, 生物碱类等<sup>[7,8]</sup>。

通过查阅大量文献发现, 黄酮类成分在金莲花

收稿日期: 2023-01-09

接受日期: 2023-04-03

基金项目: 中国中医科学院中央本级重大增减支项目(2060302)

\* 通信作者 Tel: 86-013407126284; E-mail: hero0712@163.com,

zgh1227@sina.com

中含量比较高,目前国内对于金莲花有效成分的研究报道主要以黄酮类成分为主,有关金莲花酚酸类成分的报道相对较少,并且目前对于金莲花总酚酸提取工艺的研究更加罕见。然而,有研究发现金莲花酚酸类成分具有较高的生物利用度,机体对于金莲花酚酸类成分的吸收明显好于黄酮类<sup>[9,10]</sup>。近年来关于中药中总酚酸药理活性的研究报道越来越多,发现中药中总酚酸具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒等多方面的药理活性<sup>[11,12]</sup>。一些研究表明,作为天然的抗氧化剂,中药中的酚酸类化合物比普通膳用植物具有更强大的抗氧化活性<sup>[13]</sup>,同时也发现一些植物中总酚酸具有酪氨酸酶抑制的作用<sup>[14,15]</sup>。另外植物多酚由于其具有抗衰老、保湿等作用在化妆品方面应用较为广泛<sup>[16-18]</sup>。但是对于金莲花总酚酸美白活性的相关研究却鲜有报道。

因此,本试验首次采用响应面分析法中的 Box-Behnken Design (BBD) 实验对金莲花总酚酸的提取工艺进行优化,并对其体外抗氧化及酪氨酸酶抑制作用进行研究,为今后寻找金莲花美白活性物质及进一步科学合理开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

金莲花药材:亳州中药材市场;湖北惠海希康制药有限公司;安国中药材市场荷花池中药材市场,规格每袋 10g,经湖北中医药大学陈科力教授鉴定为毛茛科植物金莲花 (*Trollius chinensis* Bge.) 的干燥花。粉碎后过 60 目筛,备用;阿魏酸对照品(批号:110773-201614;纯度 $\geq 99\%$ )购于中国食品药品检定研究院;氯化钠(AR,批号:20160926)、十二烷基硫酸钠(化学纯,CP,批号:20181210)、抗坏血酸(AR,批号:20180928)、硫酸亚铁(AR,批号:20201203)、磷酸氢二钠(AR,批号:20180313)、磷酸二氢钠(AR,批号:20210908)、三氯化铁(AR,批号:20170701)均购于国药集团化学试剂有限公司;盐酸(AR):信阳市化学试剂厂;2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH,批号:D807297-250 mg)购于 MACKLIN;水杨酸(AR,批号:S104158-250 g,纯度:99.5%)、三氯乙酸(AR,10%,批号:A291706-500 mL)购于 Aladdin;铁氰化钾(分析纯,AR, $\geq 99.5\%$ )购于天津市大茂化学试剂厂;过氧化氢(AR, $H_2O_2$ , $\geq 30\%$ )购于武汉市洪山中南化工试剂有限公司;RP-MI-1640 完全培养基(批号:WHAA22D071-125 mL)购于 Procell;TritonX-100(批号:1903GB034-100 mL)

购于 GBCBIO Technologies;L-DOPA(批号:TX20468-100 g;纯度 $\geq 98.0\%$ )购于颖心实验室;胰酶购于 Cytiva;小鼠黑色素瘤细胞(B16-F10 细胞)购于 Procell。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 供试品溶液的制备

金莲花药材粉末(过 60 目筛)约 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中。精密加入 60% 乙醇 30 mL,在 70 °C 下回流 90 min 后得到提取液,经漏斗过滤后取 1 mL 滤液,加 60% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶,即得到所需供试品溶液。

#### 1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取阿魏酸对照品 4.29 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇使其溶解并定容至刻度,制得 0.171 6 mg/mL 的对照品溶液。

#### 1.2.3 紫外吸收波长的选择

分别吸取金莲花供试品溶液、阿魏酸对照品溶液各 1 mL,于 25 mL 容量瓶中。加 60% 乙醇至 5 mL,加 0.3% 十二烷基硫酸钠 2 mL,加 0.5%  $FeCl_3$ -1.0% 铁氰化钾(1:1)混合液 1 mL,摇匀,在暗处放置 5 min。再加 0.1 mol/L HCl 至刻度,摇匀,暗处放置 30 min。以 60% 乙醇代替样品液,并加显色剂作为参比液进行基线校正,于 200 ~ 800 nm 波长范围内进行全波长扫描<sup>[19,20]</sup>。最终选择 710 nm 为金莲花总酚酸的测定波长。

#### 1.2.4 方法学考察

##### 1.2.4.1 标准曲线的绘制

本实验采用三氯化铁-铁氰化钾比色法测定金莲花提取液中总酚酸的含量。精密吸取阿魏酸对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中。按“1.2.3”项下方法进行显色,并分别测定吸光度。以阿魏酸的浓度( $C$ ,  $\mu g/mL$ )为横坐标,以吸光度( $A$ )为纵坐标,绘制标准曲线。得到标准曲线方程: $A = 0.191 2C + 0.060 3$  ( $R^2 = 0.999 1$ ,  $n = 6$ ),结果表明阿魏酸对照品在 1.37 ~ 8.24  $\mu g/mL$  范围内线性关系良好。

##### 1.2.4.2 精密度的试验

精密吸取阿魏酸对照品溶液适量,按“1.2.3”项下方法测定吸光度,连续重复测定 6 次,结果吸光度 RSD 为 0.19% ( $n = 6$ )。表明仪器精密度高。

##### 1.2.4.3 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,按“1.2.3”项下方法显色后暗处放置并每隔 20 min 测定一次吸光度,结果吸光度 RSD 为 2.09% ( $n = 6$ )。表明供试品溶液

显色后在 120 min 内稳定。

#### 1.2.4.4 重复性试验

分别精密称取金莲花粉末 6 份,各 1.007 4 g,按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液后分别测定其吸光度,结果吸光度 RSD 为 1.46% ( $n=6$ )。表明此方法重复性良好。

#### 1.2.4.5 加样回收率试验

精密称取已测得含量的金莲花粉末 3 份,各 0.500 0 g,分别精密加入阿魏酸对照品 0.5 mL(即 0.085 8 mg),按“1.2.1”项下方法制备供试品溶液并测定其吸光度,结果平均回收率为 99.51%,RSD 为 2.31%,表明该方法准确度良好。

#### 1.2.5 单因素实验

采用单因素试验法,以金莲花中总酚酸得率为考察指标,分别考察乙醇浓度、回流时间、回流温度和液料比对金莲花中总酚酸得率的影响,按公式(1)计算金莲花总酚酸得率。

$$\text{总酚酸得率} = \frac{C \times V \times N}{M \times 1000} \quad (1)$$

式中,总酚酸得率单位为 mg/g,  $C$  为供试品溶液中总酚酸浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $V$  为提取液定容体积, mL;  $N$  为稀释倍数;  $M$  为金莲花质量, g。

##### 1.2.5.1 乙醇浓度的考察

固定回流温度为 70 °C,回流时间为 90 min,液料比为 30:1,分别选择乙醇浓度为 50%、60%、

70%、80%、90% 五个条件,并且每个条件重复 3 次实验,进而考察不同的乙醇浓度对金莲花总酚酸得率的影响。

##### 1.2.5.2 回流时间的考察

固定乙醇浓度为 60%,回流温度为 70 °C,液料比为 30:1,分别选择回流时间为 30、60、90、120、150 min 五个条件,并且每个条件重复 3 次实验,进而考察不同的回流时间对金莲花总酚酸得率的影响。

##### 1.2.5.3 回流温度的考察

固定乙醇浓度为 60%,回流时间为 90 min,液料比为 30:1,分别选择回流温度为 50、60、70、80、90 °C 这五个条件,并且每个条件重复 3 次实验,进而考察不同的回流温度对金莲花总酚酸得率的影响。

##### 1.2.5.4 液料比的考察

固定乙醇浓度为 60%,回流温度为 70 °C,回流时间为 90 min,分别选择液料比为 20、30、40、50、60 mL/g 五个条件,并且每个条件重复 3 次实验,进而考察不同的液料比对金莲花总酚酸得率的影响。

#### 1.2.6 响应面优化设计实验

在单因素实验的基础上,结合响应面中的 BBD 实验,以乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度为考察因素,以金莲花总酚酸得率为响应值,利用 Design Expert 10.0.7 软件优化金莲花总酚酸提取工艺。试验因素、水平见表 1。

表 1 实验因素及水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平 Level	因素 Factor			
	A 液料比 Liquid:solid ratio (mL/g)	B 乙醇浓度 Concentration of ethanol (%)	C 回流时间 Reflow time (min)	D 回流温度 Reflow temperature (°C)
-1	30:1	50	60	60
0	40:1	60	90	70
1	50:1	70	120	80

#### 1.2.7 金莲花总酚酸体外抗氧化活性研究

根据响应面优化所得的最佳提取工艺条件进行金莲花总酚酸抗氧化活性的评价。精密称取金莲花药材粉末适量,在最优工艺条件下提取金莲花总酚酸,将提取液依次稀释为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL 的溶液备用。

##### 1.2.7.1 金莲花总酚酸清除 DPPH 自由基活性能力的测定

参照 Wei 等<sup>[19]</sup>并略作改动,分别取上述不同质

量浓度的金莲花总酚酸提取液 2.0 mL 于 10 mL 试管中,然后加入浓度为 0.3 mmol/L 的 DPPH 的乙醇溶液 2.0 mL(现配现用),摇匀后室温避光静置 30 min 后于 517 nm 处测定吸光度,记为  $A_1$ ;取空白溶剂 2.0 mL 代替金莲花总酚酸提取液置于 10 mL 试管中,同法操作,测定吸光度,记为  $A_2$ ;另分别量取不同浓度提取液 2.0 mL,加入无水乙醇 2.0 mL 代替 DPPH 乙醇溶液,同法操作,测定吸光度,记为  $A_3$ 。采用抗坏血酸作为阳性对照同法操作,测定吸光度。以上

各组重复3次,按公式(2)计算其清除率。

$$\text{清除率} = \frac{1 - (A_1 - A_3)}{A_2} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.2.7.2 金莲花总酚酸的还原能力的测定

参照 Duan 等<sup>[20]</sup>并略作改动,取上述不同浓度的金莲花总酚酸提取液 2.0 mL 于 10 mL 的试管中,然后加入 0.2 mol/L pH 为 6.6 磷酸盐缓冲溶液 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾 2.5 mL,混匀,将试管于 50 °C 水浴锅中反应 20 min,加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL,摇匀后静置 30 min。吸取上清液 5 mL 于 15 mL 试管中,加入蒸馏水 4 mL 和 0.1% 三氯化铁 1 mL,混匀,在 700 nm 波长处测定其吸光度。以蒸馏水为空白,采用抗坏血酸作为阳性对照,同法操作,测定吸光度。以上各组重复 3 次。

### 1.2.7.3 金莲花总酚酸清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )的能力测定

参照 Li 等<sup>[21]</sup>并略作改动。取上述不同浓度的金莲花总酚酸提取液 2.0 mL 分别加入到试管中,分别依次加入 1 mL 9 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液,1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液,1 mL 6 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。充分混匀后在 37 °C 下水浴 30 min,在 510 nm 处测定吸光度为  $A_2$ 。同样的方法,用空白溶剂替代金莲花总酚酸提取液测得吸光度为  $A_0$ ;用蒸馏水代替  $\text{H}_2\text{O}_2$  测得吸光度为  $A_1$ 。同时采用抗坏血酸作为阳性对照同法操作,测定吸光度。以上各组重复 3 次,按公式(3)计算其清除率。

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{1 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

### 1.2.8 细胞培养

B16-F10 细胞采用 RPMI-1640 完全培养基培养,将细胞置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度环境的培养箱中,隔天换液一次,每 24 h 于倒置显微镜下观察细胞生长状态,当细胞贴壁生长至近融合状态时(铺满瓶底 80% ~ 90%),弃去培养液,用 PBS 洗 2 次,加入 1 mL 预温至 37 °C 的 0.25% 胰酶,于培养箱内进行消化反应 1 min,加培养液中中止消化。离心处理分离后,按 1:3 的体积比传代,每一次实验取自同一传代细胞<sup>[22]</sup>。

### 1.2.9 金莲花总酚酸对酪氨酸酶抑制作用研究

#### 1.2.9.1 CCK-8 法测定金莲花总酚酸对 B16-F10 细胞存活率的影响

收集对数生长期的细胞,按照细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板,每孔含培养液 100  $\mu\text{L}$ (空

白组不接种细胞)。在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度环境的培养箱中培养 24 h。用培养液将金莲花总酚酸提取物配制成 0.015、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL 质量浓度的工作液,0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤备用。吸去培养基,给药组加入 100  $\mu\text{L}$  各受试物工作液,对照组(normal control, NC)与空白组均添加不含药的空白培养基,每组设置 6 个重复孔。加药后在培养箱中继续培养 24 h,吸去培养基,用 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次后加入含有 CCK-8 的细胞培养液 100  $\mu\text{L}$ ,在培养箱中培养 1 h 后,用酶标仪在 450 nm 下读取吸光度值。按照公式(4)计算细胞存活率,空白孔中仅添加细胞培养液。

$$\text{细胞存活率} = \frac{OD_{\text{给药}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (4)$$

#### 1.2.9.2 B16-F10 细胞内酪氨酸酶活性

参考 Xia 等<sup>[23]</sup>采用多巴氧化法测定,取对数生长期的 B16-F10 细胞,按每孔  $1.0 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔培养板中(每孔 100  $\mu\text{L}$ ,空白组不接种细胞),置于培养箱中培养 24 h。实验分为对照组(NC)、不同浓度金莲花总酚酸组(0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 mg/mL),并用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤备用。弃除上清液,对照组(NC)和空白组加入空白培养液,给药组加入相应受试物工作液,每组设置 6 个复孔。作用 B16-F10 细胞 24 h 后弃上清液,用 PBS 清洗细胞 2 次后,每孔依次加入 100  $\mu\text{L}$  的 TritonX-100 溶液,在 -80 °C 温度下冻存 1 h,而后室温下使其融化裂解,每孔依次加 0.1% L-DOPA 100  $\mu\text{L}$ ,于 37 °C 孵育 2 h,置酶标仪下测定其在 490 nm 处 OD 值。按公式(5)计算细胞酪氨酸酶活性。

$$\text{细胞酪氨酸酶活性} = \frac{OD_{\text{给药}} - OD_{\text{空白}}}{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (5)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

#### 2.1.1 乙醇浓度对金莲花总酚酸得率的影响

由图 1 可知,乙醇浓度在 50% ~ 60% 范围内金莲花总酚酸得率逐渐增大,当乙醇浓度为 60% 时,金莲花总酚酸的得率最大。继续增大乙醇浓度时,金莲花总酚酸得率则呈下降趋势,原因可能是一些脂溶性、醇溶性杂质的溶出,从而降低了组织的通透性,导致总酚酸得率下降<sup>[10]</sup>。因此应该选择乙醇浓度为 60% 进行提取。

#### 2.1.2 回流时间对金莲花总酚酸得率的影响

由图 2 可见,回流时间对金莲花总酚酸的提取

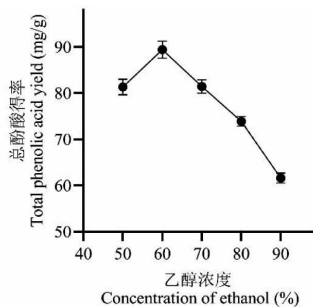


图1 乙醇浓度对总酚酸得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total phenolic acid

效果在 30 ~ 90 min 呈上升趋势,在 90 min 时,总酚酸的得率达到最高,然后呈下降趋势。这说明在 90 min 时金莲花总酚酸已提取完全,而随着总酚酸的长时间受热,可能部分酚酸被分解或氧化,使得其含量有所降低<sup>[15]</sup>。因此应该选择 90 min 进行提取。

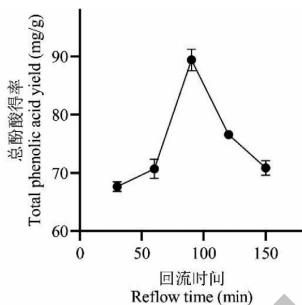


图2 回流时间对总酚酸得率的影响

Fig. 2 Effect of reflux time on extraction rate of total phenolic acid

### 2.1.3 回流温度对金莲花总酚酸得率的影响

由图 3 可知,随着提取温度的升高,金莲花总酚酸得率逐渐增大,可能因为温度升高,有利于溶质中酚酸类成分的扩散,使其更容易从原料中浸出。当温度为 70 °C 时,金莲花总酚酸的得率最高;继续升温时,金莲花总酚酸得率呈下降趋势,可能是由于高

温状态下总酚酸中某些成分结构被破坏,从而使其含量降低<sup>[23]</sup>。则应该选择 70 °C 进行回流提取。

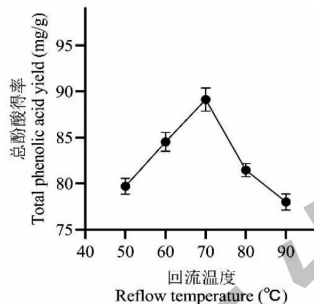


图3 回流温度对总酚酸得率的影响

Fig. 3 Effect of reflux temperature on extraction rate of total phenolic acid

### 2.1.4 液料比对金莲花总酚酸得率的影响

由图 4 可见,液料比对金莲花总酚酸得率的影响呈现出先上升再下降的趋势,当液料比为 40 mL/g 时金莲花总酚酸得率达到最高。因此应选择 40:1 的液料比进行提取。

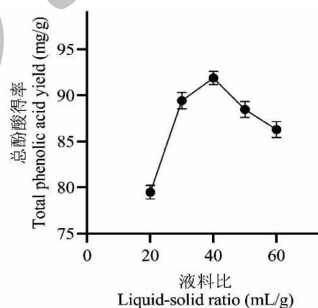


图4 液料比对总酚酸得率的影响

Fig. 4 Effect of liquid-solid ratio on extraction rate of total phenolic acid

## 2.2 响应面优化分析

### 2.2.1 响应面优化试验结果

以金莲花总酚酸得率作为响应值(Y),得到的响应面实验设计方案及结果如表 2 所示。

表 2 试验方案编码值和实验结果

Table 2 The coding value of the experimental scheme and the experimental results

实验号 No.	A	B	C	D	总酚酸得率 Yield of total phenolic acid (mg/g)
1	0	1	0	1	88.19
2	-1	0	1	0	76.21
3	0	0	0	0	91.34
4	-1	0	0	-1	84.53

续表 2(Continued Tab. 2)

实验号 No.	A	B	C	D	总酚酸得率 Yield of total phenolic acid(mg/g)
5	1	0	0	1	79.64
6	0	0	1	-1	84.54
7	0	-1	0	-1	86.92
8	0	0	0	0	92.62
9	0	-1	-1	0	78.18
10	-1	0	-1	0	70.73
11	0	0	0	0	91.20
12	0	1	1	0	80.72
13	-1	1	0	0	68.44
14	0	0	-1	-1	85.77
15	0	1	-1	0	73.82
16	1	0	-1	0	75.96
17	0	0	0	0	91.86
18	0	0	-1	1	81.58
19	1	0	0	-1	82.35
20	0	1	0	-1	87.97
21	1	-1	0	0	75.34
22	0	0	1	1	87.93
23	1	0	1	0	78.56
24	1	1	0	0	79.24
25	-1	0	0	1	81.32
26	0	0	0	0	89.53
27	-1	-1	0	0	81.94
28	0	-1	0	1	89.59
29	0	-1	1	0	75.34

### 2.2.2 模型建立与显著性检验

采用 Design-Expert 10.0.7 软件对表 2 所得数据进行回归分析,得到金莲花中总酚酸得率对液料比(A)乙醇浓度(B)、回流时间(C)、回流温度(D)

的回归模型方程为: $Y = 91.31 + 0.66A - 0.74B + 1.44C - 0.32D + 4.35AB - 0.72AC + 0.13AD + 2.43BC - 0.61BD + 1.90CD - 9.49A^2 - 5.56B^2 - 7.60C^2 + 1.27D^2$ 。模拟出回归模型方差分析表见表 3。

表 3 回归模型方差分析表  
Table 3 Analysis of variance of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	1 157.07	14	82.65	16.09	< 0.000 1	**
A	5.23	1	5.23	1.02	0.330 1	
B	6.65	1	6.65	1.29	0.274 4	
C	24.83	1	24.83	4.83	0.045 2	*
D	1.22	1	1.22	0.24	0.633 2	

续表 3(Continued Tab. 3)

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	显著性 Significance
<i>AB</i>	75.69	1	75.69	14.74	0.001 8	**
<i>AC</i>	2.07	1	2.07	0.40	0.535 4	
<i>AD</i>	0.063	1	0.063	0.012	0.913 7	
<i>BC</i>	23.72	1	23.72	4.62	0.049 6	*
<i>BD</i>	1.50	1	1.50	0.29	0.597 3	
<i>CD</i>	14.36	1	14.36	2.80	0.116 6	
<i>A</i> <sup>2</sup>	584.12	1	584.12	113.75	< 0.000 1	**
<i>B</i> <sup>2</sup>	200.58	1	200.58	39.06	< 0.000 1	**
<i>C</i> <sup>2</sup>	375.11	1	375.11	73.05	< 0.000 1	**
<i>D</i> <sup>2</sup>	10.45	1	10.45	2.03	0.175 7	
残差 Residual	71.89	14	5.14			
失拟项 Lack of fit	66.69	10	6.67	5.13	0.064 5	
纯误差 Pure error	5.20	4	1.30			
总回归 Cor total	1 228.96	28				

注: \* 显著( $P < 0.05$ ); \*\* 极显著( $P < 0.01$ )。

Note: \* Significant( $P < 0.05$ ); \*\* Very significant( $P < 0.01$ )。

从表 3 的回归模型方差分析可知,该回归模型的  $F = 16.09$ ,  $P < 0.000 1$ ,表明该模型极显著,只有 0.01% 的几率可能会由于噪声而产生如此大的  $F$  值。失拟项  $F = 5.13$ ,  $P = 0.064 5 > 0.05$ ,失拟项不显著,表明实验数据很好的适应了模型,实验设计可靠,适合二次回归方程。

另外,该模型的相关系数为  $R^2 = 0.941 5$ ,说明响应面值的变化有 94.15% 来自所选的变量,表明方程的拟合度较高,该模型完全可以反映金莲花总酚酸得率与料液比、乙醇浓度、回流时间以及回流温度之间的关系。回归模型中的信噪比 Adeq Precision  $> 4$  是可取的,本实验的 Adeq Precision = 12.766 表示该模型中的信号强度高,可以用这个模型来导航设计实验。

该回归模型中, $AB$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  这几项对金莲花总酚酸得率的影响达到极显著效应( $P < 0.01$ ); $C$ 、 $BC$  两项对金莲花总酚酸得率的影响达到显著效应( $P < 0.05$ ),其他几项对金莲花总酚酸得率的影响不显著( $P > 0.05$ )。从  $P$  值以及  $F$  值可以看出,4 个因素对金莲花总酚酸提取率的影响显著性大小顺序依次为: $C > B > A > D$ ,即回流时间  $>$  乙醇浓度  $>$  料液比  $>$  回流温度。

### 2.2.3 响应面交互作用分析

使用 Design-Expert 10.0.7 软件并根据回归方程绘制三维响应面图及等高线图(见图 5),通过观

察响应面的陡峭程度可直观地反映各因素之间的相互作用对金莲花总酚酸得率的影响,等高线图反映了两因素间交互作用的显著性。另外,还要结合方差分析表中的结果综合分析交互作用是否显著<sup>[19,21]</sup>。

结合方差分析结果可知,料液比与乙醇浓度的响应面斜面最陡,具有最高点,等高线呈椭圆形,说明两者交互作用最大,达到极显著水平( $P < 0.01$ );乙醇浓度与回流时间的交互作用次之,其响应面较陡,交互作用较明显,达到显著水平( $P < 0.05$ );料液比与回流时间、料液比与回流温度、乙醇浓度与回流温度以及回流时间与回流温度的响应面相对缓和,两因素的交互作用不显著( $P > 0.1$ )。

### 2.2.4 验证实验

通过响应面 Design-Expert 10.0.7 软件中回归模型得出所考察的四个因素最佳条件为:液料比为 40.566:1,乙醇浓度为 60.249%,回流时间为 88.786 min,回流温度为 60.187 °C,总酚酸含量预测值为 92.848 mg/g。考虑到实际的可操作性以及实验成本后确定金莲花总酚酸最佳提取工艺条件为:乙醇浓度为 60%,液料比为 40:1,回流时间为 90 min,回流温度为 60 °C。经 3 次重复验证,此条件下金莲花总酚酸的得率为 92.245 mg/g,与预测值接近,说明经响应面 BBD 实验优化的提取工艺条件是可行的。

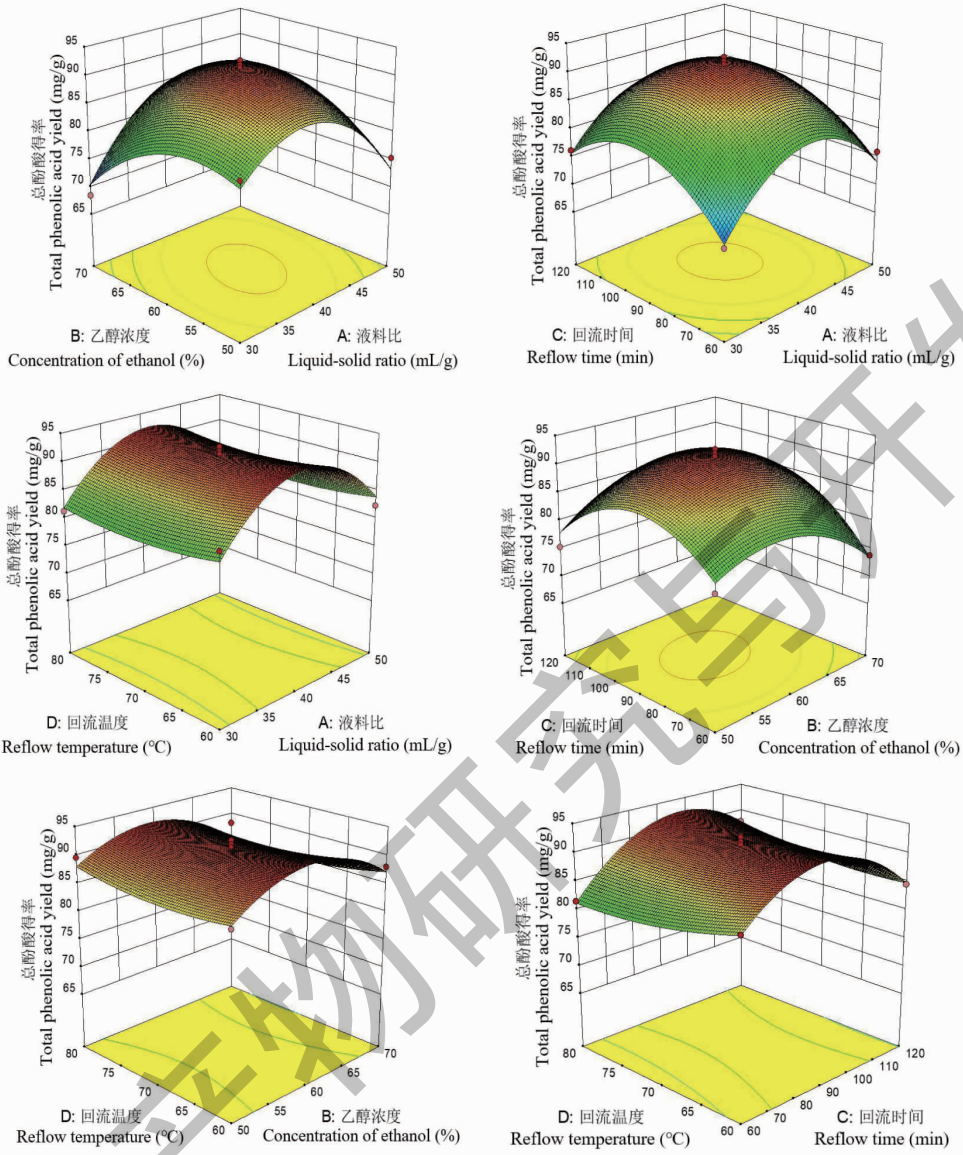


图5 各因素交互作用的响应面图

Fig. 5 Response surface of the interaction of various factors

### 2.3 金莲花总酚酸体外抗氧化活性研究

#### 2.3.1 金莲花总酚酸清除 DPPH 自由基活性的测定

由图6可知,随着金莲花中总酚酸浓度的不断增加,其对 DPPH 自由基的清除率不断增强,变化比较明显,并且清除能力略低于同浓度的抗坏血酸溶液。当金莲花总酚酸的浓度为 0.03 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率达到最大,为 89.04%。

#### 2.3.2 金莲花总酚酸的还原能力的测定

由图7可知,金莲花总酚酸和抗坏血酸的还原能力随着浓度的升高,其吸光度值逐渐增大,还原能力逐渐增加,并且略低于抗坏血酸的还原能力。

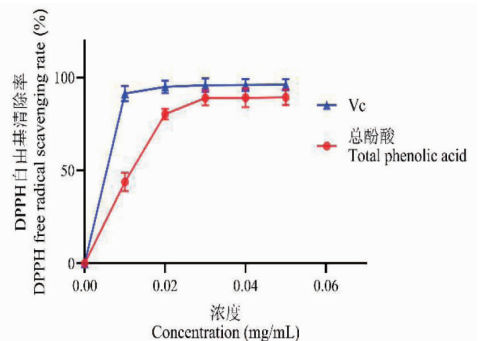


图6 金莲花总酚酸对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 6 Scavenging ability of total phenolic acid from Trollii Flos on DPPH free radicals



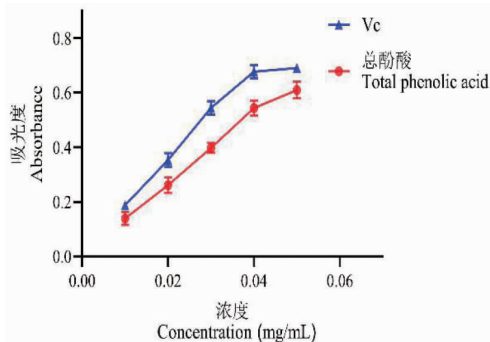


图7 金莲花总酚酸的还原能力

Fig. 7 Reduction ability of total phenolic acid from *Trollii Flos*

### 2.3.3 金莲花总酚酸清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )的能力测定

由图8可知,随着金莲花中总酚酸浓度的不断增加,其对羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )清除率逐渐增强,当金莲花中总酚酸浓度为0.05 mg/mL时,对 $\cdot\text{OH}$ 清除率达到最大,为21.7%。

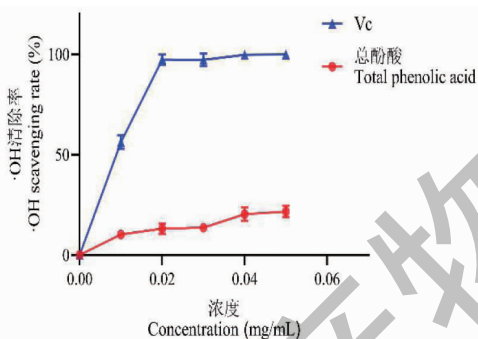


图8 金莲花总酚酸清除羟基自由基的能力

Fig. 8 The ability of total phenolic acid from *Trollii Flos* to scavenge hydroxyl radicals

## 2.4 金莲花总酚酸美白活性研究

### 2.4.1 对B16-F10细胞安全浓度的考察

不同质量浓度金莲花总酚酸对B16-F10细胞存活率的影响如图9所示。由图可知,当金莲花总酚酸浓度为0.5 mg/mL时,细胞存活率为80%以上,当浓度为1 mg/mL时,细胞存活率显著下降至80%以下。因此选用0.5 mg/mL及以下的质量浓度进行后续实验。

### 2.4.2 B16-F10细胞酪氨酸酶活性测定

由图10可知,与正常组相比,62.5~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的金莲花总酚酸可显著性地降低酪氨酸酶活性( $P < 0.05$ ),且具有一定的浓度依赖性。在浓度为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时金莲花总酚酸对B16-F10细胞酪氨酸

酶活性抑制率可达到28.49%。

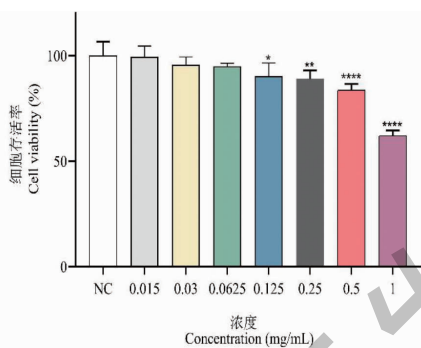


图9 不同质量浓度金莲花总酚酸对B16-F10细胞增殖的影响

Fig. 9 Effect of different mass concentrations of total phenolic acid from *Trollii Flos* on the proliferation of B16-F10 cells

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ,下同。Note: Compared with normal control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , the same below.

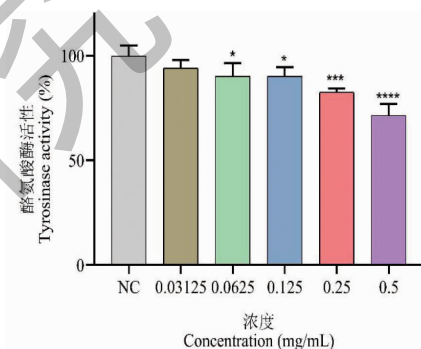


图10 不同浓度金莲花总酚酸对B16-F10细胞酪氨酸酶活性的影响

Fig. 10 Effect of different concentrations of total phenolic acid from *Trollii Flos* on tyrosinase activity in B16-F10 cells

## 3 讨论与结论

采用单因素实验考察乙醇回流法提取金莲花总酚酸,并结合响应面试验中的BBD实验优化得到的最佳提取工艺条件为:料液比为1:40,乙醇浓度为60%,回流时间为90 min,回流温度为60  $^{\circ}\text{C}$ ,此条件下金莲花总酚酸的得率可达到92.245 mg/g。该方法稳定可行,重复性好,也为金莲花总酚酸的进一步研究开发奠定了基础。体外抗氧化活性研究结果表明,在0.01~0.05 mg/mL的浓度范围内,金莲花总酚酸随着浓度增加,其对DPPH自由基、羟基自由基的清除能力逐渐增强,还原能力也逐渐增强,具有良好的体外抗氧化活性。细胞实验的结果显示,62.5~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 各浓度金莲花总酚酸实验组均能够显

著性地抑制酪氨酸酶活性,具有一定的美白潜力。以上研究为金莲花药材的综合开发利用提供了理论依据。

后续可以对金莲花总酚酸进行分离纯化,同时对其美白机制进行更加深入地研究,从而为金莲花相关美白产品的开发利用提供科学理论依据。

#### 参考文献

- Zhang F, Ma JB, Nie SH, et al. Discussion on artificial cultivation techniques of trollflower in Bashang area, Hebei province[J]. Hebei Forest Sci Technol(河北林业科技), 2021, 1:68-70.
- Zhao XM. Compendium of Materia Medica(本草纲目拾遗)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1957:39.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 1977:359.
- Cai HY, Liu HS, Zheng GH, et al. Advances in studies on chemical compositions of *Trollius chinensis* Bge. and their biological activities [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2021, 23:2340-2352.
- Sun P, Li XP, Xue T, et al. Research progress of pharmacological effects and clinical application of *Trollius chinensis* [J]. China Pharm(中国药房), 2022, 33:507-512.
- Ling JW, Wang MY, Olounfeh KM, et al. Network pharmacology-based identification of potential targets of the flower of *Trollius chinensis* Bunge acting on anti-inflammatory effects [J]. Sci Rep, 2019, 9:8109.
- Liu LJ, Hu XH, Guo LN, et al. Anti-inflammatory effect of the compounds from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31:1951-1957.
- Zhao DY. Study on chemical composition and biological activity of nasturtium[D]. Xiamen: Xiamen University(厦门大学), 2019.
- Liu LJ, Guo LN, Zhao C, et al. Characterization of the intestinal absorption of seven flavonoids from the flowers of *Trollius chinensis* using the Caco-2 cell monolayer model [J]. PLoS One, 2015, 10:e0119263.
- Wu XW, Wang RF, Liu LJ, et al. Absorbability, mechanism and structure-property relationship of three phenolic acid from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Molecules, 2014, 19:18129-18138.
- Peng KY, Gu JF, Su SL, et al. *Salvia miltiorrhiza* stems and leaves total phenolic acid combination with tanshinone protect against DSS-induced ulcerative colitis through inhibiting TLR4/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 264:113052.
- Zhao H, Jia JJ, Bai M, et al. Updated pharmacological effects of total phenolic acid on the meningeal microcirculation in mice [J]. J Health Eng, 2022, 2022:8441050.
- Chen JX. Study on structure-activity relationship and antioxidant mechanism of phenolic acid antioxidant activity [D]. Taiyuan: North University of China(中北大学), 2020.
- Xiong W, Wu T, Cao WW, et al. Effects of *in vitro* digestion on phenolic acid content and antioxidant activity of *Artemisia selengensis* Turcz leaves [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2020, 36:78-83.
- Song JZ, Li LJ, Sun P, et al. Study on the inhibition of *Salvia miltiorrhiza* total phenolic acid on tyrosinase and their mechanism [J]. Chin J Aesthetic Med(中国美容医学), 2015, 24:25-28.
- Davinelli S, Bertoglio JC, Polimeni A, et al. Cytoprotective polyphenols against chronological skin aging and cutaneous photodamage [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24:99-105.
- Fukagawa S, Haramizu S, Sasaoka S, et al. Coffee polyphenols extracted from green coffee beans improve skin properties and microcirculatory function [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81:1814-1822.
- Kim E, Hwang K, Lee J, et al. Skin protective effect of epigallocatechin gallate [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19:173.
- Wei Z, Lai HF, Peng LJ, et al. Extraction of total phenolic acid and antioxidant activity of red bluegrass optimized by response surface [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2020, 41:84-90.
- Duan JR, Yan GL, Yang H. Optimization of extraction process of total phenolic acid from *Viola philippica* by response surface methodology and study on its antioxidant activity [J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2020, 51:683-688.
- Li J, Gong LL, Wang G, et al. Optimization of extraction process of total phenolic acid from *Lonicera confusa* and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2020, 41:182-187.
- Zha YF, Huang JW, Zhan Y, et al. Evaluation of antioxidant and whitening efficacy of *Prunus mume* extract [J]. China Surfactant Deterg Cosmet(日用化学工业), 2022, 52:172-179.
- Xia Y, Zhang WZ, Huang Z, Qiu FM, et al. Study on the re-extraction process and whitening activity of *Curcuma wenyujin* dregs [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34:457-464.