

蔡铁全, 庞会娜, 黄意情, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化桔梗醇提工艺及醇提物美白活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 189–196. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110203

CAI Tiequan, PANG Huina, HUANG Yiqing, et al. Optimization of Alcohol Extraction Process of *Platycodon grandiflorum* by Box-Behnken Design-Response Surface Method and Analysis of Whitening Activity of Alcohol Extract[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(20): 189–196. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110203

· 工艺技术 ·

# Box-Behnken 设计-响应面法优化桔梗醇提工艺及醇提物美白活性分析

蔡铁全<sup>1</sup>, 庞会娜<sup>2</sup>, 黄意情<sup>2</sup>, 万志强<sup>2,\*</sup>, 严铭铭<sup>2,3,\*</sup>

(1.国家市场监督管理总局食品审评中心, 北京 100070;

2.长春中医药大学东北亚中医药研究院, 吉林长春 130117;

3.吉林省中药保健食品科技创新中心, 吉林长春 130117)

**摘要:** 利用响应面法优化桔梗醇提工艺, 并考察其美白活性。以提取时间、提取次数、溶媒量为影响因素, 采用单因素考察和 Box-Behnken 响应面设计试验, 优化桔梗醇提工艺; 以酶抑制活性和抗氧化为指标考察提取物的美白活性。结果表明, 桔梗的最佳乙醇提取工艺为提取次数 3 次, 提取时间 1 h, 溶媒量 8 倍, 该条件下制备的桔梗醇提物中桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷的提取率分别为 0.122%±0.003%、0.128%±0.005%、0.582%±0.007%, 且具有良好的酪氨酸酶抑制活性 (92.39%)、透明质酸酶抑制活性 (88.26%)、细胞黑色素抑制效果及自由基 DPPH (90.19%) 和 ABTS<sup>+</sup> (80.57%) 清除活性。优化的桔梗醇提工艺稳定可靠, 可操作性好, 该工艺提取的桔梗醇提物具有良好的美白和抗氧化活性, 为进一步研究桔梗生物活性及美白机制提供科学依据。

**关键词:** 桔梗, 醇提物, 提取工艺, 酪氨酸酶, 透明质酸酶, 黑色素

中图分类号: TS251.5

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)20-0189-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110203

本文网刊:



## Optimization of Alcohol Extraction Process of *Platycodon grandiflorum* by Box-Behnken Design-Response Surface Method and Analysis of Whitening Activity of Alcohol Extract

CAI Tiequan<sup>1</sup>, PANG Huina<sup>2</sup>, HUANG Yiqing<sup>2</sup>, WAN Zhiqiang<sup>2,\*</sup>, YAN Mingming<sup>2,3,\*</sup>

(1. Food Evaluation Center of the State Administration of Market Supervision and Administration, Beijing 100070, China;

2. Northeast Asia Institute of Chinese Medicine, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

3. Provincial Health Food Science and Technology Innovation Center, Changchun 130117, China)

**Abstract:** To optimize the alcohol extraction process of *Platycodon grandiflorum* by response surface methodology, then investigate its whitening activity. With extracting time, extracting times and solvent volume as factors, the ethanol extraction process of *Platycodon grandiflorum* was optimized by single factor investigation and Box-Behnken response surface design. The optimal ethanol extracting technology was 8 times of solvent, extraction for 3 times, 1 h each time. The extraction rates of platycodon D, arbutin, and total saponins in the ethanol extract were 0.122%±0.003%, 0.128%±0.005%, and 0.582%±0.007%, respectively, and the extract had good tyrosinase inhibition activity (92.39%), hyaluronidase

收稿日期: 2022-11-17

基金项目: 吉林省科技创新中心建设与发展项目 (YD ZJ202102CXJD 060); 长春中医药大学省级大学生创新创业训练计划项目 (S202210199074)。

作者简介: 蔡铁全 (1976-), 男, 本科, 副主任药师, 研究方向: 从事保健食品安全性研究, E-mail: 386759102@qq.com。

\* 通信作者: 万志强 (1984-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药有效成分与应用开发, E-mail: 155055699@qq.com。

严铭铭 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 具有重要生物活性天然先导结构的发现与研究, 创制新药的应用基础和应用开发研究, E-mail: yanmm595@126.com。

inhibition activity (88.26%), cell melanin inhibition effect, and DPPH· (90.19%), ABTS<sup>+</sup> (80.57%) free radical scavenging activity. The optimal ethanol extraction process of *Platycodon grandiflorum* was stable, reliable and operable. The ethanol extract had good whitening and antioxidant activity, which would provide scientific basis for further research on biological activity and whitening mechanism of *Platycodon grandiflorum*.

**Key words:** *Platycodon grandiflorum*; alcohol extract; extraction process; tyrosinase; hyaluronidase; melanin

桔梗为桔梗科植物桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC.)的干燥根,始载于《神农本草经》,被列为下品<sup>[1-2]</sup>,具有利咽,宣肺<sup>[3-4]</sup>,祛痰<sup>[5]</sup>,排脓等功效,为我国卫生部批准的药食兼用中药材之一<sup>[6]</sup>。现代研究表明,桔梗的化学成分主要包括皂苷类<sup>[7]</sup>、黄酮类<sup>[8]</sup>、脂肪油、脂肪酸<sup>[9]</sup>、无机元素<sup>[10]</sup>等成分,具有抗氧化<sup>[11]</sup>、降血糖<sup>[12]</sup>、抗肿瘤<sup>[13]</sup>等生物活性。经查阅文献可知,近年来桔梗研究主要集中在抗肿瘤、心血管保护及提高人体免疫力方面<sup>[14]</sup>,而在桔梗美白活性方面的研究上,除本课题组前期研究外并未见其相应的研究。

人体的皮肤颜色除了受遗传因素的影响外,还会受到外界因素的影响,如紫外线、光照时间、海拔等,而这些因素就是造成肤色差异的原因。自古以来,中国女性就有对美的追求,所以对色素沉着、雀斑等皮肤问题也越来越重视,从而使美白成为人们生活中不可或缺的一部分<sup>[15]</sup>。传统的美白剂(氢醌、铅粉等)细胞毒性大,副作用较强,已经无法满足现代人追求美白所要求的安全、滋润、温和等条件,同时“致癌”事件屡发也让人们对美白产品安全性的担忧日益增加。随着美白保健品的研究与开发,发现从植物中提取的活性成分更具有安全、高效的特性,其作为美白保健产品的有效组分深入人心。如今,研发更多天然植物原料已是美白保健品领域研究的热点之一<sup>[16-17]</sup>。

我国作为桔梗生产大国,在桔梗美白保健品的研发方面具有很大上升空间,因此,从桔梗中寻找和提取功能性物质对桔梗美白保健品的研究与开发具有重要意义。因此,本实验以酶抑制活性和抗氧化为考察指标,优化桔梗醇提工艺,探究桔梗醇提物体外美白功效,为其进一步研究提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

桔梗药材(批号: C359180401b) 吉林省仙草医药药材有限公司,经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC.的干燥根; B16F10 小鼠黑色素瘤细胞

中国上海生物科学研究所细胞资源中心; 桔梗皂苷 D 标准品(批号: 24588-201708)、熊果苷对照品(批号: 21402-201823)、桔梗对照药材(批号: 121028-201612) 中国食品药品检定研究院; 氢氧化钠、DPPH·、ABTS<sup>+</sup>、过二硫酸钾、乙酰丙酮、埃尔利希国药集团化学试剂有限公司; 酪氨酸酶( $\geq 500$  U/mg)、L-酪氨酸、透明质酸酶(400~1000 U/mg)、透明质酸

钠 北京索莱宝科技有限公司。

ALB-224 万分之一分析天平、AB265-S 十万分之一分析天平 赛多利斯科学仪器有限公司; KQ-250 超声波清洗器 昆山市仪器有限公司; HX-400A 高速中药粉碎机 浙江省永康市溪岸五金药具厂; LC-2010AHT 高效液相色谱仪 日本岛津公司; ELSD 6000 蒸发光散射检测器 Alltech CHROM Thermo; DZTW 电子调温电热套 北京市永光明医疗仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 桔梗醇提物的制备 将桔梗药材进行粉碎,过 65 目,称取适量药粉,加 8 倍量的 95% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,浓缩至浸膏,80 ℃ 干燥,粉碎,过 80 目,即得桔梗醇提物(PGE-ME5)<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.2 指标的测定

1.2.2.1 桔梗总皂苷提取率的测定 参考但汉龙等<sup>[19]</sup>的方法,稍作修改,分别吸取 0.5 mg/mL 的桔梗皂苷 D 对照品 0、0.2、0.4、0.6、1.2、1.4 mL,挥干后,首先加入 0.2 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液,然后加入 0.8 mL 的高氯酸,混匀之后于水浴中以 60 ℃ 的温度加热 15 min,放冷后加入冰醋酸 5 mL 震荡混匀后,于 550 nm 处测定其吸光度值并记录。将桔梗皂苷 D 取样量的质量和吸光度值分别作为横坐标和纵坐标,所得到的标准曲线为  $Y=0.0016X+0.0148$ ,  $R^2=0.9992$ 。精密配制 1.0 mg/mL 的桔梗醇提物,按照上述方法进行测定,桔梗总皂苷提取率的计算公式如下:

$$\text{桔梗总皂苷提取率}(\%) = \frac{Y - 0.0148}{0.0016m} \times 100$$

式中: Y 为样品的吸光度值; m 为所测样品对应药材的质量,mg。

1.2.2.2 桔梗皂苷 D 提取率的测定 桔梗皂苷 D 提取方法按 2015 年版《中国药典》项下方法提取,测定前过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜,采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法对其进行测定,选用反向 C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm),选用乙腈和水作为流动相,以 1.0 mL/min 流速进行等度洗脱,流动相乙腈:水的比例为 25:75,蒸发光散色检测器的温度是 103.8 ℃,气体流量为 2.8 L/min。对照品溶液进样量为 5、10  $\mu\text{L}$ ,供试品溶液进样量为 15  $\mu\text{L}$ ,采用外标两点法对数方程进行计算<sup>[18]</sup>,所得标准曲线为  $Y=2.8978X+13.362$ ,  $R^2=0.9994$ ,桔梗皂苷 D 的提取

率计算公式如下:

$$\text{桔梗皂苷D提取率}(\%) = \frac{Y - 13.362}{2.8978m} \times 100$$

式中: Y 为样品的吸光度值, m 为所测样品对应药材的质量, mg。

1.2.2.3 熊果苷提取率的测定 精密称取 0.5 g 桔梗醇提物于具塞锥形瓶中, 加甲醇提取溶剂 10 mL, 称重, 超声 30 min 进行提取, 放至室温后补足失重, 含量测定前过 0.45 μm 有机滤膜, 选用反向 C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm), 采用 HPLC-ELSD 法测定熊果苷单体, 以乙腈和 0.1% 甲酸水作为流动相(乙腈: 0.1% 甲酸水=5:95), 以 0.8 mL/min 的流速等度洗脱, 蒸发光散色检测器的温度为 105 ℃, 气体流量是 2.8 L/min。对照品溶液进样量为 5、10 μL, 供试品溶液进样量为 15 μL, 采用外标两点法对数方程计算<sup>[18]</sup>, 所得标准曲线为 Y=4.3033X+12.762, R<sup>2</sup>=0.9996, 熊果苷的提取率计算公式如下:

$$\text{熊果苷提取率}(\%) = \frac{Y - 12.762}{4.3033m} \times 100$$

式中: Y 为样品的吸光度值, m 为所测样品对应药材的质量, mg。

1.2.3 单因素实验 溶媒量 8 倍, 提取时间 1 h, 提取次数 3 次作为固定的反应条件, 选择提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h)、提取次数(1、2、3、4 次)、溶媒量(6、7、8、9、10 倍)进行单因素实验, 平行 3 次, 考察其对桔梗总皂苷、桔梗皂苷 D、熊果苷的提取率的影响。

1.2.4 响应面设计试验 根据单因素实验结果, 以提取次数(A)、提取时间(B)、溶媒量(C)为影响因素, 以桔梗总皂苷、桔梗皂苷 D、熊果苷的提取率为综合评分(综合评分=(30%×桔梗皂苷 D 提取率/桔梗皂苷 D 提取率最大值+30%×熊果苷提取率/熊果苷提取率最大值+40%×桔梗总皂苷提取率/桔梗总皂苷提取率最大值)×100)作为评价指标(Y), 用 Box-Behnken 进行响应面试验设计<sup>[20-23]</sup>, 因素水平见表 1。

表 1 响应面试验因素水平设计  
Table 1 Response surface test factor level design

| 水平 | 因素         |            |           |
|----|------------|------------|-----------|
|    | A: 提取次数(次) | B: 提取时间(h) | C: 溶媒量(倍) |
| -1 | 2          | 0.5        | 7         |
| 0  | 3          | 1.0        | 8         |
| 1  | 4          | 1.5        | 9         |

1.2.5 桔梗醇提物美白活性研究

1.2.5.1 酪氨酸酶活性抑制实验 根据文献修改如下<sup>[24]</sup>, 用磷酸缓冲溶液将待测样品和熊果苷配制成质量浓度为 3.125、6.25、12.5、18.75、25 mg/mL 的溶液备用, 在 96 孔板中设置 240 μL 总反应体系(见表 2), 按照表 2 数据将试剂依次加入, 震荡混匀后, 37 ℃ 水浴中反应 20 min 后, 于 475 nm 下测定吸光度, 酪

氨酸酶抑制率计算公式如下:

$$\text{酪氨酸酶抑制率}(\%) = [(A-B)/(C-D)]/(A-B) \times 100$$

式中: A: 等量缓冲液代替样品溶液的吸光度; B: 等量缓冲液代替样品溶液和酪氨酸酶溶液的吸光度; C: 样品溶液吸光度; D: 等量缓冲液代替酪氨酸酶溶液的吸光度。

表 2 酪氨酸酶催化反应体系(μL)  
Table 2 Tyrosinase catalytic reaction system (μL)

| 试剂                 | A   | B   | C   | D   |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|
| 25 mmol pH6.8磷酸缓冲液 | 80  | 120 | 40  | 80  |
| 0.5 mg/mL L-酪氨酸    | 120 | 120 | 120 | 120 |
| 样品溶液               | -   | -   | 40  | 40  |
| 50 U/mL酪氨酸酶溶液      | 40  | -   | 40  | -   |

1.2.5.2 透明质酸酶活性抑制实验 采用 Elson-Morgan 法进行透明质酸酶体外抑制实验, 用 pH5.6 的醋酸缓冲溶液配置透明质酸钠(0.5 mg/mL)、透明质酸酶(600 U/mL)及待测样品(3.125、6.25、12.5、18.75、25 mg/mL)溶液待用, 将 0.2 mL CaCl<sub>2</sub> 溶液与 0.5 mL 的透明质酸酶溶液混匀后于 37 ℃ 下孵育 20 min, 然后加入待测样品溶液 0.5 mL, 37 ℃ 下孵育 20 min, 加入 0.5 mL 的透明质酸钠溶液 37 ℃ 孵育 30 min, 取出后加入 0.1 mL 的 NaOH, 冰水浴中冷却 8 min, 加入 0.1 mL 的埃尔利希, 常温下放置 20 min 后, 于 555 nm 下测定吸光度<sup>[18]</sup>。透明质酸酶抑制率计算公式如下:

$$\text{透明质酸酶抑制率}(\%) = [(A-B)/(C-D)]/(A-B) \times 100$$

式中: A: 醋酸缓冲液代替样品的吸光度; B: 醋酸缓冲液代替样品和透明质酸酶的吸光度; C: 样品吸光度; D: 醋酸缓冲液代替透明质酸酶的吸光度。

1.2.5.3 细胞黑色素生成抑制活性 将 B16F10 黑色素瘤细胞接种到 24 孔的培养板中, 每个孔的细胞个数为 1×10<sup>4</sup> 个, 细胞贴壁后, 加入 α-黑素细胞刺激激素(100 nmol/L α-MSH)继续培养 48 h, 然后加入不同浓度(100、150、200 μg/mL)的 PGE-ME5 提取物和熊果苷, 分别培养 24、48、72 h, 每组 5 个复孔, 给药时间结束后, 去除培养基, 用 PBS(pH7.2)洗涤细胞两次, 加入 200 μL 含有 1% tritonx-100 的 PBS, 通过冷冻和解冻使细胞破裂。以 12000 r/min 离心 30 min 后去除上清液, 在细胞颗粒中加入 300 μL 含 10% 二甲基亚砜的 1 mol/L NaOH, 在 80 ℃ 下反应 2 h 以溶解细胞的黑色素<sup>[25]</sup>, 使用酶标仪在 450 nm 处测量溶解的色素的吸光度值。

$$\text{黑色素抑制率}(\%) = (\text{给药组 } A_{450} - \text{空白组 } A_{450}) / (\text{对照组 } A_{450} - \text{空白组 } A_{450}) \times 100$$

1.2.6 桔梗醇提物体外抗氧化活性研究

1.2.6.1 DPPH 自由基清除能力测定 根据文献 [26] 修改如下: 将配制好的桔梗醇提物溶液 2 mL 加入

到 2 mL 0.004% 的 DPPH 溶液中, 涡旋, 避光反应 30 min 后, 于 517 nm 下测定吸光度值  $A_1$ ; 以等量乙醇溶液代替 DPPH 溶液, 得吸光度值  $A_2$ ; 以等量蒸馏水代替样品溶液作为空白对照, 得吸光度值  $A_0$ 。以  $V_C$  作为阳性对照。按下列公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100$$

1.2.6.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力测定 根据文献 [27] 修改如下: 使用 pH7.4 PBS 缓冲溶液对 ABTS<sup>+</sup> 工作液进行稀释, 使其在 734 nm 处的吸光度值范围在 0.5~0.9 之间即可; 取 10  $\mu\text{L}$  桔梗醇提物样品溶液与 0.2 mL ABTS<sup>+</sup> 工作液进行混合, 室温下避光反应 6 min, 于 734 nm 波长测定吸光度, 以  $V_C$  为阳性对照, 按下列公式计算:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

式中:  $A_1$ : 样品+ABTS<sup>+</sup>测得的吸光度值;  $A_0$ : PBS+ABTS<sup>+</sup>测得的吸光度值。

### 1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次, 采用 Origin 2019 和 Design-Expert V8.0.6 进行实验数据分析及图像绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取次数对桔梗醇提物桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷提取率的影响 结果如图 1 所示, 桔梗美白活性提取物中桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷的提取率的高低与提取次数有关, 随着提取次数的增加, 各指标性成分的提取率呈现先升高后趋于平缓的趋势, 当提取次数小于 3 时, 各指标性成分随着提取次数的增加, 其提取率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 当提取次数达到 3 次时, 桔梗总皂苷的提取率基本达到最高值。其原因可能是当提取次数较低时, 各指标性成分并未完全溶出, 因此当提高提取次数时, 目标提取物的提取率则会相应的提高, 当提取次数达到一定值时, 各指标性成分的提取率会达到最高值, 因此再增加提取次数时, 各个指标成分的提取率将增加不明显。考虑到当提取次数达到 3 时, 桔梗皂苷 D 和熊果苷的提取率并未达到最高值, 因此选择 2、3、4 次进行响应面优化分析。

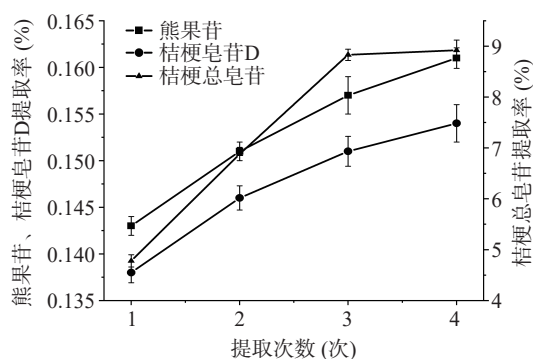


图 1 提取次数对桔梗醇提物各指标成分提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction times on extraction rate of each index component of *Platycodon grandiflorum* ethanol extract

2.1.2 提取时间对桔梗醇提物桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷提取率的影响 提取时间是影响各指标性成分提取率的关键因素之一, 充足的提取时间有利于各指标性成分的溶出。结果如图 2 所示, 桔梗醇提取物中, 桔梗皂苷 D 和熊果苷的提取率在测定时间内 (0.5~2.5 h) 变化不显著 ( $P > 0.05$ ), 当提取时间在 0.5~1.0 h 时, 桔梗总皂苷的提取率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而当提取时间到达 1.0~2.5 h 时, 桔梗总皂苷的提取率基本保持不变, 其原因可能是随着时间的进一步增加, 溶解度达到饱和时, 桔梗总皂苷不再被溶解, 提取率不再有明显提高 [28]。因此选择 0.5、1.0、1.5 h 进行响应面优化分析。

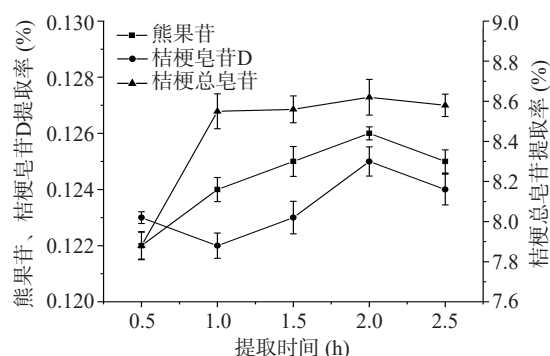


图 2 提取时间对桔梗醇提物各指标成分提取率的影响  
Fig.2 Effect of extraction time on extraction rate of each index component of *Platycodon grandiflorum* ethanol extract

2.1.3 溶媒量对桔梗醇提物桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷提取率的影响 溶媒量是影响细胞内外渗透压的主要因素, 适当的溶媒量对各指标性成分的溶出是有利的, 还可以节约提取溶液 [29]。从图 3 中可以看出, 当溶媒量为 6 倍时, 桔梗总皂苷的提取率明显较低, 而后随着溶媒量的增加各指标性成分的提取率有了一定的提高, 其中当溶媒量由 6 提高到 8 时, 桔梗总皂苷的提取率显著升高 ( $P < 0.01$ )。这是因为适当增大溶媒量, 能扩大指标性成分在桔梗内外的浓度差, 有利于指标性成分的溶出, 但溶媒量对于各指标性成分溶出的增强效应也是有一定的界限的, 因此当达到一定的溶媒量时, 再继续提高溶媒量也不会显

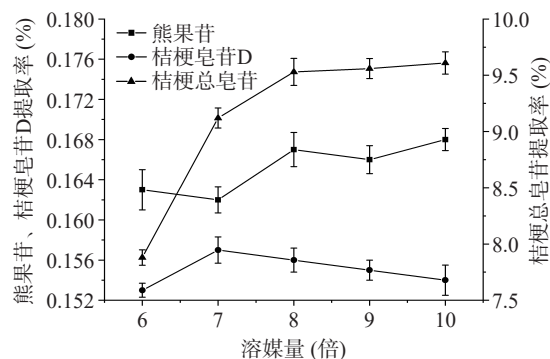


图 3 溶媒量对桔梗醇提物各指标成分提取率的影响

Fig.3 Effect of solvent amount on extraction rate of each index component of *Platycodon grandiflorum* ethanol extract

著地增加指标性成分的提取率<sup>[30]</sup>。因此选择 7、8、9 倍进行响应面优化分析。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 回归模型的建立与数据分析 在单因素实验基础上, 根据单因素实验结果, 以提取次数(A)、提取时间(B)、溶媒量(C)为影响因素, 以桔梗总皂苷、桔梗皂苷 D、熊果苷提取率的综合评分(Y)为响应值, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 3 因素 3 水平共 17 个试验设计, 结果如表 3 所示, 得到关于提取次数(A)、提取时间(B)和溶媒量(C)综合评分的二元多项回归方程:  $Y=9.68-0.08A-0.036B+0.32C-2.50E-0.3AB+0.023AC-0.015BC-0.95A^2-0.44B^2-0.27C^2$ 。

表 3 Box-Behnken 响应面试验设计与结果

Table 3 Box-Behnken response surface test design and results

| 实验号 | A  | B  | C  | 综合评分  |
|-----|----|----|----|-------|
| 1   | -1 | -1 | 0  | 79.71 |
| 2   | 0  | 1  | 1  | 87.69 |
| 3   | 0  | 0  | 0  | 91.49 |
| 4   | -1 | 0  | -1 | 78.47 |
| 5   | 0  | -1 | 1  | 88.73 |
| 6   | 0  | 0  | 0  | 92.44 |
| 7   | 0  | 1  | -1 | 82.08 |
| 8   | 1  | 0  | -1 | 76.19 |
| 9   | -1 | 1  | 0  | 79.14 |
| 10  | 0  | 0  | 0  | 93.48 |
| 11  | 0  | 0  | 0  | 91.39 |
| 12  | 1  | -1 | 0  | 78.57 |
| 13  | 0  | 0  | 0  | 91.20 |
| 14  | 1  | 0  | 1  | 82.75 |
| 15  | 0  | -1 | -1 | 82.56 |
| 16  | -1 | 0  | 1  | 84.17 |
| 17  | 1  | 1  | 0  | 77.90 |

对所得实验数据模型进行方差分析, 结果如表 4 所示。结果表明, 本模型的  $F$  值为 110.73,  $P<0.0001$ , 模型显著; 失拟项  $F$  值为 0.095,  $P$  值为 0.9591 $>0.05$ , 失拟不显著; 模型的调整决定系数  $R^2_{adj}$  值为 0.9158, 拟合度较高, 表明本模型对综合评分进行的分析和预

表 4 二次回归模型方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis of quadratic regression model

| 方差来源           | 平方和      | 自由度 | 均方        | $F$ 值    | $P$ 值   |
|----------------|----------|-----|-----------|----------|---------|
| 模型             | 6.18     | 9   | 0.69      | 110.73   | <0.0001 |
| A              | 0.051    | 1   | 0.051     | 8.26     | 0.0239  |
| B              | 0.011    | 1   | 0.011     | 1.7      | 0.2341  |
| C              | 0.8      | 1   | 0.8       | 129.07   | <0.0001 |
| AB             | 0.000025 | 1   | 0.000025  | 0.004033 | 0.9511  |
| AC             | 0.002025 | 1   | 0.002025  | 0.33     | 0.5855  |
| BC             | 0.0009   | 1   | 0.0009    | 0.15     | 0.7145  |
| A <sup>2</sup> | 3.8      | 1   | 3.8       | 612.33   | <0.0001 |
| B <sup>2</sup> | 0.8      | 1   | 0.8       | 129.71   | <0.0001 |
| C <sup>2</sup> | 0.31     | 1   | 0.31      | 50.25    | 0.0002  |
| 残差             | 0.043    | 7   | 0.006199  |          |         |
| 失拟项            | 0.002875 | 3   | 0.0009583 | 0.095    | 0.9591  |
| 纯误差            | 0.041    | 4   | 0.01      |          |         |
| 总离差            | 6.22     | 16  | 1         |          |         |

测是准确有效的。由回归模型和方差分析可知, 方程一次项 A、C 对综合评分的影响达到显著水平( $P<0.05$ ); 方程二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对综合评分的影响达到极显著水平( $P<0.01$ ), 而 AB、AC、BC 之间的交互作用对综合评分的影响并不显著, 根据  $F$  值可知, 各因素对综合评分影响的大小顺序为: C(溶媒量) $>$ A(提取次数) $>$ B(提取时间)。

2.2.2 验证实验 运用 Design-Expert V8.0.6 软件对模型进行解析, 得到了一组桔梗醇提物的最佳提取条件: 提取次数 2.96 次, 提取时间 0.97 h, 溶媒量 8.58 倍。根据工业化生产等实际情况进行调整, 最终确定的最佳工艺参数为: 提取次数 3 次, 提取时间 1 h, 溶媒量 8 倍。按照上述优选提取工艺参数制备的提取物作为桔梗最佳美白活性提取物(PGE-ME5)。通过三次平行验证实验得, PGE-ME5 中桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷的提取率, 与预测值相差不大, 指标性成分桔梗皂苷 D、熊果苷、桔梗总皂苷的提取率分别为  $0.122\%\pm0.003\%$ 、 $0.128\%\pm0.005\%$ 、 $0.582\%\pm0.007\%$ , 表明工艺合理稳定, 可为后续相关规模化生产奠定基础。

2.3 PGE-ME5 美白活性实验结果

2.3.1 对酪氨酸酶及透明质酸酶的抑制结果 熊果苷是常见的美白剂, 它通过竞争性抑制人类酪氨酸酶活性而减少色素沉着, 在研究中常用作阳性对照<sup>[31]</sup>, PGE-ME5 对酪氨酸酶及透明质酸酶的抑制效果如图 4 所示, 实验结果表明, 随着 PGE-ME5 的浓度升高, 其对酪氨酸酶及透明质酸酶的抑制率呈上升的趋势, 与阳性药熊果苷相比, 当给药浓度为 18.75 mg/mL

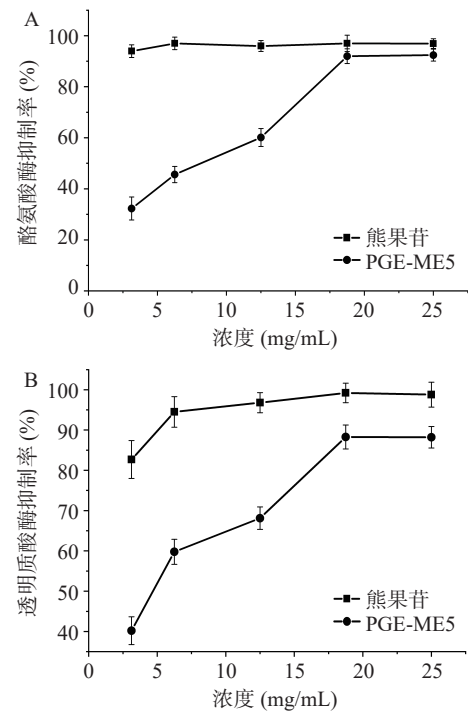


图 4 PGE-ME5 对酪氨酸酶及透明质酸酶抑制率  
Fig.4 Inhibition rate of PGE-ME5 on tyrosinase and hyaluronidase

时,其抑制效果相当,抑制率分别为92.39%、88.26%,其原因可能是PGE-ME5中含有多种美白活性成分(熊果苷、桔梗总皂苷等),因此表现出良好的美白活性。

**2.3.2 抑制细胞黑色素结果** 与空白对照组比较,以100 nmol/L  $\alpha$ -MSH刺激的B16F10细胞(对照组)的黑色素含量明显高于未刺激的细胞,表明造模成功;随着PGE-ME5提取物浓度的增加,使 $\alpha$ -MSH刺激的B16F10细胞中黑色素含量呈剂量依赖性显著减少。当给药时间为48 h时, $\alpha$ -MSH刺激的B16F10细胞中黑色素生成抑制效果最佳,结果见图5。

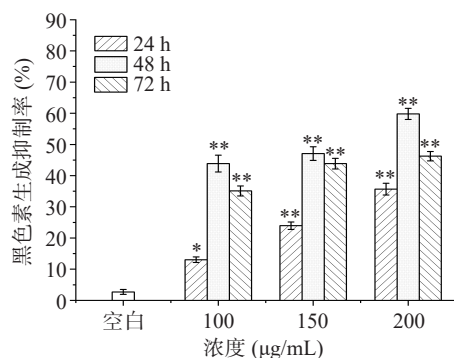


图5 PGE-ME5对细胞黑色素的抑制率

Fig.5 Inhibition rate of PGE-ME5 on cell melanin

注: \*表示与空白组相比差异具有统计学意义 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )。

## 2.4 PGE-ME5体外抗氧化活性实验结果

PGE-ME5对DPPH·、ABTS<sup>+</sup>自由基清除效果如图6所示,实验结果表明,随着PGE-ME5的浓度升高,其对DPPH·及ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率呈上升

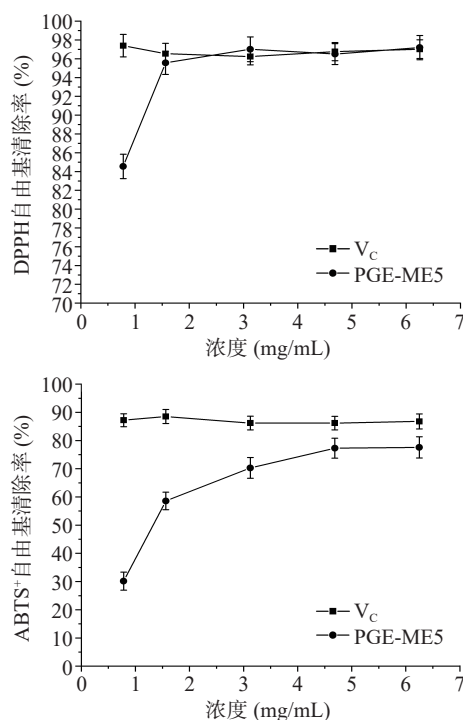


图6 PGE-ME5对DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力

Fig.6 Scavenging ability of PGE-ME5 to DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radicals

的趋势,与阳性药V<sub>C</sub>相比,其抑制效果相当,当给药浓度达到3.13 mg/mL时,对DPPH自由基的清除率达到最高值为97.19%,当给药浓度达到4.69 mg/mL时,对ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率达到最高值为80.57%,该实验结果表明PGE-ME5具有良好的抗氧化活性。

## 3 结论

本研究利用响应面法对桔梗醇提工艺进行了优化,得到最佳提取工艺为:提取次数3次,提取时间1 h,溶媒量8倍,在此条件下提取得到的桔梗美白活性提取物(PGE-ME5)中桔梗皂苷D、熊果苷、桔梗总皂苷的提取率分别为0.122%±0.003%、0.128%±0.005%、0.582%±0.007%。美白功效评价结果显示,PGE-ME5具有良好的美白活性,对酪氨酸酶和透明质酸酶的抑制率分别为92.39%和88.26%,此时的给药浓度为18.75 mg/mL,且对B16F10细胞中黑色素的生成具有良好的抑制效果。抗氧化结果表明,PGE-ME5具有良好的抗氧化活性,对DPPH·、ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率,分别为97.19%、80.57%。

皮肤的颜色主要是由黑色素决定的。当细胞受到内源性刺激物作用时,就会激活酪氨酸酶,促进黑色素的生成<sup>[32]</sup>。另外,活性氧(ROS)在黑色素生成过程中也起到十分重要的作用,ROS在酪氨酸酶催化氧化过程中既是引发剂也是反应物,并通过相关蛋白的作用来诱导黑色素合成基因的表达,从而导致黑色素含量的升高<sup>[33]</sup>。故抑制酪氨酸酶活性、抗氧化是目前公认美白的两个关键靶点。

DPPH法及ABTS法为两大常用的体外抗氧化评价实验,广泛用于评价植物提取物的抗氧化性能<sup>[34]</sup>。而本实验发现PGE-ME5在抗氧化、抑制酪氨酸酶活性上均显示出良好的作用,由此初步得出,桔梗醇提物作为一种抗氧化剂可能是通过阻断或减弱酪氨酸酶活性、抑制酶表达,从而达到协同美白效果,具体的美白作用机制还需进一步研究,综上所述,PGE-ME5具有良好的美白及抗氧化活性,因此,桔梗醇提物可能会成为潜在的天然美白活性成分,用于美白保健产品的研发。

## 参考文献

- [1] 左军,尹柏坤,胡晓阳.桔梗化学成分及现代药理研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(1):113-116. [ZUO J, YIN B K, HU X Y. Progress in the chemical composition and modern pharmacological studies of *Platycodon grandiflorum*[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 21(1): 113-116.]
- [2] 李时珍.本草纲目(校点本上、下册)[M].北京:人民卫生出版社,2004:714. [LI S Z. Compendium of materia medica (the first and second volumes)[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2004: 714.]
- [3] 董双勇,徐远胜,王弋,等.桔梗总皂苷对大鼠急性肺损伤保护作用及机制[J].中华急诊医学杂志,2017,26(12):1413-1417. [DONG S Y, XU Y S, WANG Y, et al. Protective effects and mechanisms of acute lung injury in rats[J]. Chinese Journal of

Emergency Medicine, 2017, 26(12): 1413-1417. ]

[ 4 ] 姚琳, 张俊威, 孟庆杰, 等. 桔梗总皂苷对 PM<sub>2.5</sub> 致肺损伤大鼠表面活性物质相关蛋白 A 表达的影响[J]. 中国药业, 2018, 27(1): 17-20. [ YAO L, ZHANG J W, MENG Q J, et al. Effect of total saponin on the expression of surfactant-related protein A in PM<sub>2.5</sub>-induced lung injury rats[J]. China Pharmaceutical Company, 2018, 27(1): 17-20. ]

[ 5 ] 梁仲远. 桔梗水提液的镇咳、祛痰作用研究[J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3291-3292. [ LIANG Z Y. Study on cough and expectorant effects of aqueous extract of *C. platycodon* [J]. Pharmacy of China, 2011, 22(35): 3291-3292. ]

[ 6 ] 邓亚玲, 任洪民, 叶先文, 等. 桔梗的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 190-202. [ DENG Y L, REN H M, YE X W, et al. Processing history, chemical composition and pharmacological effects of *Platycodon grandiflorum* [J]. Chinese Journal of Experimental Medicine, 2020, 26(2): 190-202. ]

[ 7 ] 田雨弘. 桔梗的化学成分分析及药理活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017. [ TIAN Y H. Chemical composition analysis and pharmacological activity study of *Platycodon grandiflorum* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017. ]

[ 8 ] 朴向民, 于营, Han Sin-Hee, 等. 桔梗的体外抗氧化活性及总多酚和黄酮苷元含量分析[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(5): 579-584. [ PU X M, YU Y, HAN S H, et al. *In vitro* antioxidant activity and element content of total polyphenols and flavonoids[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(5): 579-584. ]

[ 9 ] 周勇. 桔梗研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(39): 19, 22. [ ZHOU Y. Progress in *Platycodon grandiflorum* [J]. World's Latest Medical Information Abstract, 2017, 17(39): 19, 22. ]

[ 10 ] 仇劲, 李国清, 毕研文, 等. 中药材桔梗中常量元素和微量元素含量分析[J]. 农学学报, 2017, 7(7): 43-46. [ ZHANG J, LI G Q, BI Y W, et al. Analysis of constant elements and trace elements in *Platycodon grandiflorum* [J]. Journal of Agriculture, 2017, 7(7): 43-46. ]

[ 11 ] KIM Y S, PARK C S, SUN N. Chae Potential of glycoside hydrolases treatment for production of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) extract[J]. Journal of Chitin and Chitosan, 2022, 27(3): 132-136.

[ 12 ] 乔彩虹, 孟祥顺. 桔梗多糖降血糖作用及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7): 1944-1946. [ QIAO C H, MENG X S. The hypoglycemic effect of *Platycodon grandiflorum* polysaccharide and its mechanism[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(7): 1944-1946. ]

[ 13 ] JUNG S, JOON A S, YEONGIN K, et al. Pharmacological effects and pharmacokinetic properties of *Panax ginseng* and *Platycodon grandiflorum* [J]. Korean Journal of Crop Science, 2022, 67(4): 305-318.

[ 14 ] 单进军, 杨瑞, 张新庄, 等. 桔梗汤止咳祛痰的网络药理学研究[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3501. [ SHAN J J, YANG R, ZHANG X Z, et al. Network pharmacology study of cough and expectorant in *Tangycodon* decoction[J]. Chinese Herbal Medicine, 2018, 49(15): 3501. ]

[ 15 ] 何毅帆, 龙芸嵩, 李征, 等. 天然植物美白成分作用机理的研究进展[J]. 日用化学品科学, 2022, 45(10): 37-43. [ HE Y F, LONG Y L, LI Z, et al. Progress on the mechanism of whitening components of natural plants[J]. Science of Daily Chemicals, 2022,

45(10): 37-43. ]

[ 16 ] WANG B, AN X H, QU L P, et al. Review on oral plant extracts in skin whitening[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: e83922.

[ 17 ] ZHAO W, YANG A Q, WANG J, et al. Potential application of natural bioactive compounds as skin-whitening agents: A review [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2022, 21(12): 6669-6687.

[ 18 ] 马馨桐, 邵帅, 张荣榕, 等. 桔梗美白活性部位的提取分离及活性初步研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2388-2392.

[ MA X T, SHAO S, ZHANG R R, et al. Preliminary study on extraction and activity of whitening active site of *Platycodon grandiflorus* [J]. Shizhen National Chinese Medicine, 2021, 32(10): 2388-2392. ]

[ 19 ] 但汉龙, 李娜, 叶红莲, 等. 响应面优化无患子皂苷超声辅助提取工艺[J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35(6): 107-113.

[ DAN H L, LI N, YE H L, et al. The response surface optimized the ultrasound-assisted extraction process[J]. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 2015, 35(6): 107-113. ]

[ 20 ] 彭明. 星点设计-响应面法优化沙棘总黄酮提取工艺[J]. 中国药师, 2020, 23(7): 1322-1326. [ PENG M. Star design-response surface method to optimize total flavonoids extraction process of sea seabuckthorn[J]. Chinese Pharmacist, 2020, 23(7): 1322-1326. ]

[ 21 ] 李凡, 许琦, 熊建, 等. 响应面优化设计饮料专用酵母抽提物多糖提取工艺[J]. 食品科技, 2020, 45(4): 164-168. [ LI F, XU Q, XIONG J, et al. The response surface was optimized to design the polysaccharide extraction process for beverages[J]. Food Technology, 2020, 45(4): 164-168. ]

[ 22 ] 许守超, 陈屠梦, 包绍印, 等. 基于响应面试验设计优选衡水壳多指标成分工艺研究[J]. 中药材, 2019, 42(11): 2617-2621.

[ XU S C, CHEN T M, BAO S Y, et al. Research on multi-index composition technology of *C. aurantii* based on response surface test design[J]. Traditional Chinese medicine, 2019, 42(11): 2617-2621. ]

[ 23 ] 毛艳, 古丽白热木·玉素因, 蔡晓翠, 等. Box-Behnken 响应面法结合层次分析法优化新疆紫草根的提取工艺[J]. 中药材, 2019, 42(7): 1605-1610. [ MAO Y, GULI BAI RE MU Y, CAI X C, et al. Box-Behnken response surface method combined with hierarchical analysis to optimize the extraction process of Xinjiang purple roots[J]. Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(7): 1605-1610. ]

[ 24 ] MA X T, SHAO S, XIAO F Q, et al. *Platycodon grandiflorum* extract: Chemical composition and whitening, antioxidant, and anti-inflammatory effects[J]. RSC advances, 2021, 11(18): 10814-10826.

[ 25 ] JIAO B, XU C T, LI Q, et al. Chemical constituents of flavonoids from *Camellia oleifera* and their anti-inflammatory activity *in vitro* [J]. Proprietary Chinese Medicine, 2019, 41: 327-333.

[ 26 ] ELZBIETA W, ALDONA K, RENATA Z W. Antioxidant activity and free radicals of roasted herbal materials[J]. Herba Polonica, 2017, 63(2): 34-41.

[ 27 ] 鹿会娜, 董红影, 肖凤琴, 等. 响应面法优化葛根蛋白酶解工艺及其体外抗氧化特性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 197-204. [ PANG H N, DONG H Y, XIAO F Q, et al. Optimization of proteolysis process and *in vitro* antioxidant properties[J]. science and technology of Food industry, 2022, 43(24): 197-204. ]

- [28] 张倩. 黄茶多糖的分离纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(14): 49-55. [ZHANG Q. Isolation and purification of yellow tea polysaccharides and their antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2021, 42(14): 49-55.]
- [29] 张猛猛. 玛咖根部多糖的结构鉴定及免疫调节活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [ZHANG M M. Structural identification and immunomodulatory activity of maca root marcan[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
- [30] AUNG N N, NGAWHIRUNPAT T, ROJANARATA T, et al. HPMC/PVP dissolving microneedles: A promising delivery platform to promote trans-epidermal delivery of alpha-arbutin for skin lightening[J]. AAPS PharmSciTech, 2019, 21(1): 25.
- [31] 陈虎, 侯丽娟, 路付勇, 等. 响应面法优化超声溶剂法提取甜菊糖苷工艺[J]. 食品工业, 2022, 43(5): 6-9. [CHEN H, HOU L J, LU F Y, et al. Optimization of stevia glycoside extraction by response surface method[J]. Food Industry, 2022, 43(5): 6-9.]
- [32] 夏禹, 张文珍, 黄真, 等. 温莪术药渣再提取工艺及其美白活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(3): 457-464. [XIA Y, ZHANG W Z, HUANG Z, et al. Study on the reextraction process and whitening activity of the residue[J]. Research and Development of Natural Products, 2022, 34(3): 457-464.]
- [33] LEE J, KIM E, JI H, et al. Anti-melanogenesis and skin protective activities of *Panax ginseng* calyx ethanol extract[J]. J Ginseng Res, 2018, 42: 389-399.
- [34] 邱金东, 汤昆. DPPH 和 ABTS 法测定核桃仁的体外抗氧化活性[J]. 中成药, 2008(8): 1215-1216. [QIU J D, TANG K. *In vitro* antioxidant activity of walnut kernel by DPPH and ABTS[J]. Chinese Patent Medicine, 2008(8): 1215-1216.]