

· 中药工业 ·

## 复方中药黄酮类成分提取工艺优化及抑制黑素合成活性研究

杜卓, 李丽, 董银卯\*, 杜一杰

(北京工商大学, 北京 100048)

**[摘要]** **目的:** 以总黄酮为指标, 对由当归、丹参、黄芪、黄芩、甘草、白薇六味中草药形成的组方进行提取工艺优化, 并通过体外检测对经过 UVB 刺激后 B16 黑素瘤细胞黑素合成抑制活性, 探究组方提取物美白功能。**方法:** 采用 CCK8 法检测样品对 B16 细胞的增殖抑制活性, 用 NaOH 裂解法测定黑素含量, 用硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定总黄酮含量, 以总黄酮为指标, 考察提取时间、提取温度、料液比、溶剂 4 个主要因素, 通过单因素和正交试验, 研究组方最佳提取工艺。**结果:** 组方最佳提取工艺为提取时间 3 h, 提取温度 85 °C, 提取料液比 1:20, 提取溶剂 75% 乙醇。通过最佳提取工艺提取所得的组方提取物, 对经过 UVB 刺激后的 B16 黑素瘤细胞黑素合成均具有显著抑制活性( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖型。**结论:** 采用最佳提取工艺提取的组方提取率高, 具有较佳的美白活性, 能为复方美白功能添加剂的开发提供参考。

**[关键词]** 中草药组方; B16 黑素瘤细胞; 黑素含量; 总黄酮; 美白

### Study on Extractive Technology of Total Flavones from Compound Chinese Herbal Medicine and Its Inhibitory Effect on Melanin Synthesis

DU Zhuo, LI Li, DONG Yinmao\*, DU Yijie

(Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**[Abstract]** **Objective:** The extraction process of Compound Chinese herbal medicine which contains Radix Astragali, Radix Scutellariae, Radix Angelicae Sinensis, Radix Salviae Miltiorrhizae, Radix et Rhizoma Glycyrrhizae and Radix Cynanchi Atrati was optimized with the content of total flavonoids as index. And through the *in vitro* detection of the inhibitory activities on the melanogenesis of B16 melanoma cells after UVB stimulation, the whitening effect of component herbs extracts was studied. **Methods:** The cell proliferation inhibitory activity was detected by cck8 assay, the melanin content was detected by NaOH assay, the content of total flavonoids was detected by colorimetry with  $Al(NO_3)_3-NaNO_2$ , with the content of total flavonoids as index the four major factors of extraction time, extraction temperature, solid-liquid ratio and extraction solvent were investigated. With single factor and orthogonal experiments, the best extraction process of the prescription was explored. **Results:** The best extraction process of prescription was as follows: extraction time 3 h; extraction temperature 85 °C; extracting solid-liquid ratio 1:20; extraction solvent 75% ethanol. And the prescription extracts showed a significant inhibitory activity ( $P < 0.01$ ) on the melanogenesis of B16 melanoma cells after UVB stimulation in dose-dependent manner. **Conclusion:** The prescription extracts through the best extraction process has high extraction efficiency and high skin-whitening activity, which can provide a reference for the development of compound whitening efficacy additive.

**[Keywords]** Compound Chinese herbal medicine; B16 melanoma cells; melanin content; total flavonoids; skin-whitening

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.10.020

皮肤白皙一直是东方女性所追求的热点, 故美白剂的开发也随之成为化妆品行业关注的焦点<sup>[1]</sup>。目前市场上的美白剂主要为烟酰胺、熊果苷、曲酸等。文献表明, 这些物质虽然具有较好的美白功能,

但存在一定的安全隐患, 如烟酰胺、曲酸等被报道均具有一定的皮肤刺激性<sup>[1-2]</sup>。利用中草药提取物作为化妆品功能添加剂具有药效持久稳定、毒副作用小的优势, 深受人们的青睐<sup>[3]</sup>。复方中草药通过诸

\* [通信作者] 董银卯, 教授, 研究方向: 化妆品植物功效原料与配方技术; E-mail: ymdong2008@163.com

多药合理配伍后,能发挥相辅相成的协同作用,使中草药功能得到充分发挥<sup>[4]</sup>,这成为国内外化妆品活性原料开发的主要趋势。研究表明,中草药中广泛存在的黄酮类化合物具有清除皮肤中自由基、抗炎、抑制酪氨酸酶,减少色素沉着等作用<sup>[5-6]</sup>,具有良好的美白活性。文献报道,黑色素的形成和沉积是影响肤色的决定因素<sup>[7]</sup>,故体外检测样品对B16黑素瘤细胞黑素合成抑制作用被广泛用于美白功能评价。

本研究以由当归、丹参、黄芪、黄芩、甘草、白薇六味中草药组成的复方为研究对象,以其主要美白成分总黄酮含量为指标,考察提取时间、提取温度、料液比、溶剂4个主要因素,通过单因素和正交试验,对组方最佳提取工艺进行优化,并通过体外检测其对经UVB刺激后的B16黑素瘤细胞黑素合成的抑制活性,探讨其美白功能,以期为复方美白功能添加剂的开发提供参考。

## 1 试剂和仪器

复方中草药(按照质量比1:1:1:1:1:1称取甘草、白薇、丹参、黄芪、当归、黄芩6味中药共250g);甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 产地内蒙古,北京东方森森生物科技有限公司提供,经中国医学科学院药用植物研究所许利嘉鉴定;白薇 *Radix Cynanchi Atrati*. 产地辽宁,北京东方森森生物科技有限公司提供,经中国医学科学院药用植物研究所许利嘉鉴定;丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge. 产地四川,北京东方森森生物科技有限公司提供,经中国医学科学院药用植物研究所许利嘉鉴定;黄芪 *stragalus membranaceus* Fisch. Bunge. 产地内蒙古,北京东方森森生物科技有限公司提供,经中国医学科学院药用植物研究所许利嘉鉴定;当归 *Radix Angelicae Sinensis*. 产地甘肃,北京东方森森生物科技有限公司提供,经中国医学科学院药用植物研究所许利嘉鉴定;黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 产地内蒙古,北京东方森森生物科技有限公司提供,经中国医学科学院药用植物研究所许利嘉鉴定。

黑素瘤细胞(B16)(协和细胞库,批号150203);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号150209);DMEM培养基(gibco,批号8115216);胰蛋白酶(gibco,批号1676922);双抗混合液(gibco,批号1697547);PBS缓冲液(HyClone,批号NAH1449);CCK-8试剂盒(同仁化学研究所,批号

GW769);芦丁(北京百灵威科技有限公司,批号L330P88)。

酶标仪(TACAN, M200pro);真空冷冻干燥机(Virtis);UVB灯、UVB311灯、KN-4006B(科诺)。

## 2 方法

### 2.1 组方提取工艺优化

#### 2.1.1 单因素试验

2.1.1.1 提取时间 精密称取6份5.0g组方,按1:30的料液比加入150mL75%乙醇,在85℃下,分别提取0.5、1.0、2.0、3.0、4.0h,过滤得样品溶液,测定总黄酮含量。

2.1.1.2 提取温度 精密称取5份5.0g组方,按1:30的料液比加入150mL75%乙醇,分别在55、65、75、85、100℃,提取1.0h,过滤得样品溶液,测定总黄酮含量。

2.1.1.3 提取料液比 精密称取5份5.0g组方,分别按照1:15、1:20、1:30、1:40、1:50,加入75%乙醇,在85℃下,提取1.0h,过滤得样品溶液,测定总黄酮含量。

2.1.1.4 提取溶剂 精密称取5份5.0g组方,按照1:30料液比加入150mL水95%乙醇、75%乙醇、60%乙醇、30%乙醇,在85℃下,分别提取1.0h,过滤得样品溶液,测定总黄酮含量。

2.1.2 正交试验 精密称取9份10.0g组方,以提取时间、提取温度、料液比、溶剂为考察因素,每个因素设3个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行试验,并以总黄酮含量为评价指标对组方提取工艺进行优化。

2.1.3 硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定总黄酮含量 标准曲线制作<sup>[8]</sup>:芦丁于105℃下干燥至质量恒定,准确称取芦丁对照品10.0mg,用30%乙醇溶液定容于100mL容量瓶中,得质量浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准母液。精密量取芦丁标准母液1、2、3、5、6、8mL分别置于10mL容量瓶中,分别加入30%乙醇溶液定容,得到质量浓度为10、20、30、50、60、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准液。再于5mLEP管中分别加入芦丁标准液0.50mL,30%乙醇3.22mL,5%亚硝酸钠溶液0.14mL,混匀,静置5min,加10%硝酸铝0.14mL,混匀,静置6min;加 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液1.00mL,混匀,静置10min,以30%乙醇为空白对照,在510nm处测定吸光值,以测得的吸光值( $X$ )为横坐标,以对照品芦丁的浓度( $Y$ )为纵坐标,得回归方程: $Y =$

132.3 X - 0.164 3, 相关系数  $r = 0.999 1$ , 表明样品溶液在  $0 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  具有良好的线性关系。

样品总黄酮含量测定: 将 2.1.1 和 2.1.2 制得的样品溶液用 30% 乙醇稀释 10 倍后, 按上述方法测定总黄酮含量。

$$\text{提取液中总黄酮质量浓度}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{(132.3 \times \text{吸光值} - 0.164 3) \times \text{稀释倍数}}{1000} \quad (1)$$

$$\text{生药中总黄酮含量}(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{提取液中总黄酮质量浓度}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) \times \text{提取液体积}(\text{mL})}{\text{生药质量}(\text{g})} \quad (2)$$

## 2.2 最佳 UVB 辐射剂量的筛选

2.2.1 CCK8 法检测不同剂量 UVB 对 B16 黑素细胞的毒性 本研究采用 UVB 作为外界刺激源, 刺激 B16 细胞黑素合成上调。

将细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液, 待细胞贴壁后, 吸出各孔的培养基, 每孔加 100  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液覆盖底面, 用 10 种不同剂量 UVB (150、300、450、600、750、900、1050、1200、1350、1500  $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 辐射细胞, 每个处理 10 个复孔, 空白对照不使用 UVB 辐射。辐射完成后, 用新鲜培养基替换 PBS 缓冲液继续孵育 48 h, 再加入 CCK8 试剂 10  $\mu\text{L}$  反应 2 h 后, 酶标仪 405 nm 测定其吸光度。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{UVB 辐射组 OD 值}}{\text{空白对照组 OD 值}} \times 100\% \quad (3)$$

UVB 辐射细胞的具体条件如下: 1) 使用的科诺 KN-4006B 紫外线光疗仪含两根 UVB 紫外荧光灯(冷光源), 光谱范围为 280 ~ 320 nm, 发射峰为 311 nm, 辐照强度固定为 10  $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 有效辐射面积为  $(104 \pm 2\%) \text{cm}^2$ ; UVB 剂量计算: UVB 辐照剂量( $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) = UVB 辐照强度( $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ )  $\times$  时间(s); 3) 照射细胞前开机预热 5 min, 待 UVB 辐射度稳定后开始对细胞进行紫外辐射。UVB 辐射细胞时, 用 UVB 灯照射细胞, 紫外光源距细胞 10 cm, 垂直照射, 分别照射 15、30、45、60、75、90、105、120、135、150 s, 即 UVB 辐射剂量分别为 150、300、450、600、750、900、1050、1200、1350、1500  $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

2.2.2 NaOH 法检测不同剂量 UVB 对 B16 黑素细胞黑素合成的促进作用 将细胞以  $3 \times 10^5$  的密度接种

于 60 mm 细胞培养板中, 待铺板的细胞贴壁后, 吸出平皿中的培养基, 并向每个平皿中加入 1 mL PBS 缓冲液覆盖底面, 用 10 种不同剂量的 UVB (150、300、450、600、750、900、1050、1200、1350、1500  $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 辐射细胞, 每个处理设置三个平行, 空白对照不进行 UVB 辐射处理。UVB 辐射的具体条件如上 2.2.1 所述。辐射结束后, 用新鲜培养基替换 PBS 缓冲液, 继续孵育 48 h。孵育 48 h 后, 用 0.25% 胰酶消化收集细胞, 离心后 PBS 洗涤 1 次, 加入 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH (10% DMSO) 200  $\mu\text{L}$ , 吹打数次, 放入 100  $^{\circ}\text{C}$  的环境下沸腾 10 min, 使细胞溶解, 取上清液加入 96 孔板, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 于 450 nm 读取吸光度值, 并计算黑素合成抑制率<sup>[9]</sup>。

$$\text{黑素合成促进率}(\%) = \frac{(\text{辐射组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})}{\text{空白对照组 OD 值}} \times 100\% \quad (4)$$

2.3 组方对经 UVB 刺激后的 B16 黑素瘤细胞黑素合成抑制活性

2.3.1 CCK8 法检测组方对 B16 黑素瘤细胞的增殖抑制作用 用得到的最佳提取工艺提取组方, 70  $^{\circ}\text{C}$  旋蒸浓缩后, 冷冻干燥制得组方提取物冻干粉。称取组方提取物冻干粉 16 mg, 溶解于 2 mL 的 DMSO 中, 制备成 8  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品母液。再分别用培养基将样品母液梯度稀释成 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

将细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液, 待细胞贴壁后, 吸出废旧培养基, 用 PBS 清洗, 再分别加入 8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.13、0.06 3  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  样品溶液, 对照组用培养基代替, 每个处理设置 3 个平行。孵育 48 h, 加入 CCK8 试剂 10  $\mu\text{L}$  反应 2 h, 酶标仪 405 nm 测定其吸光度, 计算细胞的存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{样品组 OD 值}}{\text{空白组 OD 值}} \times 100\% \quad (5)$$

2.3.2 NaOH 法检测组方对 B16 黑素瘤细胞黑素合成抑制作用 样品溶液的配制: 称取 6 mg 的组方提取物冻干粉, 溶解于 12 mL 的 DMSO 中配制成 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品母液, 再用培养基将样品母液进行梯度稀释, 制成 250、125、62.5、31.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  4 个浓度。

阳性对照溶液的配制: 称取 3 mg 熊果苷粉末, 溶于 6 mL 培养基中, 即得 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的熊果苷溶液。

实验操作过程: 1) 将细胞以  $3 \times 10^5$  的密度接种

于60 mm 细胞培养板中并随机分为三组：空白对照组、样品组、阳性对照组；2)待细胞贴壁后，吸出培养液，加入1 mL PBS 缓冲液覆盖平皿表面；3)用 $1050 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  UVB 辐射细胞；4)辐射结束后，吸出PBS 缓冲液，空白对照组加入5 mL 新鲜培养基，样品组加入5 mL 含样品培养基，阳性对照组加入5 mL 含阳性对照培养基；5)继续孵育48 h 后用NaOH 裂解法检测黑素含量。实验方法如上2.2.2 所述。

$$\text{黑素合成抑制率}(\%) = \frac{(\text{空白对照组 OD 值} - \text{样品组 OD 值})}{\text{空白对照组 OD 值}} \times 100\% \quad (6)$$

## 2.4 统计分析

实验中每个处理至少设置三组平行，取平均值，使用EXCEL 软件计算处理，所测数据以(平均值  $\pm$  标准差)表示。使用SPSS 17.0 软件进行组间显著性差异分析。

## 3 结果

### 3.1 组方提取工艺的优化

#### 3.1.1 单个因素对组方总黄酮含量的影响

##### 3.1.1.1 不同提取时间对组方总黄酮含量的影响

按照2.1.3 所述方法，按照测定2.1.1.1 不同提取时间所得的样品溶液中的黄酮含量，每个样品设置3 个平行，结果见图1。

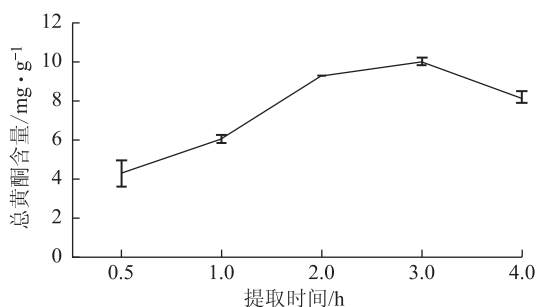


图1 不同提取时间对组方总黄酮含量的影响( $n=3$ )

图1 表明，随着提取时间增加，组方提取物中的总黄酮含量先增加后减少，在提取时间为3 h 时达到最大值，故选取3 h 为最佳提取时间。

##### 3.1.1.2 不同提取温度对组方总黄酮含量的影响

按照2.1.3 所述方法，按照测定2.1.1.2 不同提取温度所得的样品溶液中的黄酮含量，每个样品设置3 个平行，结果见图2。

图2 表明，随着提取温度的增加，组方提取物

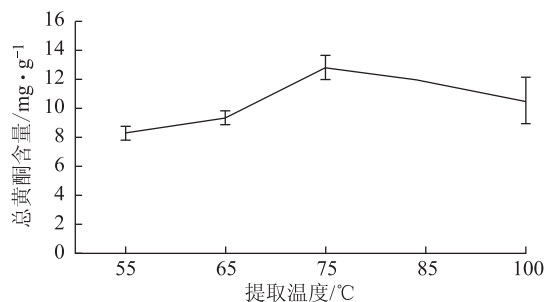


图2 不同提取温度对组方总黄酮含量的影响( $n=3$ )

中的总黄酮含量先增加后减少，在提取温度为75 °C 时达到最大值，故选取75 °C 为最佳提取温度。

##### 3.1.1.3 不同提取料液比对组方总黄酮含量的影响

按照2.1.3 所述方法，按照测定2.1.1.3 不同提取料液比所得的样品溶液中的黄酮含量，每个样品设置3 个平行，结果见图3。

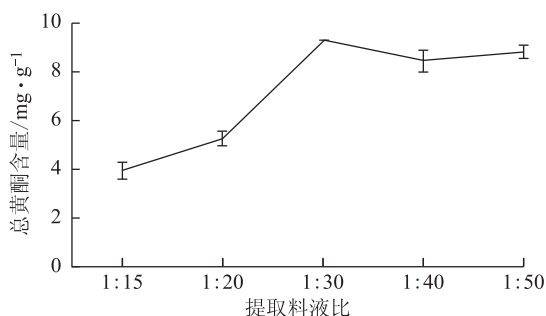


图3 不同料液比对组方总黄酮含量的影响( $n=3$ )

图3 表明，随着提取料液比的增加，组方提取物中的总黄酮含量先增加后减少，在料液比为1:30 时达到最大值，故选取1:30 为最佳提取料液比。

##### 3.1.1.4 不同提取溶剂对组方总黄酮含量的影响

按照2.1.3 所述方法，按照测定2.1.1.4 不同提取溶剂所得的样品溶液中的黄酮含量，每个样品设置3 个平行，结果见图4。

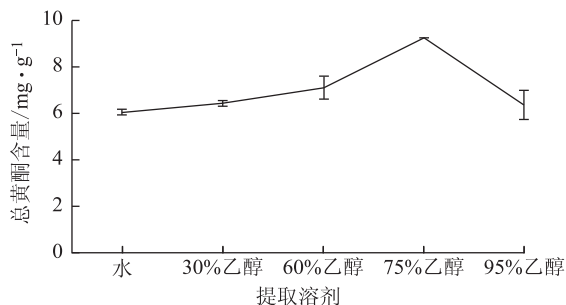


图4 不同提取溶剂对组方总黄酮含量的影响( $n=3$ )

图4 表明，随着提取溶剂中乙醇含量的增加，组方提取物中的总黄酮含量先增加后减少，在提取

溶剂为75%乙醇时达到最大值,故选取75%乙醇为最佳提取溶剂。

3.1.2 最佳提取工艺的优化 在单因素试验的基础上,按照2.1.2所述,选择 $L_9(3^4)$ 正交表,对提取时间、提取温度、提取料液比、提取溶剂4因素进行正交试验,以总黄酮含量为评价指标,对组方提取工艺进行优化,结果见表1。

表1表明,4因素中提取时间对组方总黄酮含量影响最大,各因素对总黄酮含量的影响主次顺序依次为提取时间>提取溶剂>提取温度>料液比。

分析正交试验结果,确定组方最佳提取工艺为提取时间3h,提取温度85℃,提取料液比1:20,提取溶剂75%乙醇。

### 3.2 最佳UVB辐射剂量的筛选

按照2.2.1和2.2.2的方法,测定不同剂量UVB对B16细胞的增殖抑制活性和黑素合成促进作用。结果见表2~3。由表2可知,UVB对B16细胞增殖的影响随剂量增加起到先促进后抑制的作用,其中在UVB辐射剂量为 $1050\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时,B16细胞活性达到最高。

表1 正交试验结果

序号	提取时间/h	提取温度/℃	料液比	提取溶剂	总黄酮含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	2	65	1:20	60%乙醇	11.32±0.080
2	2	75	1:30	75%乙醇	12.88±0.016
3	2	85	1:40	95%乙醇	9.64±0.040
4	3	75	1:40	60%乙醇	14.48±0.012
5	3	85	1:20	75%乙醇	16.84±0.013
6	3	65	1:30	95%乙醇	12.60±0.050
7	4	85	1:30	60%乙醇	11.20±0.040
8	4	65	1:40	75%乙醇	11.36±0.080
9	4	75	1:20	95%乙醇	8.96±0.020
$k_1$	11.28	11.76	12.37	12.33	
$k_2$	14.64	12.11	12.23	13.69	
$k_3$	10.51	12.56	11.83	10.40	
极差R	4.13	0.80	0.55	3.29	
因素主→次	提取时间→提取溶剂→提取温度→料液比				
较优水平	时间:3h,提取温度:85℃,料液比:1:20,提取溶剂:75%乙醇				

表2 不同剂量UVB对B16细胞毒性作用( $n=10$ )

UVB辐射剂量/ $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
细胞活率(%)	102±8	98±7	105±6	105±5	110±6	111±11	136±17	110±3	78±3	65±5

注:数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

表3 不同剂量UVB对B16细胞黑素合成作用( $n=3$ )

UVB辐射剂量/ $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$	150	300	450	600	750	900	1050	1200	1350	1500
黑素合成促进率(%)	—	—	13±3.75	13±2.00	21±3.48	27±1.74	35±7.74	19±2.30	18±4.42	12±6.38

注:数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;“—”表示对黑素合成无促进作用。

由表3可知,随剂量的增加,UVB对B16细胞黑素合成起到不同程度的促进作用,其中在UVB辐射剂量为 $1050\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时,对B16细胞黑素合成促进效果最明显。综合比较,选择 $1050\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 为刺激B16细胞黑素合成上调的UVB最佳辐射剂量。

### 3.3 组方对经UVB刺激后的黑素瘤细胞黑素合成抑制活性

#### 3.3.1 组方对B16黑素瘤细胞的增殖抑制活性

按照2.3.1的方法测定组方提取物在8000、4000、2000、1000、500、250、125、62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下对B16黑素瘤细胞的增殖抑制活性,每组处理3个复孔。结果见表4。我们规定样品作用于B16黑素瘤细胞后,细胞存活率 $\geq 80\%$ 时,则认定该样品对细胞无毒。

由表4可知,组方提取物对B16细胞无毒的最大浓度为 $250\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3.2 组方对 B16 黑素瘤细胞黑素合成抑制活性  
在组方无毒浓度范围内, 选取 250、125、62.5、  
31.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  4 个浓度, 按照 2.3.2 的方法检测组

方提取物对 B16 细胞黑素合成的抑制作用。以  
500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  熊果苷溶液作为阳性对照, 结果见表 5。

表 4 组方提取物对 B16 细胞毒性作用 ( $n=3$ )

组方样品浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	8000	4000	2000	1000	500	250	125	62.5
细胞活率 (%)	4 ± 0.47	14 ± 1.12	26 ± 1.14	59 ± 1.88	70 ± 0.78	89 ± 6.46	96 ± 4.93	109 ± 8.58

注: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

表 5 组方及阳性对照对 B16 细胞黑素合成的抑制率 (%) ( $n=3$ )

测试样品	测试浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$					
	500	250	125	62.5	31.3	15.6
组方提取物		51 ± 2.77**	43 ± 5.55**	28 ± 4.71**	11 ± 2.16**	
熊果苷	30 ± 4.58**					

注: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; SPSS 17.0 软件分进行组间显著性差异分析, \*\*表示与空白对照相比  $P < 0.01$ 。

由表 5 可知, 按最优提取工艺提取的组方, 对  
经过 UVB 刺激后的 B16 细胞黑素合成具显著抑制效  
果 ( $P < 0.01$ ), 并呈一定剂量依赖性。

赖型。由此可见, 采用最佳提取工艺提取的组方,  
提取率高, 具有较佳的美白活性, 能对复方美白功  
能添加剂的开发提供参考。

#### 4 讨论

黄酮类物质存在于大多数中草药中, 具有多种  
生物活性。Badria F A 等<sup>[10]</sup>研究表明, 27 种测试黄  
酮类化合物中有 6 种能显著抑制酪氨酸酶活性, 具  
有抑制黑素合成的美白功能。目前, 国内外对植物  
中黄酮类物质的提取工艺研究比较成熟, 提取方法  
也很多, 例如水提法、有机溶剂提取法、热回流提  
取法、微波辅助提取法、生物酶提取法等, 其中以  
用乙醇溶液为提取溶剂的热回流提取法最为常见。

本研究通过单因素和正交试验, 以总黄酮得率  
为指标, 考察提取时间、提取温度、料液比、提取  
溶剂 4 个因素, 对由甘草、白薇、丹参、当归、黄  
芪、黄芩六味药组成的复方提取工艺进行优化, 并  
对组方提取物黑素合成抑制活性进行研究。结果表  
明, 随着单因素的依次优化, 最优条件逐渐增多,  
提取出的总黄酮量也逐渐增大, 各因素对组方总黄  
酮得率的影响顺序依次为提取时间 > 提取溶剂 > 提  
取温度 > 料液比, 最终优化的组方总黄酮提取工  
艺: 提取时间为 3 h、提取温度为 85  $^{\circ}\text{C}$ 、提取料液  
比为 1:20、提取溶剂为 75% 乙醇。通过最优提取工  
艺, 1 g 组方生药能提取出 16.84 mg 黄酮类物质, 所  
得的组方提取物对经过 UVB 刺激后的 B16 黑素瘤  
细胞黑素合成具有显著抑制活性 ( $P < 0.01$ ), 且呈  
剂量依

#### 参考文献

- [1] 汪昌国, 金抒, 李华山. 皮肤美白剂进展[J]. 日用化学工业, 2002, 32(4): 56-60.
- [2] 王咏. 美白化妆品的作用机理及存在的卫生安全问题[J]. 今日南国旬刊, 2010(5): 179-180.
- [3] 谢艳君, 孔维军, 杨美华, 等. 化妆品中常用中草药原料研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3925-3931.
- [4] 黄霏莉, 徐大鹏, 范晔. 试论中药化妆品的特色与优势[J]. 中华中医药杂志, 2000, 15(3): 20-24.
- [5] 焦晶晶, 张英. 植物类黄酮作为护肤因子在化妆品领域的研究进展[J]. 精细化工, 2004, 21(s1): 98-102.
- [6] 王颖异, 郭宝林, 张立军. 具美白祛斑活性植物成分的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(11): 7-11.
- [7] 陈旭, 孔佩慧, 甄雅贤. 含黑素细胞的人体外重建皮肤模型: 角质形成细胞生长因子在构成性色素沉着方面的作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(1): 75-77.
- [8] 魏永生, 王永宁, 石玉平, 等. 分光光度法测定总黄酮含量的实验条件研究[J]. 青海大学学报, 2003, 21(3): 61-63.
- [9] 张迪敏, 李永伟, 尉晓冬, 等. 女贞子对培养的黑素细胞酪氨酸酶活性和黑素合成的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(4): 197-199.
- [10] Badria F A, Elgayyar M A. A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation[J]. Bollettino Chimico Farmaceutico, 2001, 140(4): 267-271.

(收稿日期 2016-12-19)