

响应面优化千日红酪氨酸酶抑制活性成分的提取工艺

穆燕¹, 胡松青²

(1. 深圳职业技术学院计算机工程学院, 广东深圳 518055)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了千日红粗提物对酪氨酸酶的抑制作用并采用响应面法优化千日红中酪氨酸酶抑制剂的提取工艺。在单因素实验的基础上, 探讨了提取温度、提取时间、液料比和乙醇浓度等因素为影响因子, 应用 Box-Behnken 中心组合法进行 4 因素 3 水平试验设计, 以酪氨酸酶抑制率为响应值, 进行响应面分析, 优化千日红中酪氨酸酶活性抑制组分的提取工艺。结果表明, 最佳提取条件: 提取温度为 80 ℃、提取时间为 3 h、液料比为 60 mL/g(V/M)、乙醇浓度为 50%(V/V)。在此条件下, RSM 模型预测千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为 54.94%, 实测千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为(53.86±2.11)%, 与预测值无显著性差异($p>0.05$)。

关键词: 千日红; 酪氨酸酶; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2018)02-157-163

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.025

Optimization of the Extraction Process of Tyrosinase Inhibitors from *Gomphrena globosa* by Response Surface Methodology

MU Yan¹, HU Song-qing²

(1. Shenzhen Polytechnic, School of Computer Engineering, Shenzhen 518055, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Inhibitory effect of *Gomphrena globosa* (GG) crude extract on the tyrosinase activity was investigated and the extraction process of tyrosinase inhibitor was optimized by response surface methodology (RSM). Based on single-factor tests, the extraction temperature, extraction time, liquid-to-solid ratio and ethanol concentration were regarded as factors. A 4-factor, 3-level experiment design was performed using the Box-Behnken center composite experiment. The response surface analysis was conducted by using tyrosinase inhibition rate as the response value, and the extraction process of the inhibitory component of tyrosinase activity was optimized. The results showed that the optimum extraction conditions by RSM were extraction temperature of 80 ℃, extracting time of 3 h, ratio of liquid to material of 60:1 (V/M) and the concentration of ethanol 50% (V/V). Under the conditions, the RSM model predicted that the inhibition rate of crude extract on tyrosinase was 54.94%, which was no significant difference compared with the actual measured value (53.86 ± 2.11)% ($p > 0.05$).

Key words: *Gomphrena globosa*; tyrosinase; response surface methodology

酪氨酸酶是一种生物体内催化黑色素合成的关键限速酶, 与生物体的重要生理过程密切关系, 其活性的异常过量表达既可导致人体的色素沉着性疾病产生^[1], 抑制酪氨酸酶的活性可降低 L-DOPA 合成多巴醌的速率, 从而降低黑色素的合成速率, 减轻黑色素的异常沉积以达到祛斑美白的目的^[2]。然而传统的美白活性成分(如汞及其化合物、氢醌等)具有细胞毒性、刺激性、致敏性及不良反应大等缺点, 目前已被禁用

于化妆品中。因此, 寻找新一代天然、安全和高效的植物美白活性成分成为近几年国内外研究的热点之一^[3]。千日红是一种具有美白祛斑功效的植物, 目前, 已从千日红中分离香豆素、阿魏酸和一些黄酮类物质等^[4], 但是, 由于已有研究并不以从千日红研究开发酪氨酸酶为目的, 如黄良琴等从千日红中提取挥发油并研究其化学成分^[5], 刘存瑞等对千日红中的色素的稳定性进行研究^[6]; 李金花等测量了千日红中多糖的含量^[7]; 刘星塔等确定了千日红祛痰有效成分^[8], 然而, 作为一种具有美白祛斑作用的花茶, 鲜有人对关于千日红对酪氨酸酶抑制作用进行深入研究。本文采用溶剂提取法提取粗提物, 探讨具有美白祛斑作用的千日

收稿日期: 2017-09-28

基金项目: 深圳职业技术学院科研项目(601722K20024)

作者简介: 穆燕(1984-), 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 天然产物化学

红粗提物对酪氨酸酶活性的抑制作用,进而研究不同的提取条件对不同中药类植物中酪氨酸酶抑制活性成分的影响,通过单因素试验和响应面分析相结合考察浸提时间、浸提温度、溶剂浓度、液料比对提取效果的影响,以确定最适的提取工艺参数。研究结果对开发天然植物来源酪氨酸酶抑制剂并应用于化妆品、食品和药物领域具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 原料

千日红:产地云南,购自广州清平市场;L-酪氨酸,生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司;酪氨酸酶,生化试剂,美国Sigma公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钾试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

SHZ-D(III)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Sunrise 酶标仪,瑞士TECAN公司;KR 251 高速离心机,美国Thermo公司;PB-10pH计、BSA224S 万分之一电子天平,德国sartorius公司;SHA-B 恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;HPX-9162MBE 数显式培养箱,上海博讯实业有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酪氨酸酶活性的测定

1.3.1.1 实验原理

酪氨酸或者多巴在酪氨酸酶的催化作用下转化为多巴色素,多巴色素在475 nm处具有特征吸收,因此,可以通过比色法测定酪氨酸酶的活性。

1.3.1.2 试剂配制

(1) 1 mol/L 氢氧化钾溶液配制:准确称取氢氧化钾11.20 g,用脱气的去离子水溶解,冷却后移入200 mL容量瓶中定容,转移到胶塞试剂瓶中待用。

(2) pH 6.8 磷酸缓冲溶液的配制:准确称取磷酸二氢钾6.80 g,用1 L去离子水溶解后,用1 mol/L 氢氧化钾溶液调pH至6.8。

(3) 1.0 mmol/L 单酚底物的配制:准确称取L-酪氨酸酶0.0181 g,用pH 6.8磷酸缓冲溶液溶解后移入100 mL容量瓶定容,摇匀后移入试剂瓶于4℃保存待用。

1.3.1.3 酪氨酸酶活性抑制率的测定方法

参照文献^[9,10]的测定方法并作适当修改。将110 μL的L-酪氨酸溶液分别加入96孔板的三个孔中,记

为1号、2号、3号,在1号孔中加入70 μL样品溶剂,在2、3孔中加入已配制好的待测样品溶液70 μL,然后在1、2号孔加入30 μL酪氨酸酶溶液(溶于pH 6.8磷酸盐缓冲溶液),用pH 6.8磷酸盐缓冲溶液将三个孔内的溶液体积补至210 μL,体系中酶的终浓度为173 U/mL。

将反应液于30℃孵育30 min后,在492 nm处测其吸光值,计为A₁、A₂、A₃,按式(1)计算待测样品对酪氨酸酶活性的抑制率(%IR):

$$\%IR = (1 - \frac{A_2 - A_3}{A_1}) \times 100\% \quad (1)$$

其中,A₁-底物、酪氨酸酶在样品溶剂存在下体系反应30 min的吸光度;A₂-底物、酪氨酸酶在抑制剂存在下体系反应30 min的吸光度;A₃-底物、抑制剂反应30 min的吸光度。

1.3.2 酪氨酸酶活性抑制成分的提取

称取5 g(干基)千日红,加入250 mL 50%(V/V)乙醇溶液,摇床转速为150 r/min,60℃下提取3 h后中速滤纸抽滤,将滤过液去溶剂减压浓缩干燥,过滤弃渣,将滤过液于55℃真空浓缩干燥,加入50%(V/V)乙醇溶液定容至100 mL,测定粗提液对酪氨酸酶活性的抑制率数据。

1.3.3 千日红中酪氨酸酶抑制活性成分提取的单因素实验

(1) 浸提温度的影响

称取5 g(干基)中药类植物,加入250 mL 50%(V/V)乙醇溶液,分别在20、40、50、60和80℃水浴振荡2 h,过滤弃渣,将滤过液于55℃真空浓缩干燥,加入50%(V/V)乙醇溶液定容至100 mL,待测。

(2) 浸提时间的影响

称取5 g(干基)中药类植物,加入250 mL 50%(V/V)乙醇溶液,在50℃水浴分别振荡0.5、1.0、2.0、3.0和4.0 h,过滤弃渣,将滤过液于55℃真空浓缩干燥,加入50%(V/V)乙醇溶液定容至250 mL,待测。

(3) 液料比的影响

称取5 g(干基)中药类植物,分别加入250 mL 50%(V/V)乙醇溶液按照液料比20、30、40、50和100 mL/g(V/M)加入100、150、200、250和500 mL 50%(V/V)乙醇溶液,在50℃水浴振荡2 h,过滤,55℃真空浓缩干燥,加入50%(V/V)乙醇溶液定容至100 mL待测。

(4) 乙醇浓度的影响

称取5 g(干基)中药类植物,分别加入20、40、50、60和80%(V/V)乙醇水溶液250 mL,在50℃水浴振荡2 h,过滤弃渣,将滤过液于55℃真空浓缩干燥,加入50%(V/V)乙醇溶液定容至100 mL,待测。

1.3.4 响应曲面法实验设计^[11,12]

以中药类植物提取物对酪氨酸酶活性%IR抑制率为目标函数,采用响应曲面法优化浸提温度、浸提时间、液料比和乙醇浓度等主要提取条件参数。

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,采用 4 因素 3 水平响应面分析方法,优化千日红中酪氨酸酶活性抑制成分的提取工艺。在单因素试验的基础上,自变量的试验水平分别以-1、0、1 进行编码,设计 29 个试验点,5 个中心点重复实验。按照方程

$$\begin{aligned} \%IR = & A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_4 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{14}X_1X_4 \\ & + A_{23}X_2X_3 + A_{24}X_2X_4 + A_{34}X_3X_4 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 + A_{44}X_4^2 \end{aligned} \quad (2)$$

其中, A_0 为常数项, A_1, A_2, A_3, A_4 为线性系数, $A_{12}, A_{13}, A_{14}, A_{23}, A_{24}, A_{34}$ 为交互项系数, $A_{11}, A_{22}, A_{33}, A_{44}$ 为二次项系数。

1.3.5 数据分析

试验数据以平均值±标准差 (Mean±SD) 表示。采用 OriginPro 8.0 数据分析工具进行处理,并用 t 检验各处理平均数之间的差异显著性 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 千日红的乙醇粗提物对酪氨酸酶活性的影响

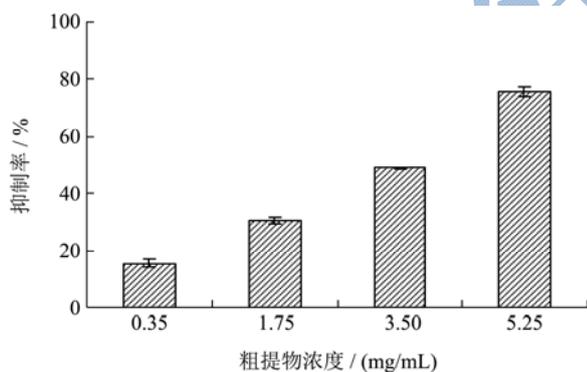


图1 不同浓度千日红粗提物对酪氨酸酶活性的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of crude extract with various concentrations from GG on tyrosinase activity

不同浓度千日红的乙醇粗提物对酪氨酸酶活性的抑制规律如图1所示。由图1看出,在实验所选的浓度范围内,千日红的乙醇粗提物对酪氨酸酶活性具有很强的抑制效果,且呈浓度依赖性,即随着千日红乙醇粗提物浓度的增大,对酪氨酸酶活性的抑制率也增加。对千日红乙醇粗提物浓度与酪氨酸酶活性抑制率的变化规律进行线性拟合,可以得到其关系方程为:

$$IR = 12.17C + 9.64 \quad (3)$$

其中, IR-酪氨酸酶的抑制率, %; C-千日红乙醇粗提物

xi=(Xi-X0)/ΔX 对自变量进行编码(xi 为自变量的编码值, Xi 为自变量的真实值, Xi (0) 为中心点处自变量的真实值, ΔX 为自变量的变化步长),以自变量的编码值+1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平^[13]。以提取物酪氨酸酶活性的抑制率%IR 为响应值。

$$\begin{aligned} x_1 &= (X_1 - 70) / 10; \quad x_2 = (X_2 - 2) / 1; \\ x_3 &= (X_3 - 50) / 10; \quad x_4 = (X_4 - 40) / 10. \end{aligned}$$

假设由最小二乘法拟合的响应值与自变量之间的相关关系的多元二次回归方程为:

的质量浓度, mg/mL。

拟合曲线的相关系数的平方 $R^2 = 0.99$, 说明线性拟合是有效的。根据拟合方程,可以计算千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的 $IC_{50} = 3.32$ mg/mL。

千日红作为一种美容花茶,具有降火消炎、排毒养颜、延缓衰老、活血养颜和护肤祛斑等作用,常饮能调理气血、养颜消斑、美白皮肤,使皮肤光滑富有光泽和弹性,而且,对治疗内分泌紊乱引起的黄褐斑、雀斑、色斑和暗疮等有明显疗效。实际上,本实验结果也表明千日红对黑色素合成的关键限速酶-酪氨酸酶的催化活性有显著的抑制作用。

2.2 千日红中酪氨酸酶抑制有效组分的乙醇提取研究

2.2.1 浸提温度的影响

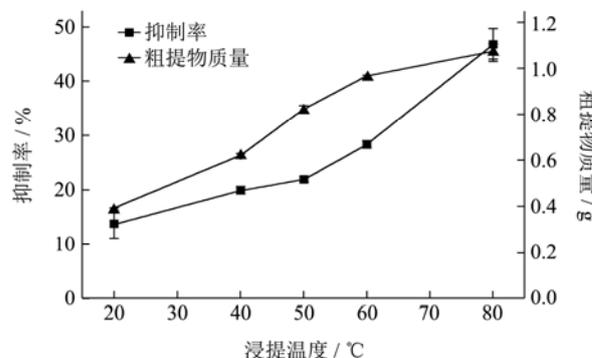


图2 浸提温度对千日红乙醇提取物中酪氨酸酶抑制成分的活性影响

Fig.2 Effects of extraction temperature on the the activity of tyrosinase inhibitor in the ethanol extracts from GG

在不同浸提温度下,从千日红中提取的乙醇粗提物的重量及其对酪氨酸酶活性的影响如图2所示。从

图2中可以看出,随着提取温度的上升,粗提物的质量增大,这是因为随着温度的升高,溶剂的粘度减小,分子运动速度加快,提取液的扩散系数增加,促使浸提速度加快。但当温度达到60℃后,千日红的乙醇粗提物质量之增幅减小后逐渐趋于平缓。在溶剂相同的情况下,不同浸提温度所提的粗提物成分大致相同,只是所提的活性成分的质量存在一定程度的差异,故随着粗提物质量的增大,将其定容到相同体积时粗提液中酪氨酸酶抑制活性成分浓度增大,其对酪氨酸酶的抑制率随之增大。也就是说,千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率随温度上升而增大,与提取质量呈正相关趋势,这也说明千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制作用具有浓度依赖性。

2.2.2 浸提时间的影响

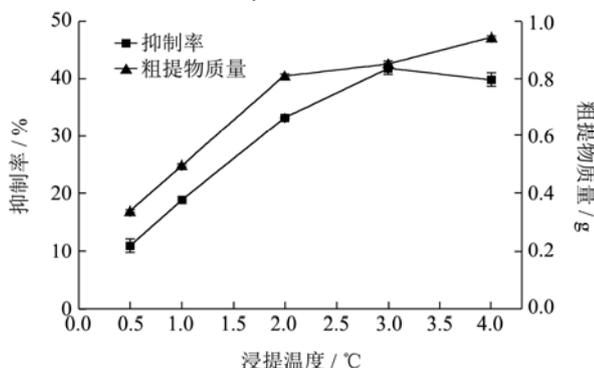


图3 浸提时间对千日红乙醇粗提物中酪氨酸酶抑制成分的活性影响

Fig.3 Effects of extraction time on the the activity of tyrosinase inhibitor in the ethanol extracts from GG

浸提时间影响到溶剂与不同细胞位置活性物质的接触程度。随着浸提时间的延长,溶剂能够渗透到千日红细胞组织的更多部位,与细胞活性物质有更多的接触并溶解,从而提高有效成分的提出效果。用乙醇水溶液从千日红中浸提不同时间,乙醇粗提物的重量及其对酪氨酸酶活性的变化如图3所示。从该图可知,随浸提时间的延长,千日红乙醇粗提物的质量不断增加,但当浸提时间达到2h后,所提物质的质量增幅缓慢趋于平缓。同时,千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制作用随着浸提时间的延长而增大,在3h达到最大值,粗提物对酪氨酸酶的抑制活性基本维持稳定,不再增加。说明,在此条件下,千日红乙醇粗提物中酪氨酸酶活性物质的溶出已经达到平衡,继续增加时间不会有更多的活性物质被提取出来。

2.2.3 液料比的影响

不同的液料比会影响到活性物质的提取速度和最终提取率。液料比过低,因溶剂量少,活性物质不能被充分提取出来,这会影响到提取率。液料比过高,

虽然能充分溶解活性物质,但是会增大提取溶剂的用量,并加大后续浓缩的负荷。在不同液料比下,从千日红中提取的乙醇粗提物的重量及其对酪氨酸酶活性的影响如图4所示。从图4可以看出,随着提取液料比的增大,提取的粗提物质量迅速增加,当液料比达到50 mL/g(V/M)时,所千日红乙醇粗提物提物质不会随着液料比的增加而明显增加。所得千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制规律与粗提物的质量变化呈正相关变化,也在50 mL/g(V/M)达到最大值。

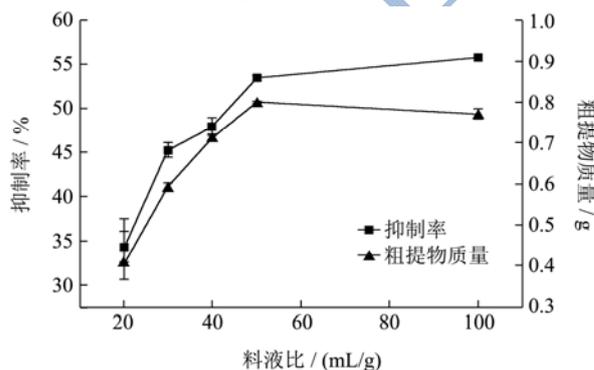


图4 液料比对千日红乙醇粗提物中酪氨酸酶抑制成分的活性影响

Fig.4 Effects of liquid to solid ratio on the the activity of tyrosinase inhibitor in the ethanol extracts from GG

2.2.4 乙醇浓度的影响

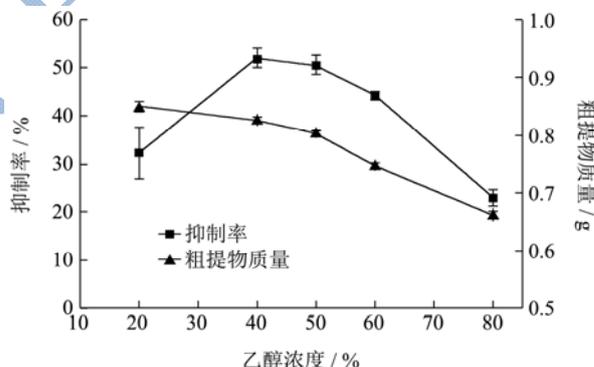


图5 乙醇浓度对千日红乙醇粗提物中酪氨酸酶抑制成分的活性影响

Fig.5 Effects of ethanol concentration on the activity of tyrosinase inhibitor in the ethanol extracts from GG

采用不同体积浓度的乙醇水溶液从千日红中提取有效成分,乙醇粗提物的重量及其对酪氨酸酶活性的变化如图5所示。从图5可知,千日红的乙醇粗提物的质量随着乙醇浓度的增大而不断降低,在乙醇浓度超过60%(V/V)时,总粗提物的质量明显减少。根据相似相溶原理,低浓度的乙醇水溶液可以溶解植物中的极性成分,如蛋白质、淀粉和鞣质等,而这些物质是构成植物细胞的主要成分,所提取的粗提物重量也就最大。而且,随着乙醇浓度在20%(V/V)-80%(V/V)范

围内变化时, 千日红的乙醇粗提物对酪氨酸酶活性的抑制效果首先不断增强, 在乙醇浓度达到为40%~50%(V/V)时出现极大值, 随后, 随着乙醇浓度的增加, 粗提物对酪氨酸酶的抑制作用下降, 究其原因可能是, 低浓度乙醇水溶液提取大量的蛋白质、淀粉、鞣质等强极性成分对酪氨酸酶基本没有抑制作用, 而且, 适当增加乙醇浓度, 有利于具有酪氨酸抑制活性成分的浸出, 但是过大的乙醇浓度没有起到有效溶解酪氨酸酶活性成分的目的, 使得所提取的千日红乙醇粗提物的酪氨酸酶抑制率下降, 可见, 乙醇浓度是影响千日红中酪氨酸酶抑制活性物质提取的重要因素。

2.3 响应面优化实验结果

2.3.1 实验结果与分析

根据 2.2 节单因素试验结果, 采用 Design-Expert 8.05b 统计软件中 Box-Behnken 中心组合实验设计法进行实验设计及数据分析, 以浸提温度 X1 (°C)、浸提时间 X2 (h)、液料比 X3 (mL/g (V/M))、乙醇浓度 X4 (% (V/V)) 4 个因子为自变量, 分别标记为 A、B、C 和 D。根据单因素实验结果, 四者的取值范围确定为 60~80 °C、1~3 h、40~60 mL/g、30~50%。

以千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶活性抑制率为评价指标, 设计四因素三水平共 29 个实验点, 5 个中心点重复实验, 试验自变量因素编码及水平见表 1, 各因素和水平见表 2。采用 Design-Expert 8.5b 软件, 按照 Box-Behnken 中心组合试验设计的安排进行实验, 获得实验结果示于表 2 中。

表 1 试验自变量因素编码及水平

Table 1 The code and level of factors for the trial

因素	水平		
	-1	0	+1
浸提温度 X ₁ /°C	60	70	80
浸提时间 X ₂ /h	1	2	3
液料比 X ₃ / (mL/g (V/M))	40	50	60
乙醇浓度 X ₄ / (% (V/V))	30	40	50

应用 Design-Expert 软件对表 2 的数据进行回归分析, 得多元二次方程见公式 4。对式 4 的数学模型进行方差分析, 结果见表 3。由方差分析结果可以得到以下信息:

(1) 模型 $p < 0.0002$, 说明该模型极显著。

(2) 模型的失拟项 $p = 0.0615 > 0.05$, 没有显著性意义, 说明, 数据中没有异常点, 不需要引入更高次数的项, 模型适当。

(3) 模型的调整确定系数 $R^2_{Adj} = 0.8022$, 表明该

模型拟合程度较好, 同时, 该模型对试验数据有较好的拟合性, 在选取的自变量变化范围内, 可用于响应值变化的分析和预测。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 RSM experimental designs and results

试验 序号	因素				实测值%	预测值%
	A:X ₁	B:X ₂	C:X ₃	D:X ₄		
1	1	0	1	0	3.54	-6.35
2	0	0	0	0	37.88	26.80
3	1	0	0	1	-1.35	10.61
4	0	0	0	0	3.12	33.51
5	-1	1	0	0	20.51	18.55
6	1	0	-1	0	25.4	19.92
7	1	0	0	-1	2.13	25.69
8	1	-1	0	0	-1.96	30.88
9	0	0	0	0	5.76	3.27
10	0	0	-1	-1	23.79	17.25
11	-1	0	1	0	38.38	-1.72
12	0	-1	0	-1	29.3	40.35
13	0	1	0	1	46.55	21.10
14	-1	0	0	1	26.76	25.85
15	-1	0	-1	0	36.33	17.30
16	0	1	-1	0	18.69	36.21
17	0	0	0	0	20.42	5.15
18	0	-1	1	0	12.46	25.02
19	0	0	1	1	22.34	0.27
20	0	1	0	-1	21.66	36.46
21	0	0	1	-1	31.72	12.94
22	0	0	-1	1	25.51	24.37
23	0	-1	0	1	13.01	21.59
24	0	0	0	0	20.34	33.82
25	0	-1	-1	0	19.25	24.24
26	-1	-1	0	0	26.28	24.24
27	0	1	1	0	30.68	24.24
28	1	1	0	0	14.98	24.24
29	-1	0	0	-1	26.57	24.24

(4) 由表 3 对回归方程的系数显著性检验可知, 模型中一次项中提取温度和提取时间极显著 ($p < 0.01$), 说明, 温度和时间是提取过程中的关键因素。而乙醇浓度显著 ($p < 0.05$), 二次项系数 X_1^2 极显著 ($p < 0.01$), 交互项系数 X_1X_4 显著 ($p < 0.05$), 其他项均不显著。该模型反映, 在千日红酪氨酸酶活性成分的提取过程中, 对于 RSM 所选取的影响因素和影响水平内, 提取温度和提取时间对活性成分的提取影响最为显著, 其次是乙醇浓度, 液料比不显著, 提取温

由图 6 响应曲面分析的立体图和等高线图可知,固定浸提时间和液料比不变,响应值会随着浸提温度和乙醇浓度的升高而增大,且增幅较大。乙醇浓度与温度因素交互时,响应值出现最高点,在单因素实验中,当乙醇浓度为 40% 时,千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制剂具有极值点,与温度因素交互后,最大值出现在乙醇浓度为 50%,说明温度会影响有机溶剂对植物细胞的穿透性。

2.4 验证实验

利用 Design-Expert 8.05b 软件进行最优化分析,以千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为评价指标,确定最适提取条件为:提取温度为 80 °C、提取时间为 3 h、液料比为 59.99 mL/g(V/M)、乙醇浓度为 49.96%(V/V),在此条件下,所得千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为 54.94%。

考虑到实际情况,在验证实验时将最适提取条件调整为:提取温度为 80 °C、提取时间为 3 h、液料比为 60 mL/g(V/M)、乙醇浓度为 50%(V/V),在此最适工艺参数条件下,做了三次平行验证试验,并采用 OriginPro 8.0 软件进行单样本 *t*-检验,实测千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为 (53.86±2.11)%,与预测值无显著性差异。表明,该模型可靠,采用该模型优化的工艺参数具有可行性。

3 小结

以酪氨酸酶活性抑制率为指标,研究千日红粗提物对酪氨酸酶活性影响的基础上,探讨了提取温度、提取时间、液料比和乙醇浓度等因素对千日红中酪氨酸酶抑制活性成分提取的影响,并应用响应曲面分析法对四个因素进行了优化,小结如下:

3.1 单因素实验考察各因素对从千日红中提取酪氨酸酶抑制活性成分的影响,结果表明,在实验所选的参数范围,乙醇粗提物重量及酪氨酸酶抑制活性随着浸提温度的升高、浸提时间的延长、液料比增大而增大,而乙醇浓度过高或过低都不利于活性成分较好的溶出。

3.2 应用 RSM 优化了从千日红中提取酪氨酸酶抑制活性组分的各因素,发现,在实验所选的参数范围内,各因素对千日红乙醇粗提物中酪氨酸酶抑制活性成分的活性影响显著性依次是:提取温度>提取时间>乙醇浓度>液料比,并确定了最佳提取条件:提取温度为 80 °C、提取时间为 3 h、液料比为 60 mL/g(V/M)、乙醇浓度为 50%(V/V)。在此条件下,RSM 模型预测千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为 54.94%,

实测千日红乙醇粗提物对酪氨酸酶的抑制率为 (53.86±2.11)%,与预测值无显著性差异。

参考文献

- [1] 穆燕,李琳,董方圆,等.对甲氧基肉桂酸对酪氨酸酶的抑制机理[J].华南理工大学学报(自然科学版),2012,40(12):134-138
MU Yan, LI Lin, DONG Fang-yuan, et al. Inhibition mechanism of 4-methoxycinnamic acid to tyrosinase [J]. Journal of South China University of Technology, 2012, 40(12): 134-138
- [2] 孙劲毅,蔡春辉,梁蓉,等.茶皂素的纯化及抑制酪氨酸酶活性的研究[J].日用化学工业,2017,47(6):312-316,340
SUN Jin-yi, CAI Chun-hui, LIANG Rong, et al. Purification of tea saponin and its inhibition on tyrosinase activity [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2017, 47(6): 312-316,340
- [3] 杨绪娟,周婷,吴文娟,等.植物提取物美白活性成分的研究进展[J].临床皮肤科杂志,2017,1:81-83
YANG Xu-juan, ZHOU Ting, WU Wen-juan, et al. The progress on mechanisms of skin whitening [J]. J Dermatology and Venereology, 2017, 39(3): 168-172
- [4] Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Valentão P, et al. Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, 25(22): 3441-3446
- [5] 黄良勤,王刚.千日红挥发油提取工艺优化及其化学成分分析[J].湖北农业科学,2014,5:1156-1158
HUANG Liang-qin, WANG Gang. Optimizing technology of volatile oil from flower of *Gomphrena globosa* and analyzing extracting its chemical compositions [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 5: 1156-1158
- [6] 刘存瑞,胡喜兰,曾宪佳,等.天然千日红色素的稳定性研究[J].现代食品科技,2003,19(4):62-63
LIU Cun-rui, HU Xi-lan, ZENG Xian-jia, et al. Study of stability in *Gomphrenag Lobosa* L pigment [J]. Guangzhou Food Science & Technology, 2003, 19(4): 62-63
- [7] 李金花,农石生,卢秋杰,等.千日红多糖的提取及含量测定[J].中国执业药师,2015,4:24-26
LI Jin-hua, NONG Shi-sheng, LU Qiu-jie, et al. Extraction and content determination of polysaccharides in *Gomphrena globose* [J]. China Licensed Pharmacist, 2015, 4: 24-26
- [8] 刘星塔,张德成,褚志义.千日红祛痰有效成分-新黄酮甙的

- 结构鉴定[J].中国药学杂志,1981,16(1):55
- LIU Xing-kai, ZHANG De-cheng, ZHU Zhi-yi. Effective constituents of *Gomphrena globosa*-Structure identification of new flavonol glycosides [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1981, 16(1): 55
- [9] 鄢贵龙,刘乃森.葛根提取物对酪氨酸酶活性的影响[J].天然产物研究与开发,2009,21(1):96-98
- YAN Gui-long, LIU Nai-sen. Effect of extracts from *Pueraria* on tyrosinase activity [J]. Natural Product Research & Development, 2009, 21(1): 96-98
- [10] Prasad K N, Yang B, Yang S. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis Sonn.*) seeds [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 1-7
- [11] 袁芝,朱孝晨,孙利芹.响应面法优化拟微绿球藻藻油脱色工艺[J].食品科学,2017,网络预发版
- YUAN Zhi, ZHU Xiao-chen, SUN Li-qin. Optimization of decolorization process of algae oil from *nannochloropsis oceanica* by response surface methodology [J]. Food Science, 2017, in press
- [12] 张黎明,李瑞超,郝利民,等.响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2014,30(4):233-239
- ZHANG Li-ming, LI Rui-chao, HAO Li-min, et al. Response surface methodology for optimization of extracting total flavonoids from maca leaves and antioxidant evaluation [J]. Modern Food Science & Technology, 2014, 30(4): 233-239
- [13] 周丽珍.超声场对酿酒酵母的活性及生物效应的影响与作用机制研究[D].广州:华南理工大学,2007
- ZHOU Li-zhen. Influences mechanism of ultrasound disinfection on activity of yeast cells and its biological effect [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2007