



引用格式:刘有停,刘宇红.红景天提取液生化与细胞水平的美白功效研究[J].轻工学报,2016,31(4):39-43.

中图分类号:TQ658 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.4.005

文章编号:2096-1553(2016)04-0039-05

红景天提取液生化与细胞水平的美白功效研究

Study on whitening efficacy of rhodiola crenulata extract on the biochemistry and cell level

刘有停,刘宇红

LIU You-ting, LIU Yu-hong

北京工商大学 中国化妆品协同创新中心,北京 100048

*Chinese Cosmetic Collaborative Innovation Center, Beijing Technology and Business University,
Beijing 100048, China*

关键词:

红景天提取液;抗氧化;
美白功效;化妆品

Key words:

rhodiola crenulata
extract; antioxidant;
whitening efficacy;
cosmetics

摘要:采用超声提取的方法制备红景天提取液,所得生药的质量浓度为0.05 g/mL.通过清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基实验、抑制酪氨酸酶实验、小鼠B16黑色素瘤细胞实验,评估红景天提取液生化与细胞水平的美白功效.结果显示,在1.00 wt%的受试浓度下,红景天提取液对DPPH自由基的清除率为92.2%,对酪氨酸酶的抑制率为79.1%,黑色素细胞相对细胞活率高于75%,对小鼠黑色素细胞合成黑色素的抑制率为39.0%.说明所制备的红景天提取液具有良好的清除DPPH自由基活性和抑制酪氨酸酶活性的作用,可有效降低小鼠黑色素细胞分泌黑色素的能力,在生化与细胞水平具有良好的美白功效,在美白化妆品中具有良好的应用潜力.

收稿日期:2016-04-13

作者简介:刘有停(1986—),男,江西省九江市人,北京工商大学工程师,主要研究方向为化妆品植物功效原料的开发.

Abstract: The rhodiola crenulata extract was prepared by the method of ultrasonic extraction, and the quality concentration of the extract was 0.05 g/mL. The experiments of clearance rate of DPPH free radical and inhibition rate of tyrosinase were conducted to evaluate the whitening efficacy of biochemistry level of the rhodiola crenulata extract, and the test of mouse B16 melanoma cell was applied to evaluate the whitening efficacy of cell level. The results showed that under the concentration of 1.0 wt%, the clearance rate of DPPH was 92.2%, the inhibition rate of tyrosinase was 79.1%, melanoma cell comparative survival rate was up to 75%, and the inhibition rate of melanin synthesis to mouse B16 melanoma cell was 39.0%. It declared that the prepared rhodiola crenulata extract had good function of clearing DPPH free radical and inhibiting tyrosinase. Therefore, the rhodiola crenulata extract has excellent whitening efficacy on the biochemistry and cell level, which had a good potential to apply into the whitening cosmetics.

0 引言

东方女性“以白为美”。随着科技发展,化妆品科技工作者开发出琳琅满目的美白化妆品,化妆品美白剂也成为科技工作者关注的热点^[1]。

目前,市面上存在着众多的化妆品美白剂,这些美白剂大多以强效抑制酪氨酸酶活性,减少黑色素生成来发挥美白功效^[2-3]。但是,近年来化妆品安全事件时有发生,2013年日本出现了“杜鹃醇致皮肤白斑”事件后,人们对化学美白剂的安全性担忧情绪日益加重,如何实现“安全、健康美白”已成为一个严峻的科学问题。鉴于此,寻找来自绿色植物的天然活性成分以实现健康美白,已经成为化妆品美白产品开发的主流方向,各种各样的植物美白剂也应运而生,如甘草提取物、当归提取物及复合植物提取物等,这些植物美白剂在多种护肤品中被添加使用。

红景天作为一种优质的植物资源,在食品、药品、保健品及化妆品中均有着广泛的应用。本文旨在研究红景天提取液在生化与细胞水平的美白功效,为其在化妆品天然植物美白剂的研究与开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

主要试剂:大花红景天(中药饮片),安国

市万联中药饮片有限公司产;生化试剂 L-酪氨酸和蘑菇酪氨酸酶,分析纯 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),Sigma 试剂公司产;化学纯浓盐酸,分析纯氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、甘油、二甲亚砜(DMSO),国药集团化学试剂有限公司产;小鼠 B16 黑色素瘤细胞、DMEM 培养基,北京富龙康泰生物科技有限公司产。

主要仪器:1510 全波长 Multiskan GO 酶标仪,Thermo Fisher 公司产;PL1001-L 型电子天平,Mettler Toledo 公司产;96 孔板,BIOFIL 公司产;FE20t 型 pH 计,Mettler Toledo 公司产;MX-F 型旋涡混合器,大龙兴创实验仪器(北京)有限公司产。

1.2 方法

1.2.1 红景天提取液制备工艺 称取红景天原料 10 g,粉碎机粉碎后,加入 80% (v/v) 乙醇溶液 200 mL,在 30 °C 下超声提取 30 min 后过滤,除去滤渣,滤液经减压浓缩除去全部乙醇后,加入与 80% (v/v) 乙醇溶液投料量相同质量的甘油进行复溶,二次过滤,得到红景天提取液。制备的红景天提取液生药的质量浓度为 0.05 g/mL。

1.2.2 DPPH 自由基清除实验 DPPH 是一种稳定的有机自由基,在可见光区 517 nm 处具有最大吸收峰,在乙醇溶液中,每个 DPPH 分子

在溶液中可生成 1 个稳定的含氮自由基,具有典型紫色,当它与提供 1 个电子的自由基清除剂相作用时,生成无色产物,使溶液的典型紫色变浅,其褪色程度与配对电子数成化学计量关系.因而可用分光光度法进行定量分析,来检测自由基清除情况,以评价样品清除自由基的能力^[4].通过构建如表 1 所示的 DPPH 自由基清除反应体系来评估红景天提取液的抗氧化活性.

表 1 DPPH 自由基清除实验反应体系

Table 1 Reaction system of DPPH free

radical scavenging		mL	
体系	无水乙醇	0.2 mmol/L DPPH 溶液	待测液
1 [#]	—	1.5	1.5
2 [#]	1.5	1.5	—
3 [#]	1.5	—	1.5

按照表 1 的顺序加样结束后,于 25 °C 水浴下恒温反应 20 min,在 517 nm 处测各体系的吸光值. DPPH 自由基清除率计算公式为

$$\text{清除率} = [(A_2 + A_3) - A_1] / A_2 \times 100\%$$

式中, A_1, A_2, A_3 分别为 1[#], 2[#], 3[#] 反应体系反应结束后在 517 nm 处的吸光值.

1.2.3 抑制酪氨酸酶实验 构建酪氨酸酶催化反应体系,以评价红景天提取液对酪氨酸酶的抑制效果^[5-6].在 pH = 6.8 的磷酸缓冲液 (PBS) 体系中,酪氨酸酶可催化 L-酪氨酸产生黑色素,在 475 nm 处具有最大吸收峰.在反应体系中添加酪氨酸酶抑制剂可减少黑色素的生成,通过黑色素生成量的减少程度来评价抑制剂对酪氨酸酶的抑制效果.酪氨酸酶催化反应体系如表 2 所示.

按照表 2 顺序加样结束后,于 37 °C 水浴下恒温反应 20 min,在 475 nm 处测定各体系的吸光值.酪氨酸酶抑制率计算公式为

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

式中, A, B, C, D 分别为表 2 中各反应体系反应结束后在 475 nm 处的吸光值.

表 2 酪氨酸酶催化反应体系

Table 2 Reaction system of tyrosinase

		inhibition		μL
体系	pH = 6.8 PBS	0.05% L-酪氨酸	待测液	200 U/mL 酪氨酸酶溶液
A	750	400	—	250
B	1 000	400	—	—
C	350	400	400	250
D	600	400	400	—

1.2.4 小鼠 B16 黑色素瘤细胞实验 1) 相对细胞活率测定 (MTT 法)^[7].培养小鼠 B16 黑色素瘤细胞,待细胞生长到对数期,用 0.25% (质量分数) 胰酶消化,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL .置于培养箱中培养 24 h 后,弃上清液,添加含药培养基,每个样品 4 个浓度组 (0.01%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 均为质量分数).每一浓度设 3 个复孔,对照组不加药物,代之以相应的溶媒.孵育 72 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL ,4 h 后弃上清液,每孔加入细胞裂解液 100 μL ,继续培养过夜,在酶标仪上检测各孔吸光度值,波长为 570 nm.

$$\text{相对细胞活率} = (\text{对照组平均吸光度值} - \text{药物组平均吸光度值}) / \text{对照组平均吸光度值} \times 100\%$$

2) 黑色素合成抑制率测定^[7].将小鼠 B16 黑色素细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 96 板.每孔 1 mL,孵育 24 h 后,弃上清液,添加待测药物.药物作用 72 h 后,弃上清液, PBS 洗涤,每孔加入含 10% DMSO 的 1 mol/L NaOH 溶液 500 μL ,震荡 5 min 后,测量 490 nm 各孔吸光度值.

$$\text{黑色素合成抑制率} = [1 - (\text{药物孔 } 490 \text{ nm 吸光度值} / \text{药物孔 } 570 \text{ nm 吸光度})] / (\text{对照孔 } 490 \text{ nm 吸光度值} / \text{对照孔 } 570 \text{ nm 吸光度})] \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 红景天提取液对 DPPH 自由基清除效果 大量的研究表明, DPPH 自由基清除

率可表征受试样品的抗氧化活性. 通常情况下, DPPH 自由基清除率越高, 抗氧化活性越强. 红景天提取液在不同的受试浓度 (0.05 wt%, 0.10 wt%, 0.50 wt%, 1.00 wt%) 下对 DPPH 自由基清除实验结果如图 1 所示.

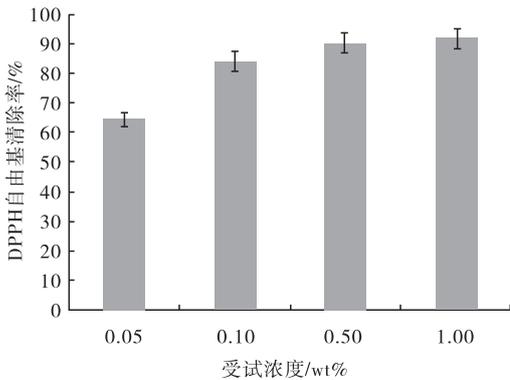


图 1 不同浓度的红景天提取液对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 1 DPPH free radical scavenging ratio of different concentration of the rhodiola crenulata extract

由图 1 可见, 红景天提取液具有良好的清除 DPPH 自由基的作用, 在受试浓度范围内呈现一定的量效关系. 在一定的浓度范围内, 随着受试浓度的提高, DPPH 自由基的清除率逐渐升高. 当受试浓度为 1.00 wt% 时, 红景天提取液对 DPPH 自由基的清除率为 92.2%. 这说明红景天提取液具有突出的抗氧化活性, 应用于化妆品中, 可望有效降低肌肤氧化应激反应, 改善肌肤因氧化损伤所致的暗沉状态, 起到协同亮肤的作用.

2.2 红景天提取液对酪氨酸酶的抑制效果

酪氨酸酶为黑色素合成关键酶, 抑制酪氨酸酶活性在一定程度上可以减少黑色素的生成, 起到美白亮肤的作用. 红景天提取液在不同的受试浓度 (0.05 wt%, 0.10 wt%, 0.50 wt%, 1.00 wt%, 2.00 wt%) 下抑制酪氨酸酶的实验结果如图 2 所示.

由图 2 可见, 红景天提取液具有良好的抑制酪氨酸酶活性的作用, 在受试浓度范围内呈

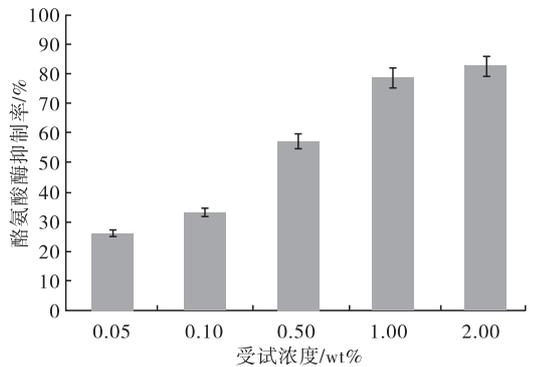


图 2 不同浓度的红景天提取液对酪氨酸酶的抑制率

Fig. 2 Tyrosinase inhibition ratio of different concentration of the rhodiola crenulata extract

现一定的量效关系. 在一定的浓度范围内, 随着受试浓度的提高, 酪氨酸酶抑制率逐渐提高, 当受试浓度为 1.00 wt% 时, 红景天提取液对酪氨酸酶的抑制率为 79.1%, 说明红景天提取液在生化水平具有良好的美白功效, 应用于美白类化妆品中, 可望有效改善色素沉着状态, 美白并光亮皮肤.

2.3 红景天提取液对黑色素细胞的相对细胞活率及黑色素合成抑制率

小鼠 B16 黑色素瘤细胞实验常用于在细胞水平评价美白剂的美白功效. 一般情况下, 在保证良好的相对细胞活率的前提下, 若具有一定的黑色素合成抑制率 (一般大于 20% 视为有效), 说明受试物在细胞水平具有一定的美白功效. 不同浓度红景天提取液对小鼠 B16 黑色素细胞的相对细胞活率及黑色素合成抑制率实验结果如图 3 和图 4 所示.

由图 3 和图 4 可见, 在受试浓度范围内, 黑色素细胞的相对细胞活率随着红景天提取液浓度的增加逐渐降低, 在低于 2.00 wt% 的受试浓度下, 相对细胞活率始终在 75% 以上; 同时, 在受试浓度范围内, 随着受试浓度的升高红景天提取液对黑色素细胞黑色素合成抑制率逐渐增大, 受试浓度为 2.00 wt% 时, 黑色素合成抑制

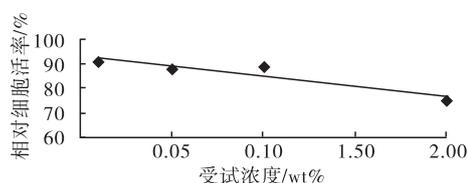


图3 不同浓度红景天提取液对黑色素细胞相对细胞活率的影响

Fig.3 Melanin cell relative cell viability of different concentration of the rhodiola crenulata extract

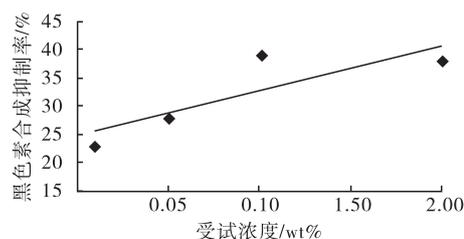


图4 不同浓度红景天提取液对黑色素瘤细胞黑色素合成抑制率

Fig.4 Melanin synthesis inhibition ratio of different concentration of the rhodiola crenulata extract

率约为39.0%。这说明红景天提取液在对黑色素细胞具有较好的相对细胞活率的同时,还具有一定的黑色素合成抑制率。因此,红景天提取液在细胞水平具有良好的美白功效。

3 结论

本文通过超声提取的方法制备了红景天提取液,并通过DPPH自由基清除实验、抑制酪氨酸酶实验及小鼠B16黑色素瘤细胞实验评估了红景天提取液在生化与细胞水平的美白功效。

研究表明,在1.00 wt%的受试浓度下,红景天提取液对DPPH自由基的清除率为92.2%,对酪氨酸酶的抑制率为79.1%,黑色素细胞相对细胞活率高于75%,对小鼠黑色素细胞合成黑色素的抑制率为39.0%。说明红景天提取液在生化水平与细胞水平均具有良好的美白功效,在美白化妆品中具有良好的应用前景。

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.
- [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,2010,157:179.
- [3] 董银卯,李丽. 科学美白 安全有效——复方植物美白剂的开发思路探讨[J]. 中国化妆品,2015,2:40.
- [4] 吴冬青,任雪峰,徐新建,等. 芦苇不同部位醇提物抗氧化性对比分析[J]. 食品工业科技,2012,33(10):174.
- [5] 张目,严泽民,朱少娟,等. 几种中药的美白作用研究[J]. 香精香料化妆品,2009,2(1):33.
- [6] 陈志春,王英豪. 地骨皮总黄酮的提取及酪氨酸酶活性抑制研究[J]. 福建中医药,2012,43(4):54.
- [7] 陶丽莉,刘洋,吴金昊,等. 化妆品美白功效评价方法研究进展[J]. 日用化学品科学,2015,38(3):15.