

桃花精油生物活性分析及护肤效果初探*

孙嘉晨¹ 黄宇¹ 王娜¹ 丁众¹ 高洪坤¹ 张恒^{1,2**}

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266042;

2. 青岛科技大学生态化工国家重点实验室培育基地, 山东 青岛 266042)

摘要:为了分析桃花提取物中有效生物活性组分对皮肤的美白和抗衰老效果,本研究通过无水乙醇法提取了桃花精油,并将精油制备成面霜.采用紫外-可见分光光度计分析了不同样品对酪氨酸酶活性的抑制率和羟基自由基的清除率.同时征集志愿者进行桃花面霜效果试用,填写问卷调查.当使用量为0.50 mL时,反应14 min后,桃花精油和桃花面霜对酪氨酸酶的抑制率分别为28.33%和12.90%;当使用量为1.25 mL时,桃花精油和桃花面霜对羟基自由基的清除率分别为18.31%和7.59%.桃花面霜试用结果表明,该试用品具有一定的皮肤美白、祛皱、滋润和祛痘效果.

关键词:桃花;精油;面霜;羟基自由基;酪氨酸酶;护肤;生物活性

中图分类号:TQ654

DOI:10.19789/j.1004-9398.2020.06.007

0 引言

皮肤的白净程度与皮肤内黑色素的多少有很大的关系,黑色素是由黑色素细胞产生后逐渐向角质细胞、表皮细胞和角质层转移,最后随角质层的脱落而排泄,以此影响皮肤的颜色或形成色斑^[1].酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)是人体调控黑色素生成的限速酶.生物化学方法对皮肤的美白是通过抑制TYR活性以抑制黑色素的生成,阻断其生成过程中的信号通路和加快表皮细胞代谢速度等途径,达到肌肤美白的效果^[2].

研究显示,皮肤的老化与自由基的氧化作用有较大关联^[3].人体内的自由基分为外源性和内源性2类,外源性自由基由生活环境产生,内源性自由基是细胞在正常代谢过程中产生.而自由基在夺取电子的过程中会对细胞结构造成破坏,甚至使其丧失原有的功能,导致皮肤衰老.生物化学方法延缓皮肤的衰老是通过清除自由基,以有效地减轻其对细胞的破坏,从而实现抗衰老的目的^[4-5].人体内的自由基包括超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)、

羟基自由基($\cdot OH$)、羧基自由基($ROO\cdot$)、脂氧基自由基、一氧化氮自由基($NO\cdot$)和硝基自由基($\cdot ONOO-$)6种.其中, $\cdot OH$ 因其具有强氧化能力,能与大多数有机物发生自由基链反应的特性而备受重视.因此,目前对氧化能力的探究多以 $\cdot OH$ 作为重要研究对象.谭冰等^[6]提取广西茉莉花叶的总黄酮,研究显示其对 $\cdot OH$ 有很好的清除作用;吴冬青等^[7]研究了9种药用植物花的提取物,并根据其对 $\cdot OH$ 清除能力进行了排序;袁建梅等^[8]对桃花多酚进行了提取,并证实了其对 $\cdot OH$ 和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基具有较强的清除能力.

植物精油是萃取植物特有的芳香物质,由一百至上千种成分构成,主要含有醇类、醛类、酸类、酚类、丙酮类和萜烯类等^[9],具有抗菌保健和美容养颜等功效,目前多应用于化妆品领域^[9-10].与化学方法合成的大分子类活性物质相比,将植物精油添加入化妆品中,更有助于皮肤吸收和增加化妆品的美容、润肤等功效^[11],且具有环保安全等特点^[12].刘杰超等^[13]研究显示桃花中的多酚和黄酮具有优越的抗氧化性能;王英锋等^[14]证实了半枝莲中黄酮成分提取的可能性;郭彩珍等^[15]证实了桃花多糖具有抗氧化性能;耿明江等^[16]对桃花精油的提取工艺进行了探讨,并总结出了最佳优选提取工艺,为本实验的进行提供了有力的依据.

收稿日期:2019-07-26

* 山东省自然科学基金项目(ZR2017MC032);2018年青岛科技大学大学生创新创业训练计划项目(201810426073);山东省重点研发计划(公益性科技攻关类)项目(2019GGX102029)

** 通信作者:hgzhang@sina.com

目前,桃花作为天然生物质资源,相关护肤产品在市面上较少.经诸多研究表明,其对自由基与TYR有一定的清除和抑制作用.在此基础上,本研究采用已优化的工艺提取桃花精油^[17],制成面霜,通过对照实验,分析不同状态的桃花提取物对TYR的抑制作用和·OH的清除能力,同时对桃花精油和面霜的效果进行考察,并征集志愿者进行桃花面霜效果试用,以更全面地了解桃花提取物对皮肤的美容效果.

1 实验部分

1.1 实验试剂

维生素C($C_6H_8O_6$)、日化级甘油($C_3H_8O_3$)、环聚二甲基硅氧烷、Peg-8硬脂酸酯($C_{34}H_{68}O_{10}$)、丁二醇($C_4H_{10}O_2$)、硬脂醇($C_{18}H_{38}O$)、杏仁油、透明质酸钠($C_{14}H_{22}NNaO_{11}$)、黄原胶($C_8H_{14}Cl_2N_2O_2$)、海藻糖($C_{12}H_{22}O_{11}$)和山梨酸钾($C_6H_7KO_2$)均购自山东优索化工科技有限公司;分析纯邻二氮菲($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$)购自天津市北联精细化学品开发有限公司;分析纯的无水乙醇(C_2H_5OH)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)购自国药集团化学试剂有限公司;分析纯硫酸亚铁($FeSO_4$)购自上海埃彼化学试剂有限公司;分析纯的30%过氧化氢(H_2O_2)和磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)购自天津市鼎盛鑫化工有限公司;分析纯磷酸二氢钾(KH_2PO_4)购自天津市北辰方正试剂厂;分析纯左旋多巴购自上海恒远生物科技有限公司.实验所用水(H_2O)均为蒸馏水.实验咖啡因为自制.新鲜土豆购自生活超市.

1.2 实验仪器

采用北京普析通用仪器有限责任公司生产的TU-1810型紫外-可见光分光光度计测定溶液吸光度;采用上海司乐仪器有限公司生产的HD2010W型卧式高速均质机进行样品搅拌.

1.3 桃花精油制备

采用无水乙醇提取工艺提取桃花精油^[17].使用滤纸包扎1.0 g干燥小瓣桃花粉末进行抽提,控制索氏抽提器提取温度为80~90℃,抽提6 h,无水乙醇在抽提器中循环不少于每小时4次.抽提完毕后后将所得溶液浓缩至30.00 mL,即得到桃花精油.

1.4 桃花面霜制备^[18]

称取5.0 g环聚二甲基硅氧烷、6.0 g Peg-8硬脂酸酯、7.0 g硬脂醇和2.0 g黄原胶逐次加入烧杯

中,于40℃搅拌溶解于20.0 g甘油中,再逐次加入5.0 g丁二醇、8.0 g杏仁油和3.0 g透明质酸钠,使用高速均质机搅拌均匀;再加入35.00 mL H_2O 、1.0 g海藻糖、2.0 g山梨酸钾、5.0 g桃花精油、0.3 g咖啡因及0.7 g EDTA-2Na,40℃水浴加热,持续搅拌至完全溶解,放至室温后得到桃花精油质量分数为5.0%的100.0 g桃花面霜.

1.5 溶液配制

(1)维生素C溶液配制.将0.1 g维生素C加入100.00 mL水中,搅拌溶解,配置成1.0 g/L维生素C水溶液.

(2)磷酸盐(PBS)缓冲液配制.称取28.4 g Na_2HPO_4 与27.2 g KH_2PO_4 分别配置成1.00 L 0.2 mol/L的 Na_2HPO_4 与 KH_2PO_4 溶液.使用670.0 g 0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液与330.0 g 0.2 mol/L KH_2PO_4 溶液配制得PBS缓冲液.

1.6 TYR活性抑制率测定

将土豆去皮切块,称取10.0 g土豆在-20℃冷冻过夜,按照质量体积比为1:1加入10.00 mL PBS缓冲液,研磨成匀浆状态,过滤,收集滤液,-4℃冷冻,在离心半径3 cm,4 000 r/min离心15 min.收集上清液即为TYR提取液,冰浴保存待用.

向试管中分别加入0.50 mL桃花精油、0.50 mL PBS缓冲液、2.00 mL 16.0 mmol/L左旋多巴溶液和2.00 mL H_2O ,35℃温育10 min后,加入0.50 mL TYR提取液,反应14 min.从反应开始,每间隔2 min测量反应液在吸收波长为475 nm时溶液的吸光度(A_t).用维生素C作为对照组.将上述步骤中的桃花精油换成等体积维生素C重复实验,得到维生素C溶液吸光度随时间变化曲线.由曲线斜率即可求得酶活力^[19].计算公式为酶活力= $(A_t - A_0)/14$,式中 A_t 表示在t时测得的吸光度值, A_0 表示初始测得的吸光度值.

桃花精油对TYR活性抑制率测量,利用反应结束时溶液的吸光度进行计算.上述步骤可得到样品的吸光度($A_{样}$);将上述步骤中桃花精油和左旋多巴溶液换为等体积 H_2O ,测量得到背景溶液吸光度($A_{背景}$);将上述步骤中桃花精油分别换为等体积 H_2O ,得到空白样品的吸光度($A_{空白}$);将上述步骤中左旋多巴溶液换为等体积 H_2O ,得到样品背景的吸光度($A_{基底}$).TYR活性抑制率(K)计算公式为^[19-20]

$$K = \frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{背景}}) - (A_{\text{样}} - A_{\text{基底}})}{A_{\text{空白}} - A_{\text{背景}}} \times 100\%.$$

将实际样品桃花精油分别换为等体积维生素 C 和桃花面霜,重复操作,可得到不同实际样品的 K . 所有实验重复 3 次.

1.7 ·OH 清除能力测定

通过紫外-可见光吸光度法间接检测体系中芬顿(Fenton)反应·OH 量的变化^[10]. (1)在试管中依次加入 1.00 mL 750.0 $\mu\text{mol/L}$ 的邻二氮菲溶液、2.00 mL PBS 缓冲液和 1.00 mL H_2O ,充分混匀后加入 1.00 mL 750.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 FeSO_4 溶液,混匀后加入 1.00 mL 0.01% H_2O_2 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴反应 1 h,测量吸收波长为 536 nm 时溶液的吸光度,记为背景吸光度(A_p);(2)将步骤(1)中 H_2O_2 溶液换成等体积 H_2O ,测量吸光度,为水的吸光度(A_B);(3)将步骤(2)中 1.00 mL H_2O 分别换成 1.00、1.25、1.50、1.75 和 2.00 mL 桃花精油、桃花面霜和维生素 C,分别测得不同添加量时不同样品吸光度值(A_s). 重复 3 次. 不同添加量时不同样品对·OH 清除率(d)计算公式为

$$d = \frac{A_s - A_p}{A_B - A_p} \times 100\%.$$

1.8 桃花面霜试用问卷调查

通过线上及线下的方式征集 100 名志愿者进行桃花面霜样品试用,试用人群可分为男性、女性,青年、中年人等群体. 其中,18~20、21~35 和 36~50 岁试用者所占比例分别为 10.00%、75.00% 和 15.00%.

桃花面霜使用方法:皮肤清洗洁净后取适量产品涂匀于部分皮肤表面,试用期限为 10 d. 为保证实验的准确性,在试用进行期间,所有志愿者均停用其他化妆品.

试用结束后,所有志愿者填写对桃花面霜试用效果的问卷调查. 问卷内容的设计主要是根据日常护肤品所具有的滋润、美白、去皱和祛痘等功效展开. 问卷调查主要采用多项选择题型,作答以志愿者的个人感官评价为准.

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 使用 Excel 软件对数据进行处理分析.

2 实验结果

2.1 TYR 活性抑制率

不同时间不同样品对 TYR 活性变化曲线如

图 1 所示. 在 0~14 min,所有样品溶液的 TYR 酶活力随时间变化呈现较好的线性关系. 在样品使用量为 0.50 mL 时, H_2O 、维生素 C、桃花精油和桃花面霜作用下, TYR 活力值分别为 30.89、8.02、22.15 和 26.99 Abs/min; 当使用量为 0.50 mL 时,反应 14 min 后,维生素 C、桃花精油和桃花面霜对 TYR 活性抑制率分别为 74.09%、28.33% 和 12.90%.

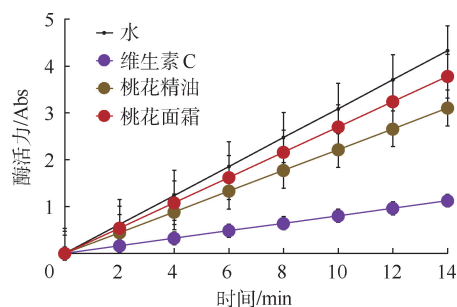


图 1 不同样品对酪氨酸酶活力随时间变化曲线

2.2 ·OH 清除能力

不同用量时,反应 1 h 后各样品对·OH 的清除率曲线如图 2 所示. 在样品体积为 1.25 mL 时,维生素 C、桃花精油和桃花面霜对·OH 的清除率基本趋于平衡. 在样品用量为 1.25 mL 时,维生素 C、精油和面霜对·OH 的清除率分别为 41.99%、18.31% 和 7.59%.

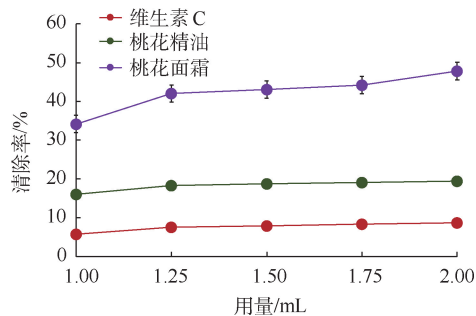


图 2 不同用量时各样品对羟基自由基的清除率

2.3 问卷调查结果

本次共发放和收回问卷 100 份,问卷有效率为 100%. 调查结果显示:46.00% 的试用者表示涂抹该产品感到滋润,36.00% 的试用者表示使用该产品感受到了美白效果,29.00% 的试用者认为其对皱纹及痘痘有一定祛除功效,5.00% 和 2.00% 的试用者认为该产品有其他效果和无效果.

3 讨论

维生素 C 为强还原剂,其对 TYR 活性的抑制性

极大.本研究以维生素C作为TYR抑制力的判断基准衡量桃花精油和桃花面霜对TYR的抑制水平.由TYR活性抑制和 $\cdot\text{OH}$ 清除实验可知,桃花精油与桃花面霜均对TYR具有一定的活性抑制作用,同时对 $\cdot\text{OH}$ 具有一定的清除能力;将不同样品对TYR活性抑制率和清除率按大小排序为:维生素C、桃花精油、桃花面霜.说明虽然与同等水平的维生素C相比,桃花精油和桃花面霜对TYR的抑制率和对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率较低,但桃花精油和桃花面霜具备一定的抑制TYR活性和清除 $\cdot\text{OH}$ 的功效,同时证明添加了桃花活性提取物的化妆品存在一定的美白和抗衰老功效.

调查结果表明使用桃花面霜后,46.00%的志愿者认为桃花面霜护肤作用明显,试用产品有护肤功效.调查中,所有样本未出现过敏反应,表明本试用产品致敏概率较低.本研究虽然只进行了TYR活性抑制和 $\cdot\text{OH}$ 清除实验,表明桃花提取物具有美白和抗衰老功效,而志愿者试用后的问卷调查结果显示,试用产品除具有皮肤美白和祛皱效果,还具有滋润和祛痘作用.这是因为采用无水乙醇提取的桃花有效成分很多,本课题组前期已通过气相色谱质

谱(GCMS)仪分析了桃花精油中的成分,表明桃花精油中至少含有20种以上物质,包含黄酮和多酚等有效成分^[17].研究表明,黄酮类物质能够阻止过氧化物对皮肤的破坏,减少了皮肤中蛋白质的变性和破坏^[3],从而使皮肤的屏障功能发挥作用,达到志愿者所体验到的皮肤美白、祛皱、滋润和祛痘效果.而维生素C在护肤的功效主要表现在美白和抗衰老,而没有研究表明其具有祛痘效果.因此,这也间接表明桃花提取物的护肤功能更多样.

4 结束语

本文研究了桃花提取物对TYR的抑制作用和对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力,从理论实验层面证实桃花提取物具有一定的皮肤美白和抗氧化作用.将其制成桃花面霜后进行试用和问卷调查,结果表明试用产品对皮肤的美白、祛皱、滋润和祛痘效果较为显著.然而,在实验调查的过程中,仍有可能存在志愿者试用产品时间较短和问卷设计粗糙等问题.在下一步,将以桃花精油其他方面的保健效果为方向,扩大研究层面,探索桃花作为天然生物质能给人所带来的更多益处.

参 考 文 献

- [1] 刘月恒. 松茸美白活性成分提取及其多糖分离纯化[D]. 北京:北京工商大学,2011.
- [2] 熊东彦,李志远,黄丹,等. 酪氨酸酶结构功能分析及其抑制物的设计[J]. 科技与创新, 2017(13): 118-119.
- [3] 谭文波,卢义红,谭刚. 木瓜黄酮的抗皮肤衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(23): 5218-5219.
- [4] 王方,王灿. 白芷醇提物延缓皮肤衰老与抗氧化作用的相关性研究[J]. 中国药房, 2012, 23(7): 599-602.
- [5] 陆海丽,梁景文,苑婷婷. 桑枝黄酮的提取及抗氧化作用研究[J]. 轻工科技, 2019, 35(11): 14-15+37.
- [6] 谭冰,严焕宁,廖惠娴,等. 广西茉莉花叶总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究[J]. 食品科技, 2012, 37(6): 244-246.
- [7] 吴冬青,安红钢,齐亚娥,等. 九种药用植物花黄酮类物质提取及对羟自由基清除能力的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 514-517+548.
- [8] 袁建梅,耿明江,闫瑞芳,等. 超声提取桃花多酚的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2012, 37(12): 179-183.
- [9] 王广要,周虎,曾晓峰. 植物精油应用研究进展[J]. 食品科技, 2006(5): 11-13+14.
- [10] 纪红. 以花为食[J]. 贵阳文史, 2017(2): 30-33.
- [11] 刘娜娜,王馨悦,白拉拉,等. 以精油提取法研制桃花乳[J]. 生物化工, 2018, 4(2): 94-96+102.
- [12] 马永鹏,张红霞,杜芝芝. 云南高原芳香植物精油在化妆品中的应用[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 146-154.
- [13] 刘杰超,张春玲,吕真真,等. 桃花中总酚和总黄酮的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1750-1756.
- [14] 王英锋,焦燕,王慧彬,等. 半枝莲中黄酮成分的提取纯化及LC-MS检测[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2009, 30(5): 32-34.
- [15] 郭彩珍,邵芬娟,闫桂琴. 桃花多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2009, 40(增刊1): 156-158.

- [16] 耿明江, 刘振岭, 席荣英, 等. 正交法优选桃花精油的提取工艺[J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(4): 364–365.
- [17] 高洪坤, 孙嘉晨, 侯磊磊, 等. 乙醇法提取桃花精油的工艺研究及桃花精油的成分分析[J]. 生物资源, 2018, 40(2): 182–185.
- [18] 黄雪秋, 韦有杰, 谢彝健, 等. 葡萄籽中原花青素的提取及在护肤品中的应用[J]. 山东化工, 2019, 48(18): 5–6+8.
- [19] 孙文凯, 高翠平, 袁怀波, 等. 沙棘黄酮对酪氨酸酶活力抑制作用的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(5): 190–193+198.
- [20] 吴颖, 崔彬清, 王露, 等. 5 种天然植物提取物抗氧化性和酪氨酸酶抑制作用的比较[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 81–86+37.

Biological Activity Analysis and Skin Care Effect of Peach Blossom Essential Oil

SUN Jiachen¹ HUANG Yu¹ WANG Na¹ GAO Hongkun¹ ZHANG Heng^{1,2}

(1. Collge of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao Shandong 266042;

2. State Key Laboratory Base of Eco-chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao Shandong 266042)

Abstract: In order to analyze the whitening and anti-aging effects of the effective components of peach blossom extract on skin, peach blossom essential oil was extracted by ethanol, and the essential oil was prepared into cream. The inhibition rate of tyrosinase activity and the scavenging rate of hydroxyl radicals in different samples were analyzed by UV-Vis spectrophotometer. Meanwhile, volunteers were asked to try the peach blossom cream and fill in the questionnaire. When the dosage was 0.50 mL, the inhibitory rates of tyrosinase activity of peach blossom essential oil and peach blossom cream were 28.33% and 12.90% respectively after 14 min. When the dosage was 1.25 mL, the scavenging rates of hydroxyl radicals of peach blossom essential oil and peach blossom cream were 18.31% and 7.59% respectively. According to the survey by questionnaire, the trial participants believe that peach blossom cream has a certain degree of skin whitening, moistening, removing wrinkle and acne effects.

Keywords: peach blossom; essential oil; face cream; hydroxyl radical; tyrosinase; skin care; bioactivity