

丽人饮工艺研制及其美白抗氧化功效评价

李英^{1,2} 李欣^{1,2} 孟瑞丽^{2,3} 张永杰^{2,3} 汪丹¹ 魏贺敏¹

(1.山西振东五和医养堂股份有限公司; 2.药食同源功能食品山西省重点实验室; 3.山西振东制药股份有限公司 山西长治 047100)

摘要: 以茯苓、白芷、甘草、燻桃仁和枸杞子、人参、重瓣红玫瑰为主要原料, 研制一款保健美白抗氧化饮品, 通过测定和评价不同工艺参数对饮品感官品质和美白抗氧化功效的影响, 确定最佳工艺条件。结果表明, 该工艺配方调配出的饮品色泽诱人, 呈现紫红色、均匀, 酸甜爽口, 具玫瑰特有的气味与滋味, 口感醇厚, 取名“丽人饮”。利用斑马鱼模型评价其美白及抗氧化活性, 能够显著抑制斑马鱼黑色素生成, 具有良好的美白活性和抗氧化活性。

关键词: 丽人饮; 保健饮品; 加工工艺; 美白; 抗氧化

黄帝内经曰:“夫精明五色者, 气之华也”, 五色即面部五种颜色(黄白青黑赤), 气之华, 是说人体的颜面是五脏(心肝脾肺肾)之气在外的华彩, 要想皮肤好, 内调离不了。

中医美白是在中医理论指导下, 运用中药调理脏腑、平衡阴阳, 以达到美白的目的。西医美白多采用外治法以治标为重, 虽有疗效快的优点, 但毒副作用明显, 且疗效很不稳定。女人一到中年, 十有八九气虚、气滞、血瘀、气血不足, 从而导致肤质暗淡、粗糙、发黄、色黑, 长斑、长皱纹、痘印、毛孔粗大、红血丝。中医美白因采用内调法治疗, 以治本为主, 毒副作用小, 疗效也相对稳定。针对现代女性健康美白的需求, 课题组研制了中药健康饮品丽人饮, 课题组采用斑马鱼动物实验建立抗氧化模型, 并观察其对黑色素密度的作用效果, 用来佐证其“养血活血、提高免疫”的功效, 同时为中药功效评价模型的建立提供借鉴。

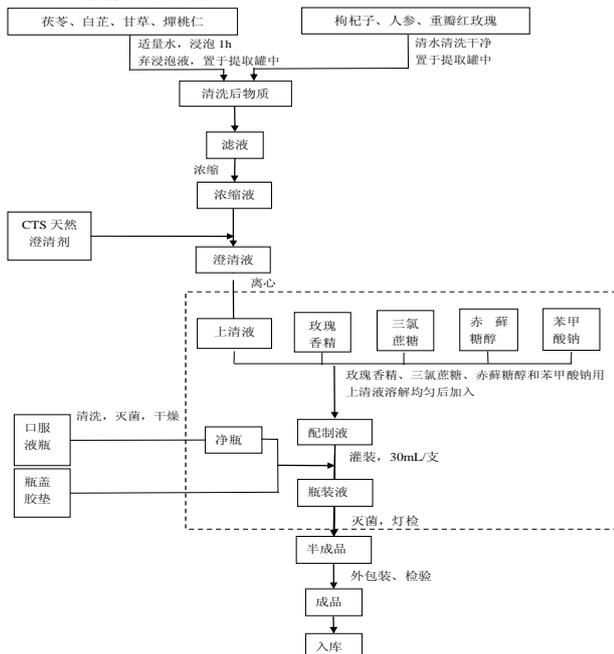
1. 材料与工艺

1.1 材料与设备

丽人饮的原材料主要包括茯苓、白芷、甘草、桃仁、枸杞子、人参、重瓣红玫瑰组成。

设备: 立式压力蒸汽灭菌锅, 型号: BXM-100VE, 厂家: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 台式低速离心机, 型号: TD25-WS, 厂家: 长沙维尔康湘离心机有限公司; 口服液封口机, 型号: KJ-J-1035, 厂家: 温州市凯鲨机械有限公司。

1.2 制作工艺



注: 虚框内示为洁净控制区(10万级);

1.3 操作要点

1.3.1 原料处理

茯苓、白芷、甘草、燻桃仁: 按投料量称取后, 加适量水(超出原料表面 5cm)浸泡 1h。弃浸泡液。枸杞子、重瓣红玫瑰和人参用清水清洗干净。

1.3.2 提取

将茯苓、白芷、甘草、重瓣红玫瑰、桃仁、龙眼肉、枸杞子和人参八种原料投入提取罐中, 加 8 倍水煮沸提取 2 次, 每次 2h, 过 80 目筛网, 合并滤液。

1.3.3 浓缩

将上述滤液, 减压浓缩至相对密度 1.013g/mL 即可。

1.3.4 澄清

配制 1%天然 CTS 澄清剂加入, 常温(20-25℃)絮凝 3h, 得澄清液。

1.3.5 离心

将澄清液用管式离心机离心分离, 转速 17000r/min, 进液速度 150-200L/h, 保留上清液。

1.3.6 配制

103 罐中加入赤藓糖醇、苯甲酸钠、玫瑰香精、三氯蔗糖后, 用 400L 上清液溶解, 搅拌 10min, 抽入 202 搅拌罐中, 过 200 目滤芯。剩余上清液加入 103 罐中, 抽入 202 搅拌罐中, 过 200 目滤芯。加水定容, 搅拌 30min, 得配制液。

1.3.7 洗瓶

口服液瓶清洗后, 150℃高压灭菌 10min, 干燥后得净瓶。

1.3.8 灌装

按 30ml/支灌装, 得瓶装液。

1.3.9 灭菌、灯检

将瓶装液 105℃灭菌 30min 后, 灯检, 得半成品。

1.3.10 外包装, 检验

半成品贴签、包装、检验后, 得成品。

二、丽人饮美白抗氧化功效评价

2.1 材料与仪器

2.1.1 动物与试剂

AB 系野生型斑马鱼为山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。

链酶蛋白酶 E、苯硫脲(PTU)、2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)和 N-乙酰-L 半胱氨酸(L-NAC)均购自鼎国昌盛生物科技有限公司, 活性氧(ROS)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

3.1.2 仪器

DP2-BSW 图像采集系统(日本 Olympus 公司);AXIOZOOM.V16 体视荧光显微镜(德国 CarlZeiss 公司);Forma3111 型水套式 CO2 培养箱(美国 Forma 公司);斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司)。

4.1.3 方法

5.1.3.1 丽人饮美白活性的检测

选用健康 AB 系斑马鱼胚胎作为实验对象,在胚胎发育至 20hpf (hourpostfertilization) 时,使用 1.0mg/mL 链酶蛋白酶 E 溶液脱去卵膜。在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎,移入 24 孔培养板中,设置空白对照组(胚胎培养用水)、阳性对照组(PTU)和丽人饮处理组(1.25、2.5 和 5 μ L/mL),每组 10 条斑马鱼,同时设置 2 个复孔,并置于 28 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养 24h。处理结束后,使用麻醉剂麻醉斑马鱼,显微镜下观察黑色素生成情况并拍照,利用 Image-ProPlus 软件计算黑色素面积,利用 GraphPadPrism6.0 软件对结果进行统计,统计数据用相对 $\bar{x} \pm SEM$ 表示,统计学差异通过 t 检验检测分析, $p < 0.05$ 为具有统计学差异。

6.1.3.2 丽人饮抗氧化活性的检测

选用健康 AB 系斑马鱼胚胎作为实验对象,在胚胎发育至 24hpf (hourpostfertilization) 时,使用 1.0mg/mL 链酶蛋白酶 E 溶液脱去卵膜。在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎,移入 24 孔培养板中,设置空白对照组、AAPH 造模组(AAPH12.5mM)、L-NAC 阳性对照组(AAPH12.5mM+L-NAC200 μ M)和丽人饮处理组(AAPH12.5mM+丽人饮 1.25 μ L/mL、AAPH12.5mM+丽人饮 2.5 μ L/mL 和 AAPH12.5mM+丽人饮 5 μ L/mL),每组 10 条斑马鱼,同时设置 2 个复孔,并置于 28 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养 24h。处理结束后,对斑马鱼进行 ROS 染色,按照说明书操作稀释所需的探针溶液,本实验采用 30 μ M 的工作液(现用现配),各组 28 $^{\circ}$ C 避光染色 40min 后,用新鲜斑马鱼胚胎培养用水清洗染色后斑马鱼 3-5 遍,体式显微镜下观察并拍照,利用 Image-ProPlus 软件对荧光亮度进行分析,利用 GraphPadPrism6.0 软件对结果进行统计,统计数据用相对 $\bar{x} \pm SEM$ 表示,统计学差异通过 t 检验检测分析, $p < 0.05$ 为具有统计学差异。

7.2 试验结果

8.2.1 丽人饮安全剂量评价

如图 1 所示,斑马鱼在 10 μ L/mL 的丽人饮稀释液中暴露 24h 后开始出现畸形情况,在 80 μ L/mL 的丽人饮稀释液中暴露 24h 后开始出现死亡情况,说明丽人饮稀释液浓度 $\geq 10 \mu$ L/mL 时,会影响斑马鱼发育,所以选定非致畸、非致死浓度(1.25、2.5 和 5 μ L/mL)为安全剂量进行活性检测实验。

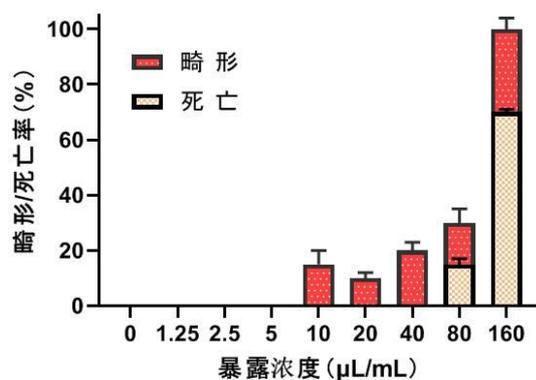


图 1 丽人饮对斑马鱼畸形率和死亡率的影响

1.2.2 丽人饮美白活性评价

Control 组为空白对照组,使用胚胎培养用水处理斑马鱼,没有任何药物处理;阳性对照组为 PTU 处理组;样品处理组是浓度为 1.25、2.5 和 5 μ L/mL 的丽人饮稀释液。如图 2 所示,PTU 组与 Control 组相比,黑色素明显减少;丽人饮各浓度处理组与 Control 组相比,黑色素也存在一定程度减少,说明丽人饮能够抑制黑色素生成,具有显著美白活性。

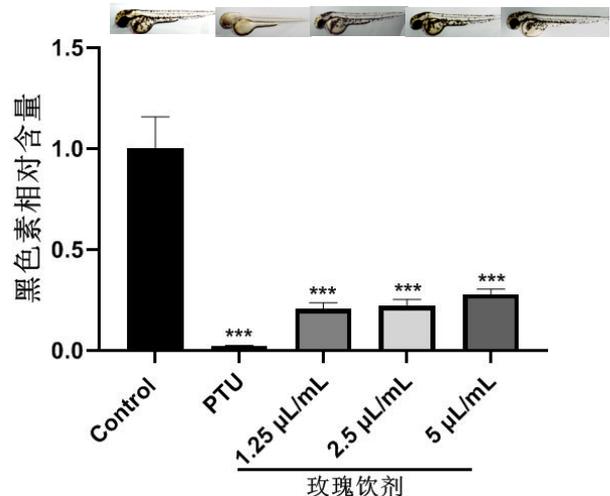


图 2 丽人饮对斑马鱼美白活性和黑色素的影响

标尺为 500 μ m

图 2 中对应组别黑色素面积统计结果,各组数据是以 Control 组数值为标准进行标准化的结果,***表示与 Control 组(空白对照组)比较 $p < 0.001$ 。

1.2.3 丽人饮抗氧化活性评价

Control 组为空白对照组,使用胚胎培养用水处理斑马鱼,没有任何药物处理;AAPH 为造模组,阳性对照组为 AAPH 和 L-NAC 共处理;样品处理组是 AAPH 分别与浓度为 1.25、2.5 和 5 μ L/mL 的丽人饮稀释液共处理。如图 4、图 5 所示,Control 组 ROS 水平较低;AAPH 组与 Control 组相比,ROS 水平显著升高;L-NAC 能一定程度上缓解 AAPH 引起的 ROS 水平升高情况;同样地,丽人饮稀释液各浓度组也能缓解 AAPH 引起的 ROS 水平升高情况,说明丽人饮具有显著抗氧化活性。

标尺为 200 μ m。

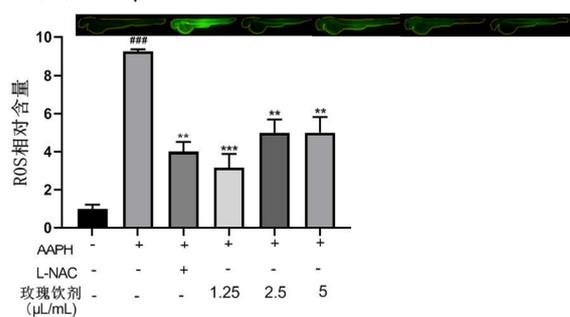


图 3 丽人饮对斑马鱼抗氧化活性统计结果

图 3 中对应组别 ROS 荧光强度统计结果,各组数据是以 Control 组数值为标准进行标准化的结果,###表示与空白对照组比较 $p < 0.001$,**表示与造模组(AAPH)比较 $p < 0.01$,***表示与造模组(AAPH)比较 $p < 0.001$ 。

1.2.4 结论

该试验结果表明,丽人饮能够显著抑制斑马鱼黑色素生成,说明丽人饮具有显著的美白活性;丽人饮能够显著降低斑马鱼中 ROS 水平,说明丽人饮具有显著的抗氧化活性。综上所述,丽人饮具有良好的美白活性和抗氧化活性。

3、讨论

我国人民使用中草药来美白历史悠久。美白类中草药种类繁多、成分复杂,即使功效相同,机制也不一定相同。对于某些有美白功效的中草药还不能清晰了解其机制,有时笼统地归结于抑制酪氨酸酶活性,且相关美白类中草药有效成分的副作用及安全性研究较薄

(下转第 106 页)

(上接第 102 页)

弱 [1, 2]。

白芷能“长肌肤，润泽，可作面脂”^[1]。桃仁有祛除淤血、抗炎和抗过敏的作用，能够抑制黑色素沉着，淡化斑点。甘草提取物中的疏水成分光甘草定具有很好的抗炎美白的功效^[4]。枸杞子富含枸杞多糖、枸杞总黄酮、类胡萝卜素等多种活性成分。清除自由基，抗氧化，调节免疫，延缓衰老。人参补气健脾，生津安神；全方采用药食同源的组成，以保证长期服用无毒性。枸杞多糖可健脑护心^[5-6]；玫瑰花具有抗氧化活性、调节血脂、抗血栓等作用^[7]；其中，酚类和黄酮类等含量较为丰富。多酚及鞣质均可抑制酪氨酸酶活性^[8-9]，且玫瑰发酵液浓度越高，其对酪氨酸酶活性的抑制效果越强。多酚是多羟基酚类的总称，具有很强的抑菌、抗氧化性、抗肿瘤、抗衰老等功效^[10]。黑色素的生成过程需要氧化条件，而氧化条件也是影响酪氨酸酶活性发挥的重要因素^[11]。

总之，通过实验研究表明：丽人饮的药效物质能抑制酪氨酸酶的活性，减少斑马鱼中 ROS 水平，从而抑制了酪氨酸酶的产生，实现抑制斑马鱼胚胎黑色素生成的效果，可能具有美白药品开发的前景。

参考文献：

- [1] 龚坚, 刘朝圣. 美白中药实验研究进展 [J]. 中医药导报, 2015, 21(16):100103.
[2] 王一帆, 赖家珍, 龙晓英, 等. 中药美白机制及功效评价进

展 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(4):525-529.

[3] 李海馨, 何婧芝, 冯文亚, 等. 白芷美白活性部位初步研究 [J]. 天然产物研究与开发. 2018, 30:425-428, 514.

[4] 张兴琪, 何敬愉, 龚盛昭, 等. 不同种类甘草成分及美白抗敏活性差异研究 [J]. 日用化学工业, 2021, 51(7):648-654.

[5] 董思颖, 陈亮, 张璐, 等. 基于斑马鱼实验模型评价人参玫瑰膏改善气血健康作用 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(9):2295-2298.

[6] 孟 姣, 吕振宇, 孙传鑫, 等. 枸杞多糖药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10):2489.

[7] 贾佼佼, 苗明三. 玫瑰花的化学、药理及应用分析 [J]. 中医学报, 2014, 29(9):1337.

[8] 杨洋, 高航. 玫瑰樱桃复合风味发酵乳的研制 [J]. 中国奶牛, 2015(5):43-46.

[9] 张佳婵, 谢娅霏, 虞旦, et al. 玫瑰花及花渣中黄酮类物质的提取及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(22):226-30.

[10] 张世珍, 高兴盛, 冉翠香, et al. 核桃青皮中多元酚类化合物的提取及含量分析 [J]. 南方农业, 2014, (30):159-62.

[11] 庄永亮, 张燕新, 唐远龙. 玫瑰蜂花粉中不同存在形态酚类物质的组成及其抑制 B 16 黑色素瘤细胞的活性 [J]. 现代食品科技, 2016, 32(8):1-7.