

马齿苋提取物制备工艺、安全性及抗敏功效的研究

王 领¹, 李富恒^{1*}, 程 华², 何聪芬², 董银卯²

¹东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; ²北京工商大学植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100048

摘要:以透明质酸酶抑制率为考察指标,通过正交实验,确定了最佳醇提工艺:乙醇浓度为75%(体积分数),料液比1:10,提取温度60℃,提取时间1h,提取液过滤脱色浓缩冷冻干燥后,得到马齿苋醇提物。同浓度下的马齿苋醇提物的透明质酸酶抑制率远高于水提物,红细胞溶血实验说明马齿苋水提物和醇提物的刺激性低,安全性高。人体斑贴实验表明,马齿苋醇提物能减轻或抑制常见致敏源对皮肤的刺激作用,减弱皮肤炎症反应,增强皮肤的屏障功能。

关键词:马齿苋;制备工艺;安全性;抗敏

中图分类号:Q949.95

文献标识码:A

Study on the Extraction Technology, Safety and Anti-allergic Effect of *Portulaca oleracea* L.

WANG Ling¹, LI Fu-heng^{1*}, CHENG Hua², HE Cong-fen², DONG Yin-mao²

¹ School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

² School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: The anti-allergic effect of the extract of *Portulaca oleracea* L. was evaluated by inhibiting the hyaluronidase. Using the inhibition rate of hyaluronidase as investigation index, the extraction conditions of *P. oleracea* were optimized using the orthogonal tests and were determined as follows: 75% ethanol as extraction solvent, 1:10 (m/v) as ratio of solid to liquid, 60℃ as extraction temperature, and with 1 h's extraction. The hyaluronidase inhibition rate of the ethanol extract was much higher than that of the water extract at the same concentration. The RBC hemolysis experiment indicated that both ethanol extract and water extract of *P. oleracea* had low irritative effect. Human patch test indicated that the ethanol extract can enhance the barrier function of skin, weaken skin inflammation and relieve or restrain the stimulation caused by common sensitization source.

Key words: *Portulaca oleracea* L.; preparation technology; safety; anti-allergic

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.),又名马舌菜、长命菜等,为马齿苋科马齿苋属一年生肉质草本植物。多以其干燥地上部分入药,盛产于四川,遍布全国。马齿苋的营养价值和药用价值极高,是我国卫生部划定的78种药食同源的野生植物之一^[1]。马齿苋含有有机酸、黄酮、萜类、生物碱、香豆素、强心苷、花色苷、不饱和脂肪酸、矿物质、蛋白质、氨基酸、多糖等多种成分^[2,3]。具有清热解毒、凉血止血的功能,常用于热毒血痢、痈肿疔疮、湿疹、丹毒、蛇虫叮咬、便血、痔血和崩漏下血^[4]。现代药理研究表明:马齿苋具有抗菌、抗氧化、抗衰老、抗缺氧、镇痛、抗炎和神经保护等作用。

目前,对马齿苋的抗菌、抗肿瘤、抗氧化及增强免疫功效研究较多。其抗过敏及辅助性治疗皮肤病的功效相对研究较少,宋璞等将含有马齿苋的面贴膜用于激光术后患者的皮肤护理,发现可有效减少激光术后皮肤红斑、敏感、瘙痒等症状,并可提高皮肤含水量^[5]。何黎^[6]等报道使用含马齿苋及甘草提取物护肤品辅助治疗敏感性皮肤,患者乳酸刺激实验、皮肤含水量及皮脂含量等指标有明显改善。但是这些研究仅限于马齿苋提取物的应用,对于马齿苋提取物不同的溶剂提取工艺、提取物的安全性及抗敏功效的基础研究鲜有报道。因此,本实验以马齿苋为研究材料,分别用纯水、不同浓度的乙醇进行提取,比较分析各提取物的透明质酸酶抑制率,确定最优提取工艺,并对提取物进行安全性、功效性评价,以期医药、护肤品行业提供天然的植物原料,也

为马齿苋的深加工及应用提供理论依据和数据支撑。

1 材料与仪器

1.1 材料

马齿苋,于2012年8月采于北京通州郊区,野生,洗净干燥,粉碎过40目筛后备用。柠檬酸、柠檬酸三钠、葡萄糖、十二烷基硫酸钠(SDS)、透明质酸酶(Sigma公司);透明质酸钠(Solarbio公司),分析纯;氢氧化钠、浓盐酸、无水乙醇、对-二甲氨基苯甲醛、乙酸钠结晶、冰乙酸、无水氯化钙、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠(北京化工厂),国产分析纯;乙酰丙酮(国药集团化学试剂有限公司);医用活性炭(青岛冠宝林活性炭有限公司);新鲜兔血取自北京市海淀区兴隆实验动物养殖场。

1.2 仪器

UV-2550(岛津);F80C碎冰制冰机(博威兴业科技发展有限公司);4K15-离心机(Sigma公司);Ultra Bioscience Purelab Vltra-超纯水机(德国 Carl Zeiss公司);真空冷冻干燥机(美国 Virtis公司);FMe-100B摇床(上海福玛实验设备有限公司);HH-1数显恒温水浴锅(江苏东鹏仪器制造有限公司)。

2 实验方法

2.1 水提工艺制备马齿苋提取物

取马齿苋粉20g,按照1:10料液比进行加热搅拌提取,80℃提取2h,过滤,加入质量分数0.5%的活性炭,60℃脱色0.5h,离心过滤,得到马齿苋提取液,浓缩,浓缩液冷冻干燥得到马齿苋提取物冻干粉,备用。

2.2 醇提工艺正交实验设计

各取马齿苋粉20g,按照1:10料液比进行回流提取,选取乙醇浓度、提取时间、提取温度三个因素进行考察,设计正交实验表 $L_9(3^3)$ 如表1,得到的提取液按照2.1中方法脱色、离心、浓缩、制备成冻干

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor		
	提取温度 Extraction temperature(℃)	乙醇浓度 Ethanol concentration(%)	提取时间 Extraction time(h)
1	50	60%	1
2	60	75%	2
3	70	90%	3

粉,备用。以透明质酸酶抑制率作为评价标准,确定马齿苋醇提最佳提取工艺。

2.3 透明质酸酶抑制实验

采用 Elson-Morgan^[7-8]法进行测定,取0.1 mL 0.25 mmol/L CaCl₂溶液和0.5 mL 透明质酸酶液37℃保温培养20 min;加入样品液0.5 mL,继续37℃保温培养20 min;加入0.5 mL 透明质酸钠液37℃保温30 min,常温放置5 min;加入0.1 mL 0.4 mol/L NaOH 溶液和0.5 mL 乙酰丙酮溶液,置于沸水浴中加热15 min 后立即用冰水进行冷却5 min;加入埃尔利希试剂1.0 mL 并用3.0 mL 无水乙醇进行稀释,放置20 min 显色,用分光光度计测定其吸光度值。

$$\text{透明质酸酶抑制率}(\%) = \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100\%$$

式中:A为对照溶液ABS值(用醋酸缓冲溶液代替样品溶液);B为对照空白溶液ABS值(用醋酸缓冲溶液代替样品溶液及酶液);C为试样溶液ABS值;D为试样空白溶液ABS值(用醋酸缓冲溶液代替酶液)。

实验时先对A组试样进行450~700 nm范围的波长扫描,以确定最大吸收波长,然后以去离子水作为参比,在该最大吸收波长处分别进行ABS值测定。

2.4 红细胞溶血实验

2.4.1 溶液配制

2.4.1.1 取Na₂HPO₄ 7.951 g、KH₂PO₄ 0.726 g、NaCl 7.213 g、葡萄糖1.802 g溶解于1 L超纯水中,用稀NaOH溶液调pH=7.4,即为pH=7.4磷酸盐缓冲液(PBS);

2.4.1.2 按照柠檬酸三钠:柠檬酸=66:44 mmol/L,超纯水配制柠檬酸缓冲溶液;

2.4.1.3 用PBS缓冲液配制浓度为0.1%标准表面活性剂溶液(SDS),用于测试SDS溶血标准曲线;

2.4.1.4 测试样品溶液:准确称取水提和醇提马齿苋提取物冻干粉0.05 g,用PBS缓冲液定容至50 mL的容量瓶中,配制成浓度为0.1%的测试原料样品,即1 g/L。

2.4.2 血红细胞悬液(RBC)制备

取新鲜兔血盛装于聚乙烯塑料容器中,按1:9比例加入柠檬酸缓冲液混匀。立即将混匀血样保温于保温箱中,温度为21~22℃内储存。用10 mL 聚乙烯无菌离心管分装采集的血液样本,室温下3000 rpm离心15 min,小心吸弃上清液再用2.5倍PBS

缓冲液洗涤 RBC 2 次(3000 rpm, 15 min)。

2.4.3 RBC 完整性分析

用 PBS 配制 1.0 mg/mL(即质量分数 0.1%)的 SDS 溶液。向 EP 管中依次加入 0、10、20、30、40、50、60、70、80、60、100 μL 的 SDS 溶液,分别加入 PBS 补齐至 975 μL ,快速加入 25 μL RBC 悬液。将各管置于摇床,室温 180 rpm 孵育 10 min,终止孵育。10000 rpm 离心 1 min,取上清液 200 μL 于 530 nm 波长处测吸光度。结果显示,新鲜配制的 RBC 悬液半溶血量约为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明 RBC 完整性良好。

2.4.4 实验步骤

准备测试溶液样品,在 EP 管中分别按照表 2 中的量加入测试样品,然后加入 PBS 补齐到 975 μL ,快速加入 25 μL RBC 悬液。将各管置于摇床,室温 180 rpm 孵育 10 min,终止孵育。10000 rpm 离心 1 min,取上清液 200 μL 于 530 nm 波长处测定吸光度值。阴性对照:975 μL PBS + 25 μL RBC 的溶血率为 0%;阳性对照:975 μL 水 + 25 μL RBC 的溶血率为 100%;一般溶血率高于 20% 时,表示样品的刺激性大。

表 2 样品溶血实验加样表

Table 2 Different volumes of samples added in RBC experiments

序号 NO No.	样品量 Sample amount sample size(μL)	PBS (μL)	RBC (μL)
1(阴性对照) N(negative control)	0	975	25
2	100	875	25
3	200	775	25
4	300	675	25
5	400	575	25
6	500	475	25
7	600	375	25
8	700	275	25
9	800	175	25
10(阳性对照) (positive control) 纯水	975	25	

2.5 人体斑贴实验

斑贴实验(Patch Test)是确定皮炎湿疹患者的致敏原一个简单、可靠的方法。

选取志愿者 30 人,年龄构成和性别随机确定,符合 2007《化妆品卫生规范》纳入、排除标准;选取上背部脊椎两侧皮肤为受试部位,皮肤分为两部分,一部分为空白对照,一部分涂抹含 0.5% 马齿苋醇提物的乳液;然后将加有斑试物的斑试器胶带自下向上贴牢;斑贴试验时间为 48 h;贴敷 48 h 后,去除斑试器,30 min 后观察记录试验结果。详细操作步骤参照斑贴试验诊断试剂盒说明书。结果判断:

(?)—可疑反应;仅有微弱的(不清楚的)红斑;

(+)—弱(无疱的)阳性反应;红斑、浸润、可能有小红疹;

(++)—强(水疱)阳性反应;红斑、浸润、丘疹非小水疱;

(+++)—极度的阳性反应;红肿并有水疱;

(-)—无反应;

(IR)—不同类型的刺激反应;

3 结果与分析

3.1 醇提工艺正交实验结果

前期对马齿苋醇提条件进行单因素试验,选取影响结果最大的乙醇浓度、提取时间、提取温度三个因素设计正交实验,并对 3 个因素进行极差分析,以透明质酸酶活性抑制率为考察指标进行评价,结果见表 3。从中可以看出,各因素对透明质酸酶抑制率的影响程度为提取温度 > 乙醇浓度 > 提取时间,醇提最佳组合 $A_2B_1C_2$,即最佳醇提工艺:75% 乙醇提取,提取时间为 1 h,提取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,提取后制备的冻干粉对透明质酸酶抑制率最佳。

按醇提最佳组合 $A_2B_1C_2$ 进行三次平行实验,制备的冻干粉同浓度下对透明质酸酶抑制率结果基本一致,故确定 $A_2B_1C_2$ 为最佳马齿苋醇提工艺。

表 3 正交实验结果

Table 3 Result of orthogonal design tests

实验号 No.	因素 Factor			
	乙醇浓度 Ethanol concentration(%)	提取时间 Extraction time(h)	提取温度 Extraction temperature($^{\circ}\text{C}$)	透明质酸酶抑制率 Hyaluronidase inhibition(%)
1	1(60)	1(1)	1(50)	45.6
2	1(60)	2(2)	2(60)	73.8
3	1(60)	3(3)	3(70)	82.8

4	2(75)	1(1)	2(60)	92.2
5	2(75)	2(2)	3(70)	89
6	2(75)	3(3)	1(50)	67.7
7	3(90)	1(1)	3(70)	69.6
8	3(90)	2(2)	1(50)	58.8
9	3(90)	3(3)	2(60)	76.5
K1	67.400	69.133	57.367	
K2	82.967	73.867	80.833	
K3	68.300	75.667	80.467	
极差 R	15.567	6.534	23.466	

3.2 马齿苋提取物透明质酸酶抑制结果

透明质酸是组织基质中限制水分和其它胞外物质扩散的成分,被透明质酸酶水解后,细胞间则变为非粘性,引起细胞脱颗粒和合成的新介质渗出,发挥生物效应,导致速发型过敏反应的发生。透明质酸酶是过敏反应的参与者,其与过敏有强相关性,许多抗过敏药物有强抑制透明质酸酶活性的作用^[9],因此常用样品对透明质酸酶的抑制程度来反映样品对I型超敏反应的缓解和改善作用。对水提和最佳醇提工艺制备的马齿苋冻干粉,设定不同的浓度梯度,测定透明质酸酶抑制率。结果见图1,从图中可以看出,马齿苋醇提取物透明质酸酶抑制率同浓度下远远高于马齿苋水提取物,并随着浓度的增大,抑制率呈现增大的趋势。这表明,马齿苋中对透明质酸酶活性有抑制作用的物质多为非极性醇溶物质,比如黄酮、香豆素、生物碱等。因此,对于马齿苋醇提取物中的抗敏功效成分、作用机制及协同作用关系还有待进一步深入研究。

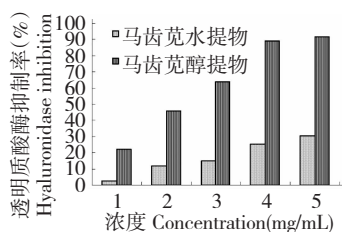


图1 透明质酸酶抑制率结果

Fig. 1 Hyaluronidase inhibition rates of water and ethanol extracts of *P. oleracea*

3.3 马齿苋提取物刺激性测定

红细胞溶血实验是体内眼刺激试验(Draize 试验)的替代实验,其基于测定从红细胞中漏出的血红蛋白的量来评价细胞膜的损伤程度,二者的相关

性分析显示较好的一致性^[10]。马齿苋水提取物和醇提取物在不同的添加浓度下,溶血率均小于10%,见图2。这表明马齿苋提取物刺激性低,安全性高,可在护肤品中安全添加。

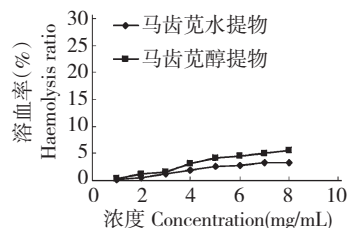


图2 红细胞溶血率实验结果

Fig. 2 Results of RBC hemolysis experiment

3.4 人体斑贴实验结果

从表4中可以看出,涂抹含有0.5%马齿苋醇提取物的乳液后,能大大减缓刺激源对皮肤所造成的损伤,其中山梨酸、布罗波尔、檀香油、聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯、羊毛脂、丙二醇基本无过敏表征,皮肤致敏率接近零,远小于空白对照。其他刺激源对皮肤的刺激性与空白对照相比,也有一定的减缓趋势。这表明涂抹含有马齿苋醇提取物的乳液后,能在一定程度上减轻刺激源造成的过敏炎症反应,提高皮肤耐受性。人体斑贴实验更加直接证明马齿苋醇提取物具有一定的抗敏功效。

表4 人体斑贴实验结果

Table 4 Human patch test result

致敏源 Allergens	空白 Control	乳液 Skin milk
夸特-15 Quaternium-15	27(-) 3(?)	28(-) 2(?)
间苯二酚 Resorcin	26(-) 3(+) 1(?)	29(-) 1(?)

三乙醇胺 TEOA	22(-) 6(+) 2(?)	27(-) 2(+) 1(?)
水杨酸 Salicylic acid	22(-) 7(+) 1(?)	28(-) 2(+)
香草醛 Vanillina	26(-) 4(+)	28(-) 2(?)
山梨酸 Sorbic acid	28(-) 2(+)	30(-)
三氯生 Triclosan	17(-) 12(+) 1(?)	26(-) 2(+) 2(?)
硫柳汞 Thiomersal	11(-) 18(+) 1(?)	18(-) 11(+) 1(?)
丁基化羟甲基苯 BHT	26(-) 3(+) 1(?)	29(-) 1(?)
乙二胺 EDTB	24(-) 4(+) 2(?)	28(-) 1(+) 1(?)
布罗波尔 Bronopol	28(-) 2(?)	30(-)
檀香油 Santal oil	20(-) 9(+) 1(?)	30(-)
聚氧乙烯山梨糖醇酐 单油酸酯 Tween-80	21(-) 8(+) 1(?)	30(-)
十二烷基硫酸钠 SDS	15(-) 13(+) 2(?)	23(-) 5(+) 2(?)
羊毛脂 Lanolin	23(-) 5(+) 2(?)	30(-)
薄荷油 Mint oil	24(-) 5(+) 1(?)	29(-) 1(?)
丙二醇 PG	29(-) 1(+)	30(-)
秘鲁香脂 Peru balsam	24(-) 4(+) 2(?)	28(-) 2(?)
咪唑烷基脲 Imidazolidinylurea	25(-) 4(+) 1(?)	29(-) 1(+)
尼泊金酯 Paraben	18(-) 10(+) 2(?)	28(-) 1(+) 1(?)

4 结论

通过正交实验分别考察了乙醇浓度、提取时间、提取温度三个因素对马齿苋抗敏成分提取的影响,得到醇提最优化提取条件:乙醇浓度为 75%,料液比 1:10,提取时间为 1 h,提取温度为 60 ℃。得到的提取液过滤脱色浓缩冷冻干燥后,得到马齿苋醇提物。

透明质酸酶抑制实验和红细胞溶血实验结果表明:马齿苋醇提物对透明质酸酶抑制率远高于水提物,分析原因主要是马齿苋中的抗敏成分应多为醇溶性物质。

红细胞溶血实验表明马齿苋水提物和醇提物的刺激性低,安全性高。人体斑贴实验进一步验证了

马齿苋醇提物的抗敏功效,具有减轻或抑制常见致敏源对皮肤的刺激作用、减弱皮肤炎症反应,同时能增强皮肤的屏障功能。

本实验建立的方法简单实用,得到的马齿苋醇提物可作为潜在的保健品和抗敏护肤品添加剂,也为马齿苋在更广泛领域的应用提供参考。

参考文献

- Gao L(高莉), Liu J(刘捷), Sui YH(隋彦辉), *et al.* The functional character and exploitation of *Portulaca oleracea* L. *Food Drug*(食品与药品), 2007, 7(10): 26-28.
- Yuan Z(袁仲), Li WH(李伟华). Purslane health function & processing use. *Acade Period Farm Prod Proc*(农产品加工学刊), 2005, 6, 7: 135-137.
- Ding HW(丁怀伟), Yao JQ(姚佳琪), Song SJ(宋少江). Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Portulaca oleracea* L. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2008, 25: 831-838.
- Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. 46-47.
- Song P(宋璞), Li J(李婧), Wang YT(王延婷), *et al.* Clinical effects of winona sensitive skin relief series on skin after laser therapy. *J Clin Dermatol*(临床皮肤科杂志), 2009, 38: 358-360.
- He L(何黎), Wen H(温海), Xu LM(徐丽敏), *et al.* Clinical observation on effects of skin care products containing extract from purslane and licorice in patients with sensitive skin. *J Clin Dermatol*(临床皮肤科杂志), 2009, 28: 364-366.
- Li WY(李晚谊). Studies on antiallergic activities of *Thea sinensis*, *Lithocarpus litseifolius* and *Perilla frutescens* in Yunnan. Chongqing: Southwest Agricultural University(西南农业大学), MSc. 2001.
- Park EK, Choo MK, Kim EJ, *et al.* Antiallergic activity of ginsenoside Rh2. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 1581-1584.
- Kawasaki M, Toyoda M, Teshima R, *et al.* *In vitro* antiallergic activity of flavonoids in histamine release assay using rat basophilic leukemia(RBL-2H3) cells. *J Food Hyg Soc Japan*, 1994, 35: 497-503.
- Liao Y(廖艳), Wang X(王雪), Zhang LS(张立实), *et al.* Study on using Haemolysis test as an Alter native method of Draize eye irritation test. *Mod Prevent Med*(现代预防医学), 2002, 29: 593-595.