

文章编号:1001-6880(2016)12-2006-06

# 黄芩素在化妆品中多功效研究及安全性评价

区梓聪<sup>1</sup>,何秋星<sup>1\*</sup>,李馨恩<sup>1</sup>,关建云<sup>2</sup><sup>1</sup>广东药科大学医药化工学院; <sup>2</sup>中山市后本草化妆品有限公司,中山 528458

**摘要:**本文以黄芩素为研究对象,通过生化酶学法、自由基清除测试、最低抑菌浓度(MIC)测定及红细胞溶血实验等实验,对其进行美白、抗氧化、抗过敏、抑菌等功效研究及安全性评价。结果显示,浓度达到2.0 mg/mL的黄芩素,对酪氨酸酶的抑制率为60.20%;当浓度达到0.1 mg/mL和1.0 mg/mL时,其对DPPH·和·OH清除率分别为95.21%和66.69%;当浓度达到10.0 mg/mL时,对透明质酸酶的抑制率是52.51%;当浓度达到1.25 mg/mL时,其对5种菌均有抑制作用;其半数溶血率(HD<sub>50</sub>)为1.80 mg/mL,蛋白质变性指数(DI)为0.34,HD<sub>50</sub>/DI(H/D)>10。实验表明,黄芩素具有较好的美白、抗氧化、抗过敏、抑菌功效且具有安全性。

**关键词:**黄芩素;化妆品;多功效;安全性

中图分类号:TQ658

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.027

## Multiple Efficiency and Safety of Baicalein in Cosmetics

OU Zi-cong<sup>1</sup>, HE Qiu-xing<sup>1\*</sup>, LI Xin-en<sup>1</sup>, GUAN Jian-yun<sup>2</sup><sup>1</sup>Guangdong Pharmaceutical University, School of Chemistry and Chemical Engineering;<sup>2</sup>Zhongshan Herbal Cosmetic Co. Ltd., Zhongshan 528458, China

**Abstract:** In this study, the properties of baicalein such as whitening, antioxidant, antiallergy, antibacterial and safety were evaluated using biochemical enzyme method, free radical scavenging assay, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and experimenting hemolysis. The results showed that the inhibition rate of tyrosinase was 60.20% (2.0 mg/mL of baicalein), the scavengingrate of DPPH· and ·OH was 95.21% and 66.69% respectively (0.1 mg/mL and 1.0 mg/mL of baicalein), and the inhibition rate of enzyme was 52.51% (10.0 mg/mL of baicalein). In addition, when the concentration of baicalein reached 1.25 mg/mL, it had inhibitory effect on the five kinds of bacteria. Its half hemolysis rate (HD<sub>50</sub>) was 1.80 mg/mL, protein denaturation index (DI) was 0.34, and HD<sub>50</sub>/DI (H/D) > 10. The experiments proved that baicalein exhibited better performance in whitening, antioxidant, antiallergy and antibacterial effects.

**Key words:** baicalein; cosmetics; multiple efficiency; safety

近年来,化妆品为了顺应消费心理和“回归自然”的潮流,生产商纷纷选用毒副作用小、疗效显著、稳定性高的天然物质作为原料,以减少化学物质给消费者带来的危害<sup>[1]</sup>。中草药的应用源远流长,是我国医学库中的瑰宝,其具有天然、多功效、疗效显著等特点,将中草药及其活性成分应用在化妆品中,既满足了绿色天然的主题,亦符合当今世界化妆品的发展趋势。其中,活性物的多功效性研究及安

全性评价,亦是化妆品原料研发的新趋势。

黄芩素(Baicalein)化学名为5,6,7-三羟基黄酮,是唇形科植物黄芩(*Scutellaria Baicalensis*)干燥根中主要有效成分之一<sup>[2]</sup>,在生药中占其含量的5.41%<sup>[3]</sup>。近现代研究表明,黄芩素具有抗菌、抗病毒、抑制炎症反应、保肝、利胆、利尿、抗癌等作用,具有很好的临床应用价值<sup>[4]</sup>,因其具有多方面的作用而受到国内外学者的关注,并对其进行了大量的深入研究。然而,黄芩素作为一种多功效活性物应用于化妆品中鲜有报道。本文综合国内外关于黄芩素的研究报道,结合现代生物理论,选用化妆品行业中常用的体外评价方法,对其具有美白、抗氧化、抗过敏、抑菌多种功效进行研究,并遵循欧盟提出的“3R”原则,采用红细胞溶血实验方法评价黄芩素的

收稿日期:2016-07-06 接受日期:2016-09-29

基金项目:“2015年广东药科大学‘创新强校工程’化妆品研发人才培养模式创新实验室资助项目”(gyzlgc201503);“广东省化妆品工程技术研究中心”资助项目;“2015年广东药科大学‘创新强校工程校级培育教学成果奖培育项目’构建校企协同育人平台,探索培养适应区域经济发展的化妆品应用型人才资助项目”

\*通讯作者 Tel:86-015913344566; E-mail:heqixing@126.com

眼刺激性,为安全、多功效型中药化妆品的研发和推广提供思路及理论依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验指示菌株

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*, ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*, ATCC 14053) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*, ATCC 16404), 均购于广东省微生物研究所。大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基, 黑曲霉和白色假丝酵母采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

#### 1.1.2 试剂

黄芩素单体(纯度为98%,陕西慈缘生物技术有限公司)、酪氨酸酶(BR,美国Worthington试剂公司)、 $\alpha$ -甲基多巴(L-DOPA)(BR,上海伊卡生物技术有限公司)、2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)(BR,阿拉丁试剂有限公司)、维生素C(L-抗坏血酸)(AR,美国Sigma试剂公司)、透明质酸酶(BR,美国Sigma试剂公司)、透明质酸钠(BR,山东福瑞达生物化工有限公司)、其它化学试剂均为国产分析纯。

表1 各反应液含量表

Table 1 The compositions of restrain enzyme reagent

组别 Group	受试物 Sample (mL)	磷酸(盐)缓冲液 PBS (mL)	$\alpha$ -甲基多巴 L-DOPA (mL)	酪氨酸酶 Tyrosinase (mL)
1	0	2.0	1	0
2	0	1.5	1	0.5
3	0.5	1.5	1	0
4	0.5	1.0	1	0.5

#### 2.1.2 抗氧化测试

##### 2.1.2.1 DPPH·清除率测试

精密移取2.0 mL DPPH·乙醇溶液(0.2 mmol/L), 加入2.0 mL受试液, 充分混合后在暗处静置30 min, 以无水乙醇为参比, 517 nm处测定其吸光度, 重复测定3次, 结果取平均值。按以下公式计算各供试液对DPPH·的清除率<sup>[7,8]</sup>:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} (\%) = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100\%$$

式中  $A_i$  为样品与 DPPH· 反应后体系的吸光度;  $A_j$  为样品本身吸光度(以2.0 mL乙醇代替 DP-

试剂。

#### 1.1.3 动物

新西兰白兔(体重约2.5 kg),由广东药科大学实验动物中心提供。

## 1.2 仪器

紫外可见分光光度计(UV1000,上海天美科学仪器有限公司)、立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-50KBS,上海申安医疗器械厂)、多用途生物显微镜(XSP-44X.9,上海光学仪器厂)。

## 2 实验方法

### 2.1 多功效测试

#### 2.1.1 酪氨酸酶抑制率测试

取黄芩素单体,加适量二甲基亚砜溶解,再用磷酸(盐)缓冲溶液(PBS)稀释、定容,配制成浓度为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/mL的黄芩素溶液。按表1准备四组反应液。先后加入PBS(pH≈6.8)、酪氨酸酶(100 U/mL)、受试样品液,于37 °C水浴恒温10 min,再加入1 mL的L-DOPA溶液(1.5 mmol/L),37 °C反应到5 min时立即测定475 nm处的吸光度,各反应组吸光度分别为  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  和  $A_4$ <sup>[5,6]</sup>。以熊果苷为阳性对照,平行实验3次,结果取平均值。按以下公式计算各样品对酪氨酸酶的抑制率:

$$\text{抑制率} (\%) = (1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2}) \times 100\%$$

PH·乙醇溶液);  $A_0$  为未加样品空白值(以无水乙醇代替样品)。以维生素C为阳性对照。

##### 2.1.2.2 ·OH 清除率测试

采用Fenton反应产生羟自由基。反应体系中先加入1.0 mL FeSO<sub>4</sub>(9.0 mmol/L)、1.0 mL水杨酸乙醇溶液(9.0 mmol/L)、1.0 mL受试液,再加入1.0 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(8.8 mmol/L),于37 °C下反应30 min,以无水乙醇为参比,510 nm处测定其吸光度<sup>[9]</sup>,重复测定3次,结果取平均值。按以下公式计算各供试液对·OH的清除率:

$$\cdot \text{OH 清除率} (\%) = \frac{A_0 - A_x - A_{x0}}{A_0} \times 100\%$$

式中  $A_0$  为空白对照液(以无水乙醇代替样品)的吸光度,  $A_x$  加入样品后反应体系的吸光度,  $A_{x0}$  为不加  $\text{H}_2\text{O}_2$  的样品(以无水乙醇代替  $\text{H}_2\text{O}_2$ )本底吸光度。以维生素 C 为阳性对照。

### 2.1.3 抗过敏功效测试

取 0.1 mL  $\text{CaCl}_2$  溶液(0.25 mmol/L)和 0.5 mL 透明质酸酶液(1250 U/mL)于 37 °C 下水浴恒温培养 20 min;加入受试样品液 0.5 mL,继续在保温 20 min;再加入 0.5 mL 透明质酸钠液(0.5 mg/mL),37 °C 水浴恒温培养 30 min 后取出,在常温下放置 5 min;加入 0.1 mL NaOH 溶液(0.4 mol/L)和 0.5 mL 乙酰丙酮溶液(3.5 mL 乙酰丙酮溶于 50 mL 的 1.0 mol/L 碳酸钠溶液中),于沸水浴中加热 15 min 后立即转移至冰水水浴冷却 5 min;滴加 1.0 mL 埃尔利希试剂(0.8 g 对-二甲基氨基苯甲醛溶于 15 mL 浓盐酸和 15 mL 无水乙醇中),并用 3.0 mL 无水乙醇稀释,室温放置 20 min 显色,用分光光度计测定波长为 540 nm 处吸光度值<sup>[10,11]</sup>。样品对透明质酸酶抑制率的测定计算公式如下<sup>[12]</sup>:

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

式中:A——对照溶液吸光度值(用醋酸缓冲溶液代替样品溶液);B——对照空白溶液吸光度值(用醋酸缓冲溶液代替样品溶液及酶液);C——试样溶液吸光度值;D——试样空白溶液吸光度值(用醋酸缓冲溶液代替酶液)。

### 2.1.4 最小抑菌浓度(MIC)测定

采用试管 2 倍稀释法测定 MIC。取 9 支灭菌试管,各管分别加入牛肉膏蛋白胨液体培养基或马铃薯葡萄糖液体培养基 1 mL,在第 1 管中加入 1 mL 灭菌的 10 mg/mL 黄芩素溶液(40% 乙醇溶解),混匀后吸取 1 mL 加入到第 2 管中,依此类推,直至第 7 管,第 7 管吸取 1 mL 弃去,使其成 1:2、1:4、1:8 等浓度梯度。向 1-7 管中分别加入 0.1 mL 菌液,第 8 管只加培养基和菌液,不加样品作为阳性对照。第 9 管只加培养基和受试液,不加菌液作为阴性对照。细菌于 37 ± 1 °C 培养 24 h,真菌于 28 ± 1 °C 培养 48 h。肉眼观察试管浊度,以不显示浊度的最低药液浓度作为 MIC。并从以上培养物中分别取 0.1 mL 涂布于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基平板上,于 37 ± 1 °C 或 28 ± 1 °C 下培

养后观察,以进一步验证上述试管法的肉眼观察结果,以无菌生长的最低稀释度为 MIC<sup>[13,14]</sup>。

## 2.2 红细胞溶血实验

### 2.2.1 红细胞悬液的制备

将新鲜采集的兔血分装至聚乙烯离心管,每管 3~5 mL,然后加入 37 °C 水浴的 PBS 溶液,于 1500 rpm 下离心 10 min。移除上清液和白细胞层,再次加入 PBS 溶液并离心,重复以上操作 3 次<sup>[15]</sup>。密封后保存于 4 °C 冰箱备用。实验前,将 RBC 血样取出放置至室温,加入 PBS 溶液使 RBC 中血细胞浓度约为  $8 \times 10^9$  个/mL,备用。

### 2.2.2 溶血及蛋白变性测定

取适量二甲基亚砜溶解黄芩素,并用 PBS 溶液定容,配制成浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的黄芩素溶液。每个浓度组取 2 支具塞试管,分别加入受试液 2 mL;阴性对照组 2 支具塞试管,每管加入 PBS 溶液 2 mL;阳性对照组 2 支具塞试管,每管加入蒸馏水 2 mL。每支试管加入 2 mL 稀释兔血,轻轻混匀,37 °C 孵育 30 min。结束后,离心 15 min,1500 rpm,吸取上清液移入比色皿内,于分光光度计 540 nm,560 nm 及 575 nm 测其吸光度(A)值。按公式①计算溶血率(%),公式②计算血红蛋白变性指数 DI(%)<sup>[16]</sup>:

$$\text{溶血率} (\%) = \frac{A_{560 \text{ 受试管}} - A_{560 \text{ 阴性管}}}{A_{560 \text{ 阳性管}} - A_{560 \text{ 阴性管}}} \times 100\%$$

$$\text{DI} (\%) = \frac{R_1 - R_2}{R_1 - R_3} \times 100$$

式中:  $R_1$  为空白对照蒸馏水的离心上清液  $A_{575}/A_{540}$  值;  $R_2$  为受试液离心上清液  $A_{575}/A_{540}$  值;  $R_3$  为阳性对照 SDS 离心上清液  $A_{575}/A_{540}$  值。以 100 mg/mL 十二烷基硫酸钠(SDS)为阳性对照。

主要观察指标:50% 红细胞发生溶血时的样品浓度( $\text{HD}_{50}$ )、蛋白质变性指数(DI)、 $\text{HD}_{50}$  与变性变性指数 DI 的比值( $\text{H/D} = \text{HD}_{50}/\text{DI}$ )。

按表 2 标准评价<sup>[17]</sup>受试液的刺激性:

表 2 评价标准

Table 2 Criteria for evaluation

评分 Score	分类 Classification
10 ≤ H/D	无刺激性 No irritation
1 ≤ H/D < 10	微弱刺激性 Weak irritation
0.1 ≤ H/D < 1	轻度刺激性 Moderate irritation
H/D < 0.1	严重刺激性 Severe irritation

### 3 结果与讨论

#### 3.1 黄芩素多功效测试结果

##### 3.1.1 黄芩素抑制酪氨酸酶活性

黄芩素对酪氨酸酶活性抑制的浓度梯度结果见图1。由图中可得出,黄芩素对酪氨酸酶的抑制能力随浓度增加而增强,当黄芩素的浓度为2.0 mg/mL时,抑制率达到60.20%, $IC_{50}$ 值为1.31 mg/mL,其中,浓度小于1.0 mg/mL时,其抑制酪氨酸酶活性接近于熊果苷。结果表明黄芩素有效抑制酪氨酸酶活性,可减少皮肤中黑色素的生成,具有一定的美白功效。

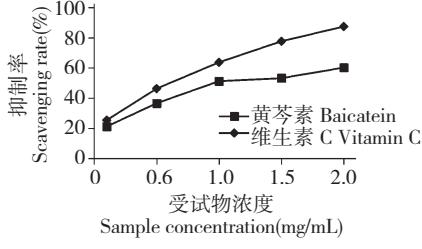


图1 黄芩素对酪氨酸酶的抑制结果

Fig. 1 Tyrosinase inhibitory effect of baicalein

##### 3.1.2 黄芩素体外抗氧化活性

###### 3.1.2.1 清除DPPH·自由基能力

黄芩素对DPPH·清除率测试结果见图2。由图中可得出,黄芩素对DPPH·清除能力随浓度增长而提高,当黄芩素浓度小于0.05 mg/mL时,对DPPH·的清除率随着浓度的变化较为明显,且当黄芩素浓度为0.1 mg/mL时,清除率已达到95.21%,接近维生素C的清除率。由图2可算得黄芩素清除DPPH·清除率的 $IC_{50}$ 值为0.03 mg/mL。DPPH·是一种稳定的氮自由基,可测试自由基清除剂的活性<sup>[18]</sup>,评价其抗氧化性能。图中DPPH·清除率表明,黄芩素有较强的DPPH·清除能力,具有一定的抗氧化性能。

###### 3.1.2.2 清除·OH自由基能力

黄芩素对·OH清除率测试结果见图3。由图

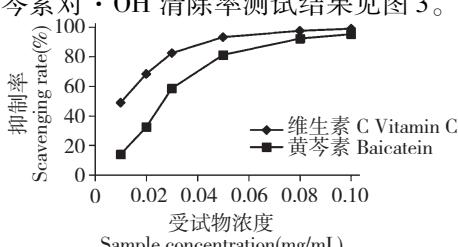


图2 黄芩素对DPPH·的清除能力

Fig. 2 DPPH· scavenging abilities of baicalein

中可得出,当黄芩素浓度大于0.6 mg/mL时,对·OH的清除率随着浓度的增加而缓慢增强,当黄芩素浓度小于0.6 mg/mL时,对·OH的清除率随着浓度的变化较为明显。当黄芩素浓度为1.0 mg/mL时,清除率为66.69%。·OH是人体中最活泼,对机体危害较大的自由基<sup>[19]</sup>,图中·OH清除率表明,黄芩素具有较强的清除·OH能力,降低·OH对机体的危害。

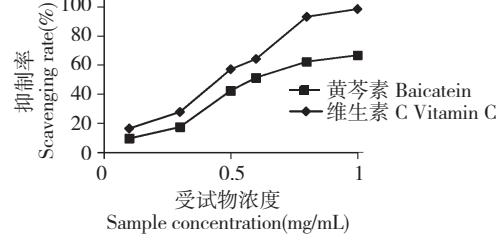


图3 黄芩素对·OH的清除能力

Fig. 3 ·OH scavenging abilities of baicalein

##### 3.1.3 黄芩素抗过敏活性

黄芩素的透明质酸酶抑制率测试结果见图4。由图可得,黄芩素具较强的透明质酸酶抑制活性,且其抑制率随浓度增长而提高,当浓度高于7.0 mg/mL时,其抑制率随着浓度升高而缓慢增强。当浓度小于7.0 mg/mL时,其抑制率随着浓度的变化较为明显。当黄芩素浓度为10.0 mg/mL时,抑制率可达到52.51%。图中透明质酸抑制率表明,黄芩素具有较强抗过敏功效。

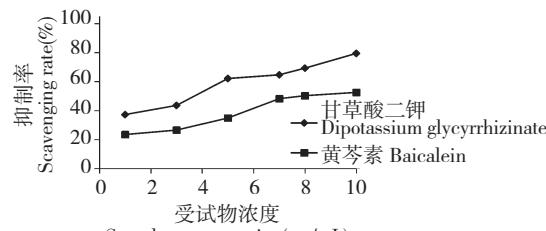


图4 黄芩素对透明质酸酶抑制结果

Fig. 4 Hyaluronidase inhibitory effect of baicalein

##### 3.1.4 黄芩素的最低抑菌浓度

黄芩素对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、白色假丝酵母和黑曲霉有明显抑制作用。其中,黄芩素对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,其MIC为0.3125 mg/mL;其次为铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌和黑曲霉,其MIC为0.625 mg/mL;最后,黄芩素对白色假丝酵母的抑制作用相对较差,其MIC为1.25 mg/mL,详细结果由表3可知:

表 3 黄芩素对供试菌的最小抑菌浓度(MIC)

Table 3 The minimal inhibitory concentration(MIC) of baicalein on the tested bacteria

菌种 Bacteria	阳性 Positive	阴性 Negative	黄芩素浓度 Concentration of baicalein ( mg/mL)						
			5.0	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+	++
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	-	-	-	-	+	++	++	++
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	+++	-	-	-	-	+	++	+++	+++
白色假丝酵母 <i>Candida albicans</i>	+++	-	-	-	+	++	++	++	+++
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	+++	-	-	-	-	+	++	++	+++

注：“-”表示没有菌；“+”表示有极少菌；“++”表示有少数菌；“+++”表示有大量菌。

Note：“-”No bacteria; “+”Precious few bacteria; “++”Few bacteria; “+++”A large number of bacteria.

### 3.2 红细胞溶血实验

溶血率与黄芩素浓度存在一定的线性关系,见图5,其回归方程为: $y = 0.3308x - 0.0954$ ,其中,x为黄芩素浓度( mg/mL),y为溶血率(%),相关系数的平方( $R^2$ )为0.9866。根据回归方程,可计算得出黄芩素的半数溶血率  $HC_{50} = 1.80 \text{ mg/mL}$ ,同时,根据公式求得:DI=0.34,H/D(10,其结果表明黄芩素溶液没有眼刺激性,可作为一种极具安全性的活性物添加到化妆品中。

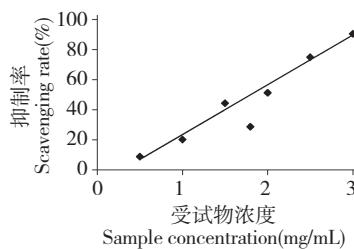


图 5 红细胞溶血实验结果

Fig. 5 Results of red blood cell hemolysis test

## 4 结论

美白、抗氧化、抗过敏和抑菌功效一直是化妆品功能性添加剂领域的研究热点。实验研究表明:1) 黄芩素通过抑制酪氨酸酶和透明质酸酶活性,减少皮肤色素沉着和肥大细胞中组胺的浓度,增强机体美白和抗过敏功效;2) 黄芩素通过清除DPPH·和·OH,有效降低体内有害自由基的含量,减缓皮肤氧化性损伤;3) 黄芩素通过抑制五种菌生长,大大降低化妆品染菌的风险,减少产品发霉、变质的几率;4) 黄芩素通过红细胞溶血实验,表明其不具有眼刺激性,对人体作用温和,具有安全性。

## 参考文献

1 Zhou ZL(周泽琳), Yang YM(杨铁眉), Gu YX(顾宇翔),

- et al.* Applied research and prospect of baicalin in cosmetics. *Deterg Cosmet*(日用化学品科学), 2010, 6:20-23.
- 2 Wang WY(王文玉), Dai JY(戴建业), Sun SJ(孙淑军), *et al.* Progress in pharmacokinetic researches of baicalein. *World Sci Technol/Modern Tradit Chin Med Mater Med*(世界科学技术-中医药现代化化), 2011, 13:1018-1021.
- 3 Yao YH(姚亚红), Zhang LW(张立伟). Study on the stability of baicalein. *Chin J Spectrosc Lab*(光谱实验室), 2006, 2;346-348.
- 4 Zhang XP(张喜平), Li ZF(李宗芳), Liu XG(刘效恭). A general survey of the pharmacological study of baicalein. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2001, 6:711-713.
- 5 Song QR(宋琦如), Jing XP(金锡鹏), Shen GZ(沈光祖). Evaluation of the efficacy of several kinds of skin whitening agents. *China Surfact Deterg Cosmet*(日用化学工业), 2002, 32(2):47-49.
- 6 Wang P(王鹏). Screening of plant whitening extract and its mechanism of action. Tianjin:Tianjin University of Commerce (天津商业大学), PhD. 2010.
- 7 Li CY(李春阳), Xu SY(许时婴), Wang Z(王璋). Measuring the antiradical efficiency of proanthocyanidin from grape seed by the DPPH· assay. *J Food Sci Biotechnol*(食品与生物技术学报), 2006, 25(2):102-106.
- 8 Wang HC(王和才), Hu QH(胡秋辉). Measuring the anti-radical efficiency of purple sweet potato pigment from grape seed by the DPPH· assay. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2010, 31:132-135.
- 9 Cheng C(程超), Li W(李伟). The *in vitro* antioxidant effect of several plant polysaccharides. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2006, 9:63-65.
- 10 Wang HT(王海涛). Research on screening, extraction and mechanism of active materials in cosmetic anti-allergy and anti-irritation. Beijing:Beijing Technology and Business University(北京工商大学), PhD. 2010.

(下转第 1958 页)