

## 白芷美白活性部位初步研究

李海馨<sup>#</sup>, 何婧芝<sup>#</sup>, 冯文亚, 赵倩, 赵卓, 陈佳露, 吴卫, 侯凯<sup>\*</sup>

四川农业大学农学院, 成都 611130

**摘要:** 白芷自古为美白常用药材, 但近年因其香豆素类物质光敏毒性而被禁用于美白产品。本研究对比白芷不同提取部位美白活性及香豆素类物质含量, 期望找到光敏物质含量低而美白效果较好的活性部位。采用酪氨酸酶抑制试验及人体美白试验测定白芷不同提取部位的美白活性; 采用高效液相色谱法测定不同提取部位香豆素类物质含量。结果显示, 白芷水提液比醇提液显示出较强的酪氨酸酶抑制作用, 人体美白活性更高, 而香豆素类物质含量较少。因此, 白芷美白应选用其水溶性部位。

**关键词:** 白芷; 提取物; 酪氨酸酶活性抑制; 人体美白; 光敏毒性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.013

## Preliminary Studies on the Active Fraction Responsible for Whitening Activity of *Angelicae Dahuricae*

LI Hai-xin<sup>#</sup>, HE Jing-zhi<sup>#</sup>, FENG Wen-ya, ZHAO Qian, ZHAO Zhuo, CHEN Jia-lu, Wu Wei, HOU Kai<sup>\*</sup>

College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

**Abstract:** *Angelicae Dahuricae* is commonly used as whitening herb since ancient times, but it is disable as skin whitening product in recent years for coumarin in the root which has photosensitive toxicity. To find a better whitening active extractive with lower content of photosensitive toxicity, we compared the whitening activity of different extracts of this plant and measured their coumarin contents. Whitening activity of two extractions was determined by tyrosinase inhibition experiment and body whitening activity test, at the same time a high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed to determine the content of photosensitive coumarin. As a result, the water extraction showed a stronger inhibition on the activity of tyrosinase than the alcohol extraction did, and the body whitening activity of it was high. Photosensitive coumarin could barely be found in the water extraction but abundantly in the alcohol extraction. In conclusion, the water extraction of *Angelicae Dahuricae* was confirmed to be the active components responsible for whitening activity.

**Key words:** *Angelicae Dahuricae*; extraction; inhibitory effects on tyrosinase; skin whitening; photosensitive toxicity

白皙的皮肤一直为东方女性所追求, 近年来更是成为备受推崇的时尚。受其影响, 美白、祛斑类化妆品市场广阔, 产品销量大且具有较强潜力<sup>[1]</sup>。随着崇尚自然、回归传统成为当今世界化妆品的发展潮流<sup>[2]</sup>, 以天然植物活性部位作为美白化妆品添加剂, 成了目前美容医药学研究的热点之一。

白芷药材是伞形科多年生草本植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. Var. *formosana* (Boiss) Shan et Yuan 的干燥

根。四川是白芷的道地主产区, 以遂宁出产的白芷品质最佳<sup>[3]</sup>。据记载, 白芷能“长肌肤, 润泽, 可作面脂”<sup>[4]</sup>, 自古以来为美白第一品。据统计, 古书中美容护肤方约有 1974 首, 其中使用频次最高的就是白芷<sup>[5]</sup>。其美白护肤功效值得肯定, 但美白活性部位尚不清晰。特别是后来研究发现白芷根部存在香豆素类光敏物质, 限制了其在化妆品中的应用<sup>[6,7]</sup>。明确白芷美白活性部位, 剔除其光敏毒性物质, 为更好的强化白芷在美白化妆品中的应用与开发提供理论基础。拟采用酪氨酸酶活性抑制试验及人体美白活性试验考察白芷不同提取部位美白活性, 同时采用高效液相色谱法测定不同提取部位香豆素类物质含量, 筛选白芷美白效果好而光敏物质含量少的活性部位。

收稿日期: 2017-08-29

接受日期: 2018-01-16

基金项目: 大学生创新训练计划(2015038); 四川省突破性道地药材育种材料与技术创新(2016NYZ0036)

\* 通信作者 Tel: 86-013550151951; E-mail: hking@sicau.edu.cn

# 共同第一作者

# 1 材料与方法

## 1.1 试剂与仪器

101-3AB 型电热鼓风干燥箱(北京鑫润科诺仪器仪表有限公司),FW135 中草药粉碎机(上海五久自动化设备有限公司),电子恒温水浴锅(北京中心伟业仪器有限公司),高速冷冻台式离心机(美国贝克曼库尔特公司),RE2000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),酶标仪(Thermo),高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),苏彩 Sucolor 通用色度计(广州科域新材料科技有限公司)。

分析纯级 L-多巴,曲酸及酪氨酸酶(T3824-25KU,  $\geq 10004$ -25KU)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,HPLC 级欧前胡素,异欧前胡素由成都普思生物科技股份有限公司惠赠。中药材白芷采自川白芷道地产区遂宁船山区(品种为课题组选育的川芷 2 号),并由四川农业大学侯凯副教授鉴定。白芷材料经低温烘干后,进一步处理获得不同提取部位,作为供试液备用。

## 1.2 白芷浸提液提取

取川芷二号 NC100 材料适量,杀青 15 min,45 °C 烘干后磨粉;称取 10 g 白芷粉末,加入 150 mL 蒸

馏水(70% 乙醇),35 °C 水浴加热提取 8 h,所得液体于 4000 rpm 离心 20 min,取上清液浓缩至 20 mL,配制成质量浓度为 500 mg/mL 的白芷水提液、醇提液,重复提取三次,低温保存备用。

## 1.3 酪氨酸酶抑制实验

本方法参考文献<sup>[8,9]</sup>方法改良而成。将 500 mg/mL 白芷提取液分别稀释到相当于原药材 50、25、12.5、6.25、3.125 mg/mL 溶液低温保存备用;配制 5 mg/mL 曲酸,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,3.8 mmol/L L-多巴,0.25 mg/mL 酪氨酸酶等溶液;按表 1 向 96 孔板中加入 L-多巴、磷酸盐缓冲液、白芷提取液/曲酸,最后加入酪氨酸酶并立即置于酶标仪中,32 °C 恒温反应 10 min,测定 475 nm 处吸光度值,多次重复实验。白芷提取液对酪氨酸酶的抑制率可从下列公式得知:

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

A 为未加白芷提取液在 10 min 的吸光度值;B 为未加白芷提取液及酪氨酸酶在 10 min 的吸光度值;C 为已加川白芷提取液在 10 min 的吸光度值;D 为已加白芷提取液且未加酪氨酸酶在 10 min 的吸光度值。

表 1 酪氨酸酶抑制实验设计

Table 1 Experiment design of tyrosinase inhibition

试剂 Reagent	标准对照 Standard control	提取液 Extract	曲酸 Kojic acid	阴性对照 Negative control		
				1	2	3
L-多巴 L-dopa	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
磷酸盐缓冲液 Phosphate buffer	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	150 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
白芷提取液 Extract of <i>Angelicae</i>	-	50 $\mu$ L	-	-	50 $\mu$ L	-
曲酸 Kojic acid	-	-	50 $\mu$ L	-	-	50 $\mu$ L
酪氨酸酶 Tyrosinase	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	-	-	-

## 1.4 皮肤美白性能测试

本方法参考文献<sup>[10,11]</sup>方法改良而成。材料:原生药质量浓度为 5 mg/mL 白芷水提液(为防止醇提液出现光敏活性,仅以水提液参与人体美白功效评价);相同质量浓度的曲酸溶液为阳性对照。

### 1.4.1 志愿者筛选

按照美白化妆品功效评价(人体试验法)标准筛选符合试验要求的志愿者,选择年龄为 20 岁-25 岁的在校大学生受试者共 20 人,男女各 10 人。纳

入标准:以室内活动为主,能够遵循试验要求,配合测试者。无光过敏史、化妆品过敏史,无皮肤或系统性疾病,近 2 个月内未参加药物临床试验或其他化妆品功效评价者。试验过程中,有过敏或不良反应者剔除。

### 1.4.2 测试方法

按男女 1:1 比例将其平均随机分为 2 组;在志愿者左右手臂内侧靠近手腕处相同部位各选取一定区域 3 cm  $\times$  3 cm,左侧定为实验区,右侧定为对照

区,用医用棉棒沾取 70% 的酒精涂抹消毒后用色度计测量并记录皮肤  $L$ 、 $a$ 、 $b$  初始值,同一部位重复读数三次取平均值。记录皮肤初始值后涂抹药品进行实验,第一组志愿者实验区涂抹白芷提取液,第二组志愿者实验区涂抹曲酸,对照区涂抹清水为阴性对照。每天早晚涂抹 2 次,连续 3 周;每周定期测量一次皮肤颜色量值,同一部位重复读数三次取平均值,记录肤色变化情况。

评价指标: $L$  为亮度,值越大颜色越偏向白色; $a$  为红、绿色品,  $+a$  为红色方向,  $-a$  为绿色方向; $b$  为黄、蓝色品,  $+b$  为黄色方向,  $-b$  为蓝色方向; $\Delta Eab$  为  $L$ 、 $a$ 、 $b$  的综合指数,代表色度的立体变化,  $\Delta Eab = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$ 。

### 1.5 高效液相色谱法测定光敏性物质含量

本方法参考文献<sup>[12,13]</sup>方法及药典规定改良而成。将质量浓度为 500 mg/mL 的川白芷提取液 A、B 冻干,溶于甲醇,分别过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,收集滤液备用,重复三次;精确称取欧前胡素标品 2.62 mg、异欧前胡素标品 2.07 mg,分别用甲醇配制成 10 mL

标品溶液。流动相甲醇与水超声脱气;精密吸取白芷提取液 10  $\mu\text{L}$ ,采用高效液相色谱法进行测定,色谱条件: $\text{C}_{18}$  色谱柱;以 70% 甲醇为流动相,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,测定物质在 254 nm 处的吸光度值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 白芷不同提取液对酪氨酸酶活性的抑制作用比较

酶学活性检测结果(表 2)显示白芷水提液及醇提液对酪氨酸酶均具有一定的酶活抑制作用,在实验浓度范围内,随着质量浓度的增加,抑制作用随之增大,最高质量浓度水提液对酪氨酸酶活性的抑制率接近 50%。与同质量浓度醇提液相比,白芷水提液对酪氨酸酶活性的抑制作用较强;需要注意的是与醇提物相同浓度的乙醇溶液酪氨酸酶抑制率为 46% 左右,因此醇提物的酪氨酸酶抑制作用主要是其中乙醇的作用。与阳性对照曲酸相比,白芷两种提取液的抑制作用相对较弱。

表 2 不同质量浓度白芷提取液对酪氨酸酶活性的抑制情况 ( $n=6, \bar{x} \pm s, \%$ )

Table 2 Inhibition of tyrosinase activity by different concentrations of *Angelica dahurica* extraction ( $n=6, \bar{x} \pm s, \%$ )

提取液质量浓度 Extract concentration	提取液 A 抑制率 The inhibitory rate of extract A	提取液 B 抑制率 The inhibitory rate of extract B
50 mg/mL	43.50 $\pm$ 2.61 *	37.00 $\pm$ 2.84
25 mg/mL	41.00 $\pm$ 1.82 *	34.50 $\pm$ 2.23
12.5 mg/mL	32.33 $\pm$ 2.87 *	25.33 $\pm$ 2.89
6.25 mg/mL	29.17 $\pm$ 1.97 *	22.50 $\pm$ 1.66
3.125 mg/mL	21.83 $\pm$ 2.19	20.33 $\pm$ 2.74
5 mg/mL Kojic acid	96.33 $\pm$ 0.94	

注:与提取液 B 比较, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compare with extraction B, \*  $P < 0.05$ .

### 2.2 白芷水提液人体美白功效评价

白芷水提液人体美白功效评价结果(表 3)显示使用水提液一周、两周后  $L$  值有逐渐升高的趋势;使用三周后其  $L$  值明显增加,较处理前差异显著( $P < 0.05$ ),表明白芷水提液有明显的人体美白活性。且三周后水提液  $L$  增加值( $61.27 \pm 0.3$ )高于阳性对照曲酸( $60.70 \pm 0.62$ )。与使用前(0 周)相比,白芷水提液处理组  $\Delta Eab$  逐渐升高,在第 2 周后达到显著差异水平,第 3 周达到极显著差异水平。阳性对照曲酸处理组也显示出逐渐升高的趋势,但升高值较白芷水提液处理组小,第 3 周才表现出明显

的  $\Delta Eab$  差异。

### 2.3 白芷不同提取液香豆素含量分析

对同质量浓度川白芷水提液和醇提液中香豆素含量进行比较分析。

采用高效液相色谱分析,以欧前胡素、异欧前胡素为标准品(图 1),检测不同提取物中这两种物质的含量。结果表明,白芷水提液中几乎不含此类香豆素(图 2),而醇提液中两种香豆素的含量水平较高(图 3)。此外,对比白芷水提液和醇提液 HPLC 图发现,出峰时间为 2.94 min 的物质,其在白芷水提液中的含量高于醇提取液。

表3 白芷水提液人体美白功效评价 ( $n = 10, \bar{x} \pm s, \%$ )Table 3 Efficacy evaluation of skin whitening of water extracts of *radi Angelicae dahuricae* ( $n = 10, \bar{x} \pm s, \%$ )

	时间(周) Time (week)	$L$	$\Delta Eab$
白芷水提液 Water extract of <i>Angelicae</i>	0	59.12 $\pm$ 0.69	
	1	59.72 $\pm$ 0.49	2.49 $\pm$ 0.39
	2	60.32 $\pm$ 0.42	3.43 $\pm$ 0.41 *
	3	61.27 $\pm$ 0.37 *	4.26 $\pm$ 0.24 **
曲酸 Kojic acid	0	59.08 $\pm$ 0.46	
	1	59.83 $\pm$ 0.47	2.01 $\pm$ 0.29
	2	60.31 $\pm$ 0.35	2.22 $\pm$ 0.33
	3	60.70 $\pm$ 0.62 *	3.14 $\pm$ 0.47 *

注:与0周比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with 0 week, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 3 结论

白芷在历代美白配方中应用较多,但现代研究表明其含有香豆素类光敏毒性物质。香豆素类物质一般为醇溶性,难溶于水。本实验结果显示白芷水提物较醇提物含有更少的香豆素类物质。对不同提取物的酪氨酸酶活性抑制试验及人体美白功效评价试验显示白芷水溶液美白活性较高。对白芷而言,选取其水溶性提取物作为美白活性部位,具有较好的美白效果,较低的副作用。此外,在本实验条

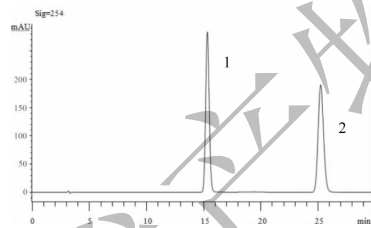


图1 欧前胡素、异欧前胡素标品 HPLC 图(254 nm)

Fig. 1 HPLC chromatogram of imperatorin and isoimperatorin reference (254 nm)

注:1 为欧前胡素 2 为异欧前胡素

Note: 1: imperatorin 2: isoimperatorin

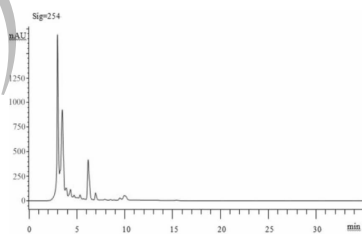


图2 白芷水提液 HPLC 图(254 nm)

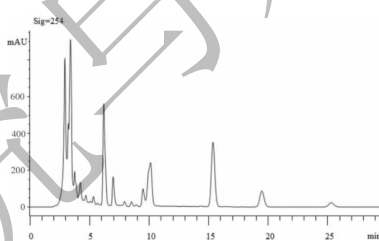
Fig. 2 HPLC chromatogram of the water extraction of *Angelicae dahuricae* (254 nm)

图3 白芷醇提液 HPLC 图(254 nm)

Fig. 3 HPLC chromatogram of the alcohol extraction of *Angelicae dahuricae* (254 nm)

件下,出峰时间为 2.94 min 的物质在水提液中的含量水平较高,且酪氨酸酶活性抑制效果与该物质含量呈正相关关系,推测其可能为白芷美白活性物质,课题组正在进行进一步分离和活性测定。

有研究表明,白芷醇提物含有的光敏性香豆素类物质可以用来治疗白癜风等皮肤问题,对皮肤衰老和氧化也有较好的抑制作用,因此也应该进一步加强对白芷醇提物的研究。

#### 参考文献

- 1 Wang HQ(王寒清), Wang CT(王昌涛), Dong YM(董银卯). Evaluation method for whitening cosmetics [J]. *Detergent & Cosmetics* (日用化学品科学), 2007, 30:32-34.
- 2 Lv HZ(吕海珍). Preparation of beautiful whitening cream with chinese traditional medicine [J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China* (中国中医药现代远程教育), 2012, 10:159-161.
- 3 Yang J(杨涓), Deng Y(邓赞), Zhou ZD(周在德), et al. Chemical constituents of *angelica dahurica* [J]. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2002, 14:227-229 + 177.

(下转第 514 页)