

基于美白功效对当归补血汤药效关系的分析

黄永红¹, 何秋星^{1*}, 李馨恩¹, 区梓聪¹, 李运景², 关建云³

(1. 广东药学院 医药化工学院, 广东 中山 528458; 2. 中山市人民医院, 广东 中山 528403;
3. 湛江市赛美生物科技有限公司, 广东 湛江 524000)

[摘要] **目的:**通过研究当归补血汤中黄芪、当归不同配比对美白功效的影响,探索该复方美白功效的最佳药效配比。**方法:**采用生化酶学法测定当归补血汤对酪氨酸酶的抑制率,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)分析法测定当归补血汤的抗氧化活性,综合2种方法筛选当归补血汤的美白功效的最佳药效配比。采用Franz扩散池试验评价该复方的透皮吸收效果。**结果:**当归补血汤的配伍最佳剂量组合为黄芪-当归(1:7),对酪氨酸酶活性的抑制率89.65%,对DPPH自由基的清除率90.96%。阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的24 h累积透过量分别为0.030 4, 0.001 2 mg·cm⁻²,渗透率依次为59.27%, 57.79%。**结论:**方剂配伍比例的变化会影响其功效的发挥,甚至改变组成方中药物的地位,使全方主治证及功用发生变化,为当归补血汤开发成为绿色天然美白化妆品提供参考。

[关键词] 均匀设计; 当归补血汤; 美白功效; 配伍; 酪氨酸酶

[中图分类号] R283.6;R944.1;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0010-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160215.1131.016.html>

[网络出版时间] 2016-02-15 11:31

Analysis on Pharmacodynamic Relationship of Danggui Buxue Tang Based on Whitening Efficacy

HUANG Yong-hong¹, HE Qiu-xing^{1*}, LI Xin-en¹, QU Zi-cong¹, LI Yun-jing², GUAN Jian-yun³

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China; 2. Zhongshan City People Hospital, Zhongshan 528403, China;
3. Zhanjiang Saimei Biotechnology Co. Ltd., Zhanjiang 524000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the best ratio of Danggui Buxue Tang for whitening efficacy by investigating whitening efficacy caused by different proportion of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix in this compound. **Method:** Biochemical-enzymic method was adopted to measure tyrosinase inhibition rate of Danggui Buxue Tang and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method was adopted to measure its antioxidant activity. Franz diffusion cell test was used to evaluate skin permeation of Danggui Buxue Tang. **Result:** Optimum proportion of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix in this compound was 1:7. Under this proportion, its inhibition rate of tyrosinase achieved 89.65% and scavenging ratio of DPPH free radicals achieved 90.96%. Accumulative permeation amounts in 24 h of ferulic acid and calycosin-7-O-β-D-glucoside were 0.030 4, 0.001 2 mg·cm⁻², permeabilities were 59.27% and 57.79%, respectively. **Conclusion:** Change of compatibility ratio can affect efficacy of Danggui Buxue Tang, or even change status of compatibility between monarch and ministerial drug, then it may change syndrome and function of this prescription.

[Key words] uniform design; Danggui Buxue Tang; whitening efficacy; compatibility; tyrosinase

[收稿日期] 20150715(005)

[第一作者] 黄永红,在读硕士,从事中药药剂学、中药化妆品研究,Tel:15889899402,E-mail:hwangyonghong@163.com

[通讯作者] *何秋星,博士,副教授,硕士生导师,从事精细化工、化妆品研发,Tel:13539924229,E-mail:heqiuqing@126.com

随着人们对美白的需求和关注,关于美白祛斑机制、有效活性成分、效果等方面的研究不断深入,美白祛斑类化妆品的开发引起了众多化妆品公司的重视,也不断推陈出新,目前已成为一类重要的功效类化妆品^[1]。相比具有刺激性、过敏性等安全问题的化学美白剂,中草药来源的天然美白剂具有安全、温和、持久、高效等优点,目前已成为美白化妆品研究开发的趋势^[2]。传统中医理论认为,黑色素的生成与气血阻滞、肝气郁结、劳伤脾土等有关,应采用具有补血、活血和理气功效的中药^[3]。面部肌肤的润泽,尤与气血的运行、津液的输布密切相关。肌肤赖气血以濡养,津液以滋润,气血津液亏虚,则肌肤晦暗干枯无泽^[4]。

当归补血汤始载于《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》^[5],是经典的气血双补名方。该方组成简单,重用黄芪大补脾肺之气,以资生血之源,与当归合用,养血和营,则阳生阴长,气血两旺,两药互伍,共同发挥补气生血活血作用^[6]。当归能改善由于运血无力、面部血液供给不充分、皮肤失于滋养引起的晦暗无华症状,增强毛细血管血液循环,改善和增强皮肤新陈代谢作用^[7]。现代研究表明当归含有 4-羟基-3-甲氧基苯基结构(阿魏酸)的物质对黑色素合成过程中的关键酶——酪氨酸酶具有抑制作用^[8],有美白功能^[9];中医学认为气与血二者之间关系非常密切,“有形之血,不能自生,生于无形之气”,提出了“气能生血”的观点。方中配伍具有补气升阳功效的黄芪,能改善因气机不畅、肝郁化热致使血瘀滞于面的症状,配伍当归得以补益气血,营养肌肤;现代研究发现黄芪中黄酮类物质有防辐射^[10]、清除自由基的作用,可达到防晒美白的功效^[11]。本实验选择均匀设计试验,通过生化酶学法和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)分析法优选当归补血汤美白功效的药效配比关系,采用 HPLC 检测体外透皮吸收情况,为将该方开发成为绿色天然化妆品提供参考。

1 材料

2489 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),TK-20B 型垂直式 Franz 扩散池(上海锴凯科技贸易有限公司),SZCL-2 型数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司),雷磁 PHSJ-4A 型 pH 计(上海亚荣生化仪器厂),UV1000 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。

当归、黄芪药材均购自中山市中智中药饮片有限公司,经广东药学院中药学院李书渊教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根和豆科植

物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根,均符合 2015 年版《中国药典》一部相关项下要求;阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为 131029,140326),酪氨酸酶(美国 Worthington 公司,批号 34B14750N,505 U·mg⁻¹),L-多巴胺(上海伊卡生物技术有限公司),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,阿拉丁试剂有限公司),水为去离子水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠,体重 220 ~ 250 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SYXK(粤)2012-0125。

2 方法与结果

2.1 试液的配制

2.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制 分别准确称取磷酸氢二钠 17.9 g 和磷酸二氢钠 7.8 g,加水溶解,分别转移至 250 mL 量瓶中定容,调整 pH 6.8,即得。

2.1.2 酪氨酸酶溶液的配制 准确称取 920 U·mg⁻¹酪氨酸酶,用 PBS 配成 200 U·mg⁻¹的酶液,放置于冰箱 -20 ℃ 保存,用前需在 4 ℃ 下解冻备用。

2.1.3 多巴溶液的配制 精密称取 L-多巴胺,加 PBS 配制成 1.5 g·L⁻¹多巴溶液,置于 4 ℃ 下避光保存。

2.1.4 DPPH 自由基溶液的配制 准确称取一定量 DPPH,加乙醇配成质量浓度约 0.04 g·L⁻¹的 DPPH 溶液,置于 4 ℃ 下避光保存。

2.1.5 当归补血汤美白活性成分的提取 在预试验和单因素试验基础上,称取适量当归片和黄芪片于圆底烧瓶中,加入 10 倍量水,大火煎煮至水开后转中火保持微沸煮 1 h,过滤药液,采用减压旋转蒸发浓缩至 1 g·mL⁻¹,得供试原液。

2.2 当归补血汤对酪氨酸酶的抑制作用 按表 1 设计在各试管中分别加入 PBS 和样品液、酪氨酸酶溶液,混合均匀,置于 37 ℃ 水浴中反应 10 min,分别

表 1 反应液的组成

反应组	PBS	供试原液	酪氨酸酶
C1	1.5	0	0.5
C2	2	0	0
T1	1	0.5	0.5
T2	1.5	0.5	0

迅速加入多巴溶液 1 mL,混匀,于 37 °C 水浴中反应 5 min,在 475 nm 处测定吸光度 A 。按抑制率 = $[1 - (A_{T1} - A_{T2}) / (A_{C1} - A_{C2})] \times 100\%$ 计算供试药液对酪氨酸酶的抑制率^[12], C_1 为空白, C_2 用于空白调零, T_1 为样品管, T_2 用于样品调零。

2.3 当归补血汤对 DPPH 自由基的清除能力 精密移取 DPPH 自由基溶液和无水乙醇各 2 mL 于同一试管中,混匀后避光静置 20 min,于 517 nm 处测定吸光度 A_c 。精密移取 DPPH 自由基溶液和供试原液各 2 mL 于同一试管中,混匀后避光静置 20 min,于 517 nm 处测定吸光度 A_i ;精密移取无水乙醇和供试药液各 2 mL 于同一试管中,混匀后避光静置 20 min,于 517 nm 处测定吸光度 A_j 。平行测定 2 次。按清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$ 计算供试药液对 DPPH 自由基的清除率^[13]。

2.4 剂量的确定^[14] 根据预试验和参考文献[15-17],确定配方中两药的剂量范围,当归 2~10 g,黄芪 6~14 g。2 个因素各分为 5 个水平。为避免量效关系对药效的干扰,在保持各组药剂配比不变,将各药的取值调整至各组总药量相同(12.0 g)。以酪氨酸酶抑制率和 DPPH 自由基清除率的综合评分为指标,权重系数均为 0.5,试验安排及结果见表 2。结果显示最优的配比为第 2 组,即黄芪-当归(1:1)。

表 2 当归补血汤不同剂量配比均匀设计分析

Table 2 Uniform design analysis of different dosage ratio of Danggui Buxue Tang

组别	X_1 黄芪 /g	X_2 当归 /g	酪氨酸酶抑制率/%	DPPH 清除率/%	综合评分
1	7.2	4.8	36.74	93.95	65.35
2	6	6	49.99	93.79	71.89
3	10	2	28.06	89.98	59.02
4	8	4	31.37	92.91	62.14
5	7	5	38.39	94.81	66.60

注:综合评分 = 酪氨酸酶抑制率 \times 50% + DPPH 清除率 \times 50%。

通过 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,得酪氨酸酶抑制率的回归方程 $Y = 40.633 + 1.106X_2 - 0.848X_1X_2$, $P < 0.01$,回归方程有统计意义。说明当归为正效应,黄芪和当归的相互作用为负效应。DPPH 自由基清除率的回归方程 $Y = 84.508 + 0.272X_1X_2$, $P < 0.01$,黄芪和当归的相互作用对结果呈正效应。采用综合评分分析,得回归方程 $Y = 62.074 + 0.536X_2 - 0.261X_1X_2$, $P < 0.01$,当归起正效应,黄芪与当归相互作用起负效应。说明在这个

功效配伍中,当归起君药作用,抑制酪氨酸酶活性,美白肌肤;黄芪起臣药作用,清除自由基,减少黑色素生成,减少色素沉淀。方中当归所占比例越大越好,黄芪相对当归在方中所占比例越少越好。

2.5 验证试验 根据以上试验结果,结合实际进行人工优化预测配伍,同时为了验证预测的准确性,设计了 5 个剂量配比进行验证试验,按 2.1.5 项下方法制备样品液,备用。按上述方法进行功效关系试验,见表 3。结果显示综合评分最高的是第 4 组,与 SPSS 19.0 统计软件分析的趋势一致,当剂量配比中,当归所占比例越大,美白效果越好。比较第 1 和第 4 组,缺少黄芪的单方美白效果不如复方配伍效果好,表明两药配伍有协同增效作用。

表 3 当归补血汤不同剂量配比验证试验

Table 3 Verification test of different proportion of Danggui Buxue Tang

组别	黄芪 /g	当归 /g	酪氨酸酶抑制率/%	DPPH 清除率/%	综合评分
1	0	6	46.11	86.99	66.55
2	6	0	25.17	26.81	25.99
3	6	6	36.65	86.52	61.59
4	2	10	44.29	94.20	69.25
5	10	2	23.45	58.80	41.13

为进一步优化配伍,将上述最佳效果组的配比和优化设计另外 3 个剂量配比组合(2.625:7.875, 1.75:8.75, 1.312 5:9.118 75, 1.05:9.45),按 2.1.5 项下方法制备样品液并进行功效关系试验。结果显示 4 个组别均对 DPPH 自由基有很高的清除作用,清除率依次为 89.33%,91.46%,90.96%,91.66%,能起到抗氧化作用,研究表明酪氨酸酶的催化作用和多巴醌及其以后的自动氧化反应均需自由基的参与,通过减少自由基的参与,可减少黑色素的生成^[18]。各组对酪氨酸酶抑制力方面则有所差别,但 4 组配比所得样液对酪氨酸酶抑制率均 $> 50\%$,表明有较好的抑制酪氨酸形成作用,从而减少多巴的形成达到美白作用。综合评分最高的是第 3 组,高达 90.31%。得美白功效最优剂量配比为黄芪-当归(1:7)。

2.6 阿魏酸的含量测定 Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm,5 μ m),检测波长 320 nm,流动相甲醇-0.1% 磷酸(60:40),进样量 10 μ L,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹。精密称取阿魏酸对照品 4.5 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配制

成质量浓度分别为 0.036, 0.072, 0.108, 0.144, 0.18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线 $Y = 6.388 \times 10^7 X - 43\,942.4$ ($R^2 = 0.998\,2$), 线性范围 0.36 ~ 1.8 μg 。

2.7 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定 Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm), 检测波长 235 nm, 流动相乙腈-水 (20:80), 进样量 10 μL , 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 4.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 0.032, 0.064, 0.096, 0.128, 0.16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线 $Y = 7.746 \times 10^7 X + 1.075 \times 10^5$ ($R^2 = 0.998\,8$), 线性范围 0.32 ~ 1.6 μg 。

2.8 体外透皮试验 将健康的雄性 SD 大鼠采用脱颈椎处死后, 置手术板上固定四肢, 用手动须刨脱去腹部的毛, 清水洗净皮肤表面, 剥取腹部皮肤, 剪除损伤的皮肤, 取下已去毛的动物皮肤, 平铺于干净的玻璃板上, 角质层朝下, 小心地用蘸有生理盐水的脱脂棉除去皮下脂肪组织和黏连物, 用生理盐水反复冲洗干净, 滤纸拭干, 直接使用。将制备好的鼠皮用铁夹子固定在两室扩散池之间, 向垂直扩散池的接受池内加入生理盐水 8 mL, 搅拌速度 400 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 水温 (37 \pm 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 。向供给池内分别加入供给液, 以保鲜膜封住。当样品渗透 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 时, 分别取样置具塞离心管中, 每次取样同时向接受池中补充等量的接受液并排除池中的气泡^[19]。计算累积透过量 (Q)^[20]。

$$Q = \frac{V_1 \rho_n \pm \sum_{i=1}^{n-1} \rho_i \times V_2}{S}$$

$$\text{渗透率} = \frac{Q \times S}{C \times V} \times 100\%$$

式中 Q 为累积透过量, S 为透皮扩散面积, V_1 为接受液体积, ρ_n 为第 n 次取样时接受液的质量浓度, ρ_i 为第 i 次取样时接受液的质量浓度, V_2 为取样量, $Q_{24\text{h}}$ 为 24 h 累积透过量, S 为透皮扩散面积, C 为供给液质量浓度, V 为供给池体积。计算阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的 $Q_{24\text{h}}$ 分别为 0.030 4, 0.001 2 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$, 两者的累积透过量均随着时间的增长而增长, 但在 12 h 后趋于平缓。计算当归补血汤美白液中阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的 24 h 渗透率分别为 59.27%, 57.79%。见图 1, 2。

3 讨论

关于中药复方的研究多局限于单一成分、部位

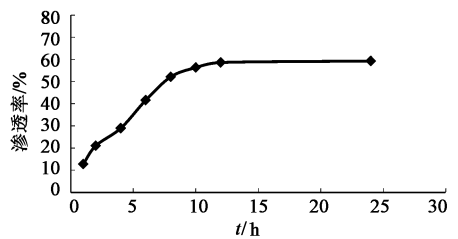


图 1 当归补血汤中阿魏酸的渗透率-时间曲线

Fig. 1 Permeability-time curve of ferulic acid in Danggui Buxue Tang

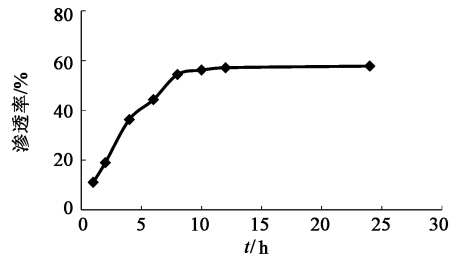


图 2 当归补血汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的渗透率-时间曲线

Fig. 2 Permeability-time curve of calycosin-7-O- β -D-glucoside in Danggui Buxue Tang

和作用靶点, 往往忽略了药味之间的相互作用。这种相互联系的作用, 除了反映在体内复杂的吸收、代谢、酶反应等过程, 更体现在煎煮过程中不同药味、不同成分间的物理化学反应, 可能会产生特殊的活性, 从而体现复方配伍的疗效特点^[21]。对于广泛用于主治血虚阳浮发热证, 妇人经期、产后血虚发热头痛, 或疮疡溃后久不愈合者, 且重用黄芪为君药的当归补血汤, 通过以上一系列实验探讨, 以配伍关系为基础, 优化设计, 针对美白功效, 筛选有效的美白中药复方最优配比。结果发现药物配比会影响药效, 甚至改变组成方中药物的君、臣地位, 从而使全方主治证及功用发生变化。虽然药物组成相同, 但因药物剂量不同, 则配伍关系、功用主治就截然不同^[22]。

透皮传输效果对中药化妆品的使用至关重要。皮肤表面化妆品营养成分过剩, 是造成皮肤氧化的重要原因之一。同样, 如果化妆品的营养成分不能被皮肤完全吸收, 就会成为寄生细菌生长繁殖的温床, 而大量的细菌还会导致皮肤感染^[23]。目前国内外仅对药物的透皮吸收研究较多, 主要集中在药物渗透特性、药动学分析和促渗剂的选用等方面, 对于化妆品透皮吸收机制的研究则非常有限, 且分散见于各种文献资料^[24]。本文参考有关药物透皮吸收机制的研究方法, 检测当归补血汤美白液的透皮吸收情况, 通过检测阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的累积透过量 and 渗透率评定其皮肤吸收的效果, 可为

中药化妆品的透皮吸收性能研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 杨艳伟,朱英.化妆品中常用的美白祛斑成分及其检测方法研究进展[J].环境与健康杂志,2010,27(8):745-748.
- [2] 张萌,陈士林.中药化妆品的研发现况与发展前景[J].中国中药杂志,2007,32(23):2457-2459.
- [3] 李丽丹.中草药美白及有效成分的研究进展[J].中国药业,2010,19(20):82-83.
- [4] 董银卯,郑彦云,马忠华,等.本草药妆品[M].北京:化学工业出版社,2010:23.
- [5] 李东垣.东垣医集[M].北京:人民卫生出版社,1993:29.
- [6] 柳英霞.当归补血汤中化学成分的研究[D].南昌:南昌大学,2006.
- [7] 沈放,王德斌.当归多糖对酪氨酸酶活性的影响[J].昆明师范高等专科学校学报,2005,27(4):61-62.
- [8] Fenoll L G, Penalver M J, Rodriguez-lopez J N, et al. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(2):235-246.
- [9] 杨柳依,曹煜,魏羽佳.14种中药提取成分对酪氨酸酶活性的抑制作用[J].中华皮肤科杂志,2003,36(4):207-209.
- [10] 汪德清,房征宇,沈文梅,等.黄芪总黄酮抗紫外线损伤作用的实验研究[J].劳动医学,1998,15(4):200-202.
- [11] Kim A J, Choi J N, Kim J, et al. Metabolomics-based optimal koji fermentation for tyrosinase inhibition supplemented with Astragalus radix [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(5):863-869.
- [12] 李雪梅,甘雨,尤献民,等.均匀设计法优化月安煎处方最佳配伍研究[J].西北药学杂志,2012,27(3):197-199.
- [13] 曾宇,江滨,马世平,等. DPPH 自由基清除法筛选当归芍药散抗氧化活性有效部位[J].广东药学院学报,2013,29(2):138-141.
- [14] 陈明珠,陈崇宏,卢惠萍.均匀设计法在筛选丹参与黄芪最佳配比中的应用[J].海峡药学,2010,22(11):28-30.
- [15] 尤卓莹,何秋星,李馨恩,等.四物汤美白功效评价及其药效关系研究[J].日用化学工业,2015,45(1):45-48.
- [16] 周春刚,陆曙,王书乐,等.黄芪与当归不同配比水提液对 ANG II 诱导大鼠动脉内皮细胞凋亡的实验观察[J].中成药,2013,35(10):2253-2256.
- [17] 陈芳,唐于平,陶静,等.当归-黄芪药对不同配比的应用数据分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):235-238.
- [18] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J N, Garcia-Canovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1247(1):1-11.
- [19] 赵华,林婕,何聪芬,等.4种中药促透剂对不同结构类型物质的促透功效评价[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):34-38.
- [20] OECD. Test guideline 428: skin absorption: *in vitro* method [J/OL]. [2004. 4. 13]: <http://www.oecd-ilibrary.org>.
- [21] 任德旺,叶淳淳,倪必辉,等.当归补血汤对药物介导小鼠氧化性溶血的疗效及作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(16):135-137.
- [22] 邴守兰.关于药量变化的文献探索和研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2006.
- [23] Rosen M R. Delivery system handbook for personal care and cosmetic products [M]. East Norwich: William Andrew Pub, 2005:4.
- [24] 林婕,何聪芬,董银卯.化妆品功效成分的透皮吸收机理[J].日用化学工业,2009,39(4):275-278.

[责任编辑 刘德文]