

枇杷核水提物的体外活性及人体美白功效研究

周澜华¹, 李忆红², 赵蕊¹, 孙玉涵², 张梅娜¹, 袁祯爽², 祝希春¹, 刘玮³, 黄建梅²

(1.北京京城皮肤医院皮肤科 北京 100101; 2.北京中医药大学中药学院 北京 102488; 3.空军特色医学中心皮肤科 北京 100142)

[摘要]目的: 探讨枇杷核水提物的体外活性、对人体皮肤美白的功效及安全性。方法: 通过1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2, 2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS) 自由基清除实验、小鼠黑素瘤B16细胞活性、黑色素含量以及酪氨酸酶活性实验, 考察枇杷核水提物的体外抗氧化、美白作用; 选取色素沉着斑志愿者30例, 随机选择一侧半脸为枇杷核水提物治疗组, 另一侧半脸为阴性对照组。比较治疗8周后皮肤个体类型角 (Individual type angle, ITA°)、皮肤黑色素 (MI) 指标。结果: 枇杷核水提物可清除DPPH和ABTS自由基, 半抑制浓度 (IC₅₀) 值分别是7.98 mg/ml和1.11 mg/ml, 在2.5~100 mg/ml浓度对小鼠B16细胞活力无影响, 能减少细胞黑色素生成及抑制酪氨酸酶活性。人体美白功效试验: 治疗组治疗8周后ITA° [(34.02±7.03)] 高于治疗前 [(27.07±5.89)], 治疗8周后MI [(162.7±40.20)] 低于治疗前 [(162.7±40.20)], 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 两组治疗后ITA° 和MI比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论: 枇杷核水提物有良好的体外抗氧化、抑制黑色素生成、酪氨酸酶活性作用且无明显细胞毒性。人体试验显示有美白作用且无不良反应。

[关键词]枇杷核水提物; 体外活性; 人体功效; 美白; 功效研究

[中图分类号]R285 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455 (2025) 01-0010-05

Study on the in Vitro Activity and Human Whitening Effect of Loquat Seed Water Extract

ZHOU Lanhua¹, LI Yihong², ZHAO Rui¹, SUN Yuhua², ZHANG Meina¹, YUAN Zhenshuang²,
ZHU Xichun¹, LIU Wei³, HUANG Jianmei²

(1.Department of Dermatology, Beijing Jingcheng Dermatology Hospital, Beijing 100101, China; 2.Faculty of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Department of Dermatology, Air Force Medical Center, PLA, Beijing 100142, China)

Abstract: **Objective** To investigate the in vitro activity, skin whitening efficacy and safety of loquat seed aqueous extract. **Methods** The antioxidant and whitening effects of loquat seed aqueous extract were investigated by 1,1-diphenyl 1-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH), 2,2'-diaminobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diamine salt (ABTS) radical scavenging assay, mouse melanoma B16 cell activity, melanin content and tyrosinase activity assay; Thirty volunteers with pigmented spots were enrolled in the study. One side of the face was randomly selected as the loquat seed extract group, and the other side as the negative control group. Skin individual type angle (ITA°) and skin melanin (MI) were compared after 8 weeks of treatment. **Results** Aqueous extract of loquat seed could scavenge DPPH and ABTS free radicals with IC₅₀ values of 7.98 mg/ml and 1.11 mg/ml, respectively. It had no effect on the viability of mouse B16 cells, but could inhibit the production of melanin and the activity of tyrosinase. Human body whitening efficacy test: ITA degree [(34.02±7.03)] after 8 weeks of treatment was higher than before [(27.07±5.89)], MI [(162.7±40.20)] after 8 weeks of treatment was lower than before [(162.7±40.20)], and the difference was statistically significant ($P<0.05$). ITA° and MI were significantly different between the two groups after treatment ($P<0.05$). **Conclusion** The aqueous extract of loquat seed has good effects of antioxidation, melanogenesis inhibition and tyrosinase activity in vitro and has no obvious cytotoxicity. Human trials show that it has whitening effect and no adverse reactions.

Key words: aqueous extract of loquat seed; in vitro activity; human body efficacy; whitening; efficacy study

通信作者: 刘玮, 主任医师; 研究方向为皮肤美容、化妆品功效研究。E-mail: lwei5811@126.com

共同通信作者: 黄建梅, 教授; 研究方向为中药有效成分及体内过程分析。E-mail: huangjm@bucm.edu.cn

第一作者: 周澜华, 副主任医师; 研究方向为皮肤美容、损容性皮肤病的诊治。E-mail: lanhua0118@163.com

美白剂的开发成为近年来化妆品行业关注的热点,而目前常用的美白剂种类有限,如熊果苷、曲酸、氨甲环酸、维生素C等,存在稳定性不足、皮肤刺激性等缺点^[1-2]。枇杷属蔷薇科,枇杷核其种子内含氨基酸、维生素、多酚类、黄酮类和三萜类化合物等成分^[3-4]。成分分析表明,枇杷核具有潜在的延缓衰老、抗氧化、抗炎、防止皮肤变黑、保湿以及营养皮肤的功效^[3-7]。本研究通过探讨枇杷核水提物的体外活性、对人体皮肤美白的功效及安全性。为其作为美白剂的开发应用提供实验基础。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和材料:多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);台式低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);旋转蒸发仪(河南省予华仪器有限公司)。鲜枇杷核(福建省莆田市祥云堂药业提供);苯乙基间苯二酚(377,天津市大茂化学试剂厂);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, APEX BIO公司);2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS,上海易恩化学技术有限公司);MTT(LABLEAD公司);酪氨酸酶活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.1.2 细胞株:小鼠黑素瘤B16细胞(北京北纳创联生物技术有限公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 枇杷核水提物的制备和成分分析

1.2.1.1 枇杷核水提物的制备:鲜枇杷核100 g,称取并加入1 000 ml去离子水,80℃加热回流1 h,重复2次。过滤后合并滤液,70℃旋蒸浓缩,-80℃冷冻成固体后放入冻干机得枇杷核提取物冻干粉。取冻干粉适量,去离子水充分溶解,得到枇杷核水提液。

1.2.1.2 枇杷核水提物的成分分析:过色谱柱,质谱检测分析。

1.2.2 枇杷核水提物抗氧化活性实验

1.2.2.1 DPPH自由基清除实验:取0.1 mmol/L DPPH与等体积不同质量浓度的枇杷核水提物溶液混合,暗室室温反应30 min,波长517 nm处测定其吸光度,记为 A_i ,空白的吸光度为 A_0 , A_j 为无DPPH时枇杷核水提物的吸光度。DPPH自由基清除率(%)=[1-(A_i-A_j)/ A_0] \times 100%。

1.2.2.2 ABTS自由基清除实验:取等体积的ABTS和K2S2O8溶液混合,用PBS稀释至734 nm处吸光度为0.7左右,再与等体积不同质量浓度的枇杷核水提物溶液混合,静置,于波长734 nm处测吸光度,记为 A_i ,空白的吸光度为 A_0 , A_j 为无ABTS时枇杷核水提物的吸光度。ABTS自由基清除率%=[1-(A_i-A_j)/ A_0] \times 100%。

1.2.3 基于小鼠B16黑素瘤细胞的美白实验

1.2.3.1 B16细胞形态学实验:96孔板接种培养B16细胞,设置空白对照组及不同浓度给药组。加入不同浓度(9个浓度)的枇杷核水提物培养基溶液。孵育24 h,倒置显微镜下观察其细胞形态并拍照。

1.2.3.2 B16细胞活力实验:采用MTT法测定B16细胞活力。96孔板接种培养B16细胞。设置空白对照组及不同浓度给药组。加入不同浓度(8个浓度)的枇杷核水提物培养基溶液,孵育24 h。先后加入MTT(5 mg/ml)、DMSO溶液,酶标仪于490 nm波长处测各孔的吸光值。A为给药组的平均吸光度值;B为对照组(不给药)的平均吸光度值;C为调零组(只含有DMSO)的平均吸光度值。细胞相对存活率=(A-C)/(B-C) \times 100%。

1.2.3.3 B16细胞黑色素含量实验:采用NaOH裂解法测定细胞内黑色素含量。12孔板接种培养B16细胞。设置空白对照组、阳性药组及不同浓度给药组。孵育后分离细胞,离心,加入NaOH溶液(含10% DMSO),80℃水浴孵育,离心取上清液于酶标仪下检测405 nm处吸光度。A为给药组的平均吸光度值;B为对照组的平均吸光度值;C为调零组(只10%DMSO的1 mol/L的NaOH溶液)的平均吸光度值。细胞内黑色素含量(%)=(A-C)/(B-C) \times 100%。

1.2.3.4 酪氨酸酶活性实验:选用L-Dopa氧化法测定细胞内酪氨酸酶活性。B16细胞接种孵育、给药再孵育均与“1.2.3.3”项下相同。96孔板中加入细胞裂解离心后的上清液,加L-Dopa溶液(5 mmol/L),37℃孵育。475 nm波长处测定各孔的吸光度至其稳定。给药组平均吸光度值为A;对照组为B。细胞内酪氨酸酶活性(%)=A/B \times 100%。

1.2.4 人体美白功效测试

1.2.4.1 研究对象:选取2022年7月-2023年10月笔者医院门诊的32例年龄18~60岁面部褐色沉着斑患者。知情同意后入选。其中2例因个人原因退出。最终有效数据30例,皆为女性,平均年龄(28.4 \pm 8.7)岁。每人半侧脸按随机数字法进行分组,一侧半脸为枇杷核水提物治疗组(产品A组),另侧半脸为对照组(产品B组)。纳入标准:①年龄18~60岁;②双侧面部拟受试区域皮肤至少各有一处对称性的褐色色素沉着斑片,且直径不小于3 mm(非雀斑、色素痣);③患者对本研究知情,并签署知情同意书。排除标准:①有严重的系统性疾病或其他皮肤病者;②有严重皮肤过敏史者;③近1个月内接受过任何形式的面部皮肤治疗、果酸、激光或美容手术者,试验期间无法避免紫外线曝晒者;④受试部位1个月内有外涂抗炎药物者;⑤近1个月内参加药物临床试验者或其他化妆品功效评价者;⑥妊娠或哺乳期妇女。

1.2.4.2 试验样品:具体如下。①产品A(治疗组):枇杷核水提物溶液(浓度为80 mg/ml)、促渗剂(0.4%N-甲基吡咯烷酮);②产品B(对照组):无菌水、促渗剂(0.4%N-甲基吡咯烷酮)、调色剂(0.10 mg/ml焦糖色素)。

1.2.4.3 测试仪器:皮肤色度仪(德国CK公司型号:MPA4,包含Mexameter MX18、Skin Colorimeter CL400探头)、ViewSkin皮肤图像分析仪(中国安德公司)。

1.2.4.4 环境条件:测试环境处于恒温恒湿,温度20℃~22℃,湿度40%~60%。

1.2.4.5 测试方法:采用随机、双盲、半脸对照试验设计。具体操作如下:产品使用由患者在家中。每天早

晚各1次,使用前先清洁面部并擦干,按分组分别给予两侧面部1 ml的产品A和产品B涂抹,涂抹后立即用水溶面膜纸覆盖15 min。研究者在第0天、第4周、第8周与每位患者约定在医院对其皮肤生物特性进行评估,测量左右面部的皮肤个体类型角、皮肤黑色素指标,取平均值(重复测定3次)。个体类型角(ITA°):皮肤色度仪颜色探头(CL400)测得。ITA°大小与肤色深浅度呈单调递减关系。黑色素指数(MI):皮肤色度仪黑色素探头(MX18)测得。MI值大小与皮肤黑色素含量多少呈单调递增关系。

1.3 统计学分析:将数据导入Graph prism 8.0、SPSS 25软件进行数据处理和可视化分析。计量数据表示为:均值±标准差($\bar{x} \pm s$),并进行正态分布性检验和基于均值的方差齐性检验($\alpha=0.05$),符合正态分布要求和方差齐性,采用单因素方差分析、自身对照前后比较采用配对 t 检验,否则采用两个相关样本秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 枇杷核水提物的成分分析:质谱分析共鉴定得到99种化合物。营养成分包括脂肪酸类化合物棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等7种和氨基酸类化合物。功能成分包括糖苷类化合物苦杏仁苷和异柚葡萄糖苷2种,酚酸类化合物绿原酸、阿魏

酸、龙胆酸等12种,挥发油类化合物苯甲酸、苯甲酸甲酯、水杨酸甲酯等16种,黄酮类化合物槲皮素、芦丁、山柰酚等15种,和三萜类化合物熊果酸、桦木酸、齐墩果酸等26种。

2.2 枇杷核水提物抗氧化活性的测定:枇杷核水提物能清除DPPH(见图1A)和ABTS(见图1B)自由基,半抑制浓度(IC₅₀)值分别是7.98 mg/ml和1.11 mg/ml。具有抗氧化活性。见图1。

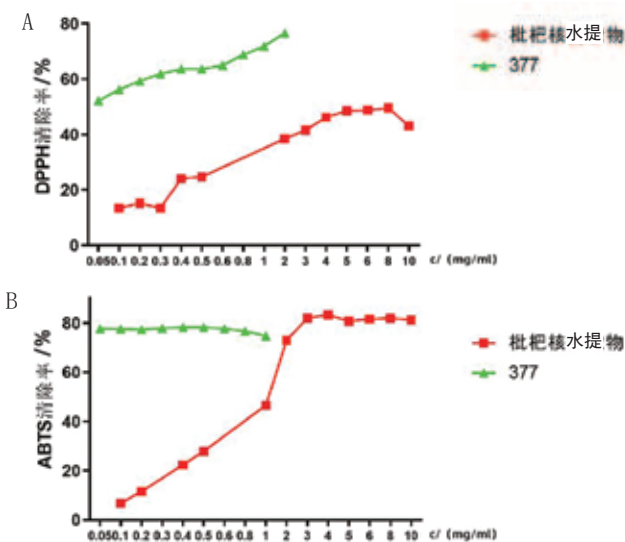


图1 枇杷核水提物和阳性药377对DPPH、ABTS自由基的清除作用

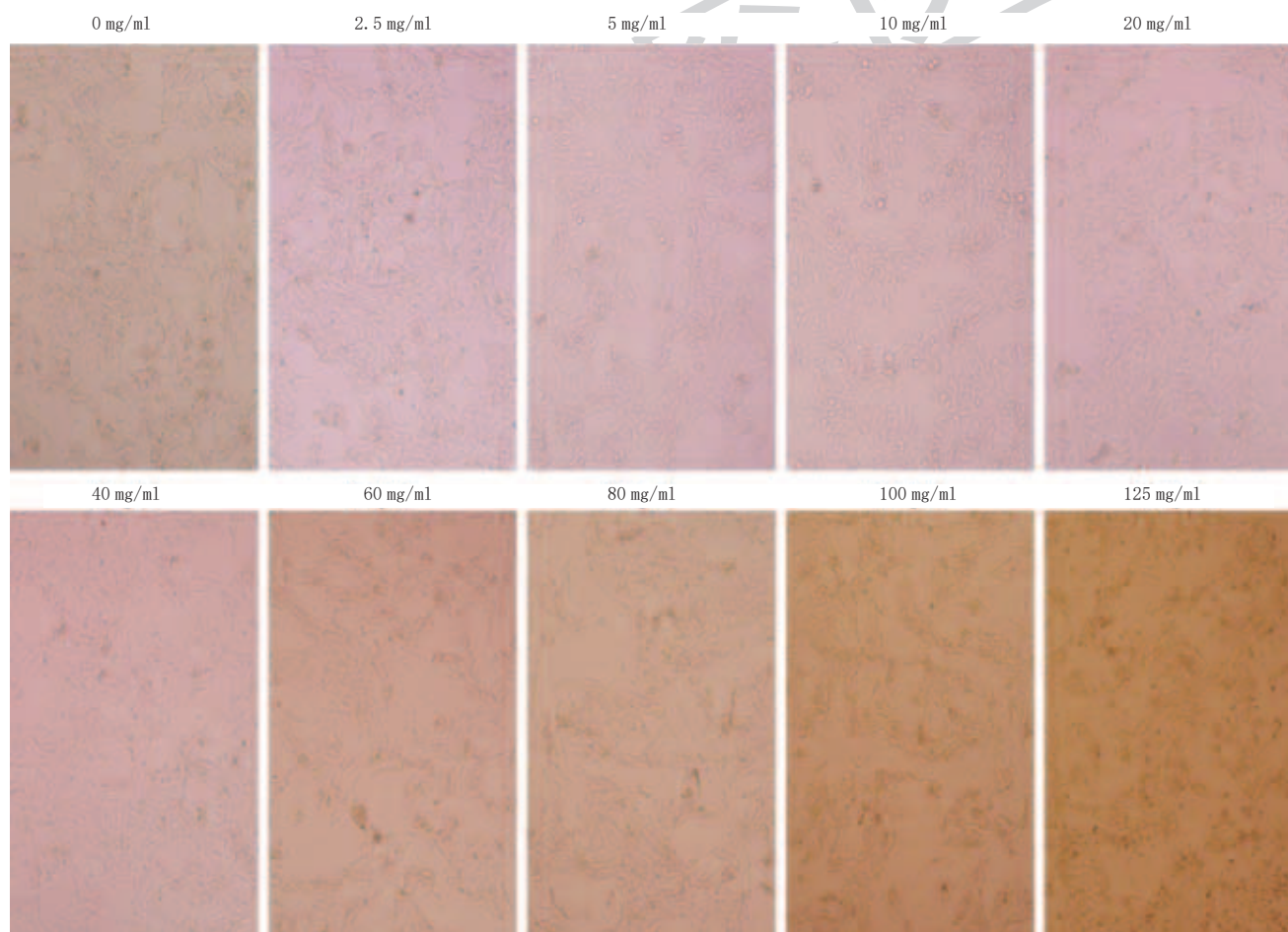


图2 B16细胞的形态(10×)

2.3 枇杷核水提取物对小鼠B16黑素瘤细胞的美白实验

2.3.1 B16细胞形态学实验：对照组B16细胞生长良好，形态正常。主要为两极的贴壁生长的上皮型细胞。加入不同浓度的枇杷核水提取物后，细胞形态均未出现明显变化。见图2。

2.3.2 B16细胞活力测定：经不同浓度枇杷核水提取物（2.5~100 mg/ml）处理24 h，与空白组相比，B16细胞活性差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。此浓度范围对B16细胞无毒性。见图3。

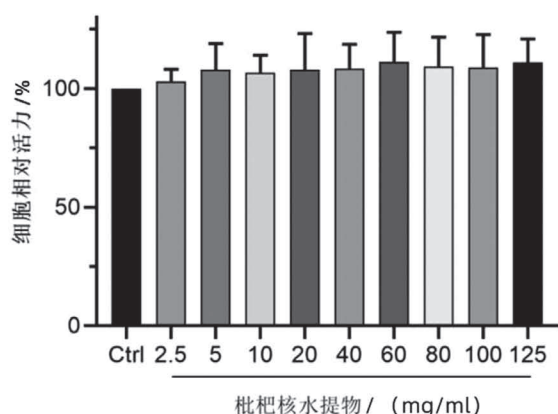
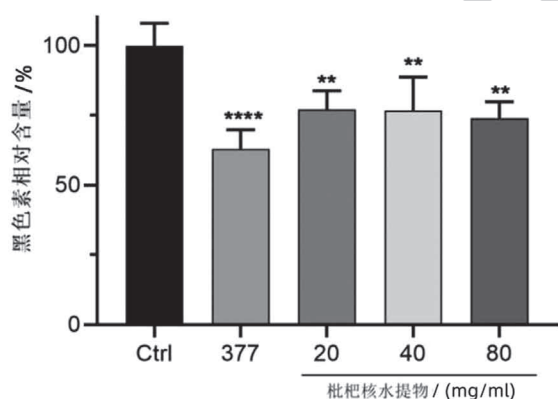


图3 枇杷核水提取物对B16细胞活性的影响

2.3.3 B16细胞黑色素含量抑制实验：枇杷核水提取物抑制B16细胞黑色素生成，与空白组比较差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）。见图4。



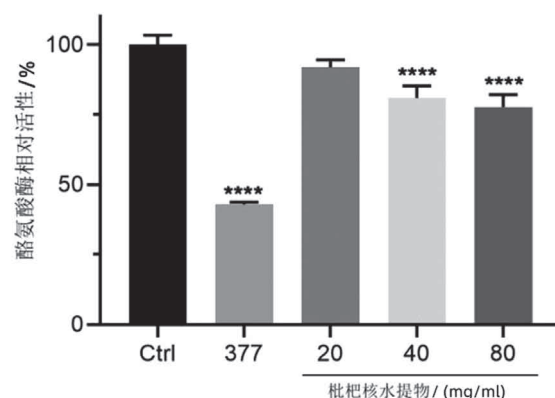
注：与空白组比较，** $P<0.01$ ，**** $P<0.0001$

图4 枇杷核水提取物对B16细胞黑色素含量的影响

2.3.4 B16细胞酪氨酸酶活性抑制实验：枇杷核水提取物明显抑制B16细胞的酪氨酸酶活性，与空白对照组比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。见图5。

2.4 人体美白功效测试结果

2.4.1 患者基本情况及不良反应：30例色斑患者完成试验，未发生不良反应。



注：****表示与空白组比较， $P<0.0001$

图5 枇杷核水提取物对B16细胞酪氨酸酶活性的影响

2.4.2 皮肤个体类型角和黑色素客观指标比较：治疗前枇杷核治疗组（产品A）与对照组（产品B）ITA°和MI平均值比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；治疗8周后治疗组ITA°平均值均较治疗前上升，MI平均值均较治疗前下降，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。对照组ITA°和MI平均值较治疗前差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。治疗后治疗组和对照组ITA°和MI比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。见表1~2。

表1 两组治疗前后个体ITA°比较 (例, $\bar{x} \pm s$)				
组别	治疗前	治疗后	t值	P值
治疗组 (n=30)	27.07 ± 5.89	34.02 ± 7.03	-8.048	<0.001
对照组 (n=30)	28.26 ± 6.94	28.48 ± 7.60	-0.411	0.684
t值	-1.586	7.153		
P值	0.124	<0.001		

表2 两组治疗前后黑色素MI比较 (例, $\bar{x} \pm s$)				
组别	治疗前	治疗后	t值	P值
治疗组 (n=30)	191.2 ± 50.98	162.7 ± 40.20	7.1	<0.001
对照组 (n=30)	190.7 ± 50.23	190.4 ± 50.23	0.533	0.589
t值	1.586	-6.996		
P值	0.124	<0.001		

3 讨论

本研究采用加热回流提取法获得枇杷核水提取物，液质联用初步分析水提取物的主要成分为三萜类、黄酮类、多酚类、脂肪酸类等物质。本研究选用了DPPH、ABTS自由基清除实验来测定枇杷核水提取物的抗氧化活性，实验结果显示清除效果明显。其原因可能与枇杷核中黄酮、多酚类还原类物质可与自由基的单电子配对而清除自由基相关^[5-8]。基于氧化应激在色斑的形成中起到重要作用^[14]，提示有体外抗氧化功能的枇杷核水提取物具有潜在的美白功效。

黑色素的多少和皮肤颜色深浅呈单调递增关系，过多

的黑色素会导致肤色变黑、出现色斑,甚至会引起皮肤癌变。酪氨酸酶起到了调控皮肤黑色素生成的速度及数量的关键作用。本研究采用与人体黑素细胞生理上较为接近的小鼠黑色素瘤B16细胞作为研究模型,通过测定细胞增殖率、黑色素含量以及酪氨酸酶活性,在细胞水平检测了枇杷核水提物的体外美白活性,对枇杷核水提物的细胞安全性和美白作用机制进行了初步研究,结果显示,枇杷核水提物在浓度为2.5~80 mg/ml时,对细胞无明显毒性作用。为枇杷核水提物应用安全性提供了依据。并发现枇杷核水提物能抑制小鼠B16黑色素瘤细胞黑色素的生成及酪氨酸酶的活性。其作用机制可能与其成分中含有不饱和脂肪酸 α -亚麻酸和亚油酸能加速酪氨酸酶蛋白降解、含多酚类物质可与酪氨酸转化酶结合,抑制酪氨酸酶的活性,从而阻止黑色素的生成,防止皮肤变黑或出现色斑^[8-13]。皮肤氧自由基激发的氧化损伤及酪氨酸酶活性增强是诱导皮肤黑色素增多的主要因素^[14]。体外实验显示了枇杷核水提物的美白活性。在体外抗氧化实验和细胞黑色素含量、酪氨酸酶活性实验中都选取了苯乙基间苯二酚(377)作为阳性对照物,源于377作为公认的美白剂收录于2015版化妆品准用目录,可强效抑制酪氨酸酶并具抗氧化功效^[15]。

本研究还通过人体美白功效试验验证了枇杷核水提物的人体皮肤美白功效。试验采用随机、双盲、半脸对照的设计方案,结果评估采用了客观指标表示皮肤颜色的ITA°和黑色素含量的MI值,避免了主观评价的缺点,增加了结果可靠性。半脸对照的试验方法有效减小了个体误差。试验中30例患者均无不良反应,也初步验证了枇杷核提取物原料使用的安全性。但本研究样本量较少,仅30例,结果有一定局限性。如样本量进一步扩大,可进一步验证枇杷核水提物的人体美白功效性及安全性,为新美白剂的开发应用提供更多的依据。

[参考文献]

[1]周欣瑜,范梅梅,温雪华,等.化妆品风险物质检测方法的研究进

展[J].日用化学工业,2022,52(4):431-437.

[2]魏芳,杨明,郭德华,等.进口化妆品曲酸添加情况的调查[J].中国环境卫生检疫杂志,2007,30(4):106-108.

[3]余筱洁,金晓燕,周存山,等.红肉和白肉枇杷果仁营养成分分析[J].浙江农林大学学报,2011,28(1):149-152.

[4]翁爱彬,郑荔莉.大体积富集-胶束毛细管电色谱法测定枇杷核中的有效成分[J].中国医院药学杂志,2010,30(24):2129-2130.

[5]焦士蓉,王玲.枇杷核黄酮类物质微波法提取及对羟自由基清除作用研究[J].食品科学,2006,27(9):84-87.

[6]季晨怡,郭瑞昕.枇杷核中黄酮类物质的提取与清除自由基效果的研究[J].广东化工,2016,43(2):17-18.

[7]李长虹,秦小梅,张璐璐,等.枇杷核挥发油化学成分及体外抗氧化活性研究[J].华中师范大学学报,2014,48(1):58-61.

[8]王萍,赖普辉,李辉,等.响应面法优化陕产枇杷核多酚的提取及体外抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2019,36(7):22-28.

[9]吴颖,崔彬清,王露,等.5种天然植物提取物抗氧化性和酪氨酸酶抑制作用的比较[J].现代食品科技,2018,34(10):81-86,37.

[10]荣家闵,张仁文.槲皮素体外抗氧化活性研究[J].科学技术创新,2019,(29):43-44.

[11]林国荣,沈高杨,陈剑锋.HPLC法测定枇杷核中苦杏仁苷含量[J].海峡医学,2007,14(1):41-42.

[12]林国荣,吴磊,吴锦程.枇杷叶总黄酮的富集及生物活性的研究[J].食品科技,2014,39(11):233-237.

[13]焦晶晶,张英.植物类黄酮作为护肤因子在化妆品领域的研究进展[J].精细化工,2004,21(2):98-102.

[14]王一帆,赖家珍,龙晓英,等.中药美白机制及功效评价进展[J].广东药学报,2014,30(4):525-526.

[15]于承任,徐学刚,李远宏,苯乙基间苯二酚的研究应用进展[J].中国皮肤性病学杂志,2020,34(6):692-695.

[收稿日期]2023-12-19

本文引用格式:周澜华,李忆红,赵蕊,等.枇杷核水提物的体外活性及人体美白功效研究[J].中国美容医学,2025,34(1):10-14.

· 告作者和读者 ·

《中国美容医学》来稿要求

①论著类文稿字数限制在5 000字以内,有中英文摘要,英文表述的内容与中文对应,包括英文文题,全部作者姓名、单位及邮编,英文摘要要符合英文表达习惯,注意正确的语态、时态,关键词5~8个。

②临床总结(经验交流)类文稿要求与论著相同。综述类文章需指导老师或本专业权威专家审校后投寄,其余要求及书写格式同论著类文稿。

③为数据检索之便并与国际接轨,所有文章应有中英文摘要,除综述与教学类文章为提示性摘要外,其余均为结构式摘要。