·实验研究·

罗仙子油精制工艺优化及其对 *D*-半乳糖致小鼠皮肤衰老的作用研究

姜晓琳,陈亮元,牛　君,罗露香,杨　全,程轩轩

(广东药科大学中药学院,国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点研究室,国家中药材产业技术体系广州综合试验站,广东省南药规范化种植与综合开发工程技术研究中心,广州 510006)

[**摘要**] **目的**:优化罗仙子油的精炼工艺,研究罗仙子精油对 *D*-半乳糖致小鼠皮肤衰老的干预作用。**方法**:分别考察不同因素对罗仙子油的水化脱胶、碱炼脱酸精炼效果的影响,分析比较罗仙子油精制前后的理化值。将昆明种雌性小鼠随机分为正常组、模型组、基质组、维生素 E 组、罗仙子精油低剂量组和高剂量组。除正常组外,其余各组均每日颈背部皮下注射 3% *D*-半乳糖连续 42 d,建立小鼠亚急性衰老模型;各给药组于小鼠颈背部涂抹相应药物 *qd*,持续 32 d,HE 染色观察皮肤组织形态,检测皮肤含水量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、羟脯氨酸(HYP)及丙二醛(MDA)的含量。采用家兔对罗仙子精油进行皮肤刺激性实验,将 12 只家兔分为正常组、完整皮肤组、破损皮肤组。在家兔背部左侧给予 0.5 mL 罗仙子精油,右侧给予同体积基质,*qd*,连续 7 d。观察药物对家兔皮肤的刺激性,对皮肤红斑和水肿进行评分,于末次给药后 72 h 对给药部位皮肤进行 HE 染色,并观察皮肤组织形态。**结果**:罗仙子油精炼后,碘值(18.714 ± 0.116) g·100 g^{-1}、酸值(0.465 ± 0.006) mg·g^{-1}、过氧化值(0.016 ± 0.001) g·100 g^{-1}和皂化值(130.212 ± 1.623) mg·g^{-1},符合按摩精油及润肤油的国家标准。与模型组比较,罗仙子精油组小鼠皮肤真皮层增厚,毛囊数明显增加且胶原纤维增多,皮肤含水量、HYP 含量、SOD 及 GSH-PX 活力明显提高($P < 0.05$,$P < 0.01$),MDA 含量显著降低($P < 0.01$)。在家兔皮肤刺激实验中,各组家兔的红斑和水肿评分均为 0 分,皮肤刺激性均评价为无刺激。**结论**:罗仙子精油具有延缓 *D*-半乳糖致小鼠皮肤衰老的作用,且无刺激性,具有潜在应用价值。精炼后罗仙子油的色泽、气味、澄明度和流动性均得到改善,为罗仙子精油的抗衰老产品开发提供依据。

[**关键词**] 罗仙子油;*D*-半乳糖;抗衰老;精炼;脱胶;脱酸

[**中图分类号**] R961.1　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003 - 3734(2021)02 - 0162 - 08

Optimization of the refining technology of maggots oil and its effect on skin aging induced by *D*-galactose in mice

JIANG Xiao-lin, CHEN Liang-yuan, NIU Jun, LUO Lu-xiang, YANG Quan, CHENG Xuan-xuan

(*Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production & Development of Cantonese Medicinal Materials, Comprehensive Experimental Station of Guangzhou, Chinese Materia Medica, China Agriculture Research System, Guangdong Provincial Research Center on Good Agricultural Practice& Comprehensive Agricultural Development Engineering Technology of Cantonese Medicinal Materials, School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou* 510006, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To optimize the refining technology of maggots oil and study the effect of refined maggots oil on skin aging induced by *D*-galactose in mice. **Methods**: The effects of different factors on the refining technology (including hydration degumming and deacidification by alkali-refining) of maggots oil were investigated, and the physical and chemical properties of maggots oil were analyzed. Female Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, matrix group, vitamin E group, low dose and high dose refined maggots oil

[**基金项目**] 中央本级重大增减支项目"名贵中药资源可持续利用能力建设项目"(2060302)

[**作者简介**] 姜晓琳,女,硕士研究生,主要从事中药化学成分和药理活性研究。E-mail:Lynn2511@126.com。

[**通讯作者**] 程轩轩,女,副教授,主要从事中药化学成分和药理活性研究。E-mail:gdyxycxx@126.com。

groups. Except for the normal group, the mice in the other groups were subcutaneously injected 3% *D*-galactose into the back of the neck for 42 consecutive days to establish the subacute aging model. The mice in each administration group were smeared with corresponding drugs once a day for 32 days. HE staining was used to observe the micromorphology of skin tissue, and the contents of water, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), hydroxyproline (HYP) and malondialdehyde (MDA) in the skin were detected. Ten rabbits were divided into normal group, intact skin group and damaged skin group. The skin irritation test was conducted on rabbits. Twelve rabbits were divided into normal group, intact skin group and damaged skin group. The rabbits were given 0.5 mL maggots essential oil on the left side of the back and olive oil of the same volume on the right side, once a day for 7 days. The irritation effect of the drug on the rabbit skin was observed, and the skin erythema and edema were scored. The skin of the administration site was stained with HE at 72 h after the last administration, and the skin tissue morphology was observed. **Results**: After refining, the iodine value, acid value, peroxide value and saponification value of maggots oil were (18.714 ± 0.116) g·100 g^{-1}, (0.465 ± 0.006) mg·g^{-1}, (0.016 ± 0.001) g·100 g^{-1} and (130.212 ± 1.623) mg·g^{-1}, respectively, which conformed to the national standard of the massage essential oil and emollient oil. Compared with the model group, the dermis of mice in the maggots essential oil groups were thickened, the numbers of hair follicles and collagen fibers, the contents of water, HYP, SOD and GSH-Px in the skin increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the content of MDA decreased significantly ($P < 0.01$). In the rabbit skin irritation test, the erythema and edema score of each group were 0, and the skin irritation was evaluated as no irritation. **Conclusion**: Maggots essential oil has anti-aging effect on mouse skin induced by *D*-galactose without irritation, and has potential application value. The color, smell, clarity and fluidity of maggots essential oil are improved after refining, which provides the basis for the development of anti-aging products of maggots essential oil.

[**Key words**] maggots oil; *D*-galactose; anti-aging; refining; degumming; deacidification

衰老是生物体随着时间推移,由于体内外环境因素造成的生物体功能衰退。皮肤是人体最大的器官,参与全身的机能运动,也是最早反映机体衰老的组织,因此预防和延缓皮肤衰老已成为关注的热点之一[1-2]。

罗仙子为丽蝇科昆虫大头金蝇(*Chrysomyis megacephala* Fab.)及其近缘动物的幼虫或蛹壳,又名蛆、五谷虫、水仙子等。本品性寒,味咸、甘,无毒,归脾、胃经,具有健脾消积、清热除疳的功效[3]。近年来关于罗仙子的研究主要集中在活性肽[4]、蛋白类成分[5-7]。课题组前期研究发现,罗仙子油中含有大量不饱和脂肪酸,体外对 DPPH 和 ABTS 自由基有一定的清除能力[8]。本研究采用颈背部注射 *D*-半乳糖的方法建立小鼠亚急性衰老模型,探讨罗仙子油对衰老小鼠皮肤含水量、皮肤组织形态、皮肤中羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽过氧化物(glutathione peroxidase, GSH-Px)含量的影响,评价罗仙子油的抗衰老作用。此外,还考察了工艺条件对罗仙子油精炼效果的影响,为罗仙子油的开发应用提供参考。

材料与方法

1 药品与试剂

罗仙子由中山大学胡新军博士提供并鉴定为大头金蝇的幼虫;橄榄油(佛山市梦莎美容化妆品有限公司,批号:FH11);维生素 E 软胶囊(广州白云山制药总厂生产,批号:2150005);*D*-半乳糖(苏州天可贸易有限公司,批号:KG90439,纯度:99%);SOD 试剂盒、GSH-Px 试剂盒、HYP 试剂盒、MDA 试剂盒和蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所)。

2 仪器

PK－S23 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);AUY120 分析天平(日本岛津公司);UV－2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);KQ5200DE 型超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司);RE－52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TDL－80－2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);85－1 恒温磁力搅拌器(常州国华电器有限公司)。

3 动物

SPF 级昆明种小鼠,雌性,共计 90 只,体重 18 ~

22 g;健康成年家兔 12 只,体质量 2.5 ~ 3.0 kg,雌雄各半,均购自广州中医药大学实验动物中心。动物于温度为 18 ~ 22 ℃,相对湿度为 50% ~ 60%,12 h/12 h 白昼规律交替的环境中饲养 1 周,自由饮食、饮水。

4 罗仙子油的提取

根据课题组前期优化的提取方法:将罗仙子药材微波干燥后粉粹,称取粉末 200 g,置于锥形瓶中,加入 5 000 mL 正己烷,超声提取 3 次(功率 400 W),每次 30 min,合并提取液,过滤,减压回收溶剂,得罗仙子油。

5 罗仙子油的精炼工艺研究

5.1 水化脱胶 根据文献[9-12]调整方案,称取罗仙子油 10 g 置于 50 mL 烧杯中,加热至一定温度,以 100 r·min^{-1}进行磁力搅拌,按照一定粗油质量的百分比加入磷酸,搅拌 15 min;再按照一定粗油质量的百分比加入蒸馏水,调整转速至 70 r·min^{-1},磁力搅拌 30 min,4 000 r·min^{-1}离心 15 min,收集上清液,得到脱胶油。

考察不同因素对水化脱胶的影响:考察加水量(5%,10%,15%,20%,30%)对脱胶效果的影响时,固定加热温度 50 ℃、加热时间 20 min、磷酸添加量 0.5%。考察磷酸添加量(0.3%,0.4%,0.5%,0.6%,0.7%)对脱胶效果的影响时,固定加热温度 50 ℃、加水量 20%、加热时间 20 min。考察加热温度(30,40,50,60,70 ℃)对脱胶效果的影响时,固定加水量 20%、加热时间 20 min。考察加热时间(10,20,30,40,50 min)对脱胶效果的影响时,固定加热温度 50 ℃、加水量 20%。每个试验重复 3 次。

5.2 碱炼脱酸 根据文献[11-14]调整方案,称取 10 g 脱胶油,置于 50 mL 烧杯中,搅拌加热至一定温度后,逐滴加入一定质量分数的等温 NaOH 溶液,以 100 r·min^{-1}搅拌使碱液和油完全混合,当有明显皂粒出现时,减慢搅拌速度,待絮状物充分凝结后停止搅拌,保温沉降 4 h。将油皂混合物在 4 000 r·min^{-1}下离心 15 min,分离出上层油,将油加热到 80 ℃,按油量 15% 加入 80 ℃蒸馏水洗涤至中性后,于真空干燥箱脱水 2 h 后得到脱酸油。

考察不同因素对碱炼脱酸的影响:考察碱浓度(2%,6%,10%,14%,18%)对脱酸效果的影响时,固定超碱量为 0.2%、碱炼温度为 50 ℃、碱炼 30 min。考察超碱量(0.05%,0.1%,0.15%,0.20%,0.25%)对脱酸效果的影响时,固定碱浓度 10%,碱炼温度为 50 ℃,碱炼时间 30 min。考察加热温度(40,50,60,70,80 ℃)对脱酸效果的影响时,固定碱浓度为 10%,碱炼时间为 30 min,超碱量为 0.2%。考察加热时间(15,20,25,30,35 min)对脱酸效果的影响时,固定 NaOH 浓度为 10%,超碱量为 0.2%,碱炼温度为 50 ℃。每个试验重复 3 次。

5.3 罗仙子精油理化指标的测定 酸值和过氧化值测定参考国家标准 GB/T 5009.37-2003。碘值测定参考国家标准 GB/T 5532-2008。皂化值测定参考国家标准 GB/T 5534-2008。

6 罗仙子精油对 *D*-半乳糖致小鼠亚急性衰老的作用

6.1 动物分组与处理 将 90 只昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、维生素 E 组(100 μL·d^{-1},阳性对照)、橄榄油组(100 μL·d^{-1},基质组)、罗仙子精油低剂量组(虫油 + 橄榄油:50 μL·d^{-1} + 50 μL·d^{-1})和高剂量组(虫油 100 μL·d^{-1}),每组 15 只。各组小鼠颈背部脱毛约 5 cm × 5 cm,模型组和各给药组小鼠每日均颈背部皮下注射 3% *D*-半乳糖溶液 120 mg·kg^{-1}·d^{-1},正常组注射等容量生理盐水,连续注射 42 d[15-16]。从造模 d 11 开始,维生素 E 组、橄榄油组、罗仙子精油高、低剂量组小鼠每天在脱毛处涂抹相应药物,观察并记录[15,17]。d 42 末次给药 1 h 后,颈椎脱臼法处死小鼠,立即取小鼠背部正中皮肤,除去血液及皮下脂肪组织。

6.2 皮肤组织的病理学变化 取小鼠背部脱毛区域皮肤组织标本约 0.5 cm × 0.5 cm,置于 4% 多聚甲醛液中固定。经脱水、透明、浸蜡、包埋、常规切片、HE 染色后,于光学显微镜下观察,比较各组皮肤组织的显微形态特征。

6.3 皮肤含水量的测定 取脱毛后背部皮肤 1 cm × 1 cm,精密称其湿重,放置烘箱 24 h 后精密称其干重,计算皮肤含水量[17]。

6.4 皮肤生化指标的检测 取小鼠背部脱毛后的皮肤组织约 0.5 g,制备 10% 的皮肤组织匀浆液。按照试剂盒说明书测定小鼠皮肤中 HYP,SOD,MDA 和 GSH-Px 的含量。

7 皮肤刺激性实验

7.1 分组与处理 取家兔 12 只,随机分为正常组、完整皮肤组和破损皮肤组,每组 4 只。根据文献方法进行家兔皮肤刺激实验[18-19]。于给药前 24 h 将家兔背部脊柱两侧去毛,脱毛面积约 3 cm × 3 cm,破损皮肤组首次给药前使用无菌注射器针头划“#”字损伤表皮层,以不伤真皮、有轻度渗血为度。两组均

采用同体左右侧自身对照法给药,左侧涂抹 0.5 mL 罗仙子精油,右侧涂抹同体积的基质(橄榄油)。连续给药 7 d,*qd*,涂抹后 6 h 用温水清洗观察皮肤状态,于末次给药 24 h 后洗去残留药物。

7.2 观察指标 于末次清除药物后 1,24,48 和 72 h,观察涂抹部位有无红斑和水肿等情况,按照《皮肤刺激反应评价标准》[20]进行评分。

7.3 皮肤组织的病理学变化 末次清除药物后 72 h,将家兔处死,剪取给药部位皮肤及皮下组织,采用组织标本固定液固定,然后经脱水、透明、浸蜡、包埋、常规切片、HE 染色后,于光学显微镜下观察,比较各组皮肤组织的显微形态特征。

8 统计分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

结 果

1 水化脱胶工艺优化

1.1 加水量对脱胶效果的影响 由表 1 可知,随着加水量增大,脱胶率呈上升趋势,且罗仙子油由较浑浊的黄褐色逐渐变为澄清的金黄色,但精油得率逐渐降低,综合考虑,水的适宜添加量为 20%。

表 1 加水量对脱胶效果的影响 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

参数	加水量/%				
	5	10	15	20	30
脱胶率/%	80.57 ± 0.31	82.97 ± 0.26	85.03 ± 0.21	88.36 ± 0.14	90.14 ± 0.19
精油得率/%	91.42 ± 0.12	91.17 ± 0.18	88.75 ± 0.13	86.60 ± 0.17	79.74 ± 0.22

1.2 加酸量对脱胶效果的影响 由表 2 可知,加酸量对脱胶效率影响不显著,对脂肪油性状改善不明显,且加酸量过大易使油酸败,故选择加酸量 0.3%。

表 2 加酸量对脱胶效果的影响 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

参数	加酸量/%				
	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
脱胶率/%	63.15 ± 0.22	65.08 ± 0.19	66.74 ± 0.26	67.31 ± 0.18	66.52 ± 0.17
精油得率/%	89.24 ± 0.12	89.14 ± 0.17	88.63 ± 0.13	89.33 ± 0.04	88.67 ± 0.15

1.3 加热温度对脱胶效果的影响 由表 3 可知,随着温度的升高,脱胶率呈逐渐上升趋势,但精油得率先升高后降低,综合考虑确定适宜加热温度 50 ℃为宜。

表 3 加热温度对脱胶效果的影响 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

参数	加热温度/℃				
	30	40	50	60	70
脱胶率/%	58.62 ± 0.24	62.57 ± 0.16	66.19 ± 0.21	68.31 ± 0.28	70.01 ± 0.34
精油得率/%	89.90 ± 0.11	87.98 ± 0.19	90.00 ± 0.22	85.29 ± 0.28	86.58 ± 0.26

1.4 加热时间对脱胶效果的影响 由表 4 可知,加热时间对脱胶率和精油得率的影响不显著,综合考虑确定适宜加热时间为 20 min。

表 4 加热时间对脱胶效果的影响 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

参数	加热时间/min				
	10	20	30	40	50
脱胶率/%	53.49 ± 0.27	55.08 ± 0.15	57.39 ± 0.23	56.94 ± 0.12	58.39 ± 0.33
精油得率/%	91.21 ± 0.22	92.26 ± 0.18	89.75 ± 0.23	91.02 ± 0.21	87.77 ± 0.27

2 碱炼脱酸工艺优化

2.1 碱浓度对脱酸效果的影响 从表 5 可知,随着碱浓度的升高,罗仙子精油的酸值和精油得率均逐渐降低。综合考虑,选择适宜碱浓度为 10%。

表 5 碱浓度对脱酸效果的影响 $\bar{x} \pm s$, $n=3$

参数	碱浓度/%				
	2	6	10	14	18
精油的酸值	2.43 ±0.11	2.25 ±0.14	1.64 ±0.16	0.14 ±0.07	0.07 ±0.02
精油得率/%	92.07 ±0.11	90.98 ±0.15	85.30 ±0.17	66.50 ±0.20	65.85 ±0.14

2.2 超碱量对脱酸效果的影响 从表 6 可知,随着超碱量增加,罗仙子精油酸值和精油得率均逐渐降低。综合考虑,选择 0.2% 的超碱量。

表 6 超碱量对脱酸效果的影响 $\bar{x} \pm s$, $n=3$

参数	超碱量/%				
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
精油的酸值	1.50 ±0.17	1.40 ±0.12	1.26 ±0.19	1.14 ±0.11	1.05 ±0.18
精油得率/%	61.92 ±0.20	59.77 ±0.19	58.95 ±0.23	56.90 ±0.18	30.08 ±0.22

2.3 加热温度对脱酸效果的影响 从表 7 可知,随着加热温度的升高,精油得率和酸值都先升高后降低,综合考虑,选择 50 ℃进行碱炼脱酸。

表 7 加热温度对脱酸效率的影响 $\bar{x} \pm s$, $n=3$

参数	加热温度/℃				
	40	50	60	70	80
精油的酸值	0.44 ±0.15	1.00 ±0.16	1.00 ±0.19	1.03 ±0.14	0.78 ±0.18
精油得率/%	63.07 ±0.10	65.39 ±0.14	65.14 ±0.16	63.04 ±0.11	59.85 ±0.17

2.4 加热时间对脱酸效果的影响 从表 8 可知,加热时间对罗仙子精油得率和素质的影响较小,综合考虑,选择 30 min 进行碱炼脱酸。

表 8 加热时间对脱酸效率的影响 $\bar{x} \pm s$, $n=3$

参数	加热时间/min				
	15	20	25	30	35
精油的酸值	0.44 ±0.08	0.59 ±0.13	0.74 ±0.11	0.44 ±0.17	0.59 ±0.11
精油得率/%	62.61 ±0.10	63.02 ±0.16	62.70 ±0.15	62.72 ±0.11	62.42 ±0.12

3 罗仙子油精制前后理化值比较

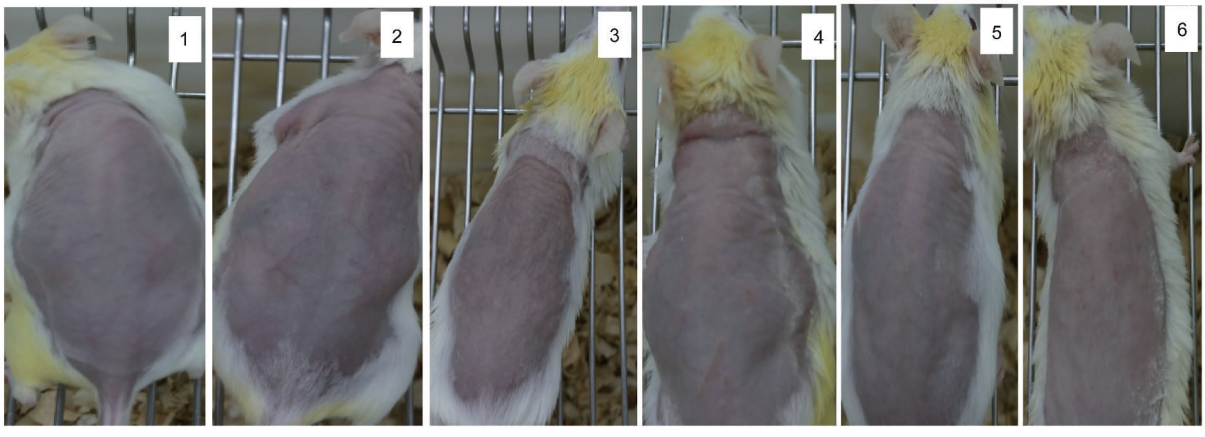
分别测定罗仙子油精制前后的酸值、碘值、过氧化值以及皂化值(见表 9)。酸值表示油脂中游离脂肪酸的含量,为评价油脂质量的重要指标。经测定,精炼后罗仙子油的酸值显著降低,表明脱胶和脱酸工艺将易氧化成酸败的游离脂肪酸已基本去除。碘值表示油脂中不饱和脂肪酸的含量,精炼后碘值显著降低。油脂中的过氧化值是衡量油脂质量的重要指标,过氧化值过高,油脂会自动氧化而引起变质,精炼后过氧化值显著降低。中华人民共和国国家标准 GB/T 26516-2011 按摩精油及 GB/T 29990-2013 润肤油中均对精油酸值作了规定[21-22],分别要求低于≤7 $mg \cdot g^{-1}$ 及≤5 $mg \cdot g^{-1}$,本实验样品精油均符合以上标准规定。

表 9 罗仙子油精制前后理化值对比 $\bar{x} \pm s$, $n=3$

精制前后	理化值			
	酸值/$mg \cdot g^{-1}$	碘值/$g \cdot 100\ g^{-1}$	过氧化值/$g \cdot 100\ g^{-1}$	皂化值/$mg \cdot g^{-1}$
精制前(粗油)	4.337 ±0.738	56.067 ±0.696	0.037 ±0.009	168.873 ±2.300
精制后(精油)	0.465 ±0.006	18.714 ±0.116	0.016 ±0.001	130.212 ±1.623

4 罗仙子精油对 *D*-半乳糖致小鼠皮肤衰老的影响

4.1 皮肤观察 图 1 所示，正常组皮肤光滑，有色泽、弹性；模型组皮肤粗糙且有皱纹，干燥角化、无光泽，表皮层变薄，失去弹性、柔软性；与模型组相比，维生素 E 组、罗仙子精油低、高剂量组的表皮皱纹减少，皮肤光滑、有弹性、有光泽。



1：正常组；2：模型组；3：橄榄油组；4：维生素 E 组；5：罗仙子精油低剂量组；6：罗仙子精油高剂量组

图 1 各组小鼠颈背部给药皮肤外观照片

4.2 各组小鼠皮肤含水量 见表 10。

表 10 各组小鼠皮肤含水量比较 $\bar{x} \pm s, n = 12$

组别	皮肤含水量/%
正常组	66.52 ± 5.03
模型组	61.15 ± 1.23[b]
橄榄油组	63.80 ± 2.17[d]
维生素 E 组	64.65 ± 3.03[d]
罗仙子精油低剂量组	66.50 ± 6.23[d]
罗仙子精油高剂量组	65.33 ± 4.31[d]

与正常组比较，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$；与模型组比较，c：$P < 0.05$，d：$P < 0.01$

由表 10 可知，与正常组相比，模型组小鼠皮肤含水量显著减少（$P < 0.01$）；与模型组相比，罗仙子精油低剂量和高剂量组皮肤含水量均显著增加（$P < 0.01$），且高于橄榄油组和维生素 E 组。

4.3 各组小鼠皮肤组织中 HYP，SOD，MDA 和 GSH-Px 的含量 如表 11 所示，与正常组相比，模型组小鼠皮肤组织 HYP 含量、SOD 和 GSH-Px 活性均显著下降（$P < 0.01$），MDA 含量显著增高（$P < 0.01$）。与模型组比较，罗仙子精油组小鼠皮肤组织中 HYP 含量增高（$P < 0.05$），SOD 和 GSH-Px 活力显著增强（$P < 0.01$），MDA 含量显著降低（$P < 0.01$）。罗仙子精油组的 SOD 活力高于维生素 E 组，低剂量组的 MDA 含量低于维生素 E 组。

表 11 各组小鼠皮肤组织中 HYP，SOD，MDA 和 GSH-Px 的含量 $\bar{x} \pm s, n = 8$

组别	HYP/μg·mg^{-1}	SOD/U·mg prot^{-1}	MDA/nmol·mg prot^{-1}	GSH-Px/U·mg prot^{-1}
正常组	1.79 ± 0.36	475.66 ± 27.69	3.63 ± 0.37	44.77 ± 3.90
模型组	1.29 ± 0.32[b]	338.87 ± 28.38[b]	5.11 ± 0.28[b]	30.32 ± 3.44[b]
橄榄油组	1.51 ± 0.26	344.23 ± 27.85[b]	3.86 ± 0.19[d]	36.95 ± 3.26[bd]
维生素 E 组	1.83 ± 0.18[d]	407.77 ± 36.55[bd]	3.23 ± 0.29[ad]	42.22 ± 2.52[d]
罗仙子精油低剂量组	1.74 ± 0.17[c]	411.69 ± 23.91[bd]	3.09 ± 0.39[ad]	33.57 ± 3.17[b]
罗仙子精油高剂量组	1.75 ± 0.24[c]	419.52 ± 31.12[bd]	3.26 ± 0.16[ad]	41.33 ± 3.61[d]

与正常组比较，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$；与模型组比较，c：$P < 0.05$，d：$P < 0.01$

4.4 小鼠皮肤病理形态学观察 HE 结果表明（图 2），正常组的小鼠皮肤形态结构完整，表皮和真皮层界限清楚，毛囊和皮脂腺饱满，染色较均匀，小鼠皮肤真皮胶原纤维束细长，排列成束状，紧密；模型组小鼠皮肤组织真皮层变薄，毛囊和皮脂腺数量显著减少，胶原纤维层明显减少，排列疏松，部分纤维明显断裂，排列紊乱；维生素 E 组的小鼠皮肤生长良好，毛囊数较衰老模型组明显增加，胶原纤维束呈波纹状紧密排列；罗仙子精油低剂量组的小鼠表皮较规则，真皮层厚度增加，但毛囊和汗腺不够饱满；罗仙子

精油高剂量组的小鼠表皮规则,真皮厚度、毛囊数与衰老模型组相比明显增加,胶原纤维排列较紧密。

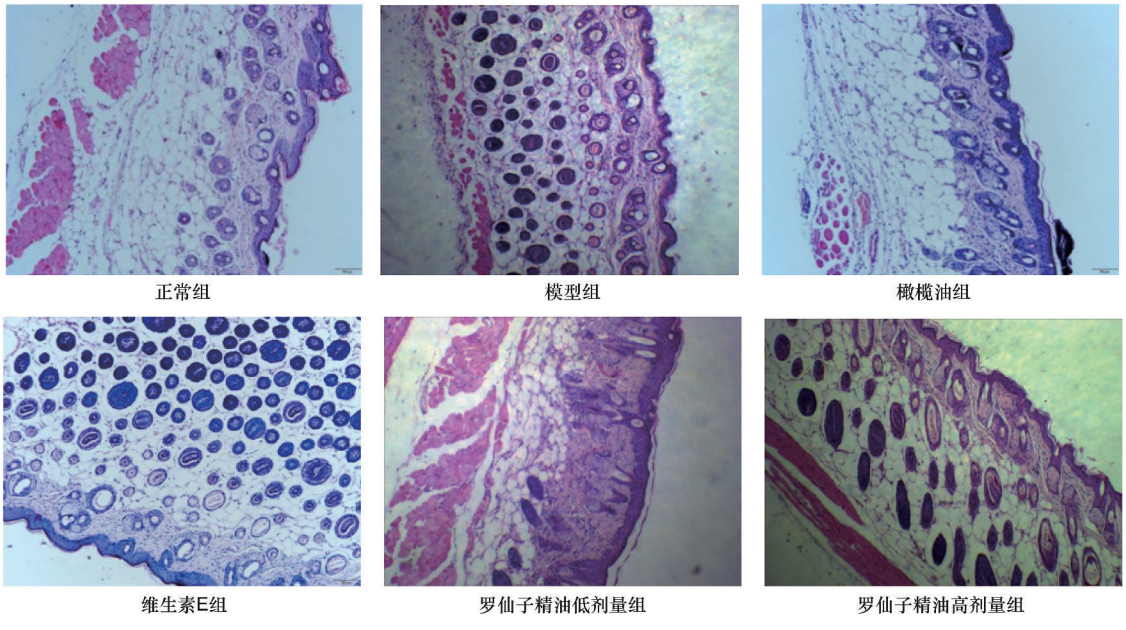


图 2 小鼠皮肤切片病理组织学观察(HE, ×100)

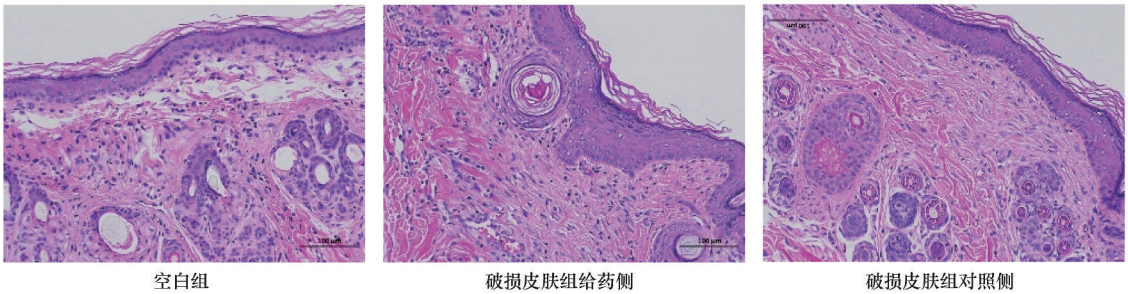
5 罗仙子精油的皮肤刺激性实验

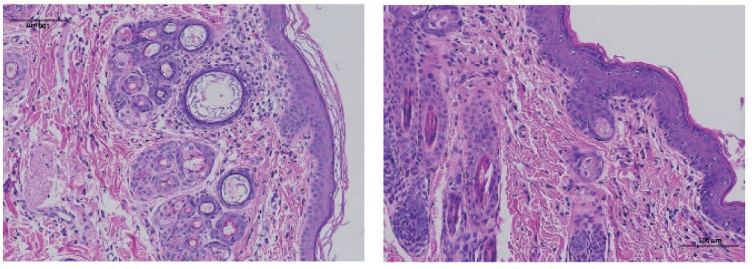
5.1 皮肤评分 结果见表 12,完整皮肤组和破损皮肤组家兔在恢复观察期间,罗仙子精油和基质涂抹部位均未出现红斑和水肿等刺激症状,皮肤刺激评分为 0,皮肤刺激强度为无刺激性。

表 12 皮肤刺激性实验结果 $n=4$

组别	动物数/只	部位	观察反应时间和反应平均分值				刺激强度
			1 h	24 h	48 h	72 h	
完整皮肤组	4	左侧(给药)	0	0	0	0	无刺激性
		右侧(基质)	0	0	0	0	无刺激性
破损皮肤组	4	左侧(给药)	0	0	0	0	无刺激性
		右侧(基质)	0	0	0	0	无刺激性

5.2 皮肤病理形态学观察 如图 3 所示,空白组:表皮完整,厚度均匀,从外至内依次可见角质层、颗粒层、棘细胞层、基底层,表皮细胞排列紧密,形态正常,真皮层胶原丰富,可见较多毛囊。破损皮肤组:给药侧(罗仙子精油)与对照侧(橄榄油)的皮肤较空白组皮肤均有增厚,给药侧真皮层胶原丰富,可见较多毛囊,真皮层顶部少量炎性细胞散在浸润;对照侧顶部胶原含量减少,着色变浅,并见少量纤维细胞及成纤维细胞增生,真皮顶部还见少量炎性细胞散在浸润。完整皮肤组:给药侧和对照侧的皮肤较空白组皮肤略增厚,皮肤的各层结构完整,真皮层胶原丰富,可见较多毛囊。





完整皮肤组给药侧　　完整皮肤组对照侧

图 3　家兔皮肤切片病理组织学观察(HE, ×100)

讨　论

本实验通过水化脱胶、碱炼脱酸对罗仙子油进行精制,选择对精油得率、脱胶及脱酸效率影响较大的若干因素进行考察,筛选适宜工艺条件。结果表明罗仙子油经过精炼后,色泽及腥臭味显著降低,澄明度及流动性改善,酸值、碘值、皂化值、过氧化值明显降低。

目前 *D*-半乳糖广泛应用于衰老模型的建立,皮下注射 *D*-半乳糖可加快皮肤老化,降低抗氧化酶活性,属于衰老模型的内源性因素[23]。本实验结果表明:小鼠颈背部皮下注射 *D*-半乳糖 42 d 后,模型组小鼠皮肤粗糙干燥且有褶皱,失去弹性、柔软性,含水量明显减少,且皮肤组织中 HYP 含量、SOD 及 GSH-Px 活力显著下降,MDA 含量显著增高。经罗仙子精油干预后,小鼠真皮厚度、毛囊数明显增加,胶原纤维排列紧密,明显提高小鼠皮肤组织中 HYP 含量、SOD 及 GSH-Px 活力,并降低 MDA 含量。说明罗仙子精油能有效提高皮肤内抗氧化酶的活力,增强皮肤组织清除自由基与抗氧化能力,减少皮肤氧化性损伤,从而发挥抗衰老作用。皮肤刺激性实验显示罗仙子精油对家兔皮肤无明显的刺激性。综上所述,罗仙子精油可明显改善皮肤外观性状和理化值,对皮肤具有抗衰老功效,本研究为罗仙子精油的资源利用及深入开发奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] WANG LJ, DU JL, ZHAO FY, *et al*. Trillium tschonoskii maxim saponin mitigates D-galactose-induced brain aging of rats through rescuing dysfunctional autophagy mediated by Rheb-mTOR signal pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 516 – 522.

[2] FARAGE MA, MILLER KW, ELSNER P, *et al*. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2008, 30(2): 87 – 95.

[3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草(第九卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 191 – 192.

[4] 巫春旭. 罗仙子抗氧化肽的制备及对皮肤光老化预防作用研究[D]. 广东药科大学, 2017.

[5] 王寿宇. 中药五谷虫对感染创面抗菌作用的临床与分子机制研究[D]. 大连医科大学, 2008.

[6] 褚夫江, 金小宝, 刘文彬, 等. 不同提取方法对中药罗仙子体外抑菌活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1806 – 1808.

[7] 张姝. 五谷虫粗提物抗菌消炎和调节动物免疫作用的初步研究[D]. 南京农业大学, 2011.

[8] 牛君, 程轩轩, 杨全, 等. 烟饲五谷虫与常规饲养五谷虫油脂成分及体外药理活性比较研究[J]. 广东药学院学报, 2017, 33(3): 331 – 335.

[9] 罗美, 李捷, 熊华. 米胚油精炼工艺与精炼油理化指标分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 233 – 237.

[10] 王兴宏, 马绍英, 李秉建, 等. 牡丹籽油提取工艺与精炼工艺的优化[J]. 核农学报, 2019, 33(8): 1559 – 1568.

[11] 朱远坤, 张振山, 谢庆方, 等. 精炼工艺对杜仲籽油品质的影响[J]. 中国油脂, 2017, 42(12): 44 – 48.

[12] 胡新娟, 张正茂, 邢沁浈, 等. 小麦胚芽油精炼工艺优化及对其品质的影响[J]. 中国油脂, 2016, 41(9): 7 – 12.

[13] 李婉莹, 刘俊渤, 唐珊珊, 等. 松籽油的精炼工艺[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(6): 731 – 738.

[14] 姚尧, 仝宗兴, 李诚, 等. 正交试验优化猪网油实验室碱炼脱酸工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 86 – 90.

[15] 黄玲玲, 魏道智, 吴亚妮, 等. 复方精油对 *D*-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30(6): 32 – 35.

[16] HO S, LIU J, WU R. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose[J]. *Biogerontology*, 2003, 4(1): 15 – 18.

[17] 孙程, 王冬东, 张辉靠, 等. 茶树提取物经皮给药对衰老小鼠皮肤的影响[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1690 – 1694.

[18] 魏玉, 苏成福. 双氯芬酸钠微乳的家兔皮肤刺激性及体外透皮吸收性能评价[J]. 中国药房, 2017, 28(4): 490 – 493.

[19] 杜婕莹, 曾森, 王璐, 等. 聚异丁烯骨通贴膏经皮肤给药的安全性研究[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3512 – 3514.

[20] 国家食品药品监督管理局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005.

[21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 按摩精油: GB/T 26516-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.

[22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 29990-2013 润肤油[S]. 北京: 中国标准出版社,2013.

[23] 游庭活, 温露, 刘凡. 衰老机制及延缓衰老活性物质研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(11): 1985 – 1990.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 08 – 10