

和田玫瑰精油提取工艺优化及其抗氧化和美白活性研究

古丽菲热·伊力哈木, 阿塔吾拉·铁木尔,

伊力塔尔·穆哈塔尔, 萨拉麦提·艾迪热斯*

新疆农业科学院农产品加工贮藏研究所 新疆农产品加工与保鲜重点实验室, 乌鲁木齐 830091

摘要: 探究和田玫瑰精油的最佳提取工艺以及其抗氧化和美白活性。以和田玫瑰为原料, 采用盐浸辅助水蒸气蒸馏法提取玫瑰精油, 研究盐浸浸泡时间、NaCl 质量浓度和料液比对精油提取量的影响, 在单因素试验的基础上采用 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺参数, 最优提取条件得到的和田玫瑰精油进行体外和细胞水平实验来验证其抗氧化和美白活性。结果表明: 在盐浸浸泡时间为 2.5 h, NaCl 质量浓度为 5.4%, 料液比 1:7.3 (g/mL) 条件下精油提取量最高, 可达到 23.35 mg/g (干花)。在此条件下得到的玫瑰精油对 DPPH 自由基清除能力的 IC₅₀ 值为 7.14 mg/mL; 细胞实验结果表明, 和田玫瑰精油能降低 α -MSH 诱导后 B16F10 细胞中的黑色素含量, 抑制细胞水平上酪氨酸酶的活性。本研究提供了一种高效提取和田玫瑰精油的方法, 证明了和田玫瑰精油具有一定的抗氧化和美白活性, 为和田玫瑰精深加工以及抗氧化美白应用方面提供了科学依据。

关键字: 和田玫瑰精油; 盐浸辅助水蒸气蒸馏法; 工艺优化; 抗氧化; 美白

中图分类号: TQ654.2; Q233 文献标识码: A

Optimization of extraction technology of essential oil of *Rosa rugosa* 'Hetian' and its antioxidant and whitening activity

YILIHAMU Gulifeire, TIEMUER Atawula, MUHETAER Yilitaer, AIDIRESI Salamaiti*

Xinjiang Key Laboratory of Agricultural Products Processing and Preservation, Institute of Agro-Products

Storage and Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

Abstract: In order to explore the optimal extraction process of the *Rosa rugosa* 'Hetian' essential oil and its antioxidant and whitening activities, this experiment used rose essential oil as raw material, which was extracted by salt-soaking assisted steam distillation. On the basis of single factor experiment, the effects of salt-soaking time, NaCl mass concentration, and solid-liquid ratio on essential oil extraction were studied, and Box-Behnken response surface method was used to optimize the extraction process parameters. Then, *in vitro* and cellular level

experiments were conducted to verify the antioxidant and whitening activities of rose essential oil obtained from the optimal extraction conditions. The results showed that the extraction amount of essential oil was the highest, which could reach 23.35 mg/g (dried flowers) under the conditions of salt soaking time of 2.5 h, NaCl concentration of 5.4% and material-liquid ratio of 1 : 7.3 (g/mL). Under these conditions, the IC₅₀ value of scavenging DPPH radical of rose essential oil was 7.14 mg/mL. The results of cell experiments showed that the *R. rugosa* 'Hetian' essential oil could reduce the melanin content and inhibit the tyrosinase activity in the α -MSH induced B16F10 cells. To sum up, this study provides an efficient method to extract the *R. rugosa* 'Hetian' essential oil, which proves that rose essential oil has certain antioxidant and whitening activities, further provides a scientific basis for the deep processing, antioxidant and whitening application of the *R. rugosa* 'Hetian' essential oil.

Keywords: *Rosa rugosa* 'Hetian' essential oil; salt-assisted steam distillation; process optimization; antioxidation; whitening

和田玫瑰 (*Rosa rugosa* 'Hetian') 又名粉玫瑰, 是新疆和田地区主要种植的经济作物以及区域优势的特色产业之一^[1]。其生长的地理环境平均海拔在 3000 米, 是世界唯一高地玫瑰。由于和田玫瑰受日照时间长以及昆仑山雪水浇灌等环境因素影响, 导致其花期较长, 一年一开, 生长慢, 产量低^[2], 但同时这些因素使其花瓣大且出油率高, 因此和田玫瑰被公认为稀珍的优良玫瑰品种^[3], 如何提高和田玫瑰的精油得率和实用活性价值尤为重要。

随着对于植物精油提取工艺的不断提升, 各种提取方法之间的对比, 可以得到含抗氧化物质更多的精油。目前玫瑰精油常用的提取制备方法有水蒸气蒸馏法、溶剂提取法、压榨法、脂析法以及超临界流体萃取法等^[4]。水蒸气蒸馏 (质量标准 ISO9842:2003) 作为国际上通用的提取玫瑰精油的一种方法, 虽然得到的精油较纯但是影响了玫瑰精油的提取率, 造成了原料的浪费; 有机溶剂法提取精油提高了精油提取率, 但其溶剂残留率高, 对精油香气成分影响较大; 超临界二氧化碳技术提取效率高但此法杂质多, 且成本高, 不适合中试投入到工业化生产当中。研究发现, 盐浸前处理后对植物精油的水相萃取具有积极作用: Huang 等^[5]通过成分分析、理化指标、热稳定性及抗氧化活性研究发现, 盐效应辅助水蒸气蒸馏法和水蒸气蒸馏法提取的丁香精油无明显差异, 且盐效应辅助提取可有效提高丁香精油提取率。Li 等^[6]的研究通过盐析-水蒸气蒸馏法来提取葛缕子精油, 同样也发现盐浸前处理对精油产量的提高具有积极作用。因此本研究拟通过采用工业化生产的盐浸辅助水蒸气蒸馏的方法, 在单因素试验基础上采用响应面优化玫瑰精油提取工艺条件, 获得最佳的工艺参数提高和田玫瑰精油提取率。

研究表明,植物精油具有很好的抗氧化及美白功效^[7-1]。将植物精油这类纯天然成分应用于美白抗衰老化妆品的探索近几年为研究热点。黑色素形成的原因主要为皮肤表皮基底细胞间存在黑素细胞,黑素细胞中的酪氨酸在酪氨酸酶的作用下,经过氧化生成多巴和多巴醌,最终形成了黑色素造成局部皮肤过黑和色斑^[8]。人体中黑色素浓度的高低能直接影响皮肤的颜色,为了达到美白抗衰老的功效,研究人员普遍采用体外抑制酪氨酸酶和抗氧化实验对植物精油的美白抗氧化活性进行评估^[7,9],而对于和田玫瑰这一品种玫瑰精油的抗氧化和美白活性研究还未有文章报道。本研究选用生化代谢方面与人表皮黑色素细胞相似的小鼠皮肤黑色素瘤细胞(B16F10)进行试验,在细胞水平上研究和田玫瑰精油减少黑色素的能力。为和田玫瑰精油作为一种具有抗氧化、美白功效的天然美白剂开发提供科学依据,为和田玫瑰产业的综合开发与利用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

和田玫瑰于2023年5月采自新疆和田地区墨玉县萨依巴格乡,由中国科学院新疆理化技术研究所努尔波拉提·阿依达尔汗研究员鉴定为和田玫瑰(*Rosa rugosa* 'Hetian'),样本(Nos. 01397)存放于新疆农业科学院农产品加工贮藏研究所。

氯化钠(纯度:≥99.5%,批号:20240120,天津市盛奥化学试剂有限公司);氢氧化钠(纯度:96%,批号:20230301,天津市致远化学试剂有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(批号:STBD4147V)、BCA蛋白分析试剂盒(批号:XI357472)(美国Sigma公司);脱氧胆酸钠(纯度:98%,批号:M03HS176910)、曲拉通X-100(Triton X-100)(批号:S15022)、左旋多巴(纯度:99%,批号:A02IS211382)、曲酸(纯度:99%,批号:M26HS181099)、黑素细胞刺激素(α -MSH)(纯度:95%,批号:J13HS188447)(上海源叶生物科技有限公司);无水乙醇(分析纯,批号:20240108,天津市鑫铂特化工有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(纯度:99%,批号:102556074,美国Sigma公司);Gibco RPMI-1640培养基(批号:8123420,美国赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号:2053264,以色列BI公司);青霉素-链霉素双抗溶液(批号:J230006,美国HyClone公司)。

1.2 仪器与设备

SYNERGY-H1BioTek全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);CF1524R冷冻离心机(北京兰杰柯科技有限公司);BPN-80CH(UV)二氧化碳培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);BDS200-PH倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 精油提取

和田玫瑰采收后进行阴干，水分小于 10%后，粉碎至 20 目大小，备用。

取一定量干花粉末于圆底烧瓶中，与一定质量浓度的 NaCl 溶液混合浸泡一定时间后，将圆底烧瓶放入电热套中，加热回流一定时间，停止加热后从挥发油提取装置中收集精油，称重计算精油提取量，最后得到和田玫瑰精油 (*Rosa rugosa* 'Hetian' essential oil, RHEO)，密封后 4 °C 储存。

1.3.1.1 单因素试验

设计盐浸浸泡时间 (0、1.5、3、4.5、6 h)、NaCl 质量浓度 (0%、3%、5%、7%、9%、11%) 和料液比 (1:5、1:7、1:9、1:11、1:13 g/mL) 三个单因素，在蒸馏时间 2 h 后，分别考察浸泡时间、NaCl 质量浓度和料液比对 RHEO 提取量的影响。

1.3.1.2 响应面优化试验

运用 DesignExpert 13.0 中选择 Box-Behnken 设计优化提取条件。在上述单因素实验方差分析后的基础上，选择浸泡时间 (*A*)、NaCl 质量浓度 (*B*)、料液比 (*C*) 三个变量作为 BBD 的自变量，以玫瑰精油提取量 (*Y*) 为响应值，设计三因素三水平的响应面优化试验，共 17 组试验 (见表 1)。

表 1 响应面因素水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface test design

水平 Level	因素 Factor		
	A: 浸泡时间 Soaking time (h)	B: NaCl 质量浓度 NaCl mass concentration (%)	C: 料液比 Material-liquid ratio (g/mL)
-1	1.5	3	7
0	3.0	5	9
1	4.5	7	11

1.3.2 抗氧化能力测定

由于精油极易乳化，因此选择 DPPH 自由基清除能力测定试验来考察 RHEO 抗氧化活性^[10]。将 RHEO 用无水乙醇进行溶解后稀释成不同浓度梯度备用，按照 1:1 的比例与 DPPH 工作溶液 (200 μmol/L) 在 96 孔板中混合，室温下避光反应 30 min 后在 517 nm 处测定吸光值，按照公式 (1) 计算 DPPH 自由基清除率 (*S*)。

$$S = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_i 表示样品组 (100 μL RHEO 稀释液+100 μL DPPH 溶液) 吸光值; A_j 示空白样品 (100 μL 无水乙醇+100 μL RHEO 稀释液) 吸光值; A_0 表示空白组 (100 μL 无水乙醇+100 μL DPPH 溶液) 吸光值。

1.3.3 RHEO 美白能力测定

1.3.3.1 B16F10 细胞的培养

用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 B16F10 细胞, 待细胞生长至近 80%左右, 用胰蛋白酶消化传代, 每 2~3 d 传代 1 次。

1.3.3.2 RHEO 对 B16F10 细胞的细胞毒性试验

采用 MTT 法检测 RHEO 对 B16F10 细胞增殖的影响^[11]。将 B16F10 细胞接种在密度为 1×10^5 个/mL 的 96 孔板中。置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养过夜。试验分为仅有 RPMI-1640 完全培养基的空白组 (control, Con)、不同浓度的 RHEO 组 (20、40、60、80、100、200、400、800 和 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每个浓度设置六个复孔分别加入上述样品, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养 24~48 h 后, 吸净培养基, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL , 放回培养箱反应 4 h。反应结束后吸去上清再加入 150 μL 的 DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 15 min 后, 酶标仪测定 490 nm 波长处吸光值 (A), 用公式 (2) 计算细胞存活率 (R)。

$$R = \frac{A_s - A_D}{A_B - A_D} \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_s 为 RHEO 组的吸光值, A_D 为 DMSO 的吸光值, A_B 为正常不加药细胞组的吸光值。

1.3.3.3 RHEO 对 B16F10 黑色素含量的抑制作用

试验采用 NaOH 裂解法检测 B16F10 细胞中黑色素含量^[12]。将 B16F10 细胞铺于 6 孔板, 过夜培养。分为仅有 RPMI-1640 完全培养基的 Con 组、模型组 (model, Mod)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲酸的阳性对照组 (kojic acid, KA) 和低中高浓度的 RHEO 组 (20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 加样 2 h 后, 除空白组外均加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 α -MSH。作用 48 h 后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后, 用 RIPA 收获细胞。收集的细胞在 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 min。用 BCA 蛋白分析试剂盒检测细胞提取液中总蛋白的含量。去除上清液, 用含 10% DMSO 的 NaOH (200 μL , 1 mol/L) 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下溶解剩余的细胞沉淀 60 min。然后, 将细胞裂解物加入 96 孔板, 在 405 nm 处检测特征吸收峰。通过将黑色素的总量调整到相应的蛋白质浓度来量化黑色素的形成。每组试验三次重复。

1.3.3.4 RHEO 对 B16F10 细胞内酪氨酸酶活性的抑制作用

采用多巴氧化法测定化合物对 B16F10 细胞内酪氨酸酶活性的影响^[13]。按“1.3.3.3”中方法以及分组处理细胞 48 h 后,用含脱氧胆酸钠溶解的 1% Triton X-100 的 PBS 溶液收集漂洗后的细胞。收集的细胞在 12 000 r/min, 4 °C 下离心 5 min, 在测量细胞提取液中蛋白质含量后,检测细胞内酪氨酸酶活性,方法如下:转移上清 90 μL 至 96 孔酶标板,再加入 10 μL 10 mM 的左旋多巴, 37 °C 避光孵育至各孔有浅棕褐色出现,迅速在 490 nm 处测定吸光值。通过将酪氨酸酶释放量调整到相应的蛋白质浓度来量化酪氨酸酶活性。每组试验三次重复。

1.4 数据处理与分析

使用 SPSS 20.0 进行统计学分析,实验数据采用 One-way ANOVA 方差分析以及 *t* 检验,统计显著性用不同小写字母表示。并运用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行绘图和数据分析。 $P < 0.05$ 被认为有差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 浸泡时间对 RHEO 提取量的影响

在精油提取过程中,盐溶液浸泡处理有利于植物组织细胞的膨胀,使提取时细胞内的挥发性成分更易浸出,从而提高精油得率。但浸泡时间过长,其挥发性成分可能会流失,化学成分被破坏^[14]。由图 1 可知,随着浸泡时间在 0~3 h 范围内的增加,RHEO 得率随之快速增加;当浸泡时间在 3 h 时,RHEO 得率最高;当浸泡时间超过 3 h 之后,RHEO 得率显著降低,说明浸泡时间过久,会破坏精油的成分,使精油得率下降^[15]。因此,选择最佳浸泡时间为 3 h。

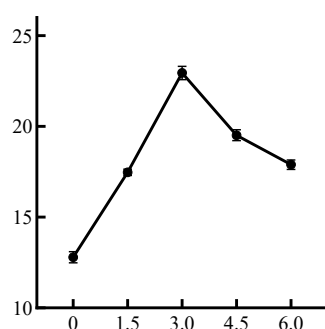


图 1 盐浸时间变化对 RHEO 提取量的影响

Fig.1 Effect of salt soaking time on the extraction yield of RHEO

注:不同小写字母表示显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。Note: Significant differences are indicated by different lowercase letters ($P < 0.05$), the same below.

2.1.2 NaCl 质量浓度对 RHEO 提取量的影响

一定浓度 NaCl 可增加原料组织细胞内外渗透压，消除或减弱油脂水相萃取过程中的乳化程度，使油脂类物质更易渗出。由图 2 可知，NaCl 质量浓度在 0%~5% 范围内时，玫瑰精油得率不断提高。当 NaCl 质量浓度为 5% 时，RHEO 得率最高为 0.02%；NaCl 质量浓度继续增加，精油得率显著降低，可能是由于随着 NaCl 质量浓度的增加，盐水浓度升高，水蒸气沸点升高进而蒸馏温度升高，导致精油损耗增加，同时过量 NaCl 会损耗 RHEO 中挥发性成分，导致得率下降。因此，选择最佳 NaCl 质量浓度为 5%。

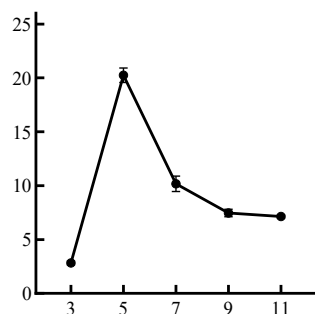


图 2 NaCl 质量浓度变化对 RHEO 提取量的影响

Fig.2 Effect of NaCl concentration change on the extraction yield of RHEO

2.1.3 料液比对 RHEO 提取量的影响

精油提取过程中物料与溶剂的比例对提取率有很大影响^[16]。由图 3 可知，随着料液比在 1:5~1:9 (g/mL) 范围内的提高，玫瑰精油得率随之迅速上升；当料液比由 1:9 (g/mL) 提高至 1:13 (g/mL) 时，精油得率降低。说明料液比过低时，盐溶液过少不利于分子扩散而导致提取率偏低；当料液比过高时，RHEO 提取率反而降低，可能是分散在水中的精油浓度降低，降低了 RHEO 的得率^[17]。因此，综合考虑，选择最佳料液比为 1:9 (g/mL)。

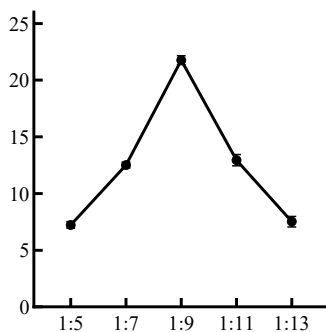


图 3 料液比变化对 RHEO 提取量的影响

Fig.3 Effect of the ratio of material to liquid on the extraction yield of RHEO

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验设计及方差分析

响应面试验设计与结果如表2所示,响应面结果方差分析如表3所示。利用 Design-Expert 分析软件对表2数据进行回归方程拟合,绘制3D响应曲面图,3个因素交互作用的3D响应面图如图4所示。

依据表3分析结果:模型 $P < 0.0001$, 说明该模型适合并具有显著性;失拟项 $P > 0.05$ 不显著,表明模型拟合度良好;总决定系数 R^2 和模型调整系数 R_{adj}^2 均接近于1,表明实验值与预测值具有高度的相关性,该模型相关度较好。各因素对精油提取量的影响大小依次是料液比(C) > 浸泡时间(A) > NaCl质量浓度(B)。

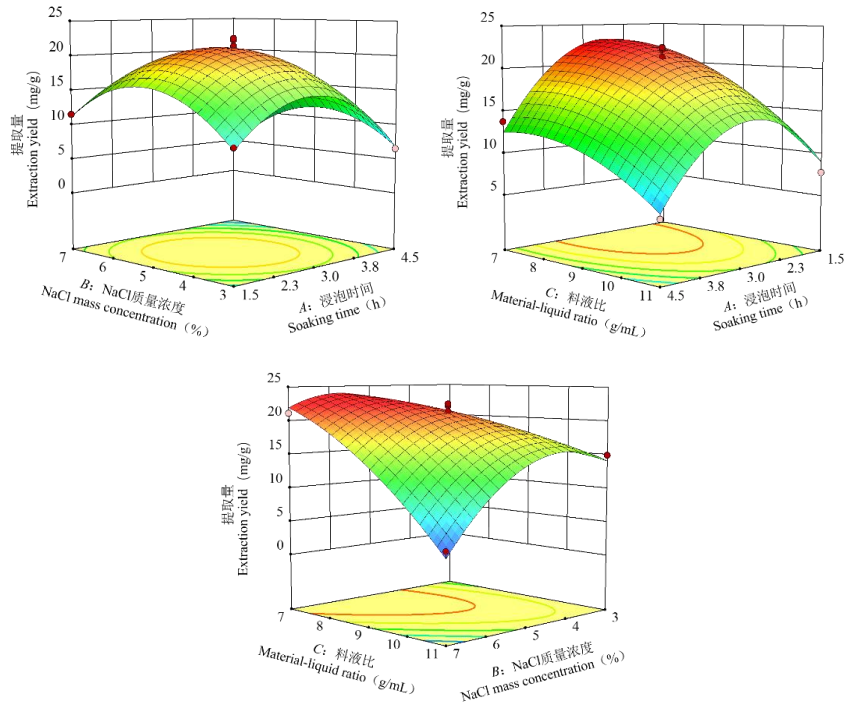


图4 三个提取因素对 RHEO 提取量影响的响应面三维图

Fig.4 3D response surface diagram of the influence of three extraction factors on the extraction rate of RHEO

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface test design and results

编号 No.	A: 浸泡时间 Soaking time (h)	B: NaCl 质量浓度 NaCl mass concentration (%)	C: 料液比 Material-liquid ratio (g/mL)	提取量 Extraction yield (mg/g)
1	1.5	3	9	9.488

2	4.5	3	9	6.483
3	1.5	7	9	11.494
4	4.5	7	9	3.743
5	1.5	5	7	19.321
6	4.5	5	7	13.729
7	1.5	5	11	7.735
8	4.5	5	11	5.474
9	3	3	7	10.625
10	3	7	7	21.092
11	3	3	11	14.925
12	3	7	11	4.138
13	3	5	9	19.745
14	3	5	9	22.233
15	3	5	9	22.487
16	3	5	9	19.745
17	3	5	9	21.350

表 3 响应面结果方差分析

Table 3 Analysis of variance of response surface results

方差来源 Variance source	<i>F</i>	<i>P</i>
模型 Model	39.38	< 0.000 1
<i>A</i>	43.28	0.002 6
<i>B</i>	0.139 1	0.802 8
<i>C</i>	132.00	< 0.000 1
<i>AB</i>	5.63	0.142 9
<i>AC</i>	2.77	0.284 7
<i>BC</i>	112.94	0.000 2
<i>A</i> ²	219.48	< 0.000 1
<i>B</i> ²	156.14	< 0.000 1
<i>C</i> ²	22.80	0.012 7

失拟项 Lack of fit	2.51	0.354 3
R^2		0.980 6
R_{adj}^2		0.955 7

2.2.2 验证试验结果分析

通过对本试验模型分析表明，经过 Design Expert 13.0 优化后的最佳提取工艺为：盐析浸泡时间为 2.47 h，NaCl 质量浓度为 5.37%，料液比 1 : 7.33 (g/mL)，在这三个因素条件下，理论预计玫瑰精油提取率为 23.72 mg/g。在验证实验中，考虑实际条件，将操作工艺参数调整为盐析浸泡时间为 2.5 h，NaCl 质量浓度为 5.4%，料液比 1 : 7.3 (g/mL)，作 3 组平行实验。RHEO 提取率为 23.35 mg/g，与理论值相差 1.54%，说明该模型与实际拟合效果较好，证明本模型有效。

2.3 RHEO 的抗氧化活性分析

试验通过测定 DPPH 自由基清除能力来探究 RHEO 的体外抗氧化活性。由图 5 可以得出，不同浓度的 RHEO 具有一定的 DPPH 自由基清除的能力，并呈浓度依赖趋势，且其 IC_{50} 值为 7.14 mg/mL。说明 RHEO 具有一定的抗氧化活性。

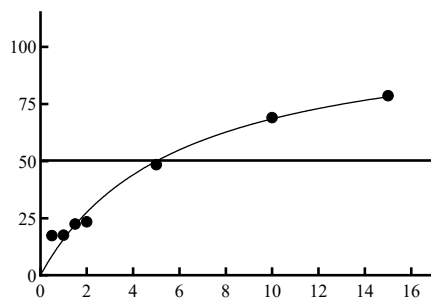


图 5 RHEO 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.5 Scavenging effect of RHEO on DPPH free radical

2.4 RHEO 对 B16F10 细胞活性的影响

在确保细胞增殖率不受影响的情况下，若对黑色素的合成具有一定的抑制效果，说明样品在细胞水平上具有一定的美白功效^[18]。如图 6 所示，0~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 RHEO 对细胞的增殖无影响；当 RHEO 浓度大于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时，与空白组相比差异显著减少 ($P < 0.05$)。说明 RHEO 浓度小于 200 $\mu\text{g/mL}$ 对 B16F10 细胞的活性无明显影响，对细胞无毒性作用，因此选择 20、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 为上样低、中、高浓度进行进一步研究。

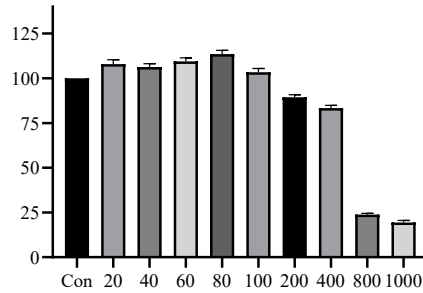


图 6 RHEO 对 B16F10 细胞存活率的影响

Fig.6 Effect of RHEO on cell survival rate of B16F10 cells

注：与 Con 比较，[#] $P < 0.05$ ，^{###} $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.001$.

2.5 RHEO 对 B16F10 细胞中黑色素含量的影响

为了阐明RHEO是否影响黑色素的合成，实验选取低、中、高三个浓度（20、50和100 $\mu\text{g/mL}$ ）的RHEO和 $\alpha\text{-MSH}$ （1 $\mu\text{g/mL}$ ）共处理B16F10细胞48 h，检测的黑色素含量结果由图7可知，与空白组相比，模型组利用 $\alpha\text{-MSH}$ 造模后使B16F10细胞黑色素含量显著增加（ $P < 0.001$ ），表明模型建立成功。与模型组比较，RHEO使B16F10细胞的黑色素含量显著降低，同一高浓度下的阳性对照曲酸和RHEO具有相似降低黑色素含量的能力，与模型组相比差异显著减少（ $P < 0.01$ ）。由此可见，RHEO可以抑制细胞黑色素生成。

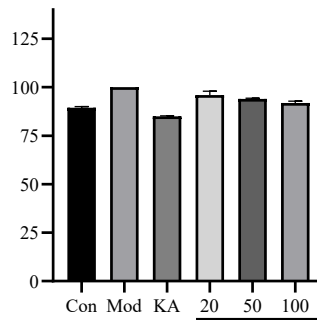


图 7 RHEO 对 B16F10 黑色素含量的抑制作用

Fig.7 Inhibitory effect of RHEO on B16F10 melanin content

注：与 Con 比较，^{###} $P < 0.001$ ；与 Mod 比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ，^{***} $P < 0.001$ ，下同。Note: Compared with Con, ^{###} $P < 0.001$ ；Compared with Mod, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. The same follow.

2.6 RHEO 对 B16F10 细胞中酪氨酸酶活性的影响

为了探明RHEO对酪氨酸酶活性的影响，采用多巴氧化法对B16F10细胞进行了酪氨酸酶活性抑制能力的检测。实验结果由图8可知，与空白组相比，模型组利用 $\alpha\text{-MSH}$ 造模后使B16F10细胞酪氨酸酶活性显著增强（ $P < 0.001$ ），说明模型建立成功。与模型组比较，阳性

对照曲酸和不同浓度的RHEO对酪氨酸酶的活性明显降低 ($P<0.001$)，表明RHEO能有效抑制 α -MSH诱导后B16F10细胞酪氨酸酶活性，说明RHEO具有潜在的美白作用，可以用作美白类产品的添加。

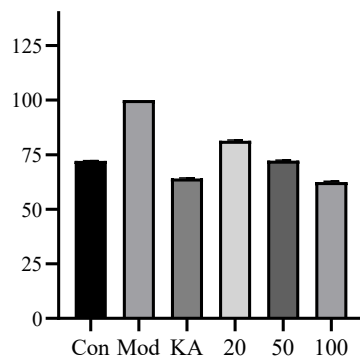


图 8 RHEO 对 B16F10 细胞内酪氨酸酶抑制作用

Fig. 8 Inhibitory effect of RHEO on tyrosinase in B16F10 cells

3 讨论与结论

玫瑰是珍贵的药食同源植物，而玫瑰精油作为玫瑰的代谢产物，素有“液体黄金”的美誉，也是医疗药用价值极高的天然挥发油，可以应用于药物的研发，具有抗氧化、抗炎以及美白等作用^[19]。因此本研究以和田玫瑰为实验材料，利用盐浸辅助水蒸气蒸馏法提取玫瑰精油，优化了精油的制备方法，并在体外验证了其抗氧化和美白活性，为和田玫瑰产业高质量发展提供了一条崭新的道路。

本实验以和田玫瑰为原料，采用盐浸辅助水蒸气蒸馏法提取RHEO，研究了盐浸浸泡时间、NaCl质量浓度、料液比3个因素对提取率的影响，在单因素的基础上采用Box-Behnken响应面法优化提取工艺参数，最优提取参数为盐浸浸泡时间2.5 h，NaCl质量浓度5.4%，料液比1:7.3 (g/mL) 条件下精油提取率最高。目前，关于玫瑰精油最佳提取方法及工艺的报道当中，An等^[20]采用超声辅助水蒸气蒸馏法从新疆大马士革鲜玫瑰中提取精油，使玫瑰精油得率达到0.0802%；Ma等^[21]以兰州苦水鲜玫瑰为原料，采用超声微波协同萃取法提取玫瑰精油，精油提取率最高可达到1.274%。前人的研究均以玫瑰鲜花为原料提取精油，但是鲜花保存时间短，方法具有时限性。采用超声、微波技术虽能提高精油得率，但是生产成本较高，不适合工业化提取。本研究利用NaCl盐溶液能够渗透细胞、破坏细胞的性质，通过盐浸来充分提取出精油，在保证高得率的同时，减少了成本。除此之外，本研究利用阴干后的和田玫瑰进行提取工艺的优化，比Cao等^[22]运用超临界萃取法从玫瑰干花中提取玫瑰精油的得率高了24倍，说明本试验方法提取效率高，为精油的进一步开发利用提供参考依据。

本研究通过检测DPPH自由基清除能力来考察RHEO的抗氧化活性,发现RHEO具有一定的抗氧化活性,其DPPH自由基清除能力的IC₅₀值为7.14 μg/mL,比Yi等^[10]研究的大马士革玫瑰精油、小叶玫瑰精油、凤梨精油和月季“大红荣耀”玫瑰精油的DPPH自由基清除IC₅₀值高了173.6倍、135.8倍、128.8倍和2800倍,说明RHEO有着极强的抗氧化活性。研究表明,植物抗氧化剂可以降低氧化应激,并对氧化应激和相关疾病具有保护作用^[23]。具有抗氧化性能的化合物可将酪氨酸氧化为多巴醌,来减少黑色素生成途径中的黑色素合成^[24]。此外,紫外线导致皮肤损伤,主要是由于氧自由基的影响。黑色素吸收细胞质产生的自由基和皮肤中紫外线产生的自由基。因此,具有抗氧化作用的物质,例如玫瑰精油,可能是通过减少ROS和自由基的产生来减少黑色素的数量^[25]。由于酪氨酸酶在黑色素生成中的必要性,本研究测定了RHEO对B16F10细胞作用后酪氨酸酶的活性以及对黑色素的抑制能力,发现RHEO与黑色素合成相对量之间呈浓度依赖趋势,且高浓度(100 μg/mL)的RHEO在细胞水平上拥有和阳性对照曲酸相当的抑制黑色素的能力。

综上所述及结合本文结果表明,RHEO可通过抗氧化和抑制黑色素两作用相协同的途径来达到抗氧化且美白效果,且玫瑰精油安全性、稳定性较高,提取方法简单,因此RHEO极具有化妆品乃至医疗方向使用的前途,对玫瑰精油高质量生产应用具有重要意义。

参考文献

- 1 Zhao YL,Yang FR,Niu JH,et al.Comparative study on the structural characterization and cosmetic-related activities of three rose polysaccharides[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024;1-18[2024-06-17].<https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110048>.
- 2 Zhang M.Research on brand value promotion strategy of Erxiangxian Yufang rose[D].Tianjin:Tianjin University of Finance and Economics(天津财经大学).2021.
- 3 Parhat R,Aygul A,Zhu K,et al.Antioxidant activity *in vitro* of total flavonoids and total polysaccharides from rose petals[J].Food Sci(食品科学),2013,34:138-141.
- 4 Chen HY,Li H,Liu LL,et al.Rose essential oil component extraction[J].China Sci Technol Inf(中国科技信息),2019(18):53-55.
- 5 Huang JL,Hu YW,Lu Q,et al.Extraction of clove essential oil by salt assisted steam distillation and its antioxidant activity evaluation[J].J Nuclear Agric Sci(核农学报),2024,38:512-521.
- 6 Li MJ,Lu ZX,Zhao HZ.Extraction of caraway essential oils by ultrasonic-assisted salting-out hydrodistillation[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2013,34:99-107.
- 7 Lai WJ,Zhang X,Huang Y,et al.Enzymatic extraction of essential oil from Zingiberis Rhizoma and its

- biological activity evaluation[J].J Chengdu Univ:Nat Sci(成都大学学报:自科版),2023,42:239-247.
- 8 Wang L,Liu J.Research progress on molecular mechanism in the formation of melanin[J].J Xinjiang Univ:Nat Sci(新疆大学学报:自科版),2019,36:468-499.
 - 9 Sioud F,Maatouk M,Bzeouich IM,et al.*In vitro* anti-melanoma effect of polyphenolic compounds[J].Asian Pac J Trop Med,2022,12:446-452.
 - 10 Yi F,Sun J,Bao X,et al.Influence of molecular distillation on antioxidant and antimicrobial activities of rose essential oils[J].LWT,2019,102:310-316.
 - 11 Siqi Z,Drira R,Kazuichi S.Grape extract promoted α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells,which was inverse to resveratrol[J].Molecules,2021,26:5959-5969.
 - 12 Kamilijiang M,Zang D,Abudukelimu N,et al.Anti-melanogenesis effect of polysaccharide from *Saussurea involucrata* on forskolin-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells[J].Nutrients,2022,14:5044-5061.
 - 13 Nam G,An SK,Park IC,et al.Daphnetin inhibits α -MSH-induced melanogenesis via PKA and ERK signaling pathways in B16F10 melanoma cells[J].Biosci Biotech Bioch,2022,86:596-609.
 - 14 Wu Y,Han X,Yuan W,et al.Salt intervention for the diversities of essential oil composition,aroma and antioxidant activities of Kushui rose(*R. setata* \times *R. rugosa*)[J].Ind Crop Prod,2020,150:112417.
 - 15 Sheng L,An SY,Chen XE,et al.Process optimization and composition analysis of green kumquat essential oil by steam distillation[J].J Zhejiang Ocean Univ:Nat Sci(浙江海洋大学学报:自科版),2023,42:512-517.
 - 16 Ma L,Hu T,Guo CC,et al.Extraction of essential oil from *Nardostachys jatamansi* by salting out assisted steam distillation and its volatile aroma compounds analysis[J].China Brew(中国酿造),2023,42:235-240.
 - 17 Liu JZ,Xian MX,Kong WH,et al.Optimization of extraction process and composition analysis of essential oil from *Amomum tsao-ko*[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:766-780.
 - 18 Cheng XA,Zhang SM,Zhou XW,et al.Study on inhibition mechanism of melanogenesis and melanin synthesis of B16F10 cell induced by two natural products[J].Biotechnol Bull(生物技术通报),2017,33:199-205.
 - 19 Mohebitabar S,Shirazi M,Bioos S,et al.Therapeutic efficacy of rose oil:a comprehensive review of clinical evidence[J].Avicenna J Phytomedi,2017,7:206-213.
 - 20 An BF,Chen CY,Qiao GF,et al.Optimization of extraction process of rose essential oil by ultrasonic-assisted steam distillation method using response surface methodology[J].China Condiment(中国调味品),2024,49:118-124.

- 21 Ma JP, Shi SL, Zhang YX, et al. Optimized the extraction parameters of essential oil from Lanzhou rose by ultrasonic microwave synergistic extraction method using RSM and its antibacterial activities[J]. *J. Chin. Cereals Oils Assoc.* (中国粮油学报), 2023, 38: 151-157.
- 22 Cao Y, Li CY. Extraction and influence factor analysis of rose oil[J]. *J. Nanyang Inst. Technol.* (南阳理工学院学报), 2021, 13: 104-108.
- 23 Hassan M, Shahzadi S, Kloczkowski A. Tyrosinase inhibitors naturally present in plants and synthetic modifications of these natural products as anti-melanogenic agents: a review[J]. *Molecules*, 2023, 28: 378-391.
- 24 Lee Y, Hyun CG. Mechanistic insights into the ameliorating effect of melanogenesis of psoralen derivatives in B16F10 melanoma cells[J]. *Molecules*, 2022, 27: 2613-2616.
- 25 Yu ZY, Xu K, Wang X, et al. Punicalagin as a novel tyrosinase and melanin inhibitor: Inhibitory activity and mechanism[J]. *LWT*, 2022, 161: 113318.

收稿日期: 2024-06-17

接受日期:

基金项目: 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(上海合作组织科技伙伴计划及国际科技合作计划)(2022E01023); 新疆维吾尔自治区“天池博士计划”(2021); 新疆农业科学院农业科技创新稳定支持专项课题(xjnkzydzc-2023003-2-7)

*通信作者 E-mail: salamet619@163.com