

文章编号: 1004-4353(2019)01-0084-06

林蛙皮银耳保湿霜的制备

陈海燕, 孙志双, 刘美含, 朱彩凤, 施溯筠*

(延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 以林蛙皮和银耳为主要原料研制了一种林蛙皮银耳保湿霜. 首先采用复合脱腥法、 H_2O_2 脱色法对林蛙皮进行处理, 然后利用单因素实验、Box-Behnken 中心组合设计原理和响应面分析法等分析了单硬脂酸甘油酯、棕榈酸异辛酯、三乙醇胺、甘油的添加量对保湿霜的影响. 实验结果表明, 林蛙皮银耳保湿霜的最佳配方为单硬脂酸甘油酯 3%、棕榈酸异辛酯 4%、三乙醇胺 0.8%、甘油 8%、林蛙皮极细粉 1.5%、银耳粗多糖提取液 2%, 最佳配方的综合评分为 9.19; 该保湿霜保湿效果良好, 可作为一种良好的护肤产品.

关键词: 林蛙皮; 银耳; 保湿; 响应面法

中图分类号: R944.2

文献标识码: A

Preparation of *Rana chensinensis* skin *Tremella* moisturizing cream

CHEN Haiyan, SUN Zhishuang, LIU Meihan, ZHU Caifeng, SHI Suyun*

(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In this paper, a *Rana chensinensis* skin *Tremella* moisturizing cream was developed with *Rana* skin and *Tremella* as the main raw materials. *Rana chensinensis* skin was decomposed by composite method and decolorized by H_2O_2 . On the basis of Single-factor experiment, Box-Behnken center combination design principle and response surface analysis method to analyze the effects of the addition of glyceryl monostearate, isooctyl palmitate, triethanolamine and glycerin to the moisturizing cream. Taking the appearance of the moisturizing cream and the emulsion stability as evaluation indexes, the moisturizing effect was evaluated by measuring the moisture content of the stratum corneum of the skin in a short period of time. The experimental results show that the optimum formula of the *Rana chensinensis* skin *Tremella* moisturizing cream was 3% glycerin monostearate, 4% isooctyl palmitate, 0.8% triethanolamine, 8% glycerin, it is a kind of skin care product with uniform texture, pleasant smell and certain moisturizing activity. The comprehensive score of the best formula is 9.19. Therefore, it could be used as a good skin care product.

Keywords: *Rana chensinensis* skin; *Tremella*; moisturizing; response surface methodology

0 引言

中国林蛙(*Rana chensinensis davidi*)又称哈什蟆, 属两栖纲无尾目蛙科蛙属^[1], 是集食补、药用、美容等功能于一体的珍稀动物. 目前, 对林蛙的研究与应用主要集中于林蛙油和林蛙卵, 而有关林蛙皮的则很少. 研究^[2]表明, 林蛙皮中天然保

湿因子透明质酸、胶原蛋白等含量较高, 同时对修复微创面、恢复皮肤屏障具有很好的效果^[3]. 银耳(*Tremella*)是银耳科银耳属担子菌门真菌银耳的子实体^[4]. 银耳多糖作为银耳主要的活性成分之一, 不仅具有优良的保湿功效, 而且可改善皮肤纹理度, 降低皮肤粗糙度, 增加皮肤弹性, 可作

收稿日期: 2018-10-17

* 通信作者: 施溯筠(1972—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为天然生物资源开发与活性成分研究.

为功效性成分应用于化妆品中^[5]。

在护肤市场中,保湿功效类护肤品一直深受消费者青睐。查阅文献发现,有将林蛙皮或银耳为原料制成护肤品的报道^[2,4-7],但未发现有将林蛙皮和银耳共同作为原料制成护肤品的报道。鉴于此,本实验以林蛙皮和银耳多糖为主料,通过响应面分析法优化保湿霜的基质处方,并用皮肤角质层的水分含量评价该处方的保湿效果。

1 实验仪器与材料

UV-2201 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;HH-6 型数显恒温水浴锅,金坛市科技仪器有限公司;FA-2004 电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;Z-36HK 高速台式离心机,天津市医疗器械厂;pHSJ-4F 雷磁型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;ZK-2S 真空干燥箱,北京中兴伟业仪器有限公司;DHG-9145A 型电热鼓风干燥箱,常州诺基仪器有限公司;SK-III 数字皮肤水分测试仪,深圳凯尔电子有限公司;Laisen 多功能活氧解毒机,厦门市莱森电子有限公司。

三乙醇胺,抚顺佳化化工有限公司生产;甘油,益海嘉里投资有限公司生产;单硬脂酸甘油酯,广州市佳力士食品有限公司生产;棕榈酸异辛酯,山东优索化工科技有限公司生产;卡波姆 940,山东优索化工科技有限公司生产;其他试剂均为分析纯。

新鲜林蛙皮来自长白山辉煌生物科技有限公司,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用;银耳购于延吉市西市场。

2 实验方法

2.1 林蛙皮及银耳的加工处理

2.1.1 林蛙皮极细粉的制备 将林蛙皮剪切成 $3\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 的薄片。采用复合脱腥法^[8](臭氧脱腥法^[9]、 β -环糊精法^[10]和茶汤吸附法^[9])对林蛙皮进行脱腥处理。采用 H_2O_2 法^[11]脱色。将脱色后的林蛙皮置于真空干燥箱中干燥($80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h),然后粉碎过 200 目筛,得到林蛙皮极细粉。

2.1.2 银耳多糖的制备 将 50 g 银耳子实体粉碎后过 60 目筛,加蒸馏水(料液比为 1:40),在

$80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热提取 3.5 h,冷却后 4 000 r/min 离心 10 min。将上清液浓缩至 300 mL,用乙醇(体积比为 1:4)在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下沉淀 12 h,4 000 r/min 离心 10 min。除去上清液得到沉淀,取 200 mL 蒸馏水将其溶解,用 Sevage 法除去蛋白,得 200 mL 银耳多糖提取液,备用。采用硫酸-苯酚法^[12]测定银耳多糖的含量。

2.2 林蛙皮银耳保湿霜的配方

根据相关文献^[13],结合预实验初步确定保湿霜的基本配方如表 1 所示。

表 1 林蛙皮银耳保湿霜的配方

相别	原料编号	化学名称	质量分数/%
A	1	卡波姆 940	0.5
	2	甘油	2~10
	3	蒸馏水	70.4~92
B	4	单硬脂酸甘油酯	1~5
	5	十八醇	0.2~1.0
	6	棕榈酸异辛酯	2~6
	7	三乙醇胺	0.2~1.0
C	8	对羟基苯甲酸丁酯	0.1
D	9	林蛙皮极细粉	1.0~3.0
	10	银耳粗多糖提取液	1.0~3.0

2.3 保湿霜的制备工艺

将卡波姆 940 用蒸馏水预先溶解,然后加入甘油,在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热搅拌直至甘油完全溶解。将 B 相水浴加热至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶解,搅拌条件下将 A 相加入 B 相并搅拌 45 min 以上;自然冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后,加入 C 相水浴恒温($45\text{ }^{\circ}\text{C}$)搅拌 20~25 min,加入 D 相继续搅拌至室温,成霜体后装瓶密封保存。

2.4 各项指标检测

2.4.1 外观性状 观察样品色泽是否均匀,有无明显的麻点,是否细腻易涂抹。1~2 分为色泽不均匀,有明显颗粒感,不易涂抹;3~4 分为色泽不均匀,有颗粒感,不易涂抹;5~6 分为色泽较均匀,颗粒感不明显,涂抹效果一般;7~8 分为色泽较均匀,颗粒感不明显,涂抹效果良好;9~10 分为色泽均匀,无颗粒感,涂抹效果极佳。

2.4.2 乳化稳定性 取样品 0.1 g 加入 50 mL 去离子水, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀,冷却至室温;以水作参比,测定其在 380~800 nm 范围内的最低透光

率.透光率越低表示乳化越稳定.透光率为 0.8~1,为 0~2 分;透光率为 0.6~0.8,为 2~4 分;透光率为 0.4~0.6,为 4~6 分;透光率为 0.2~0.4,为 6~8 分;透光率为 0~0.2,为 8~10 分.

2.5 单因素实验

2.5.1 单硬脂酸甘油酯添加量对膏剂制备的影响 在棕榈酸异辛酯用量 4%、三乙醇胺用量 0.8%、甘油用量 8%、乳化时间 45 min 条件下,以单硬脂酸甘油酯作为单因素,选取不同水平单硬脂酸甘油酯的用量(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)进行实验,以此确定单硬脂酸甘油酯的最佳用量.

2.5.2 棕榈酸异辛酯添加量对膏剂制备的影响 在单硬脂酸甘油酯用量 3%、三乙醇胺用量 0.8%、甘油用量 8%、乳化时间 45 min 条件下,以棕榈酸异辛酯作为单因素,选取不同水平棕榈酸异辛酯的用量(2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%)进行实验,以此确定棕榈酸异辛酯的最佳用量.

2.5.3 三乙醇胺添加量对膏剂制备的影响 在单硬脂酸甘油酯用量 3%、棕榈酸异辛酯用量 4%、甘油用量 8%、乳化时间 45 min 条件下,以三乙醇胺作为单因素,选取不同水平的三乙醇胺用量(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)进行实验,以此确定三乙醇胺的最佳用量.

2.5.4 甘油添加量对膏剂制备的影响 在单硬脂酸甘油酯用量 3%、棕榈酸异辛酯用量 4%、三乙醇胺用量 0.8%、乳化时间 45 min 条件下,以甘油作为单因素,选取不同水平甘油的用量(2.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%)进行实验,以此确定甘油的最佳用量.

2.5.5 林蛙皮极细粉和银耳粗多糖提取液的添加量对膏剂制备的影响 参考文献[14]选取不同林蛙皮极细粉的用量(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)和银耳粗多糖提取液的用量(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)进行实验,以此确定林蛙皮极细粉和银耳粗多糖提取液的最佳用量.

2.6 响应面实验

根据 Box-Behnken 模型的中心组合试验设计原理,选取单因素实验中对保湿霜影响较大的 3 个因素(棕榈酸异辛酯(A)、三乙醇胺(B)、甘油(C))作为自变量,并通过确定 3 个因素水平的最

佳参数来进行响应面分析,因素及水平见表 2.

表 2 响应面分析因素及水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 棕榈酸异辛酯/%	5	6	7
B 三乙醇胺/%	0.6	0.8	1.0
C 甘油/%	9	12	15

2.7 皮肤角质层水分含量的测试

按照自愿原则选择 20~30 岁无皮肤病史及化妆品过敏史的 10 名受试者进行皮肤短期保湿性试验.测试条件:环境温度(25±1)℃,相对湿度(40±5)%.测试前受试者需在测试条件下至少稳定 30 min,测试期间不能喝水和剧烈活动,不得使用其他同类产品.实验过程中左右前臂(暴露状态)内侧标记(2 cm×2 cm)试验区域,区域间隔 1 cm.测试样品和空白对照均随机分布在左右前臂内侧.样品用量为(2.0±0.1) mg/cm².使用皮肤水分测试仪测定标记点在样品使用前和使用后每隔 30 min 皮肤角质层的水分含量,直到 180 min 后停止测试,同时记录所有的测试数据(单位为 au.).

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果

林蛙皮银耳保湿霜的单因素实验结果如图 1 所示.单硬脂酸甘油酯含量在 1%~5%时,保湿霜色泽均匀,但用量过多或过少会使其乳化稳定性变差,因此将 3%的单硬脂酸甘油酯作为最佳用量.棕榈酸异辛酯含量过少时保湿霜不易涂抹,含量过多则变得油腻,并且棕榈酸异辛酯含量在 4%和 5%时的涂抹效果相差不大.因此考虑经济性选择 4%的棕榈酸异辛酯作为最佳用量.三乙醇胺含量过多或过少均会降低保湿霜的稳定性,因此选择 0.8%的三乙醇胺作为最佳用量.甘油含量过低保湿霜不易涂抹,含量过高则变得油腻,因此选择 8%的甘油作为最佳用量.

由图 1 可知,林蛙皮极细粉和银耳粗多糖提取液在质量分数为 1.0%~3.0%时均有明显的保湿作用.和基质共同作用时,林蛙皮极细粉含量为 1.5%和银耳粗多糖提取液含量为 2%时所制得

的保湿霜的涂抹分散性及稳定性最好。

表 4 回归方程模型方差分析表

因素	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
回归模型	15.48	9	1.72	40.66	<0.000 1
A	6.66	1	6.66	157.44	<0.000 1
B	0.22	1	0.22	5.15	0.057 6
C	0.088	1	0.088	2.08	0.192
AB	0.12	1	0.12	2.73	0.142 3
AC	0.036	1	0.036	0.85	0.386 4
BC	0.026	1	0.026	0.61	0.462 1
A ²	0.03	1	3.03	71.56	<0.000 1
B ²	1.26	1	1.26	29.89	0.000 9
C ²	3.21	1	3.21	75.84	<0.000 1
残差	0.3	7	0.042		
失拟项	0.17	3	0.056	1.73	0.299 4
纯误差	0.13	4	0.032		
总变异	15.78	16			

$R^2=0.981 2$ $R_{adj}^2=0.957 1$

注: $P<0.05$ 表示差异显著; $P<0.001$ 表示差异极显著。

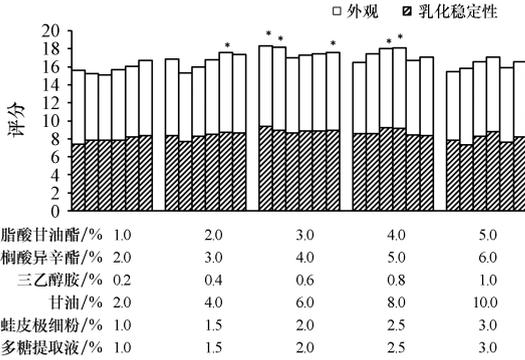


图 1 单因素实验

3.2 响应面实验结果

3.2.1 响应面实验设计 依次改变棕榈酸异辛酯(A)、三乙醇胺(B)、甘油(C)的用量,以保湿霜的综合评分作为指标,采用响应面分析法对工艺参数进行优化。实验设计和结果见表 3。

表 3 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	综合评分
1	0	0	0	9.09
2	-1	1	0	8.76
3	-1	-1	0	8.78
4	0	0	0	9.55
5	-1	0	1	8.73
6	0	0	0	9.25
7	0	-1	-1	8.21
8	0	-1	1	7.94
9	1	0	-1	6.71
10	0	1	-1	8.07
11	1	0	1	6.53
12	1	1	0	6.78
13	1	-1	0	7.48
14	0	0	0	9.45
15	-1	0	-1	8.53
16	0	1	1	7.48
17	0	0	0	9.39

3.2.2 拟合模型与显著性检验 根据表 3 的数据,可得表 4 所示的回归方程方差分析表。利用软件 Design-Expert 8.0.6 进行非线性回归的二次多项式拟合,得如下预测模型:

$$Y=9.35-0.91A-0.16B-0.1C-0.17AB-0.095AC-0.08BC-0.085A^2-0.55B^2-0.87C^2,$$

其中 Y 为保湿霜综合评分。

回归方差分析显著性检验表明,所得模型回归极显著($P<0.000 1$),说明该模型有意义。失拟项 $P=0.299 4$,说明模型模拟数据与试验值的差异较小。另外,该模型的总决定系数 $R^2=0.981 2$,调整决定系数 $R_{adj}^2=0.957 1$,说明该模型中的 3 个因素及其二次项能解释 95.71% 的响应值变化,即表明该回归模型拟合性较好,可以用于本实验进行预测和分析。

由表 4 可知:棕榈酸异辛酯的 $P<0.000 1$,达到极显著水平;三乙醇胺的 $P=0.057 6$,甘油的 $P=0.192 0$,均为统计显著性。由此得出各因素对综合评分的影响顺序是:A(棕榈酸异辛酯)>B(三乙醇胺)>C(甘油)。根据回归方程,二次项中 AB、AC、BC 3 项的 P 值均大于 0.05,说明因素之间的交互作用不显著,各实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。在二次项中 A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均小于 0.001。依此配方,进行 3 次实验,实验所得综合评分为 9.19。

图 2—图 4 为各因子交互作用的响应面分析图和等高线分析图。通过考察所拟合的响应曲面的形状,可分析 A、B、C 的添加量对保湿霜综合评价的影响。等高线的形状趋于圆形表示 2 个因素之间交互作用不显著,趋于椭圆形则相反。由图 2—图 4 中的响应面的最高点和等高线可以看出,在所选的范围内存在极值,该极值点既是响应面

的最高点,也是等高线最小椭圆的中心点. 这说

明,本文实验因素所选择的水平区间是合理的.

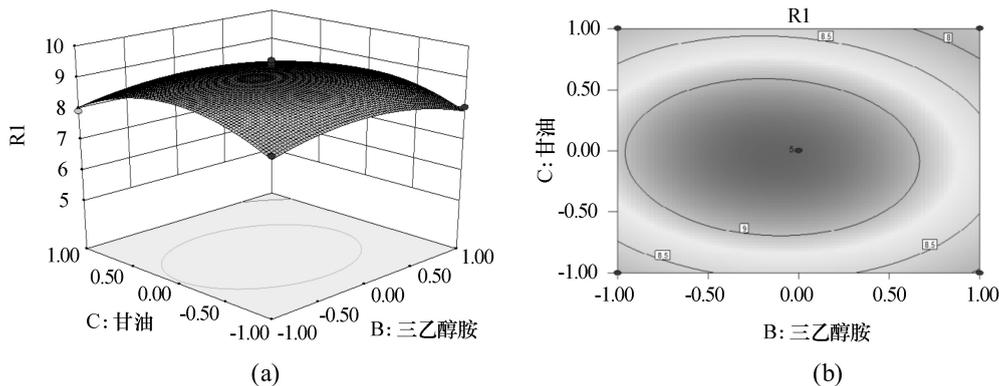


图 2 三乙醇胺和甘油相互影响的响应面分析图(a)及等高线分析图(b)

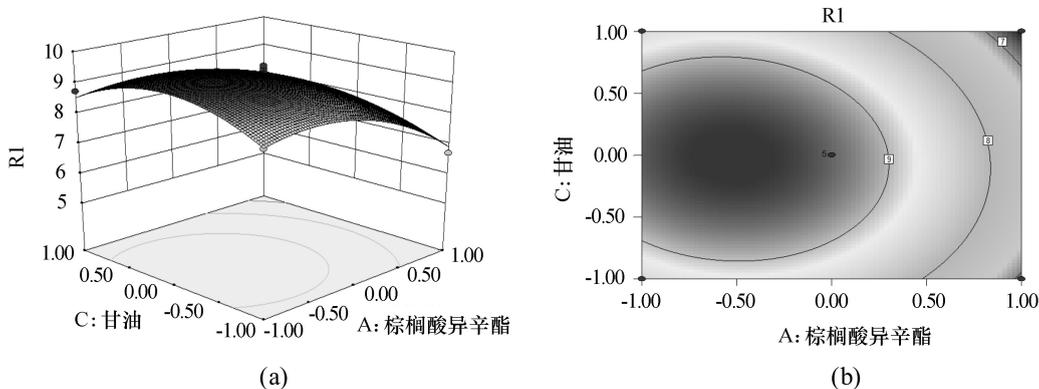


图 3 棕榈酸异辛酯和甘油相互影响的响应面分析图(a)及等高线分析图(b)

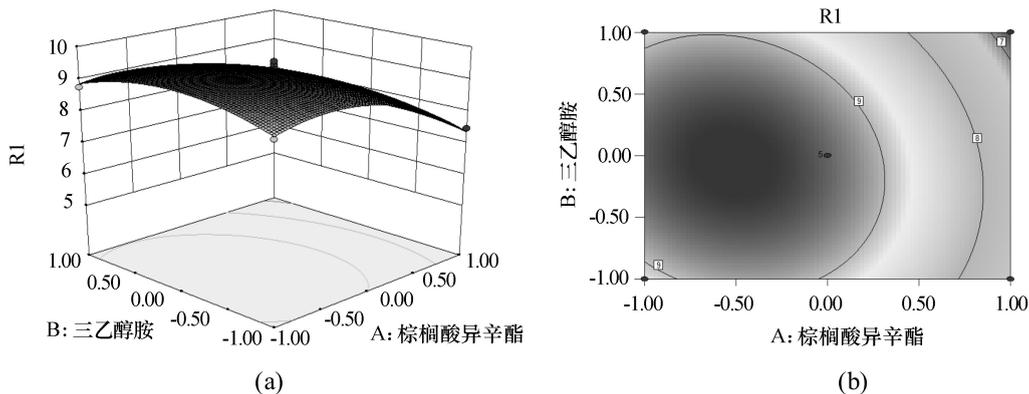


图 4 棕榈酸异辛酯和三乙醇胺相互影响的响应面分析图(a)及等高线分析图(b)

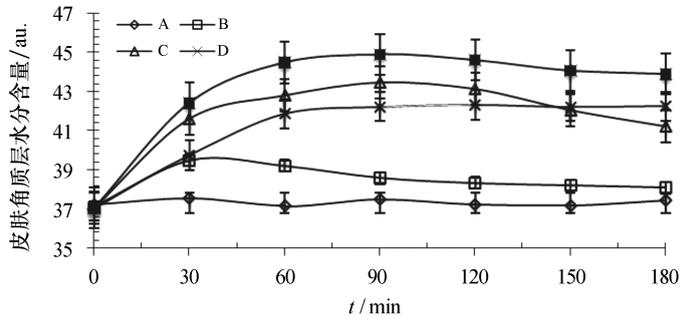
3.3 保湿霜的保湿效果

保湿霜保湿效果的测定结果如图 5 所示. 由图 5 可以看出: A 组在 180 min 内皮肤角质层的水分含量无显著变化. B 组在 30 min 内时皮肤角质层的水分含量最高,其原因可能是基质中的成分阻断了水分的流失;在 30~90 min 时,可能由

于基质内的水分散失,水分含量降低;在 90 min 后无明显变化. C 组在 30 min 内时皮肤角质层的水分含量迅速升高;在 60~90 min 时水分含量平缓上升,且在 90 min 时水分含量最高;在 90 min 后随时间的推移水分含量持续降低. D 组在 30~60 min 时,皮肤角质层的水分含量快速提高;在

60~180 min 时,水分含量增加缓慢. E 组在 0~90 min 时,皮肤角质层的水分含量有显著提高,且在 90 min 达到最高值;在 90~180 min 时,水

分含量高于同时间内的 C 组和 D 组,有统计学差异($P < 0.05$). 这说明,林蛙皮极细粉和银耳粗多糖提取液在保湿效果上有协同增效作用.



A 空白; B 基质; C 基质+2%银耳粗多糖提取液; D 基质+1.5%林蛙皮极细粉

图5 林蛙皮银耳保湿霜在 180 min 内对皮肤角质层水分含量的影响

4 结论

本文研究了棕榈酸异辛酯、三乙醇胺、甘油等物质的添加量对林蛙皮银耳保湿霜综合评分的影响,并通过单因素实验、Box-Behnken 中心组合设计原理和响应面分析法等确定了保湿霜的最佳基质组成及各因素的主效应关系. 实验结果表明,林蛙皮银耳保湿霜的最佳配方为:单硬脂酸甘油酯 3%、棕榈酸异辛酯 4%、三乙醇胺 0.8%、甘油 8%、林蛙皮极细粉 1.5%、银耳粗多糖提取液 2%,最佳配方的综合评分为 9.19. 本文提出的保湿霜的制备方法简单,条件温和,且保湿霜具有良好的耐寒、耐热性及稳定性和舒适性,符合化妆品 GB/T 29665—2013 的要求,因此该保湿霜可作为一种良好的护肤品进行开发利用.

参考文献:

[1] 陶久臣,于森,邢波建,等. 东北林蛙基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 黑龙江畜牧兽医,2018,40(17):179-181.

[2] 衣铭慧,孙志双,施溯筠. 响应面优化林蛙皮-人参美白保湿膏的基质配方[J]. 延边大学学报(自然科学报),2018,44(1):58-62.

[3] 马骁. 透明质酸钠和胶原蛋白在激光术皮肤护理品中的应用研究[D]. 上海:复旦大学,2013:29-40.

[4] 任清,李守勉,李丽娜,等. 银耳多糖的提取及其美容功效研究[J]. 日用化学工业,2008,38(2):103-105,109.

[5] 来吉祥,何聪芬,董银卯,等. 银耳多糖工业化提取工艺优化及护肤功效研究[J]. 日用化学工业,2010,40(4):259-262.

[6] 李燕,蔡东联,胡同杰,等. 银耳多糖对实验性衰老小鼠的保护作用[J]. 第二军医大学学报,2004,25(10):1104-1107.

[7] 聂林燕. 林蛙皮多肽提取工艺建立及化妆品初步研制[D]. 长春:吉林大学,2017.

[8] 刘艳,段振华,蔡彦,等. 牡蛎酶解液的脱腥工艺研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(21):95-99.

[9] 林学清. 鹿角藻脱腥脱色技术研究[J]. 福建轻纺,2017,23(4):44-47.

[10] 王振华. 泥鳅脱腥方法及脱腥对泥鳅品质的影响[D]. 重庆:西南大学,2016:58-70.

[11] 石硕,孙丽娜,仙靓,等. 神仙草叶多糖提取及过氧化氢脱色工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2017,31(3):50-54.

[12] 周雅琳,谭红军,杨勇. 不同处理方式对银耳粗多糖提取效果及化学成分的影响[J]. 食品科技,2015,40(5):216-220.

[13] 孟潇,冯小玲,陈庆生,等. 高效保湿霜配方设计及其保湿性能研究[J]. 香料香精化妆品,2015,42(4):63-67.

[14] 衣铭慧,袁海恋,孙志双,等. 中国林蛙皮保湿性研究[J]. 临床皮肤科杂志,2018,47(4):205-208.