紫草素和姜黄素在化妆品动物替代试验的研究

阮浩澜,陈琪,许姿敏,霍淑霞,乔叶军,翁森,方继辉,颜林*(广东省药品检验所/国家药品监督管理局化妆品风险评估重点实验室,广东广州 510180)

摘要:目的 探究化妆品中药原料紫草素和姜黄素在动物替代试验中的应用。**方法** 选用紫草素和姜黄素单体原料分别进行体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验,体外 3T3 中性红摄取光毒性试验与皮肤变态反应:局部淋巴结试验(DA 法,LLNA:DA)。**结果** 紫草素在 3 个试验中结果均为阴性。姜黄素不能在兔角膜上皮细胞短时暴露试验和体外 3T3 中性红摄取光毒性试验规定的溶媒中均匀溶解,只进行了 LLNA:DA 试验,结果为阴性。**结论** 动物替代试验结果显示紫草素眼刺激、光毒性和致敏性为阴性,姜黄素致敏性为阴性。姜黄素和紫草素在规定溶媒中的溶解性决定了二者在动物替代试验中的适用性,在进行动物替代试验前需对样品进行充分的溶解度预试验。

关键词:紫草素;姜黄素;化妆品;替代方法;动物试验
中图分类号:R917 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-229X(2022)02-0102-04
Doi:10.12048/j.issn.1674-229X.2022.02.004

Study on Shikonin and Curcumin in Cosmetics Animal Substitution Experiments

RUAN Haolan, CHEN Qi, XU Zimin, HUO Shuxia, QIAO Yejun, WENG Sen, FANG Jihui, YAN Lin* (*Guangdong Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Safety Risk Assessment of Cosmetics, Guangzhou, Guangdong* 510180, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the application of shikonin and curcumin in animal substitution experiments as the raw materials of cosmetics. **METHODS** The raw materials of shikonin and curcumin in cosmetics were separately carried out with short-term exposure test (STE test) in rabbit corneal epithelial cells, 3T3 cell neutral red uptake test and murine local lymph node assay: Daicel adenosine triphosphate (LLNA:DA) test method. **RESULTS** The results were negative predition in the three tests for shikonin. Curcumin could not be uniformly dissolved in the solvent specified in the short-term exposure test of rabbit corneal epithelial cells and in the 3T3 cell neutral red uptake test. Only the LLNA:DA test was performed and the result was negative predition. **CONCLUSION** Animal substitution experiment results from eye irritation, skin phototoxicity and sensitization were negative predition for shikonin, and curcumin was negative predition for sensitization. The solubility of curcumin and shikonin in the prescribed solvent determine their applicability in animal substitution experiments. Before conducting animal substitution experiments, sufficient solubility pre-tests should be performed on the samples.

KEY WORDS: shikonin; curcumin; cosmetics; substitution methods; animal experiment

近年多种中药提取物作为原料被添加于化妆品中,但部分添加的中药提取物可能具有潜在的皮肤过敏性和刺激性,因此对化妆品的中药原料特别是新原料需进行系统的安全性评价。化妆品中药原料中尤以姜黄素及紫草素最为常用,二者对酪氨酸酶均有很好的抑制作用,具有显著的抗氧化活性[1-2],是常用的化妆品中药原料[3-4]。针对姜黄素及紫草素是否有潜在的皮肤光毒性,已有研究利用中药提取物在豚鼠上进行了皮肤光毒性试验,试验结果为未显示有光毒性[5]。

一直以来进行评价和检测化妆品中药单体的方法都是动物试验,试验方法操作简单、成熟,但结果外推存在一定的差异,且某些反应会给动物造成极大痛苦,存在一定的伦理学问题,随着欧盟化妆品法规对于化妆品动物试验禁令的实施,全球动物福利呼声的日益强烈,创新发展动物体外替代试验对于保障化妆品安全显得日益重要。本研究选用《化妆品卫生规范》(2015 版)收录的体外兔角膜上皮细胞

作者简介:阮浩澜,副主任药师,研究方向:药品、化妆品安全性评价评价,E-mail:9160009@qq.com ***通信作者:**颜林,高级工程师,研究方向:药品、化妆品安全性评价

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

短时暴露试验，体外 3T3 中性红摄取光毒性试验与皮肤变态反应：局部淋巴结试验（DA 法，LLNA：DA）3 种化妆品动物替代方法从化妆品的眼刺激、皮肤光毒性和皮肤过敏性等 3 个方面对姜黄素及紫草素进行试验，观察姜黄素及紫草素在 3 种替代方法中的试验结果以及探讨动物替代方法在中药原料的安全性评价中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

兔角膜上皮细胞（SIRC，第 4 代），购于深圳市豪地华拓生物科技有限公司；BALB/c 3T3 成纤维细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库；BALB/c 小鼠，SPF 级，雌性，体质量 21.4～25.1 g，由广东省医学实验动物中心提供，实验动物合格证号：44007200081434，实验动物使用许可证号：SYXK（粤）2019-0050。

1.2 仪器

Spectramax Plus 全自动酶标仪，Molecular Devices公司；HOPE-MED 8130G 细胞光毒性检测仪，天津开发区合普工贸有限公司；ATP 荧光检测仪，日本龟甲万公司。

1.3 试剂与材料

紫草素（卡尔玛公司）、姜黄素（麦克林公司）、十二烷基硫酸钠（广州化学试剂厂）、MTT（Aladdin 公司）、盐酸氯丙嗪（CNW technologies 公司）、中性红（天津市天新精细化工开发中心）、α-己基肉桂醛（麦克林公司），生物检测试剂盒 CheckLite250 Plus（ATP 检测）购自日本龟甲万公司。

1.4 方法

1.4.1 体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验 依据《化妆品卫生规范》（2015 版）化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验方法进行试验。在溶解度预试验中，姜黄素不能均匀混悬于 5% 的 DMSO/生理盐水，不适用于本次试验，因此本次只进行紫草素的试验。待测兔角膜上皮细胞按试验方法接种 96 孔板，每孔加入 200 μL 5% 和 0.05% 紫草素溶液（5%DMSO 的生理盐水配制），处理 5 min，每个样品做 3 个复孔，同时空白对照、培养基对照、溶剂对照和阳性对照做相应的处理。试验重复 3 次，取 3 次试验数据进行后续分析。结果判定根据受试物 3 次试验结果计算每个样品的平均细胞存活率±标准差，然后按以下依据进行判断：细胞存活率在 5% 浓度大于 70%，0.05% 浓度大于 70%，判断为无刺激性或微刺激性；5% 浓度小于或等于 70%，0.05% 浓度大于 70%，结果无法判定；5% 浓度小于或等于 70%，0.05% 浓度小于或等于 70%，判断为腐蚀性（不可逆眼损伤）。

1.4.2 体外 3T3 中性红摄取光毒性试验 依据《化妆品卫生规范》（2015 版）化妆品用化学原料体外 3T3 中性红摄取光毒性试验方法进行试验。试验前评价受试物的溶解度，结果显示姜黄素不能溶于或均匀混悬于二甲基亚砜（DMSO）或乙醇（ETOH）等溶剂，因此在本次只进行紫草素的试验，使用 DMSO 作为溶剂，其终浓度不超过总体积的 1%（*v*/*v*）。每次试验制备两个板，包括相同的受试物浓度系列、溶剂对照、空白对照和阳性对照，一个板用于确定细胞毒性（-Irr），另一个板用于确定光毒性（+Irr）。按试验流程处理后，用酶标仪在 540nm 波长处测定孔板每孔光密度，用空白孔作为参考对照。评判标准：PIF≤2 或 MPE≤0.1：预测“无光毒性”；PIF≥5 或 MPE≥0.15，预测“有光毒性”；PIF 介于2～5之间或 MPE 介于 0.1～0.15 之间，需进行重复试验，如果 PIF 仍介于 2～5 之间或 MPE 仍介于0.1～0.15之间预测“有潜在光毒性”。

1.4.3 皮肤变态反应 局部淋巴结试验：DA 法（LLNA：DA）紫草素和姜黄素均能溶解于丙酮：橄榄油（AOO，*v*/*v* 4∶1），通过预试验结果分别选择 100%、50%、25% 3 个连续的浓度作为正式实验时的浓度。实验第 7 天染毒后约 24～30 h 人道处死动物，摘取小鼠双侧颌下淋巴结，用龟甲万 ATP 检测试剂盒检测淋巴细胞相对发光单位（RLU），同时分离耳廓打孔称重。依据试验结果判断致敏性，当刺激指数 SI≥1.8，受试物为致敏阳性。

2 结果

2.1 体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验结果

试验结果显示阳性对照组细胞存活率小于 70%，结果为腐蚀性（不可逆眼损伤）。0.05% 和 5% 紫草素溶液处理组的细胞存活率均大于 70%，结果为无刺激性或微刺激性，具体见表 1。紫草素在体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验结果为无刺激性或微刺激性。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　紫草素兔角膜上皮细胞短时暴露试验结果($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞存活率/%	结果
溶剂对照	100	无刺激性
阳性对照(0.01%十二烷基硫酸钠)	48.22±2.21	腐蚀性(不可逆眼损伤)
0.05%紫草素	79.63±3.90	无刺激性或微刺激性
5%紫草素	75.39±5.85	无刺激性或微刺激性

2.2　3T3 细胞光毒试验结果

各处理组用酶标仪测定中性红提取物溶液在 540 nm 波长处光吸收值,使用 OECD 的 PHOTO32 软件处理,计算光刺激因子(PIF 值)和平均光效应(MPE 值),结果见表 2。结果显示,盐酸氯丙嗪(阳性对照)PIF 值为 26.217,MPE 值为 0.250,预测有光毒性。紫草素 PIF 值为 * 1,MPE 值为-0.021,小于 0.1,预测紫草素无光毒性。

表 2　紫草素 3T3 细胞光毒试验结果

受试物	PIF	MPE	结果评判
紫草素	* 1	-0.021	预测无光毒性
阳性对照(盐酸氯丙嗪)	26.217	0.250	预测有光毒性

注:受试物在最高浓度时仍未显示任何细胞毒性,用“PIF = * 1”表示,提示“无潜在光毒性”。

2.3　皮肤变态反应:局部淋巴结试验:DA 法(LLNA:DA)试验结果

依据《化妆品卫生规范》(2015 版)皮肤变态反应:局部淋巴结试验:DA 进行试验。小鼠耳廓局部刺激红斑评分和受试物耳廓重结果显示,在整个试验过程中紫草素和姜黄素未见中度皮肤刺激性反应,符合试验规定。淋巴细胞相对发光单位(RLU)和刺激指数(SI)记录结果见表 3,受试物致敏性判断见表 4。

表 3　淋巴细胞相对发光单位均值(RLU 均值)和刺激指数(SI)记录结果

组别	RLU 均值	SI
25%紫草素	16016	1.20
50%紫草素	16744	1.25
100%紫草素	17043	1.28
25%姜黄素	17924	1.34
50%姜黄素	17238	1.29
100%姜黄素	15139	1.14
阳性对照组(α-己基肉桂醛)	52962	3.98
溶剂对照组	13316	/

表 4　受试物致敏性判断

受试物	最大刺激指数 SI	致敏阴性/阳性
紫草素	1.28	阴性
姜黄素	1.34	阴性
阳性对照	3.98	阳性

注:当刺激指数 SI≥1.8,受试物为致敏阳性。

3　讨论

目前,有超过 60 多种不同的植物成分被应用到功能性化妆品配方里,对植物药产品最常见的不良皮肤反应包括过敏和刺激性接触性皮炎[6]。在传统观念里安全、不良反应发生率低的植物药在临床上使用的安全性越来越受到重视,同时在作为外用的化妆品中药原料其安全性评估也需慎重。化妆品中药原料紫草素作为化妆品原料已有较长的历史,除了作为化妆品色素使用,还有具有收敛、消炎、抗菌的作用[7],姜黄素具有抗氧化、抗菌、抗炎等作用,是国内外功能性化妆品常用的添加成分[8]。

随着欧盟化妆品法规对于化妆品动物试验禁令的实施,目前许多国家和地区都颁布了化妆品动物试验禁令。为了迎合国际趋势,建立与国际接轨的化妆品安全性评价体系,自 2016 年起,我国《化妆品安全技术规范》[9]已先后纳入 6 项替代毒理学试验方法[10]。本试验目的是尝试利用《化妆品安全技术规范》里的《化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验》《化妆品用化学原料体外 3T3 中性红摄取光毒性试验》和《皮肤变态反应:局部淋巴结试验:DA》对常用的化妆品中药原料紫草素和姜黄素在眼刺激、光毒性和皮肤变态反应 3 个方面进行初步研究探讨,研究结果显示紫草素在这 3 个试验中的结果预测均为阴性,姜黄素由于在本次试验中的部分规定溶媒中溶解不充分,只进行了局部淋巴结试验,试验结果预测为阴性。

紫草素,紫色片状结晶或结晶性粉末,不溶于水,溶于乙醇、有机溶剂和植物油,易溶于碱性溶液,遇酸又沉淀析出。姜黄素,橙黄色结晶粉末,不溶于水和乙醚,溶于乙醇、丙二醇,易溶于冰醋酸和碱溶液。在本次试验中,紫草素和姜黄素均能溶解于纯的二甲基亚砜(DMSO),但按规定将 DMSO 含量降低到 5%或更低后,姜黄素会出现沉淀析出,用乙醇做溶剂时姜黄素也出现同样的析出情况。但在局部淋巴结试验的溶媒丙酮:橄榄油(v/v,4:1)中,紫草素和姜黄素均有良好的溶解度。本次试验不同于传统的动物试验,有些替代方法是在体外的细胞中进

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

行，对样品的溶解度和溶媒对细胞的毒性都有具体要求。因此，在应用替代方法对化妆品原料，特别是中药原料进行安全性评估的时候，需对它们的化学特性以及在规定溶媒中的溶解情况进行充分的预试验和评估，从而判断是否适用该试验方法，确保试验结果稳定可靠。

参考文献

[1] 杜志云，徐学涛，潘文龙，等.姜黄素类化合物及姜黄素衍生物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J].日用化学工业，2008，38(3)：172-175.

[2] 魏梦涛.紫草素抗氧化和抑制酪氨酸酶活性研究[D].南昌：江西中医药大学，2019.

[3] 王春晓，邓小玲.紫草提取物功效型唇膏的制备及性能评价[J].煤炭与化工，2021，44(9)：120-123.

[4] 周丹丹，贺立平，刘婷婷，等.不同配方化妆品对皮肤美白作用的初步研究[J].香料香精化妆品，2016(1)：45-49.

[5] 潘南楠，赖维，龚子鉴，等.四种中药提取物的动物光毒实验[J].皮肤性病诊疗学杂志，2011，18(2)：76-78.

[6] 刘毅.美国含草药提取物功能化妆品的新态势[J].中国化妆品，2017(Z3)：44-49.

[7] 冯启浩，张唯.化妆品与天然物质[J].香料香精化妆品，1996(3)：39-54.

[8] 杜志云，林丽，邓玉川.姜黄素的生物活性及其在化妆品中的应用[J].中国洗涤用品工业，2005(4)：64-66.

[9] 国家食品药品监督管理局.化妆品安全技术规范[M].北京：人民卫生出版社，2017.

[10] 邢书霞.欧盟和我国化妆品安全性评价体系的比较研究[J].中国卫生检验杂志，2017，27(17)：2581-2584.

（收稿日期：2021-11-30；在线出版日期：2021-12-27）

（上接第 90 页）

[13] 广东省药学会.免疫检查点抑制剂全程化药学服务指引(2019年版)[J].今日药学，2020，30(5)：289-306.

[14] 广东省药学会.乳腺癌患者的药学门诊管理专家共识[J].今日药学，2021，31(12)：881-885.

[15] 广东省药学会.结直肠癌药学门诊服务规范医药专家共识[J/OL].今日药学：1-13[2022-01-13].http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1650.R.20211208.0130.004.html.

[16] Zheng Z，Wu J，Zeng Y，*et al*.Creating the position of surgical pharmacist in China[J].Eur J Hosp Pharm，2020，27(6)：99.

[17] 郑志华，伍俊妍，曾英彤，等.推动“外科药师”的建立[J].今日药学，2020，30(4)：259-260，271.

[18] Zheng Z，Wu J，Wei L，*et al*.Surgical pharmacy：the knowledge system of surgical pharmacists[J].Eur J Hosp Pharm，2021.Doi：10.1136/ejhpharm-2021-002887.

[19] 伍俊妍，张梅，王若伦，等.构建外科药师的知识体系——外科药学(Surgical Pharmacy)[J].今日药学，2021，31(1)：1-8.

[20] 罗志华.建立药师门诊当给药师更多话语权[N/OL].光明日报，2017. http://epaper. gmw. cn/gmrb/html/2017-11/15/nw.D110000gmrb_20171115_6-11.htm.

[21] 黄子宁.药师也能坐诊开方？[N/OL].广州日报，2018.http://news.sina.com.cn/c/2018-02-09/doc-ifyrkrva5633809.shtml.

（收稿日期：2022-01-25；在线出版日期：2022-01-28）

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net