

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)02-0052-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.02.012



皮肤外用桑白皮水提物安全性研究*

钱明明, 杨颖[△], 王婷婷, 王玺宁

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要:目的 评估皮肤外用桑白皮水提物的安全性。方法 选取豚鼠进行皮肤急性毒性试验, 观察豚鼠 14 d 内的体质量变化、毒性反应和死亡情况; 进行皮肤致敏试验, 观察 72 h 内皮肤致敏情况并评分。选取新西兰兔, 采用自身对比法进行单次、多次皮肤刺激, 观察 72 h 内完整及破损皮肤刺激性反应并评分。结果 经低、中、高剂量(6.0, 12.0, 24.0 mg/mL)桑白皮水提物处理后, 豚鼠均正常生长, 完整皮肤、破损皮肤均未见急性毒性反应, 且破损皮肤处结痂正常; 各组豚鼠用药前及用药后 7, 14 d 的体质量无显著差异($P > 0.05$); 未出现局部皮肤红斑、水肿或站立不稳、呼吸困难和过敏性休克等全身性症状, 豚鼠未发生皮肤致敏反应。试验兔完整皮肤、破损皮肤均未出现刺激性反应。结论 在外用质量浓度不超过 24 mg/mL 桑白皮水提物作用下, 豚鼠无皮肤急性毒性、致敏性表现, 试验兔无刺激性反应。

关键词: 桑白皮水提物; 皮肤外用; 急性毒性试验; 致敏试验; 刺激性试验; 安全性

Safety Study of Water Extract from Mori Cortex for Skin Application

QIAN Mingming, YANG Ying, WANG Tingting, WANG Xining

(Lianyungang Inspection Testing Center of Food and Drug, Lianyungang, Jiangsu, China 222000)

Abstract: Objective To evaluate the safety of the water extract from Mori Cortex for skin application. **Methods** Forty guinea pigs were selected for acute skin toxicity test, and the changes in body mass, toxic reaction and mortality within 14 d were observed. Another thirty guinea pigs were selected for skin sensitization test, the sensitization degree within 72 h was observed and scored. Sixteen New Zealand rabbits were selected for single- and multiple-dose skin stimulation tests by the self-contrast method, the stimulation reactions of intact and damaged skin within 72 h were observed and scored. **Results** After the treatment of low-, medium- and high-doses water extract from Mori Cortex (6.0, 12.0, 24.0 mg/mL), guinea pigs grew normally, and no acute toxic reaction was observed in both intact and damaged skins, and the scabs on the damaged skin were normal. The body weight of guinea pigs in each group 7 d and 14 d after medication was similar to that before medication ($P > 0.05$). No erythema or edema was observed at local skin of guinea pigs, and no systemic symptom (unstable standing, dyspnea, allergic shock) or skin sensitization reaction occurred. No stimulation reaction was observed in the intact and damaged skins of the test rabbits. **Conclusion** Water extract from Mori Cortex shows no acute skin toxicity or sensitization in guinea pigs or stimulation reaction in test rabbits when applied at a dose ≤ 24 mg/mL.

Key words: water extract from Mori Cortex; medicine for skin application; acute toxicity test; sensitization test; stimulation test; safety

桑白皮,系桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 除去栓皮的干燥根皮,始载于《神农本草经》,具有清肺平喘、利水消肿之功效^[1]。近年来,有研究发现其提取物具有美白活性,在外用美白护肤品方面具备一定开发价值^[2-3],但目前尚未见皮肤外用相关提取物的毒理学安全性研究。对于桑白皮有效美白成分的提取,可通过甲醇、乙醇和水进行萃取^[4-5],但甲醇属《化妆品安全技术规范(2015年版)》中的禁用物质,乙醇会溶解皮脂膜从而破坏皮肤的屏障功能。故本研究中选取去离子水作为提取溶剂,参照国家药品监督管理局《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究的技术指导原则》,通过皮肤急性毒性试验、皮肤致敏试验、皮肤刺激性试验系统评价桑白皮水提物的安全性,以期为其进一步应用提

供依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:BS-600L型电子天平(上海友声衡器有限公司,精度为0.1g);AWH-30-SA型电子天平(上海英展机电企业有限公司,精度为0.1g)。

试药:薇婷脱毛膏(利洁时家化有限公司,批号为C160322003);2,4-二硝基氯苯(山东西亚化学有限公司,批号为20220705);水为去离子水。桑白皮药材饮片(购于江苏仟草堂药业有限公司,产地安徽),由连云港市食品药品检验检测中心马冬云主任中药师鉴定为正品。

动物:健康豚鼠(体质量为250~300g)、健康新西

*基金项目:江苏省市场监督管理局科技计划项目[KJ2022046]。

第一作者:钱明明,男,硕士,主管药师,研究方向为药物分析与药物安全性评价,(电子信箱)qianmingming2012@163.com。

[△]通信作者:杨颖,女,硕士,副主任药师,研究方向为药物分析与药物安全性评价,(电子信箱)yangyingxiao7@163.com。

兰兔(体质量约1.7 kg),雌雄各半,均购自邳州市东方养殖有限公司[实验动物生产许可证号分别为SCXK(苏)2022-0004、SCXK(苏)2022-0005]。实验动物雌雄分笼饲养于我中心动物房[实验动物使用许可证号为SYXK(苏)2020-0020],温度20~22℃,相对湿度50%~60%,自由进食(饲料购自邳州市小河科技发展有限公司)、饮水。

1.2 桑白皮水提物制备

称取药材饮片样品2.4 g,置250 mL圆底烧瓶中,加入去离子水50 mL,回流提取2 h后,滤过,滤渣继续提取2 h,合并滤液,浓缩至20 mL,稀释制得质量浓度分别为6.0、12.0、24.0 mg/mL的水提液。

1.3 皮肤急性毒性试验

完整皮肤:取健康豚鼠40只,雌雄各半,随机分为空白组(等体积水)及桑白皮水提物低、中、高剂量组(简称低、中、高剂量组,6.0、12.0、24.0 mg/mL桑白皮水提物),各10只。试验前24 h剪去动物背部两侧长毛,再用脱毛膏脱毛(面积约20 cm²)。各组脱毛区分别均匀涂抹相应水提物或水2 mL,用无菌纱布覆盖,以无刺激性橡皮胶固定,24 h后用温水洗净药物。每日观察豚鼠脱毛区皮肤局部变化及全身毒性反应,包括皮肤、毛发、眼睛、黏膜、饮食、排泄、四肢活动、呼吸、中枢神经系统等的变化,连续观察14 d;记录用药前及用药后7、14 d豚鼠的体质量。若试验过程中动物死亡,应立即进行解剖学检查,必要时进行组织病理学检查。

破损皮肤:取健康豚鼠40只,雌雄各半,动物分组、脱毛方法和脱毛面积同上,脱毛区皮肤用薄刀片作“#”形划破,破口以渗血不伤及真皮为度,其余操作步骤同“完整皮肤”。

1.4 皮肤致敏试验

致敏接触:取健康豚鼠30只,雌雄各半,随机分为空白组(等体积水)、桑白皮水提物组(简称桑白皮组,6.0 mg/mL桑白皮水提物)和阳性对照组(1%2,4-二硝基氯苯溶液激发给药6 h),各10只。试验前24 h剪去其背部两侧对称位置长毛,再用脱毛膏脱毛,两侧脱毛(约3 cm×3 cm)。各组豚鼠左侧脱毛区分别涂相应药物0.2 mL,覆盖无菌纱布,用无刺激性橡皮胶固定,分笼饲养,6 h后用温水洗净药物,并于首次给药后7、14 d采用相同方法重复致敏。

激发接触:末次接触致敏14 d后于右侧脱毛区,采用与“致敏接触”相同的方法给药,激发6 h后洗净药物,然后分别于0、24、48、72 h时观察并记录豚鼠皮肤红斑、水肿,以及站立不稳、呼吸困难和过敏性休克等全身性症状发生情况。

致敏反应评价^[6]:无红斑、轻度红斑、中度红斑、重

度红斑、水肿性红斑分别计0分、1分、2分、3分、4分;无水肿、轻度水肿、中度水肿、重度水肿分别计0分、1分、2分、3分。致敏反应平均分=(红斑形成总分+水肿形成总分)/动物总数。致敏率(%)=发生致敏反应动物数/受试动物总数×100%。皮肤致敏性评价中,致敏率为0~10%、11%~30%、31%~60%、61%~80%、81%~100%分别评定为无致敏性、轻度致敏性、中度致敏性、高度致敏性、极度致敏性。

1.5 皮肤刺激性试验

单次给药:采用自身对比法。取健康新西兰兔8只,雌雄各半,随机分为完整皮肤组和破损皮肤组。试验前24 h剪去兔背部两侧对称位置长毛,再用脱毛膏脱毛(约3 cm×4 cm)。完整皮肤组脱毛区皮肤无损伤;破损皮肤组脱毛区皮肤用薄刀片作“#”形划破,破口以渗血不伤及真皮为度。自身对照侧皮肤均涂抹水0.5 mL(作为完整皮肤空白组和破损皮肤空白组),另一侧均涂抹6.0 mg/mL桑白皮水提物0.5 mL(作为完整皮肤桑白皮组和破坏皮肤桑白皮组),用单层无菌纱布和单层蜡纸覆盖,再用无刺激性橡皮胶固定,4 h后用温水洗净,并于洗净后1、24、48、72 h观察涂抹部位皮肤刺激反应并记录相应评分。

多次给药:取健康新西兰兔8只,雌雄各半,动物分组、脱毛面积和皮肤处理及给药步骤与单次给药时试验相同,连续用药7 d,清除药物后1、24、48、72 h观察涂抹部位皮肤刺激反应并记录相应评分。

皮肤刺激性反应评价^[7]:红斑,无红斑、轻微红斑(勉强可见)、明显红斑、中重度红斑、严重红斑(紫红色)至轻微焦痂形成分别计0分、1分、2分、3分、4分;水肿,无水肿、轻微水肿(勉强可见)、轻度水肿(皮肤隆起轮廓清楚)、中度水肿(皮肤隆起约1 mm)、重度水肿(皮肤隆起超过1 mm)分别计0分、1分、2分、3分、4分。每天每只动物皮肤刺激性反应平均分=红斑和水肿总分/(受试动物数×刺激天数)。皮肤刺激强度评价中,平均分为0~0.49分、0.50~1.99分、2.00~5.99分、6.00~8.00分分别评定为无刺激性、轻刺激性、中刺激性、强刺激性。

1.6 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮肤急性毒性试验

试验期间,各组豚鼠均正常生长,口、耳、鼻及眼未见异常分泌物,皮肤、毛发、呼吸、饮水、饮食及大小便均无异常,未出现惊厥、痉挛、运动失调等神经系统反

表1 皮肤急性毒性试验中各组豚鼠体质量比较($\bar{X} \pm s, g, n = 10$)

Tab.1 Comparison of body mass of guinea pigs in each group after acute skin toxicity test ($\bar{X} \pm s, g, n = 10$)

类别	组别	给药前	给药后7 d	给药后14 d
完整皮肤	空白组	263.9 ± 6.3	292.9 ± 6.7	320.0 ± 6.4
	低剂量组	268.3 ± 6.8	296.8 ± 6.7	324.9 ± 6.9
	中剂量组	264.0 ± 7.1	292.4 ± 7.5	320.7 ± 7.2
	高剂量组	262.7 ± 5.8	291.4 ± 5.5	319.5 ± 5.7
破损皮肤	空白组	267.1 ± 5.8	295.6 ± 6.1	323.5 ± 6.2
	低剂量组	269.7 ± 7.0	298.2 ± 6.8	326.3 ± 7.3
	中剂量组	264.5 ± 6.1	293.6 ± 7.0	321.3 ± 6.2
	高剂量组	263.4 ± 6.0	292.1 ± 5.8	321.2 ± 5.4

应,破损皮肤处结痂正常,且未见死亡。各组豚鼠用药前及用药后7,14 d的体质量均无显著差异($P > 0.05$),结果见表1。

2.2 皮肤致敏试验

致敏后72 h,桑白皮组豚鼠未出现局部皮肤红斑、水肿或站立不稳、呼吸困难和过敏性休克等全身性症状,其致敏反应各项评分均为0分(致敏率为0);阳性对照组致敏后0,24,48,72 h时的平均分分别为1.8分、2.0分、1.2分、1.0分,致敏率为100%,结果见表2和图1。

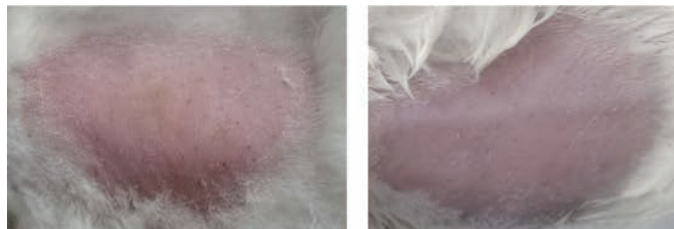
表2 各组豚鼠皮肤致敏试验结果比较

Tab.2 Results of skin sensitization test of guinea pigs in each group

组别	平均分(分)				致敏率 (%)	致敏强度
	0 h	24 h	48 h	72 h		
空白组	0	0	0	0	0	无致敏性
阳性对照组	1.8	2.0	1.2	1.0	100	极度致敏性
桑白皮组	0	0	0	0	0	无致敏性

2.3 皮肤刺激性试验

单次给药4 h后,完整皮肤桑白皮组和破坏皮肤桑白皮组试验兔1,24,48,72 h内均未出现红斑、焦痂或水肿,皮肤形态与相应空白组相同(见图2),单次与多次皮肤刺激性试验中,两组皮肤过敏反应评分均为0,表明其皮肤刺激强度均为无刺激性。详见图3。

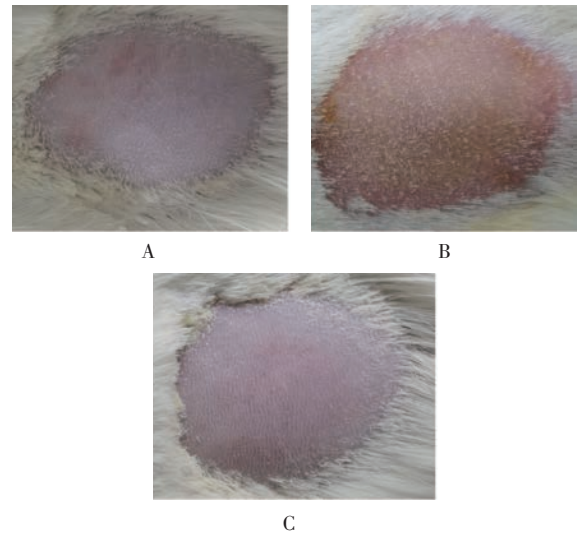


A. 完整皮肤空白组 B. 完整皮肤桑白皮组 C. 破损皮肤空白组 D. 破损皮肤桑白皮组

图3 试验兔多次给药皮肤刺激性试验72 h观察结果

A. Intact skin - blank group B. Intact skin - Mori Cortex group C. Damaged skin - blank group D. Damaged skin - Mori Cortex group

Fig.3 Results of multiple-dose skin stimulation test for 72 h in test rabbits

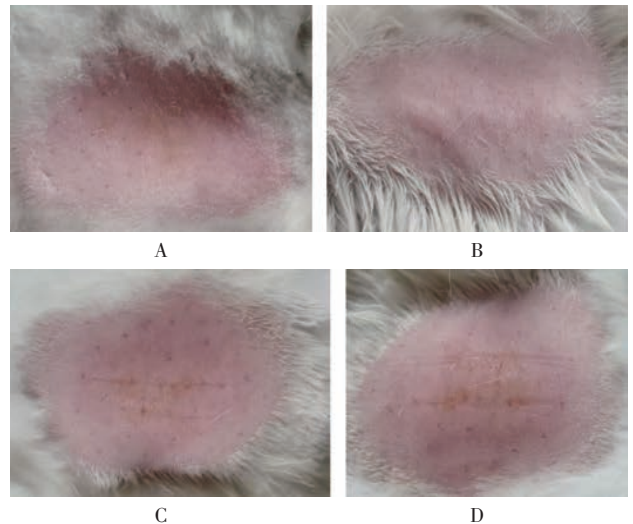


A. 空白组 B. 阳性对照组 C. 桑白皮组

图1 豚鼠皮肤致敏试验72 h观察结果

A. Blank group B. Positive control group C. Mori Cortex group

Fig.1 Results of guinea pigs' skin sensitization test for 72 h



A. 完整皮肤空白组 B. 完整皮肤桑白皮组

C. 破损皮肤空白组 D. 破损皮肤桑白皮组

图2 试验兔单次给药皮肤刺激性试验72 h观察结果

A. Intact skin - blank group B. Intact skin - Mori Cortex group

C. Damaged skin - blank group D. Damaged skin - Mori Cortex group

Fig.2 Results of single-dose skin stimulation test for 72 h in test rabbits