

3 种植物源表面活性剂的提取及其安全性研究

张晶¹, 董银卯^{1*}, 孟宏², 宋杰¹

(1. 北京工商大学, 北京 100048; 2. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 研究皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷 3 种天然非离子植物源表面活性剂在化妆品领域运用的安全性。**方法:** 以乙醇作为提取剂对简单处理过的 40 目皂荚粉、茶籽粉和无患子粉进行粗提。通过红细胞溶血实验中 50% 溶血浓度 (HC₅₀)、蛋白变性指数 (DI) 及 HC₅₀/DI (L/D) 3 个参数对皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷进行安全性评估, 同时与化妆品中常用的表面活性剂十二烷基醇醚硫酸铵 (AESA) 进行比较。**结果:** 3 种天然表面活性剂中, 无患子皂苷产率和实际含量最低。3 种天然表面活性剂 HC₅₀ 均低于 50 mg·L⁻¹, 且刺激性高于 AESA, 其中, 无患子皂苷刺激性最强。眼刺激分级, 3 种提取物 L/D 值均 < 1, 属于刺激性物质。**结论:** 无患子皂苷生产成本比另外 2 种表面活性剂高。且这 3 种天然表面活性剂刺激性均较强, 运用到化妆品时, 应严格控制其添加量, 以降低其刺激性的影响。

[关键词] 表面活性剂; 皂苷; 溶血作用; 化妆品原料安全性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0274-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070274

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130123.1529.003.html>

[网络出版时间] 2013-01-23 15:29

Extract of Three Surfactants from Plants and Study on Safety of the Extract

ZHANG Jing¹, DONG Yin-mao^{1*}, MENG Hong², SONG Jie¹

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. Institute of Acupuncture and Moxibustion China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the safety of three surfactants from plants, gleditsia saponin, tea saponin and sapindus saponin, in the field of cosmetics. **Method:** After simple pre-treatment, ethanol used as the extraction agent, 40 mesh-powders from Gleditsia sinensis, tea-seed cake and sapindus mukorossi were extracted respectively. Compared with ammonium alcohol ether sulphat (AESA) which was commonly used in the cosmetics, the 50% hemolytic dosage (HC₅₀), protein denaturation index (DI), and the ratio of HC₅₀/DI (L/D) in hemolysis test were measured to evaluate the safety of leditsia saponin, tea saponin and sapindus saponin. **Result:** The yield and the real content of sapindus saponin among three surfactants were the lowest. HC₅₀ of gleditsia saponin, tea saponin and sapindus saponin were all lower than 50 mg·L⁻¹, which meant the saponins had stronger irritation than AESA, and the HC₅₀ value of sapindus saponin was the minimum. L/D value of the saponins was less than 1. By eye irritation classification, it showed that three surfactants from plants belonged to the irritating substance. **Conclusion:** The production cost of sapindus saponin was the highest among three saponins. Considering the strong irritation of the three surfactants from plants, the amount of them should be strictly controlled to decrease the irritation when applied as cosmetics.

[Key words] surfactants; saponin; hemolysis; the safety of cosmetic raw material

[收稿日期] 20121008(549)

[第一作者] 张晶, 硕士研究生, Tel: 15652708410, E-mail: zhangjing_btbu1989@163.com

[通讯作者] * 董银卯, 教授, 从事植物源化妆品功能成分开发与功效检测的研究, Tel: 010-68984917, E-mail: ymdong2008@163.com

皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷是非常优良天然非离子表面活性剂,其原料来源广,具有可再生性。这3种物质作为表面活性剂除了具有较好的去污、起泡性能外,还具有各自独特的优点。皂荚皂苷具有消炎抗菌、抗过敏功效^[1],茶皂素具有相当好的乳化、分散、抗渗和镇痛等性能^[2],而无患子皂苷具有良好的抗菌、杀菌、消炎功效和去屑止痒功效^[3]。

随着绿色环保趋势的发展,皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷开始受到广泛的关注和研究,除了用于常见的洗涤剂外,还开始应用于化妆品、医药^[4]等领域中。而化妆品作为直接接触皮肤的日常用品,其原料的安全性尤为重要。目前,对皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷作为化妆品原料的安全性还少有系统的研究。红细胞溶血实验作为一种简单、快速的 Draize 眼刺激试验的一种体外替代方法,主要用于表面活性剂以及含有表面活性剂产品眼刺激性评价^[5]。因此,本文利用红细胞溶血实验中半溶血率和蛋白质变性2项指标对这3种植物源表面活性剂进行安全性评估,为其在化妆品领域的应用安全性提供一定的理论基础。

1 材料

1.1 样品与试剂 皂荚,安国市御颜坊中药材有限公司;无患子,安国市御颜坊中药材有限公司;茶籽饼,浙江省遂昌县金竹镇;TS2106型茶皂素,质量分数>50%,浙江东方茶业科技有限公司;天然无患子皂苷粉,质量分数>75%,广州荣健贸易发展有限公司;十二烷基醇醚硫酸铵(AESA),纯度70%,科宁化工中国有限公司;无水乙醇、石油醚,均为市售分析纯,北京化工厂;磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、葡萄糖、柠檬酸三钠、柠檬酸,均为市售分析纯,北京化学试剂公司;十二烷基硫酸钠(SDS),市售分析纯,美国Sigma公司;新鲜兔血,北京海淀区兴隆实验动物养殖厂。

1.2 仪器 DL-101-1BS型电热鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司),KQ-400KBD型高功率数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司),SHZ-D型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),RE-2000型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),4KBTXL型冷冻干燥机(美国Vir Tis公司),Primo Star生物显微镜(德国卡尔蔡司公司),FMe-100B型摇床(上海福玛实验设备有限公司),4K15型冷冻离心机(美国Sigma公司),MKGO型酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 皂荚皂苷粗品制备^[6] 将皂荚100g粉碎过40目筛,40℃烘干24h备用。称取30g皂荚粗粉,按料液比1:10加入300mL水,于45℃浸泡12h。以100kHz频率的超声波处理30min,趁热抽滤。将滤液减压浓缩得浸膏,加入10倍体积70%乙醇,溶解液于4000r·min⁻¹离心10min,弃去沉淀,上清液减压蒸馏回收70%乙醇,重复纯化3次,得淡黄色皂苷黏稠液体。真空冷冻干燥得淡黄色固体。称量并计算得率。

2.2 茶皂素粗品制备^[7] 将茶籽饼放入45℃烘箱中烘24h,粉碎过40目筛。称取磨碎的茶籽饼20g左右,置于250mL磨口三角烧瓶中,加入120mL石油醚,50℃左右回流1h,去茶油,过滤。残渣用相同方法再浸提1次,过滤。按液固比16mL·g⁻¹加入95%乙醇溶液,提取温度为80℃,提取3h。将提取液趁热过滤,并用95%乙醇溶液分2次洗涤残渣。将滤液于75℃左右浓缩至黏稠状。冷冻干燥。称量并计算得率。

2.3 无患子皂苷粗品制备^[8] 取500g无患子放入45℃干燥箱中烘24h。称取30g无患子粉末,按料液比1:10加入300mL蒸馏水,在45℃下浸泡,每3h换1次水,共浸泡4次,抽滤,得布氏漏斗中的固体。用滤纸将上步得到的固体包裹后放入索氏提取管中,用95%乙醇在93℃的水浴中初步提取。待虹管中流下的液体基本为无色后,停止蒸馏,得到乙醇提取液。对提取液浓缩,得黏稠液体。冷冻干燥,称量并计算得率。

2.4 红细胞溶血实验

2.4.1 各缓冲液及测试样品的制备 柠檬酸缓冲液的配制:柠檬酸三钠:柠檬酸66:44mmol·L⁻¹,超纯水配制。该缓冲溶液用于血液抗凝。磷酸盐缓冲液(PBS)的配制:Na₂HPO₄22.2mmol·L⁻¹,KH₂PO₄5.6mmol·L⁻¹,C₆H₁₂O₆10mmol·L⁻¹,NaCl123.3mmol·L⁻¹,超纯水配制,4℃保存。使用10%NaOH调至pH7.4。PBS用于溶解或稀释样品。SDS溶液配制:用PBS缓冲液溶解SDS,配制成0.1%质量浓度,用于测试SDS溶液标准曲线。样品配制:用PBS缓冲液分别溶解AES铵盐、皂荚皂苷粗品、茶皂素粗品、无患子皂苷粗品、市售茶皂素、市售无患子皂苷,配制成0.1%质量浓度。

2.4.2 红细胞悬液的制备 按1:9比例向新鲜抽取的兔血中加入抗凝剂柠檬酸缓冲液,立即混匀。将新鲜兔血放入聚乙烯无菌离心管中,3000r·

min⁻¹, 室温离心 15 min。吸弃上清液。用 PBS 缓冲液混洗 RBC, 重复 2 次, 得红细胞悬液。镜下计数后, 用 PBS 调整红细胞密度约为 5 × 10⁸ 个/mL。

2.4.3 溶血实验 在 EP 管中分别按照 10, 20, 30...100 μL 等浓度梯度加入 0.1% SDS, 再加入 PBS 补齐至 975 μL。以超纯水作为阳性对照, 以 PBS 缓冲液作为阴性对照。迅速加入 25 μL RBC 悬液。在室温下以 180 r·min⁻¹ 孵育 10 min。室温 10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min。用酶标仪测量 (530 nm) 吸光度 (A)。按公式计算溶血率。并确定刺激物引起红细胞发生 50% 溶血时的浓度 (HC₅₀)。

$$\text{溶血率} = \frac{(\text{样品 } A_{530 \text{ nm}} - \text{阴性 } A_{530 \text{ nm}})}{(\text{阳性 } A_{530 \text{ nm}} - \text{阴性 } A_{530 \text{ nm}})} \times 100\%$$

样品的溶血操作步骤与 0.1% SDS 相同。

2.4.4 蛋白质变性试验 测试样品和 PBS 以 100 μL:875 μL 加入 EP 管中。迅速加入 25 μL RBC, 在室温下以 180 r·min⁻¹ 孵育 10 min。室温 10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min。用酶标仪测量 540 nm, 570 nm 下的溶血 A。按公式计算血红蛋白变性指数 (DI, %)。R 为 575 nm 测量的 A 与 540 nm 测量的 A 的比值。

$$R = A_{575 \text{ nm}} / A_{540 \text{ nm}}$$
$$DI = (R_{\text{阴性对照}} - R_{\text{样品}}) / (R_{\text{阴性对照}} - R_{\text{阳性对照}}) \times 100\%$$
$$L/D = HC_{50} / DI$$

根据 L/D 值推断出产品的刺激性, 其中, L/D > 100、10 < L/D ≤ 100、1 < L/D ≤ 10、0.1 < L/D ≤ 1 和 L/D < 0.1 分别表示无刺激性、轻微刺激性、中等刺激性、刺激性和强刺激性。

3 结果

3.1 样品提取得率 3 种植物源表面活性剂中, 皂荚皂苷得率最高, 为 46.3% (13.89/30 g), 茶皂素得率次之, 为 23.8% (4.76/20 g) 无患子皂苷含量最低, 为 1.7% (0.34/20 g)。而实际皂荚中皂荚皂苷含量为 15% ~ 30%^[6], 茶粕中茶皂素含量为 10% ~ 20%^[10], 无患子中无患子皂苷含量为 4%^[11]。可见, 得率与植物中实际表面活性剂含量基本趋势一致。

3.2 样品对红细胞溶血作用

3.2.1 RBC 完整性分析 根据溶血率-SDS 浓度关系曲线, 从中得到 50% 溶血率的 HC₅₀, 即 SDS 诱导 50% 的红细胞的裂解浓度。随着 SDS 质量浓度的增加, 红细胞溶血现象明显, 溶血率增加, SDS 增加到 100 mg·L⁻¹ 时, 红细胞溶血率达到 100%, SDS 的 HC₅₀ 约为 50 mg·L⁻¹。由此可知, 红细胞具有良好

的完整性, 可以进行后续试验。见图 1。

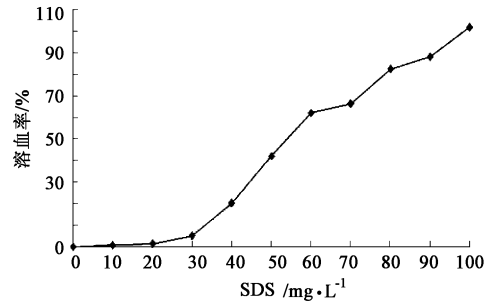


图 1 SDS 质量浓度与红细胞溶血率关系

3.2.2 样品对红细胞溶血作用 AESA 是常见的化妆品表面活性剂添加剂, 通过与 AESA 进行对比, 评估植物源表面活性剂添加到洗发护发化妆品中的安全性。考虑到提取物中有效成分含量未知, 因此, 除了粗提物外, 选用已知纯度的样品, 以降低样品纯度对实验结果的影响, 提高整体安全性评估的可靠性。

相同添加量下, AESA 溶血率最低, HC₅₀ 约为 58 mg·L⁻¹, 添加量达到 90 mg·L⁻¹ 时接近 100% 溶血。而 3 种皂苷类表面活性剂的 HC₅₀ 均低于 50 mg·L⁻¹。可知, 植物源表面活性剂的溶血作用比常用的化妆品表面活性剂 AESA 强。

无患子皂苷刺激性最大, 无论是市售样品还是自提粗品, HC₅₀ 均 < 25 mg·L⁻¹, 添加量为 30 mg·L⁻¹ 时, 溶血率已达到 100%。纯度为 50% 的市售茶皂素和皂荚皂苷粗品整个溶血率趋势相近, HC₅₀ 在 30 mg·L⁻¹ 左右, 茶皂素粗品 HC₅₀ 为 25 mg·L⁻¹, 添加量为 60 mg·L⁻¹ 左右时溶血率达到 100%。见图 2。

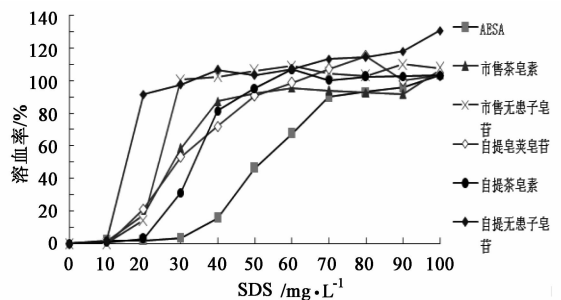


图 2 样品质量浓度与红细胞溶血率关系

3.2.3 眼刺激性分析 根据样品浓度与红细胞溶血率关系曲线得出的 HC₅₀ 和利用公式计算的血红蛋白变性指数 DI (%), 确定 L/D。根据 L/D 对样品进行眼刺激分级。L/D 越小, 刺激性越大。所测样品 L/D 均 < 1, 分级均为刺激性。其中, AESA 刺激

性最弱,无患子皂苷刺激性最大,蛋白质变性结果与 HC_{50} 结果一致。见表1。

表1 各种样品眼刺激参数比较

受试物	HC_{50} /mg·L ⁻¹	DI /%	L/D
AES 铵盐	52	109.55	0.47
自提皂荚皂苷粗品	29	118.26	0.25
市售茶皂素	28	114.52	0.24
自提茶皂素粗品	34	99.04	0.34
市售无患子皂苷	24	104.25	0.23
自提无患子皂苷粗品	13	102.46	0.13

4 讨论

皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷眼刺激性强于常用化妆品表面活性剂 AESA,其中以无患子皂苷的刺激性最强。

大多数皂苷类物质会造成较强的红细胞溶血作用^[12],可能是因为皂苷与细胞膜上的胆甾醇结合,生成复合物,导致细胞膜内渗透压增大,从而导致红细胞破裂^[13]。但也有研究表明,皂苷与胆固醇脂质的磷脂双分子层结合,导致细胞膜渗透性改变,导致细胞质外渗,最终使整个红细胞解体^[14]。

皂荚皂苷、茶皂素和无患子皂苷属于齐墩果烷型五环三萜类皂苷^[15-17],国外研究表明^[18],单糖链皂苷比双糖链皂苷具有更强的溶血作用,且溶血作用随着糖链的增长而减弱。皂荚皂苷是双糖链皂苷,茶皂素和无患子皂苷属于单糖链皂苷,并且茶皂素的单链上有4个糖分子,而无患子皂苷仅有2个。因此,从化学结构上来看,三者的溶血作用依次为无患子皂苷>茶皂素>皂荚皂苷,与本试验结果基本吻合。

在3种植物源表面活性剂中,无患子皂苷产率和实际含量远低于皂荚皂苷和茶皂素而造成较高的生产成本,一定程度上限制了无患子皂苷的应用。考虑到其刺激性和开发应用的需求,这3种天然表面活性剂可作为辅助表面活性剂复配到表面活性剂体系中,改善化妆品性能和用途,但应注意要严格控制其添加量。

[参考文献]

[1] 李莹桥. 山皂荚皂苷的提取工艺及其表面活性剂的

性能分析[D]. 吉林:吉林农业大学,2011.

- [2] 张颂培,王华,黄文飞. 茶皂素及其在日用洗护品中的应用[J]. 中国茶叶,2009(6):4.
- [3] 孙洁如,陈孔常,周鸣方,等. 无患子表面活性物及其复配体系的性质研究[J]. 日用化学工业,2002,32(4):16.
- [4] 孙立,龙子江,张道福,等. 无患子皂苷对大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):110.
- [5] 程树军,焦红. 实验动物替代方法原理与应用[M]. 北京:科学出版社,2010:303.
- [6] 刘英翠. 运用超声法提高皂荚皂甙浸出率的研究[J]. 山西林业科技,2009,38(1):18.
- [7] 李敏,王承明. 油茶籽粕中茶皂素的提取工艺研究[J]. 中国粮油学报,2011,26(5):38.
- [8] 饶厚曾,桑成涛. 微波萃取法提取无患子皂苷工艺[J]. 辽宁石油化工大学学报,2006,26(4):70.
- [9] ECVAM. ECVAM DB-ALM; INVITOX Protocol, Red blood cells test system [S]. INVITOX No37. Ispra, Italy: ECVAM,1994.
- [10] 陈莹,刘松柏,何良兴,等. 油茶籽粕和茶皂素中皂苷的定量检测方法研究[J]. 中国粮油学报,2012,27(2):105.
- [11] 段纪东,张鹏,武士威,等. 无患子提取物的泡沫性能研究[J]. 辽宁化工,2007,36(9):595.
- [12] 张国松,封传华,罗晓健,等. 柴胡总皂苷提取物体外溶血作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):166.
- [13] 黄宝山,宋纯洁. 皂苷的化学与生物活性[J]. 国外医药:植物药分册,1982(4):204.
- [14] Mei Hu, Keiichi Konoki, Kazuo T achibanan. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1299: 252.
- [15] 张春霞,李圣强,周罗栗娅,等. 天然表面活性剂皂荚皂甙的性能与应用[J]. 郑州轻工业学院学报,1993,8(2):56.
- [16] 刘红,田晶. 茶皂甙的化学结构及生物活性最新研究进展[J]. 食品科技,2008(5):186.
- [17] 张静. 天然无患子总皂苷分离纯化的研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2010.
- [18] 孔令义. 三萜皂苷的药理研究进展[J]. 国外医药:植物药分册,1990,5(1):4.

[责任编辑 何伟]