

霍山石斛多糖吸湿保湿性能及皮肤刺激性研究

谷仿丽^{1,2*}, 姜雪萍^{1,2}, 陈艳君^{1,2}, 韩邦兴^{1,2}, 陈乃富^{1,2}, 韦传宝^{1,2}

¹皖西学院生物与制药工程学院;²安徽省石斛协同创新工程技术研究中心,六安 237012

摘要:为探讨霍山石斛多糖吸湿保湿性能及皮肤刺激性,应用干燥器控制湿度对霍山石斛多糖进行体外吸湿(43%、81%)和保湿性能研究,应用皮肤水分测定仪对霍山石斛多糖进行人体皮肤保湿性能研究,应用家兔正常皮肤和破损皮肤进行霍山石斛多糖皮肤刺激性研究。结果显示:霍山石斛多糖体外吸湿率随环境湿度的升高而升高,相对湿度43%、81%的吸湿率强弱为丙三醇>霍山石斛多糖>壳聚糖>海藻酸钠;体外的保湿强弱为壳聚糖>霍山石斛多糖>海藻酸钠>丙三醇,霍山石斛多糖在涂抹后6、8、12 h的人体皮肤保湿率显著高于丙三醇保湿率,12 h显著高于海藻酸钠保湿率,与壳聚糖保湿率无显著性差异;家兔正常皮肤及破损皮肤刺激值小于0.5。表明霍山石斛多糖具有一定的吸湿保湿性能,且无皮肤刺激性,具有开发为天然保湿剂的潜能。

关键词:霍山石斛;多糖;吸湿;保湿;皮肤刺激性

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.007

Study on Moisture-absorption-retention Capacity and Skin Irritation of Polysaccharide from *Dendrobium huoshanense*

GU Fang-li^{1,2*}, JIANG Xue-pin^{1,2}, CHEN Yan-jun^{1,2}, HAN Bang-xing^{1,2}, CHEN Nai-fu^{1,2}, WEI Chuan-bao^{1,2}

¹Dept of Biological and Pharmaceutical Engineering, West of Anhui University; ²Anhui Province

Collaborative innovation of Dendrobium engineering technology research center, LiuAn 237012, China

Abstract: In order to explore moisture-absorption retention capacity and skin irritation of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense*, the properties of moisture-absorption (43%, 81%) retention of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* are studied *in vitro* by controlling the relative humidities of the desiccator, and studied *in vivo* by skin moisture meter, then the skin irritation of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* studied by using normal and damaged skin of rabbits. The results discover that moisture-absorption (43%, 81%) of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* increase with the increase of environmental humidity, the sequence of the moisture absorption rate with the relative humidity of 43% and 81% is as follows: Glycerol > *Dendrobium huoshanense* polysaccharide > chitosan > sodium alginate; the sequence of *in vitro* moisture content is as below: chitosan > *Dendrobium huoshanense* polysaccharide > sodium alginate > glycerol. After smearing *Dendrobium huoshanense* polysaccharide for 6 h, 8 h and 12 h, the moisture retention rate of human skin is significantly higher than that of glycerol, the moisture retention rate of human skin for 12 h is significantly higher than that of sodium alginate and is not significantly different from that of chitosan; the stimulus value of normal skin and damaged skin of rabbits is less than 0.5, indicating that *Dendrobium huoshanense* polysaccharide has a certain moisture absorption and moisturizing performance but no skin irritation, and they boast the potential of being developed into natural moisturizer.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; polysaccharose; moisture-absorption capacity; moisture-retention capacity; skin irritation

安徽霍山因特殊的地理位置及气候条件,分布有3个石斛品种,分别为霍山石斛(又称米斛)、铁

皮石斛、铜皮石斛,其中霍山石斛为道地药材。现代研究表明,霍山石斛含有多糖、石斛碱、蛋白质以及人体必需的7种氨基酸,具有抗菌、抗炎、抗衰老、抗氧化、增强免疫等作用^[1]。

保湿是保持皮肤健康、延缓衰老的重要条件^[2]。研究表明,生物性多糖能够以氢键的形式与水结合^[3],在皮肤表面形成“锁水膜”防止皮肤水分

收稿日期:2018-03-09 接受日期:2018-05-23

基金项目:安徽省教育厅高校优秀人才重点项目(gxyqZD2016251);安徽省教育厅自然科学基金重大项目(KL2015ZD43);安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KL2015A454, KL2016A887)

*通信作者 Tel:86-564-3305033; E-mail: gfl0127@163.com

流失,达到持久保湿效果^[4],同时又具有营养功效^[5]。

金钗石斛属于石斛中一种,研究表明其水提取物与几种常用的保湿剂比较,保湿性能仅次于小分子透明质酸,优于神经酰胺、海藻酸钠、芦荟凝胶提取物、银耳提取物,表现出较好的保湿性能^[6]。霍山石斛的主要活性成分为水溶性的多糖类物质,粗多糖含量高达20%以上^[7],但目前尚无其吸湿保湿性能的研究报道。因此,本课题组拟探讨霍山产霍山石斛多糖的吸湿保湿性能及皮肤刺激性,为霍山石斛开发应用打下基础。

1 材料

1.1 药品及试剂

霍山石斛采于皖西学院石斛种植基地。丙三醇,无水碳酸钠,由天津市北辰方正试剂厂生产;壳聚糖,由山东卫康生物科技有限公司生产;海藻酸钠,由上海申夏生物化工有限公司生产;无水硫酸铵,由西陇化工股份有限公司生产;以上试剂均为分析纯。硅胶,由青岛麦克硅胶干燥剂有限公司生产。

1.2 动物

日本大耳白家兔,3月龄,体重2~2.5 kg,雌雄各半,购自南京医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK(苏)2002-0031。

1.3 仪器

XL-2B型粉碎机(旭朗机械设备有限公司,广州),JA-B型电子分析天平(精科实业有限公司,上海),RE-52A型旋转蒸发器(亚荣生化仪器厂,上海),皮肤水分测试仪(可奈雅科技有限公司,深圳),玻璃干燥器(蜀玻有限公司,四川)。

2 方法

2.1 霍山石斛多糖的制备及含量测定

将霍山石斛干燥至恒重,粉碎,以固液比1:8、温度80℃水提两次,合并提取液减压浓缩,加入95%乙醇,使达总提取液的80%,4℃冰箱放置24 h,4 000转离心10 min,取沉淀物干燥,sevag法去蛋白,再次醇沉,烘干得粗多糖。

依据文献^[7],采用苯酚-硫酸法测定多糖含量。

2.2 霍山石斛多糖吸湿性的测定

在20℃左右的室温下,准确称取烘干至恒重的霍山石斛多糖及壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠三份各

0.5 g分别放入培养皿中,随之分别放置在有饱和碳酸钠溶液(RH为43%)、饱和硫酸铵溶液(RH为81%)的12个干燥器中,并于放置后2、4、8、12、24、48、72 h称重,计算三份样品质量的平均值。按公式(1)计算吸湿率:

$$\text{吸湿率} = [(m_n - m_0) / m_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中 m_0 和 m_n 分别为放置前、后样品的质量。

2.3 霍山石斛多糖保湿性的测定

2.3.1 霍山石斛多糖体外保湿性的测定

在20℃左右的室温下,准确称取烘干至恒重的霍山石斛多糖及壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠三份各0.5 g分别放入培养皿中,精确量取0.2 mL去离子水加入上述样品中,轻轻晃动,使样品充分吸收水分,放置于装有干硅胶的干燥器内,分别于放置后2、4、8、12、24、48、72 h称重,计算平均值。按公式(2)计算保湿率:

$$\text{保湿率} = (H_n / H_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中 H_0 和 H_n 分别为放置前、后的水分质量。

2.3.2 霍山石斛多糖人体皮肤保湿性的测定

在人体手臂内侧皮肤同一部位划分四个区域,分别涂抹霍山石斛多糖及壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠四组水溶液,用皮肤水分测试笔^[8]分别测定涂抹前、涂抹后0、0.5、1、2、4、6、8、12 h,按公式(3)计算保湿率^[9]:

$$\text{保湿率} = \text{涂抹后含水量} / \text{涂抹前含水量} \quad (3)$$

2.4 霍山石斛多糖对家兔的刺激性实验

选择健康日本大耳白家兔24只,雌雄各半,根据性别随机分为4组:完整皮肤对照组、霍山石斛多糖完整皮肤组、破损皮肤对照组和霍山石斛多糖破损皮肤组。于试验前24 h,剪去家兔背部脊柱两侧的毛(每侧约3 cm × 3 cm,无红斑、水肿及破损)。采用无菌针头在脱毛且消毒的皮肤上划“#”字形至渗血,作为破损皮肤。完整皮肤对照组和破损皮肤对照组于左侧脱毛处涂0.3 mL空白基质,完整皮肤给药组和破损皮肤给药组于左侧脱毛处涂多糖溶液0.3 mL。给药24 h用温水洗净受试物,根据化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则评分。再涂布相同的受试药物,每日于同一时间给药1次,连续7天,观察脱毛区皮肤的刺激程度。红斑通过观察,水肿通过轻轻触摸来评分。刺激分值评价^[10]:刺激分值 = (红斑反应总分 + 水肿反应总分) / 动物只数。评分标准如表1。

表 1 皮肤刺激性评分标准

Table 1 Evaluation standards of skin irritation

评分指标 Grading index	无 Nothing	轻度 Light	中度 Moderate	重度 Severe
红斑 Erythema	0	1	2	3
水肿 Edema	0	1	2	3
刺激 Stimulus	<0.5	0.5 ~ <2	2 ~ <6	≥6

2.5 数据处理方法

用 SPSS 13.0 软件统计处理数据,采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果与分析

3.1 霍山石斛多糖的吸湿性

3.1.1 在相对湿度 RH43% 环境中的吸湿性

在 RH43% 的环境中,霍山石斛多糖、壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠吸湿率随时间的变化如图 1 所示。从图 1 可以看出,在 0 ~ 72 h 内的吸湿率大小为丙三醇 > 霍山石斛多糖 > 壳聚糖 > 海藻酸钠。霍山石斛多糖在 0 ~ 12 h 吸湿率上升较快,达到 35.4%,12 h 后吸湿率上升缓慢,至 72 h 分别达到 42.3%。丙三醇的吸湿率最大,72 h 达到 75.6%,但丙三醇受环境湿度影响较大,当空气干燥时会从皮肤中吸收水分,造成皮肤损伤^[11]。化妆品的使用时间一般不超过 12 h,霍山石斛多糖 12 h 吸湿速率优于壳聚糖 20.7%、海藻酸钠 17.8%,表明霍山石斛多糖具有开发为吸湿性保湿剂的潜能。

3.1.2 在相对湿度 RH81% 环境中的吸湿性

在 RH81% 的环境中,霍山石斛多糖、壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠吸湿率随时间的变化如图 2 所示。从图 2 可以看出,72 h 时的吸湿率大小顺序仍为丙三醇 > 霍山石斛多糖 > 壳聚糖 > 海藻酸钠,每个时间点的吸湿率均随环境湿度的增大明显高于在 RH43% 环境中的吸湿率,表明霍山石斛多糖的吸湿率会随着环境相对湿度的上升而增加,与其他三种常用保湿剂规律一致。

3.2 霍山产霍山石斛多糖的保湿性

3.2.1 霍山石斛多糖体外保湿性

在干硅胶环境中,霍山石斛多糖、壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠吸湿率随时间的变化如图 3 所示。从图 3 可以看出,72 h 几种保湿剂的保湿率顺序为:壳聚糖 > 霍山石斛多糖 > 海藻酸钠 > 丙三醇,各样品

的保湿率均持续下降,其中丙三醇的下降速度最快,验证了其随环境湿度下降而保湿率急剧下降的特点;霍山石斛多糖保湿率在 0 ~ 8 h 期间,保湿率大于 50%,与壳聚糖接近,优于海藻酸钠、丙三醇。

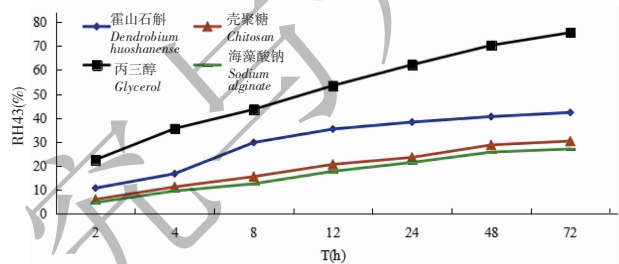


图 1 各样品相对湿度 43% 的吸湿

Fig. 1 Moisture absorption of each sample in RH43%

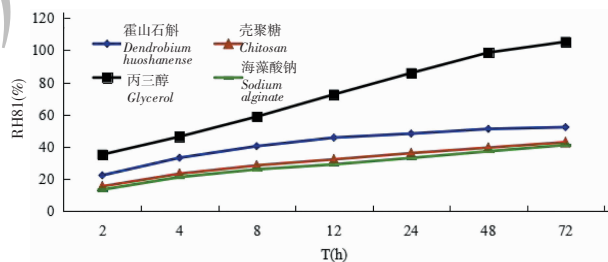


图 2 各样品相对湿度 81% 的吸湿率

Fig. 2 Moisture absorption of each sample in RH81%

3.2.2 霍山石斛多糖人体皮肤保湿性

在人体皮肤保湿性实验中,霍山石斛多糖、壳聚糖、丙三醇、海藻酸钠吸湿率随时间的变化如图 4 所示。从图 4 可以看出,在 12 h 内,各样品的保湿率均持续下降,在人体皮肤保湿率顺序为:壳聚糖 > 霍山石斛多糖 > 海藻酸钠 > 丙三醇,霍山石斛多糖人体皮肤保湿率在涂抹后 6、8、12 h 显著高于丙三醇保湿率,显著高于海藻酸钠 12 h 保湿率,与壳聚糖 12 h 保湿率无显著性差异,表明霍山石斛多糖保湿性良好。

3.3 霍山石斛多糖对家兔皮肤的刺激性

单次、多次涂抹家兔正常皮肤、破损皮肤霍山石

斛多糖溶液均未发现红斑、水肿,刺激值小于0.5,依据皮肤刺激值评分标准(表1)表明霍山石斛多糖对皮肤无刺激性。

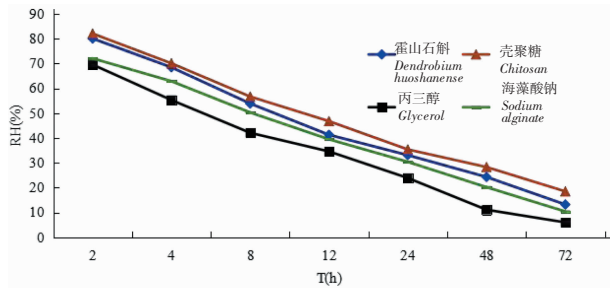


图3 各样品在硅胶环境中的保湿率

Fig. 3 Moisture retention of each sample in silica gel environment

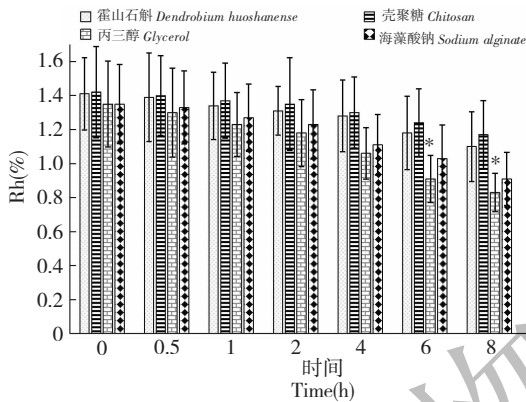


图4 各样品在体保湿率

Fig. 4 Moisture retention of each sample in vivo

注: * $P < 0.05$ v 霍山石斛。

Note: * $P < 0.05$ v *Dendrobium huoshanense*.

4 结论

皮肤是人体的第一道屏障,而角质层是这道屏障的关键部位,能有效阻止外来物质的侵入及皮肤水分、营养物质的流失^[12]。随着年龄的增加,角质层中自身保湿因子减少,水合能力下降,因而出现皮肤松弛、干燥、脱屑、细小皱纹等现象^[13]。应用吸湿保湿剂涂抹皮肤,可使皮肤水含量上升^[14],达到保护皮肤、延缓衰老的作用。

理想的保湿剂需要具有以下特质:保湿吸湿性好,匹配度广,安全无刺激^[13]。目前常用的保湿剂主要有传统保湿剂和天然保湿剂,传统的保湿剂大多是合成的多元醇类保湿剂,如丙三醇、丙二醇等,这类保湿剂吸湿性强,受环境湿度影响较大,当空气干燥时,会从皮肤中吸收水分,造成皮肤损伤^[11];天

然保湿剂主要有植物多糖、氨基酸、胶原蛋白、神经酰胺等,通过在皮肤表面形成“锁水膜”减少经皮水分流失、促进皮肤屏障功能的修复、促进水通道蛋白AQP3的表达、抑制皮肤透明质酸酶活性从而达到保湿作用,且安全无刺激,因而,具有较好的应用前景^[4,14]。已有研究证实麦冬多糖、燕麦多糖、芦荟多糖、茯苓多糖等具有较好的保湿性,添加入化妆品中起到了良好的保湿效果^[4]。

本课题体外用经典的重量法、体内应用无损的水分测定仪^[13]对霍山石斛多糖保湿性能进行了研究,发现随着环境湿度的增大,霍山石斛多糖吸湿性随之增大,并呈现在0~12 h内吸湿率上升迅速的特点,优于壳聚糖及海藻酸钠;霍山石斛多糖的保湿性能较好,在0~8 h的保湿率与壳聚糖相近。虽然霍山石斛多糖的吸湿性不及丙三醇,保湿性不及壳聚糖,但具有较稳定的吸湿及保湿效果,且对正常及损伤皮肤均无刺激性,并能提供给肌肤营养物质。因此,霍山产霍山石斛多糖作为保湿剂具有较好的应用前景。

参考文献

- Si HY(司华阳), Chen ND(陈乃东), Chen NF(陈乃富), et al. Review on isolation and pharmacological activities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28:467-470.
- Huang RC(黄仁术), Gu FL(谷仿丽), He XM(何晓梅), Study on moisture-absorption and moisture-retention capacity of polysaccharose from the *Fagopyrum dibotrys* [J]. *New chem mater*(化工新型材料), 2014, 42:141-142.
- Wu YY(吴燕燕), Zhang W(张婉), Li LH(李来好), et al. Analysis of the moisture-absorption and moisture-retention properties of MAAs from *Gloiopeltis furcata* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28:1199-1206.
- Li CZ(李楚忠), Gao HJ(高红军), Cong CL(丛琳). Application of natural plant moisturizer in skin care [J]. *Deter & Cos*(日用化学品科学), 2014, 38(7):24-26.
- Gao RY(高瑞英), Zhang XY(张秀宇), Mu D(慕丹), et al. Evaluation the moisture-absorption and moisture-retention properties of biologically active polysaccharide used in cosmetics including hyaluronic acid Etc [J]. *Guangdong chem ind*(广东化工), 2009, 36:230-232.
- Gui YH(桂雨豪), Meng X(孟潇), Liang YM(梁绮梅), et al. Study on moisturizing performance of several commonly used moisturizing ingredients [J]. *Detergent & Cosmetics*(日

- 用化学品科学), 2017, 40(10): 22-25.
- 7 Gu FL(谷仿丽), Chen NF(陈乃富), Dai J(戴军). Influence of multi-loop cable outlets on power quality of urban power grid and the countermeasures[J]. *J Suzhou Univ*(宿州学院学报), 2011, 26(11): 68-70.
 - 8 Niu WX(牛文霞), Cao YY(曹艳亚), Fu YC(符移才), et al. Study on the effects of cosmetics on the skin and the correlation between moisture and elasticity[J]. *Flavour Frag Cos*(香料香精化妆品), 2014, 4: 53-58.
 - 9 Chen YF(陈亚飞), Yu HM(余汉谋), Jiang XT(姜兴涛), et al. Evaluation methods for efficacy of skin moisturizing agents[J]. *Deter & Cos*(日用化学品科学), 2015, 38(2): 27-30.
 - 10 Zhang JP(张建萍), Wei YH(魏玉辉), Zhang GQ(张国强), et al. Dermal irritation and long-term toxicity of total alkaloid of *sophora alopecuroides* thermo-sensitive gel[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32: 1180-1184.
 - 11 Zou PF(邹鹏飞), Liu ZH(刘志河), Lu WC(路万成), et al. Skin's natural moisturizing system and the design of moisturizing cosmetics[J]. *Deter & Cos*(日用化学品科学), 2012, 35(1): 18-20.
 - 12 Dai HJ(戴宏杰), Sun YL(孙玉林), Yang MY(杨梅语), et al. Antioxidant activity, moisture absorption and retention capacities of alkali-soluble polysaccharides extracted from gonad of *Sepia lycidas*[J]. *Food Sci*(食品科学), 2016, 37(2): 31-38.
 - 13 Zhong LY(钟柳艳). Study on the fermentation technology of *Ganoderma lucidum* extract and the evaluation of the moisturizing function of the fermentation product[D]. Guangzhou: South China Agricultural University(华南农业大学), 2016.
 - 14 Lai JD(赖劲东). Application prospect of traditional chinese medicine in moisturizing cosmetics[J]. *Med Infor*(医学信息), 2011, 24: 184-186.
-
- (上接第 1668 页)
- 6 Guo LY(郭娜燕), Lv GR(吕国荣), Qiu DY(邱丹纓). Review on alkaloids from marine-derived actinomycetes[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29: 159-171.
 - 7 Hogerzeil LM. Experience with the combination of clofazimine(Lamprene) and long-term steroid therapy in the treatment of leprosy[J]. *Lepr India*, 1976, 48: 718-721.
 - 8 Fang Y(方运玲), Sun S(孙爽), Shen Y(申阅), et al. Progress on the development and application of biopesticide Shenqinmycin[J]. *Chin J Pest Sci*(农药学学报), 2014, 16: 387-393.
 - 9 Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 417-445.
 - 10 Yoon MY, Kim YS, Shi YR, et al. In vitro and in vivo antifungal activities of decursin and decursinol angelate isolated from *Angelica gigas*, against *Magnaporthe oryzae*, the causal agent of rice blast[J]. *Pestic Biochem Phys*, 2011, 101: 118-124.
 - 11 Wu ZC(吴正超), Zheng LJ(郑六眷), Chen YL(陈耀龙), et al. Isolation and elucidation of phenazine alkaloid antibiotics from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. SCSIO 10428[J]. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2014, 33: 45-52.
 - 12 Abdelfattah MS, Toume K, Ishibashi M. Isolation and structure elucidation of izuminosides A-C; a rare phenazine glycosides from *Streptomyces* sp. IFM 11260[J]. *J Antibiot*, 2011, 64(3): 271-275.
 - 13 Rusman Y, Opegard LM, Hiasa H, et al. Solphenazines A-F, glycosylated phenazines from *Streptomyces* sp. strain DL-93[J]. *J Nat Prod*, 2013, 76: 91-96.
 - 14 Budzikiewicz H, Stoeckl D, Roemer A. Mass spectroscopic fragmentation behavior of hydroxy-and methoxyphenazinecarboxylic acids and their methyl esters[J]. *J Heterocyclic Chem*, 1979, 16: 1307-1312.
 - 15 Li Y, Han L, Rong H, et al. Diastaphenazine, a new dimeric phenazine from an endophytic *Streptomyces diastaticus* subsp. ardesiacus[J]. *J Antibiot*, 2015, 68: 210-212.
 - 16 Ding ZG, Li MG, Ren J, et al. Phenazinolins A-E; novel diphenazines from a tin mine tailings-derived *Streptomyces species*[J]. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 2771-2776.