

甘草酸二钾细胞安全性差异原因分析

白冰^{1,2} 朱志贤^{1,2} 陈国宝^{1,2} 陈保华^{3*}

1. 甘肃泛植制药有限公司 甘肃 兰州 730010
2. 甘肃省甘草制品开发与应用技术创新中心 甘肃 兰州 730010
3. 兰州大学 甘肃 兰州 730000

摘要:选取不同生产商供应甘草酸二钾,利用MTT比色法测定角质形成细胞、口腔上皮细胞TR146在一定浓度甘草酸二钾中的细胞存活率,反应不同厂家来源甘草酸二钾的相对细胞毒性强弱,并结合工艺条件分析其安全性差异来源。试验结果显示基于角质形成细胞模型1#、2#样品在2.5mg/mL的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。样品甘草酸二钾6#1.25mg/mL的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。3#、4#、5#、7#、8#在0.625mg/mL的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性;基于口腔上皮细胞TR146模型1#、2#、6#在10mg/mL的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性;3#、4#、5#、7#、8#在5mg/mL的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性;表明不同厂家来源甘草酸二钾细胞安全浓度有所差异。进一步分析样品中硫元素含量,结果显示8个样品含硫量在0~1058pp之间;并且发现含硫量越高其细胞安全浓度越低,分析可能与制备工艺有关,主要可能存在离子交换树脂脱落物的影响。

关键词:甘草酸二钾;细胞毒性;含硫量;离子交换树脂脱落物

甘草酸二钾是一种化妆品常用皮肤保护剂,可用于水乳膏霜精华面膜洗发水牙膏漱口水等多种类型的个人护理产品,具有抗炎、修护、舒缓、止痒等功效^{[1][2]}。为考察分析不同生产商供应甘草酸二钾安全性差异,基于角质形成细胞和口腔上皮细胞,通过MTT法检测受试物作用后的细胞活力变化情况,从而判定待测活性物在角质形成细胞和口腔上皮细胞中的细胞毒性强弱。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

甘草酸二钾分别由不同厂家供应,随机编号1、2、3、4、5、6、7、8#;本测试所用细胞为角质形成细胞(批号:Ep24013002),口腔上皮TR146细胞(批号:211203-4),由广东博溪生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂

KcGrowth培养液(广东博溪生物)、DMEM培养液(Gibco)、PBS(索莱宝)、MTT(Sigma)、DMSO(Sigma)、乙腈(天津大茂)、醋酸(天津大茂)、乙醇(天津大茂)。

1.3 主要设备

CO₂培养箱(Thermo, 150I)、超净工作台(苏净安泰, SW-CJ-1F)、倒置显微镜(Olympus, CKX53)、酶标仪(BioTek, Epoch)、高效液相色谱仪(安捷伦1260)、十万分之一电子天平(赛多利斯)、电感耦合等离子体发射光谱仪(赛默飞 ICP-7400)。

1.4 基于角质形成细胞、口腔上皮TR146细胞的细胞毒性测试

测试方法:

细胞活力测试方法

细胞培养与处理:

将复苏后的细胞悬液接种于96孔培养板中,待细胞贴壁率达到约60%后,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养12-16小时。实验设置包含空白对照组、溶剂对照组、阳性对照组及实验组。其中,实验组采用8个不同浓度梯度,每个浓度设置3个平行孔。

溶液配制与给药:

根据预实验确定的浓度范围,配制系列浓度的工作液。当细胞贴壁率达到50%-60%时进行药物处理:空白对照组仅加入200μL培养基;溶剂对照组加入含等体积溶媒的培养基;阳性对照组加入含10% DMSO的培养基;实验组加入含相应浓度受试物的培养基。处理后的培养板继续在培养箱中孵育24小时。

检测与分析:

孵育结束后,移除培养基,每孔加入0.5mg/mL MTT溶液,37℃避光孵育4小时。随后去除上清液,加入150μL DMSO溶解甲臞结晶,使用酶标仪在490nm波长下测定吸光度值。细胞相对活性计算公式为:(实验组OD值-空白组OD值)/(溶剂对照组OD值-空白组OD值)×100%。

1.5 甘草酸二钾 高效液相色谱含量测定

方法参照中国香料香精化妆品工业协会团体标准《T/CAFFCI 1-2018 化妆品用原料 甘草酸二钾》^[4]进行测定。

1.6 含硫量测定

方法参照《GB/T 30902-2014 无机化工产品杂质元素的测定电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-OES)》^[5]进行测定。

表 1. 甘草酸二钾样品含量、含硫量、细胞安全浓度检测结果汇总表

样品名称	HPLC 含量	安全浓度范围 mg/mL (m/v)		含硫量 (mg/kg)
		角质形成细胞	TR146 细胞 - 口腔上皮细胞	
甘草酸二钾 1#	65.8%	≤ 2.5	≤ 10	未检出
甘草酸二钾 2#	72.5%	≤ 2.5	≤ 10	未检出
甘草酸二钾 3#	68.3%	≤ 0.625	≤ 5	346
甘草酸二钾 4#	75.4%	≤ 0.625	≤ 5	534
甘草酸二钾 5#	62.0%	≤ 0.625	≤ 5	380
甘草酸二钾 6#	70.4%	≤ 1.25	≤ 10	191
甘草酸二钾 7#	72.0%	≤ 0.625	≤ 5	1058
甘草酸二钾 8#	64.3%	≤ 0.625	≤ 5	600

备注：含硫量仪器检出限 1 μ g/L

2 测试结果

液相色谱法测定甘草酸二钾高效液相色谱含量，细胞活力角质成形细胞 MTT 检测结果、口腔上皮 TR146 细胞 MTT 检测结果，含硫量检测结果汇总数据见表 1。

试验结果显示基于角质成形细模型 1#、2# 样品在 2.5mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。样品甘草酸二钾 6#1.25mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。3#、4#、5#、7#、8# 在 0.625mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性；基于口腔上皮细胞 TR146 模型 1#、2#、6# 在 10mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性；3#、4#、5#、7#、8# 在 5mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性；表明不同厂家来源甘草酸二钾细胞安全浓度有所差异。

3 分析与讨论

在甘草酸二钾对角质形成细胞、口腔上皮细胞 TR146 的细胞毒性测试数据中可以看出，基于角质成形细模型 1#、2# 样品在 2.5mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。样品甘草酸二钾 6#1.25mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。3#、4#、5#、7#、8# 在 0.625mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性；基于口腔上皮细胞 TR146 模型 1#、2#、6# 在 10mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性；3#、4#、5#、7#、8# 在 5mg/mL 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性；表明不同厂家来源甘草酸二钾细胞安全浓度有所差异。

进一步测定分析其高效液相色谱含量得知甘草酸二钾含量分别为 65.8%、72.5%、68.3%、75.4%、62.0%、70.4%、72.0%、64.3%，对照发现这八个甘草酸

二钾含量并非导致其细胞毒性差异的直接原因。故认为导致其细胞毒性差异的原因可能是生产过程中原辅料引入或工艺引入的微量危害性杂质导致。

结合其生产工艺，分析认为可能是甘草酸单铵盐转化为甘草酸二钾盐的过程中用到离子交换树脂所引起。甘草酸二钾生产所有阳离子交换树脂脱为苯乙烯或丙烯酸（酯），通过聚合反应生成具有三维空间立体网络结构的骨架，再在骨架上导入磺酸基而制成，树脂中残留物有苯乙烯、二乙烯苯、芳烃（烷基苯、茚、萘、乙苯等）、脂肪烃、酯类。它们的来源是未完全反应的单体、交联剂、添加剂及原料本身引入的各种杂质。离子交换树脂的工业产品中，会出现树脂残留物的不断溶出，另外树脂使用过程中由于温度变化、溶剂更换、机械摩擦等原因产生破裂和降解，我们称之为树脂脱落物^{[6][7]}，在使用过程中上述物质就会转入到下游产品中。这一系列树脂脱落物多位苯系物，且组分较为复杂，较难定性定量分析。因此以导入其中磺酸基上的硫元素含量来对树脂脱落物进行定量分析表征。

通过电感耦合法定测定 8 个样品中含硫量，结果显示 1#、2# 样品未检出硫元素。3#、4#、5#、6#、7#、8# 样品硫元素含量分别为 346、534、380、191、1058、600mg/kg。对比细胞毒性数据可发现，含硫量越高，细胞毒性越强。对应关系如表 1 所示。

也就是说离子交换树脂脱落物可能是导致甘草酸二钾安全性能降低的风险因素之一。因此离子交换树脂的选择以及正确的使用方法对甘草酸二钾的生物安全性有较大影响，我们需要选择交联聚合度较高的离子交换树脂，并且重复的进行预处理、选择温和的溶剂和使用

条件并且定期进行活化再生^[8]。同时建议甘草酸二钾生产所有离子交换树脂需要根据使用情况定期更换。

做为化妆品原料甘草酸二钾，其中可能存在的树脂脱落物多为苯系物，有一定致敏性和刺激性，大多数

苯系物是化妆品中的禁用成分。因此有必要深入研究，进一步建立与之有关的质量标准和检测方法。化妆品生产企业在选择甘草酸二钾时，更加有必要关注其中可能存在刺激性和致敏性的微量杂质成分。

参考文献：

[1]Shi M L, Jin J R, Guo M X, et al. Study on the skin repair effect of dipotassium glycyrrhizinate care solution[J]. Journal of Jinggangshan University(Natural Science Edition), 2018, 39(05): 81-86.

[2]Xue W B, Lu Z J, Dong C Q. Study on the soothing effect of compound emulsion of licorice and ginger root extracts[J].China Cosmetics, 2021(12): 115-119.

[3]Zhou D X, Qian J, Li B Y, Wu J F, Deng Panpan. Comparative study on the soothing effect of dipotassium glycyrrhizinate[J].Guangdong Chemical Industry, 2023, 50(17): 53-56.

[4]T/CAFFCI 1-2018, Cosmetic raw materials-Dipotassium glycyrrhizinate[S].

[5]GB/T 30902-2014, Inorganic chemical products-

Determination of impurity elements-Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)[S].

[6]He B L, Wang L F. Overview and prospects of the development of ion exchange resins[J]. Ion Exchange and Adsorption, 1986(04):3-18. DOI:CNKI:SUN:LJYX.0.1986-04-000.

[7]Huang Y, Zhang Z X, Han Q Q, et al. Current situation and prospects of domestic ion exchange resin production and application[J]. Water Purification Technology, 2010(5):7. DOI:10.3969/j.issn.1009-0177.2010.05.003.

[8]Tang H. Analysis of the reasons for the high breakage rate of ion exchange resins and preventive measures[J]. Chemical Engineering and Equipment, 2019, (07):232-233+241. DOI:10.19566/j.cnki.cn35-1285/tq.2019.07.103.

作者简介：白冰（1984.2- ），女，兰州大学药学专业本科毕业，研究领域：天然产物提取分离纯化和应用，2006年进入甘肃泛植制药有限公司，从事甘草制品研发、生产、应用研究。