

中图分类号: R114; R99 文献标识码: B 文章编号: 1002-3127(2025) 04-0315-05

• 安全性评价 •

乳酸杆菌/海茴香发酵物毒理安全性评价研究

林梦雅¹, 吴剑辉², 黄洁¹, 孔秋婵¹, 霍蔼倩², 李楚忠¹

(1. 广州环亚化妆品科技股份有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广州质量监督检测研究院, 国家化妆品质量检验检测中心(广州), 广东 广州 511447)

【摘要】 目的 开展乳酸杆菌/海茴香(*Crithmum maritimum*)发酵物的安全性评估,为该原料在化妆品中的应用提供理论依据。**方法** 采用急性经皮试验、多次皮肤刺激性试验、急性眼刺激性试验、皮肤变态反应、皮肤光变态反应、皮肤光毒性试验、细菌回复突变试验和体外哺乳动物染色体畸变试验等测试手段,对乳酸杆菌/海茴香发酵物的毒理学性质进行了综合性的毒理学评价。**结果** 乳酸杆菌/海茴香发酵物皮肤刺激性、眼刺激性评分为0。**结论** 未见乳酸杆菌/海茴香致皮肤变态反应、皮肤光毒性及致突变性,为该原料在化妆品中的应用提供了理论依据。

【关键词】 乳酸杆菌/海茴香发酵物; 毒理学; 安全性评价; 化妆品原料安全

DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2025.04.008

海茴香是一种重要的植物原料,生长在极端环境中,具有耐盐耐碱的特性^[1]。海茴香中含有丰富的黄酮类化合物、类胡萝卜素和维生素等功效成分^[2]。在食品、药品和化妆品中具有广泛的应用前景^[1,3-4]。部分研究表明,发酵过程有助于富集植物中的活性成分,且能够帮助改善植物中的细胞毒性,且相关研究表明,海茴香发酵物具有较强的自由基清除能力,对于TNF- α 和IL-1 β 等具有抑制作用,因此海茴香在化妆品领域具有巨大的潜在应用价值^[5-7]。然而,无论是海茴香提取物还是海茴香发酵成分,其毒理性的研究报道甚少。随着监管部门对原料安全性的日益关注,随着科学界对毒理、代谢等相关领域研究的不断深入,成分毒理安全性数据的缺失,成为其在日化领域应用的重大阻碍。因此为进一步挖掘海茴香在化妆品中的应用,本次研究以乳酸杆菌/海茴香(*Crithmum Maritimum*)发酵物作为研究对象,根据《化妆品安全技术规范》(2015版)中的要求,对其在化妆品中的应用性进行了安全性评价。本文中所开展的毒理性试验更关注于成分的经皮过程,特别进行多次皮肤刺激性测试、光变态反应、以及光毒性测试试验,测试手段的筛选更侧重化妆品日常使用场景^[7-8]。相关结果为该成分在化妆品中的应用提供了详实的安评数据基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器 乳酸杆菌/海茴香发酵物:将海茴香原料进行高温均质,之后加入植物乳酸杆菌、MRS肉汤培养基、蜜二糖以及低聚甘露糖混合发

酵,发酵温度40℃,发酵时长48h,得到所述植物发酵物,灭菌并离心后,取上层清液,获得乳酸杆菌/海茴香发酵物。四氯代水杨酰苯胺(TCSA)上海毕得医药科技有限公司(批号CPL812),实验前用95%乙醇配制成为诱导浓度为8.0%、激发浓度6.0%的溶液;CHL细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);大鼠肝匀浆上清液(S9)(体外哺乳动物细胞染色体畸变试验中用到的采购自江苏齐氏生物科技有限公司,批号:22FS167E,细菌回复突变试验中用到的购自北京安宝迪科技有限公司(批号:20220310))S9混合液(S9mix)含S9组分12.5%,补充相应的辅助因子;环磷酸胺(CP)(上海源叶生物科技有限公司批号:X13J11Y115691),丝裂霉素C(MMC)(美国MEC公司,批号31756);鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535菌株(美国MOLTOX);2,4-二硝基氯苯(DNCB)(成都西亚化工有限公司);8-甲氧基补骨脂素(8-Mop)[阿法埃莎(中国)化学有限公司];皮肤光毒性试验检测仪,天津合普开发区合普工贸有限公司(型号:HOPE-MED 8130B)。

1.2 实验动物及饲养环境 广州锐格生物科技有限公司 SPF级SD大鼠,3月龄,体重约200~300g,生产许可证号:SCXK(粤)2021-0059。广东省医学实验动物中心(三水基地)普通级新西兰白色家兔,3月龄体重约1.8~2.2kg,广东省医学实验动物中心(三水基地)实验动物普通级Hartley豚鼠,3月龄,体重约250~450g,生产许可证号:SCXK(粤)2019-0035。实验动物

作者简介:林梦雅,博士,高级工程师,研究方向:化妆品相关研究。

饲料科澳协力(天津)饲料有限公司提供,实验动物许可证号 SCXK(津) 2020-0004、广东省医学实验动物中心:粤饲证(2019) 05073。饲养环境:动物购进后在广州质检院屏障环境饲养,温度:20~26℃,相对湿度:40%~70%,光照/黑暗 12 h/12 h。实验动物使用许可证号:SYXK(粤) 2018-0137,动物实验经广州质量监督检测研究院伦理委员会审批。

1.3 实验方法

1.3.1 理化指标测定:依据《化妆品安全技术规范》(2015 年版),对 3 个不同批次的乳酸杆菌/海茴香发酵物进行铅、汞、砷和镉含量的检测。

1.3.2 微生物指标测定:依据《化妆品安全技术规范》(2015 年版),对 3 个不同批次的乳酸杆菌/海茴香发酵物进行菌落总数、霉菌和酵母菌总数、耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌含量的检测。

1.3.3 急性经皮试验:本实验采用一次限量法,取健康大鼠,随机分为受试组、阴性对照组和阳性对照组,每组 10 只,雌雄各半。在试验前将动物颈部皮肤去毛,设置 2 180 mg/kg·bw 剂量组:选用检疫合格的动物 10 只,雌雄各半。实验前 24 h,剔除动物躯干背部拟染毒区域的被毛,涂抹区域约 30~40 cm²。每次涂皮剂量为 218 mg/100 g。将受试物均匀涂敷于动物背部皮肤染毒区,然后用一层薄胶片覆盖,无刺激胶布固定,封闭接触 24 h。染毒后用水清除残留受试物,记录动物的表现,观察 14 d。根据急性毒性分级标准进行毒性分级。

1.3.4 多次皮肤刺激性试验:普通级新西兰白色家兔 4 只,雌雄各半。取受试物 0.5 ml 涂抹在一侧皮肤上,另一侧不作处理作为对照,每天涂抹 1 次,连续涂抹 14 d。从第 2 天开始,每次涂抹前剪毛,用纯水清除残留受试物。1 h 后观察结果,按《化妆品安全技术规范》(2015 年版)对结果进行评分,并判定家兔皮肤刺激性强度。

1.3.5 急性眼刺激试验:普通级新西兰白色家兔 3 只,将受试物 0.1 ml 滴入受试动物眼部结膜囊中,使上下眼睑闭合,另一侧眼睛不处理,分别在 1、24、48 和 72 h 对动物眼部进行检查,根据《化妆品安全技术规范》(2015 版)中的标准进行积分,判定受试物对眼的刺激强度。

1.3.6 皮肤变态反应:采用局部封闭涂皮试验法,取普通级 Hartley 豚鼠 30 只,雌雄各半。首先进行诱导接触:将受试物 0.2 ml 涂抹在受试物组动物背部右侧去毛区皮肤上,以 2 层纱布和 1 层玻璃纸覆盖,胶布固

定 6 h,在第 7 和 14 天重复试验。对照组不作处理。之后进行激发接触:在末次诱导接触 14 d 后,将 0.2 ml 涂于受试物测试区域,以二层纱布和一层玻璃纸覆盖,胶布固定 6 h。阴性对照组作同样处理。通过比较激发接触 24 和 48 h 皮肤的变化,依据《化妆品安全技术规范》(2015 年版),判定受试物的致敏强度。

1.3.7 皮肤光变态反应试验:按《化妆品安全技术规范》(2015 年版)皮肤光变态反应试验方法进行操作。取普通级 Hartley 豚鼠 30 只,雌雄各半。光诱导阶段:确定照射剂量后,在动物颈部去毛区四角注射 0.1 ml 弗氏完全佐剂与生理盐水的 1:1(v/v)混合剂,之后用透明胶带去除受试区角质层,再将受试物涂抹在受试区,30 min 后用 UVA 进行照射,每天 1 次,共计进行 5 次。光激发阶段:光诱导处理两周后,提前 24 h 将豚鼠背部脊柱两侧皮肤去毛,去毛区分别涂抹受试物、阳性对照组和阴性对照组。30 min 后,去毛区用铝箔覆盖,胶带固定,右侧去毛区用 UVA 光源照射。

1.3.8 皮肤光毒性试验:根据《化妆品安全技术规范》(2015 年版)的要求,取普通级 Hartley 豚鼠 6 只,雌雄各半。将受试动物脊柱两侧去毛,左右各划分两块去毛区,在 1、2 区涂抹 0.2 ml 受试物,30 min 后,去毛区 1/3 用铝箔覆盖,胶带固定。去毛区 2、4 用 UVA 照射 1、24、48 和 72 h 观察皮肤反应,并对每只受试动物皮肤反应评分。

1.3.9 细菌回复突变试验:实验采用鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 菌株,采用平板渗入法进行测试,试验在加和不加 S₉ 条件下进行,同时设置空白对照组、阳性对照组和无菌对照组,受试物浓度设置为 5、2.5、1.25 和 0.625 μl/皿。37℃生化培养箱里培养 48 h,记录每皿回变菌落数。

1.3.10 体外哺乳动物染色体畸变试验:选用 CHL 细胞株进行试验,试验在加与不加 S₉mix 条件下进行,设置受试物组、阴性对照组和阳性对照组,受试物浓度设置为 5、2.5、1.25 μl/ml。将 CHL 细胞接种于 6 孔培养板中,与受试物共同培养 4 h 后,弃去培养液,加入不含血清的培养液,继续培养 24 h。24 h 后,收获细胞,收获前 4 h 加入秋水仙素,消化、低渗、固定、制片和染色。每一处理组选择 200 个(阳性对照选 100 个)分散良好的中期分裂相进行分析,记录染色体结构畸变的细胞数,计算畸变率,用 χ^2 检验进行统计学分析。当受试物为原料时,如果在加和不加 S₉ mix 的条件下均获得阴性结果,则尚需补加另外的试验,即在不加 S₉ mix 的条件下,使受试物与试验系统的接触时

间延长至 24 h。

1.4 统计学方法 用 SPSS 统计软件对试验数据进行统计学分析。技术资料用卡方检验; 计量资料用单因素方差分析, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 理化、微生物指标 依据《化妆品安全技术规范》(2015 年版), 对 3 个不同批次的乳酸杆菌/海茴香发酵物进行铅、汞、砷和镉含量的检测。3 个批次的乳

酸杆菌/海茴香发酵物其菌落总数、霉菌和酵母菌总数、耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌含量符合相关要求。

2.2 急性经皮刺激试验 根据实验结果, 试验大鼠在受试后, 观察期内未发现有中毒表现及死亡个体。观察期结束后, 对存活动物解剖, 肉眼未见异常, 14 d 观察期内, 动物均无其他异常。受试物对雌、雄大鼠的急性经皮半数致死剂量大于 2 180 mg/kg·bw, 属无刺激性反应, 见表 1。

表 1 乳酸杆菌/海茴香发酵物对大鼠急性经皮毒性试验结果($\bar{x}\pm s, n=5$)

性别	剂量分组(mg/kg·bw)	体重(g)			死亡动物数(只)	死亡率(%)
		0 d	7 d	14 d		
雌性	2 180	207.9±2. 28	214. 3±6. 09	223.1±2. 82	0	0
雄性	2 180	217.9±2. 91	275. 4±4. 49	318.3±8.66	0	0

2.3 多次皮肤刺激性试验 多次皮肤刺激性试验结果如表 2, 经多次给药后, 受试动物皮肤无红斑、水肿等不良情况发生。根据《化妆品安全技术规范》(2015

年版) 的皮肤刺激性/腐蚀性实验表评分, 皮肤刺激性反应积分为 0, 判定受试物对家兔的多次皮肤刺激强度为无刺激性。

表 2 乳酸杆菌/海茴香发酵物对家兔多次皮肤刺激性试验结果($n=4$)

涂抹天数(d)	皮肤刺激性反应积分					
	样品			对照		
	红斑	水肿	总分	红斑	水肿	总分
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
14 d 每只动物积分均值			0.00	0.00		
每天每只动物积分均值			0.00	0.00		

2.4 急性眼刺激试验 急性眼刺激试验结果如表 3。在滴入受试物 1、24、48 和 72 h 对动物眼睛进行检查, 在 24 h 观察和记录结束后, 对所有动物的眼睛用荧光素钠作进一步检查。实验结果表明, 受试物对家兔急性眼刺激性反应积分为 0, 表明该受试物在不冲洗试验条件下, 呈现无刺激性。

2.5 皮肤变态反应 皮肤变态反应结果如表 4, 结果显示阳性对照组部分实验体出现红斑和水肿状况。受

试物组试验体皮肤均未出现红斑或水肿情况, 皮肤反应强度积分为 0, 认为该条件受试物不会引起皮肤变态反应。

2.6 皮肤光变态反应 根据实验结果, 阳性组在接受紫外照射后, 出现皮肤反应, 致敏率为 40%。受试物组光诱导阶段照射后的 24 和 48 h 后, 未观察到皮肤局部反应, 致敏率为 0%。因此认为该成分未见皮肤光变态反应(表 5) 。

表 3 乳酸杆菌/海茴香发酵物对家兔急性眼刺激性试验

动物编号	部位	眼刺激性反应积分							
		1 h		24 h		48 h		72 h	
		样品	对照	样品	对照	样品	对照	样品	对照
1	结膜充血	0	0	0	0	0	0	0	0
	结膜水肿	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	0	0	0	0	0	0
2	结膜充血	0	0	0	0	0	0	0	0
	结膜水肿	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	0	0	0	0	0	0
3	结膜充血	0	0	0	0	0	0	0	0
	结膜水肿	0	0	0	0	0	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	0	0	0	0	0	0
积分均值	结膜充血	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	结膜水肿	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	虹膜	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	角膜	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 4 乳酸杆菌/海茴香发酵物对豚鼠皮肤变态反应试验结果(BT 法)

组别	动物数 (只)	诱导剂量	激发剂量	观察 时间(h)	皮肤反应强度								积分≥2 动物数	致敏率 (%)	
					红斑反应强度					水肿反应强度					
					0	1	2	3	4	0	1	2	3		
阴性对照	10	/	0. 2 ml	24	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0	0
			受试物	48	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0	0
受试物组	20	0. 2 ml	0. 2 ml	24	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20	20/20	0/20	0/20	0/20	0	0
		受试物	受试物	48	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20	20/20	0/20	0/20	0/20	0	0
阳性对照	20	0. 2 ml	0. 2 ml	24	2/20	18/20	0/20	0/20	0/20	7/20	13/20	0/20	0/20	13	65
		0. 4% DNCB	0. 1% DNCB	48	5/20	15/20	0/20	0/20	0/20	10/20	10/20	0/20	0/20	10	50

表 5 乳酸杆菌/海茴香发酵物对豚鼠皮肤光变态反应试验结果(BT 法, n = 10)

组别	诱导剂量	激发剂量	观察 时间(h)	皮肤反应强度								致敏 率(%)	
				红斑反应强度					水肿反应强度				
				0	1	2	3	4	0	1	2		3
阴性对照	/	/	24	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0
			48	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0
受试物组	0.1 ml 受试物	0.02 ml 受试物	24	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0
			48	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0
阳性对照	0.1 ml	0.02 ml	24	1/10	9/10	0/10	0/10	0/10	6/10	4/10	0/10	0/10	40
	8% TCSA	6% TCSA	48	3/10	7/10	0/10	0/10	0/10	7/10	3/10	0/10	0/10	30

2.7 皮肤光毒性试验

在结束照射后的 1、24、48 和 72 h 观察受试动物的皮肤反应,对每只受试豚鼠皮肤

反应进行评分,结果如表 6。未观察到红斑或水肿等反应症状,表明该测试成分对豚鼠皮肤无光毒反应。

表 6 乳酸杆菌/海茴香发酵物对豚鼠皮肤光毒性试验结果

动物编号	性别	体重 (g)	皮肤反应积分															
			1 h				24 h				48 h				72 h			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	雄性	341.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	雄性	329.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	雄性	329.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	雌性	323.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	雌性	330.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	雌性	318.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.8 细菌回复突变试验 根据实验结果,在加与不加 S9 条件下,受试物在剂量 5 μ l/皿及以下剂量时,TA97a、TA98、TA100 和 TA102 的回变菌落数均未达到溶剂对照组的 2 倍,TA1535 的回变菌落数均未达到溶剂对照组的 3 倍,未见致突变性。

2.9 体外哺乳动物染色体畸变试验 根据实验结果,染毒 4 h,在加和 不加 S9 mix 条件下,乳酸杆菌/海茴香发酵物在 5 μ l/ml 以下剂量时,染色体畸变率与阴性对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。染毒 24 h,在 不加 S9 mix 条件下,该受试物在 5 μ l/ml 及以下剂量时,染色体畸变率与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

海茴香是一种富含多酚、黄酮和有机酸的天然植物,相关研究表明其发酵物具有美白、抗炎等功效,在化妆品领域具有广阔的应用前景^[7]。根据《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中对化妆品可用原料的要求,本文对乳酸杆菌/海茴香发酵物的原料安全性进行评价。对不同批次的该原料进行理化、微生物指标检测,结果表明其含有的铅、砷、镉、汞含量,菌落总数,霉菌和酵母菌总数,耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌数均符合《化妆品安全技术规范》(2015 年版)中的规定。

对乳酸杆菌/海茴香发酵物进行急性经皮试验、多次皮肤刺激性试验、急性眼刺激性试验、皮肤变态反应、皮肤光变态反应、皮肤光毒性试验、细菌回复突变试验和体外哺乳动物染色体畸变试验等毒性试验对乳酸杆菌/海茴香的毒理学性质进行了综合性的评估,试验结果均为阴性,表明乳酸杆菌/海茴香具有较高的安全性。此外,相关研究证实海茴香发酵物经红细胞溶血实验及人体斑贴测试后,均无刺激性^[7]。结合其进一步证实,海茴香发酵物可在化妆品领域被安全使用。

综上所述,本研究系统性的对乳酸杆菌/海茴香发

酵物安全性进行评价,以测试该成分一次、多次及长期在化妆品中应用的潜在毒性情况。开展光变态反应试验、光毒性试验以评估在对应光损伤带来皮肤问题时,在化妆品中添加该成分是否存在潜在的安全性风险,为后续应用提供了毒理学数据基础。

参考文献

[1] Alemán A, Marín D, Taladrid D, et al. Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes [J].Food Res Int,2019,119: 665-674.

[2] Meot-Duros L, Magné C. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L.leaves [J].Plant Physiol Biochem, 2009, 47(1) : 37-41.

[3] Maoloni A, Milanović V, Osimani A, et al. Exploitation of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) for manufacturing of novel high-value fermented preserves [J].Food Bioprod Process, 2021: 174-197.

[4] Mekinić IG, Blažević I, Mudnić I, et al. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity [J].J Food Sci Technol, 2016,53(7) : 3104-3112.

[5] Tai S, Lin CG, Wu MH, et al. Evaluation of depigmenting activity by 8-Hydroxydaidzein in mouse B16 melanoma cells and human volunteers [J].Int J Mol Sci, 2009,10(10) : 4257-4266.

[6] Chung SY, Seo YK, Park JM, et al. Fermented rice bran downregulates MITF expression and leads to inhibition of α -MSH-Induced melanogenesis in B16F1 melanoma [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009,73(8) : 1704-1710.

[7] 林梦雅,何敬愉,刘薇,等 海茴香植物乳杆菌发酵物对黑色素生成抑制作用及安全性评估 [J].香料香精化妆品, 2024,2: 105-111.

[8] 国家食品药品监督管理局. 化妆品安全技术规范(2015 年版) [S].北京: 人民卫生出版社,2015.

(收稿日期: 2024-07-15)