

SOD应用研究集

丁克祥 主 编

王连光 郭书钦 副主编

陈长志 张家修

姚树人 主 审

原子能出版社

内 容 简 介

超氧化物歧化酶(SOD)是当今生化、化工、医药、临床医学等学科领域中研究的热门。本书着重介绍SOD及其复合酶在外用软膏、眼药膏、化妆品、牙膏、泡泡糖等方面的应用及临床疗效,包括其原理、制备工艺、配伍性、稳定性、耐受性及毒理、临床观察情况等;同时,还介绍了抗衰老中药对机体和细胞中SOD活性影响的作用机制。本书可供从事生化、化工、分子生物学、基础医学和临床医学的教学和研究人员,特别是从事自由基及SOD研究的人员以及日化、医药生产部门的技术人员参考。

SOD 应用研究集

丁克祥 主 编
王连光 郭书钦 副主编
陈长志 张家修
姚树人 主 审

原子能出版社出版
(北京2108信箱)

国防科工委印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

☆

开本 787×1092 1/16 ·印张11.375 ·字数281千字

1991年6月北京第一版·1991年6月北京第一次印刷

印数 1—2700

ISBN7-5022-0447-4

R·5 定价: 12.00元

超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, 简称SOD) 广泛存在于自然界一切生物体内, 是目前国际上普遍公认的一种重要的自由基清除剂, 受到生物化学界、医(药)学界、化工界的广泛关注和高度重视。

自从1956年由 Harman 等人首先提出自由基学说以来, 自由基的研究已成为多学科中很活跃的学术领域。但在1900年 Gomberg 发现三苯甲基以前, 对于自由基是否存在的问题, 曾有过长时间的争论。当时, 公认基是分子的组成部分之一, 在一系列化学反应中, 这类分子虽然发生了变化, 由一种分子转变成成为另一种分子, 但基的形式却始终保持不变。由于当时的科学技术尚难将基分离制备, 因此, 不少学者认为基是不能游离存在的, 而极少数学者却坚持认为基可以分为结合基与自由基, 但由于提供不出自由基存在的充分依据, 一直未被学术界广泛承认。随着科学技术水平的提高, 人们对基的认识有了进一步提高, 直到后来一些较为稳定“长寿”的自由基被陆续发现并被分离提纯, 自由基存在的学术思想才逐渐被化学家们所接受。

近些年来随着自由基研究工作不断开展, 人们对自由基与健康 and 疾病关系的认识也发展到了一个新的水平。现代基础医学和分子生物学实验已经证明, 在机体的生命活动的过程中, 自由基也伴随着产生。正常情况下, 机体自由基的产生、利用、清除三者之间处于一种动态的生理平衡, 即自由基不断产生、又不断被利用, 且也不断被清除, 保持着生命活动所需要的低浓度水平。在此情况下, 具有高活性的自由基不仅不会损伤机体、妨碍机体的正常新陈代谢, 而且, 还最大限度地直接或间接发挥对机体有益的生物效应。不仅如此, 不少生物有机体的有些生理功能缺少这些自由基尚不能完成正常代谢的需要, 甚至不能存活。例如, 机体中前列腺素、凝血酶原、胶原蛋白的合成和核糖核苷酸的还原以及机体内的解毒功能, 吞噬细胞杀菌作用, 植物的光合作用、植物果实的成熟速度、植物组织的创伤响应, 海胆卵的受精作用, 环核苷酸的合成等, 均与自由基的存在及其浓度高低密切相关。

但是, 在某些病理的情况下, 不论是什么原因使自由基的产生增加, 还是清除自由基作用减弱, 或者两者兼而有之, 都会导致不利生物效应的发生并造成对机体严重的强氧化性损伤, 从而引起机体的脂质过氧化作用的发生, 导致对生物膜 (包括细胞膜、线粒体膜、微粒体膜、溶酶体膜等)、小动脉和中枢神经系统的损伤。这些损伤会形成小动脉的纤维性变化, 加快动脉硬化以及其它心血管疾病的发生。同时, 自由基可以引起DNA的氧化破坏或交联, 使核酸变性, 结果导致DNA发生突变, 对热的稳定性改变、单链断裂等, 从而影响了它们传递信息的功能以及转录与复制的特性, 导致蛋白质合成能力下降和合成差错。而当蛋白质合成能力下降时, 可引起记忆力减退、智力障碍以及肌肉萎缩等等。蛋白质的合成差错, 可引起多种生物酶的减少与失活, 或虽有活性但遇热不稳定; 尤其是RNA或统管信息的酶合成差错的进行性积累, 会影响蛋白质合成的准确性, 甚至危及整个机体的蛋白质合成。自由基还可以引起蛋白质变性, 发生交联性改变, 导致某些异性蛋白的出现, 从而引起自身免疫性疾病; 同时, 自由基还可以对细胞外的多糖高分子聚合物及其他可溶成分发生比较明显的氧化损伤作用, 从而更加严重地造成机体的损伤, 严重干扰机体正常生命活动, 并加快机体的衰老和死亡。

因此,不少研究人员集中对自由基清除系统进行了研究,做了大量深入细致而又颇有成效的工作,取得了可喜的进展和令人瞩目的成就。特别是1969年,美国生化学者 McCord 和 Fridovich 等人首先发现并成功地提取了能特异性清除超氧自由基(O_2^-)的生物活性物质——超氧化物歧化酶(SOD),并对其化学结构、理化特性、药理机制及临床应用进行了广泛的研究,取得了令人信服的科学依据。已经证明,SOD的存在,对机体的防护和抗衰老,抗炎症、抗肿瘤、抗自身免疫性疾病、抗辐射、抗休克、抗氧中毒等均有积极的作用。而且,近几年的研究也表明,SOD对创伤的修复,缺血再灌注损伤的防护以及白内障的预防也有明显效果。因此,1985年9月,在意大利罗马召开的第四届国际SOD学术会议上,与会者一致认为深入进行SOD研究,不仅具有重大的理论意义而且也有一定的应用价值,且对人类的健康起着不可低估的作用。

近20多年来,国际上已逐步形成了SOD研究热,使SOD的研究水平不断提高,发展十分迅速。一些新的学说、新的理论、新的见解不断涌现,使SOD研究更趋完善。尤其是近几年,人们对单一SOD的作用效果进行了大量实验和比较,发现单一SOD由于半衰期短、代谢速率快而影响疗效。为此,我们提出了SOD复合酶对自由基清除作用的机理,使它从单一的边缘学科领域,逐步引深到各基础、临床及应用学科领域,并不断和其他学科交叉、相连,形成了一整套系统的科学理论。

随着对自由基研究的发展和深入,人们对自由基和抗自由基体系的认识水平也有了明显提高,特别是笔者在国际上首先提出SOD复合酶的概念后,对抗自由基体系的联合作用(包括增效、协同、共济作用)或抗自由基体系的研究广泛开展起来。事实上,关于抗自由基的联合作用,国内外一些文章中陆续有些报道,即认为自由基的大分子和小分子清除剂,对自由基存在着相互弥补、相互完善、相互促进、相互保护的作用。因此,只有最大限度地发挥出共同效应和联合作用,才具备对自由基的最大清除效果,这也是自由基研究迄今取得的一大进步。

为了推动本学科研究的向前发展,促进SOD研究水平的不断提高,并广泛传递SOD研究的新信息、新成果,笔者根据自己近十年的研究成果和学术思想以及工作体会,同全国有关单位的同行专家、教授和学者一道,编著了《SOD应用研究集》。

本书主要介绍了1) SOD及SOD复合酶在皮肤外用软膏、眼药膏和牙膏、美容霜、泡泡糖(口香糖)、食品饮料中的广泛应用,SOD及SOD复合酶在上述产品中应用的原理、工艺流程、技术路线、配方的科学性和可靠性,以及该酶在上述产品中的稳定性和配伍性、应用的可行性和统一性。每项研究都附有临床观察结果和毒理试验指标;2)几种抗衰老中药对机体和细胞中SOD活性提高作用的研究情况和它们有效调节SOD活性的作用机制,特别是某种药物对不同试验对象SOD活性的提高作用的试验方法和结果;3)不同标本中SOD的制备工艺、提取方法,及其鉴定方法;4)微量血SOD快速检测试剂盒的研制及应用,同时还附有与本书有关的国内外SOD应用研究目录以供广大读者查阅、使用。

总而言之,本书以SOD复合酶应用性研究为主题,采用研究论文的写作手法,介绍了SOD及SOD复合酶的直接应用和对提高SOD活性的某些中草药的间接性应用研究的实验,说明了SOD不仅在医药、临床上具有明显的应用价值,而且,在日化产品、食品、饮料以及预防保健等领域中也有广阔的应用前景。

SOD及SOD复合酶应用的领域之广、范围之大、内容之多,是很难用一本书概括的,

特别是SOD的应用研究涉及诸多边缘学科,这门学科不仅错综复杂,而且学科之间有着千丝万缕的联系。本书介绍的SOD应用性研究,只是近期研究的第一部分工作,它并不代表整个学术界的总体水平和全部情况;特别是SOD是刚开垦的新的学术领域,其学术花朵刚绽开,幼苗刚萌芽,还有许多工作尚需进一步开拓、完善和深入探讨。正是基于这一点,我们大胆地向社会和学术界裸露我们的研究成果,目的是希望得到同行的指导和帮助,真正起到抛砖引玉、与大家共勉之作用。我希望学术界能百花齐放,百家争鸣,也十分愿意在今后的工作中与广大同行共同探讨,互相学习,互相交流,不断研究,不断创新,把SOD应用性研究工作开展起来,深入持久地坚持下去,为人类创造更多、更好、更有价值的社会和经济效益。

由于笔者能力有限,时间仓促,书中难免有遗漏和不妥之处,希望读者批评指正。

丁克详

1991年5月

目 录

SOD 复合酶美容霜的研制及其临床应用的评价	(1)
SOD 复合酶外用制剂的研制及其对常见皮肤病的临床疗效评价	(18)
抗痒Ⅲ、Ⅳ号的研制和应用以及抗痒Ⅲ号与 SOD 复合酶制剂联合治疗瘙痒性皮 病疗效评价	(33)
SOD 复合酶牙膏的研制及其临床疗效的评价	(39)
SOD 复合酶对 153 例老年口腔患者的疗效观察	(55)
SOD 复合酶泡泡糖(口香糖)的研制及其临床疗效的评价	(59)
SOD 复合酶眼药膏的研制及其对常见眼科疾病的临床疗效的评价	(75)
SOD 复合酶及其制剂的急性毒性试验	(84)
SOD 复合酶及其制剂的蓄积毒性试验	(94)
SOD 复合酶及其制剂对骨髓细胞的微核试验	(101)
SOD 复合酶及其制剂对小鼠骨髓细胞染色体畸变分析的研究	(105)
SOD 复合酶及其制剂的 Ames 试验研究	(109)
抗衰老药物对 SOD 作用研究的新进展	(114)
五味子冲剂对 SOD 活性影响的整体和细胞水平的研究	(120)
温郁金挥发油对鼠肝 SOD 活性的影响	(131)
猕猴桃对 SOD 活性影响的实验研究	(134)
SOD 的制备及分离纯化	(137)
SOD 复合酶的提取及其工艺流程的研究	(141)
SOD 的模拟和在医学上的应用	(154)
微量血 SOD 快速检测试剂盒的研制	(159)
附录 SOD 及其它生物活性物在多学科领域中应用的检索目录	(167)

SOD复合酶美容霜的研制及其临床应用的评价

丁克祥 张爱玲 尹贝立 陈定奎 卢三燕

摘要: 本试验对 SOD 复合酶美容霜的配方、毒理、酶学稳定性及其临床应用进行了研究, 完成了美容霜基质中单体原料的配伍性试验, 膏体稳定性试验, Ames 试验, 微核试验, 染色体畸变试验, 急性毒性试验, 蓄积毒性试验, 临床应用的疗效观察以及各种毒物检测和细菌卫生学检验。另外, 还对 SOD 复合酶在美容霜中的活性稳定性和贮存期进行了观察和研究, 完成了在 75℃ 条件下的破坏性试验。SOD 对 K_{12} (十二醇-硫酸钠) 和甘油、香精等单体原料的耐受性试验以及在 40~55℃ 条件下的稳定性试验。试验结果表明, SOD 复合酶按不同比例加入美容霜主要单体原料 (如水相和油相) 中, 搅拌后, 于室温和 55℃ 恒温箱中各放置 30 天, 均未发现有化学变化, 配伍性良好。剖视基质观察, 也未发现有水相分离及变质的现象; 毒理学试验结果表明, Ames 试验为阴性, 骨髓细胞染色体畸变试验和嗜多染红细胞微核检查, 分别与对照组比较, 均无明显差异, $P > 0.05$ 其细胞染色体突变为 0.4%, 嗜多染红细胞微核率为 3.6%, 均未发现有致突变作用; 急性毒性试验结果表明, SOD 复合酶美容霜以最大涂皮容量剂量 2000mg/kg 体重试验, 均未见有局部中毒和死亡情况发生, 经皮试验 $LD_{50} > 2000\text{mg/kg}$ 体重, 蓄积毒性试验的结果表明, SOD 复合酶美容霜对家兔的皮肤反复多次刺激, 未见有明显的刺激反应。另外, 临床对试验组 198 例受试者进行疗效观察结果表明, SOD 复合酶美容霜对治疗皱纹有效率为 88.68%, 雀斑的有效率为 87.80%, 粉刺的有效率为 94.74%, 色素沉着有效率为 91.84%, 总有效率为 90.17%, 与对照组相比有显著性差异, $P < 0.01$, 同时, SOD 复合酶美容霜于室温贮存近 7 个月, 其 SOD 剩余活性为 76.2%, 122.6U/g 膏体 $>$ 标准浓度 100U/g 膏体 $>$ 有效浓度。

关键词: SOD 复合酶美容霜 耐受性 破坏性 稳定性 有效期 自由基清除剂

超氧化物歧化酶^[1]是一种新型的生物酶制剂, 是一种重要的超氧自由基清除剂, 在美国、西德、澳大利亚等国已有产品, 其商品名为 Orgotein, Ormetein, Outosein, Palasein, Paraxinorn, HM-81, Cu, Zn-SOD 等, 由于它能专一性清除超氧自由基, 故引起国内外医药界和生物化学界的极大关注。文献报道, SOD 复合酶具有抗炎、抗辐射、抗衰老等作用, 能治疗过去棘手、甚至无法治疗的疾病^[2]。国外已有报道^[3], SOD 复合酶如果用于药物, 可利用制药工业中各种载体填充料或添加剂乃至各种辅助剂与之制成各种剂型, 如粉剂、片剂、水剂和糖浆供口服。Michelson 和 Koste 等人证实, SOD 复合酶可以制成各种化妆品、护肤剂, 有抗炎、防晒、去斑及防止面部衰老, 保青春之功效^[4,5]。国内有单位^[6]也将 Cu, Zn-SOD 加入美容霜等化妆品中, 为市场提供了一种具有防衰老、防皱、预防色素沉积、抗辐射、防晒及退粉刺等多效能的新型护肤品。

作者认为, SOD 清除 O_2^- , 使之歧化为无毒的 H_2O , 是一种链锁反应, 不仅有 SOD 参与, 同时还应有过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 共同参与反应, 组成一道多酶的防护群带, 起到保护细胞、保护皮肤的增效或共济作用。

为此,我们采用先进工艺,从动物血中提取了以SOD为主要成分,同时含有多种抗衰老生物活性成分的SOD复合酶,并以此为原料,辅以其它营养液和酶活性保护剂,在武汉市康丽化工厂和北京日用化学研究所协助配合下,研制出高级美容霜,并经随机化双盲对照法,对不同面部特征的人进行试用和临床疗效观察,取得明显效果。

材 料 和 方 法

一、材 料

1. SOD 复合酶原料

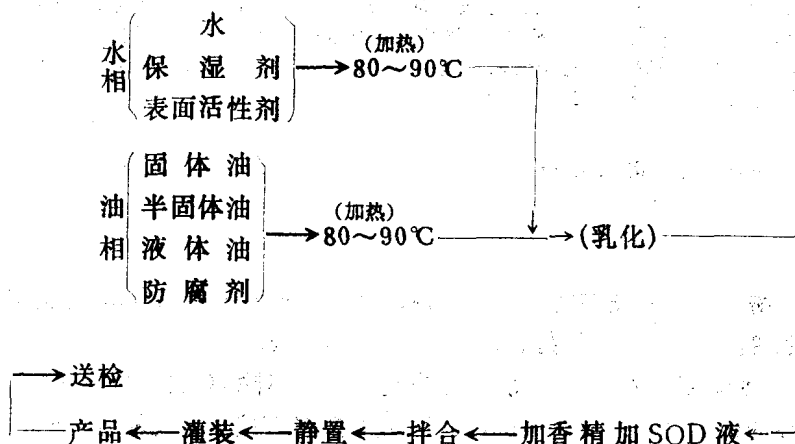
留取新鲜动物血经抗凝,洗涤,溶血,去除血红蛋白,得到SOD复合酶抽提液,再经浓缩,分级,丙酮沉淀,抽干即可得到产品,辅以适量营养液和酶活性保护剂,即可得SOD复合酶原料。

2. 美容霜基质主要原料

高级脂肪醇、保湿剂(甘油)、滋润剂、抗氧化剂、表面活性剂(K_{12} 、十三乙醇胺)、香精。

二、SOD美容霜的工艺流程和制备方法

1. 工艺流程



2. 制备方法

先将SOD复合酶在水溶液中完全溶解,离心,过滤,取透明澄清后滤液,用孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的赛氏(或蔡氏)不锈钢滤膜过滤器在无菌室或净化工作台内进行过滤除菌,除菌液贮存,备用。将水、保湿剂(甘油)、表面活性剂(K_{12} 、三乙醇胺)按一定比例混合后加热至 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$,作为水相液;同时,再将固体油(十八醇)、半固体油(羊毛脂)、液体油(白油)、防腐剂(尼泊金乙酯)按一定比例混匀,加热至 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 即为油相液。将 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 水相液加入已配好的油相液($80\sim 90^{\circ}\text{C}$)中,搅拌,乳化至 50°C ,加香精和SOD复合酶溶液,拌合,静置灌装,最后将产品送检。

三、检测方法

1. SOD活性测定

采用SOD微量快速测定法,即取0.5g膏体,溶于5ml双蒸水中,充分溶解后,4000转/分钟,离心30分钟,取上清液100 μ l加入对照管(B),100 μ l加入测定管(R)中。两管均置25℃水浴20分钟后,R管加0.4ml邻苯三酚,B管加0.4ml、10mmol/L HCl 4分钟后,各滴加终止试剂,以B管调“0”,波长420nm测定其吸光度(A_t /4分钟),同时测定自氧化速率的吸光度(A_0 /4分钟),按如下公式进行计算:

$$\text{SOD活性(U/ml)} = \frac{\frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%}{50\%} \times \text{反应液总体积(ml)} \times \frac{1}{\text{稀液体积(ml)}}$$

$$\text{SOD活性(U/g膏体)} = \frac{\text{单位活性(U/ml)}}{\text{膏体量(g/ml)}}$$

式中, A_0 为自氧化速率, A_t 为SOD抑制自氧化速率。

2. 美容霜的质量检查和标准

耐热试验,耐寒试验,pH值测定,色泽,香气,膏体结构,汞、铅、砷,细菌卫生学检查。

四、几种毒理学试验

1. Ames 试验^[7]

(1)受试物 SOD复合酶和SOD美容霜。

(2)试验菌株 采用组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₀₂ 菌株为指示菌。

(3)毒理学试验方法 将SOD复合酶干品用二甲基亚砜(DMSO)配成0.1ml溶液中含10 μ g,100 μ g,1000 μ g,5000 μ g等不同浓度。SOD美容霜配成0.1ml DMSO溶液中含2000 μ g,1000 μ g,200 μ g等不同浓度进行试验,采用平皿掺入法,在加入活化系统(+S-9)及不加活化系统(-S-9)的条件同时进行经37℃培养,48小时观察结果,阳性对照采用致癌物敌克松(Dexoh)作为直接诱变物,2,7-二氨基芴作为间接诱变物;阴性对照采用DMSO。

(4)结果判断 计算平皿培养基上的回变菌落数,凡诱变菌落数(R_t)为自发回变菌落数(R_c)2倍以上,且诱变物作用呈现剂量-效应关系时,为阳性致突变物。本结果以MR(突变率)= $R_t/R_c > 2$, $MR < 2$,结果为阴性。

2. 微核试验^[8]

(1)受试物 SOD复合酶和SOD美容霜。

(2)受试动物 健康成年NAH种小鼠,体重18~20g。

(3)试验方法 试验分为对小鼠骨髓细胞染色体畸变率检测和骨髓嗜多染红细胞微核检测试验。供试动物按体重进行随机分组,每组5只,受试物SOD复合酶设10mg/kg体重、100mg/kg体重和1000mg/kg体重三个剂量组。SOD美容霜设一个1250mg/kg体重剂量

组,另设一个共同阴性对照组和阳性对照组。为进行骨髓细胞染色体畸变与分析,每只动物观察50个中期细胞,以%数表示,骨髓嗜多染红细胞率以‰计算。

3. 急性毒性试验^[9]

(1)受试物 SOD复合酶和SOD复合酶美容霜。

(2)受试动物 健康成年昆明种小鼠,体重为18~22g;成年Wistar大白鼠,均由同济医科大学实验动物中心提供。

(3)试验方法 经检疫观察后为健康的供试动物,按体重随机进行分组,每组动物10~20只,雌雄各半,剂量组按预试验获得的剂量范围来选定,给受试动物途径为SOD复合酶一次经口灌胃,SOD复合酶美容霜为一次涂于皮肤去毛处,各对照组按同样途径给予相应的剂量的溶剂。给受试动物后即对其全身或局部中毒状况(中毒最早出现时间,中毒症状特征,中毒恢复时间等)、中毒致死状况(中毒致死最早出现时间,死后病理解剖观察,观察期间各组中毒致死动物累积数等)、及依据观察期间各组中毒死亡累积数计算该受试物的半数致死量(LD₅₀)。

4. 蓄积毒性试验

(1)受试物 SOD复合酶美容霜

(2)受试动物 健康成年Wistar大鼠体重180~240g;家兔体重2.5~3.0kg。

(3)试验方法 SOD复合酶美容霜采用反复多次皮肤刺激试验方法对家兔进行经皮肤接触的蓄积毒性试验。选作试验动物用的4只成年家兔于脊背部两侧剪去披毛,范围各为2.5cm×2.5cm,一侧涂抹安慰剂为对照,另一侧涂抹受试物为试验侧。每天上下午各一次,每次涂受试物0.5g,试验期间观察受试动物对皮肤刺激反应及试验结束后对涂药局部皮肤进行病理学、组织学检查,观察皮肤慢性刺激反应。

五、SOD活性试验

1. 破坏性试验

将SOD复合酶和SOD复合酶美容霜水溶液,各分5支试管,加盖后,分别置于75℃水箱中加热恒温水浴15分钟、30分钟、45分钟、60分钟、90分钟,测其SOD活性(C)。以不加热的标本,上述各标本在试验前,即未置75℃水箱中加热前,以同样条件下检测的SOD活性作为SOD起始活性(C₀)。然后,分别求出剩余活性(C_r%),计算分式为 $C_r\% = \frac{C}{C_0} \times 100\%$ 。

2. 稳定性试验

将SOD复合酶水溶液和SOD美容霜水溶液离心,上清液为测定液,分别测其SOD起始活性(C₀),然后分别置于40±0.5℃、45±0.5℃、50±0.5℃、55±0.5℃温度下,以间隔8小时(40℃)、4小时(45℃)、2小时(50℃)、1小时(55℃)取样,再用同样方法测定其SOD活性(C),求出各温度下,不同时间的SOD剩余活性(C_r%)。

3. SOD复合酶中的SOD对美容霜中影响酶活性的主要单体原料的耐受性试验

将SOD复合酶分别用水溶解后,离心,测其SOD起始活性(C₀)。然后分别加入美容霜基质中的保湿剂(甘油)、K₁₂和香精,充分混匀后,再离心,分别于25℃保温0小时、4小

时、8小时、16小时、32小时、48小时,测其每个单元时间的SOD活性(C_t),然后,换算出SOD剩余活性($C_t\%$)。

4. SOD复合酶美容霜的有效期试验

留取SOD复合酶美容霜,从取样之日起测其SOD活性,作为SOD起始活性(C_0),以后每间隔一个月取样平行测定,连续动态观察,求出不同时间下的SOD剩余活性($C_t\%$)。

六、各种营养成分分析

1. 蛋白质含量测定

采用凯氏定氮法,用凯氏定氮仪测定。

2. 白蛋白和球蛋白

白蛋白采用溴甲酚绿法,用721-100型分光光度计测定。

3. 各游离氨基酸测定

采用氨基酸自动分析法,用日立MLC-703型氨基酸分析仪测定。

4. 维生素含量测定

维生素A和E均采用高效液相法,维生素C采用2,4-二硝基苯肼法。

5. SOD美容霜微量元素分析

微量元素分析包括Cu、Fe、Zn、Mn、Mg、Mo、Ni、Cr等。用日立180—80偏塞曼原子吸收分光光度计直接测定。

七、检查与疗效观察

1. 常见毒物检查

包括:砷(As)、铅(Pb)、汞(Hg)、甲醇、三氯甲烷。

2. 细菌卫生学检查

包括:细菌总数、大肠菌群、致病菌。

3. 临床疗效观察

包括:观察对象、研究方法、疗效标准、临床观察、典型病例、专家评议。

结果与分析

一、SOD复合酶美容霜的研制

1. 质量检查结果及其标准

由表1可知,SOD美容霜通过质量检查,完全符合国家规定的QB963-85和GB7916-87的标准。

2. 膏体的配伍性及稳定性试验

将一定浓度的SOD复合酶配成水溶液加

表1 SOD复合酶美容霜的质量检查结果

检查项目	标准范围	分析结果
耐寒试验	膏体正常、无粗粒出水现象	正常
耐热试验	膏体无油水分离	正常
pH测定	4.0~7.0	6.08
色泽	白色或国家规定的色泽	粉红
香气	符合规定之香型	正常
膏体结构	细腻、润滑、无刺激	正常

入基质中混合搅拌均匀后作为观察物，静置过液(12小时)，进行观察。结果表明，观察物未发生化学反应，外观细腻。然后将观察物灌装，并留取少许标本。分别置于-10℃冰箱中24小时，再恢复室温后进行观察，其膏体正常，无粗粒出水现象；另取一份标本，置于40℃恒温箱内，6小时后剖视观察物进行检查。结果表明，膏体无油水现象，配伍性良好，亦未发生任何化学变化。

二、毒理学试验

1. Ames试验

将SOD复合酶和SOD复合酶美容霜用DMSO分别配成每0.1ml溶液中含10μg、100μg、1000μg、5000μg不同浓度和每0.1ml DMSO中含2000μg、1000μg、200μg等不同浓度，采用平皿掺入法，在加活化系统(+S-9)和不加活化系统(-S-9)的条件下同时进行试验。阳性对照采用敌克松作为直接诱变物，27-二胺基芴为间接诱变物，阴性对照采用DMSO，试验结果见表2，表3。

表2 SOD复合酶Ames试验掺入法实验结果

受检物浓度 (μg/皿)		MR(突变比值)= R_t/R_c							
		TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		+S -9	-S -9	+S -9	-S -9	+S -9	-S -9	+S -9	-S -9
试验组	10	0.98	0.72	1.01	0.66	1.21	0.94	1.06	0.82
	100	0.80	0.64	0.61	0.95	1.14	0.76	0.93	0.88
	1000	0.78	0.98	0.87	0.89	1.02	1.00	1.06	0.74
	5000	0.80	0.98	0.75	0.78	1.14	1.01	1.13	0.92
阳性对照敌克松 (50μg/皿)		—	2.07	—	17.62	—	5.50	—	5.36
2,7-二胺基芴 (20μg/皿)		5.76	—	50.63	—	5.01	—	1.64	—

表3 SOD复合酶美容霜Ames试验掺入和点试法实验结果

受检物浓度 (μg/皿)		MR= R_t/R_c							
		TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		+S -9	-S -9	+S -9	-S -9	+S -9	-S -9	+S -9	-S -9
试验组	2000	—	0.94	—	1.09	—	0.85	—	1.15
	1000	—	0.90	—	1.40	—	0.88	—	1.23
	200	—	0.76	—	1.22	—	0.89	—	0.96
阳性对照 DMSO		—	1.14	—	0.94	—	0.96	—	0.84

在此基础上同时用点试法进行试验，并观察结果，证实Ames试验亦为阴性，与掺入法

结果吻合。

由表 2 的实验结果可知, SOD 复合酶的 R_t/R_c 的比值MR均 <2 , Ames 试验为阴性, 无致突变作用, 表 3 结果亦表明, SOD美容霜 R_t/R_c 的比值MR均 <2 , Ames 试验为阴性, 且用点试法, 采用以上菌株同时进行 Ames 试验, 其结果也为阴性。这就进一步说明不仅加入美容霜基质中的添加物无致突变性, 而且 SOD 复合酶加入美容霜的膏体中后, 也无致突变性。

2. 微核试验

SOD 复合酶和 SOD 复合酶美容霜对骨髓细胞染色体畸变率的影响结果见表 4、表 5。

表 4 SOD复合酶对骨髓细胞染色体畸变率的影响

组 别	实验动物数 (只)	观察细胞数 (个)	细胞染色体畸变率 (%)
阴性对照组	5	5×50	0.4
试 验 组	10mg/kg体重	5	5×50
	100mg/kg体重	5	5×50
	1000mg/kg体重	5	5×50
	1000mg/kg体重	5	5×50
阳性对照组	5	5×50	42.8*

* 与阴性对照组和其它各试验组比较, $P<0.01$ 。

表 5 SOD美容霜对骨髓细胞染色体畸变的影响

组 别	实验动物数 (只)	观察细胞数 (个)	细胞染色体畸变率 (%)
阴性对照组	5	5×50	0.4
试验组 1250mg/kg体重	5	5×50	0.4
阴性对照组	5	5×50	42.8*

* 与阴性对照组和试验组比较, $P<0.01$ 。

由表 4、表 5 结果可知, SOD复合酶和SOD复合酶美容霜对NAH小鼠骨髓细胞染色体畸变作用镜检观察, 所见为染色单体型, 其结构畸变, 以单体断裂及断片为多见, 与阴性对照组比较观察结果没有明显差异 ($P>0.05$), 而阳性对照组与其它组比较均有非常显著性差异 ($P<0.01$)。

SOD复合酶和SOD复合酶美容霜对骨髓嗜多染红细胞微核率的影响结果见表 6、表 7。

表 6 SOD复合酶对小白鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

组 别	实验动物数 (只)	观察细胞数 (个)	细胞微核率 (%)
阴性对照组	5	5×1000	1.8
试 验 组	10mg/kg体重	5	5×1000
	100mg/kg体重	5	5×1000
	1000mg/kg体重	5	5×1000
	1000mg/kg体重	5	5×1000
阳性对照组	5	5×1000	14.0*

* 与阴性对照组和各试验组比较, $P<0.01$ 。

表7 SOD复合酶美容霜对小白鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

组 别	实验动物数(只)	观察细胞数(个)	细胞微核率(%)
阴性对照组	5	5×1000	1.8
试验组1250mg/kg体重	5	5×1000	3.6
阳性对照组	5	5×1000	14*

* 与阴性对照组和试验组比较, $P < 0.01$ 。

由表6、表7的结果可知, SOD复合酶和SOD复合酶美容霜对小白鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响, 与对照组相比, 均无明显差异, 经统计学处理无显著性意义, $P > 0.05$, 这说明SOD复合酶本身不仅无致突变性, 而且SOD复合酶美容霜也无致突变作用。这与王家玲教授报道的SOD复合酶和SOD复合酶美容霜的Ames试验为阴性, 无致突变性的结果一致。

3. 急性毒性试验

SOD复合酶急性毒性试验结果见表8。

表8 SOD复合酶的急性毒性试验

组 别	实验动物		给药途径	结果观察	
	雌	雄		中毒状况	死亡状况
5000mg/kg体重	10	10	经口	观察期间均未见中毒症状	观察期间均未有动物死亡
对照组	5	5	经口	均正常	无死亡

SOD复合酶美容霜的急性毒性试验结果见表9。

表9 SOD美容霜的急性毒性试验

组 别	实验动物(大鼠)		给药途径	结果观察	
	雌性	雄性		中毒症状	死亡状况
2000mg/kg体重	6	6	经皮肤	观察期间均未见局部和全身中毒症状	观察期间均未有死亡
对照组	6	6	经皮肤	均正常	均正常

由表8可知, 用SOD复合酶的最大灌胃容量的剂量为5000mg/kg体重, 分别经口给予小鼠后, 观察期间均未引起动物中毒和死亡, 故经口时小鼠的 $LD_{50} > 5000\text{mg/kg}$ 体重。SOD美容霜则以最大涂皮剂量2000mg/kg体重做试验时, 受试动物均未见有全身或局部中毒及死亡状况。因此, 其经皮 $LD_{50} > 2000\text{mg/kg}$ 体重上述试验说明, SOD复合酶和SOD复合酶美容霜的急性毒性作用是极小的, 按照化学物质急性毒性分级评定, 它们均属于实际无毒类的化合物。

4. 蓄积毒性试验

蓄积毒性试验的结果表明, 根据SOD复合酶美容霜对家兔皮肤多次反复刺激试验引起皮肤红斑及水肿形成的刺激反应观察, 其中仅有2只兔与对照组相比较各有一侧有不明显的、

勉强可见的红斑出现,其评分积分为1,该评分积分远小于4,故属于正常范围。结束试验后,对试验侧和对照侧的皮肤作病理组织检查观察结果为皮肤各层组织清晰可见,未发现角化过度、棘层肥厚以及其它皮肤病理改变,故其积分为0。这些观察结果及评分均表明,SOD复合酶美容霜对家兔皮肤多次刺激未见有明显的刺激反应;同时,对198例受试人群进行一个多月的临床和随访观察,也未发现一例出现皮肤不适或其它病理改变的现象。这就进一步说明了使用SOD复合酶美容霜的可靠性和安全性。

三、SOD活性试验

1. SOD复合酶美容霜的破坏性试验

由图1结果可知,将SOD复合酶美容霜配成水溶液,置于75℃水浴15分钟时,SOD剩余活性为90.2%,30分钟时SOD剩余活性为87.5%,45分钟时SOD剩余活性为87.5%,60分钟时SOD剩余活性为87.5%,75分钟时SOD剩余活性为80.0%,90分钟时SOD剩余活性为74.5%,30~75分钟期间SOD活性基本不变。这说明保护剂对SOD活性有效。这与SOD复合酶的水溶液和SOD复合酶牙膏的水溶液相比有更高的耐热性,其原因还可能是因为美容霜中的油脂性物质对SOD活性起到更有效的保护作用。

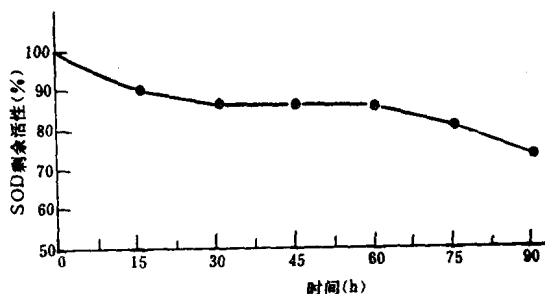


图1 75℃时不同时间对SOD复合酶美容霜中SOD活性破坏试验曲线图

2. SOD复合酶美容霜室温贮存期试验

由表10结果可知,SOD复合酶美容霜于室温自然存放(-5~40℃)近7个月(250天),每个月30天平行测定一次,其SOD活性分别为160.9U/g膏体,153.2U/g膏体,153U/g膏体,137.9U/g膏体,145.5U/g膏体,137.9U/g膏体,122.6U/g膏体,其SOD剩余活性为76.0%,7个月后的最终浓度为122.6U/g膏体>100U/g膏体>有效浓度>文献值^[12,13](0.7U以上)。

表10 SOD复合酶美容霜室温贮存期试验

室 温	理论值(U/g膏体)	SOD活性 (U/g膏体)						
		0个月	1个月	2个月	3个月	4个月	5个月	6个月
-5~40℃	183.0	160.9	153.2	153.5	137.9	145.5	137.9	122.6

3. SOD复合酶美容霜的耐受性试验

将美容霜基质中的表面活性 K_{12} 、香精、甘油分别于SOD复合酶水溶液混合后,置25℃的恒温水浴不同时间,分别测其SOD活性,观察其SOD的剩余活性(见图2—4)。

由图2可知,SOD复合酶水溶液与 K_{12} 一并混合保存48小时,其SOD变化曲线波动极小,保存8小时,SOD剩余活性为98.2%;保存16小时,SOD剩余活性为97.2%;保存24小时,SOD剩余活性为97.2%;保存32小时,SOD剩余活性为95.8%;保存48小时,

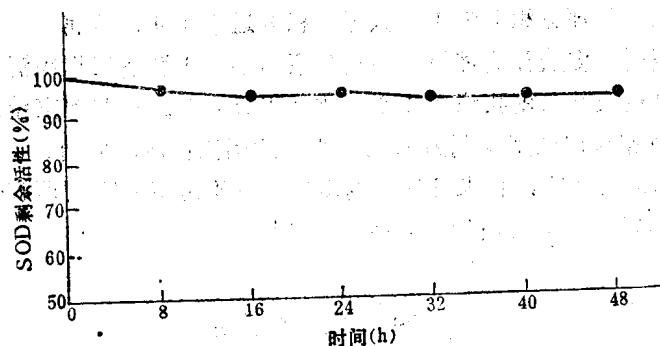


图2 SOD对表面活性剂K₁₂的耐受性

SOD 剩余活性为 94.5%。结果表明, K₁₂ 对 SOD 的活性影响不明显, 这与其它酶类相比, SOD 对 K₁₂ 的耐受性更强, 这可能是由于 SOD 特殊的化学结构和理化性质所决定的。

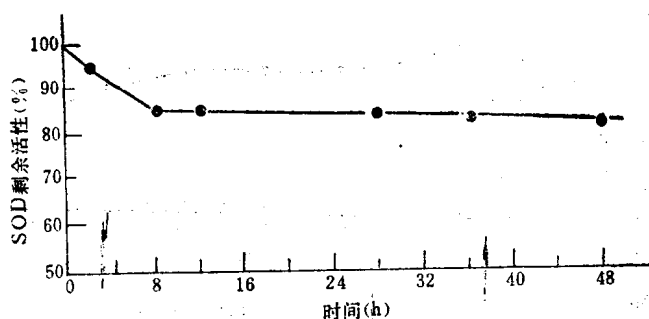


图3 SOD 复合酶水溶液对甘油的耐受性

由图3可知, 将SOD复合酶水溶液与甘油混合后置25℃水浴2小时, SOD活性变化不大, 其SOD剩余活性为94.3%, 8小时后SOD活性有一骤然下降阶段, 其SOD剩余活性为85.7%, 以后曲线平坦, 48小时后SOD活性仍在85.7%维持不变。试验证实, SOD在甘油中出现一过性降低后维持相对平衡, 这说明甘油可能与其SOD的保护

活有关, 且在和SOD充分作用后有明显保护作用。这与甘油可作为其它酶活性的保护剂的报道一致^[13], 其机制正在进一步探讨和研究。

由图4可知, SOD复合酶水溶液与香精混合后, 置25℃水浴0、4、8、16、32小时, 其SOD剩余活性分别为100%、92.6%、84.1%、74.1%、70.1%, 16小时以后SOD活性曲线变化不明显, 趋于平衡。

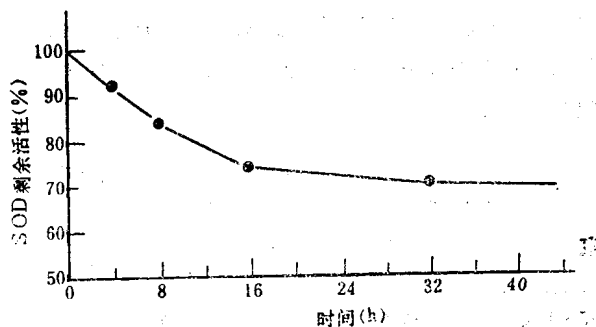


图4 25℃时 SOD复合酶对香精的耐受性

4. SOD复合酶美容霜的稳定

性试验

由表11可知, SOD复合酶美容霜分别置于40℃、45℃、50℃、55℃恒温水浴不同时间, 其SOD剩余活性均在78.0%以上, 其中40℃, 32小时时SOD剩余活性为85.8%; 45℃, 16小时时, SOD剩余活性为84.0%; 50℃, 8小时时, SOD剩余活性为82.2%; 55℃, 4小时时, SOD剩余活性为78.0%, 这与SOD牙膏中SOD活性稳定性基本相似。

表11 SOD复合酶美容霜在各温度下不同时间SOD的剩余活性

观察时间 (小时)	温度 (℃)	SOD (C, %)	时间 (小时)	温度 (℃)	SOD(C, %)
0		100	0		100
8		96.0	2		93.8
16	40	92.0	4	50	88.8
24		90.0	6		87.4
32		85.8	8		82.2
0		100	0		100
4		93.0	1		92.1
8	45	90.2	2	55	90.2
12		86.1	3		88.9
16		84.0	4		78.0

四、SOD复合酶美容霜营养成分分析检测结果

1. SOD复合酶美容霜营养成分分析

表12 SOD复合酶美容霜营养成分

序 号	营 养 成 分	含 量	单 位	分 析 方 法
1	蛋白质	0.59	g/100g	凯氏定氮法
2	维生素C	723.7	mg/100g	4-二硝基苯肼
3	维生素A	112.35	μg/g	高效液相
4	维生素E (α型)	82.75	μg/g	高效液相

2. SOD复合酶美容霜微量元素分析

表13 SOD复合酶美容霜微量元素分析

序 号	测定项目	含 量	序 号	测定项目	含 量
1	铜	1.305	6	钴	0.124
2	铁	8.951	7	镍	0.213
3	锌	0.991	8	钙	7.015
4	锰	0.119	9	镁	4.000
5	铬	0.066	10	铝	0.112

3. SOD复合酶美容霜中的氨基酸分析