



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106924117 B

(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201710236589.9

A61Q 17/00(2006.01)

(22)申请日 2017.04.12

A61Q 19/02(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61Q 19/08(2006.01)

申请公布号 CN 106924117 A

A61Q 19/10(2006.01)

(43)申请公布日 2017.07.07

(73)专利权人 惠州学院

(56)对比文件

地址 516007 广东省惠州市惠城区演达大道46号

DE 102008035443 A1,2010.04.29,

CN 104055705 A,2014.09.24,

CN 101313927 A,2008.12.03,

(72)发明人 林芳花 丁运华 吴松潮 方绳英
赖翎儿 林之雄

熊利芝等.超声醇提黄花蒿残渣总黄酮的工艺优化及抗氧化活性.《精细化工》.2013,第30卷(第11期),第1223-1228页.

(74)专利代理机构 惠州创联专利代理事务所
(普通合伙) 44382

张晓蓉等.黄花蒿残渣挥发油化学成分及其抑菌活性分析.《中草药》.2011,第42卷(第12期),第2418-2421页.

代理人 赵瑾

审查员 顾瑜尉

(51)Int.Cl.

A61K 8/9789(2017.01)

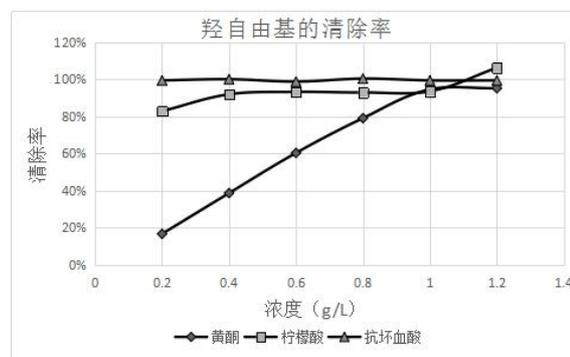
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物

(57)摘要

本发明涉及植物提取技术领域及日用精细化学品技术领域,具体涉及一种含有植物提取物的洗护用品组合物。一种利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,含有:利用提取青蒿素后的黄花蒿残渣制备的黄酮;依次提取青蒿素及黄酮后的黄花蒿残渣用有机溶剂提取得到的挥发油;以及洗护用品辅料。本发明利用提取完青蒿素后的黄花蒿残渣来制备洗护用品组合物,实现了对该资源的再生利用。该洗护用品组合物使用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣提取的黄酮和挥发油作为有效成分,对使用者具有显著的抗氧化、清除自由基、美白、抑菌效果。



1. 一种利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,其特征在于,含有:利用提取青蒿素后的黄花蒿残渣制备的黄酮;依次提取青蒿素及黄酮后的黄花蒿残渣用有机溶剂提取得到的挥发油;以及洗护用品辅料;

所述黄酮与挥发油的质量比为20~40:60~80;

所述黄酮与挥发油的总质量占洗护用品组合物重量的1%~1.5%;

所述黄酮的提取方法为:

(1) 将提取青蒿素后的黄花蒿残渣在60℃烘箱中恒温烘至恒重,放进粉碎机中粉碎,过筛,密封保存备用;

(2) 将步骤(1)所得残渣粉末用乙醇溶液辅以超声波提取,过滤后得到黄花蒿残渣总黄酮提取液;

(3) 步骤(2)所得物料浓缩去除乙醇,离心去除杂质后取上清液,得到黄酮粗提液;

(4) 步骤(3)所得黄酮粗提液采用大孔吸附树脂柱层析法提纯,得到黄酮;

所述挥发油的提取方法为:使用提取总黄酮后的提取青蒿素后的黄花蒿残渣,用有机溶剂回流提取法,得到回流抽浸液,挥发浓缩、精制提纯后得到挥发油。

2. 根据权利要求1所述的利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,其特征在于:步骤(2)残渣粉末与乙醇溶液的料液比为1g:10~40 mL,乙醇溶液的体积百分比为30%~60%,提取时间为20~50min,提取温度为40~60℃,超声功率为300W。

3. 根据权利要求2所述的利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,其特征在于:步骤(2)残渣粉末与乙醇溶液的料液比为1g:40 mL,乙醇溶液的体积百分比为40%,提取时间为20min,提取温度为60℃,超声功率为300W。

4. 根据权利要求1所述的利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,其特征在于,所述挥发油的提取方法为:使用提取总黄酮后的提取青蒿素后的黄花蒿残渣,按料液比1g:10mL 的比例加入正己烷,放入恒温搅拌器中,接上回流冷凝管,调节转速为60r/s,温度为75℃,回流提取3小时,将回流浸液抽滤收集,重复提取黄花蒿残渣,回流抽浸液混合后进行挥发浓缩,并用无水乙醇溶解,密封放置在-20℃冰箱中过夜,次日抽滤除去析出物,收集乙醇浸液,减压蒸馏除去乙醇,得到墨绿色的挥发油。

5. 根据权利要求1所述的利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,其特征在于:所述洗护用品组合物为沐浴露。

用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及植物提取技术领域及日用精细化学品技术领域,具体涉及一种含有植物提取物的洗护用品组合物。

背景技术

[0002] 黄花蒿(*Artemisia annua* Linn)又叫黄蒿,是菊科蒿属的一年生草本植物,广泛分布在国内各省,为中国传统中草药,在青蒿素的基础上开发出了多种衍生物双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚,均有抗疟、抗孕、抗纤维化、抗血吸虫、抗弓形虫、抗心律失常和肿瘤细胞毒性等作用。目前青蒿素用于疟疾防治的价值已被人类认识和接受,世界卫生组织已把青蒿素的复方制剂列为国际上防治疟疾的首选药物。根据世卫组织的统计数据,自2000年起,撒哈拉以南非洲地区约2.4亿人口受益于青蒿素联合疗法,约150万人因该疗法避免了疟疾导致的死亡。

[0003] 黄花蒿的使用量巨大,提取青蒿素后的黄花蒿残渣被大量废弃,这些黄花蒿残渣如何进行再利用,使其继续发挥价值,是值得深入研究的课题。中国专利申请201210270400.5公开了一种黄花蒿和黄花蒿工业提取剩余物作为制备咖啡酰奎尼酸原料的应用,为黄花蒿残渣的再利用提供了一个出路。

发明内容

[0004] 基于此,本发明所要解决的技术问题是提供一种利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,该洗护用品组合物使用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣提取的黄酮和挥发油作为有效成分,对使用者具有显著的抗氧化、清除自由基、美白、抑菌效果。

[0005] 本发明解决上述技术问题的技术方案为:

[0006] 一种利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的洗护用品组合物,含有:利用提取青蒿素后的黄花蒿残渣制备的黄酮;依次提取青蒿素及黄酮后的黄花蒿残渣用有机溶剂提取得到的挥发油;以及洗护用品辅料。

[0007] 优选的,所述黄酮与挥发油的质量比为20~40:60~80。发明人研究发现,单一的黄酮或挥发油对羟自由基的清除效果都不明显,但黄酮和挥发油混合后的效果比单一成分要好,且当混合成分比例在60~80挥发油:20%~40%黄酮时,其效果最明显,清除效率达到高峰。

[0008] 优选的,所述黄酮与挥发油的总质量占洗护用品组合物重量的1~1.5%。

[0009] 优选的,所述黄酮的提取方法为:

[0010] (1)将提取青蒿素后的黄花蒿残渣在60℃烘箱中恒温烘至恒重,放进粉碎机中粉碎,过筛,密封保存备用;

[0011] (2)将步骤(1)所得残渣粉末用乙醇溶液辅以超声波提取,过滤后得到黄花蒿残渣总黄酮提取液;

[0012] (3)步骤(2)所得物料浓缩去除乙醇,离心去除杂质后取上清液,得到黄酮粗提液;

[0013] (4)步骤(3)所得黄酮粗提液采用大孔吸附树脂柱层析法提纯,得到黄酮。

[0014] 进一步优选的,步骤(2)残渣粉末与乙醇溶液的料液比为1g:10~40 mL,乙醇溶液的体积百分比为30%~60%,提取时间为20~50min,提取温度为40~60℃,超声功率为300W。

[0015] 更进一步优选的,步骤(2)残渣粉末与乙醇溶液的料液比为1g:40 mL,乙醇溶液的体积百分比为40%,提取时间为20min,提取温度为60℃,超声功率为300W。经试验测定,在上述条件下,总黄酮的提取率最高,可达到7.85%。

[0016] 进一步的,所述挥发油的提取方法为:使用提取总黄酮后的提取青蒿素后的黄花蒿残渣,用有机溶剂回流提取法,得到回流抽浸液,挥发浓缩、精制提纯后得到挥发油。

[0017] 优选的,所述挥发油的提取方法为:使用提取总黄酮后的提取青蒿素后的黄花蒿残渣,按料液比1g:10mL的比例加入正己烷,放入恒温搅拌器中,接上回流冷凝管,调节转速为60r/s,温度为75℃,回流提取3小时,将回流浸液抽滤收集,重复提取黄花蒿残渣,回流抽浸液混合后进行挥发浓缩,并用无水乙醇溶解,密封放置在-20℃冰箱中过夜,次日抽滤除去析出物,收集乙醇浸液,减压蒸馏除去乙醇,得到墨绿色的挥发油。

[0018] 所述洗护用品组合物为沐浴露。也可以是润肤露、洗面奶、面霜、爽肤水、精华液等产品。所用的洗护用品组合物辅料为化妆品领域常规技术,因此不做详细说明。

[0019] 本发明具有如下有益效果:

[0020] 本发明利用提取完青蒿素后的黄花蒿残渣来制备洗护用品组合物,实现了对该资源的再生利用。该洗护用品组合物使用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣提取的黄酮和挥发油作为有效成分,对使用者具有显著的抗氧化、清除自由基、美白、抑菌效果。

附图说明

[0021] 图1为用提取青蒿素剩余的黄花蒿提取的黄酮对羟自由基的清除率折线图。

[0022] 图2为用提取青蒿素剩余的黄花蒿提取的黄酮的过氧化值曲线图。

[0023] 图3为用提取青蒿素剩余的黄花蒿提取的黄酮的酪氨酸酶的抑制效果曲线图。

[0024] 图4为本发明所得挥发油的抑菌效果图。

[0025] 图5为对实施例制备的沐浴露对羟自由基的清除率曲线图。

[0026] 图6为实施例制备的沐浴露对酪氨酸酶的抑制率曲线图。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和实施例对本发明进行详细的说明。

实施例

[0028] 一种利用提取青蒿素后剩余的黄花蒿残渣制备的沐浴露,含有利用提取青蒿素后的黄花蒿残渣制备的黄酮、依次提取青蒿素及总黄酮后的黄花蒿残渣用有机溶剂提取得到的挥发油、以及洗护用品辅料。

[0029] 其中,黄酮的提取方法为:

[0030] 1)将提取青蒿素后的黄花蒿残渣在60℃烘箱中恒温烘至恒重,放进粉碎机中粉碎,并过40目筛,密封保存备用。

[0031] 2)精确称量上述残渣粉末,按料液比1g:40 mL加入体积份数为40%的乙醇,提取20min,恒温水浴60℃,300 W 超声辅助重复提取两次,两次提取液混合、过滤,得到黄花蒿

残渣总黄酮提取液。

[0032] 3) 将黄花蒿残渣总黄酮提取液在60℃恒温磁力搅拌器中浓缩,150r/min,直到完全除去乙醇为止(参照加入乙醇的体积分数和体积,或直到闻不到酒精味),在3000r/min下离心10min,取上清液于50mL容量瓶中,沉淀加适量蒸馏水洗涤溶解,再次离心,上清液为黄酮粗提液。经 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法测定,黄酮粗提液的提取率达到7.85%。

[0033] 4) 步骤3)所得黄酮粗提液采用大孔吸附树脂柱层析法提纯,得到黄酮。

[0034] 对所得到的黄酮纯化物的抗氧化性能进行如下测定:

[0035] 对羟自由基的清除

[0036] 参照Fenton反应的方法建立反应体系($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$)模型,产生 $\cdot\text{OH}$,但由于 $\cdot\text{OH}$ 具有很高的反应活性,存活时间短,若在反应体系中加入水杨酸,就能有效地捕捉 $\cdot\text{OH}$,并产生有色产物,该产物在510nm处有强吸收,若在此反应体系中加入具有清除 $\cdot\text{OH}$ 功能的被测物,便会与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,从而使有色产物生成量减少,采用固定反应时间法,在相同体积的反应体系加入一系列浓度梯度的待测液,以待测液空白组,在510nm处测量不同的吸光值。

[0037] 取若干10mL离心管,依次加入0.3mL 9mmol/L FeSO_4 溶液,0.3mL 9mmol/L水杨酸-乙醇溶液,不同浓度的样品液,混匀,加入0.3mL 8.8mmol/L H_2O_2 溶液。将离心管置于37℃恒温水浴箱中反应30min,流水冷却,各管分别加入蒸馏水,使体系最终体积为5mL,3000r/min离心10min,取上清液于下510nm处测定吸光值 A_0 、 A_x 及 A_{x0} ,重复3次测定。其对羟基自由基的清除率按以下公式计算:

[0038] 清除率= $[1 - (A_x - A_{x0}) / A_0] \times 100\%$

[0039] 清除率公式中: A_0 为空白样液吸光值(不加样液); A_x 为待测样品液吸光值; A_{x0} 为本底吸光值(只加样液)。

[0040]

实验组号	1(对照)	2(空白)	3	4	5	6	7	8
FeSO ₄ 溶液(mL)	0.3							
水杨酸-乙醇溶液(mL)	0.3							
黄酮	X	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

[0041]

待测液 (mL)	柠檬酸	X	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
	Vc	X	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
混匀									
H ₂ O ₂ 溶液 (mL)	0	0.3							
混匀, 将离心管置于 37℃ 恒温水浴箱中反应 30min, 流水冷却。									
蒸馏水 (mL)	3.4	4.1	3.9	3.7	3.5	3.3	3.1	2.9	
3000r/min 离心 10min, 取上清液于下 510nm 处测定吸光值 A ₀ 、A _x 及 A _{x0} , 重复 3 次测定。									
浓度 (mg/mL)		0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	

[0042] 实验记录表

[0043]

实验组号	1 (A _{x0})	2 (A ₀)	3	4	5	6	7	8	
A _{x10}	黄酮	0.000	0.310	0.258	0.190	0.123	0.065	0.017	0.015
	柠檬酸	0.000	0.308	0.053	0.025	0.021	0.022	0.020	-0.019
	Vc	0.000	0.312	0.002	0.000	0.004	-0.001	0.002	0.002

[0044] 清除率 = $[1 - (A_x - A_{x0}) / A_0] \times 100\%$

[0045] 清除率公式中: A₀为空白样液吸光值(不加样液); A_x为待测样品液吸光值; A_{x0}为本底吸光值(只加样液)。

[0046] 由图1的折线图可知, 黄花蒿残渣总黄酮纯化物对羟基自由基 (·OH) 具有清除能力, 但总体清除效果低于柠檬酸及抗坏血酸, 当黄花蒿残渣总黄酮纯化物质量浓度由 0.2 g/L 提高到 1 g/L, 羟基自由基的清除效率提高较快; 当质量浓度大于 1g/L 时, 清除效率无明显变化。

[0047] 对油脂的抗氧化性

[0048] 在无水酸性条件下, 油脂中的过氧化物使 I⁻ 定量氧化成 I₂, I₂ 与 I⁻ 结合生成易溶于水的 I₃⁻, 利用 I₃⁻ 的颜色与标准碘液进行比较定量。在 353 nm 波长下, I₂ 含量 (ρ) 在 0~100 mg/L 内与吸光度 (A) 有良好的线性关系, 总黄酮提取物对油脂的抗氧化性采用国际上通用的烘箱强化贮存法: 用适量质量浓度的黄酮纯化液加到液状油脂中, 充分搅拌, 在恒温箱中贮存, 以不加任何抗氧化剂作对照组, 不同时间取样测定油脂的过氧化值。并分别用抗坏血酸和柠檬酸溶液按上述方法测定过氧化值, 比较各种抗氧化剂的抗氧化能力。

[0049] 碘含量标准曲线的制作

[0050] 在一系列干燥10 mL比色管中,分别加入4 mL的氯仿-冰醋酸溶液,0.12mL碘化钾饱和碱液,加一管混匀一管.然后加3mL蒸馏水,再分加入碘标准液0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL.然后加蒸馏水至刻度,加塞摇匀,静置约5-10 min,待分层后,取上清液移入1cm的石英比色皿中,以零管作参比,在353 nm 波长下测其吸光度,根据所对应的浓度作标准曲线。

编号	0	1	2	3	4	5	6
[0051] 碘浓度 (ug/L)	0	10	20	40	60	80	100
A353	0	0.056	0.086	0.148	0.232	0.363	0.420

[0052] 标准曲线方程: $y=234x + 0.6609, R^2=0.9886$, y为I₂含量。

[0053] 具体实验步骤为

[0054] 1.在100 mL三角瓶中加入24 mL 按V(油):V(黄酮纯化液) = 5:1 配比的混合液。在40℃烘箱中反应,间隔60 min取待测样品0.1mL于干燥15 mL比色管中,加入氯仿-冰醋酸溶液4 mL,混合搅匀,加入KI饱和碱液0.12 mL,轻摇30 s,置暗处3 min。

[0055] 2.然后加蒸馏水至刻度,加塞、颠倒,混匀2~3次,静置约5~10 min,待水相澄清后,取上清液于1 cm 石英比色皿中,在353 nm 处以空白作参比,读取各管的吸光度A并计算出碘生成量,按公式计算过氧化值(POV%)。

[0056] $POV/\% = (I_2 \text{含量}(\mu\text{g}) / \text{样品量}0.086\text{g}) \times 100$

[0057] 结果记录表

试样	处理时间							
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7	8
空白动物油	0.283	0.304	0.321	0.344	0.348	0.462	0.470	0.478
动物油+1g/L 柠檬酸	0.224	0.206	0.268	0.306	0.324	0.428	0.360	0.428
[0058] 动物油+1g/L 抗坏血酸	0.131	0.181	0.239	0.314	0.341	0.416	0.439	0.400
动物油 +0.5g/L 黄酮	0.204	0.270	0.275	0.399	0.301	0.453	0.415	0.442
动物油+1g/L 黄酮	0.187	0.198	0.246	0.288	0.266	0.362	0.356	0.397
动物油 +1.5g/L 黄酮	0.215	0.264	0.286	0.448	0.310	0.462	0.437	0.448

[0059] 过氧化值曲线图参见图2。从图2可看出,添加黄酮后,过氧化值均有不同程度的下

降,说明黄酮对油脂的氧化均有不同程度的抑制作用。而1g/L的黄酮对动物油脂的抗氧化性显著高于柠檬酸和抗坏血酸。

[0060] 对酪氨酸酶活力的抑制效果(即美白作用)

[0061] 黑色素(melanin)主要由人体皮肤表皮基底的黑色素细胞(melanocyte)产生,它能减少紫外线对皮肤的伤害。然而,黑色素在基底层的异常蓄积会造成色素沉着过度引起黑斑病、雀斑、老年斑等,影响人们的生活质量。随着对黑色素生物合成研究的不断深入,研究者发现酪氨酸酶在黑色素生物合成中扮演重要角色,它是酪氨酸和多巴向黑色素转变过程中的主要限速酶,它的过量表达是导致色素沉着过度的主要原因。因此,抑制酪氨酸酶的活性可以阻断黑色素的生物合成反应链,减少黑色素的生成,实现美白的效果。本实验通过测定酪氨酸酶(MT)催化L-多巴(L-DOPA)产生的多巴醌(在475 nm处有特征吸收峰)的含量,来评价黄花蒿残渣的黄酮粗提取物以及其他抗氧化剂对酪氨酸酶的抑制作用。

[0062] 实验仪器:紫外分光光度计

[0063] 实验试剂

[0064] 10.0 mg/mL的母液:取100.0 mg的黄酮纯化液、柠檬酸和VC,分别用蒸馏水定容至10 mL容量瓶中,配制成10.0 mg/mL的母液。用时用磷酸缓冲溶液稀释成0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL。

[0065] 0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS),pH6.8:取2.84g磷酸氢二钠于小烧杯中,加少量蒸馏水溶解,与100mL容量瓶中定容,制成0.2mol/L的磷酸氢二钠溶液。同理取2.6g磷酸二氢钠配成0.2mol/L的磷酸二氢钠溶液。取49mL0.2mol/L的磷酸氢二钠溶液与51mL0.2mol/L的磷酸二氢钠溶液混合,调节pH6.8。

[0066] 1.0 mg/mL L-多巴溶液:称量10mg L-多巴,用0.2 mol/L磷酸盐缓冲液定容至10 mL容量瓶中,配制成1.0 mg/mL的L-多巴溶液。

[0067] 186 U/mL酪氨酸酶:称取适量酶制剂,用0.2 mol/L磷酸盐缓冲液配制成186 U/mL。

[0068] 实验操作表

实验组号	1	2	3	4
PBS (mL)	+	+	+	+
L-多巴 (mL)	0.4	-	0.4	-
母液 (mL)	-	-	0.2	0.2
30°C水浴 10min				
酪氨酸酶 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
合计 (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0

[0070] 在10mL干燥的比色管中,按表中依次加入各种试剂,在475nm处测量每一次中的4

组吸光值数据,分别为 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 。

[0071] 以每分钟 A_{475} 增加 0.001 为1个酶活力单位,酶促反应的速度用每分钟 A_{475} 增加值来表示。从混合均匀开始测量,每30秒测定一次,测到 7 min,当 A_{475} 趋于稳定时,其数值就是该组的 A_{475} 。按如下两式计算相对酶活力和酶抑制率。

[0072] 相对酶活力 $r = [(A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100\%$

[0073] 酶抑制率 $R = (1 - r) \times 100\%$

[0074]

实验组号		1	2	3	4	5
黄酮	A_1	0.835	0.835	0.836	0.835	0.835
	A_2	0.691	0.691	0.691	0.690	0.690
	A_3	0.765	0.736	0.782	0.801	0.830
	A_4	0.694	0.697	0.700	0.703	0.705
柠檬酸	A_1	0.836	0.835	0.836	0.835	0.835
	A_2	0.691	0.691	0.690	0.691	0.691
	A_3	0.832	0.833	0.831	0.832	0.830
	A_4	0.690	0.688	0.689	0.686	0.682
V_c	A_1	0.836	0.835	0.836	0.836	0.836
	A_2	0.691	0.691	0.691	0.691	0.69
	A_3	0.821	0.802	0.783	0.753	0.724
	A_4	0.697	0.688	0.692	0.69	0.694

[0075] 图3为酪氨酸酶的抑制效果曲线图,由图3可知,黄花蒿黄酮对酪氨酸酶活性具有一定的抑制效果,当其浓度在0.2~0.4mg/mL时,随着浓度的增加,抑制效果越明显,且大于柠檬酸及抗坏血酸,当浓度大于0.4mg/mL时,抑制效果不断下降,但始终高于柠檬酸。

[0076] 挥发油的提取方法为:

[0077] 将上述步骤2)提取总黄酮后的黄花蒿残渣粉按1g:10mL的料液比加入正己烷,放入恒温搅拌器中,接上回流冷凝管,调节转速为60r/s,温度为75℃,回流提取3小时。将回流浸液抽滤收集,重复提取黄花蒿残渣,回流抽浸液混合后进行挥发浓缩。挥发完正己烷得到的挥发油粗品含有较多的杂质,如油脂、蜡质、叶绿素等一并被提取出来溶解在挥发油中,需进一步精制提纯,将挥发油粗品用无水乙醇溶解,密封放置在-20℃冰箱中过夜,次日抽滤除去析出物,收集乙醇浸液,减压蒸馏除去乙醇,得到墨绿色的挥发油(未除去叶绿素)。

[0078] 对所得挥发油的抑菌效果进行测试：

[0079] (1) 按配方配置菌种的相应的液体和固体培养基，用移液枪吸取5 mL/支装入试管，在121℃高压蒸汽灭菌锅灭菌20min，冷却后放进恒温培养箱，细菌37℃，真菌28℃，培养两到三天，观察是否完全灭菌。

[0080] (2) 接种：将少量金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌在无菌条件下接种至装有牛肉膏蛋白胨培养液的试管，白色念珠菌接种于土豆培养基，青霉菌接种于查氏培养基。每种细菌接种2支试管，轻微振荡试管摇匀。置于适宜的恒温培养箱培养，使其充分进行增殖，备用。

[0081] (3) 用打孔器将干净的滤纸制成直径为0.5cm的小圆纸片，干热灭菌后，浸于不同浓度的挥发油提取液中，使其充分吸收，备用。

[0082] (4) 在超净台里用移液枪吸取0.5 mL转接后生长良好的菌悬液，注入相应的菌平板，涂布均匀。将浸泡处理过的滤纸片沥干，贴在上述含菌平板上，每个平板贴3片相同黄花蒿挥发油质量浓度的滤纸片。以丙酮作为空白对照，重复实验2次。置于培养箱中，细菌37℃培养24h，真菌28℃培养48h。取出量取抑菌圈直径。分析抑菌效果。

[0083] 挥发油的抑菌效果图参见图4，由图4可知，黄花蒿残渣挥发油对实验所选取的5种菌均有一定的抑制效果。其中对青霉菌的抑制效果最佳，且随着浓度的增加，效果越好；对其他4种菌的抑制效果变化不明显。

[0084] 沐浴露的配制：

[0085] 设置黄花蒿残渣提取的黄酮及其挥发油的添加范围为0.5%~2%，取1%、1.5%、2%三个梯度抗氧化实验。其中，黄花蒿残渣提取的黄酮及其挥发油配比如下：

分组	第一组	第二组	第三组	第四组	第五组	第六组
挥发油	100%	80%	60%	40%	20%	0
黄酮	0	20%	40%	60%	80%	100%

[0087] 三个梯度的挥发油油+黄酮的质量如下：

[0088]

梯度		1	2	3	4	5	6
1% (0.5g)	挥发油	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
	黄酮	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
1.5%(0.75g)	挥发油	0.75	0.6	0.45	0.3	0.15	0
	黄酮	0	0.15	0.3	0.45	0.6	0.75
2% (1.0g)	挥发油	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
	黄酮	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0

[0089] 按比例为 $C_{12}:C_{14}=2:1$ 称量7.5 g混合脂肪酸,置于小烧杯中,将2.3 g氢氧化钾溶解成 50 %的水溶液,备用配制时将混合脂肪酸与一定量的去离子水混合后,加热至 80°C ,加入50 %氢氧化钾溶液进行皂化反应。待充分反应后加入上述三个梯度的有效成分,加入蒸馏水至50mL,充分混匀后备用。对其稳定性、抗氧化性,以及其活性效果的检测,来确定沐浴露的最佳配方,和美白效果进行测定,确定其最佳配方。

[0090] 稳定性测定

[0091] 将上述沐浴露用保鲜膜密封置于 0°C 和 50°C 恒温箱中,每隔两天观察其沉淀及分层情况,根据沉淀及分层情况出现的时间来判定其稳定性,连续观察10天。

[0092] 稳定性记录表

[0093]

梯度	1	2	3	4	5	6
1%	均正常, 无分层及沉淀产生					
1.5%						
2%						

[0094] 羟自由基的清除效果

[0095]

实验组号		对照	空白	1	2	3	4	5	6
FeSO ₄ 溶液 (mL)		0.3							
水杨酸-乙醇溶液 (mL)		0.3							
梯度 (mL)	1%	1	0	1					
	1.5%	1	0						
	2%	1	0						
混匀									
H ₂ O ₂ 溶液 (mL)		0	0.3						
混匀, 将离心管置于 37°C 恒温水浴箱中反应 30min, 流水冷却。									
蒸馏水 (mL)		3.4	4.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1

[0096]

3000r/min 离心 10min, 取上清液于下 510nm 处测定吸光值 A₅₁₀、A₅₂₀ 及 A₅₃₀, 重复 3 次测定。

[0097]

记录表(对照组已调零)

[0098]

梯度	空白	1	2	3	4	5	6
1%	0.953	0.020	0.085	0.029	0.041	0.086	0.016
1.5%	0.947	0.025	0.072	0.045	0.021	0.011	0.006
2%	0.939	0.035	0.047	0.088	0.025	0.005	0.015

[0099] 各实验组对羟自由基的清除率曲线图参见图5, 由图5可知, 单种有效成分黄酮或挥发油对羟自由基的清除效果都不明显, 但混合成分的效果普遍比单一成分要好。且当混合成分比例在60%~80%挥发油, 20%~40%黄酮时, 其效果最明显, 清除效率达到高峰。

[0100] 美白效果

[0101] 实验操作表

[0102]

实验组号	1	2	3	4
PBS (mL)	4.4	4.8	3.4	3.8
L-多巴 (mL)	0.4	-	0.4	-
母液 (mL)	-	-	1.0	1.0
30℃水浴 10min				
酪氨酸酶 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
合计 (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0

[0103] 在10mL干燥的比色管中,按表中依次加入各种试剂,在475nm处测量每一次中的4组吸光值数据,分别为A1、A2、A3、A4。

[0104] 以每分钟 A475增加 0.001 为1个酶活力单位,酶促反应的速度用每分钟 A475增加值来表示。从混合均匀开始测量,每30秒测定一次,测到 7 min,当A475趋于稳定时,其数值就是该组的A475。按如下两式计算相对酶活力和酶抑制率。

[0105] 相对酶活力 $r = [(A3 - A4) / (A1 - A2)] \times 100\%$

[0106] 酶抑制率 $R = (1-r) \times 100\%$

[0107] 记录表(A4对照已调零)

[0108]

梯度	A1	A2	1	2	3	4	5	6
1%	0.836	0.692	0.106	0.078	0.081	0.055	0.082	0.107
1.5%	0.845	0.706	0.082	0.082	0.062	0.056	0.075	0.732
2%	0.838	0.701	0.112	0.078	0.062	0.065	0.071	0.095

[0109] 各实验组对酪氨酸酶的抑制率曲线图参见图6,如图6所示,单种有效成分黄酮或挥发油对酪氨酸酶的抑制效果都不明显,但混合成分的效果明显比单一成分要好。且当混合成分比例在40%~60%时,其效果最明显,清除效率达到高峰。

[0110] 以上所述实施例仅表达了本发明的具体实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

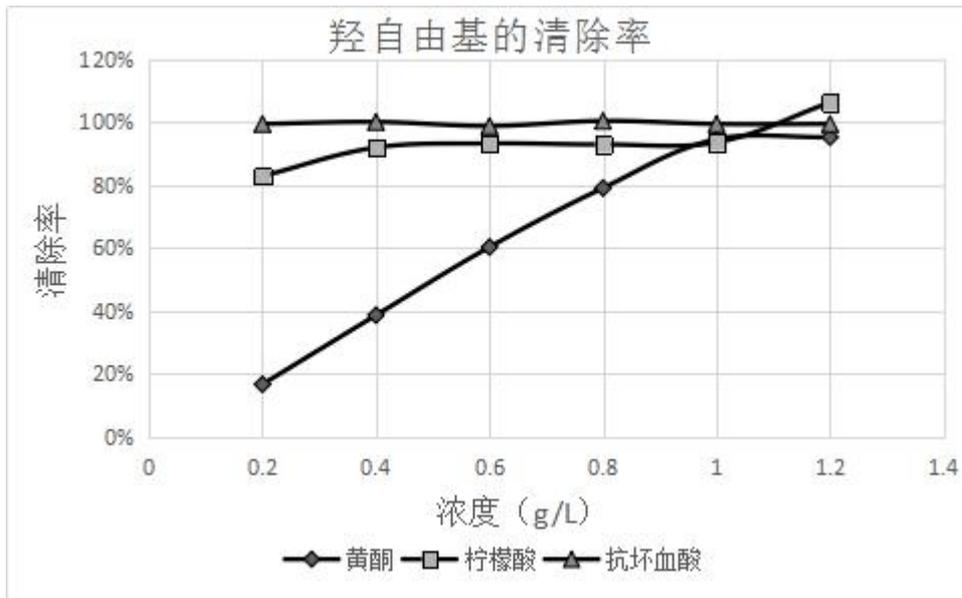


图1

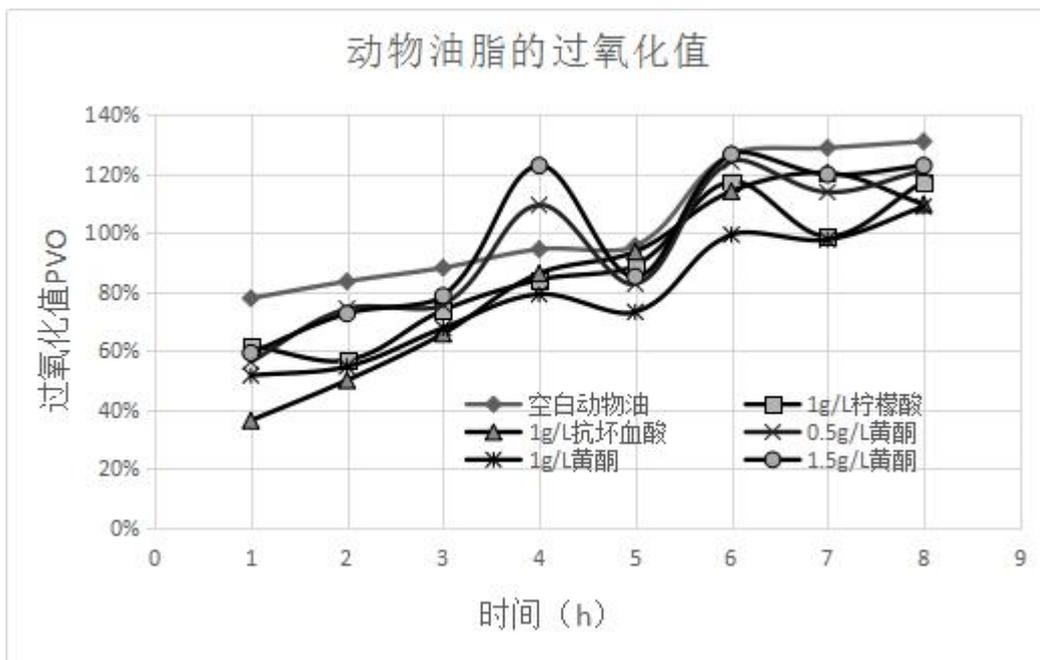


图2

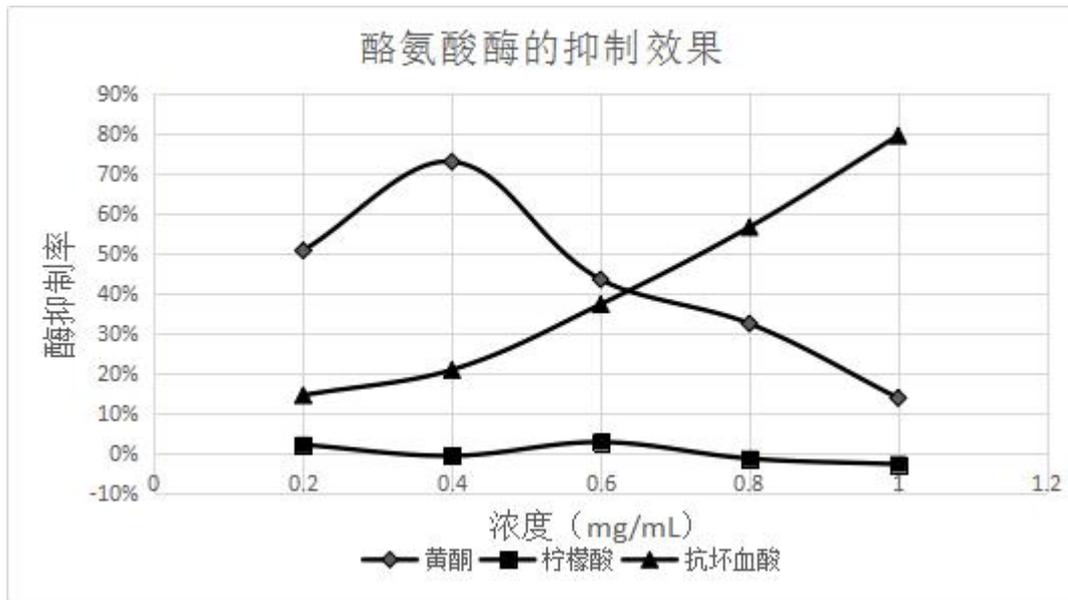


图3

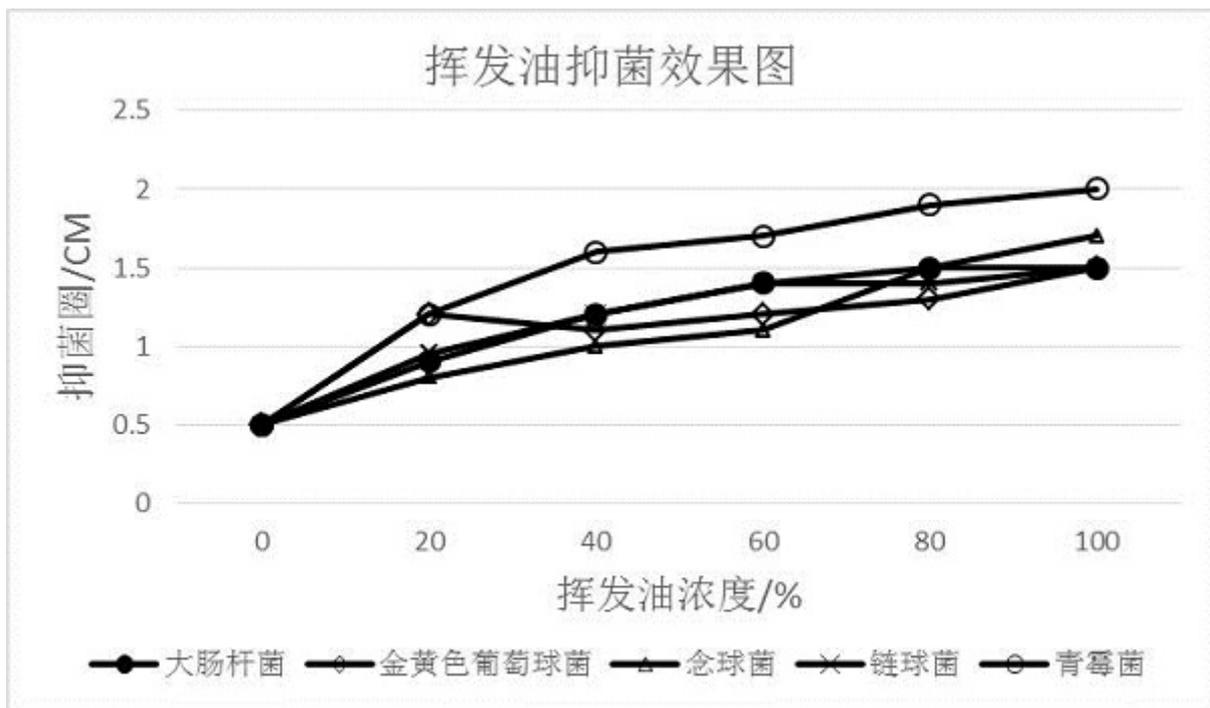


图4

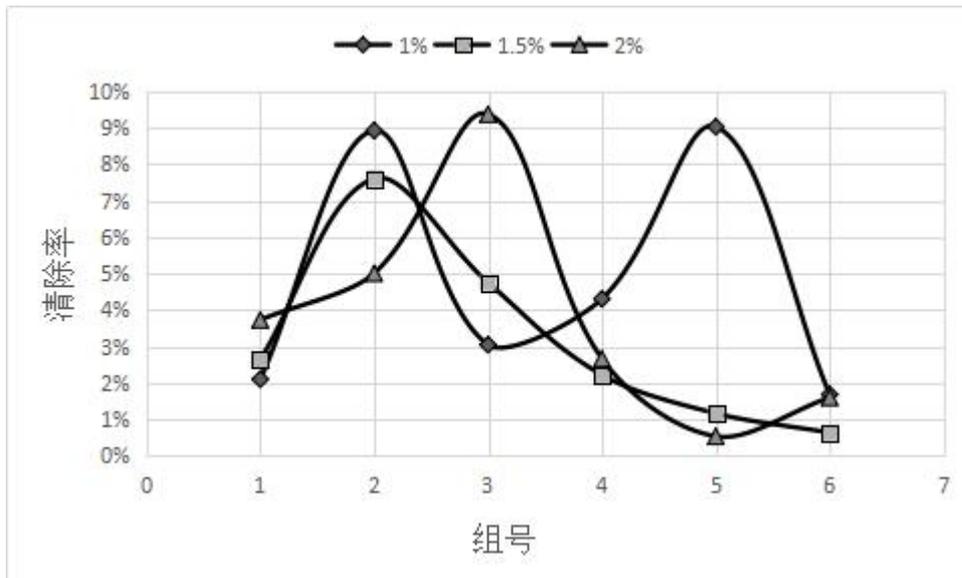


图5

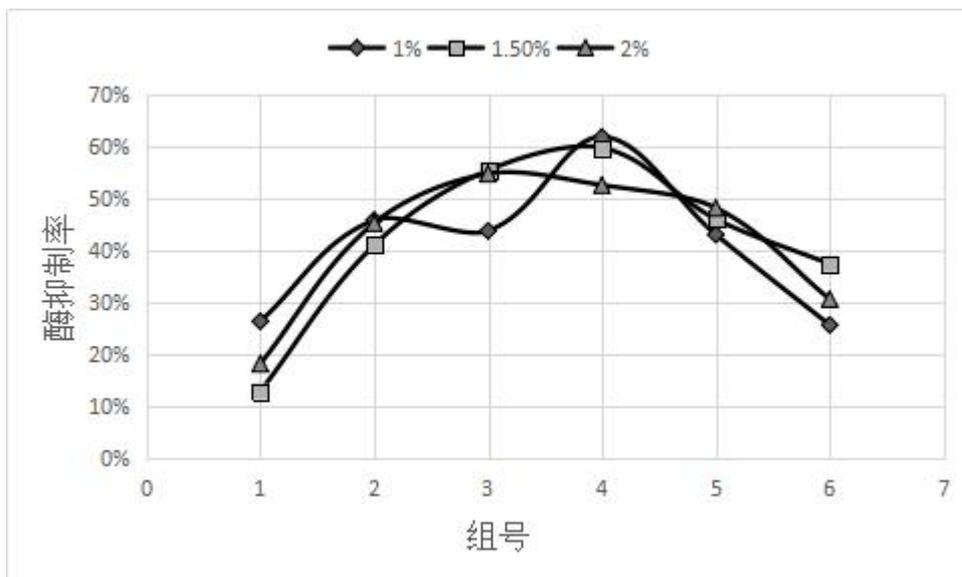


图6