

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109594.X

[51] Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 1/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年3月8日

[11] 公开号 CN 1744879A

[22] 申请日 2003.12.8

[21] 申请号 200380109594.X

[30] 优先权

[32] 2002.12.13 [33] JP [31] 362507/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/015656 2003.12.8

[87] 国际公布 WO2004/054520 日 2004.7.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.9

[71] 申请人 株式会社日冷生物科学

地址 日本东京都

[72] 发明人 永峰贤一 林美希 K·山崎

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 段晓玲

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 8 页

[54] 发明名称

美白剂、皮肤外用剂和化妆品

[57] 摘要

本发明提供一种美白剂，该美白剂可以有效利用以往做废弃处理的 camu camu 种子，安全性优异，可用于化妆品等，具有美白作用；本发明还提供混合有该美白剂等的皮肤外用剂和化妆品。本发明的美白剂含有 camu camu 种子的提取物作为有效成分，本发明的皮肤外用剂或化妆品含有上述美白剂等。

-
1. 含有 camu camu 种子提取物作为有效成分的美白剂。
 2. 权利要求 1 的美白剂，其中所述 camu camu 种子提取物含有
 - 5 没食子酸及其盐的至少一种。
 3. 皮肤外用剂，该皮肤外用剂含有权利要求 1 的美白剂。
 4. 化妆品，该化妆品含有权利要求 1 的美白剂。

美白剂、皮肤外用剂和化妆品

5 技术领域

本发明涉及以 camu camu (一种秘鲁水果) 种子的提取物作为有效成分的美白剂, 使用该提取物的皮肤外用剂和化妆品。

背景技术

10 近年来, 在化妆品产业界或食品产业界, 来源于动物的原料对人体的影响越来越大, 对其限制也不断增加, 人们对来源于植物的原料的关心日渐增强。另外, 因从机体外摄取、在机体内产生的活性氧等的氧化反应引起促进老化作用、紫外线引起皮肤着色、致癌作用等问题也日益深刻。

15 例如, 化妆品或食品的制造、加工或储藏、保存过程中, 各种材料中所含的油脂类通过空气中的氧而被氧化或过氧化, 该问题越来越严重。尤其是已知油脂中含有的亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸容易因为空气中的氧而过氧化, 生成过氧化脂质或自由基, 并生成致癌物质。发生这样的氧化或过氧化, 则产品发生着色、变色、
20 变性、产生异味或营养价、有效性降低等质变。并且变性逐步发展, 还会产生有毒物质等, 导致产品的品质劣化。

因此, 为了抑制上述不饱和脂肪酸的氧化和过氧化, 防止品质劣化, 以往采用了各种抗氧化剂。抗氧化剂作用于氧化时产生的过氧化自由基, 使氧化连锁反应终止, 或者与自由基作用, 使氧化反
25 应终止。通常这样的抗氧化剂例如采用丁基羟基茴香醚(BHA)或丁基羟基甲苯(BHT)等合成抗氧化剂。但是近年来, 随着合成抗氧化剂使用的增加, 其对人体的影响和安全性成为人们关注的问题, 消费者的抗拒反应逐渐强烈。并且, 这些合成抗氧化剂是油溶性的, 难以

应用在水溶液中。

另一方面，作为来自安全性高的天然物质的抗氧化剂例如已知有天然维生素 E(α -生育酚)、维生素 C 等。但是，这些来自天然物质的抗氧化剂具有极端脂溶性或水溶性这样的两个极端的性质，因此，其应用受到限制。另外，也具有其活性不能长时间稳定持续等缺点。

因此，人们需求抗氧化活性强、在水中的溶解性优异、且抗氧化活性长时间稳定的来自天然物质的抗氧化剂。

皮肤的着色或斑点等色素沉淀的原因有：肌体内的代谢障碍等内因要素和紫外线等引起的外因要素。一般常见的是由于后者的外因要素引起的，通过紫外线，黑素细胞受到刺激，黑素细胞活化，从而酪氨酸酶起作用，使皮肤产生色素沉着。已知通过抑制该黑素细胞的活性，抑制酪氨酸酶和黑色素的生成，可以防治皮肤的着色或斑点等色素沉着。因此在化妆品业界，具有美白作用的物质的开发一直都受到重视，一直都致力于开发各种美白剂。并且，由于近年臭氧层的破坏等，紫外线的量正在增加，与此相伴，消费者对预防紫外线的要求进一步提高，强烈需求安全、有效的美白剂。

还已知：起到保持皮肤水分、使皮肤具有柔软性、弹性的物质是胶原或透明质酸等。胶原在皮肤中占真皮的 90%，分布于整个真皮组织中，使皮肤保持适度的弹性和强度。透明质酸广泛分布于皮肤、关节液、玻璃体、韧带等机体中，在皮肤中担负着细胞连接、细胞保护、皮肤组织的形成、组织的水分保持、柔软性的保持等功能。已知生物体内分解胶原的酶是胶原酶，分解透明质酸的酶是透明质酸酶，通过它们，胶原、透明质酸被分解，其量减少，皮肤就会失去润泽、张力，发生皮肤的老化现象—皱纹或松弛。

因此，有人提出了在皮肤外用剂或各种化妆品中混合抑制上述酶活性的物质等，期待具有防止皮肤老化或防止皱纹等作用，开发出各种胶原酶活性抑制剂或透明质酸酶活性抑制剂。

其中，camu camu 的果实与西印度樱桃的果实同样，作为含有

丰富的维生素 C 的植物，近年来广为人所知。camu camu 的果实在南美已作为化妆品或食品在市场上销售，近年来，日本也有作为食品原材料的进口、销售。另外由于上述 camu camu 的果实较多含有的成分是维生素 C，因此人们发现了其提取物在抗氧化剂、保湿剂、美白剂方面的用途(例如，日本特开平 9-221429 号公报、日本特开平 11-246636 号公报、日本特开 2000-327549 号公报、日本特开 2000-327550 号公报、日本特开 2001-31558 号公报)。

但是，camu camu 的果实中，能够用作化妆品或食品的只是较多含有维生素 C 的果肉，其种子只含有极微量的维生素 C，因此尚未发现其有效利用途径，目前大都被扔弃不用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种美白剂，该美白剂可以有效利用以往做废弃处理的 camu camu 种子，安全性优异，可用于皮肤外用剂或化妆品等，具有美白作用；本发明还提供混合有该美白剂的皮肤外用剂和化妆品。

本发明的另一目的在于提供一种皮肤外用剂和化妆品，所述皮肤外用剂和化妆品有望具有稳定的抗氧化作用、胶原酶活性抑制作用或透明质酸酶活性抑制作用，安全性优异，有望具有防止皮肤老化、防止皱纹的作用。

本发明人为了解决上述课题，首先对以往压榨果汁后扔弃的 camu camu 种子的有用性进行了深入的研究。结果发现：由 camu camu 种子得到的提取物可用于皮肤外用剂、化妆品等用途，具有强效抗氧化作用、美白作用、胶原酶活性抑制作用和透明质酸酶活性抑制作用，还具有抗老化作用，从而完成了本发明。

本发明提供含有 camu camu 种子提取物作为有效成分的美白剂。

本发明还提供含有上述美白剂的皮肤外用剂或化妆品。

附图简述

图 1 是表示参考例 1 中进行的 DPPH 自由基清除能力测试结果的图谱。

5 图 2 是表示参考例 2-4 中进行的 DPPH 自由基清除能力测试结果的图谱。

图 3 是表示参考例 5 中进行的亚油酸自氧化抑制能力测试结果的图谱。

10 图 4 是表示参考例 5 中进行的亚油酸自氧化抑制能力测试中各样品在第 7 天的氧化率的图谱。

图 5 是表示实施例 1 中进行的黑色素生成抑制试验的结果的图谱。

图 6 是表示实施例 1 中进行的测定各种培养基的总蛋白重量的结果的图谱。

15 图 7 是表示参考例 6 中进行的胶原酶活性抑制作用试验结果的图谱。

图 8 是表示参考例 7 中进行的透明质酸酶活性抑制作用试验结果的图谱。

20 实施发明的最佳方式

以下对本发明进行详细说明。

25 本发明的美白剂含有 camu camu 种子提取物作为有效成分，该提取物也可作为抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂或抗老化剂的有效成分。作为该提取物原料使用的 camu camu 种子是桃金娘科(*Myrtaceae*)拟香桃木属(*Myrciaria*)果树 camu camu(学名 *Myrciaria dubia*)的种子。

上述 camu camu 生长于中南美热带雨林地区河流附近的湿地，是高 2-3 米、结直径 2-3 厘米红色果实的灌木。camu camu 的果实含

有丰富的维生素 C，但 camu camu 种子却实质不含维生素 C，几乎未见其用途，以往均作废弃处理。

5 由实验结果可知：camu camu 果实的提取物中，维生素 C 含量通常为 1789 mg/100 g (还原型维生素 C: 1485 mg/100 g + 氧化型维生素 C: 295 mg/100 g)，而 camu camu 种子提取物中，维生素 C 含量通常仅为 1 mg/100 g (还原型维生素 C: 0 mg/100 g + 氧化型维生素 C: 1 mg/100 g)。

10 本发明的美白剂以及抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂和抗老化剂中作为有效成分含有的 camu camu 种子提取物只要是用提取溶剂提取 camu camu 种子得到的物质即可，对此并没有特别限定，可以是提取液，也可以是将提取液进行浓缩、干燥等而得到的提取固态物质。提取可以是一次的提取操作，也可以根据需要用其它溶剂进行多次提取操作。

15 优选提取上述 camu camu 种子提取物，使其含有没食子酸及其盐。

20 上述提取溶剂例如有水、有机溶剂，该有机溶剂可以是任意的亲水性有机溶剂、疏水性有机溶剂。亲水性有机溶剂例如有：甲醇、乙醇、甘油、丙二醇、1,3-丁二醇等醇；丙酮、四氢呋喃、乙腈、1,4-二噁烷、吡啶、二甲基亚砷、N,N-二甲基甲酰胺、乙酸等公知的有机溶剂。疏水性有机溶剂例如有：己烷、环己烷、四氯化碳、氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、二乙醚、乙酸乙酯、苯、甲苯等公知的有机溶剂。这些有机溶剂在使用时可以使用 1 种，或将 2 种以上组合使用。其中，优选水和/或亲水性有机溶剂，特别是甲醇、乙醇、1,3-丁二醇，水或它们的混合物或组合。

25 对于提取条件并没有特别的限定，例如温度 5-95℃、优选 10-90℃、进一步优选 15-85℃，在常温下也可提取。温度越高，则提取效率有增高趋势。提取时间为数小时至数天，提取所使用的溶剂量相对于原料，按重量比通常为 1-50 倍量，优选 5-25 倍量。

对于提取操作没有特别限定，可以按照常规方法进行。为了提高提取效率，可以进行振荡提取，使用具备搅拌机等的提取机进行提取。例如，将 camu camu 种子浸渍于提取溶剂中，或不浸渍，而是与提取溶剂一起搅拌、振荡，进行提取处理，通过过滤、离心分离或滗析等将处理液分离为提取液和提取残余物，由此进行提取处理，提取残余物可进一步进行同样的提取处理。所得提取液可直接使用，也可以根据需要进一步进行浓缩处理和/或分级、提纯处理。

对于上述浓缩处理并没有特别限定，例如有：除去溶剂；利用与水或/或有机溶剂的溶解性进行的可溶解组分的回收处理；不溶解组分的回收处理；通过水-疏水性有机溶剂进行的液液分配处理；重结晶处理；再沉淀处理；回收因冷却而产生的析出物的处理等，或者将选自上述处理的2种以上的处理组合的方法等。

对于上述分级、提纯处理并没有特别限定，例如：通过正相和/或反相色谱进行的处理等。

优选作为本发明美白剂以及抗氧化剂的有效成分的 camu camu 种子提取物含有没食子酸和/或其盐。另外，使用 camu camu 种子提取物作为胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂或抗老化剂的有效成分时，该提取物也可以含有没食子酸和/或其盐。

本发明的美白剂以及抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂和透明质酸酶活性抑制剂或抗老化剂中，有效成分 camu camu 种子提取物的用量可根据使用形式等适当选择。

本发明的皮肤外用剂和化妆品含有上述本发明的美白剂。本发明还可提供含有上述美白剂、抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂、抗老化剂中的至少一种的皮肤外用剂和化妆品。

对于上述化妆品的种类没有特别限定，例如有：化妆水、乳液、霜膏、面膜、洗净剂等皮肤护理化妆品；口红、粉底等彩妆化妆品；发用化妆品等，对其剂型没有特别限定，可以是任意的。另外，皮肤外用剂有软膏、各种皮肤用药等。

本发明的皮肤外用剂和化妆品中，本发明的美白剂、抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂或抗老化剂的混合比例可根据其种类和混合的其它成分的种类或量、形态等适当选择，通常，相对于皮肤外用剂或化妆品总量，换算为 camu camu 种子提取物的干燥物，为 0.001-20%重量，优选 0.01-10%重量。

在不损害本发明所希望的效果的范围内，本发明的皮肤外用剂或化妆品中可以混合通常作为化妆品原料使用的各种其它成分。其它成分例如有：水、油剂、表面活性剂、润滑剂、醇类、水溶性高分子剂、凝胶化剂、保湿剂、缓冲剂、防腐剂、抗炎剂、增稠剂、香料、维生素类、本发明的美白剂、抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂或抗老化剂以外的美白剂、抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸酶活性抑制剂或抗老化剂等。使用时，可以根据皮肤外用剂、化妆品的种类或其它目的、以及其形态等从其中适当选择进行混合。

本发明还可提供混合有以上述 camu camu 种子提取物作为有效成分的抗氧化剂，从而具有抗氧化作用的食物。该食品只要含有上述抗氧化剂即可。对食品的种类并没有特别限定，例如可以是糖、饮料、果酱、口香糖等。对其剂型并没有特别限制，可以是任意的。

上述食品中，上述抗氧化剂的混合比例可根据食品种类和该食品中混合的其它成分的种类或量适当选择，通常，相对于食品总量，换算为 camu camu 种子提取物的干燥物，为 0.001-10%重量，优选 0.01-8%重量。

在不损害本发明所希望的效果的范围内，上述食品中可以混合通常作为食品原料使用的各种其它成分。其它成分例如有：水、醇类、甜味剂、酸味剂、着色剂、防腐剂、香料、赋型剂等。使用时，可以根据食品的种类或其它目的以及其形态等，从其中适当选择进行混合。

本发明的美白剂以及抗氧化剂、胶原酶活性抑制剂、透明质酸

酶活性抑制剂和抗老化剂是以 camu camu 种子提取物为有效成分，显示强力的抗氧化活性、黑色素形成抑制作用、胶原酶活性抑制作用、透明质酸酶活性抑制作用和抗老化作用，同时安全性优异。因此，有望具有美白效果、抗老化作用，可用于皮肤外用剂、化妆品，另外有望具有源自活性氧的食品品质保持或防止氧化的作用，可用于食品中。除此之外还可以将以往作为工业废弃物的 camu camu 种子有效利用。

实施例

以下通过参考例、实施例和配方例进一步详细说明本发明，但本发明并不限于这些。

参考例 1

在粉碎后的 camu camu 种子中加入甲醇，在 25℃ 搅拌过夜进行提取。在 5℃、4000 rpm 下离心分离 45 分钟，粗滤后用 0.22 μm 滤器过滤。将所得 camu camu 种子的甲醇提取液进行减压蒸馏，蒸发干燥固化，将干燥固化物用纯净水溶解。向其中加入正己烷，振荡 5 分钟，静置，如此反复进行，分为正己烷和水溶性组分，直至正己烷组分无着色。向所得水溶性组分中加入乙酸乙酯，按照加入正己烷时同样的方法进行分级，分为乙酸乙酯组分和水溶性组分。将乙酸乙酯组分通过减压蒸馏进行浓缩，将其通过硅胶柱进行分级。用浓度比例调节为 11 级(10:0-0:10)的氯仿/甲醇混合液进行洗脱。收集用浓度比例为 5:5-0:10 的氯仿/甲醇混合液洗脱的组分，通过减压蒸馏进行蒸发干燥固化，将干燥固化物用纯净水溶解。

接着，将该水溶解物通过 C18 柱纯化。纯化如下进行：将由上述方法得到的水溶解物加入到 C18 柱中，再用纯净水洗涤柱，使所得的未吸附组分进行蒸发干燥固化。关于未吸附组分可得到两种形式的组分，开始得到着色的组分，接着得到透明的组分。分别通过

减压蒸馏进行蒸发干燥固化, 得到易溶于水的样品(A)和难溶于水的样品(B)。

LCMS 分析采用 LCT 质谱分析仪(micromass 公司制造)、通过离子化法(ESI)进行测定。NMR 分析使用 UNITY plus 500 型(Varian 公司制造), 观测频率设为 ^1H :500.2 MHz、 ^{13}C :125.8 MHz, 样品(A)的溶剂采用 D_2O , 样品(B)的溶剂采用 CD_3OD 。

样品(A)的 LCMS 分析结果表明: 在 m/z 169 观测到可能是去质子化分子((M-H) $^-$)的离子, 推测分子量为 170。另外 NMR 分析的结果表明: ^1H -NMR 谱中, 在 7.062 ppm 处观测到单峰、在 3.5-3.9 ppm 处观测到多种峰; ^{13}C -NMR 谱中, 在 110-146 ppm 处观测到四种双键碳、在 175.8 ppm 处观测到羰基碳。将其与没食子酸(Gallic acid)标准品的质谱进行比较, 结果分子量一致, 但 COOH 和 COOH 结合的碳的化学位移不同, 由此鉴定该物质为没食子酸盐。

另一方面, 对样品(B)的 LCMS 分析结果表明: 在 m/z 169 观测到可能是去质子化分子((M-H) $^-$)的离子, 推测分子量为 170。另外 NMR 分析的结果表明: ^1H -NMR 谱中, 在 7.060 ppm 处观测到单峰; ^{13}C -NMR 谱中观测到五种峰。将其与没食子酸标准品的谱进行比较, 结果化学位移一致, 分子量也一致, 由此鉴定该物质为没食子酸。

按照以下方法测定所得提取物(B)的抗氧化活性。

<DPPH 自由基清除能力测试>

在试管中加入 400 μl 提取物(B)、1200 μl 99.5%乙醇、1600 μl 0.25 M 乙酸缓冲液(pH5.5), 在 30 $^\circ\text{C}$ 预温育 5 分钟。在该试管中加入 800 μl 500 μM DPPH 溶液, 使其在 30 $^\circ\text{C}$ 反应 30 分钟, 30 分钟后以蒸馏水为对照准确测定 517 nm 的吸光度。由测定值计算 DPPH 自由基清除率, 求出 50%自由基清除能力(IC_{50})。另外对已知的抗氧化成分 α -生育酚也同样进行 DPPH 自由基清除能力测定。结果如图 1 所示。

由图 1 可知: 由蒸发残余物换算, camu camu 种子提取物的 50%DPPH 自由基清除能力(以下称为 IC_{50})为 $\text{IC}_{50}=0.06 \text{ mg/g}$, 与已知

的抗氧化成分 α -生育酚的 $IC_{50}=0.13$ mg/g 比较, 具有高的 DPPH 自由基清除能力。

参考例 2

5 将 1 kg camu camu 种子破碎, 加入 4 kg 水, 在室温下搅拌提取一夜以上。搅拌提取后进行离心分离, 分离为上清液和粗残余物, 去除残余物, 只收集上清液。为了进一步澄清, 进行分阶段的滤器过滤, 去除细的残余物。通过以上顺序, 得到约 4 kg (固态部分为 1%) 的澄清的水溶性 camu camu 种子提取物。以该提取物作为提取物(C)。

10 与参考例 1 同样, 对所得提取物(C)进行 DPPH 自由基清除能力测试。另外对已知的抗氧化成分 α -生育酚也同样进行 DPPH 自由基清除能力测定。结果如图 2 所示。由图 2 可知: 提取物(C)的 IC_{50} 为 0.10 mg/g。 α -生育酚的 IC_{50} 为 0.13 mg/g。

参考例 3

15 将 1 kg camu camu 种子破碎, 加入 1.17 kg 水和 0.5 kg 1,3-丁二醇的混合溶剂, 在室温下搅拌提取一夜以上。搅拌提取后进行离心分离, 分离为上清液和粗残余物, 去除残余物, 只收集上清液。为了进一步澄清, 进行分阶段的滤器过滤, 去除细的残余物。通过以上顺序, 得到约 1.3 kg (固态部分为 3%)由 30%的 1,3-丁二醇提取的澄清的 camu camu 种子提取物。以该提取物作为提取物(D)。

20 与参考例 1 同样, 对所得提取物(D)进行 DPPH 自由基清除能力测试。结果如图 2 所示。由图 2 可知: 提取物(D)的 IC_{50} 为 0.07 mg/g。

参考例 4

25 将 200 g camu camu 种子破碎, 加入 2 kg 乙醇, 在室温下搅拌提取一夜以上。搅拌提取后用滤器进行粗滤, 去除残余物, 只收集上清液。接着进行减压蒸馏, 去除乙醇。向蒸发干燥固后所得物质中加入 500 g 水进行溶解, 为了澄清, 进行分阶段的滤器过滤。通过

以上顺序，得到约 500 g (固态部分为 2.5%)由乙醇提取的水溶性的澄清的 camu camu 种子提取物。以该提取物作为提取物(E)。

与参考例 1 同样，对所得提取物(E)进行 DPPH 自由基清除能力测试。结果如图 2 所示。由图 2 可知：提取物(E)的 IC_{50} 为 0.10 mg/g。

5

参考例 5

使用参考例 3 中制备的提取物(D)，进行以下所示的亚油酸自氧化抑制能力测试。

<亚油酸自氧化抑制能力测试>

10 将 2 ml 含有 2.5% (w/v)亚油酸的乙醇和 4 ml 0.05M 磷酸缓冲液 (pH 7.0)混合，制成反应液。接着，用 2 ml 99.5%乙醇和 2 ml 蒸馏水进行稀释调节，使其含有任意量的提取物(D)。将调节后的稀释物添加到上述反应液中，使总量为 10 ml，混合后，装入褐色螺口瓶，以此作为样品。

15 另外使用不添加任何被测物，只在反应液中添加 2 ml 99.5%乙醇和 2 ml 蒸馏水的样品作为阴性对照。使用 α -生育酚和 BHA，按照同样的操作方法制备成与提取物(D)同浓度的样品，以此作为阳性对照。为了进一步验证提取物(D)的抗氧化作用不仅仅是由上述 camu camu 种子提取物中所含的没食子酸引起的，还使用了按照与提取物(D)同样的操作方法将没食子酸制成以下所示浓度的样品。

20 没食子酸的浓度采用提取物(D)中可能含有的最大量进行。即，通过 Folin-Denis 法测定提取物(D)中的多酚含量。得到了相对于提取物(D)，多酚所占比例约为 20%的结果。没食子酸是多酚的一种，因此，例如假设提取物(D)中的多酚全部都为没食子酸，则其在提取物(D)中所占的最大值为约 20%，可以说含有该浓度以上的没食子酸的可能性非常小。因此推定提取物(D)中所含的没食子酸的浓度为 20%。

25 将制备的各样品置于暗处，在 40℃保存，以此作为样品，将在 4℃暗处保存的作为背景，隔一段时间取出被检物，测定 7 天。

用吸光度仪测定溶解的黑色素和使用 BIO-RAD 公司制造的 DC-蛋白测定试剂盒进行蛋白量的测定。

使用空白培养基作为对照，以该黑色素生成抑制率为 0%时，各样品的黑色素生成抑制率通过下式计算。结果如图 5 所示。

- 5 黑色素生成抑制率(%)=100-([1 mg 样品的总蛋白中黑素量的平均值]÷[1 mg 对照的总蛋白中黑素量的平均值])×100

图 5 中，黑色素生成抑制率数值越高，则可以说美白活性越高，因此可判断作为 camu camu 种子提取物的提取物(D)具有非常高的美白活性。

- 10 另外，总蛋白量与细胞数成比例，因此，测定各试验培养基的总蛋白重量，进行了对细胞增殖的影响的确认。结果如图 6 所示。

由图 6 可知：未见各样品对细胞增殖的影响有任何问题。并且显微镜观察下也未见问题。

15 实施例 2

按照 1997 年 3 月 26 日日本厚生省令第 21 号“关于药品安全性的非临床试验实施基准的省令(部颁标准)”进行参考例 3 中制备的 camu camu 种子提取物(D)的安全性试验。结果如表 1 所示。

使用大鼠的单次经口给予毒性试验

- 20 2 组大鼠(对照组、给予组)，雌雄各 5 只/组，进行试验，给予组按照 2g/kg 体重给予。

使用豚鼠的皮肤单次刺激性试验

在 3 只豚鼠的健康皮肤上进行 24 小时密封贴用，在给予后 24 小时、48 小时和 72 小时，分别观察皮肤的状态进行判定。

25 使用豚鼠的 14 天皮肤累积刺激性试验

在 3 只豚鼠的健康皮肤上，在开放体系下，每天涂布一次，连续 14 天，在试验期间，每天在涂布前和涂布后 24 小时分别观察皮肤的状态进行判定。

使用豚鼠的皮肤致敏性试验

3 组豚鼠(对照组、涂布组、DNCB 组), 5 只/组, 按照佐剂和皮肤斑试验法(Adjuvant and Patch Test)进行试验, 涂布后 24 小时和 48 小时, 分别观察皮肤的状态进行判定。

5 使用豚鼠的皮肤光毒性试验

按照森川藤凰等人的方法, 在 10 只豚鼠的背部皮肤上进行试验, 紫外线照射后 24 小时、48 小时和 72 小时, 分别观察皮肤的状态进行判定。

使用豚鼠的皮肤光致敏性试验

10 3 组豚鼠(对照组、涂布组、TCSA 组), 5 只/组, 按照 Adjuvant and Strip 法进行试验, 紫外线照射后 24 小时和 48 小时, 分别观察皮肤的状态进行判定。

使用兔的眼粘膜刺激性试验

15 以 2 组兔(非洗眼组、洗眼组), 3 只/组进行试验。滴眼后, 对非洗眼组不进行处理, 用微温的生理盐水对洗眼组清洗约 1 分钟, 然后在 1 小时、24 小时、48 小时和 72 小时后观察角膜、虹膜和结膜的状态, 由 AFNOR 区分进行判定。

使用细菌的回复突变试验

按照预温育法, 对未添加 S9mix 和添加 S9mix 的情况进行测定。

20 · 使用菌株: 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) TA100、TA98、TA1535、TA1537

· 使用菌株: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)WP2uvrA

使用哺乳类的培养细胞的染色体异常试验

25 使用哺乳类的培养细胞(CHL/TU 细胞), 采取短时间处理法(6 小时处理: 未添加 S9mix 和添加 S9mix)和连续处理组(处理 24 小时和 48 小时)对 3 组(阴性对照组、受检物质组、阳性对照组)进行研究。

表 1

安全性试验项目	结果
1)使用大鼠单次经口给予毒性试验	无毒性
2)使用豚鼠的皮肤单次刺激性试验	无刺激性
3)使用豚鼠的 14 天皮肤累积刺激性试验	无刺激性
4)使用豚鼠的皮肤致敏性试验	无致敏性
5)使用豚鼠的皮肤光毒性试验	无光毒性
6)使用豚鼠的皮肤光致敏性试验	无光致敏性
7)使用兔的眼粘膜刺激性试验	无眼刺激性
8)使用细菌的回复突变试验	无致突变性
9)使用哺乳类的培养细胞的染色体异常试验	无异常

参考例 6

使用参考例 2 制备的提取物(C)、参考例 3 制备的提取物(D)和参
考例 4 制备的提取物(E), 以及比较对照没食子酸一水合物, 按照以
下方法测定胶原酶活性抑制作用。

<胶原酶活性抑制作用试验>

[试剂的制备]

底物溶液: 将 0.39 mg Pz-肽(BACHEM 公司制造)溶解于 1 ml
0.1M Tris 盐酸缓冲液(pH 7.1、含 20mM 氯化钙)中使用(相当于 0.5
mM)。

酶溶液: 将 5 mg 胶原酶(IV 型、SIGMA 公司制造)溶解于 1 ml
蒸馏水, 分别取 100 μ l, 在-20 $^{\circ}$ C下保管, 使用时用蒸馏水稀释为 50
倍, 用于反应。

提取物(C)、提取物(D)和提取物(E)都是溶液, 分别用提取溶剂(蒸
馏水、30%重量 1,3-丁二醇)进行稀释, 使 camu camu 种子提取物按
照干燥固态物质计算的浓度为 100 μ g/ml, 制成样品。在 50 μ l 该样品
中混合 50 μ l 酶溶液和 400 μ l 底物溶液, 在 37 $^{\circ}$ C反应 30 分钟。接着,

用 1 ml 25 mM 柠檬酸溶液使反应终止，用 5 ml 乙酸乙酯提取。离心分离(3000rpm、10 分钟)后，取乙酸乙酯层。以乙酸乙酯作为对照，测定波长 320 nm 下的吸光度。

5 使用各提取溶剂代替样品，以此作为对照，另外使用蒸馏水代替酶溶液，以此作为空白，进行同样的操作。

此时，为了证实 camu camu 种子提取物的胶原酶活性抑制作用并不仅仅是由 camu camu 种子提取物中所含的没食子酸引起的，将没食子酸一水合物用蒸馏水进行浓度调节，使其达到与各提取物一样的 100 µg/ml 的浓度，制成样品。

10 通过下式，从这些值计算胶原酶活性抑制率。结果如图 7 所示。

胶原酶活性抑制率(%)=[1-(样品的吸光度-样品空白的吸光度)÷(对照的吸光度-对照空白的吸光度)]×100

参考例 7

15 使用没食子酸一水合物作为比较对照，按照以下方法对参考例 3 中制备的提取物(D)的透明质酸酶活性抑制作用进行测定。透明质酸酶活性抑制的测定通过应用了 Morgan-Elson 法的前田有美惠等人的方法(食卫志、31 卷、233-237、1990 年)进行。

20 <透明质酸酶活性抑制作用试验>

[试剂的制备]

酶溶液：将牛睾丸透明质酸酶(和光纯药工业(株))溶解于 0.1 M 乙酸缓冲液(pH=4.0)，调节至最终酶活性为 400 单位/ml。

25 酶活化溶液：将 compound 48/80(SIGMA)溶解于 0.1 M 乙酸缓冲液(pH=4.0)，调节至最终浓度为 0.1 mg/ml。

底物溶液：将透明质酸钾(和光纯药工业(株))溶解于 0.1 M 乙酸缓冲液(pH=4.0)，调节至最终浓度为 0.4 mg/ml。

硼酸溶液：在 4.95 g 硼酸中加入 50 ml 水，用 1N 氢氧化钠溶液

调节至 pH=9.1, 加入蒸馏水, 调节为 100 ml。

对二甲基氨基苯甲醛(p-DAB)试剂: 在 12.5 ml 10N 盐酸和 87.5 ml 乙酸的混合液中溶解 10 g p-DAB(和光纯药工业(株)), 冷藏保存。临使用前用乙酸稀释 10 倍使用。

5 参考例 3 的提取物(D)是溶液, 因此用作为提取溶剂的 30%重量 1,3-丁二醇水溶液稀释, 使 camu camu 种子提取物按照固态物质计算的浓度为 1 mg/ml, 以此为上限, 进一步用提取溶剂稀释, 进行浓度调节。制成样品。向 0.2 ml 该样品中加入 0.1 ml 酶溶液, 在 37℃加热 20 分钟。接着加入 0.2 ml 酶活化溶液, 在 37℃加热 20 分钟, 再
10 再加入 0.5 ml 底物溶液, 在 37℃反应 40 分钟, 然后加入 0.2 ml 0.4N 的氢氧化钠水溶液, 同时冰冷却, 使反应终止。加入 0.2 ml 硼酸溶液, 通过热浴(TOYO SEISAKUSHO、型号 TPB-32)加热 5 分钟, 然后冰冷却, 加入 6 ml p-DAB 试剂, 在 37℃加热 20 分钟, 使其显色, 以蒸馏水作为对照, 测定 585 nm 下的吸光度。

15 使用提取溶剂代替样品, 此作为对照, 另外加入 0.1 M 乙酸缓冲液(pH=4.0)代替酶溶液, 以此作为空白, 进行同样的操作。

 此时, 为了证实提取物(D)的透明质酸酶活性作用抑制并不仅
 仅是由 camu camu 种子提取物中所含的没食子酸引起的, 按照与处
 理提取物(D)同样的方法, 对没食子酸一水合物进行浓度调节。此时
20 没食子酸一水合物的浓度与实施例 5 同样, 推定为 camu camu 种子
 提取物的干燥固态物质质量的 20%。

 通过下式, 从这些值计算透明质酸酶活性抑制率。结果如图 8 所示。

 透明质酸酶活性抑制率(%)=[1-(样品的吸光度-样品空白的吸光
25 度)÷(对照的吸光度-对照空白的吸光度)]×100

 由图 8 可以判断: 提取物(D)具有与浓度相关的抑制透明质酸酶活性的能力。

配方例 1

将 0.20 重量份甘草酸二钾、0.10 重量份柠檬酸、0.30 重量份柠檬酸钠、5.00 重量份参考例 3 中制备的提取物(D)和 5.00 重量份 1,3-丁二醇混合，加入纯净水，使总量为 80.0 重量份，在 50℃下一边搅拌一边溶解，制成含有提取物(D)的水溶液。

接着，将 0.90 重量份 POE (60)山梨醇四油酸酯、0.10 重量份失水山梨醇一油酸酯、适量的防腐剂和 10.00 重量份乙醇混合，在 50℃下一边搅拌一边溶解。接着，将所得溶液一点点加入到最初制备的含提取物(D)的水溶液中，在 50℃混合搅拌。均匀混合后进一步搅拌，同时将液温由 50℃下降到 30℃，在到达 30℃时停止搅拌，加入适量的香料和纯净水，使总量为 100.00 重量份。再次混合搅拌，均匀混合，制成化妆水。

配方例 2

将 10.00 重量份角鲨烯和适量的防腐剂混合，加入纯净水，调节至总量为 70.00 重量份，加热至 80℃，制成溶液(1)。另外，将 0.10 重量份羧基乙烯基聚合物和 0.20 重量份黄原酸胶加入到适量的纯净水中，在常温下搅拌溶解，制成溶液(2)。再将 0.10 重量份三乙醇胺和 5.00 重量份 1,3-丁二醇加入到适量的纯净水中，在常温下搅拌溶解，制成溶液(3)。又将 2.00 重量份透明质酸钠和 5.00 重量份参考例 3 中制备的提取物(D)加入到适量的纯净水中，在常温下搅拌溶解，制成溶液(4)。

接着，向适量的纯净水中一点点加入溶液(1)，在 80℃混合搅拌，并一边搅拌一边加入溶液(2)，接着加入溶液(3)。均匀混合后，一边搅拌一边将溶液降温至 50℃，在到达 50℃时加入溶液(4)，再加入纯净水，将总量调节至 100 重量份。再次搅拌，直至溶液为 30℃，在到达 30℃时停止搅拌，制成均匀混合的乳液。

配方例 3

将 2.00 重量份 POE (20) 失水山梨醇一硬脂酸酯、0.50 重量份 POE 失水山梨醇四油酸酯、0.50 重量份一硬脂酸甘油酯、7.00 重量份硬脂酸、3.00 重量份鲸蜡醇、3.00 重量份棕榈酸鲸蜡醇酯、7.00 重量份霍霍巴油、3.00 重量份石蜡和适量的防腐剂混合，在 80℃ 边搅拌边溶解，制成溶液(1)。另一方面，将 5.00 重量份参考例 3 中制备的提取物(D)、7.00 重量份 1,3-丁二醇和 62 重量份纯净水混合，在 80℃ 边搅拌边溶解，制成溶液(2)。

接着，向溶液(2)中一点点加入溶液(1)，乳化，边搅拌边冷却，降温至 40℃ 时停止搅拌，制成均匀混合的霜膏。

配方例 4

将 54.00 重量份粒状糖溶解于适量的纯净水中，接着将该溶解物与 41.70 重量份液体糖浆混合，加热并煮熟。接着，一边均匀混合搅拌，一边一点点加入 1.00 重量份柠檬酸和 0.3 重量份香料，边搅拌边冷却至 90℃，然后加入 3.00 重量份参考例 2 中制备的提取物(C)进行搅拌。按照常规方法将所得均匀混合物成型，制成糖。

配方例 5

在 65.00 重量份草莓果实中一点点加入 32.00 重量份砂糖，一边搅拌一边加热，煮熟。在糖浓度达到 65% 以上时停止加热，加入 2.50 重量份参考例 2 中制备的提取物(C)、0.15 重量份柠檬酸和适量的香料，均匀混合。趁热时将所得浓缩液装瓶并灭菌，迅速冷却，制成果酱。

实施例 3

将 0.1 重量份柠檬酸钠、1.0 重量份吡咯烷酮羧酸钠和 3.5 重量份 1,3-丁二醇混合，加入纯净水，使总量为 50.0 重量份，在 50℃ 边

搅拌边溶解，制成溶液(1)。接着将 0.6 重量份 POE (30)POP (6)癸基十四烷基醚、10.0 重量份乙醇和 0.1 重量份对羟基苯甲酸甲酯混合，在 50℃ 边搅拌边溶解，制成溶液(2)。

5 将溶液(1)一点点加入到溶液(2)中，同时在 50℃ 混合搅拌，再一边搅拌一边将温度降至 30℃，到达 30℃ 时，加入 5.0 重量份参考例 3 中制备的 camu camu 种子提取物(D)，混合。向其中加入纯净水，将总量调节至 100 重量份，均匀混合搅拌，制成 5%重量配比的化妆水。

10 用同样的方法，使 1,3-丁二醇为 4.7 重量份、camu camu 种子提取物(D)为 1.0 重量份，制成 1%重量配比的化妆水。

用同样的方法，使 1,3-丁二醇为 5.0 重量份、不添加 camu camu 种子提取物(D)，制成空白化妆水。

对于所得化妆水制剂，用 DPPH 自由基清除能力测试，对混合有 camu camu 种子提取物的化妆水的抗氧化活性进行评价。

15 <DPPH 自由基清除能力测试>

(试验方法)

以空白化妆水作为对照，以参考例 1 为基准，对混合有 1%重量和 5%重量上述制备的 camu camu 种子提取物(D)的化妆水制剂的抗氧化活性进行测定，由其测定值计算 DPPH 自由基清除率。

20 (试验结果)

关于混合有 camu camu 种子提取物(D)的化妆水制剂的 DPPH 自由基清除率，5%重量配比的化妆水为 87.2%，1%重量配比的化妆水为 26.8%。由此表明：camu camu 种子提取物的混合浓度越高的化妆水制剂，越显示优异的抗氧化活性。

25

图 1

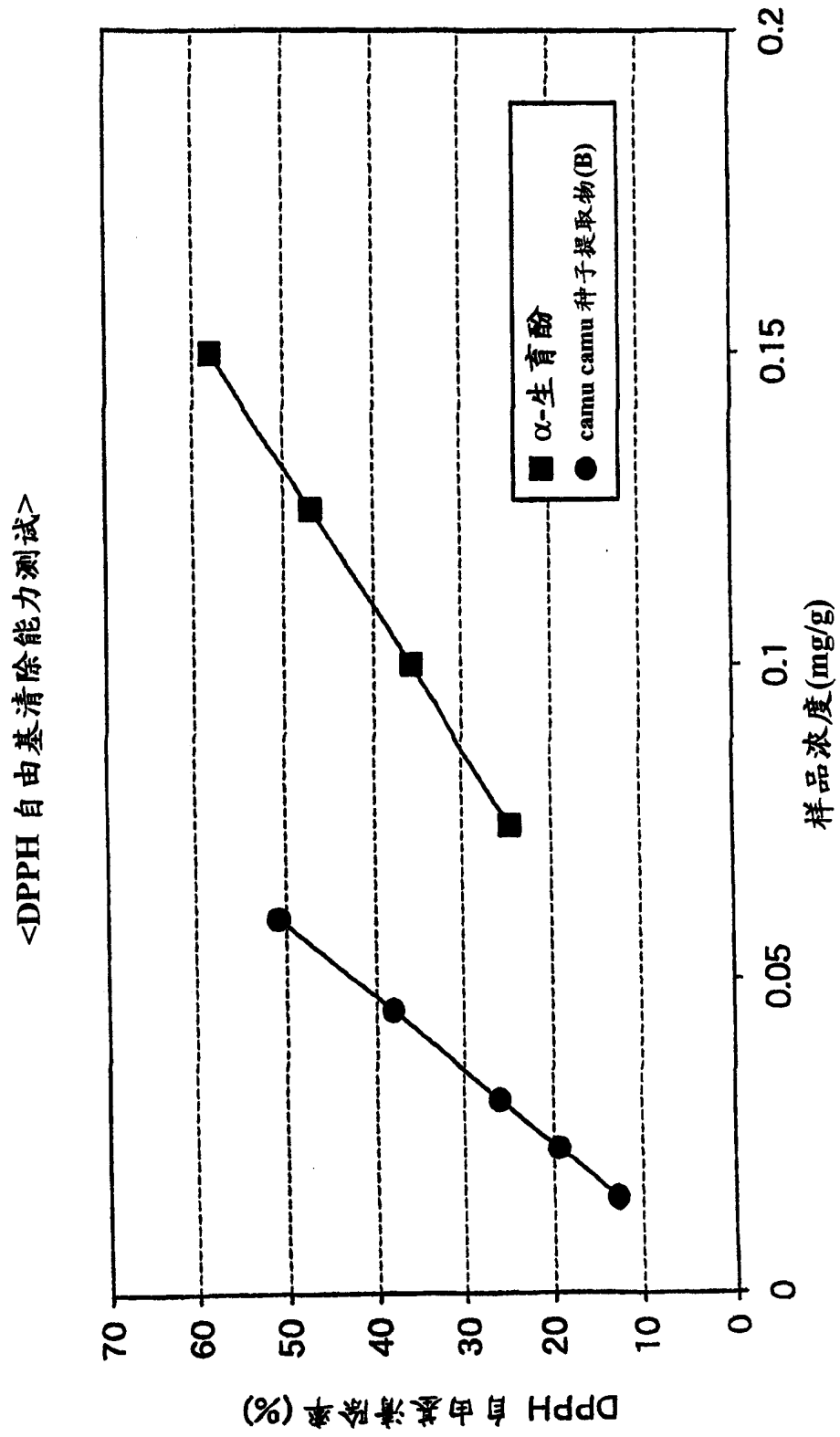


图 2

<DPPH 自由基清除能力测试>

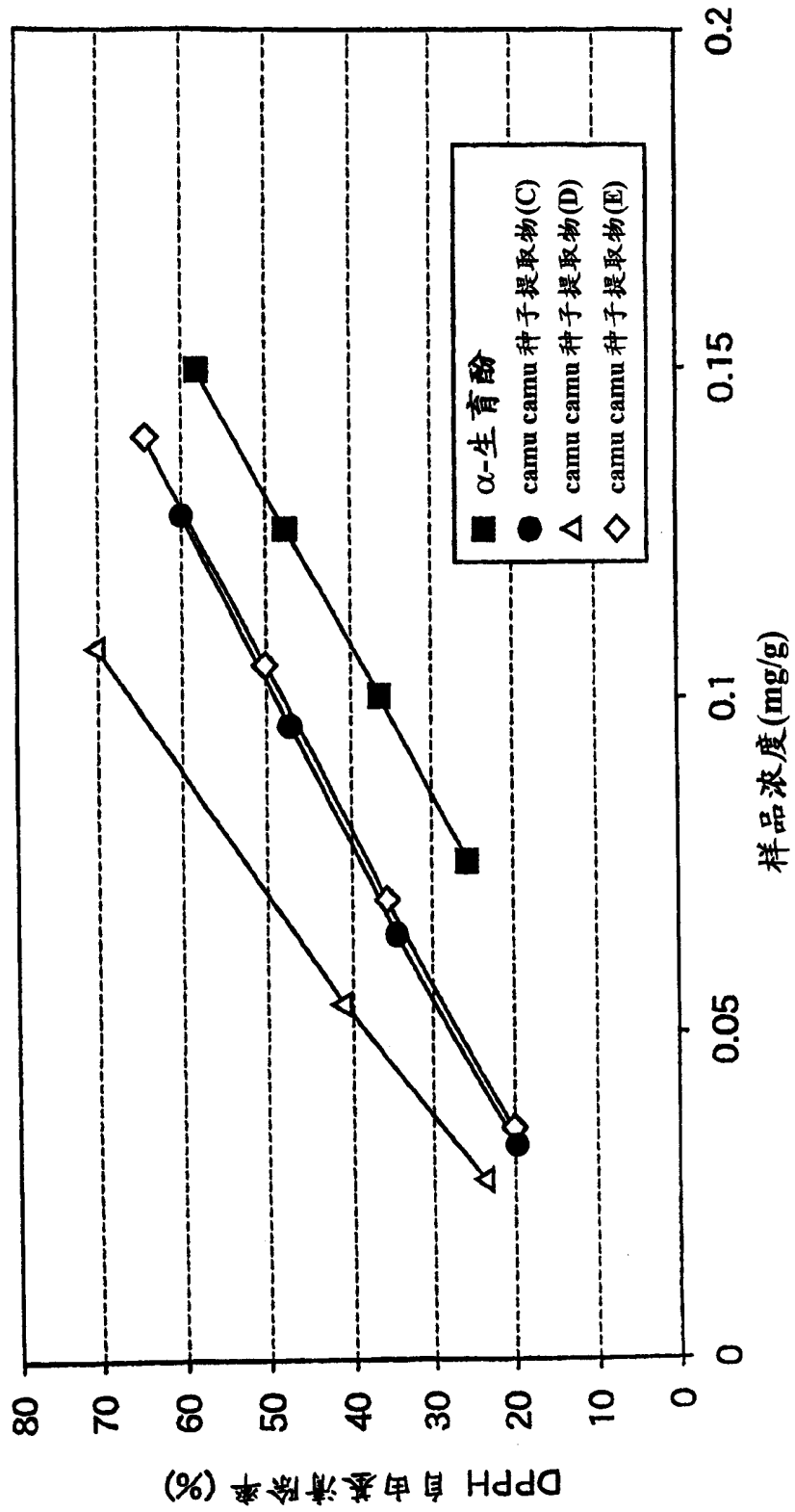


图 3

<亚油酸自氧化抑制能力测试: 0.02%组分>

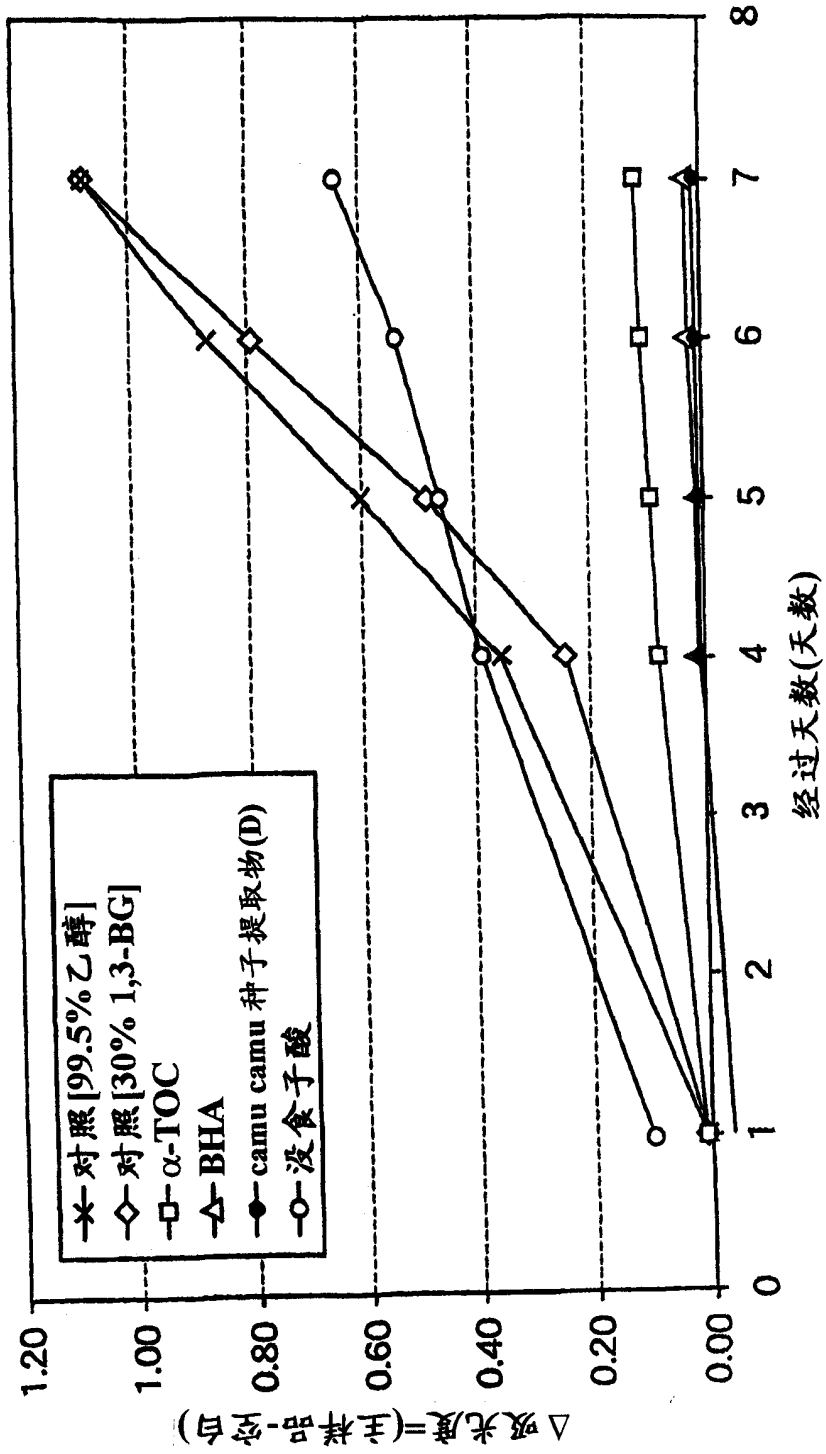


图 4

<亚油酸自氧化率: 0.02%组分(第7天)>

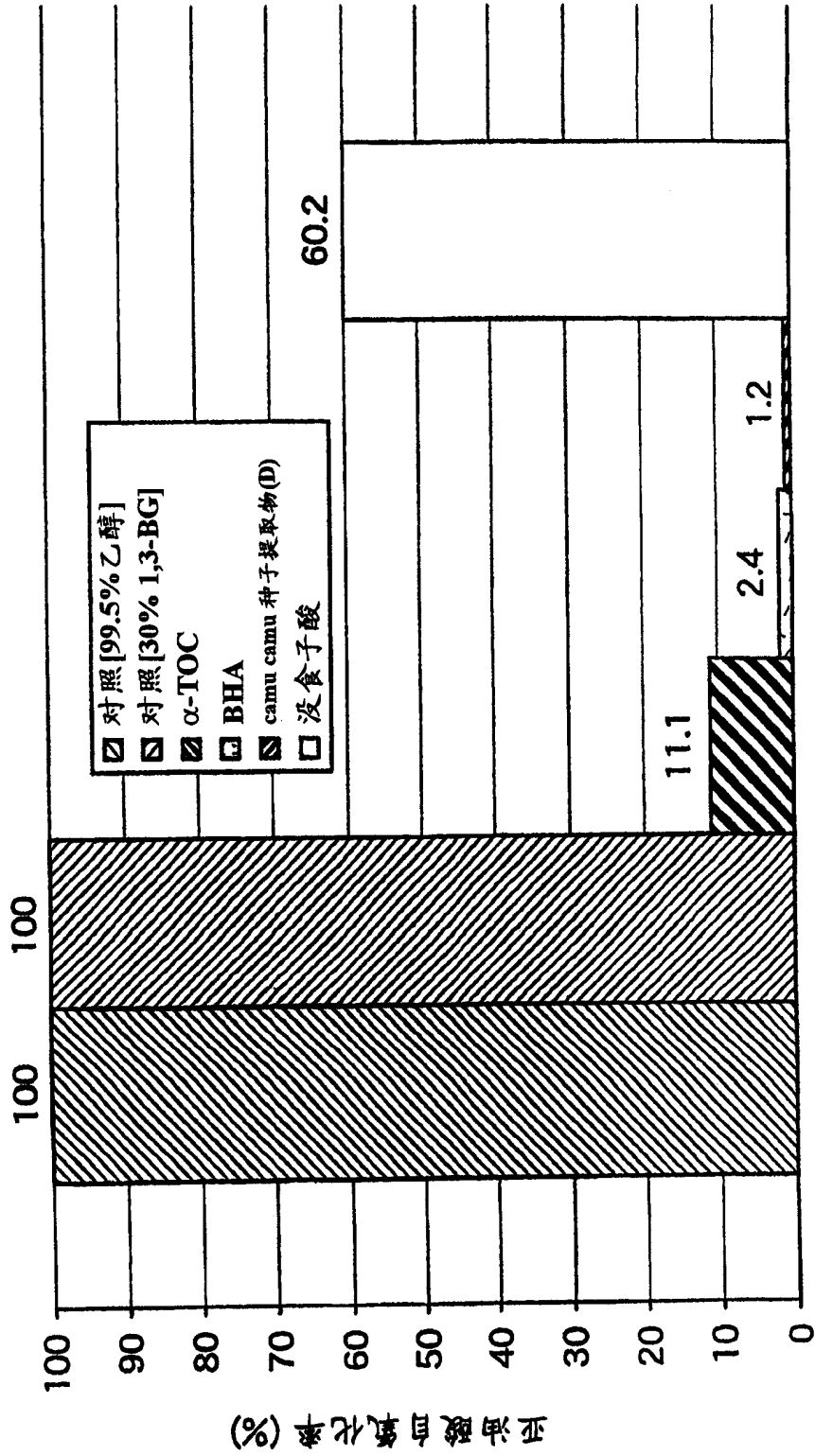


图 5
<B16 黑色素生成抑制比率>

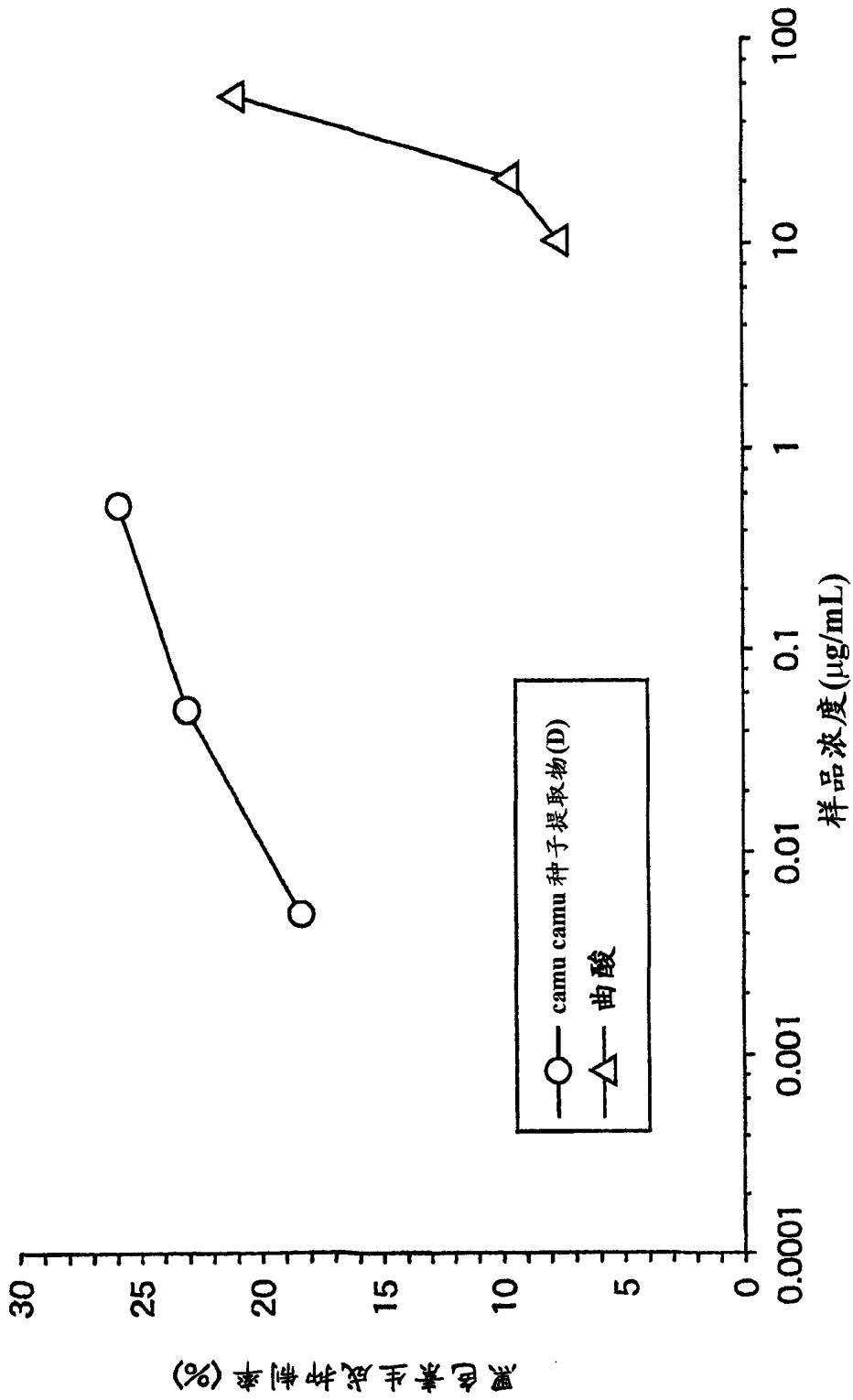


图 6

<对细胞增殖的影响>

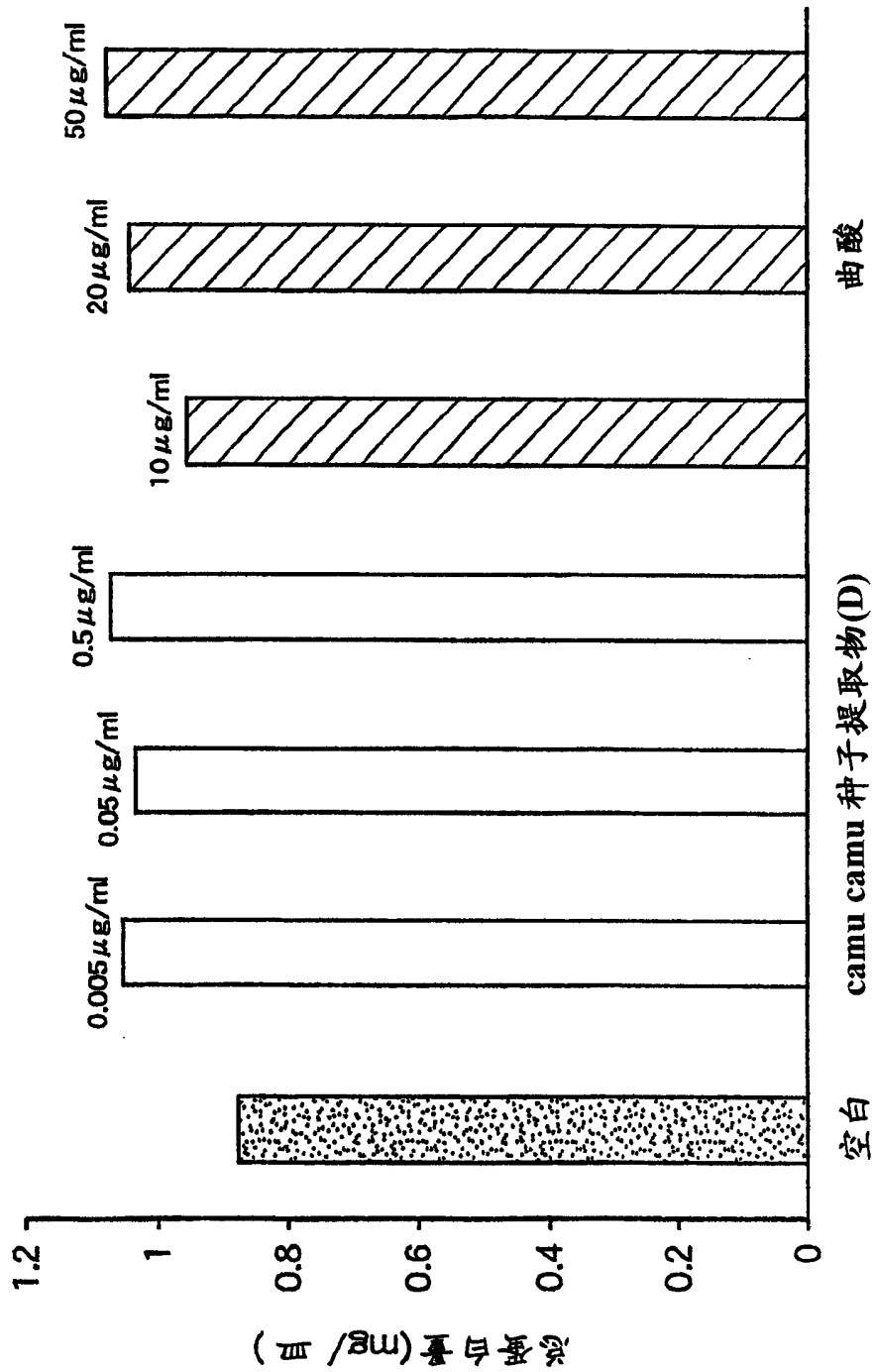


图 7
<胶原酶活性抑制率>
样品浓度(100µg/ml)

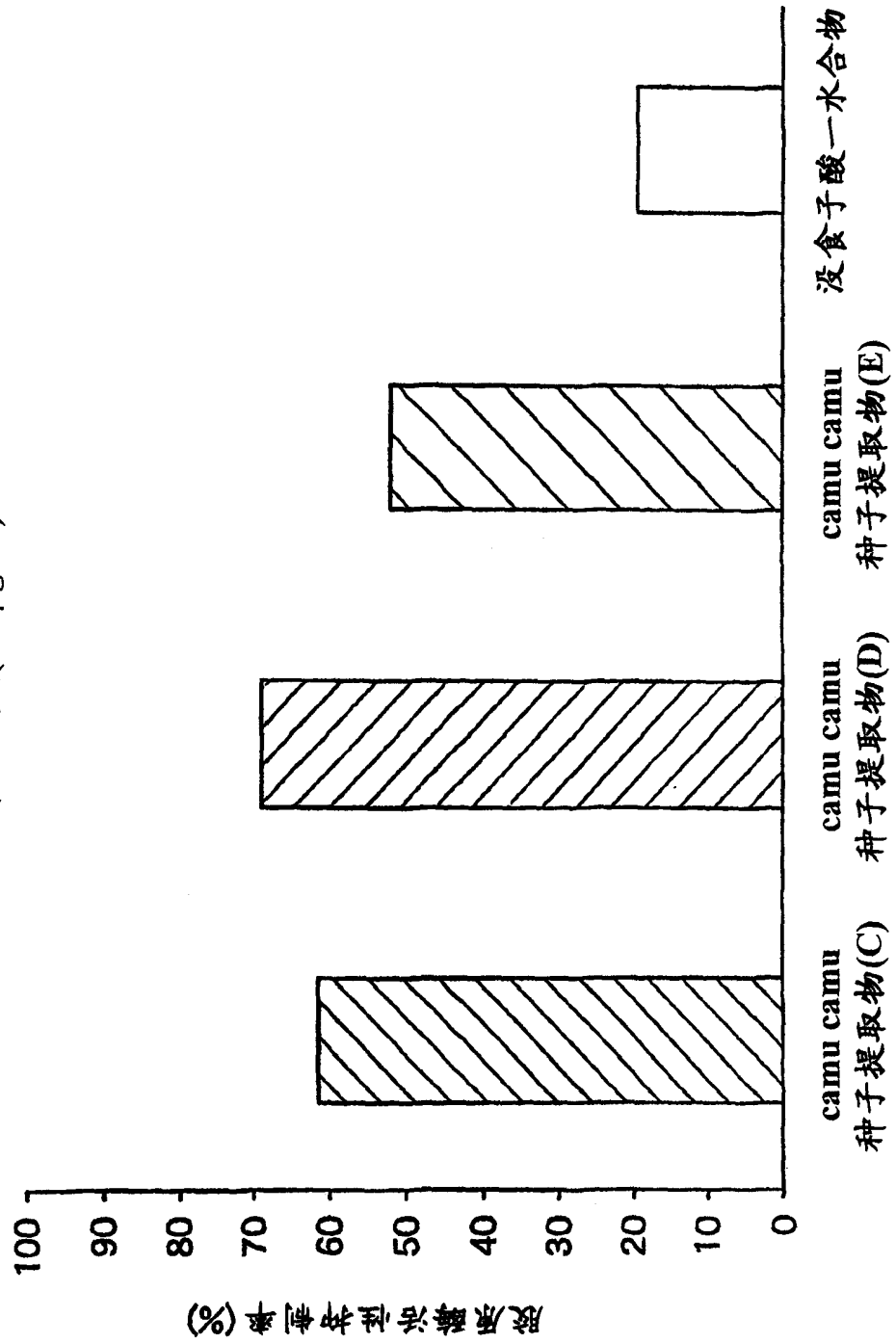


图 8
<透明质酸酶活性抑制作用试验>

