



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115568822 A

(43) 申请公布日 2023. 01. 06

(21) 申请号 202211103740.9

(22) 申请日 2022.09.09

(71) 申请人 上海家化联合股份有限公司
地址 200082 上海市虹口区保定路527号

(72) 发明人 周滢 何永红 袁登峰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 张静

(51) Int. Cl.

A61B 5/00 (2006.01)

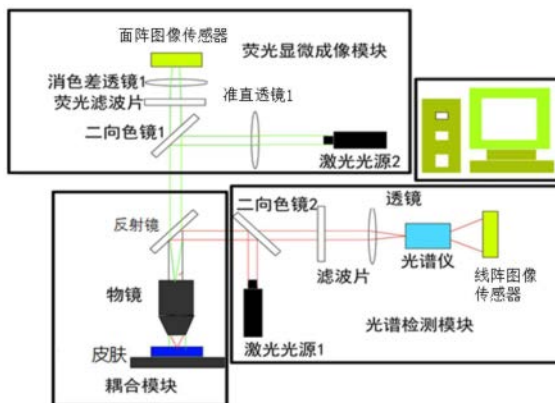
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

检测皮肤自发荧光的装置及抗糖化功效评价方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测皮肤自发荧光及其含量的装置,包括:成像及检测系统和附属器件系统,成像及检测系统包括荧光显微成像模块、荧光光谱检测模块及耦合模块,荧光显微成像模块与耦合模块光学耦合连通,荧光光谱检测模块与耦合模块光学耦合连通,附属器件系统包括操作模块、位置固定模块和被测部位承载模块。本发明还涉及采用所述小型无创装置评价抗糖化功效的方法。



1. 一种检测皮肤自发荧光及其含量的装置,所述装置包括:

- (i) 成像及检测系统;和
- (ii) 附属器件系统,

其中,所述成像及检测系统包括荧光显微成像模块、荧光光谱检测模块及耦合模块,所述荧光显微成像模块与所述耦合模块光学耦合连通,所述荧光光谱检测模块与所述耦合模块光学耦合连通,

其中,所述附属器件系统包括操作模块、位置固定模块和被测部位承载模块,

其中,所述荧光光谱检测模块包括第一光源和线阵图像传感器,并且与耦合模块中的待测样品光学耦合连通,所述线阵图像传感器连接操作模块,显示出强度和波长的参数,

其中,所述荧光显微成像模块包括第二光源和面阵图像传感器,并且与耦合模块中的待测样品光学耦合连通,所述面阵图像传感器连接操作模块,显示出样品荧光图像。

2. 如权利要求1所述的装置,其中,所述第一光源是波长350-390nm的激光光源,所述第二光源是波长350-390nm的激光光源。

3. 如权利要求1所述的装置,其中,所述装置用于检测的荧光物质选自:黄素、脂褐素、晚期糖基化终末产物AGEs、还原型辅酶INADH、类胡萝卜素、氧化黑色素、卟啉、胶原蛋白、氨基酸、弹性蛋白以及它们的组合。

4. 如权利要求1所述的装置,其中,所述荧光光谱检测模块还包括第二二向色镜,其反射光并通过光路使激发光汇聚到待测样品上以激发样品产生散射的荧光,样品激发出的散射的荧光再通过光路汇聚到线阵图像传感器上。

5. 如权利要求4所述的装置,其中,样品激发出的散射的荧光通过物镜变为平行光,经反射镜,透过第二二向色镜和滤波片,经过透镜,汇聚到光谱仪中,形成光谱汇聚到线阵图像传感器上。

6. 如权利要求1所述的装置,其中,所述荧光显微成像模块还包括第一二向色镜,其反射光并通过光路使激发光照射到待测样品上以激发样品产生荧光,样品激发出的荧光再通过光路成像到面阵图像传感器上。

7. 如权利要求6所述的装置,其中,样品激发出的荧光通过物镜,透过第一二向色镜,荧光滤光片,消色差透镜,成像到面阵图像传感器上。

8. 如权利要求1所述的装置,其中,所述操作模块用于实现荧光图像及荧光光谱的实时采集、图像拍摄、数据分析、标线拟合或其组合。

9. 一种抗糖化功效的评价方法,所述方法包括:

- (a) 标记皮肤待测区域;
- (b) 采用如权利要求1-8中任一项所述的装置测定标记区域的皮肤荧光强度及含量的基础值;
- (c) 使用待测样品;
- (d) 采用如权利要求1-8任一项所述的装置测定使用样品后标记区域的皮肤荧光强度及含量;
- (e) 将步骤(d)的结果与步骤(b)的结果进行比较,以评价抗糖化功效。

10. 如权利要求9所述的方法,其中,所述步骤(e)包括基于荧光物质的标准曲线比较步骤(d)和步骤(b)的结果,以评价抗糖化功效。

11. 如权利要求9所述的方法,其中,所述步骤(e)包括基于标准荧光色卡比较步骤(d)和步骤(b)的结果,以评价抗糖化功效。

12. 如权利要求9所述的方法,其中,所述待测样品选自:内服药品、保健品、外用药品、外用保健品和皮肤外用剂。

检测皮肤自发荧光的装置及抗糖化功效评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及功效检测领域,具体涉及一种小型无创检测皮肤AGEs含量的装置及抗糖化功效评价方法,尤其可以用于内服药品、保健品,或外用药品、外用保健品及皮肤外用剂的抗糖化功效。

背景技术

[0002] 晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products AGEs)是非酶糖基化反应(Maillard反应)的终末产物,是指蛋白质、脂质或核酸等大分子在没有酶参与的情况下,自发的与葡萄糖或其他还原单糖反应所生成的稳定且不可逆的共价加成物,是非酶糖基化衰老理论的最终产物,是研究衰老的一项重要指标。非酶糖基化衰老理论是目前已被众多学者公认的衰老理论之一。

[0003] 1912年,法国科学家Maillard最早报道了AGEs。AGEs呈棕黄色,具有荧光特性(最大激发波长370nm,最大发射波长440nm)、不可逆性、交联性、结构异质性、不易被降解、对酶稳定等特性。在肌体的不同组织器官中,如血管内皮细胞、神经细胞、胶原、晶状体循环系统以及肾脏、肝脏、肺脏、血管、腹膜等组织纤维中,都有存在,且随着年龄的增长不断积聚。截至目前尚未发现能够使AGEs生成逆转的细胞系,且尚未发现任一蛋白水解途径可以清除细胞内的AGEs,尤其是涉及到蛋白质的交联时;体内AGEs的清除主要是通过单核巨噬细胞的吞噬作用经肾脏清除。

[0004] AGEs的来源分为外源性和内源性两种,其主要通过三种机制对肌体造成损害:通过与蛋白质、脂质、核酸等大分子物质直接交联结合破坏其结构和功能;影响信号传导途径和酶活性;与细胞表面的AGEs受体相互作用,引发生物学效应。

[0005] 糖基化会造成蛋白质交联损伤,使正常的蛋白结构转变成老年蛋白结构,一些胞内蛋白已被证明在肌体老化的病理中被糖化和失活,主要参与反应的氨基酸残基有赖氨酸、精氨酸、组氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸以及苏氨酸等。糖基化还会造成结构蛋白的硬化,功能酶的损伤,能量供应的减少,代谢功能的降低,并引起免疫功能受损,平衡机能失调,基因突变等一系列老化过程。由于占据共同的蛋白结合位点,糖基化还可抑制泛素结合和泛素介导的降解。此外,糖基化和氧化联系紧密,糖基化过程产生ROS,且AGE-蛋白自身就是ROS的来源。糖基化还抑制糖激酶的转录。溶酶体调节功能(大自噬、蛋白酶表达)的缺失可能部分是由于AGEs的恶性循环促进脂褐素(亦称蜡样质或AGE-色素样脂质体,是溶酶体中一种与年龄相关的交联蛋白和聚集物质)的形成而造成的。

[0006] 众多研究表明AGEs通过与细胞表面的特异性受体结合起作用。细胞表面的RAGEs(免疫球蛋白超家族成员,可表达于血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、淋巴样细胞、肾小球系膜细胞、巨噬细胞、神经元细胞以及肿瘤细胞等,目前已识别的种类包括巨噬细胞清道夫受体I型和II型、寡糖转移酶-48、80K-H磷蛋白、galectin-3等)与AGEs等配体结合后,可诱导单核细胞的趋化和氧化应激反应,并生成大量的氧自由基,激活信号传导通路,刺激白细胞介素I(IL-1)、胰岛素样生长因子I、肿瘤坏死因子(TNF- α)、血小板来源生长因

子(PDGF)、无粒白细胞-巨噬细胞克隆刺激因子的释放和表达,尤其是激活转录因子NF- κ B,它的激活可诱导产生多种损伤因子,产生致病效应,从而激活和损害细胞内的蛋白质、核酸,引发复杂的生物学效应,导致细胞的功能和结构异常,从而影响器官的结构和功能。

[0007] 研究表明,AGEs会加速人体衰老。Se11等人检测八种哺乳动物的皮肤戊糖素水平,发现其生成率与物种的最大寿限高度相关。此外,AGEs还会导致多种慢性退化型疾病的发生,包括白内障、动脉粥样硬化、阿尔兹海默病、皮克氏病、帕金森病、中风、淀粉样变性、肾病、糖尿病、神经病变和视网膜病变等。

[0008] 就皮肤而言,AGEs与胶原蛋白交联结合,造成其断裂,致使皮肤弹性下降,出现萎缩,进而产生皱纹。不仅如此,过多的AGEs附着在肌肤上,还会使其逐渐变黄,黯淡无光。早期的一项研究证实蛋白代谢是不同类型胶原蛋白AGEs积累的主要决定因素,并估算出皮肤胶原蛋白的半衰期为15年,软骨胶原蛋白的半衰期为117年。如此长的半衰期,如不加以干预,很容易蓄积AGEs,造成皮肤老态。

[0009] 因此,AGEs是肌体衰老以及多脏器慢性退化型疾病的根源物质及重要指征,该物质的检测对肌体衰老阶段的评估、慢性退化型疾病的筛查、诊断以及干预结果的评估均具有重要意义。

[0010] 90年代早期,多采用胶原关联荧光(collagen-linked fluorescence CLF)或特定AGE测量法(戊糖素、羧甲基赖氨酸)检测活检组织匀浆提取物中的AGEs,取样时会造成生物体的创伤甚至死亡,且前处理过程复杂,通常需要1~2天完成,该过程还会造成被测物质的损耗,造成痕量物质或含量变化不明显的物质测试的精确度和准确性无法保证的问题。近年,越来越多的人使用高效液相色谱法、酶联免疫吸附法、质谱联用或荧光法在血清或血浆中测定AGEs。与需要活检组织相比,血浆更适合反复测量,但血浆AGE测定法的可重复性较差,而且与AGEs的组织含量相关性较差,血液和尿液样本中的AGE未必能反映组织AGE的水平。复杂性、成本、缺乏可重复性、缺乏标准化限制了这些检测方法的广泛应用。

[0011] 一项关于II型糖尿病患者血管损伤非侵入性标记物的研究利用自研的简易无创装置证明皮肤自身荧光与皮肤非荧光AGE的水平相关;胶原关联荧光与戊糖素(荧光物质)和(N ϵ)-羧甲基-赖氨酸(非荧光物质)的平行关系以及特定AGE间的相互关系也表明荧光和非荧光AGE表现相似。因此,皮肤自身荧光是整个肌体AGE池的一个标志,可用于标记肌体AGE的行为。该研究也提示采用适当设备进行在体AGEs含量检测的可行性。

[0012] 市面上现有的AGEs测量设备为疾病风险评估设备,主要用于体检机构及医院肾内科、内分泌科、心内科等科室糖尿病等部分慢性疾病的早期筛查、风险标记,测试部位仅能选择前臂部位,仅可提供被测皮肤1cm*1cm区域的AGEs荧光强度,再将该数据与数据库数据比对,由于患病人群的数据较对应年龄健康人群高20%~30%,比对范围后,提供相关慢性病的发病几率及并发症风险因子,以提示相关人员进行进一步医疗检查。由于该设备数据库范围有限(荧光强度只包含20岁以上的成年人的情况),且仅作前期筛查的风险评估,不提供真实的AGEs的含量,也未进行任何标准物质的校准,故对外界环境或外源物质对皮肤AGEs的微量影响无法评估,不能用于抗糖化效果的评价领域;此外,市售设备体积也十分庞大,超过常规滚筒洗衣机的大小,配置操控电脑后,更为占据空间。占地大、测试面积小、测试部位局限(仅为前臂部位)、非定量、测试数据仅供风险提示、无法识别抗糖化短期效应等,均限制其在相关领域的应用。本发明所述检测设备整体大小为常规滚筒洗衣机大小的

约1/20,占地面积小、可操作性空间大、测试面积大、可测试多处部位(包括但不限于:面部、躯干部、手足部、毛发等)、可定性定量提供准确荧光强度和对应物质含量,检出限低至 10^{-8} 量级,且无需对被测样品进行预处理,故可对外源物质(待测样品)的痕量影响进行无创、高敏感、高精度探测,故本发明所述设备为小型无创检测设备。

[0013] 2021年1月1日起《化妆品监督管理条例》施行,对化妆品进行全过程管理。为规范化妆品生产经营活动、化妆品功效宣称评价工作,保障化妆品的质量安全,保证功效宣称评价结果的科学性、准确性和可靠性,维护消费者合法权益,推动社会共治和化妆品行业健康发展,根据《化妆品监督管理条例》等有关法律法规要求,《化妆品分类规则和分类目录》、《化妆品功效宣称评价规范》制定实施。分类目录将化妆品功效分为26类+新功效,新功效即不符合26类规则的功效宣称。

[0014] 基于上述法规,化妆品“抗糖化”功效属于新功效的一种,按照评价规范要求,“应当根据产品功效宣称的具体情况,进行科学合理的分析”,但化妆品抗糖基化的临床评估,亦即皮肤AGEs含量的在体检测,在整个化妆品行业未有成熟检测手段、检测设备和测试方法。

[0015] 目前市场上的相关产品由于缺乏足够的临床数据支持,大多放弃了“抗糖基化”的宣称点,或在新法规的“窗口期”(2023年5月1日)前,意图混淆“抗糖基化”和“抗氧化”的概念,或即便有数据支持,也是来自原料的体外实验,无法迁移推演至在体应用效果,不符合功效宣称评价规范对新功效评价方法的要求。

[0016] 此外,化妆品“抗初老”宣称目前仅将靶向指标设定为胶原蛋白或是皮肤表征(肤色、弹性、细纹、皱纹等),事实上这些指标的出现已远远晚于皮肤AGEs水平的改变,作为“抗初老”宣称的靶向指标并不合适。皮肤AGEs在体检测设备及方法可通过获得初老~AGEs~生理指标的关系,建立行业内的肌肤早衰新标准,重新定义初老指数。

发明内容

[0017] 本发明提供了一种检测皮肤自发荧光及其含量的装置,所述装置包括:

[0018] (i) 成像及检测系统;和

[0019] (ii) 附属器件系统,

[0020] 其中,所述成像及检测系统包括荧光显微成像模块、荧光光谱检测模块及耦合模块,所述荧光显微成像模块与所述耦合模块光学耦合连通,所述荧光光谱检测模块与所述耦合模块光学耦合连通,

[0021] 其中,所述附属器件系统包括操作模块、位置固定模块和被测部位承载模块,

[0022] 其中,所述荧光光谱检测模块包括第一光源和线阵图像传感器,并且与耦合模块中的待测样品光学耦合连通,所述线阵图像传感器连接操作模块,显示出强度和波长的参数,

[0023] 其中,所述荧光显微成像模块包括第二光源和面阵图像传感器,并且与耦合模块中的待测样品光学耦合连通,所述面阵图像传感器连接操作模块,显示出样品荧光图像。

[0024] 在优选的实施方式中,所述第一光源是波长350-390nm的激光光源,所述第二光源是波长350-390nm的激光光源。

[0025] 在优选的实施方式中,所述装置用于检测的荧光物质选自:黄素、脂褐素、晚期糖

基化终末产物AGEs、还原型辅酶I NADH、类胡萝卜素、氧化黑色素、卟啉、胶原蛋白、氨基酸、弹性蛋白以及它们的组合。

[0026] 在优选的实施方式中,所述荧光光谱检测模块还包括第二二向色镜,其反射光并通过光路使激发光汇聚到待测样品上以激发样品产生散射的荧光,样品激发出的散射的荧光再通过光路汇聚到线阵图像传感器上。在更优选的实施方式中,样品激发出的散射的荧光通过物镜变为平行光,经反射镜,透过第二二向色镜和滤波片,经过透镜,汇聚到光谱仪中,形成光谱汇聚到线阵图像传感器上。

[0027] 在优选的实施方式中,所述荧光显微成像模块还包括第一二向色镜,其反射光并通过光路使激发光照射到待测样品上以激发样品产生荧光,样品激发出的荧光再通过光路成像到面阵图像传感器上。在更优选的实施方式中,样品激发出的荧光通过物镜,透过第一二向色镜,荧光滤光片,消色差透镜,成像到面阵图像传感器上。

[0028] 在优选的实施方式中,所述操作模块用于实现荧光图像及荧光光谱的实时采集、图像拍摄、数据分析、标线拟合或其组合。

[0029] 另一方面,本发明提供了一种抗糖化功效的评价方法,所述方法包括:

[0030] (a) 标记皮肤待测区域;

[0031] (b) 采用检测皮肤自发荧光及其含量的装置测定标记区域的皮肤荧光强度及含量的基础值;

[0032] (c) 使用待测样品;

[0033] (d) 采用检测皮肤自发荧光及其含量的装置测定使用样品后标记区域的皮肤荧光强度及含量;

[0034] (e) 将步骤(d)的结果与步骤(b)的结果进行比较,以评价抗糖化功效。

[0035] 在优选的实施方式中,所述步骤(e)包括基于荧光物质的标准曲线比较步骤(d)和步骤(b)的结果,以评价抗糖化功效。

[0036] 在优选的实施方式中,所述步骤(e)包括基于标准荧光色卡比较步骤(d)和步骤(b)的结果,以评价抗糖化功效。

[0037] 在优选的实施方式中,所述待测样品选自:内服药品、保健品、外用药品、外用保健品和皮肤外用剂。

附图说明

[0038] 下面结合附图进一步说明本发明。

[0039] 图1显示了本发明的检测皮肤自发荧光的装置。

[0040] 图2显示了同时拍摄手指前端AGEs及标准荧光色卡。

[0041] 图3显示了AGE-BSA标准溶液荧光图像(mg/mL)。

[0042] 图4显示了AGE-BSA标准曲线线性拟合(mg/mL)的结果。

[0043] 图5显示了AGE-BSA标准溶液荧光图像($\mu\text{g/mL}$)。

[0044] 图6显示了AGE-BSA标准曲线线性拟合($\mu\text{g/mL}$)的结果。

具体实施方式

[0045] 本申请针对某些荧光物质(例如,AGEs)激发光谱和发射光谱的特异性,对系统波

段范围进行优化,增强特定波段范围激发和发射光强。通过特制小型无创设备实现不同部位皮肤表面荧光物质(例如,AGEs)的在体图像及光谱检测。此外,通过标线拟合将荧光强度转换为荧光物质(例如,AGEs)的浓度或含量,检出限可达 1×10^{-8} g/mL,对外源物质造成的肌体糖化水平的影响可高敏感识别,从而提供一种化妆品抗糖化功效评估的快速、无创、定量、高灵敏检测手段。

[0046] 本发明提供了一种小型无创地检测皮肤自发荧光及其含量的装置,所述装置包括:成像及检测系统和附属器件系统。成像及检测系统包括荧光显微成像模块、荧光光谱检测模块及耦合模块,所述荧光显微成像模块与所述耦合模块光学耦合连通,所述荧光光谱检测模块与所述耦合模块光学耦合连通。附属器件系统包括操作模块、位置固定模块和被测部位承载模块。

[0047] 参照图1所示,荧光光谱检测模块包括激发光源1和线阵图像传感器,并且与耦合模块中的待测样品光学耦合连通。激发光源1可以是激光器(1-100mW,350-390nm)或LED光源(3W,350-390nm)。这种激发光源的工作方式可为连续式或者脉冲式。如果激发光源1是LED光源,荧光光谱检测模块还包括准直透镜(未显示),激发光通过准直透镜发出平行激光。荧光光谱检测模块还可以包括二向色镜2。在一些实施方式中,二向色镜2的透射波长为400-480nm,反射波长为350-400nm。因此,二向色镜2能够反射400nm以下波段的光,透过400nm以上的反射激发光。反射光经过连通的光路汇聚到待测样品上,激发样品发出荧光,例如,待测样品包括皮肤和荧光色卡。发出的荧光则汇聚到光谱仪中,并最终汇聚到线阵图像传感器上,从而显示荧光强度和波长的参数。在一些实施方式中,二向色镜2的反射光经过反射镜,再经过物镜(例如,放大倍数1x-10x)使激发光汇聚到样品上,样品激发出散射的荧光。例如,反射镜的反射波段覆盖350nm到500nm。在一些实施方式中,发出的散射的荧光先通过物镜,再经反射镜,通过二向色镜2和滤波片,经过透镜(焦距f 30-100mm),使荧光散射光汇聚到光谱仪当中。例如,滤波片的带通为400-480nm,能够滤掉400nm及以下波段的光。在一些实施方式中,经过光谱仪进行光谱的色散,形成的光谱汇聚到线阵图像传感器(包含CCD和CMOS)上。图像传感器连接操作模块,显示出强度和波长的参数。

[0048] 同样参照图1所示,荧光显微成像模块包括激发光源2和面阵图像传感器,并且与耦合模块中的待测样品光学耦合连通。激发光源2可以是激光器(1-100mW,350-390nm)或LED光源(3W,350-390nm)。这种激发光源的工作方式可为连续式或者脉冲式。如果激发光源2是LED光源,荧光光谱检测模块还包括准直透镜1,激发光通过准直透镜1发出平行激光。例如,准直透镜1包括但不限于球面镜和非球面镜。例如,准直透镜1具有 $\phi=25\text{mm}$,焦距f 20-50mm。荧光显微成像模块还可以包括二向色镜1。在一些实施方式中,二向色镜1的透射波长为400-480nm,反射波长为350-400nm。经过二向色镜1反射,激发光在物镜(例如,放大倍数1x-10x)的前焦距聚焦,在物镜平行射出激发光,使激发光均匀照射在样品之上,激发待测样品产生荧光。例如,待测样品包括皮肤和荧光色卡。在一些实施方式中,产生的荧光通过物镜,透过二向色镜1,荧光滤光片,消色差透镜1,成像到面阵图像传感器(包含CCD或CMOS,黑白或彩色)中。例如,荧光滤光片的带通为400-480nm,能够滤掉400nm及以下波段的光。面阵图像传感器连接操作模块,在操作模块上显示样品荧光图像。

[0049] 在一个具体实施方式中,本申请提供了一种小型无创检测皮肤AGEs含量的设备,该设备包括:成像及检测系统、附属器件系统。其中成像及检测系统包括荧光显微成像模

块、荧光光谱检测模块及耦合模块；附属器件系统包括操作模块、位置固定模块和被测部位承载模块。

[0050] 荧光显微成像模块中，激发光从激发光源2 (LED光源 (3W, 350-390nm)，工作方式为连续式) 发出，通过调节准直透镜1 (球面镜， $\phi=25\text{mm}$ ，焦距 $f=25\text{mm}$)，经过二向色镜1 (透射波长400-480nm，反射波长350-400nm) 反射，使LED激发光在物镜 (放大倍数1x-10x) 的前焦距聚焦，在物镜平行射出激发光，使激发光均匀照射在样品之上。激发被测样品 (包含皮肤和荧光色卡) AGEs产生荧光后，通过物镜，透过二向色镜1，荧光滤光片 (带通400-480nm)，消色差透镜1，成像到面阵图像传感器 (CCD，彩色) 中，在操作模块上显示样品荧光图像。

[0051] 荧光光谱检测模块中，激光光源1 (激光器 (1-100mW, 350-390nm)，工作方式为连续式) 发出平行激光，经过二向色镜2 (透射波长400-480nm，反射波长350-400nm)，反射400nm以下波段的光，经过反射镜 (反射波段覆盖350nm到500nm)，最后，经过物镜使激发光汇聚到样品上，样品激发出散射的荧光，荧光先通过物镜，使荧光散射光变为平行光，经反射镜，通过二向色镜2和滤波片 (带通400-480nm)，滤掉400nm及以下波段的光，经过透镜 (焦距 $f=30-100\text{mm}$)，使荧光散射光汇聚到光谱仪当中，经过光谱仪进行光谱的色散，形成的光谱汇聚到线阵图像传感器 (CCD) 上。图像传感器连接操作模块，显示出强度和波长的参数。

[0052] 操作模块用于实现荧光图像及光谱实时采集、图像拍摄、数据分析、标线拟合等功能，为搭载控制软件的计算系统，可选取荧光色卡和皮肤样品不同区域做差分分析，处理得到感兴趣光谱的强度积分，包括但不限于计算机、平板电脑、嵌入式系统等；标线拟合所需标准品包括但不限于标准品荧光色卡、标准品溶液 (包括但不限于硫酸奎宁标准品、AGEs-BSA标准品等)。

[0053] 此外，除了使用常规标准品溶液外，还开发了适用于不同浓度测试场景的多套标准荧光色卡进行定标，样品拍摄时将对应浓度梯度的标准荧光色卡置于样品一侧，实现标准色卡和待测样品的同时拍摄及测量，可极大地减少外部环境、人员操作的改变带来的系统误差 (如图2所示)。

[0054] 位置固定模块用于根据被测部位的区别调整成像及检测系统的高低、转向、倾角等空间位置，确保测试时测试窗垂直于被测样品/皮肤表面，包括但不限于升降平台、多向机械臂等。

[0055] 被测部位承载模块用于确保样品/受试者被测部位在每次测试时位置恒定，包括但不限于样品支架、头拖、臂拖、特制模板等。

[0056] 另一方面，本发明提供了人体皮肤荧光物质 (例如，AGEs) 自发荧光及含量测试方法。

[0057] 在一个实施方式中，测试方法包括以下过程：打开设备，根据预测试强度及含量范围调节曝光时长和增益倍数，用合适浓度梯度的标准品对标准曲线进行拟合，通过拟合方式的选择、拟合数据的计算，得到拟合函数对应的相关系数 R^2 ，确保其大于0.95，或直接采用合适浓度梯度的标准荧光色卡对荧光强度进行校准。志愿者到访，签署知情同意后，按照入选和排除标准进行筛选，符合标准的志愿者根据测试需求清洁受试部位，用纸巾拍干，进入恒温恒湿室 (例如，测试温度 $21\text{℃} \pm 1\text{℃}$ 、测试湿度 $50\% \pm 10\%$)，静坐休息30分钟。志愿者保持坐位/卧位/躺位不动，于待测部位标记测试区域位置 (例如，鼻基准线和过眼外眦垂线交界处， $2\text{cm} \times 4\text{cm}$ 矩形区域等)。于标记区域拍摄荧光物质 (例如，AGEs) 荧光图像，勾选合

适测量区域,软件显示该区域平均荧光强度、强度分布图,并通过前述标准曲线计算得到该区域荧光物质(例如,AGEs)含量。

[0058] 又一方面,本发明提供了一种在体、无创地评价抗糖化功效的方法。

[0059] 在一个实施方式中,在体、无创地评价抗糖化功效的方法包括以下过程:打开设备,根据预测试强度及含量范围调节曝光时长和增益倍数,用合适浓度梯度的标准品对标准曲线进行拟合,通过拟合方式的选择、拟合数据的计算,得到拟合函数对应的相关系数 R^2 ,确保其大于0.95,或直接采用合适浓度梯度的标准荧光色卡对荧光强度进行校准。志愿者到访,签署知情同意书后,按照入选和排除标准进行筛选,符合标准的志愿者根据测试需求清洁受试部位,用纸巾拍干,进入恒温恒湿室(例如,测试温度 $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、测试湿度 $50\% \pm 10\%$),静坐休息30分钟。志愿者保持坐位/卧位/躺位不动,于待测部位标记测试区域位置(例如,鼻基准线和过眼外眦垂线交界处, $2\text{cm} \times 4\text{cm}$ 矩形区域等)。可根据测试需求设置空白对照,在未涂抹样品前,进行各参数基础值的测试。于标记区域测试AGEs荧光强度及含量和/或其他待测参数,其他待测参数包括但不限于皮肤黄度(仪器Konica Minolta CM-700d)、弹性和紧致度(仪器Cutometer dual MPA580)、皮肤纹理参数(仪器Visioscan VC98)的基础值和涂抹样品后不同时间点的测量值。测试完成后进行空白对照比较/使用前/后比较判断是否具有统计学意义,从而评价抗糖化功效。

[0060] 下面结合具体的实施例进一步阐述本发明。但是,应该明白,这些实施例仅用于说明本发明而不构成对本发明范围的限制。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另有说明,所有的百分比和份数按重量计。

[0061] 实施例1:AGE-BSA(ab51995)标准曲线线性拟合

[0062] 按逐级稀释法配置浓度梯度依次为 0.0mg/mL 、 0.5mg/mL 、 1.0mg/mL 、 1.5mg/mL 、 2.0mg/mL 、 2.5mg/mL 的AGE-BSA标准溶液和 $10\mu\text{g/mL}$ 、 $20\mu\text{g/mL}$ 、 $30\mu\text{g/mL}$ 、 $40\mu\text{g/mL}$ 、 $50\mu\text{g/mL}$ 、 $60\mu\text{g/mL}$ 的AGE-BSA标准溶液,分别移取 $10\mu\text{L}$ 至 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0.1\text{mm}$ 的载玻片流道中,依次拍摄得到对应荧光图像(图3、图5)的平均荧光强度,进行一阶线性拟合,得到拟合函数和相关系数 R^2 。标准溶液对应平均荧光强度、拟合函数结果如表1、表2和图4、图6所示。

[0063] 表1:AGE-BSA标准溶液荧光强度(mg/mL)

[0064]	浓度(mg/mL)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
	平均荧光强度	13.91	55.47	89.04	137.87	180.53	210.64

[0065] 表2:AGE-BSA标准溶液荧光强度($\mu\text{g/mL}$)

[0066]	浓度($\mu\text{g/mL}$)	10	20	30	40	50	60
	平均荧光强度	70.79	96.69	112.96	145.76	170.84	188.47

[0067] 通过表1、表2和图4、图6的结果可以看出,本发明可识别并区分极低浓度(低至 10^{-8} 量级)且浓度间隔较小的AGEs对应的自发荧光强度,且均表现出很好的线性度。

[0068] 实施例2:设备精确度和稳定性测试

[0069] 设备持续运行24小时,配置 1.0mg/mL 的AGE-BSA标准溶液,移取 $10\mu\text{L}$ 至 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0.1\text{mm}$ 的载玻片流道中,每隔1小时进行一组荧光图像的拍摄,每组拍摄10次,共拍摄4组,得到对应荧光图像的平均荧光强度,计算每组数值的平均值、标准差、标准差偏离以及40个数据的整体精度情况,如表3所示。

[0070] 表3:设备重复度、精度及稳定性测试结果

组别	组 1	组 2	组 3	组 4
1	61.24	62.02	60.87	59.96
2	61.21	61.51	60.88	59.63
3	61.34	61.84	60.88	59.55
4	61.11	61.76	60.88	59.46
5	61.07	61.65	60.75	59.35
6	60.94	61.40	60.73	59.42
7	60.92	61.61	60.71	59.35
[0071] 8	60.85	61.59	60.66	59.37
9	60.71	61.56	60.64	59.27
10	60.70	61.53	60.62	59.23
平均值	61.01	61.65	60.76	59.46
标准差	0.22	0.18	0.11	0.21
标准差偏离	0.36%	0.29%	0.17%	0.36%
总体平均值	60.72			
总体标准差	0.83			
总体标准差偏离	1.36%			

[0072] 通过表3可以看出,即便设备在长时间运行(超过24h)后,对低浓度的标准品,同一时段多次测试之间重复性依旧很好(组内偏差<0.4%),且不同时间段的测试值相当,体现出很好的精确度和稳定性。

[0073] 实施例3:化妆品抗糖化功效评价测试

[0074] 打开设备,根据预测试强度及含量范围调节曝光时长为10ms、增益倍数为16,用标准荧光色卡对荧光强度进行校准。以10名40~45岁的前臂掌侧没有可见血管、疤痕、苔藓样变或其他皮肤异常情况的健康女性志愿者(平均年龄 43.8 ± 2.0 岁)为对象进行化妆品抗糖化功效评价测试,测试样品为5重量%麦角硫因水溶液,购于中国科学院上海有机化学研究所。

[0075] 志愿者到访,签署知情同意书后,按照入选和排除标准进行筛选,符合标准的志愿者用温水清洁双侧前臂内侧肌肤,用纸巾拍干,进入恒温恒湿室(测试温度 $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、测试湿度 $50\% \pm 5\%$),静坐休息30分钟。志愿者保持坐位,于双侧肘部褶皱下15cm的前臂掌侧皮肤标记 $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ 测试区域位置,左右各标记一处,一处为样品区域,一处为空白区域,在未涂抹样品前,进行各参数基础值的测试。

[0076] 于双侧前臂内侧标记区域测试AGEs荧光强度、皮肤黄度(仪器Konica Minolta CM-700d)、弹性和紧致度(仪器Cutometer dual MPA580)的基础值,每个区域平行测试三次,计算平均值。

[0077] 第一次样品涂抹,按随机表在样品区域使用测试样品,样品使用量为 $2\text{mg}/\text{cm}^2$,充分按摩至吸收;间隔至少4H,第二次样品涂抹,按随机表在样品区域使用测试样品,样品使用量为 $2\text{mg}/\text{cm}^2$,充分按摩至吸收;样品涂抹重复1周,在测试周期内,要求受试者按约定回访,由实验人员按同样方法涂抹样品;分别在样品使用3天、1周后,重复皮肤测试操作。

[0078] 数据使用SPSS 23.0软件进行统计,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。使用前后对照:如数据呈现正态分布,则采用参数检验(配对t检验),如数据不符合正态分布,则采用非参数检验(Wilcoxon符号秩检验);空白对照比较:如数据呈现正态分布,则采用参数检验(独立样本t检验),如数据不符合正态分布,则采用非参数检验(Mann-Whinty U检验)。

[0079] 1) AGEs荧光强度

[0080] 表4

受试者	样品			空白		
	BL(第0天)	第3天	第7天	BL(第0天)	第3天	第7天
1	97.80	96.91	79.07	76.31	85.10	78.54
2	95.62	75.72	77.74	100.14	128.54	130.82
3	77.11	79.81	59.22	60.73	64.10	93.81
4	84.94	84.24	71.26	93.81	131.33	122.29
5	134.34	126.43	103.17	69.01	98.52	72.91
6	158.32	136.22	125.82	130.83	128.53	130.68
7	128.68	131.40	132.24	92.05	75.09	83.59
8	73.66	70.88	75.24	87.59	86.18	84.77
9	87.61	84.33	77.62	84.05	58.25	71.63
10	142.99	140.50	129.49	174.13	152.68	159.02
平均值	108.10	102.64	93.08	96.87	100.83	102.81
标准误	9.55	8.77	8.59	10.50	10.24	9.62
p(vs.BL)	—	0.059	0.003	—	0.586	0.328
p(vs.空白)	—	0.280	0.007	—	—	—
改善率	—	—	-13.89%	—	—	—

[0082] 2) 皮肤黄度

[0083] 表5

受试者	样品			空白		
	BL (第 0 天)	第 3 天	第 7 天	BL (第 0 天)	第 3 天	第 7 天
[0084] 1	19.71	18.73	18.75	19.22	19.20	19.07
2	19.78	19.00	19.65	17.08	17.54	17.90
3	19.64	20.47	20.45	20.25	20.87	20.49
4	19.58	19.82	19.42	19.55	18.96	18.59
5	19.74	20.65	20.38	20.12	20.78	20.48
6	17.10	17.30	17.17	17.20	17.42	17.07
7	17.00	16.92	16.93	17.64	17.84	17.90
8	19.67	20.07	19.73	20.28	19.83	20.05
9	19.88	19.91	19.77	19.78	19.48	19.58
[0085] 10	14.72	15.37	15.10	14.86	15.22	15.76
平均值	18.68	18.82	18.73	18.60	18.71	18.69
标准误	0.56	0.55	0.56	0.57	0.55	0.49
p (vs.BL)	—	0.503	0.744	—	0.428	0.613
p (vs.空白)	—	0.926	0.871	—	—	—
改善率	—	—	—	—	—	—

[0086] 3) 紧致度R0

[0087] 表6

受试者	样品			空白		
	BL (第 0 天)	第 3 天	第 7 天	BL (第 0 天)	第 3 天	第 7 天
1	0.3388	0.3223	0.2953	0.3075	0.3240	0.3355
2	0.4205	0.3848	0.3675	0.3625	0.3445	0.3340
3	0.2453	0.2253	0.2163	0.3185	0.3245	0.2955
4	0.2768	0.2723	0.2955	0.3110	0.3000	0.3010
[0088] 5	0.3170	0.3063	0.3180	0.2715	0.2660	0.2975
6	0.2988	0.3148	0.2728	0.3200	0.3015	0.2345
7	0.2678	0.2098	0.2180	0.2765	0.2525	0.2265
8	0.2800	0.2760	0.2638	0.2860	0.2780	0.2860
9	0.2803	0.2710	0.3080	0.3025	0.2965	0.2790
10	0.2720	0.3053	0.2895	0.3025	0.2905	0.3020
平均值	0.2997	0.2888	0.2845	0.3059	0.2978	0.2892
标准误	0.0158	0.0159	0.0143	0.0082	0.0089	0.0114
[0089] p (vs.BL)	—	0.139	0.169	—	0.063	0.156
p (vs.空白)	—	0.746	0.921	—	—	—
改善率	—	—	—	—	—	—

[0090] 4) 弹性R2

[0091] 表7

受试者	样品			空白		
	BL (第 0 天)	第 3 天	第 7 天	BL (第 0 天)	第 3 天	第 7 天
1	0.9154	0.9008	0.9058	0.9041	0.9181	0.8993
2	0.9168	0.9002	0.9108	0.9175	0.9217	0.9291
3	0.8983	0.8858	0.9321	0.8883	0.8843	0.8790
4	0.8896	0.9133	0.8963	0.8969	0.8915	0.9351
5	0.8580	0.8534	0.8244	0.8859	0.8890	0.8890
6	0.9031	0.8595	0.8954	0.8961	0.8940	0.8980
[0092] 7	0.9146	0.8986	0.9055	0.8920	0.9073	0.9026
8	0.8929	0.8751	0.9015	0.9052	0.9070	0.9032
9	0.8838	0.9130	0.8905	0.8976	0.9118	0.9175
10	0.9114	0.9007	0.9008	0.9236	0.9087	0.9173
平均值	0.8984	0.8900	0.8963	0.9007	0.9033	0.9070
标准误	0.0058	0.0067	0.0088	0.0038	0.0041	0.0056
p (vs.BL)	—	0.240	0.444	—	0.420	0.201
p (vs.空白)	—	0.152	0.257	—	—	—
改善率	—	—	—	—	—	—

[0093] 将本发明应用于在体AGEs自发荧光测试,以评估外源物质的“抗糖化”功效,无需预处理、实时测试、检出限高、平行测试重复性好、同区域短期测试复现性好、测试灵敏度高。

[0094] 空白区域在3天、1周后,AGEs自发荧光强度均无显著性变化 ($p=0.586$, $p=0.328$);而在抗糖原料水溶液使用3天后,AGEs自发荧光强度有下降趋势 ($p=0.059$),使用1周后,AGEs自发荧光强度显著下降,改善率为13.89% ($p=0.003$),与空白区域具有显著性差异 ($p=0.007$),且此时皮肤黄度、紧致度和弹性指标还未有明显变化。说明本发明可敏锐检测到外源物质对皮肤糖化水平的改善情况,即可用于评价外源物质的“抗糖化”功效,且时间节点明显早于其他皮肤衰老指征相关指标,证实其确实可作为“抗初老”宣称的靶向指标,对“抗初老”相关宣称的评价具有指导意义。

[0095] 本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

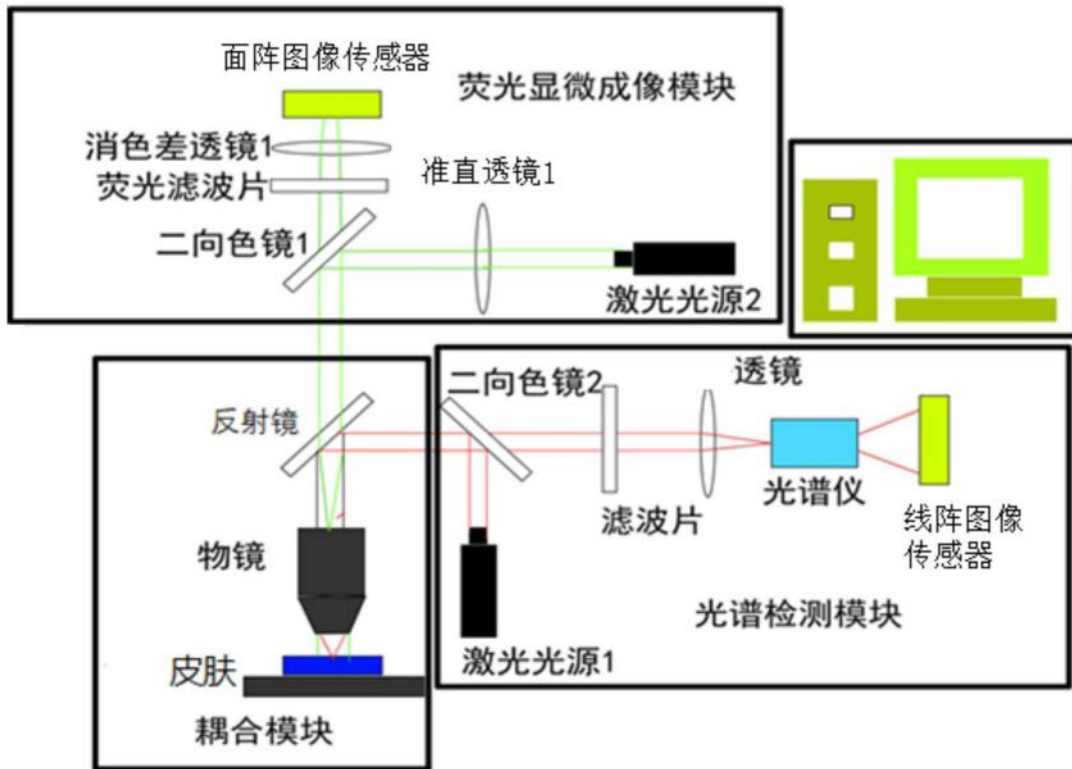


图1

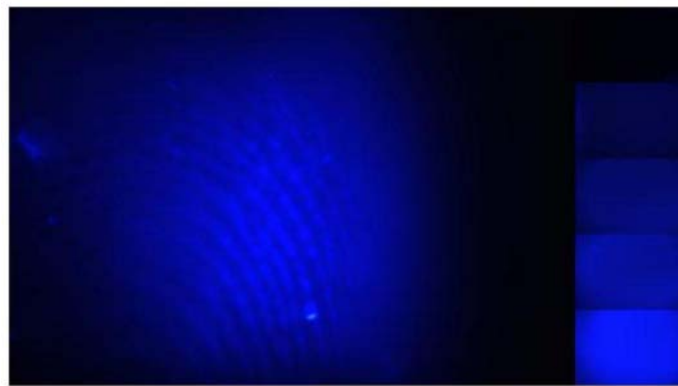


图2

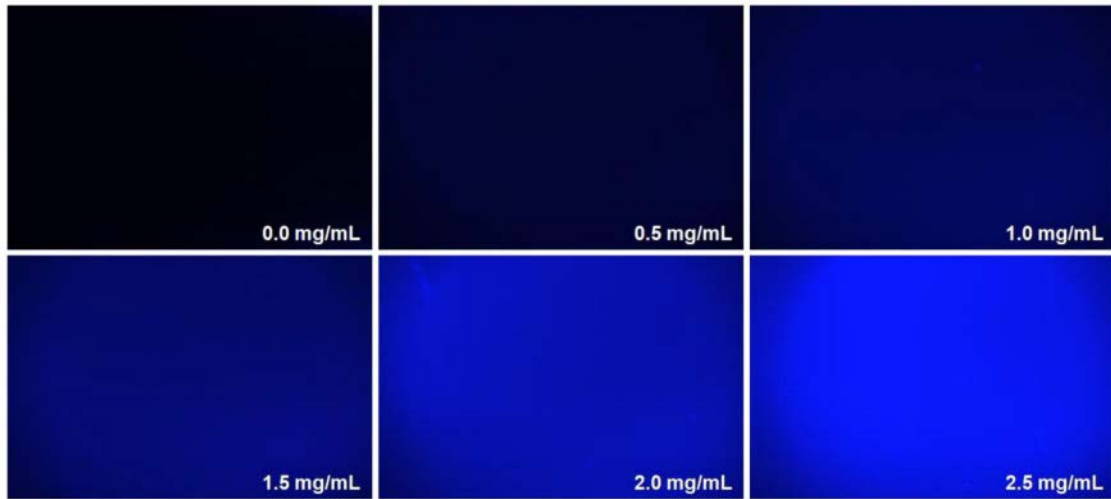


图3

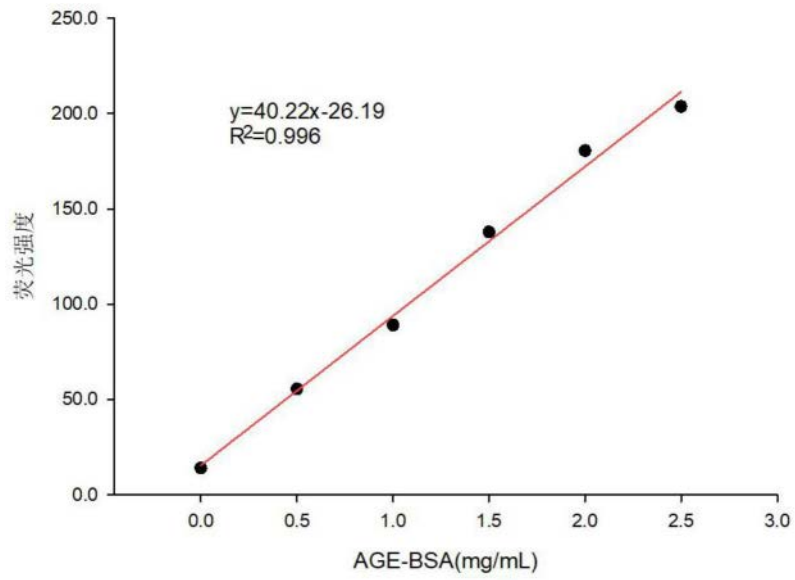


图4

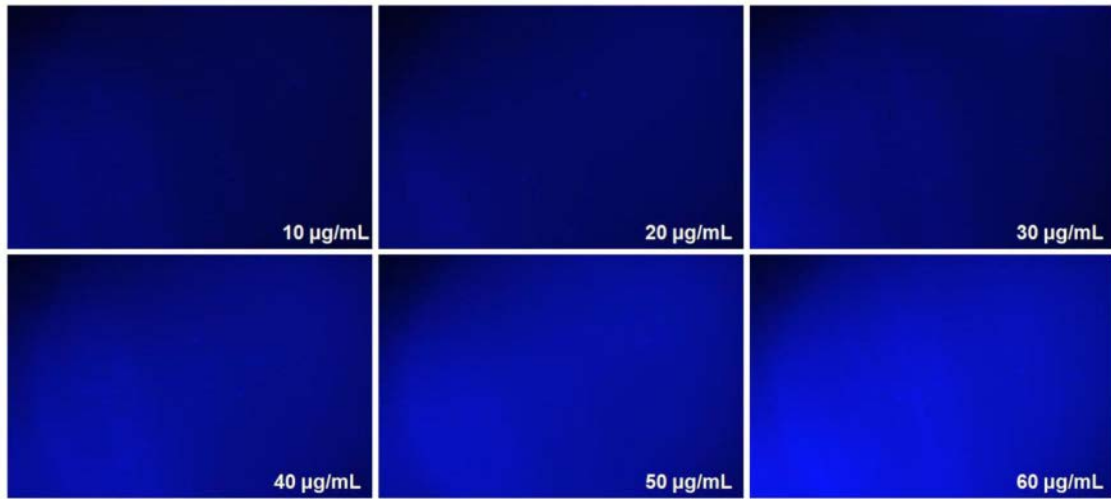


图5

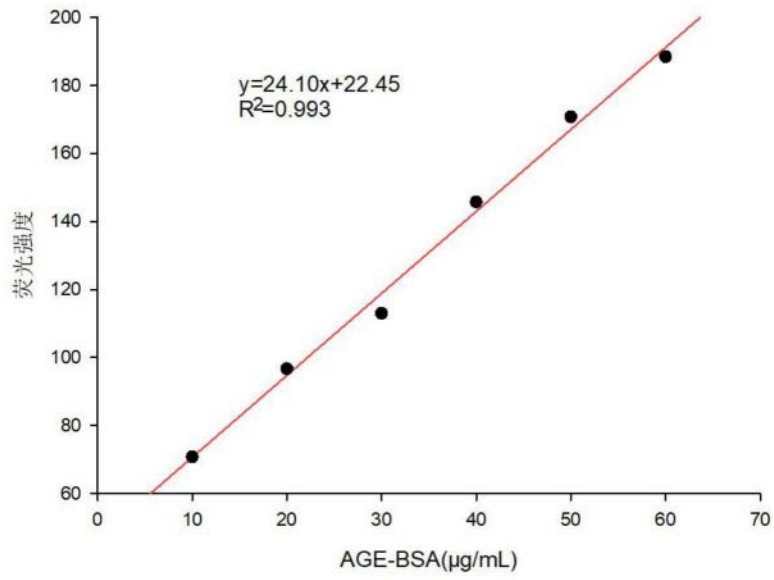


图6