



(10) 授权公告号 CN 114502139 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 202180005682.3

(22) 申请日 2021.05.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114502139 A

(43) 申请公布日 2022.05.13

(30) 优先权数据
FR2005429 2020.05.21 FR
FR2102686 2021.03.17 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.31

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/063690 2021.05.21

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/234159 FR 2021.11.25

(73) 专利权人 法国生态农业发展联合署
地址 法国巴黎

(72) 发明人 伊丽莎白·多迪内
文森特·布尔热托

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理
有限公司 51258
专利代理师 刘书芝

(51) Int.Cl.
A61K 8/9789 (2017.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/10 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 131/00 (2006.01)

审查员 吴双

权利要求书1页 说明书28页

(54) 发明名称

富含2,5-二甲酰基咪喃的阿拉伯辣木种子提取物、其获得方法及其在化妆品组合物中的用途

(57) 摘要

本发明涉及富含2,5-二甲酰基咪喃化合物的阿拉伯辣木种子提取物,更特别地涉及所述种子饼提取物,以及用于提取该提取物的方法。本发明还涉及包括所述提取物的化妆品或营养性化妆品组合物以及涉及所述组合物用于改善皮肤、粘膜或皮肤附件的外观,用于使皮肤放松、舒缓和放松和预防和/或对抗衰老和/或光衰老的皮肤体征以及用于预防老年斑的用途。

1. 一种阿拉伯辣木种子提取物,其特征在于,所述阿拉伯辣木种子提取物通过以下获得:在搅拌下,以相对于所使用的总重量按重量计20至30%的固体物质的比例,在主要为醇的溶剂中,在16至30°C的温度下2小时的加或减10%至20%的时间段,固液提取未去壳种子饼,所述醇选自乙醇或甲醇,任选地与多元醇或亚临界水共溶剂一起,比例为相对于所述主要为醇的溶剂的总重量按重量计70%至100%的醇,并且分离液相和固相以去除所述固相并回收阿拉伯辣木种子的液体提取物,所述提取物包括相对于所述总提取物的干物质大于50%的化合物2,5-二甲酰基呋喃。

2. 根据权利要求1所述的提取物,其特征在于,将所获得的液体提取物干燥,以获得包含相对于干物质的总重量按重量计大于50%的2,5-二甲酰基呋喃的所述阿拉伯辣木种子饼的干提取物。

3. 一种用于获得根据权利要求1和2中任一项所述的阿拉伯辣木种子提取物的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤,其中:

a) 收集并干燥未去壳阿拉伯辣木种子,以获得小于8%的内部含水率,

b) 压榨干燥的种子,以将油与种子的剩余部分分离,获得饼,

c) 碾磨步骤b)中获得的所述饼,

d) 以相对于所使用的总重量按重量计20至30%的固体材料的比例,将在步骤c)中获得的碾磨材料分散在主要为醇的溶剂中,所述醇选自乙醇或甲醇,任选地与多元醇或亚临界水共溶剂一起,比例为相对于所述主要为醇的溶剂的总重量按重量计70%至100%的醇;

e) 在搅拌下在16至30°C的温度下2小时的加或减10%至20%的时间段,进行固液提取,

f) 分离液相和固相,以去除所述固相并回收液体阿拉伯辣木饼提取物,以及

g) 任选地,当所述醇为乙醇时,干燥所获得的液体阿拉伯辣木提取物以获得固体阿拉伯辣木提取物。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述主要为醇的溶剂为96°纯度的乙醇。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,通过蒸馏、微滤、超滤和/或纳滤纯化所述液体阿拉伯辣木提取物,以相对于还提取的有机材料,浓缩所述提取物的2,5-二甲酰基呋喃。

6. 一种化妆品组合物,其特征在于,所述组合物包括作为活性剂的有效量的根据权利要求1和2中任一项所述的阿拉伯辣木种子提取物,以及生理学上可接受的赋形剂。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其特征在于,所述组合物是被配制用于向皮肤局部施用的化妆品组合物,并且其特征在于,所述阿拉伯辣木种子提取物以相对于所述组合物的总重量,按重量计0.002%至20%的浓度存在于所述组合物中。

8. 根据权利要求6至7之一所述的组合物在化妆品中用于改善皮肤、粘膜或体被的外观,用于使皮肤放松、舒缓和舒压,和用于预防和/或对抗皮肤的衰老和/或光衰老的体征,以及用于预防老年斑的用途。

富含2,5-二甲酰基咪喃的阿拉伯辣木种子提取物、其获得方法及其在化妆品组合物中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及化妆品和营养性化妆品领域,并且更特别地,涉及护肤组合物制剂中包括的活性成分的领域。本发明涉及富含化合物2,5-二甲酰基咪喃(DFF)的阿拉伯辣木(*Moringa peregrina*)种子提取物。本发明还涉及用于获得具体阿拉伯辣木种子提取物的方法、涉及包括这样的提取物的化妆品组合物,以及最后涉及这样的组合物用于护理皮肤、头皮和体被的化妆品或营养性化妆品用途。

背景技术

[0002] 辣木科(Moringaceae)是单属科(只有一种属,辣木属(*Moringa adans*)),是Saharo-Sindian植物群的元素,根据作者,它由12至14个物种组成,分布在非洲东部至亚洲。该属按惯例分为三个部分,然而,通过系统发育分析这三个部分并未被确认为单系的。所述分析在某种程度上已经显示了以某些形态特征为中心的分支:pachycauls(“瓶子树(bottle trees)”);“块茎树(tuberous trees)”和既不是瓶子树也不是块茎树的那些(“细长的树(slender trees)”)。物种阿拉伯辣木(*Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori)属于第三群。对该属或该科的稀疏遗传学研究证实了该物种相对于该属的其他物种的现实存在,尤其是关于印度辣木属(Indian *Moringa*)、辣木(*Moringa oleifera* Lam.) (尤其参见文章:Olson, M.E. 2002, Combining Data from DNA Sequences and Morphology for a Phylogeny of Moringaceae (Brassicales), *Systematic Botany* 27 (1):55-73; Hassanein, A.M.A. and Al-Soqee, A.A., 2018, Morphological and genetic diversity of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* genotypes, *Horticulture, Environment and Biotechnology* 59 (2):251-261)。最近关于在沙特阿拉伯不同地点取样的阿拉伯辣木的文章通过使用ITS标记物得出结论,该物种具有遗传稳定性(Alaklabi, A., 2015, Genetic diversity of *Moringa peregrina* species in Saudi Arabia with ITS sequences, *Saudi Journal of Biological Sciences* 22:186-190),然而具有高水平的种群内遗传变异。

[0003] 在也门、阿曼、沙特阿拉伯、非洲东部、苏丹、埃塞俄比亚、厄立特里亚、索马里和吉布提的岩石环境中发现了物种阿拉伯辣木。它在伊朗的存在似乎限于东南部省份,但这需要确认(PROTA14=Munyanziza E. and Yongabi K.A., Vegetable oils/Oleaginous plants, *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, http://database.prota.org/protahtml/moringa_peregrina_fr.htm, 访问于10/23/2019)。在中东和在埃及,该物种现在仅由稀有分散的残遗站(除了在高地的少许种群以外)表示,主要在苏丹地区的区域。现今,阿拉伯辣木在苏丹和也门也被视为是稀有并且濒危的。相对于其分支的其他物种,阿拉伯辣木占据着最干燥并且条件恶劣的生境。它显然比在热带和亚热带地区的大规模商业种植的辣木更耐干旱。最近的研究已经示出,种子的大小和周长(girth)对发芽时间以及幼小个体的生长速率和速度具有有利的影响(Gomaa N.H. and Picó F.X., 2011, Seed germination,

seedling traits, and seed bank of the tree *Moringa peregrina* (Moringaceae) in a hyper-arid environment, *American Journal of Botany* 98 (6):1024-1030, 表明资源分配关于种子品质而非数量发生了调整,这使得阿拉伯辣木能够在极端(超干燥)非生物环境中高效繁殖。就细胞层而言,阿拉伯辣木种子具有的中央中种皮(mesotesta)比辣木的那些更厚。

[0004] 存在一些历史报道,其倾向于表明,在伊斯兰教早期在欧拉(Al-Ula)地区活跃交易阿拉伯辣木油(Naseef, A.A.S., 1995, *Al-‘Ulā, A study of Cultural and Social Heritage*)。来自阿拉伯辣木的当地生产的油如今主要指定用于个人消费或用于当地市场。在沙特阿拉伯,传统上将叶子用作用于治疗糖尿病、肠疾病、眼疾病和贫血的内用汤剂(Abdel-Kader, M.S., Hazazi A.M.A., Elmakki O.A. and Alqasoumi S.I., 2018, *A survey on the traditional plants used in Al Kobah village, Saudi Pharmaceutical Journal* 26 (6):817-821)以及用作利尿剂、发赤剂和收敛剂(Aqeel A.A.M., Tariq M., Mossa J.S., Al-Yahya M.A. and Al-Said M.S., 1984, “Plants used in Arabian Folk medicine”, Report submitted to Saudi Arabian National Centre for Science and Technology, Riyadh, Saudi Arabia)。在阿曼,将女性在夏末提取的油用于对抗偏头痛、发烧、烧伤、撕裂伤和骨折、便秘和胃痛,以及对抗肌肉疼痛,头发干燥和阵痛(Ghazanfar S.A., 1994, *Handbook of Arabian Medicinal Plants*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, U.S.; Ghazanfar S.A., 1998, *Plants of Economic Importance*, cap.15, in Ghazanfar, S.A. and Fisher, M. (ed.) *Vegetation of the Arabian Peninsula. Geobotany* 25, pages 241-264, Kluwer Academic Publishers, table 11.1, page 247 and 11.7 page 251)。它还被用于芳香组合物(Ghazanfar S.A., 1998, page 259)以及在阿曼和也门被用作面部洗剂(Ghazanfar S.A. and Rechinger B., 1996, *Two multi-purpose seed oils from Oman. Plants for Food and Medicine*。论文展现于1996年7月1日-7日在伦敦的经济植物学学会和传统药理学国际学会的联席会议(the joint meeting of the Society for Economic Botany and International Society for Ethnopharmacology)上)。

[0005] 来源于辣木种子的提取物在化妆品领域是已知的。例如,FR 296 879公开了包含油(包括甘油三酯、脂肪酸和极性脂质)和多酚的辣木完整种子(具有皮)提取物及其在化妆品组合物中用于对抗皮肤衰老的用途。在所述文件中,辣木种子的非极性部分似乎是活性的,并且更特别地是油性部分。从FR 2 776 519中还已知,辣木种子的蛋白质提取物,已知其对浑浊的水具有净化作用,具有软化、生理调节、保湿、重组和修复作用,并且作为防污染活性剂对皮肤和粘膜具有作用。在所述文件中,活性成分是具有6500至8800Da分子量的蛋白质,它们是通过辣木饼的水性提取获得的。还已知FR 3 076 460,其涉及未发芽和脱油辣木种子的蛋白质提取物用于治疗敏感、致敏、反应性、易损和/或脆化的皮肤和/或粘膜和/或治疗和/或预防红斑,尤其是婴儿尿布疹的用途。在所述文件中,提取方法能够生产具有约8800Da分子量的蛋白质的主要组分(fraction)。KR2013/0088224还公开了发芽的完整辣木种子提取物在化妆品中的用途,尤其是通过使用超临界流体提取获得的提取物。所述方法使得可以分离非极性氨基酸和类胡萝卜素,它们被描述为用于漂白化妆品用途的活性剂。所有上述文件都涉及物种辣木的用途;它们中都没有描述物种阿拉伯辣木在化妆品领域中的用途。Kolheil等人的XP055753955, 2011公开了用乙醇从阿拉伯辣木的完整种子中

提取生物活性多酚化合物、单宁、类黄酮、皂苷、不饱和甾醇和/或三萜。获得的提取物在4℃下储存,并具有抗氧化作用。Abbas Alba等人的XP055753970,2018公开了对阿拉伯辣木的完整种子进行三天或更多天的乙醇提取。滤液在45至50℃的温度下减压浓缩。Abou-Hashem等人的XP055754018,2019公开了对阿拉伯辣木的完整种子进行3×72小时的乙醇提取。然后将获得的提取物过滤,并在约45℃的温度下在旋转蒸发器中浓缩。Majali Ibrahim等人的XP055754048,2015公开了在搅拌30分钟下用乙醇提取阿拉伯辣木的完整种子,随后在72小时内沉淀。上述文件均未公开未去壳阿拉伯辣木种子饼的乙醇提取。

[0006] 更特别地,对于物种阿拉伯辣木,已知从阿拉伯辣木的叶子或完整种子中获得的某些酚和类黄酮化合物具有抗氧化活性(Al-Dabbas M.,2017,Antioxidant activity of different extracts from the aerial part of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, from Jordan, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 30 (6) :2151-2157)。这些化合物是用溶剂诸如甲醇、乙酸乙酯或己烷从叶子或完整种子中提取的。似乎是叶子包括大量的活性化合物。

[0007] 因此,取决于辣木属中使用的物种,观察到取决于植物部分(叶子或种子)、种子部分(完整种子或另外,去壳或未去壳)和所进行的提取方法,尤其是溶剂选择,证明提取的分子是不同的。如今,提取物的组合物影响了生物活性,并因此影响了化妆品的功效。

[0008] 鉴于前述,本发明提出解决的一个问题是基于辣木属的物种阿拉伯辣木提取物开发可用于化妆品且易于使用的新颖产品。

[0009] 因此,申请人已展示了从物种阿拉伯辣木的种子,并且更特别地从物种阿拉伯辣木的种子的饼中获得的新颖提取物,该提取物尤其示出对皮肤的放松和抗应激活性、抗衰老活性以及还对老年斑的预防活性。根据本发明的提取物富含2,5-二甲酰基呋喃(DFF),也称为2,5-呋喃二甲醛。提取物特别是从阿拉伯辣木种子中,或者更特别是从阿拉伯辣木的未去壳种子的饼中,尤其经由醇提取获得的。相对于现有技术的提取物,根据本发明的提取物在化妆品领域在两个方面是新颖的,首先是由于所使用的特定来源物种,并且其次是由于其具体化合物含量。

[0010] 通过法兰西共和国政府和沙特阿拉伯王国之间于2018年4月10日的政府间协议,申请人、法国埃尔奥拉开发署(Agence Française Pour Le Développement d'AIU1a) (AFALULA) 和埃尔奥拉皇家委员会(Commission Royale pour AIU1a) (RCU) 尤其具有发展可持续农业和当地经济的联合项目,尤其是当地生产源自乡土植物的天然产品,以及保护沙特阿拉伯王国埃尔奥拉(AIU1a)地区的生物多样性和权利。沙特阿拉伯王国自2020年10月8日起成为《名古屋议定书》(Nagoya Protocol)的成员。在起草本专利时,关于《名古屋议定书》将纳入当地法律相关方面的实施法规在审查中。因此,在此阶段,沙特阿拉伯王国对本专利申请和《名古屋议定书》没有特定要求。因此,在提交该专利申请之日,没有关于获得遗传资源的合规证书的要求。

发明内容

[0011] 本发明的第一主题为富含化合物2,5-二甲酰基呋喃的阿拉伯辣木种子提取物。化合物2,5-二甲酰基呋喃是糖性质的化合物,其在植物界是稀有的,并且其由糠醛经由5-羟甲基糠醛中间体合成而合成。

[0012] 由于其具有高浓度2,5-二甲酰基咪喃的具体特征,根据本发明的提取物在辣木属中是独特的。将证明的是,物种阿拉伯辣木具有不同于从该属的其他物种,尤其是从申请人已设法展示的物种辣木的已知的那些分子谱的具体分子谱。

[0013] 本发明的第二主题为用于获得根据本发明的阿拉伯辣木种子提取物的方法,所述方法包括以下步骤,其中:

[0014] a) 收集并干燥未去壳阿拉伯辣木种子,以获得小于8%的内部含水率,

[0015] b) 压榨干燥的种子,以将油与种子的剩余部分分离,获得饼,

[0016] c) 碾磨步骤b)中获得的所述饼,

[0017] d) 以相对于所使用的总重量按重量计约25%的固体材料的比例,将在步骤c)中获得的碾磨材料分散在主要为醇的溶剂中,所述醇选自乙醇或甲醇,任选地与共溶剂诸如多元醇或亚临界水一起,比例为相对于所述溶剂的总重量按重量计80%至100%的醇;

[0018] e) 在搅拌下在16至30°C的温度下约2小时的时间段,进行固液提取,

[0019] f) 分离液相和固相,以去除所述固相并回收液体阿拉伯辣木饼提取物,以及

[0020] g) 任选地,干燥所获得的液体阿拉伯辣木提取物以获得固体阿拉伯辣木提取物。

[0021] 本发明的第三主题是化妆品或营养性化妆品组合物,其包括作为活性剂的有效量的根据本发明的阿拉伯辣木种子提取物,以及生理学上可接受的赋形剂。

[0022] 最后,本发明的第四主题是根据本发明的组合物用于改善皮肤、粘膜或体被的外观,用于使皮肤放松、舒缓和舒压,和用于预防和/或对抗皮肤的衰老和/或光衰老的体征,以及用于预防老年斑的化妆品或营养性化妆品用途。

附图说明

[0023] 从本发明的若干种具体实施方式的以下描述,本发明将更好地理解,并且其另外目的、细节、特征和优点将更加清楚呈现,这些描述仅用于说明而非限制给出。

具体实施方式

[0024] 在此描述中,除非另有说明,否则应理解当给出范围时,它包括所述范围的上限和下限。

[0025] 在本发明中,以下缩写具有下文给出的含义:

[0026] -MTT:3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物(MTT测试是用于计数活细胞的快速方法)

[0027] -SDS:十二烷基硫酸钠

[0028] -PBS:磷酸盐缓冲盐水

[0029] -ELISA:酶联免疫吸附测定

[0030] -PCR:聚合酶链反应

[0031] -ANOVA:方差分析

[0032] -MSH:促黑素细胞激素

[0033] 在本发明中,适用以下定义:

[0034] -“富含化合物2,5-二甲酰基咪喃的提取物”:包含化合物2,5-二甲酰基咪喃的量大于其他已确定成分的量,即相对于总提取物的干物质大于50%的量的提取物。

[0035] -“有效量”:为获得期望结果,即使得能够显著获得对皮肤细胞外基质的保护,所必需的活性分子的量。

[0036] -“局部施用”:将根据本发明的活性成分或包含其的组合物施用或铺展到皮肤、粘膜或体被的表面上。

[0037] -“生理学上可接受的”:适用于局部使用、与人皮肤接触或用于经由其他给药途径,例如口服或通过注射入皮肤使用,没有任何毒性、不相容性、不稳定或过敏反应的风险。

[0038] -“饼”:种子压榨后脱油的部分。它是从种子中提取油的固体残余物。它是研磨操作——用于制造油的方法的副产品。它通常占种子质量的50%至75%。

[0039] -“未去壳种子”:意指收获的种子的壳或果皮保留在种子周围。

[0040] -“果实成熟时”:意指果实成熟,优选当荚开始裂开并从深米色变为棕色时,以及当荚的下部四分之一呈180°扭转使瓣(valves)打开时成熟。

[0041] -“主要为醇的溶剂”:意指醇类型的溶剂可以包括具有足够特征以提取活性成分的共溶剂,考虑到96°纯度的乙醇似乎是最合适的醇溶剂。

[0042] -“约”:相对于给定信息(持续时间、百分比等)的加或减10%至20%的幅度。

[0043] -“活性分子”,也称为“活性成分”:根据本发明的方法从阿拉伯辣木种子中提取的2,5-二甲酰基咪喃分子。此分子负责本发明中描述的生物活性。

[0044] -“活性剂”:足够量的根据本发明的提取物以获得所述的生物活性。取决于提取物是液体或干燥的、以及是浓缩或另外的,活性剂的量可以以相对于组合物的总重量按重量计0.002%至20%的比例变化。

[0045] -“皮肤衰老的体征”:皮肤和体被的外部外观由于衰老的任何改变,例如皱纹和细纹、皮肤干瘪、皮肤下垂、皮肤变薄、皮肤缺乏弹性和/或肤色、暗沉、无光泽的皮肤或皮肤上的色素沉着斑、头发变色或指甲污渍,以及还有未通过改变的外部外观系统地反映的皮肤的任何内部变化,例如暴露于紫外(UV)辐射后皮肤的任何内部退化。

[0046] 本发明的第一主题涉及富含化合物2,5-二甲酰基咪喃的阿拉伯辣木种子提取物。2,5-二甲酰基咪喃分子,也称为2,5-咪喃二甲醛,从未以辣木属物种的种子提取物表征。物种阿拉伯辣木生长在非常干旱的气候中。因此,其经受干旱的能力使其能够获得独特的特征,申请人已经能够经由使用适于完整种子或优选地适于种子饼的提取方法来识别这些独特的特征。

[0047] 在本发明的上下文中,选择的植物部分是阿拉伯辣木种子。已知的是,将阿拉伯辣木种子用于提取称为阿拉伯辣木(peregrina)油(INCI名称:阿拉伯辣木种子油)的油,其被地域性用于个人消费或各种传统医学适应症。种子脱油后获得的饼是废物产品,其目前尤其用于动物饲料。

[0048] 根据本发明的第一目的,所述阿拉伯辣木提取物通过以下获得:在搅拌下,以相对于所使用的总重量按重量计约25%的固体物质的比例,在主要为醇的溶剂中,在16至30°C的温度下约2小时的时间段,固液提取未去壳种子饼,所述醇选自乙醇或甲醇,任选地与共溶剂诸如多元醇或亚临界水一起,比例为相对于所述溶剂的总重量按重量计70%至100%的醇,并且分离液相和固相以去除所述固相并回收阿拉伯辣木种子的液体提取物,所述提取物富含化合物2,5-二甲酰基咪喃。优选地,根据本发明的提取物是当阿拉伯辣木果实成熟时,在提取了阿拉伯辣木油(INCI名称:阿拉伯辣木种子油)之后,从收获的种子饼中获得

的。

[0049] 应该指出的是,根据本发明的提取物的活性成分,即2,5-二甲酰基呋喃,是具有一定脆性的混合极性分子。因此,从完整未去壳种子中获得的提取物应使用合适的溶剂和共溶剂以及不超过30°C的温度经历选择性提取以获得高浓度的活性成分。

[0050] 共溶剂可以是例如二醇醚(单丙二醇或二丙二醇、丙二醇和其他丙二醇衍生物、乙二醇或二乙二醇衍生物)甘油、二甲醚异山梨醇、脂肪酸的甲酯或乙酯或丙酯;碳酸二辛酰酯、二辛酰醚、乙酸烷基酯或丙酸烷基酯、丙酮、甲基或乙基酮和单萜诸如 α -蒎烯或柠烯。这些共溶剂可以与主要溶剂(例如乙醇或甲醇)以0至30% (V/V)的比例混合。

[0051] 提取条件可以在大气压下或在真空下或在惰性气氛下,但优选在16至30°C的温度下的黑暗中。

[0052] 在根据本发明的优选实施方式中,提取物是通过固液提取,用醇溶剂96°乙醇从未去壳种子饼中获得的。

[0053] 在又另一种实施方式中,将所获得的液体提取物干燥,以获得包含相对于干物质的总重量按重量计大于50%的2,5-二甲酰基呋喃的所述阿拉伯辣木种子饼的干提取物。

[0054] 阿拉伯辣木种子饼的干提取物更精确地包含相对于干物质的总重量按重量计约55%的2,5-二甲酰基呋喃、2.5%糠醛、1.2%肉豆蔻酸异丙酯、4.7%棕榈酸、11.1%油酸和25.8%甘油三酯。

[0055] 本发明的第二主题为用于获得根据本发明的阿拉伯辣木种子饼提取物的方法,所述方法包括以下步骤,其中:

[0056] a) 收集并干燥未去壳阿拉伯辣木种子,以获得小于8%的内部含水率,

[0057] b) 压榨干燥的种子,以将油与种子的剩余部分分离,获得饼,

[0058] c) 碾磨步骤b)中获得的所述饼,

[0059] d) 以相对于所使用的总重量按重量计约25%的固体材料的比例,将在步骤c)中获得的碾磨材料分散在主要为醇的溶剂中,所述醇选自乙醇或甲醇,任选地与共溶剂诸如多元醇或亚临界水一起,比例为相对于所述溶剂的总重量按重量计70%至100%的醇;

[0060] e) 在搅拌下在16至30°C的温度下约2小时的时间段,进行固液提取,

[0061] f) 分离液相和固相,以去除所述固相并回收液体阿拉伯辣木饼提取物,以及

[0062] g) 任选地,当所述醇为乙醇时,干燥所获得的液体阿拉伯辣木提取物以获得固体阿拉伯辣木提取物。

[0063] 在优选的实施方式中,当果实成熟时并且优选当荚开始裂开时,收集未去壳种子,即保留种子的壳。

[0064] 在优选的实施方式中,干燥种子以获得约6%的内部含水率,干燥优选在避光的通风架上进行,优选在户外阴暗处进行。

[0065] 然后将干燥的种子在冷压榨下即时碾磨,这允许阿拉伯辣木油(INCI名称:阿拉伯辣木种子油)与压缩种子的剩余部分(即饼)机械分离。

[0066] 然后用任何类型的机械磨机诸如锤磨机、连枷磨机、刀磨机或压碎/切碎磨机将饼机械碾磨。

[0067] 提取有利地总是在搅拌下进行,从而允许固体在液体中的分散和均化,改善溶质在溶剂中的扩散。

[0068] 为了主要提取感兴趣的化合物2,5-二甲酰基呋喃,醇溶剂诸如96°乙醇将是优选的,但也可以使用甲醇,与共溶剂诸如多元醇或亚临界水一起。在提取结束时,通过澄清过滤将耗尽感兴趣的化合物的残余植物材料有利地从液相中分离。甚至更优选地,溶剂为96°乙醇。将有利地从阿拉伯辣木种子饼中获得包括0.5%至1.6%的干物质的液体提取物,此干物质由以下构成:至少50%的2,5-二甲酰基呋喃,其对应于液体提取物的总重量的按重量计大约0.25%至0.8%。

[0069] 在根据本发明的生产方法的一种实施方式中,将获得的液体阿拉伯辣木提取物通过蒸馏、微滤、超滤和/或纳滤纯化以相对于还提取的有机材料,尤其相对于提取材料的剩余部分,诸如还提取的脂肪物质和衍生物,浓缩提取物的感兴趣的化合物2,5-二甲酰基呋喃。这些纯化步骤使得能够浓缩感兴趣的化合物,以如所提及的其他提取的化合物以及还有溶剂为代价。

[0070] 在根据本发明的生产方法的另一种实施方式中,将获得的液体提取物干燥,以获得包含相对于提取干物质的总重量按重量计大于50%的感兴趣的化合物2,5-二甲酰基呋喃的阿拉伯辣木种子饼的干提取物。

[0071] 根据本发明的有利的实施方式,当溶剂为乙醇时,优先干燥获得的液体阿拉伯辣木种子提取物,例如通过雾化、冻干或zeodration以获得固体阿拉伯辣木种子饼提取物,已将乙醇蒸发掉。干燥可以在有机载体诸如麦芽糊精、环糊精或菊糖存在下,或在矿物载体诸如层状硅酸盐、硅酸镁或碳酸盐及其盐存在下进行。

[0072] 本发明还涉及可以经由根据本发明的生产方法获得的阿拉伯辣木种子提取物。

[0073] 本发明的第三主题是化妆品或营养性化妆品组合物,其包括作为活性剂的有效量的根据本发明的阿拉伯辣木种子提取物,以及生理学上可接受的赋形剂。

[0074] 可以将根据本发明的组合物配制为呈适用于局部给药或口服给药的各种制剂的形式。

[0075] 根据第一变体,各种制剂适用于局部给药并且包括乳膏、水包油和油包水乳剂、乳状物、软膏、洗剂、油、香膏、水性或水性醇或乙醇溶液、浆液、散剂、贴剂、喷雾剂或用于外部施用的任何其他产品,例如医疗装置或化妆品织物产品。

[0076] 根据第二变体,各种制剂适用于口服给药;包括活性化合物2,5-二甲酰基呋喃的植物提取物,其可以包括在食品组合物或食品补充剂中。在本发明的上下文中,食品补充剂可以呈硬凝胶胶囊或软明胶或植物胶囊的形式。然后所述食品补充剂可以包含按重量计0.01%至100%的植物提取物。更优选地,相对于组合物的总重量,植物提取物的量为按重量计0.02%至40%,以及尤其按重量计0.2%至20%。

[0077] 在食品用途的上下文中,为了营养性或化妆品(化妆食品或营养性化妆品)目的,将组合物有利地配制为呈适用于口服给药的制剂形式。它可以不包括赋形剂并且可以整体由包括活性化合物2,5-二甲酰基呋喃的植物提取物构成。

[0078] 根据优选的实施方式,根据本发明的组合物更特别地旨在用于局部给药。因此,这些组合物必须包含化妆学上可接受的介质,即与皮肤和体被相容的介质,并涵盖所有化妆品形式。这些组合物可以尤其呈以下的形式:乳膏、水包油或油包水乳剂或者复合型乳剂、浆液、溶液、混悬剂、凝胶、乳状物、洗剂、棍状物或甚至散剂,并且可以适用于施用于皮肤、嘴唇和/或体被。这些组合物包括其制剂所必需的赋形剂,诸如溶剂、润肤剂、增稠剂、稀释

剂、表面活性剂、抗氧化剂、生物活性剂、染料、防腐剂和香料。它们可以用作护肤产品和/或皮肤化妆品产品。

[0079] 根据本发明的组合物可以尤其由护发组合物组成,并且尤其为香波、头发调理剂、治疗洗剂、定型乳膏或凝胶、调整头发的洗剂、面膜等。根据本发明的化妆品组合物可以尤其用于涉及可以或不可以随后是冲洗的施用的治疗中,或者替代地呈香波的形式。根据本发明的组合物可以有利地用于去头皮屑治疗。它也可以呈染料或睫毛膏的形式,用刷子或梳子施用,尤其是施用在睫毛、眉毛或头发上。

[0080] 根据本发明的组合物还包括在预想的施用领域中通常使用的任何添加剂以及还有它们的制剂所需的佐剂,诸如溶剂、增稠剂、稀释剂、抗氧化剂、染料、防晒剂、自晒黑剂、颜料、填料、防腐剂、香料、气味吸收剂、化妆品或药物活性剂、精油、维生素、必需脂肪酸、表面活性剂、成膜聚合物等。

[0081] INCI字典和手册(“化妆品成分国际命名(International Nomenclature of Cosmetic Ingredient)”(第13版,2010年),由Personal Care Products Council Inc.,华盛顿特区(Washington,D.C.)出版)描述了护肤行业通常使用的各种各样化妆品和药物成分,但不限于此,它们适用于用作根据本发明的组合物中的另外成分。

[0082] 在任何情况下,本领域技术人员将注意确保选择这些佐剂及其比例,使得根据本发明的组合物的期望有利特性不会受到不利影响。

[0083] 根据本发明的一种有利实施方式,根据本发明的组合物中植物提取物的量为相对于组合物的总重量按重量计0.002%至20%,以及尤其按重量计0.001%至10%。

[0084] 最后,本发明的第四主题是根据本发明的组合物用于改善皮肤、粘膜和体被的外观,用于使皮肤放松、舒缓和舒压,和用于预防和/或对抗皮肤的衰老和/或光衰老的体征,以及用于预防老年斑的化妆品或营养性化妆品用途。

[0085] 根据一种实施方式,根据本发明的用途的目的为更特别地是使皮肤放松、舒缓和舒压,并对抗皮肤衰老的体征。

[0086] 根据另一种实施方式,根据本发明的用途的目的是预防出现老年斑。

[0087] 尽管已经关于若干种具体实施方式描述了本发明,但很明显,本发明并不以任何方式限制于此,并且如果所描述的方式的所有技术等价物以及还有其组合落入本发明的上下文中,则本发明涵括所描述的方式的所有技术等价物以及还有其组合。

[0088] 动词“包含(contain)”、“包括(comprise)”或“包括(include)”及其结合形式的使用并不排除权利要求中所述那些元素或步骤以外的元素或步骤的存在。

[0089] 在权利要求中,括号内的任何参考标志都不应被解释为对权利要求的限制。

[0090] 实施例

[0091] 实施例1:从阿拉伯辣木饼中制备植物提取物

[0092] 当果实成熟时,将收获的未去壳阿拉伯辣木种子干燥,以获得小于8%以及优选约6%的内部含水率,并且然后用机械无头螺旋压榨机压榨,以将油与种子的剩余部分分离,以便一方面获得初榨油,并且另一方面获得饼。然后将饼分离为呈1至2cm块的预切卷的形式。将饼在55°C下预热10分钟,用在55°C下预热10分钟的96°乙醇以25%/75%(m/m)的比率进行浸渍和提取,用掺混机剪切混合物15分钟,并且然后在16°C至30°C的温度下通过叶轮搅拌2小时。然后在真空下通过布氏漏斗(Büchner funnel)过滤产品,以获得包含1.15%干

物质的淡黄色滤液。获得的液体提取物在下文中称为“根据本发明的阿拉伯辣木提取物”或“阿拉伯辣木提取物”或“阿拉伯辣木饼提取物”。随后将此液体提取物用于各种功效测试。

[0093] 根据本发明的此阿拉伯辣木提取物包含1.15%干物质，本身包括(相对于干物质(DM)表示的结果：

[0094] [表1]

	活性化合物	DM 中的总化合物		%
		糠醛	2.528	
	2,5-呋喃二甲醛	54.66		
[0095]	植物来源的脂肪物质	肉豆蔻酸异丙酯	1.175	42.812
		棕榈酸	4.713	
		油酸	11.093	
		甘油三酯	25.831	

[0096] 上文描述的干提取物是经由基于存在于液体提取物中的蒸发之前和之后的质量的重量法获得的。

[0097] 2,5-呋喃二甲醛或2,5-二甲酰基呋喃是此提取物的活性成分。它是通过色谱方法,并且更准确地是通过与火焰离子化检测器耦合的气相色谱法测定的。

[0098] 通过相同的方法测定糠醛。

[0099] 通过相同的方法测定肉豆蔻酸异丙酯。

[0100] 通过相同的方法测定棕榈酸和油酸。

[0101] 通过超速离心分离甘油三酯。

[0102] 实施例2:根据本发明的阿拉伯辣木提取物作为抗氧化剂的作用

[0103] 此研究的目的是使用DPPH(2,2-二苯基-1-苦基肼基)(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)基团以及还有参比抗氧化剂抗坏血酸,在脱细胞体外比色模型中评价阿拉伯辣木提取物对抗氧化活性的调节。使用的方法称为抑制。它基于在540nm处吸收的紫色着色的氧化基团DPPH与参比抗氧化剂抗坏血酸的降解。此反应充当阳性对照并导致形成无色或甚至淡黄色的DPPH化合物。将根据本发明的阿拉伯辣木提取物和参比产品“抗坏血酸”在40°C下放置与DPPH溶液接触30分钟。然后通过测量在540nm处的吸光度来评价抗氧化活性。将此活性的调节表示为测试活性剂的抗氧化活性与对于参比,在抗坏血酸存在下获得的最大抗氧化活性的刺激的百分比(T+)。

[0104] 方案:在不存在(对照)或存在根据本发明的阿拉伯辣木提取物(T+)下以及在降低浓度的测试样品下,将DPPH溶液在40°C下温育30分钟。在温育期结束时,在40°C下30分钟后,通过染色显示在存在参比产品以及在存在或不存在阿拉伯辣木提取物下的抗氧化活性。因此,它通过在540nm处测量反应介质的吸光度来评价。对于每个测试浓度,根据以下公式计算测试产品对抗氧化活性的调节。

[0105] [数学式1]

[0106] 抗氧化活性的调节百分比 = $100 \times [(OD_{540} \text{对照} - OD_{540} \text{测试产品}) / OD_{540} \text{参比产品}]$ 。

[0107] 如果结果为阴性,则将测试产品视为氧化;如果结果为阳性,则将百分比表示为自

由基清除活性的刺激。以下给出获得的结果。

[0108] [表2]

		DPPH 抑制	
[0109]	根据本发明的阿拉伯辣木提取物	2%	36
		1.0%	23
		0.1%	5

[0110] 结论:根据本发明的阿拉伯辣木提取物能够保护以免受自由基:其在1%的浓度和高于1%的浓度下具有显著的抗氧化特性。

[0111] 实施例3:根据本发明的阿拉伯辣木提取物作为金属蛋白酶抑制剂的作用

[0112] 此研究的目的是使用I型胶原酶和透明质酸酶、底物复合物和发色团茚三酮在体外脱细胞模型中,评价根据本发明的阿拉伯辣木提取物对金属蛋白酶抑制活性的调节。I型胶原酶和透明质酸酶的缓冲溶液与特定的底物复合物反应,并将其转化以形成能够通过其在80°C下温育15分钟来激活发色团的化合物。因此可以通过测量在565nm处的吸光度来评价胶原酶和透明质酸酶活性。将样品放置与胶原酶和透明质酸酶溶液连同酶底物复合物在37°C下接触5分钟。通过在80°C下温育15分钟,用酶转化的底物能够激活发色团。然后通过测量在565nm处的吸光度来评价在存在/不存在样品下胶原酶和透明质酸酶活性。在不存在活性剂下,即仅存在酶底物下,将此活性的调节表示为胶原酶和透明质酸酶活性的抑制百分比或激活百分比。

[0113] 方案:在不存在或存在根据本发明的测试阿拉伯辣木提取物下,将I型胶原酶和透明质酸酶的溶液在其底物中温育5分钟。然后将溶液放置与色原茚三酮接触,随后在80°C下温育15分钟。在温育期结束时,通过测量在565nm处的反应介质的吸光度,来评价具有和不具有测试或参比产品的胶原酶和透明质酸酶的活性。对于每个测试浓度,根据以下公式计算测试产品对胶原酶和透明质酸酶酶促活性的调节。

[0114] [数学式2]

[0115] 胶原酶/透明质酸酶酶促活性的调节百分比 = $100 \times [(OD_{\text{测试或参比产品}} - OD_{\text{仅胶原酶/透明质酸酶}}) / OD_{\text{仅胶原酶/透明质酸酶}}]$ 。

[0116] 如果结果为阴性,则将百分比表示为酶抑制;如果结果为阳性,则将百分比表示为酶激活。以下给出了用根据本发明的阿拉伯辣木提取物的金属蛋白酶抑制的结果。

[0117] [表3]

		相对于对照的抑制(%)	
[0118]	根据本发明的阿拉伯辣木提取物	1%	87
		0.5%	87
		0.1%	88
		0.01%	62

[0119] 结论:根据本发明的阿拉伯辣木提取物在0.01%的非常低水平下产生62%的强金属蛋白酶(胶原酶/透明质酸酶)抑制。根据本发明的阿拉伯辣木提取物能够强烈抑制这些金属蛋白酶,并且具有高效保护皮肤的细胞外基质的良好潜力,并且经由此种抑制,它显示

出抗衰老作用。

[0120] 实施例4:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对抑制组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 和 sirtuin I的作用

[0121] 此研究的目的是证明根据本发明的阿拉伯辣木提取物对酶HDAC和sirtuin I的抑制活性。将HDAC和sirtuin I的缓冲溶液与底物在37°C下反应20分钟,并将其转化以形成化合物,在37°C下温育10分钟后,该化合物在显色剂 (developer) 存在下被染色。因此,可以通过测量在405nm处的吸光度来评价sirtuin的最大脱乙酰活性。将根据本发明的阿拉伯辣木提取物或参比产品“曲古抑菌素A (STA) 抑制剂1 μ M”放置与sirtuin溶液连同酶底物在37°C下接触20分钟,并通过添加显色剂对用酶转化的底物染色。然后通过测量在405nm处的吸光度来评价在存在活性剂下HDAC和sirtuin I的脱乙酰活性。在不存在活性剂下,即仅在存在HDAC和sirtuin I酶底物下,将此活性的调节表示为HDAC和sirtuin I的最大活性的抑制百分比或激活百分比。

[0122] 方案:在不存在(对照)或存在参比产品或增加浓度的测试产品下,将sirtuin酶溶液在其底物中温育20分钟。在以下浓度:2%;1%;0.1% (V/V) 下测试根据本发明的阿拉伯辣木提取物。在温育期结束时,通过使用显色剂溶液(在37°C下10分钟)染色来显示并通过测量在405nm处的反应介质的吸光度来评价具有和不具有测试或参比产品的sirtuin酶的活性。对于每个测试浓度,根据以下公式计算测试产品对组蛋白脱乙酰酶和sirtuin I酶的脱乙酰活性的调节。

[0123] [数学式3]

[0124] sirtuin酶促活性的调节百分比 = $100 \times [(OD_{405} \text{ 测试或参比产品}) - (OD_{405} \text{ 仅HDAC和sirtuin I})] / OD_{405} \text{ 仅sirtuin}$ 。

[0125] 如果结果为阴性,则将百分比表示为酶促反应的抑制;如果结果为阳性,则将百分比表示为酶促反应的激活。以下给出了组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 酶的抑制结果。

[0126] [表4]

	百分比	相对于对照的抑制(%)
[0127] 根据本发明的阿拉伯辣木提取物	2%	20
	1%	ns
	0.10%	-18

[0128] 结论:在2%时,根据本发明的阿拉伯辣木提取物示出显著的HDAC抑制;此抑制反映了促进皮肤细胞自我保护免受遗传漂移,尤其是与衰老过程有关的遗传漂移的能力。因此,该提取物似乎可用于对抗皮肤表面上最常见的遗传漂移之一,即纤维化,其通过“皮赘”(纤维化隆凸)的出现来表现。该提取物可以有利地干扰皮肤表面上的纤维化,并且因此预防皮肤衰老。

[0129] 实施例5:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对调节磷脂酶-A2酶的抗炎活性的作用。

[0130] 此研究的目的是借助于“SPLA2 (V型) 抑制剂筛选测定试剂盒”在体外脱细胞模型中评价一种或多种样品对酶磷脂酶A2的抗炎活性的调节。磷脂酶A2是炎症过程上游的关键酶,其由花生四烯酸级联触发。磷脂酶A2的缓冲溶液与特定底物二庚酰基硫代-PC (diheptanoyl thio-PC) 反应,并将其转化为化合物,在室温搅拌下该化合物与色原DTNB结

合。因此可以通过测量在413nm处的吸光度来评价磷脂酶A2活性。将根据本发明的阿拉伯辣木提取物或参比抑制产品“硫醚酰胺-PC”放置与磷脂酶A2溶液同时与酶底物接触。通过在室温下搅拌借助于色原DTNB来染色通过酶转化的底物。然后通过测量在413nm处的吸光度来评价根据本发明的阿拉伯辣木提取物或参比产品的活性。在不存在活性剂下,即仅存在酶底物(二庚酰基硫代-PC)下,将此活性的调节表示为磷脂酶A2活性的抑制百分比或激活百分比。

[0131] 方案:将酶磷脂酶A2的溶液在其底物二庚酰基硫代-PC中温育,在不存在或存在参比抑制剂和根据本发明的阿拉伯辣木提取物下,在以下条件:2%;1%;0.1%(V/V)下进行测试,并且然后掺入色原DTNB,随后在25℃下温育15分钟。在温育期结束时,通过测量在413nm处的反应介质的吸光度,来评价具有和不具有测试产品或参比产品的酶磷脂酶A2的活性。对于每个测试浓度,根据以下公式计算测试产品对磷脂酶A2酶促活性的调节。

[0132] [数学式4]

[0133] 磷脂酶A2酶促活性的调节百分比 = $100 \times [(OD_{405} \text{ 测试产品或参比产品} - OD_{405} \text{ 仅sPLA2}) / OD_{405} \text{ 仅sPLA2}]$ 。

[0134] 如果结果为阴性,则将百分比表示为酶抑制;如果结果为阳性,则将百分比表示为酶激活。以下给出了调节酶磷脂酶-A2的抗炎活性的结果。

[0135] [表5]

		相对于对照的抑制 (%)
[0136]	根据本发明的阿拉伯辣木提取物	2%
		1%
		0.10%
		19
		16
		11

[0137] 结论:根据本发明的阿拉伯辣木提取物在0.1%的剂量和高于0.1%的剂量下,但更优选在1%或2%下生成轻微、稳定的PLA2抑制。这意指根据本发明的阿拉伯辣木提取物具有极早降低花生四烯酸级联/炎症级联的能力;因此,此提取物对皮肤具有良好的舒缓或放松潜力。

[0138] 实施例6:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对抑制内皮素-1作用的作用

[0139] 内皮素是人体内已知的最有效的血管收缩剂。此外,还已知内皮素消耗以产生血管舒张作用[Hirata,Y.et al.,1988,Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells, Biochemical and Biophysical Research Communications,154:3,pages868-875] [Shalinkumar P.et al.,2018,H2S Mediates the Vasodilator Effect of Endothelin-1 in the Cerebral Circulation.American Journal of Physiology.Heart Circulatory Physiology,315,pages 1759-1764]。

[0140] 目的是测定暴露于根据本发明的阿拉伯辣木提取物24小时后人微血管内皮细胞中的1型内皮素。

[0141] 方案:人微血管内皮细胞由PELOBiotech公司提供,并根据供应商的生产程序在96孔板中培养。将提取物以不同浓度作用于处于80%汇合的内皮细胞24小时,并且然后使用

PicoKine ELISA试剂盒 (EDN1) 对细胞上清液中的内皮素-1定量。预先进行生存力测试以规定用于内皮素-1测定的无毒剂量。使用培养基中未处理的细胞进行阴性对照。生存力测试中的阳性对照为0.5% SDS。所有条件均在培养基中准备,并且随后将细胞在36.5°C/5%CO₂下温育24小时。

[0142] a) 将测试溶液施用至内皮细胞:

[0143] 将测试产品放置与96孔板中的处于亚汇合的内皮细胞接触。对于每个浓度,在三个孔中进行测试。将板在36.5°C/5%CO₂下温育24小时±1小时。

[0144] b) 生存力测试:

[0145] 在与产品一起温育后,用MTT方法评价细胞的细胞生存力。温育24小时后,将上清液回收并储存在-20°C下用于测定。然后用200μL的PBS冲洗孔一次。向每个孔中添加50μL的0.5mg/ml MTT溶液:在36.5°C/5%CO₂下温育3小时。向每个孔中添加100μL的异丙醇。均化后,在550nm处读取吸光度。对于每种条件,细胞的平均光密度值与阴性对照的平均光密度值的比率确定生存力比率。

[0146] c) 内皮素-1测定:

[0147] 该测定使用ELISA试剂盒进行。

[0148] [表6]

	提取物浓度	相对于对照的 细胞生长(%)	相对于对照的 内皮素 1(%)	相对于对照的 内皮素 1(pg/ml)
[0149]	根据本发 明的阿拉 伯辣木提 取物	5%	-22.31	-53.21
		1%	0	-11.61
		0.10%	-5.77	-25.11
				-71.8
				-15.66
				-33.88

[0150] 结论:在处理结束时进行的生存力测试没有示出对测试浓度的任何毒性作用。内皮素-1测定在无毒浓度的细胞上清液中进行。使用ELISA试剂盒测定每种条件下的内皮素-1的量。对于阴性对照细胞,该值为大约134.94pg/ml。对于用不同浓度的提取物处理的细胞,这些值为63.14pg/ml (使用5%的根据本发明的提取物)至101.06pg/ml (使用0.1%的根据本发明的提取物),这示出在0.1%和高于0.1%的根据本发明的提取物下非常显著的抑制,对1型内皮素产生具有约25%的抑制,以及用5%的根据本发明的提取物对1型内皮素产生具有最高达53%的抑制。

[0151] 实施例7:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对刺激端粒酶活性的作用

[0152] 端粒是保护DNA的复合体,位于线性染色体的末端,促进染色体稳定性。人的端粒缩短正在发展成为疾病的风险和进展以及多种类型癌症,尤其为乳腺、前列腺、结肠、膀胱、头和颈、肺和肾细胞中过早死亡的预后标志[Ornish D., 2008, Increased Telomerase Activity and Comprehensive Lifestyle Changes:a Pilot Study, Lancet Oncology 9, pages 1048-1057]。通过细胞酶端粒酶抵消了端粒缩短。

[0153] 该研究的目的是在由以单层培养的低传代水平的成人角质形成细胞构成的模型中,评价称为“根据本发明的阿拉伯辣木提取物”的化合物对端粒酶活性的作用。

[0154] 方案:从49岁的供体获得人角质形成细胞。为了进行实验,在低传代水平(即细胞分离传代数2)下使用角质形成细胞。这些细胞作为单层生长,直到它们达到约75%的汇合,之后被用于实验。

[0155] 参比产品:将100ng/ml的FK228用作端粒酶1活性的参比诱导物。

[0156] 温育方案:在不存在(对照)或存在参比产品或增加浓度的测试化合物诸如根据本发明的阿拉伯辣木提取物下在0.5;1%和5%(v/v)下,将细胞温育24小时。

[0157] 将根据本发明的阿拉伯辣木提取物在温育培养基中直接稀释,以达到上述各种浓度。

[0158] 作用评价:

[0159] -蛋白质测量

[0160] 在温育期结束时,将细胞总蛋白质从细胞中提取,并借助于光谱比色方法(布拉德福德(Bradford)方法)测量。该测量用于确定用于端粒酶活性测量中的提取物的确切体积,以对于在PCR步骤中测试的所有条件均保持相同量的蛋白质(包含端粒酶)。

[0161] -端粒酶活性的测量

[0162] 在温育期结束时,将端粒酶从细胞中提取,并借助于特异性、灵敏的试剂盒确定其活性。端粒酶试剂盒的原理是通过将PCR步骤(其中端粒酶的功能与其延伸活性有关)与ELISA步骤耦合来测量端粒酶活性,以半定量确定端粒酶延伸产物的量。

[0163] -统计

[0164] 结果以端粒酶活性水平的任意单位表示(平均值±S.D)。借助于学生t检验评价“媒介物(vehicle)”和“参比产品”之间的显著性水平(*:p<0.05)。通过单向方差分析(单向ANOVA)、随后的Holm-Sidak检验独立评价每种产品的“对照”和“测试化合物”之间的显著性水平(*:p<0.05)。

[0165] 在0.5%和1%(v/v)下测试的根据本发明的阿拉伯辣木提取物,相对于“对照”没有显著地调节端粒酶活性。当在5%(v/v)下测试时,与“对照”相比,根据本发明的阿拉伯辣木提取物显著增加18.9%(p<0.001)的端粒酶活性。

[0166] 将名称为“FK228”的参比产品在100ng/ml下测试,端粒酶活性显著增加28.0%(p<0.01)。这个结果是预期的并且验证了实验。以下给出了端粒酶活性的刺激结果。

[0167] [表7]

	提取物的浓度	相对于对照的细胞生长(%)	相对于对照的端粒酶的活性(%)
[0168] 根据本发明的阿拉伯辣木提取物	5.00%	+5.8	+18.90
	1.00%	大约-2.2	+4.00
	0.50%	-2.6	+2.30

[0169] 结论:在0.5%和1%(v/v)下测试的根据本发明的阿拉伯辣木提取物,相对于“对照”没有显著地调节端粒酶活性。当在5%(v/v)下测试时,与“对照”相比,根据本发明的阿拉伯辣木提取物显著增加18.9%(p<0.001)的端粒酶活性。根据本发明的提取物直接作用于该酶促途径,该酶促途径在染色体末端建立保护性端粒,并减缓遗传物质的自然衰老。因

此,根据本发明的提取物可以对染色体产生抗衰老作用。

[0170] 实施例2至7证明了根据本发明的阿拉伯辣木提取物具有抗衰老、抗应激和放松特性,其展示了良好皮肤保护剂的属性。

[0171] 实施例8:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对刺激酪氨酸酶活性的作用

[0172] 此研究的目的是使用真菌来源的酪氨酸酶 (Sigma-Aldrich ref.T3824)、其底物 L-酪氨酸 (Sigma-Aldrich ref.T3754) 和参比抑制剂氢醌 (Sigma-Aldrich ref.H17902, 抑制剂=氢醌2.5mM), 在体外脱细胞模型中评价根据本发明的阿拉伯辣木提取物对酶酪氨酸酶的活性。将酪氨酸酶的缓冲溶液在23℃下与底物L-酪氨酸2.5mM反应60分钟,并将其转化以形成有色化合物。因此可以通过测量在475nm处的吸光度来评价最大酪氨酸酶活性。将根据本发明的阿拉伯辣木提取物或参比产品“氢醌”放置与酪氨酸酶溶液连同酶底物在23℃下接触60分钟,用酶转化的底物是自然着色的。然后通过测量在475nm处的吸光度来评价在存在活性剂下的酪氨酸酶活性。在不存在活性剂下,即仅存在酶底物(L-酪氨酸)下,将此活性的调节表示为最大酪氨酸酶活性的抑制百分比或激活百分比。

[0173] 方案:在不存在(对照)或存在参比产品或增加浓度的根据本发明的阿拉伯辣木提取物/浓度2%;1%;0.1%(V/V)下,将酪氨酸酶溶液在其底物L-酪氨酸中温育60分钟。在温育期结束时,通过测量在475nm处的反应介质的吸光度,来评价具有和不具有测试或参比产品的酪氨酸酶的活性。对于每个测试浓度,根据以下公式计算测试产品对酪氨酸酶酶促活性的调节。

[0174] [数学式5]

[0175] 酪氨酸酶酶促活性的调节百分比 = $100 \times [(OD_{475} \text{测试产品或参比产品}) - (OD_{475} \text{仅酪氨酸酶})] / OD_{475} \text{仅酪氨酸酶}$ 。

[0176] 如果结果为阴性,则将百分比表示为酶抑制;如果结果为阳性,则将百分比表示为酶激活。以下给出了酪氨酸酶活性的刺激结果。

[0177] [表8]

		相对于对照的激活(%)
[0178]	根据本发明的阿拉伯辣木提取物	2%
		1%
		0.10%
		65
		37
		8

[0179] 结论:根据本发明的阿拉伯辣木提取物能够降低基础酪氨酸酶活性,这使得可以表明该提取物具有增加皮肤保护的天然形式之一的能力:保护免受紫外线。

[0180] 实施例9:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对抑制黑素产生的作用

[0181] 关于人细胞培养的此研究的目的是核对使用的所有数据以及还有获得的结果,为了对人黑素细胞在暴露于根据本发明的阿拉伯辣木提取物5天后进行黑素调节测试。

[0182] 方案:在96孔板和24孔板中培养人黑素细胞。

[0183] 允许根据本发明的阿拉伯辣木提取物以5%、2%、1%和0.1%的浓度作用于汇合的黑素细胞5天。在24小时后用MTT的生存力预测试,使得可以评价细胞毒性并选择黑素调节测试的浓度。在暴露于提取物5天后,通过测定细胞裂解物中的黑素来评价这种调节。使

用培养基中未处理的细胞进行阴性对照。生存力测试的阳性对照为0.5% SDS。对于黑素调节测试,使用具有和不具有 α -MSH的介质作为阴性对照。

[0184] 所有条件均在培养基中准备,并且随后将细胞在36.5°C/5%CO₂下温育24小时用于细胞毒性测试,以及温育5天用于黑素测定。

[0185] a) 将测试溶液施用至黑素细胞:将测试浓度放置与96孔板(细胞毒性测试)和24孔板(黑素测定)中的汇合黑素细胞接触。对于每个浓度,在三个孔中进行测试。将板在36.5°C/5%CO₂下温育24小时±1小时和5天。

[0186] b) 生存力测试:在与产品一起温育24小时后,用MTT方法评价细胞的细胞生存力。在温育24小时后,用200 μ L的PBS冲洗预定孔一次。向每个孔中添加50 μ L的0.5mg/ml MTT溶液,并且在36.5°C/5%CO₂下进行温育3小时。向每个孔中添加150 μ L的异丙醇。均化后,在550nm处读取吸光度。对于每种条件,细胞的平均光密度值与阴性对照的平均光密度值的比率确定生存力比率。

[0187] 将相对于阴性对照值的70%的生存力截止值用于将测试物质分类为细胞毒性或非细胞毒性。对于生存力>70%的体外结果,给出了“非细胞毒性”分类,并且对于生存力 \leq 70%,给出了“细胞毒性”分类。

[0188] 5%浓度的根据本发明的提取物在测试条件下在5%下被证明是细胞毒性的。因此,将2%、1%和0.1%的浓度用于黑素调节测试。细胞裂解后,测定存在于细胞中的黑素的量。以下给出了抑制黑素产生的结果。

[0189] [表9]

	提取物浓度	相对于对照的 细胞生长(%)	相对于对照的 黑素抑制(%)	黑素含量 (μ g/ml)
[0190] 根据本发明的阿拉伯辣木提取物	2%	-3.41	+16.50	152
	1.0%	+13.46	+65.90	62
	0.10%	+13.29	+71.40	52

[0191] 结论:根据本发明的阿拉伯辣木提取物抑制细胞中黑素产生,这给予其皮肤保护特性。这种抑制还示出对黑素细胞的放松作用,因为基础速率比对照(培养基中不存在根据本发明的提取物)的基础速率更低;据回顾黑素的产生是对细胞应激的反应。因此,根据本发明的阿拉伯辣木提取物证明它能够预防老年斑。

[0192] 实施例10:根据本发明的阿拉伯辣木提取物对比用相同提取方法的辣木提取物的分析表征

[0193] 在阿拉伯辣木饼和辣木饼的基础上,施用实施例1中所述的根据本发明的提取方法。以下以干物质为基础给出了提取成分的比较组合物。

[0194] [表10]

化合物	辣木(%)	阿拉伯辣木(%)
乙酸	1.431	-
1-羟基-2-丙酮	1.962	-
糠醛	6.140	2.528
2,5-呋喃二甲醛(DFF)	0.823	55.660
肉豆蔻酸异丙酯	0.128	1.175
棕榈酸甲酯	0.230	—
棕榈酸	10.356	4.713
棕榈酸乙酯	0.399	—
亚油酸甲酯	0.428	—
[0195] 油酸甲酯	2.443	—
油酸	47.844	11.093
油酸乙酯	2.675	—
硬脂酸	5.064	—
己二酸双(2-乙基己基)酯 (Bis(2-ethylhexyl) hexanedioate)	1.688	—
7-氧亚基脱氢枞酸甲酯 (Methyl 7-oxodehydroabietate)	0.327	—
1,4-对苯二甲酸 2-乙基己酯	0.655	—
总计	84.317	74.169

[0196] 看出,这两种提取物具有非常不同的分子谱。辣木提取物包含小于1%的DFF,而阿拉伯辣木提取物包含大于50%的DFF。

[0197] 实施例11:与辣木在管内(in tubo)胶原酶测试中的比较测试

[0198] 此研究的目的是使用I型胶原酶和透明质酸酶、底物复合物和发色团茚三酮在体外脱细胞模型中,评价根据本发明的阿拉伯辣木提取物对金属蛋白酶抑制活性的调节。I型胶原酶和透明质酸酶的缓冲溶液与特定的底物复合物反应,并将其转化以形成能够通过80°C下温育15分钟来激活发色团的化合物。因此可以通过测量在565nm处的吸光度来评价胶原酶和透明质酸酶活性。将样品放置与胶原酶和透明质酸酶溶液连同酶底物复合物在37°C下接触5分钟。通过在80°C下温育15分钟,用酶转化的底物能够激活发色团。然后通过测量在565nm处的吸光度来评价在存在/不存在样品下胶原酶和透明质酸酶活性。在不存在活性剂下,即仅存在酶底物下,将此活性的调节表示为胶原酶和透明质酸酶活性的抑制百分比或激活百分比。

[0199] 方案:在不存在或存在根据本发明的测试阿拉伯辣木提取物下,将I型胶原酶和透明质酸酶的溶液在其底物中温育5分钟。然后将溶液放置与色原茚三酮接触,随后在80°C下温育15分钟。在温育期结束时,通过测量在565nm处的反应介质的吸光度,来评价具有和不具有测试或参比产品的胶原酶和透明质酸酶的活性。对于每个测试浓度,根据以下公式计

算测试产品对胶原酶和透明质酸酶酶促活性的调节。

[0200] [数学式6]

[0201] 胶原酶/透明质酸酶酶促活性的调节百分比 = $100 \times [(OD_{\text{测试或参比产品}} - OD_{\text{仅胶原酶/透明质酸酶}}) / OD_{\text{仅胶原酶/透明质酸酶}}]$ 。

[0202] 如果结果为阴性,则将百分比表示为酶抑制;如果结果为阳性,则将百分比表示为酶激活。以下给出了金属蛋白酶抑制的结果。

[0203] [表11]

		相对于对照的抑制(%)	
[0204]	根据本发明的阿拉伯辣木提取物	1%	87
		0.5%	87
		0.1%	88
		0.01%	62

[0205] 结论:根据本发明的阿拉伯辣木提取物产生强金属蛋白酶(胶原酶/透明质酸酶)抑制。根据本发明的阿拉伯辣木提取物在0.1%的浓度和高于0.1%的浓度下,能对这些金属蛋白酶发挥88%的抑制,并且具有高效保护皮肤的细胞外基质的良好潜力,并且经由此种抑制,它显示出抗衰老作用。

[0206] 将其与根据Pierre Fabre专利FR 2 946 879的提取物比较,根据相同的测试,以下给出比较的结果。

[0207] [表12]

		相对于对照的抑制(%)	
[0208]	根据 Pierre Fabre 专利的辣木提取物	1%	浓度与测试体系不兼容
		0.5%	4
		0.1%	24
		0.01%	42

[0209] 结论:根据Pierre Fabre专利的提取物对胶原酶活性示出轻微相反的剂量依赖性抑制作用,所有组合的浓度具有的峰值抑制为42%,而根据本发明的阿拉伯辣木提取物的峰值抑制为100%。

[0210] 与用根据Pierre Fabre专利的提取物观察的作用相比,关于该参数的抗衰老活性似乎不同且新颖。

[0211] 实施例12:抗应激活性(通过抑制PLA2)的比较测试。

[0212] 对于通过抑制皮肤上的PLA2的抗应激活性,其提供具有抗衰老作用的镇静/抗应激取向,进行了两项额外的管内PLA2测试:一种经由根据本发明的方法在辣木饼上进行(与根据本发明的方法制备阿拉伯辣木相同的方法制备的提取物),一种用对应于Pierre Fabre专利FR 2 946 879的提取物,另一种对应于BASF Beauty Care Solutions专利FR 3 076 460的产品 Purisoft®,以及最终最后一种Chuun&Thurot专利FR2825267。

[0213] 此研究的目的是借助于“SPLA2 (V型) 抑制剂筛选测定试剂盒”在体外脱细胞模型中评价一种或多种样品对酶磷脂酶A2的抗炎活性的调节。

[0214] 磷脂酶A2的缓冲溶液与特定底物二庚酰基硫代-PC (diheptanoyl thio-PC) 反应, 并将其转化为化合物, 在室温搅拌下该化合物与色原DTNB结合。因此可以通过测量在413nm处的吸光度来评价磷脂酶A2活性。

[0215] 将产品“根据本发明的阿拉伯辣木提取物”或参比抑制产品“硫醚酰胺-PC”放置与磷脂酶A2溶液同时与酶底物接触。通过在室温下搅拌借助于色原DTNB来染色通过酶转化的底物。然后通过测量在413nm处的吸光度来评价在存在/不存在产品“根据本发明的阿拉伯辣木提取物”或参比产品下的磷脂酶A2的活性。

[0216] 在不存在活性剂下, 即仅存在酶底物(二庚酰基硫代-PC)下, 将此活性的调节表示为磷脂酶A2活性的抑制百分比或激活百分比。

[0217] 以1mg在100 μ l中的浓度的抑制剂“硫醚酰胺-PC”是此研究中的参比产品(活性对照); 所述产品抑制PLA2活性93%, 从而验证该测试。

[0218] 将酶磷脂酶A2的溶液在其底物二庚酰基硫代-PC中不存在或存在参比抑制剂和测试产品“根据本发明的阿拉伯辣木提取物”下温育, 并且然后掺入色原DTNB, 随后在25 $^{\circ}$ C下温育15分钟。

[0219] 在温育期结束时, 通过测量在413nm处的反应介质的吸光度, 来显示具有和不具有测试产品或参比产品的酶磷脂酶A2的活性。对于每个测试浓度, 根据以下公式计算测试产品对磷脂酶A2酶促活性的调节。

[0220] [数学式7]

[0221] 磷脂酶A2酶促活性的调节百分比 = $100 \times [(\text{OD}_{405} \text{测试产品或参比产品} - \text{OD}_{405} \text{仅sPLA2}) / \text{OD}_{405} \text{仅sPLA2}]$ 。

[0222] 如果结果为阴性, 则将百分比表示为酶抑制; 如果结果为阳性, 则将百分比表示为酶激活。

[0223] [表13]

[0224]	根据本发明的阿拉伯辣木提取物	1%	19
		0.1%	16
		0.01%	11

[0225] 根据本发明的该阿拉伯辣木提取物对PLA2抑制的一致性和基本上剂量依赖性活性显示了通过降低花生四烯酸级联上游的强度的镇静活性。这种远在花生四烯酸级联上游的镇静作用降低了基础生理应激的影响。因此, 根据本发明的阿拉伯辣木提取物是抗应激剂。

[0226] 使用来自Pierre Fabre专利FR 2 946 879的方案提取物, 获得以下结果。

[0227] [表14]

[0228]	Pierre Fabre 提取物	1%	0
		0.1%	16
		0.01%	8

[0229] 在1%下,其对应于其最低工作剂量,提取物没有示出任何活性。稀释后,活性出现,但不存在剂量依赖性作用使得不能验证该提取物对这种酶的抑制的特异性和可靠性作用。

[0230] 使用来自BASF Beauty Care Solutions专利FR 3 076 460的产品**Purisoft®** LS9726的方案提取物,获得以下结果。

[0231] [表15]

[0232]	BASF 提取物	1%	10
	Purisoft LS9726	0.1%	12
		0.01%	6

[0233] 该提取物示出轻微的抑制作用,其未达到用根据本发明的阿拉伯辣木提取物在1%下观察到的最大量,即对于根据本发明的提取物,19%抑制,而对于该提取物,在1%下10%抑制。

[0234] 使用来自Chuun&Thurot专利FR 2 825 267的方案提取物,观察到以下结果。

[0235] [表16]

[0236]	Chuun & Thurot 提取物	1%	0
		0.1%	0
		0.01%	0

[0237] 这种提取物对这种酶没有示出任何抑制作用。

[0238] 使用来自根据本发明的方法的方案提取物,但被施用于辣木饼而不是阿拉伯辣木饼,观察到以下结果。

[0239] [表17]

[0240]	辣木提取物	1%	不可测定
		0.1%	0
		0.01%	6

[0241] 这种提取物对这种酶没有示出任何显著或稳定的抑制作用。

[0242] 结论:只有根据本发明的阿拉伯辣木提取物证明对酶PLA2的显著抑制活性。

[0243] 实施例13:化妆品产品制剂

[0244] [表18]

[0245]

成分	%
水	适量
辛酸/癸酸甘油三酯	19.0000
阿拉伯胶树胶(<i>Acacia senegal gum</i>)	7.0000
活性炭	6.0000
甘油	5.0000
丙二醇	5.0000
膨润土	3.1500
鲸蜡硬脂基葡糖苷	3.0000
鲸蜡硬脂醇	3.0000
苯甲醇	1.0000
根据本发明的阿拉伯辣木提取物	2.0000
纤维素胶	0.8000
黄原胶	0.1750
柠檬酸	0.1750

[0246] 实施例14:洗涤产品制剂

[0247] [表19]

成分	%
水	适量
椰油酰基硫酸钠	5.0000
椰油酰基羟乙磺酸钠	4.0000
膨润土	3.7800
辛酸/癸酸甘油三酯	2.0000
根据本发明的阿拉伯辣木提取物	1.0000
葡糖酸内酯	0.7500
苯甲酸钠	0.5450
香料	0.5000
黄原胶	0.2700
硬脂酰基谷氨酸钠	0.2250
柠檬酸	0.2250
葡萄糖酸钙	0.0050

[0249] 实施例15:护理产品制剂(抗应激抗衰老乳膏)

[0250] [表20]

成分	%
水	适量
辛酸/癸酸甘油三酯	18.0000
膨润土	4.2000
鲸蜡硬脂醇	1.5000
根据本发明的阿拉伯辣木提取物	5.0000
葡糖酸内酯	0.7500
苯甲酸钠	0.5450
黄原胶	0.5000
香料	0.5000
硬脂酰基谷氨酸钠	0.2500
柠檬酸	0.2500
葡萄糖酸钙	0.0050

[0253] 实施例16:营养性化妆品口服途径制剂

[0254] 用于镇静/抗应激活性的1g片剂包括:3%根据本发明的干提取物(在菊糖载体上包含0.6%2,5-二甲酰基咪喃)+47%包含200IU维生素D的碳酸钙+25%葡萄糖酸镁+22%菊糖+3%硬脂酸镁。

[0255] 实施例17:根据本发明的阿拉伯辣木提取物的毒理学测试

[0256] 根据实施例1制备阿拉伯辣木提取物:

[0257] 当果实成熟时,将收获的阿拉伯辣木种子干燥,以获得约6%的内部含水率,并且然后用机械无头螺旋压榨机压榨,以将油与种子的剩余部分分离,以便一方面获得初榨油,并且另一方面获得饼。然后将饼分离为呈1至2cm块的预切卷的形式。用在55°C下预热10分钟的96°乙醇以25%/75%(m/m)的比率对饼进行浸渍和提取。用掺混机剪切混合物15分钟,并且然后在20°C下通过叶轮搅拌2小时。然后在真空下通过布氏漏斗过滤产品,以获得包含1.15%干物质的淡黄色滤液。将该滤液用于以下的测试中。

[0258] 确定细菌菌株鼠伤寒沙门菌(Salmonella typhimurium)(TA 100)的致突变活性-细菌回复突变测试

[0259] 测试在三个主要阶段中进行:

[0260] -进行初步实验,以评价待测试元素的细胞毒性,并为随后实验选择剂量范围,

[0261] -第一遗传毒性实验(测试1),具有和不具有代谢活化,在初步研究规定的剂量范围内,在最小琼脂上直接掺入测试体系和测试(或对照),

[0262] -第二实验(测试2),对测试体系和测试元素(或对照)进行预温育,具有和不具有代谢活化,剂量水平由研究负责人在分析第一实验结果后规定。进行该第二实验以便确认或完成第一实验的结果,尤其是当获得模棱两可或阴性结果时。

[0263] 在分析级水中制备测试元素的稀释液。

[0264] 在浓度为5000、1600、500、160和50µg/板,具有和不具有S9-混合物(S9-Mix)的菌株鼠伤寒沙门菌TA100上进行细胞毒性测试。

[0265] 根据以下说明制备用于制备S9-混合物的试剂:

[0266] [表21]

	最终浓度
MgCl ₂ (0.4 M) + KCl (1.65 M)	8 mM + 33 mM
葡萄糖 6-磷酸盐(0.2 M)	5 mM
NADP (0.1 M)	4 mM
[0267] S9-混合物的磷酸盐缓冲液(pH 7.4 - 0.2 M)	0.1 M
S9 组分(fraction)	10%
水	调节到最终浓度

[0268] 将细菌暴露于具有和不具有代谢活化体系的测试提取物中。所使用的代谢体系是补充辅因子的后线粒体组分(S9)。该S9组分,用酶诱导物处理的Sprague-Dawley大鼠肝匀浆的微粒体组分,是根据Maron,D.M.and Ames,B.N.(1983)制备的,并且由Moltox TM提供。将其在低于-70°C的温度下储存。S9微粒体组分在S9-混合物中以10%的浓度使用。施用的

方案如下：

[0269] • 将以下引入三个溶血管中：

[0270] ○不具有代谢活化的测定：

[0271] • 0.1ml的各种浓度的测试元素，

[0272] • 0.5ml的无菌0.2M, pH 7.4磷酸盐缓冲液，

[0273] • 2ml的用于鼠伤寒沙门菌的顶层琼脂，

[0274] • 0.1ml的细菌接种物 (TA100)。

[0275] ○具有代谢活化的测定：

[0276] • 0.1ml的各种浓度的测试元素，

[0277] • 2ml的用于鼠伤寒沙门菌的顶层琼脂，

[0278] • 0.1ml的细菌接种物 (TA100)，

[0279] • 0.5ml的S9-混合物。

[0280] • 混合并倒入到之前铺在培养皿中的底层琼脂表面上。

[0281] • 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下温育48至72小时。

[0282] 对于每个测试进行这些测定：初步细胞毒性测试、测试1和测试2。将未经处理的对照、在预温育方法期间产生的阴性对照和阳性对照在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下温育20至30分钟，之后倒入顶层琼脂。

[0283] 施用的方案如下：

[0284] • 将以下引入四个2-ml的用于鼠伤寒沙门菌的顶层琼脂的组分中：

[0285] ○ 0.1ml的0.2M, pH 7.4磷酸盐缓冲液，

[0286] ○ 0.1ml的溶剂，

[0287] ○ 0.1ml的S9-混合物，

[0288] ○ 0.1ml的最高浓度的测试元素制剂，

[0289] • 2ml的用于鼠伤寒沙门菌的顶层琼脂的组分用于检查其无菌度。

[0290] • 混合并倒入到之前铺在培养皿中的底层琼脂表面上。

[0291] • 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下温育48至72小时。

[0292] • 一式三份进行该测试。

[0293] • 不应观察到细菌生长。

[0294] 对于至少五种浓度的测试提取物，进行了不具有代谢活化的测试和具有代谢活化的测试。

[0295] 表达和解释结果

[0296] 许多准则使得可以确定结果是否为阳性，尤其是与测试项的剂量相关的回复体的数量增加，或在一种或多种浓度下，在具有或不具有代谢活化下，回复体数量的可再现增加。

[0297] -如果在验证步骤的结论中，在具有和/或不具有代谢活化的五种菌株中的一种或多种上可再现地获得剂量-作用关系，则将测试元素视为是致突变的。当回复体的数量对于菌株TA98、TA100和TA102至少等于自发回复率的两倍 ($R \geq 2$) 以及对于菌株TA1535和TA1537至少等于自发回复率的三倍 ($R \geq 3$) 时，才将给定浓度视为致突变性。

[0298] -如果在具有和不具有代谢活化下，在测试1和测试2的结论中，回复体的频率对于

所有浓度的测试元素,对于菌株TA98、TA100和TA102,始终保持小于自发回复率的两倍($R < 2$),以及对于菌株TA1535和TA1537小于自发回复率的三倍($R < 3$),并且前提是检查不存在致突变作用与测试浓度的毒性无关,则将测试元素视为是非致突变的。

[0299] 初步研究示出,测试元素没有细胞毒性;因此,将该浓度范围用于遗传毒性测试1。

[0300] 基于测试1获得的结果,决定对测试2使用相同的稀释范围。回复体的分析示出:

[0301] -没有观察到细胞毒性作用,

[0302] -在具有和不具有代谢活化下,没有测试提取物的浓度示出比率 R 对于TA98、TA100和TA102大于或等于自发回复率的至少两倍,或对于TA1535和TA1537,大于或等于自发回复率的三倍,

[0303] -无论测试体系或测试条件如何,均未观察到剂量反应。

[0304] 根据此研究中获得的结果,可以将根据实施例1的阿拉伯辣木提取物视为不具有致突变或原致突变(promutagenic)活性。

[0305] 体外光毒性测试3T3 NRU

[0306] 测试的原理是基于在存在和不存在非细胞毒性剂量的UVA下,根据实施例1的阿拉伯辣木提取物对培养物中细胞的细胞毒性的比较。在具有或不具有UVA辐照下,在用参比元素和阿拉伯辣木提取物处理后24小时,通过使用活体染料:中性红确定细胞生存力来评价细胞毒性。使用的细胞是Ba1b/c 3T3克隆31系(ATCC-CCL163)的小鼠胚胎成纤维细胞。阳性对照是氯丙嗪溶液(CAS No.:69-09-0)。阴性对照是用于测试提取物和参比的稀释液(缓冲盐水溶液 $\pm 1\%$ 溶剂)。在存在或不存在UVA下,在八个浓度下,在至少四个培养孔/研究的浓度中测试阿拉伯辣木提取物。将成纤维细胞胰酶消化,并在两个96孔培养板中接种在完全培养基中包含 2×10^5 个细胞/ml(即 2×10^6 个细胞/孔)的 $100\mu\text{l}$ 细胞悬浮液。

[0307] 将接种板在 37°C 和 $5\% \text{CO}_2$ 下温育24小时。在温育结束时,检查细胞菌苔的半汇合。在就将沉积在细胞上之前制备稀释液。测量最高浓度的pH;它在6.5至8。去除培养基,用保持在室温下的 $150\mu\text{l}$ 的PBS小心地预冲洗每个孔,并且然后用 $100\mu\text{l}$ 的每种提取物或参比稀释液处理。将培养板在黑暗中以 37°C 和 $5\% \text{CO}_2$ 下温育 $1\text{h} \pm 5$ 分钟。使用Bio Sun太阳能辐照器(Vilber Lourmat RMX3W)进行辐照。Bio Sun机器是借助于可编程微处理器控制UV辐照的系统。系统连续跟踪UV光发射。当递送的能量等于程序编入的能量时,辐照自动停止。使用校准的光谱辐射计在250至700纳米的波长范围内测量测试装置的光谱辐照度。将两块板中的一块在室温下用其盖(cover)辐照,并且另一块板被保护免受UVA,并在辐照期间保持在室温。辐照后,抽取处理介质并冲洗细胞。然后小心添加不含 μl 完全培养基,并将板在 37°C 和 $5\% \text{CO}_2$ 下温育18至22h。第二天,通过使用相差显微镜观察来评价细胞生存力(生长、形态、单层完整性)。去除培养基,并且在用 $100\mu\text{l}$ 的染色溶液处理之前,将每个孔预冲洗并保持在室温。在相同条件下,将板放回培养箱3小时。去除染色溶液并冲洗细胞,然后去除冲洗溶液,并向每个孔中添加 $150\mu\text{l}$ 的解吸(desorption)溶液。摇动板,直到晶体完全溶解。在450nm处测量吸光度值。

[0308] 测试验证:

[0309] 在细胞暴露于增加的辐照剂量后,通过评价细胞的生存力,大约每10代检查细胞的UVA敏感性。以测试中使用的密度培养细胞。第二天以 2.5 至 $9\text{J}/\text{cm}^2$ 的剂量对它们辐照,并且一天后借助于NRU测试确定细胞生存力。如果细胞在 $5\text{J}/\text{cm}^2$ 下的UVA辐照后生存力大于或

等于保持在黑暗中的对照的生存力的80%，则细胞符合品质准则；在最高剂量9J/cm²的UVA下，生存力必须至少等于保持在黑暗中的对照的生存力的50%。

[0310] 结果：

[0311] 阴性对照具有的吸光度大于或等于0.4。阳性对照氯丙嗪在存在UVA下具有的IC₅₀值为0.1至2μg/ml，以及在不存在UVA下为7至90μg/ml。这些结果使得可以验证该测试。不能估计在存在或不存在UVA下，产生50%细胞死亡的阿拉伯辣木饼提取物的浓度。死亡率从未达到50%。不能估计在存在或不存在UVA下，产生50%细胞生存力的阿拉伯辣木饼提取物的浓度。生存力始终大于50%。

[0312] 结论：在所采用的实验条件下，可以视为阿拉伯辣木饼提取物是无光毒性的。

[0313] 通过使用中性红释放方法研究SIRC细胞系的体外细胞毒性，来评价眼刺激可能性

[0314] 该体外研究是基于通过借助于中性红释放技术确定导致细胞单层上50%细胞死亡的浓度(IC₅₀)来评价阿拉伯辣木饼提取物的细胞毒性。使用的细胞是无支原体的SIRC兔角膜成纤维细胞(ATCC-CCL60)。

[0315] 将阿拉伯辣木提取物在生理盐水中稀释至25%和50%。将成纤维细胞胰酶消化并在两个24孔培养板中以在完全培养基中包含2×10⁵个细胞/ml的1ml细胞悬浮液的比率接种。将接种板在37℃和5%CO₂下温育过夜。在温育结束时，检查细胞菌苔的汇合。在完全培养基中以0.5mg/ml制备染色溶液。去除培养基，并在每个孔中放置1ml的染色溶液。将板放回在37℃和5%CO₂下的培养箱3小时±15分钟。在该接触时间后，去除染色溶液，并用每孔1ml的完全培养基替换。在与提取物或参比接触之前，将板在室温下保持至少30分钟，以稳定体系。将每个孔用2ml的PBS冲洗，保持在室温下，并且然后将500μl的阿拉伯辣木提取物或参比的每种稀释液放置与细胞菌苔接触。接触时间为60秒(阳性对照为30秒)。在放置阿拉伯辣木提取物或参比的那一刻，秒表开始，逐孔进行处理。在整个处理中手动摇动板。55秒(或阳性对照为25秒)后，抽取稀释液。在精确的60或30秒时，进行五次依次冲洗(5x 2ml PBS, 保持在室温下)。每次冲洗后抽取上清液，并且最后一次冲洗后，在等待显示阶段时，保持孔中没有介质。在完全处理培养板后，将1ml的解吸溶液放置在每个孔中。将板摇动约15分钟，直到获得均匀的染色。将每个培养孔获得的溶液取出并分成96孔板的两个孔中，即150μl/孔。

[0316] 结果：

[0317] 将导致50%细胞死亡的阿拉伯辣木提取物的浓度评价为>50%。阿拉伯辣木提取物在50%下的细胞死亡百分比被评价为17%。

[0318] 结论：在所采用的实验条件下，可以将阿拉伯辣木饼提取物的细胞毒性视为是微不足道的细胞毒性。

[0319] 在皮肤病学控制下，在包扎疗法下单次施用48小时后评价阿拉伯辣木提取物的皮肤相容性

[0320] 此研究的目的是通过在手臂的前外面进行48小时的表皮(epicutaneous)测试来评价阿拉伯辣木提取物的皮肤相容性程度；并且通常评价阿拉伯辣木提取物保持皮肤良好状态的能力。将来自18至65岁，不具有干性皮肤也不具有敏感皮肤并且处理区域没有任何皮肤病学病变的10名健康的女性或男性志愿者将纳入研究中。在去除敷料后初始施用30至40分钟后，48小时评价了阿拉伯辣木提取物的皮肤相容性，该阿拉伯辣木提取物以包含5%

的根据实施例1的阿拉伯辣木提取物和95%丙二醇/山梨糖醇混合物的洗剂形式制备。根据以下等级对皮肤反应(红斑和水肿)从0至3进行评分:

[0321] [表22]

分数	红斑(Er)	水肿(Ed)
0	无红斑	无水肿
0.5	在临时包扎(patch)区的一部分上, 几乎察觉不到红斑, 非常轻微的粉红色着色	可感知的, 几乎察觉不到水肿
1	在整个临时包扎区上, 轻度红斑, 浅粉色着色	可感知的且可见的水肿
2	在整个临时包扎区上, 中等红斑, 明显着色	明显水肿, 伴有或不伴有丘疹或水疱
3	在整个临时包扎区上, 显著红斑, 强烈着色	显著水肿扩散到临时包扎区外, 伴有或不伴有丘疹或水疱

[0323] 将任何其他皮肤反应(大疱、丘疹、水疱、干燥、脱屑、粗糙、肥皂效应等)根据以下等级评价并描述性报告:

[0324] -0:没有反应

[0325] -0.5:非常轻度

[0326] -1:轻度

[0327] -2:中等

[0328] -3:显著

[0329] 研究结束时,根据以下公式计算平均刺激分数(M.I.S.):

[0330] [数学式8]

[0331] $M.I.S. = \text{皮肤反应的总和} (Er+0e+\text{大疱}+\text{丘疹}+\text{水疱}) / \text{分析的志愿者数}$

[0332] 获得的M.I.S.使得可以根据下表呈现的等级对测试提取物进行分类:

[0333] $M.I.S. \leq 0.20$ 无刺激的

[0334] $0.20 < M.I.S. \leq 0.50$ 轻微刺激的

[0335] $0.50 < M.I.S. \leq 2$ 中等刺激的

[0336] $2 < M.I.S. \leq 3$ 高度刺激的

[0337] 结果:阿拉伯辣木饼提取物的平均刺激分数(M.I.S.)等于:0。

[0338] 结论:12名志愿者施用连续48小时后,可以将阿拉伯辣木饼提取物视为无刺激的。

[0339] 测试的一般结论:

[0340] 对于根据实施例1的阿拉伯辣木提取物,上述进行的测试的结果是结论性的,并证明:

[0341] 1.眼睛和皮肤刺激测试为阴性

[0342] 2.光毒性测试为阴性

[0343] 3.致突变性测试为阴性。

[0344] 根据本发明的阿拉伯辣木提取物的安全性被证明,并且理想用于大规模局部化妆品使用,而不受目标种群的限制。

[0345] 实施例18:通过测量皮肤屏障上的经皮水分丢失 (TEWL) 及其在使用21天的时间段后的可接受性进行评价

[0346] 此研究中研究的产品为实施例15的乳膏形式的护理产品。将此产品通过轻轻按摩在早和晚施用于清洁的面部,避开眼睛周围区域。测量是在脸颊上进行的。

[0347] 评价准则为:

[0348] -对皮肤屏障作用的评价:在产品的任何施用之前 (D1) 和然后在施用21天之后 (D21) 的TEWL值的比较。

[0349] -关于不适感的D21的反馈。

[0350] -化妆品可接受性:关于D21志愿者填写的问卷。

[0351] 测试了具有所有皮肤类型的平均年龄50岁(年龄20至70岁)的22名女性志愿者。关于皮肤屏障评价的产品给出以下结果(*=相对于D1的D21变化%,**=配对数据的威尔科克森(Wilcoxon)检验,其中S=显著性($p \leq 0.05$)和NS=无显著性($p > 0.05$):

[0352] [表23]

	TEWL 值($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$)	
	D1	D21
平均值	11.70	11.79
标准偏差	3.26	2.87
中位值	10.39	11.40
最小值	7.97	7.12
最大值	17.30	17.14
变化的%*	-	0.83
p 值** 显著性	-	p = 0.555 (NS)

[0354] 结果分析示出,与D1相比,TEWL在D21时保持稳定;产品在施用21天后示出“皮肤保护”作用。鉴于与D1相比,在D21时的TEWL值不存在显著降低,仪器测量无法显示测试产品的“滋养”作用。81%的志愿者对在D21时的可接受性问卷中的“皮肤是滋养的”问题做出了积极回应。

[0355] 结论:在该研究的条件下,该乳膏示出通过TEWL测量显示的“皮肤保护”作用,和良好的化妆品可接受性,其中有利的评价为86%。