



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114869831 B

(45) 授权公告日 2024.04.30

(21) 申请号 202210580056.3

A61K 8/9789 (2017.01)

(22) 申请日 2022.05.26

A61K 8/9728 (2017.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61Q 19/02 (2006.01)

申请公布号 CN 114869831 A

A61Q 19/08 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.08.09

(56) 对比文件

(73) 专利权人 江苏巴帝恩生物科技有限公司

CN 101830906 A, 2010.09.15

地址 226133 江苏省南通市海门区临江镇

CN 103816087 A, 2014.05.28

临江大道188号G2楼

CN 104138341 A, 2014.11.12

专利权人 广州联颖化妆品有限公司

CN 104666237 A, 2015.06.03

(72) 发明人 陈秀玉 邓峰云 卢勇 詹柱

CN 104721245 A, 2015.06.24

何沪宝 朱蒙

CN 109824489 A, 2019.05.31

(74) 专利代理机构 北京首副专利代理事务所

杜玲玲等.微波法提取茯苓多糖的工艺研究.《中国药业》.2019,第18卷(第1期),第37-38页.

(普通合伙) 16217

纪凤娣等.大米蛋白提纯方法的研究.《中国酿造》.2008,(第14期),第109-111页.

专利代理师 孟庆莹

审查员 陈鸿儒

(51) Int.Cl.

A61K 8/9794 (2017.01)

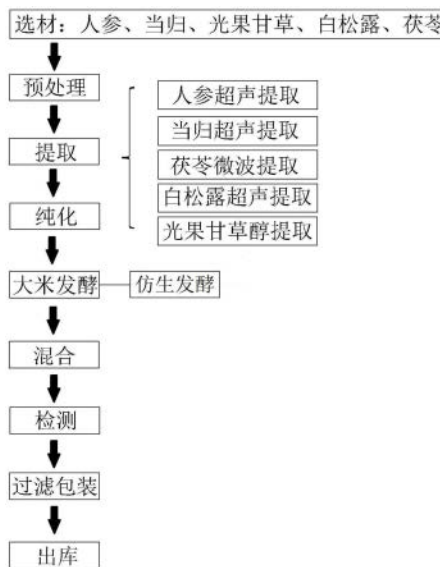
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法,涉及植物提取纯化和发酵与化妆品技术领域,包括以下步骤:步骤一:分别提取人参、当归、光果甘草、白松露和茯苓,经过纯化后获得相关提取物;步骤二:按设定顺序分步制备大米发酵液,先加入蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶进行好氧发酵,再加入瘤胃液进行厌氧发酵;步骤三:按照设定质量分数混合相关提取物,加入防腐剂,灭菌过滤得到产品,本发明将多种植物提取物复合再进行复配,并加入大米发酵液,有效解决单一提取物效果差且发挥不完全的缺陷,通过发酵使有效成分转化为更好吸收的小分子,再复合多种植物提取物,各种植物有效成分和活性成分高,起到美白保湿、抗氧化、抗衰老的效果。



1. 一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法,其特征在于:包括:

步骤一:分别提取人参、当归、光果甘草、白松露和茯苓,经过纯化后获得相关提取物;用粉碎机将白参粉碎获得白参粉末,白参粉末中加入白腐菌漆酶、纤维素酶和甘露聚糖酶,并加水于40℃恒温水浴2h,白参粉末与白腐菌漆酶、纤维素酶和甘露聚糖酶质量比为1:0.05:0.05:0.01,后用60%~75%乙醇溶液提取,白参粉末与乙醇溶液质量比为1:15~1:25,超声温度45~55℃,超声频率40-50kHz,超声提取时间0.5~1.5h,再加热至温度为65~75℃,进行回流提取,提取时间为3~6小时,之后过滤收集滤液,将滤渣进行二次提取,滤渣与乙醇溶液质量比为1:10~1:20,加热回流提取,时间为3~6小时,过滤收集滤液,合并两次滤液,滤液在75~85℃加热浓缩滤液至无醇,得到人参根提取物;当归粉碎后过24目筛且含有过60目筛的粉末不超过40%,用当归粉末15~25倍量的65~75%甲醇浸泡混合,再超声提取三次,超声总提取时间为0.5~1.0h,超声提取温度为35~55℃,三次提取的滤液合并,先加热减压浓缩至滤液一半体积,等浓缩液冷却后用浓缩液质量3倍的95%乙醇进行沉淀,离心浸出上清液,收集离心沉淀,上清液经过0.45μm的微孔滤膜收集过滤沉淀,离心沉淀与过滤沉淀混合干燥后得到当归提取物;茯苓粉碎后得到茯苓粉,茯苓粉过60目筛,加入茯苓粉质量20~30倍的蒸馏水进行微波提取,微波功率450~550W,辐射时间5-9min,再进行抽滤,滤渣再重复提取一次,合并两次提取液后用旋转蒸发仪真空浓缩成膏状,放入干燥箱在65-75℃下干燥18-24h,得到茯苓提取物;新鲜白松露洗净后真空冷冻干燥,再将真空干燥的白松露送入粉碎机粉碎得到白松露粉末,用白松露粉末15~20倍的40%~60%乙醇浸泡混合,超声辅助提取1~2h,超声频率3-6kHz,超声辅助提取后进行过滤得到粗提液,粗提液经过非极性大孔树脂-苯乙烯和聚乙烯苯聚合物进行纯化,大孔树脂先进行预处理,以无水乙醇充分溶胀,后将大孔树脂置于层析柱中,用无水乙醇流动清洗,直至清洗后液体加等量蒸馏水不变混后停止,再用大量蒸馏水冲洗大孔树脂至无乙醇气味,粗提液控制流速为3ml/min进行上样,大孔树脂吸附粗提液后以40%~60%乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为2ml/min,洗脱液加热至65-75℃减压浓缩过滤液,得到白松露菌提取物;光果甘草加入60%~75%乙醇溶剂提取3次,第一次料液比为1:8~1:10,第二次料液比为1:5~1:8,第三次料液比为1:5~1:8,提取温度为70~80℃,提取时间为4~6h,提取后过滤,三次滤液合并后得到粗提液,粗提液在60-75℃下减压浓缩至无乙醇状态得到残留液,再在残留液中加入其质量2~3倍的二氯甲烷进行萃取并收集二氯甲烷层,重复萃取操作2-3次,合并每次的二氯甲烷滤液,二氯甲烷滤液在50-60℃减压浓缩至总含量的30%-50%,浓缩液经过硅胶柱纯化,硅胶柱吸附浓缩液后加入甲醇进行洗脱,二氯甲烷与甲醇质量比为90:1,洗脱流速为1-3滴/s,收集洗脱液,洗脱液在50-60℃减压浓缩至无液体流出,对浓缩后固体进行冷冻干燥,得到光果甘草根提取物;

步骤二:按设定顺序分步制备大米发酵液,先加入蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶进行好氧发酵,再加入瘤胃液进行厌氧发酵;取干燥大米粉碎得到大米粉末,大米粉末过80目筛,加水蒸煮获取大米粉浆,大米粉末与水质量比为1:10-1:30,大米粉浆中依次加入0.1-0.8%的蛋白酶、0.1-1.2%的淀粉酶,0.1-0.65%的纤维素酶,持续搅拌溶解,加热至55-60℃,发酵pH为7.0-7.3,发酵时间为6-10h,发酵过程中持续通入滤过无菌空气氧,空气流速2-4L/min,得到大米发酵液初品;取瘤胃液置于分液漏斗中,在温度35-45℃温孵1-3h后,留取中上层瘤胃液,大米发酵液初品加入0.5-1.5%的瘤胃液,搅拌2-3min后发酵,设置发酵温度

为36~42℃,发酵pH值为6.6-6.8,发酵过程持续通入二氧化碳,气液混合搅拌1min、静息9min,发酵时间8-12h,发酵完成后发酵液灭菌处理并过滤收集滤液,得到大米发酵液;

步骤三:按照设定质量分数混合相关提取物,加入防腐剂,灭菌过滤得到产品,取人参根提取物10~20%,当归提取物8~16%,茯苓提取物8~16%,光果甘草根提取物8~16%,白松露菌提取物8~16%,1,2-己二醇0.5%~2%,对羟基苯乙酮0.2%~1%,其余用大米发酵液补充至100%的比例,搅拌均匀后灭菌过滤得到产品。

## 一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法,涉及植物提取纯化和发酵与化妆品技术领域。

### 背景技术

[0002] 随着科技的发展,由于年龄、紫外线辐射、饮食、环境等因素,人的皮肤逐渐趋于衰老。目前研究认为皮肤衰老主要包括自然老化和光老化两类。关于其成因有多种学说,如遗传学说、免疫学说、自由基学说等,其中自由基学说越来越得到人们的认同。自由基学说认为,随着年龄增长所产生的皮肤变化是由自由基的副作用所产生的。正常情况下,机体内自由基的产生与消失处于动态平衡状态,而当机体衰老时,机体内清除自由基的能力出现急性或慢性减弱。过剩的自由基就会对构成组织细胞生物大分子化学结构发生破坏性反应,从而损伤正常组织形态和功能的完整性,因此针对导致皮肤衰老等机理开发相应的护肤产品有着广阔的发展空间。

[0003] 近年来,具有抗衰老、美白等功效的天然化妆品正逐步为消费者所信赖。天然化妆品中的活性成分主要来源于植物、动物和微生物,其中植物活性成分的应用最为广泛,它已成功应用于护肤、美白、抗衰老等领域。与传统化妆品相比较,植物活性成分是从植物中提取出来的天然物质,分子更细小,更容易被皮肤吸收和消化,而且不致在体内产生沉积。同时,植物提取物类化妆品还具有疗效明显,针对性强,长期使用无副作用或副作用小的优点。研究植物活性成分提取方法并将其应用于化妆品配方中,进行人体皮肤实验,以期得到中药美白抗衰组合物,为化妆品行业开发新的美白原料及为天然植物原料的开发提供研究思路。

### 发明内容

[0004] 为了获得一款多重功效,多种工艺结合,能够美白嫩肤,抗氧化衰老等功效的化妆品原料,提出了一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法,包括以下步骤:步骤一:分别提取人参、当归、光果甘草、白松露和茯苓,经过纯化后获得相关提取物;步骤二:按设定顺序分步制备大米发酵液,先加入蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶进行好氧发酵,再加入瘤胃液进行厌氧发酵;步骤三:按照设定质量分数混合相关提取物,加入防腐剂,灭菌过滤得到产品。

[0005] 通过采用上述技术方案获得的产品是天然无刺激,营养丰富,功效强大,易于吸收的,同时也是一款可以放心使用的安全原料,可适用于护肤美容等领域。

[0006] 进一步的,用粉碎机将白参粉碎获得白参粉末,白参粉末中加入白腐菌漆酶、纤维素酶和甘露聚糖酶,并加水于40℃恒温水浴2h,白参粉末与白腐菌漆酶、纤维素酶和甘露聚糖酶质量比为1:0.05:0.05:0.01,后用60%~75%乙醇溶液提取,白参粉末与乙醇溶液质量比为1:15~1:25,超声温度45~55℃,超声频率40-50kHz,超声提取时间0.5~1.5h,再加热至温度为65~75℃,进行回流提取,提取时间为3~6小时,之后过滤收集滤液;将滤渣进行二次提取,滤渣与乙醇溶液质量比为1:10~1:20,加热回流提取,时间为3~6小时,过滤

收集滤液;合并两次滤液,将合并后滤液过大孔树脂进行吸附,后在75~85℃加热浓缩滤液至无醇,得到人参提取物。

[0007] 通过采用上述技术方案,由于人参中含有人参皂苷、人参多糖、人参多肽、维生素和微量元素等有效成分,本发明中主要对人参皂苷进行提取纯化,因此根据相似相溶原理,先选用5年生的白参,再使用多种工艺复合对白参进行提取,提取得率有效提升,且比单一工艺提取更能够有效富集活性物。

[0008] 进一步的,当归粉碎后过24目筛且含有过60目筛的粉末不超过40%,用当归粉末15~25倍量的65~75%甲醇浸泡混合,再超声提取三次,超声总提取时间为0.5~1.0h,超声提取温度为35~55℃,三次提取的滤液合并,先加热减压浓缩至滤液一半体积,等浓缩液冷却后用浓缩液质量3倍的95%乙醇进行沉淀,离心浸出上清液,收集离心沉淀,上清液经过0.45μm的微孔滤膜收集过滤沉淀,离心沉淀与过滤沉淀混合干燥后得到当归提取物。

[0009] 通过采用上述技术方案,当归粉碎制成当归粗粉或中粉,便于提取,也避免当归粉末过细影响过滤效果;多次超声提取并进行纯化,提升提取物纯度,并减少提取污染,经济效益和环境效益高。

[0010] 进一步的,茯苓粉碎后得到茯苓粉,茯苓粉过60目筛,加入茯苓粉质量20~30倍的蒸馏水进行微波提取,微波功率450~550W,辐射时间5-9min,再进行抽滤,滤渣再重复提取一次,合并两次提取液后用旋转蒸发仪真空浓缩成膏状,放入干燥箱在65-75℃下干燥18-24h,得到白茯苓提取物。

[0011] 进一步的,新鲜白松露洗净后真空冷冻干燥,再将真空干燥的白松露送入粉碎机粉碎得到白松露粉末,用白松露粉末15~20倍的40%~60%乙醇浸泡混合,超声辅助提取1~2h,超声频率3-6kHz,超声辅助提取后进行过滤得到粗提液,粗提液经过非极性大孔树脂(苯乙烯-二乙烯苯聚合物)进行纯化,大孔树脂先进行预处理,以无水乙醇充分溶胀,后将大孔树脂置于层析柱中,用无水乙醇流动清洗,直至清洗后液体加等量蒸馏水不变混后停止,再用大量蒸馏水冲洗大孔树脂至无乙醇气味,粗提液控制流速为3ml/min进行上样,大孔树脂吸附粗提液后以40%~60%乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为2ml/min,洗脱液加热至65-75℃减压浓缩过滤液,得到白松露菌提取物。

[0012] 通过采用上述技术方案,使用真空冷冻干燥技术的白松露本身的物理、化学和生物状态基本不变,从而白松露本身的营养物质和有效成分得到最大保留,减少在干燥过程中对白松露内具有挥发性成分和热敏性物质的破坏,避免白松露提取时多糖含量的降低。

[0013] 进一步的,光果甘草加入60%~75%乙醇溶剂提取3次,第一次料液比为1:8~1:10,第二次料液比为1:5~1:8,第三次料液比为1:5~1:8,提取温度为70~80℃,提取时间为4~6h,提取后过滤,三次滤液合并后得到粗提液,粗提液在60-75℃下减压浓缩至基本无乙醇状态得到残留液,再在残留液中加入其质量2~3倍的二氯甲烷进行萃取并收集二氯甲烷层,重复萃取操作2-3次,合并每次的二氯甲烷滤液,二氯甲烷滤液在50-60℃减压浓缩至总含量的30%-50%,浓缩液经过硅胶柱纯化,硅胶柱吸附浓缩液后加入甲醇进行洗脱,二氯甲烷与甲醇质量比为90:1,洗脱流速为1-3滴/s,收集洗脱液,洗脱液在50-60℃减压浓缩至无液体流出,对浓缩后固体进行冷冻干燥,得到光果甘草根提取物。

[0014] 进一步的,取干燥大米粉碎得到大米粉末,大米粉末过80目筛,加水蒸煮获取大米粉浆,大米粉末与水质量比为1:10-1:30,大米粉浆中依次加入0.1-0.8%的蛋白酶、0.1-

1.2%的淀粉酶,0.1-0.65%的纤维素酶,持续搅拌溶解,加热至55-60℃,发酵pH为7.0-7.3,发酵时间为6-10h,发酵过程中持续通入滤过无菌空气氧,空气流速2-4L/min,得到大米发酵液初品。

[0015] 通过采用上述技术方案,先添加蛋白酶,淀粉酶,纤维素酶等消化酶,能消除大米抗营养因子,降解大分子蛋白,先实现大米的好氧发酵。

[0016] 进一步的,取瘤胃液置于分液漏斗中,在温度35-45℃温孵1-3h后,留取中上层瘤胃液,大米发酵液初品加入0.5-1.5%的瘤胃液,搅拌2-3min后发酵,设置发酵温度为36~42℃,发酵pH值为6.6-6.8,发酵过程持续通入二氧化碳,气液混合搅拌1min、静息9min,发酵时间8-12h,发酵完成后发酵液灭菌处理并过滤收集滤液,得到大米发酵液。

[0017] 通过采用上述技术方案,在大米好氧发酵后利用瘤胃微生物进行厌氧发酵,能够有效降解纤维和蛋白质,将大米降解为更无害、更适合人体吸收的小分子物质,并富集活性物质,提高本发明产品的温和性,同时也降低毒副作用,并能与植物提取物产生一些新的活性物质。通过在体外环境中模拟生物胃消化食物,采用仿生多重发酵工艺,是大米发酵为更好吸收和更安全获取的活性成分。

[0018] 进一步的,取人参根提取物10~20%,当归提取物8~16%,茯苓提取物8~16%,光果甘草根提取物8~16%,白松露菌提取物8~16%,1,2-己二醇0.5%~2%,对羟基苯乙酮0.2%~1%,其余用大米发酵液补充至100%的比例,搅拌均匀后灭菌过滤得到产品。

## 附图说明

[0019] 图1为一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法工艺流程图;

[0020] 图2为一种含天然植物的化妆品复合物对DPPH抑制图;

[0021] 图3为一种含天然植物的化妆品复合物制酪氨酸酶活性试验的浓度曲线图。

## 具体实施方式

[0022] 以下结合附图和实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0023] 实施例1

[0024] 一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法,如图1所示,具体包括如下步骤:

[0025] 1. 人参根提取物,本发明中选用5年生的白参,用粉碎机将选好的白参粉碎,加酶水浴后以70%乙醇为溶剂提取,且固液比为1:20,45℃超声辅助提取1h,温度70℃,加热回流提取,时间为5小时,过滤收集滤液;将滤渣进行二提,固液比为1:12,加热回流提取,时间为4.5小时,过滤收集滤液。合并两次滤液,在80℃浓缩至无醇,最终得到人参根提取物。

[0026] 2. 当归根提取物,是将当归粉碎后过筛,取当归粉末用1:20倍量70%甲醇超声波提取0.6h,超声提取三次,超声提取温度40℃,合并滤液,滤液减压浓缩至一半,浓缩液冷却后用3倍量95%乙醇进行沉淀,离心浸出上清液收集离心沉淀,上清液过滤收集过滤沉淀,离心沉淀与过滤沉淀混合干燥后得到当归提取物。

[0027] 3. 茯苓提取物,将茯苓粉碎后得到茯苓粉,加入蒸馏水,以固液比1:20的微波辅助提取白茯苓在微波功率520W下辐射7min,再进行抽滤,滤渣再按照同样的条件重复提取1次,合并两次提取液后用旋转蒸发仪真空浓缩成膏状后,干燥,得到茯苓提取物。

[0028] 4. 白松露菌提取物,新鲜白松露真空冷冻干燥,后将白松露粉碎,用白松露粉末15倍的50%乙醇超声辅助提取1小时,超声频率5kHz,得到粗提液,粗提液经过大孔树脂吸附洗脱,得到洗脱液,洗脱液在70℃减压浓缩至无醇,得到白松露菌提取物。

[0029] 5. 光果甘草根提取物,将甘草破碎成粉,以70%乙醇为溶剂提取3次,第一次料液比为1:8,第二次料液比为1:6,第三次料液比为1:6,提取温度为70℃,提取时间为4h,提取后过滤,三次滤液合并得到粗提液,粗提液在70℃浓缩掉乙醇得到残留液,在残留液中加入两倍二氯甲烷混合,混合均匀之后,静置分层,收集二氯甲烷层并除去萃取试剂,为保证萃取效果的完整,重复萃取3次。萃取结束后的浓缩液经过硅胶柱吸附洗脱收集洗脱液,洗脱液在60℃减压浓缩,浓缩固体冷冻干燥,得到光果甘草提取物。

[0030] 6. 大米发酵滤液,先加入0.5%的蛋白酶、0.7%的淀粉酶,0.35%的纤维素酶在58℃和pH7.1下先进行好氧发酵,发酵8h,得到大米发酵液初品;大米发酵液初品加入1%的瘤胃液,在37℃和pH6.7下厌氧发酵10h,发酵完成后发酵液灭菌处理并过滤收集滤液,得到大米发酵液。

[0031] 7. 得到以上植物提取物后,按照人参根提取物15%,当归提取物10%,茯苓提取物10%,光果甘草提取物10%,白松露菌提取物10%,酵母菌/大米发酵产物滤液43.8%,1,2-己二醇1%,对羟基苯乙酮0.2%比例进行混合,灭菌过滤即得本产品。

#### [0032] 实施例2

[0033] 一种含天然植物的化妆品复合物的制备方法,如图1所示,具体包括如下步骤:

[0034] 1. 人参根提取物,本发明中选用5年生的白参,用粉碎机将选好的白参粉碎,加酶水浴后以70%乙醇为溶剂提取,且固液比为1:18,45℃超声辅助提取1.5h,温度65℃,加热回流提取,时间为5.5小时,过滤收集滤液;将滤渣进行二提,固液比为1:15,加热回流提取,时间为5小时,过滤收集滤液。合并两次滤液,在75℃浓缩至无醇,最终得到人参根提取物。

[0035] 2. 当归根提取物,将当归粉碎后过筛,取当归粉末用1:18倍量70%甲醇超声波提取0.8h,超声提取三次,超声提取温度45℃,合并滤液,滤液减压浓缩至一半,浓缩液冷却后用3倍量95%乙醇进行沉淀,离心浸出上清液收集离心沉淀,上清液过滤收集过滤沉淀,离心沉淀与过滤沉淀混合干燥后,得到当归提取物。

[0036] 3. 茯苓提取物,将茯苓粉碎后,加入蒸馏水,以固液比1:25的微波辅助提取白茯苓在微波功率520W下辐射10min,再进行抽滤,滤渣按照同样的条件再重复提取1次,合并提取液后用旋转蒸发器真空浓缩成膏状后,干燥,得到茯苓提取物。

[0037] 4. 白松露菌提取物,新鲜白松露真空冷冻干燥,后将白松露粉碎,用白松露粉末15倍的45%乙醇超声辅助提取1.5小时,超声频率6kHz,得到粗提液,粗提液经过大孔树脂吸附洗脱,得到洗脱液,洗脱液在70摄氏度浓缩至无醇,得到白松露菌提取物。

[0038] 5. 光果甘草根提取物,是将甘草破碎成粉,以75%乙醇为溶剂提取3次,第一次料液比为1:9,第二次料液比为1:8,第三次料液比为1:8,提取温度为70℃,提取时间为5.5h,提取后过滤,三次滤液合并得到粗提液,粗提液在70℃浓缩掉乙醇得到残留液,在残留液中加入两倍二氯甲烷混合,混合均匀之后,静置分层,收集二氯甲烷层并除去萃取试剂,为保证萃取效果的完整,重复萃取3次。萃取结束后的浓缩液经过硅胶柱吸附洗脱收集洗脱液,洗脱液在60℃减压浓缩,浓缩固体冷冻干燥,得到光果甘草提取物。

[0039] 6. 大米发酵滤液,先加入0.5%的蛋白酶、0.7%的淀粉酶,0.35%的纤维素酶在58

℃和pH7.1下先进行好氧发酵,发酵8h,得到大米发酵液初品;大米发酵液初品加入1%的瘤胃液,在37℃和pH6.7下厌氧发酵10h,发酵完成后发酵液灭菌处理并过滤收集滤液,得到大米发酵液。

[0040] 7.得到以上植物提取物后,按照人参根提取物15%,当归提取物15%,茯苓提取物15%,光果甘草提取物15%,白松露菌提取物15%,酵母菌/大米发酵产物滤液23.5%,1,2-己二醇1%,对羟基苯乙酮0.5%比例进行混合,灭菌过滤即得本产品。

[0041] 效果实施例1:

[0042] 清除DPPH自由基测试

[0043] 一、试剂准备

[0044] (1) 3.913mgDPPH用95%乙醇定容至50mL

[0045] (2) 8mgTrolox用95%乙醇定容至100mL

[0046] (3) 随机实施例1组合物(后面简称实施例1)

[0047] 二、实验步骤

[0048] (1) UV校零,95%乙醇作为空白样

[0049] (2) 预实验(DPPH浓度选择)

[0050] 500 $\mu$ L DPPH+1000 $\mu$ L 95%乙醇震荡10s,静置10min,测吸光度值(520nm处吸光度值0.45-0.55,则可作为以下实验DPPH溶液)

[0051] (3) Trolox的测定

[0052]

Sample	Trolox ( $\mu$ L)	95%乙醇 ( $\mu$ L)	DPPH ( $\mu$ L)
S	100	900	500
SB	100	900+500	0
C	0	100+900	500
CB	0	100+900+500	0

[0053] 加入DPPH或95%乙醇后,震荡10s,静置10min,测吸光度值

[0054] (4) 实验步骤

[0055]

	1000 ( $\mu$ L)		500 ( $\mu$ L)
S	样品	95%乙醇	DPPH
SB	样品	95%乙醇	95%乙醇
C	样品溶剂	95%乙醇	DPPH
CB	样品溶剂	95%乙醇	95%乙醇

[0056] 加入DPPH或95%乙醇后,震荡10s,静置10min

[0057] (5) 分别在520nm处测吸光度值,制作表格,作图,得IC50值。

[0058] 计算公式:抑制率(%) =  $[1 - (S - SB) / (C - CB)] * 100$

[0059] 三、实验结果

[0060]

Trolox	S	SB	C	CB
A	0.131	0.01	0.435	0.01
	0.131	0.01	0.435	0.01



实施例 1 ( $\mu\text{L}$ )	S	SB	C	CB
150	0.152	0.02	0.432	0.002
	0.152	0.02	0.432	0.002
50	0.254	0.01	0.554	0.001
	0.254	0.01	0.554	0.001
20	0.412	0.03	0.665	0.002
	0.412	0.03	0.665	0.002

Inner ( $\mu\text{L}$ )	Con ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	DPPH (%)
150	100	65.301
50	33.3	51.875
20	13.33	40.381

[0063] 实验结果: 实施例1有清除DPPH自由基的作用, 本品浓度越高, 对DPPH自由基的清除效率越高, 且由图2可以看出,  $\text{IC}_{50}$ 值约为 $27\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

[0064] 效果实施例2:

[0065] 保湿效果的检测:

[0066] 1. 实验过程

[0067] 仪器: cornemeter CMB25 (德国CK公司)

[0068] 受试样品: 1号 (纯水), 2号 (随机实施例样品)

[0069] 2. 实验条件

[0070] ①室内环境

[0071] ②无强烈阳光或灯光直射

[0072] ③环境温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 环境湿度40-60%

[0073] 3. 受试者条件

[0074] ①年龄18-60岁正常受试者, 男女均可, 女士优先

[0075] ②无严重系统性疾病、无免疫缺陷或自身免疫性病者

[0076] ③无活动性过敏性疾病者

[0077] ④既往对护肤类化妆品无过敏史

[0078] ⑤近期一个月内未曾一直使用激素类药物及免疫抑制剂

[0079] ⑥未参加其他临床实验者

[0080] ⑦志愿参加并能按实验要求完成规定内容者

[0081] 4. 皮肤水分含量检测工作原理

[0082] 采用世界公认的Cornemeter法—电容法, 它的原理基于水(81)和其他物质的介电常数( $<7$ )变化相当大, 按照含水量的不同, 适当形状的测量用电容器会随着皮肤的电容量的变化而变化, 而皮肤的电容量又是在测量的范围内, 这样就可以测量出皮肤的水分含量。电容量的测量方法比其他方法更优越, 由于被测试皮肤和测试探头没有不自然的接触, 几乎没有电流通过被测试皮肤, 因此测试结果实际上不受极化效应和离子导电率的影响。仪器探头和皮肤中水分建立平衡过程中没有惯性, 可以实现快速测量, 这样同时也消除了活性皮肤对测量结果的影响。

[0083] 5. 测试步骤

[0084] ①测试区域:手前臂内侧

[0085] ②测试前准备

[0086] 受试部位前2-3天不能使用美白功效产品(化妆品、外用药品或内服保健品),试验前,受试者需要统一清洁前臂内侧,用干的面巾纸擦拭干净,清洁后在受试者前臂内侧做好区域标记,正式测试前应该在符合标准的房间内静坐至少30min,前臂暴露,呈测试状态放置,保持轻松。

[0087] ③测试过程

[0088] 实验中前臂内侧标记3\*4cm<sup>2</sup>实验区域,同一手臂可同时标记多个区域,区域间隔2cm。测试产品和空白对照均随机分布在手前臂上,先测量各测试区域清洁后30min的空白值,然后按2.0±0.1mg样品/cm<sup>2</sup>的用量,使用乳胶指套将受试样均匀涂布于实验区内,涂抹后分布测量0h、1h、2h、4h受试区域和对照区域的皮肤含水量。同一个志愿者的测量由同一个测量人员完成。

[0089] 6. 测定指标

[0090] 皮肤含水量测定,测定两次,取均值

[0091] 7. 对照形式

[0092] 采用自身进行不同处理对照

[0093] 8. 结果与分析

[0094] 参与测试人员测量结果

0h									
	纯水			均值	样品			均值	
[0095]	1	38.8	37.0	36.7	37.5	37.2	37.4	37.1	37.2
	2	29.1	28.4	28.7	28.7	31.3	31.3	30	30.9
	3	26.3	27.2	28.4	27.3	26.4	27.4	26.8	26.9
	4	28.9	30.8	30.7	30.1	37.4	37.1	37.3	37.3
	5	34.8	33.8	35.8	34.8	44.2	43.9	43.6	43.9
	6	27.2	26.4	28.2	27.3	30.7	31.8	32.2	31.6
	7	43.5	44.6	42.6	43.6	40.6	42	41.7	41.4
	8	29.8	31.2	29.6	30.2	35.7	34.2	36.7	35.3

0.5h									
	纯水			均值	样品			均值	
[0096]	1	35.8	33.6	33.8	34.4	36.1	34.4	35.4	35.3
	2	28.3	29.9	29.7	29.3	30.4	33.3	31.7	31.8
	3	27.7	25.8	27.5	27.0	27.2	27.8	29.0	28.0
	4	34.7	33.1	35.4	34.4	40.2	37.7	41.8	39.9

[0097]	5	33.7	34.3	33.3	33.8	37.8	39.3	38.2	38.4
	6	29.4	28.4	27.1	28.3	32.9	32.1	33.4	32.8
	7	36.3	37.9	38.5	37.6	40.6	41.6	43.3	41.8
	8	32.4	34	33.7	33.4	37.8	37.3	38.5	37.9

1h									
	纯水			均值	样品			均值	
[0098]	1	33.5	33.6	34.4	33.8	38.0	38.9	39.1	38.7
	2	30.3	31.9	30.0	30.7	34.4	36.0	33.4	34.6
	3	28.6	27.7	27.7	28.0	29.2	28.6	31.6	29.8
	4	34.2	35.0	35.3	34.8	35.8	37.0	38.5	37.1
	5	33.1	32.4	32.5	32.7	41.1	38	39	39.4
	6	26.2	29.3	27.7	27.7	35.2	33.7	32.7	33.9
	7	41.7	42.4	43	42.4	41.6	43.7	41.6	42.3
	8	33.6	33.9	31.7	33.1	34.4	37.5	36.2	36.0

2h									
	纯水			均值	样品			均值	
[0099]	1	40.6	40.6	40	40.4	41.7	42	40.9	41.5
	2	29.8	28.7	28.6	29.0	32.2	31.6	30.9	31.6
	3	26.7	29.1	28.5	28.1	32.1	31.9	33.4	32.5
	4	32.0	31.3	32.8	32.0	38.1	39.3	39.8	39.1
	5	31.8	31	32.4	31.7	40.1	41.7	40.9	40.9
	6	26.9	28	28.5	27.8	41	41.6	39.9	40.8
	7	33.6	33.9	31.7	33.1	34.4	37.5	36.2	36.0
	8	31.8	31.2	28.7	30.6	33.1	34.4	33.9	33.8

[0100] 结果:由表可以看出,空白组,4个小时内不同测试人员,皮肤水分含量基本不变。

[0101] 水组,皮肤测试部位涂抹纯水后,1小时内,皮肤水分含量有细微升高,但是后面就马上回归之前的水平了,表明涂抹纯水不能增加皮肤水分含量。

[0102] 样品组,皮肤测试部位涂抹样品后,皮肤水分含量明显上升,且2小时内含水量稳定,可以得出本发明的组合物具有保湿的效果。

[0103] 效果实施例3

[0104] 1.目的:含天然植物的化妆品复合物对酪氨酸酶的半抑制作用

[0105] 2.材料:样品:含天然植物的化妆品复合物(实施例1组合物)

[0106] 缓冲液:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(8.71g/500ml)+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(6.805g/500ml)→pH=6.80(±0.02)分光光度计:uv,480nm

[0107] 3.步骤:

[0108] (1)酶浓度选择:

[0109] 取少量的酶,用缓冲液溶解,颜色棕色;取1.5ml离心管加入(L-酪氨酸(0.3mg/ml)500μL+缓冲液500μL+水450μL+酶50μL);加酶前,37℃,20min;加酶后,37℃,(加酶-测试)10min分光光度计波长480nm处,测吸光度。调整酶浓度,使吸光度(ABS)在0.45-0.55之间。此浓度的酶作为实验用酶液。

[0110] (2)实验添加

	L-酪氨酸(μL)	缓冲液(μL)	样品量(μL)+纯水(μL)				酶/缓冲液(50μL)	
			450μL					
			组	①	②	③		
[0111]	2*S	500	500	样品	30	60	90	酶
	1*SB			样品	30	60	90	缓冲液
	1*C			样品溶剂	30	60	90	酶
	1*CB			样品溶剂	30	60	90	缓冲液

[0112] (3) 分别在480nm处测吸光度,制作表格。作图,得出 $IC_{50}$ 。

[0113] 计算公式:阻碍率(%) =  $[1 - (S-SB)/(C-CB)] * 100$

[0114] 注意:加酶前,37℃,20min;加酶后,37℃,(加酶-测试)10min分光光度计波长480nm处,测吸光度。不加酶37℃,20min。

[0115] S:Sample SB:Sample Blank C:Control CB:Control Blank

[0116] 4. 结果

[0117] 含天然植物的化妆品复合物抑制酪氨酸酶活性结果表:

分组	取样量(μL)	浓度(μL/mL)	吸光度(O. D.)	吸光度差值(O. D.)	平均吸光度(O. D.)	抑制率(%)	平均抑制率(%)
[0118] S	5	3.33	0.283	0.271	0.268	40.04	43.36
	5		0.253	0.241		46.66	
	10	6.67	0.14	0.15	0.1405	70.72	70.61
	10		0.141	0.131		70.504	
	30	20.00	0.066	0.05	0.067	88.58	88.36
	30		0.068	0.052		88.13	

使用量(μL)	浓度(μL/mL)	抑制率(%)
30	20	88.36
10	6.67	70.61
5	3.33	43.36

[0120] 5. 结论:含天然植物的化妆品复合物有抑制酪氨酸酶活性的作用,本品浓度越高,对酪氨酸酶活性的抑制效果越强,由图3可以看出,本品的 $IC_{50}$ 值约为4μL/mL。

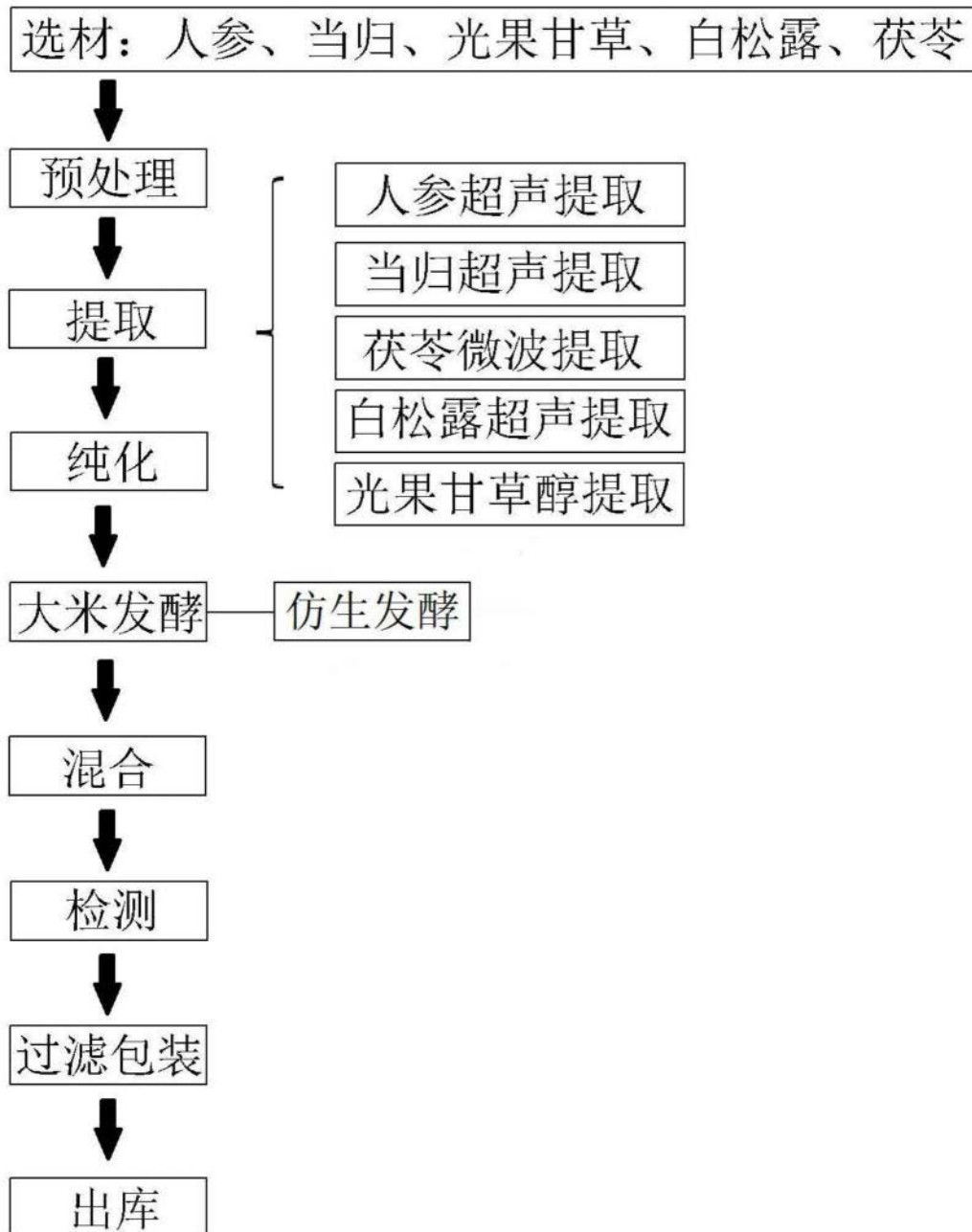


图1

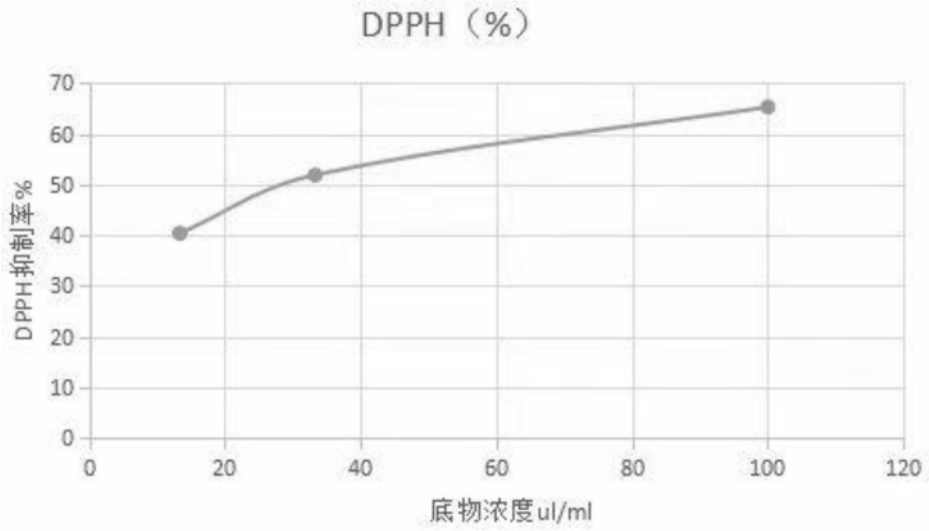


图2

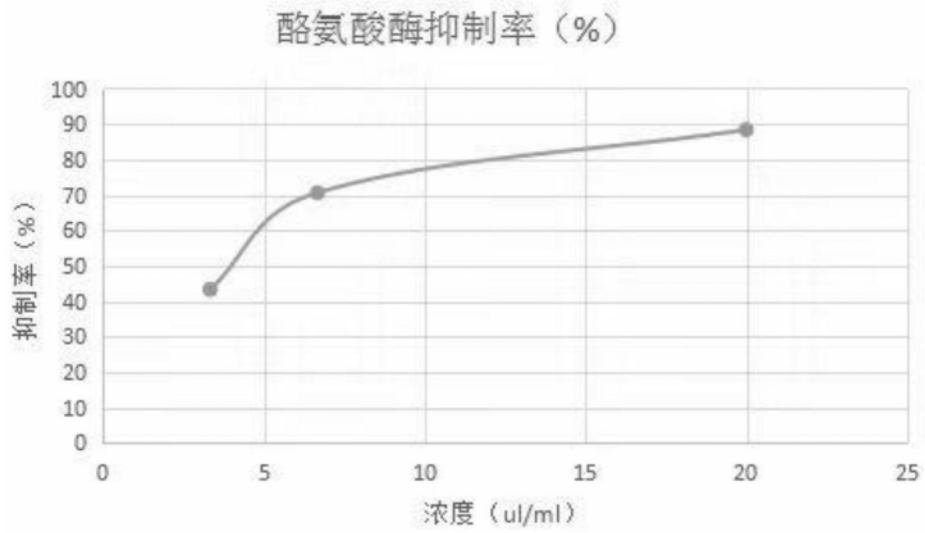


图3