



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102895308 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210450370. 6

A61Q 19/02(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 13

A61P 17/00(2006. 01)

(71) 申请人 孙海峰

地址 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平
路 24 号综合楼 1610

(72) 发明人 孙海峰 杨菲菲 丁常宏 张宁
朱天龙

(51) Int. Cl.

A61K 36/537(2006. 01)

A61K 31/216(2006. 01)

A61K 31/343(2006. 01)

A61K 8/97(2006. 01)

A61K 8/49(2006. 01)

A61K 8/37(2006. 01)

A23L 1/272(2006. 01)

A61Q 1/12(2006. 01)

A61Q 19/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

丹参酚酸作为美白祛斑及抗皱化妆品添加剂
的新用途

(57) 摘要

本发明涉及丹参酚酸的新用途。丹参酚酸对酪氨酸酶有着强烈的抑制作用,应用于皮肤美白祛斑和治疗色素沉着性疾病以及食品添加剂。通过对其丹参酚酸抑制酪氨酸酶活性的测定,证明丹参酚酸的活性很强,并有较好的稳定性,丹参酚酸能有效抑制黑素生成,可作为天然美白剂用于化妆品。同时,丹参酚酸有较好的促进皮肤细胞增殖作用,具有养颜和抗皱的功能,可应用于养颜抗皱功能的化妆品。

1. 丹参酚酸在抑制酪氨酸酶活性的应用。
2. 根据权利要求书 1 所述的应用,其中所述的丹参酚酸包含丹参总酚酸、丹参酚酸 A、丹参酚酸 B、丹参酚酸 C。
3. 根据权利要求书 1 所述的用途,其特征在于,丹参酚酸在制备由酪氨酸酶引起的皮肤色斑、黄褐斑及雀斑等药物中的应用。
4. 根据权利要求书 1 所述的用途,其特征在于,丹参酚酸在制备抑制黑素生物合成的美白祛斑化妆品中的应用。
5. 丹参酚酸在促进细胞增殖活性的应用,其特征在于,丹参酚酸作为养颜抗皱护肤因子应用在化妆品中。
6. 根据权利要求书 3 所述的用途,其特征在于,其所述的药物中添加有湿润剂、乳化剂、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、pH 调节剂、载体中的至少一种。
7. 根据权利要求书 4 和 5 所述的用途,其特征在于,其所述的化妆品为溶液、悬浮液、乳状液、霜剂、软膏剂、凝胶、奶液、粉、香皂、油、干粉、粉底液、湿粉或喷剂中的一种形式。
8. 根据权利要求书 7 所述的用途,其特征在于,所述的化妆品中添加有油性成分、粉末、pH 调节剂、药效成分、防腐剂、保湿剂、糖类、抗氧化剂、其他美白剂、维生素类和水中的至少一种。
9. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于,丹参酚酸在制备预防果蔬鱼虾变色的食品添加剂中的应用。

丹参酚酸作为美白祛斑及抗皱化妆品添加剂的新用途

技术领域

[0001] 本发明涉及丹参酚酸作为美白祛斑抗皱化妆品添加剂的新用途。

背景技术

[0002] 随着经济的发展和水平的提高,人们越来越重视皮肤的自然美白,“肤如雪,凝如脂”历来是东方人崇尚的肌肤,许多人期望通过美白护肤品的使用而得到白皙、逛街的皮肤,这就为抑制皮肤黑色素的合成,从而达到肌肤美白效果的各种美白化合物提供了广阔的应用前景,并且推动这类化妆品的生产销售。以往的美白化妆品多以化学药居多,但因其副作用大,已被许多国家禁止使用。“组分天然化”及“回归自然”的呼声已成为化妆品工业的潮流,化妆品原料天然化备受重视。我国传统中医药则以内服滋阴、活血、补肾、健脾为主,以外用中药面膜和霜、膏剂居多且疗效显著、持久、副作用小等优势,为中医药治疗黄褐斑等色素沉着性疾病展示了良好的前景。因此,寻找高效、持久且对人体无副作用的天然美白祛斑制剂,已成为目前药学和化妆品领域研究的趋势。虽然我国中草药资源丰富、天然植物制药历史悠久,但是有关的科学开发与应用研究相对滞后。目前已有一些从中草药中分离的成分被广泛的应用于美白产品中,如熊果苷和甘草提取物等,经过反复研究与试用已经成为目前最常用的美白成份。也正因为看到了传统药物在美白领域的无限,越来越多的人将寻找高效、持久的美白成份的目标集中在天然药物上。

[0003] 丹参是具有活血化瘀功效的传统中药,其中含有丹酚酸、丹参素、丹参酮等多种活性成分,对心脑血管疾病具有显著疗效。发明人通过对丹参活性成分丹参酚酸的研究发现,丹参酚酸除可以显著地抑制酪氨酸酶活性,可以明显地抑制黑素形成环节,对皮肤美白和治疗皮肤色素沉着性疾病有效、安全,是一种天然活性成分,有很好的应用前景。

[0004] 同时,果蔬鱼虾保鲜也是当前我国农业、渔业所面临的一个迫切解决的问题,有些农、水产品,例如荔枝、活鱼等,由于得不到及时有效的保鲜方法处理,每年给我国带来巨大的经济损失。而酪氨酸酶参与了许多蔬果鱼虾的褐变反应,是这些果蔬鱼虾生斑而失鲜的主要原因。所以,通过调控果蔬鱼虾中酪氨酸酶的作用,寻找天然的酪氨酸酶的抑制剂用于果蔬鱼虾保鲜的方法有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供丹参酚酸的新用途,丹参酚酸对酪氨酸酶有抑制作用,应用于美白养颜产品和改善色素沉着性疾病。

[0006] 本发明所述的丹参酚酸来源于经过提取纯化得到的水溶性提取物。所述的丹参酚酸是以游离酸型形式存在,包含有丹参酚酸 A、丹参酚酸 B、丹参酚酸 C 等的丹参总酚酸。

[0007] 通过对丹参酚酸抑制酪氨酸酶活性的测定,发现丹参酚酸表现出酪氨酸酶抑制活性。在细胞试验中,发现丹参酚酸也可以降低细胞内酪氨酸酶的活性,同时又可降低细胞内黑素生物合成的水平。

[0008] 丹参酚酸分子中含有大量的还原性多羟基与酪氨酸中的 Cu^{2+} 络合,且其结构与

酪氨酸酶底物的结构类似,均有对位苯酚结构,可与酪氨酸酶竞争性结合,从而削弱了酪氨酸酶对酪氨酸及其系列氧化产物的催化氧化作用,抑制了黑素的产生,起到了美白的作用。由于丹参酚酸A、丹参酚酸B、丹参酚酸C等结构类似都属酚酸类,这些单体化合物及这些单体化合物构成的总酚酸都有相同的功效,在本发明的应用中即可以用总酚酸也可以用其单体化合物。

[0009] 丹参酚酸作为酪氨酸酶抑制剂可以单独使用,也可以与其他化合物混合使用,并含有药学上所允许的药用辅料或常规的药用载体,用作抑制黑素生成的美白化妆品。本发明的丹参酚酸还可以添加其他美白剂成分,这些美白剂成分可以采用但不限于下列成分:熊果苷、曲酸衍生物、L-抗坏血酸及其衍生物及它们的盐、氢醌及其衍生物及它们的盐;植物提取物如甘草提取物、芦荟提取物等。美白剂成分可任意选1种或2种以上掺入。

[0010] 实验证明丹参酚酸有促进细胞增殖活性,丹参酚酸可作为养颜、抗皱因子在化妆品中应用。皮肤衰老的表现之一就是表皮细胞的增殖能力降低,皮肤细胞更新的速度慢于老化死亡的速度,使皮肤变薄,进而出现皱纹,由于丹参酚酸有促进细胞增殖作用,因而丹参酚酸有养颜、抗皱作用。

[0011] 丹参酚酸在制备药品、化妆品中应用,其中丹参酚酸的使用量可视不同的用途而不同。

[0012] 制备药物或化妆品时,用丹参酚酸与常规的药用载体,如软膏基质、乳化剂、表面活性剂、稳定剂等制成乳剂或软膏等外用制剂,制备工艺可采用常规的药物制剂级数。丹参酚酸在化妆品中或药品的用量以重量百分比计为0.01~10%比较适合。

[0013] 酪氨酸酶参与了许多果蔬鱼虾的褐变反应,是这些果蔬鱼虾变褐生斑而失鲜的主要原因。而丹参酚酸具有酪氨酸酶抑制作用,能够在预防褐变的食物添加剂中应用。

[0014] 本发明的有益效果

[0015] 本发明提供了从丹参中提取的丹参酚酸作为酪氨酸酶抑制剂的新用途。通过对其抑制活性的测定,证明丹参酚酸的活性强,并且具有较好的稳定性。丹参酚酸并可显著降低黑素瘤细胞内酪氨酸酶的活性,降低细胞内黑素的生物合成水平,且丹参酚酸在低浓度下有较好的促进细胞增殖作用。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实施实例对本发明进一步说明,但实施实例不限制本发明的保护范围。

[0017] 实施实例1:

[0018] 精密称取L-dopa 0.05g,用0.1mol/L PBS(pH6.8)溶解,定容至10mL,避光,超声溶解。L-dopa溶液易氧化,应现用现配。

[0019] 将25KU的酪氨酸酶粉末用0.1mol/L PB(pH6.8)溶解,定容至250mL,将配制好的酪氨酸酶溶液分装至离心管中,密封后置于-20℃冰箱保存。

[0020] 精密称取丹参酚总酸10.00mg,用10mL双蒸水溶解得丹参酚酸溶液。通过双蒸水逐级稀释,最终得到提取物浓度为1.0mg/mL、0.1mg/mL、0.01mg/mL的三个浓度组。4℃保存备用

[0021] 冻存的酪氨酸酶溶液,置于37℃水浴锅中,快速晃动使管中溶液迅速融化,每次融

化的酪氨酸酶溶液须在 4h 内用完。

[0022] 按表 1, 准确吸取样品、0.1mol/LPB (pH6.8)、0.5% L-dopa, 于 96 孔板中充分混匀, 每组设 4 个复孔, 37℃ 水浴 20min, 加入 100U/mL 酪氨酸酶溶液, 37℃ 孵育 10min, 在 490nm 处测定吸光度 (结果见表 2)。

[0023] 表 1 待测液的组成

[0024]

药 品	A 组	B 组	C 组	D 组
样品 (V/ μ L)			50	50
PB (V/ μ L)	150	200	100	150
0.5%L-Dopa (V/ μ L)	50	50	50	50
TYR 溶液 (V/ μ L)	50		50	

[0025] 酪氨酸酶抑制率 (I%) 计算公式如下:

[0026]
$$I\% = \frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} \times 100$$

[0027] A: 未加样品的加酶混合液所测的吸光度;

[0028] B: 未加样品亦未加酶的混合液所测的吸光度;

[0029] C: 加样品和酶的混合液所测的吸光度;

[0030] D: 加样品而未加酶的混合液所测的吸光度;

[0031] 表 2 丹参酚酸在各浓度下的抑制率

[0032]

药物	高浓度 (1mg/ml) 抑制率 (%)	中浓度 (0.1mg/ml) 抑制率 (%)	低浓度 (0.01mg/ml) 抑制率 (%)
丹参酚酸	4.18	7.48	9.32

[0033] 结果显示: 丹参酚酸在三个浓度对酪氨酸酶活性均有抑制作用。

[0034] 具体实施实例 2:

[0035] 丹参酚酸对 A375 和 HacaT 共培养细胞酪氨酸酶活性的影响

[0036] 将处于对数生长期的 A375 细胞和 HacaT 细胞, 分别经 0.25% 胰蛋白酶消化、离心、MEM 培养液混悬。按 1:2 的比例将两种细胞悬液混合, 调整细胞密度为 1.5×10^4 个/mL 接种在 96 孔板中, 每孔 200 μ L, 在 37℃ 及 5% CO_2 下孵育 24h。倒扣培养液, 根据 MTT 实验结果选取 4 个浓度 (400 μ g/mL、200 μ g/mL、100 μ g/mL、50 μ g/mL), 每孔 200 μ L, 每组设 6 个复孔, 继续孵育 48h, PBS 洗涤 2 次, 每孔加 1% Triton-X 溶液 100 μ L, 迅速置 -80℃ 冰箱内放置 30min, 取出后室温融化, 使细胞充分裂解。每孔加入 0.5% L-DOPA 溶液 50 μ L, 将培养板置于微孔板震荡器震荡, 37℃, 震荡 3h, 490nm 波长处测定各孔 OD 值。TYR 活性用 A490 值表示。TYR 活性抑制率 = [(实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (阴性对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] $\times 100\%$ (结果见表 3)。

[0037] 表 3 丹参酚酸对 A375 和 HacaT 共培养细胞酪氨酸酶活性的影响

[0038]

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD (490nm) ($\bar{x} \pm S$)	抑制率 (%)
丹参酚酸	400	0.058 \pm 0.002	3.7
	200	0.058 \pm 0.003	4.1
	100	0.056 \pm 0.004*	7.9
	50	0.054 \pm 0.004**	10.7
	阴性对照	0.061 \pm 0.002	—
	阳性对照	0.056 \pm 0.002*	6.9

[0039] 结果显示:丹参酚酸在四个浓度对细胞内酪氨酸酶活性均有抑制作用,低浓度时活性强。

[0040] 具体实施实例 3:

[0041] 丹参酚酸对 A375 和 Haca1 共培养细胞黑素合成的影响

[0042] 将 A375 细胞和 Haca1 细胞 1 : 2 的比例混合,调整细胞密度为 4.5×10^4 个 /mL 接种在 6 孔板中,每孔 2mL,在 37℃ 及 5% CO_2 下孵育 24h。吸弃培养液,根据 MTT 实验结果选取 4 个浓度 (400 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$,每孔 2mL,继续孵育 48h,去掉培养液,用 PBS 清洗 2 次,吸弃培养液,加入 0.25% 胰酶 1mL/ 孔消化后,加入 1mL MEM 培养液中中止消化,制成细胞悬液,将细胞悬液收集到 15mL 离心管中,离心,弃上清液,加入 100 μL 浓度为 1mol/L NaOH,37℃ 水浴 1h,充分裂解细胞和溶解黑素颗粒。加入 400 μL 双蒸水稀释,充分混匀后,以 100 μL / 孔分别加至 96 孔板,每组设 4 个复孔,在 490nm 波长测定各孔 OD 值。黑素含量用 A490 值表示 (结果见表 4)。黑素含量 = [(实验组各浓度吸光度 / 细胞数的平均值) / (阴性对照组吸光度 / 细胞数的平均值)] \times 100%。

[0043] 表 4 丹参酚酸对 A375 和 Haca1 共培养细胞黑素合成的影响

[0044]

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD (492nm) ($\bar{x} \pm S$)	抑制率 (%)
丹参酚酸	400	0.044 \pm 0.004**#	60.2
	200	0.045 \pm 0.003**#	59.4
	100	0.053 \pm 0.003**#	52.9
	50	0.102 \pm 0.004	8.5
	阴性对照	0.112 \pm 0.005	—

[0045] 结果显示:丹参酚酸在 4 个浓度对黑素合成均有抑制作用。

[0046] 具体实施实例 4:

[0047] 丹参酚酸对 A375 和 Haca1 共培养细胞增殖的影响

[0048] 将处于对数生长期的 A375 细胞和 Haca1 细胞,分别经 0.25% 胰蛋白酶消化、离心、MEM 培养液重悬、细胞计数。按 1 : 2 的比例将两种细胞悬液混合,调整细胞密度为 1.5×10^4 个 /mL 接种在 96 孔板中,每孔 200 μL ,在 37℃ 及 5% CO_2 下孵育 24h。弃培养液,按实验分组给药,每孔 200 μL ,每组设 6 个复孔,继续孵育 48h。培养结束前 4h,每孔加 5g/L 的 MTT 20 μL ,继续培养 4h 后,倒扣法去除培养液,加入 150 μL DMSO,将培养板置于微孔板震荡器

震荡, 37℃, 10min, 使结晶溶解。酶标仪 490nm 测定吸光度值。细胞增殖活性用 A490 值表示 (结果见表 5)。细胞增殖率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (阴性对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%

[0049] 表 5 丹参酚酸对 A375 和 Hacat 共培养细胞增殖的影响

[0050]

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD (492nm) ($\bar{x} \pm S$)	增殖率 (%)
丹参酚酸	200	0.698 \pm 0.003	95.0
	100	0.792 \pm 0.005*	107.7
	50	0.884 \pm 0.008**	120.2
	阴性对照	0.734 \pm 0.005	—
	阳性对照	0.681 \pm 0.001	92.6

[0051] 结果显示 : 丹参酚酸在低浓度下有较好的促进细胞增殖作用。