



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104147089 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201310179899. 3

(22) 申请日 2013. 05. 15

(71) 申请人 伽蓝(集团)股份有限公司

地址 201403 上海市奉贤区丽丰路 12 号

(72) 发明人 方兆华 李慧 夏增华 曹平

(74) 专利代理机构 上海序伦律师事务所 31276

代理人 包文超

(51) Int. Cl.

A61K 36/48(2006. 01)

A61K 8/97(2006. 01)

A23L 1/29(2006. 01)

A23K 1/14(2006. 01)

A61Q 19/02(2006. 01)

A61P 39/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

金合欢提取物、制取方法及其用途

(57) 摘要

一种金合欢的提取物,先使用极性溶剂进行提取,所得粗提液经吸附树脂吸附并以水和乙醇组成的洗脱液洗脱后制得。本发明以单一的金合欢植物为原材料制取,简单高效,对酪氨酸酶活性具有抑制作用,即可应用于化妆品,也可制成食品、动物用饲料、药品和准药品等。

1. 一种制取金合欢提取物的方法,其特征在于使用极性溶剂对金合欢进行提取处理而得金合欢粗提液,再经吸附树脂吸附后,以水和乙醇组成的洗脱液洗脱,并收集洗脱液。
2. 根据权利要求1所述的制取金合欢提取物的方法,其特征在于所述极性溶剂为乙醇水溶液。
3. 根据权利要求2所述的制取金合欢提取物的方法,其特征在于所述乙醇水溶液的浓度为50v/v%—90v/v%。
4. 根据权利要求1所述的制取金合欢提取物的方法,其特征在于所述极性溶剂的用量为金合欢重量的5-60倍。
5. 根据权利要求1所述的制取金合欢提取物的方法,其特征在于所述洗脱液为20v/v%-80v/v%乙醇。
6. 根据权利要求1所述的制取金合欢提取物的方法,其特征在于所述吸附树脂为AB-8。
7. 一种根据权利要求1-6之一所述的制取金合欢提取物的方法获得的金合欢提取物。
8. 一种含有权利要求7所述的金合欢提取物在美白领域的应用。
9. 一种含有权利要求7所述的金合欢提取物用于清除自由基。
10. 一种含有权利要求7所述的金合欢提取物在抑制酪氨酸酶活性中的应用。
11. 根据权利要求8-10之一所述的金合欢提取物的应用,其特征在于用于制成食品、动物用饲料、药品、准药品或化妆品。

金合欢提取物、制取方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物提取物,尤其涉及一种金合欢植物的提取物、制取方法以及其在化妆品,或在食品、动物用饲料、药品和准药品等中的应用。

背景技术

[0002] 肤色是人们审美的标准之一。对于亚洲女性,白皙肤色更是一种普遍追求。为此,各种产品应运而生,如:增白产品、防紫外线产品和膜产品等。

[0003] 经研究,皮肤颜色由皮肤细胞中所含的各种色素综合决定。在众多色素中,黑色素细胞中所含的黑色素量是最主要的决定因素。进一步研究证实,酪氨酸酶(EC1.14.18.1)是黑色素合成的关键酶。由此,通过抑制酪氨酸酶活性,以减少黑色素生成,从而达到美白的护肤效果成为研发护肤产品的重要依据之一(实用医学杂志 [J],2005,21,1364-1366;厦门大学学报(自然科学版) [J],2007,46,274-282)。在这些产品中常用的美白剂如:氢醌、曲酸、熊果苷和 Vc 衍生物等几种,这些物质或稳定性较差而难以实现清除活泼氧的作用,或具有相当的细胞毒性。因此,酪氨酸酶抑制剂的安全性是美白护肤产品研发过程中需要并重考虑的因素。

[0004] 日本专利特开平 10-25238 公开了一种皮肤外用剂,该用于皮肤外用的制剂包含通过将金合欢属植物黑荆(*Acacia mearnsii* De Wild.)的树皮和日本落叶松的心材等用溶剂如:甲醇、丙酮、乙醇或水等溶剂提取和柱分离等手段得到提取物。其中,黑荆提取物具有抑制酪氨酸酶活性。

[0005] 中国发明专利 ZL200680055582.7 公开了一种含有来自金合欢属树皮的物质的抗氧化组合物,以水、醇或醇溶液提取金合欢属植物的树皮而得。该组合物可应用于食品、动物用饲料、药品、准药品和化妆品等。但并未公开该组合物具有酪氨酸酶抑制作用,也未公开金合欢属植物具有美白作用。

[0006] 来源于天然植物的具有酪氨酸酶抑制剂作用的物质或组合物具有安全性高,成本低廉等优点,正日渐得到护肤产业的重视。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种金合欢提取物的制取方法。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种金合欢提取物,具有抑制酪氨酸酶活性的作用。

[0009] 本发明的又一个目的在于提供一种金合欢的提取物,以此护理皮肤具有美白效果,使用安全,对人体皮肤无任何副作用。

[0010] 本发明的再一个目的在于提供一种金合欢的提取物,作为活性组分应用于食品、动物用饲料、药品、准药品和化妆品等产品。

[0011] 本发明所称的“金合欢”是指植物澳洲金合欢(*Acacia dealbata* link.),尤其是其花蕾、树皮和树叶。

[0012] 如技术人员通常所能理解的,提高表面积有利于物质的溶出率,从而提高活性成分的提取效果。因此,加工方法,如:切成块、片和条,尤其是制成粉末(如:平均粒径小于2.5mm)等方式制得的金合欢也应包括于本发明。

[0013] 本发明所称的“提取物”是指提取自金合欢的含有一种或多种具有抑制酪氨酸酶活性物质的组合物或混合物。各个活性物质按比例简单混合,或与其它物质形成另一种形式,如:但不仅限于胶束、脂质体和悬浊液等。

[0014] 本发明所称的“活性物质”或“活性成分”是指通过体外酶抑制实验证明能够抑制酪氨酸酶活性的化合物、聚合物、核酸、多肽、蛋白质及各自以离子键、共价键、配位键或疏水相互作用等化学键形成的复合物和结合物。

[0015] 本发明所称的“加工”或“预加工”应理解为以物理方式对原材料进行的分解或拆分,以各种方式(如:切、锯、压、研磨、搅拌或粉碎等)将体积较大的材料分为体积较小的材料,如:段状、块状、片状、条状、颗粒状、粉状或末状。

[0016] 本发明所称的“极性溶剂”是指含有羟基或羰基等极性基团的有机溶剂,如:但不仅限于水、甲酰胺、二甲基甲酰胺、六甲基磷酰胺、四甲基乙二胺、三乙胺、三丁胺、三辛胺、乙酸、三氟乙酸、乙腈、甲酸甲酯、乙酸乙酯、碳酸二甲酯、二甲亚砜、丙酮、甲乙酮、二氧六环、吡啶、四氢呋喃、甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇和乙醚等一种或几种,优先选择乙醇水溶液,浓度为30v/v%-90v/v%,或为50v/v%-90v/v%,或为30v/v%-39v/v%、40v/v%-49v/v%、50v/v%-70v/v%和70v/v%-90v/v%之一或几种,或为50v/v%、51v/v%、52v/v%、53v/v%、54v/v%、55v/v%、60v/v%、65v/v%、66v/v%、67v/v%、68v/v%、69v/v%、70v/v%、71v/v%、72v/v%、73v/v%、74v/v%、75v/v%、76v/v%、77v/v%、78v/v%、79v/v%、80v/v%、81v/v%、82v/v%、83v/v%、84v/v%、85v/v%、86v/v%、87v/v%、88v/v%、89v/v%和90v/v%之一或几种。

[0017] 本发明所称的“吸附树脂”是本领域一般技术人员所了解的大孔吸附树脂,优先选择弱极性的或中等极性的吸附树脂,如:但不仅限于X-5、AB-8、D101、XDA-6、LX-21、NK-9、D3520和WLD等,尤其是AB-8树脂。

[0018] 本发明中,金合欢提取物所用的极性溶剂量并没有特别的限定,应使金合欢与极性溶剂充分接触。适用于本发明的极性溶剂用量,如:但不仅限于使用重量5-60倍,或10-20倍,或10-50,或20-50倍于金合欢的极性溶剂即可对金合欢原材料取得良好的提取效果。重量倍数如:但不仅限于10、15、20、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59和60能较好的适用于本发明并取得提取效果。

[0019] 极性溶剂能浸润金合欢,但活性物质的浸出率或溶出率仍较低,有必要采用进一步方法如:但不仅限于煎、煮、回流、搅拌、匀浆和超声等提取方式,以提高作业效率。这些方法可单独或组合使用,也可以重复多次。上述提取方式经适量的时间(不超过2小时)如:但不仅限于0.5-1.0小时,0.5-2.0小时以及1.0-2.0小时等即可增加活性物质的浸出率或溶出率。

[0020] 洗脱液洗脱是本发明获得活性物质的关键步骤之一,有助于提取物对酪氨酸酶抑制效果的提高,但是其洗脱的具体方式,如:线性梯度洗脱、等度洗脱和阶梯式梯度洗脱等不得限定本发明。为了适应生产规模和分离介质(如:吸附树脂)的需要,本领域技术人员可选择并适用任何一种或几种洗脱方式,并收集相应的洗脱液。本发明提供的洗脱方

式,如:以水和乙醇组成洗脱液,依次以水、20v/v%±5v/v%乙醇、40v/v%±5v/v%乙醇、60v/v%±5v/v%乙醇和80v/v%±5v/v%乙醇进行洗脱,形成总梯度为20v/v%-80v/v%乙醇洗脱方式,并分别收集洗脱液;又如:以水和乙醇组成洗脱液,依次以水、40v/v%±5v/v%乙醇和80v/v%±5v/v%乙醇进行洗脱,并分别收集洗脱液;再如:以水和乙醇组成洗脱液,进行20v/v%-80v/v%乙醇、20v/v%-60v/v%乙醇或30v/v%-50v/v%乙醇线性梯度洗脱,并收集洗脱液。

[0021] 本发明提供的一种金合欢提取物的制取方法,使用极性溶剂对金合欢进行提取,如:但不仅限于施以煎、煮、回流、搅拌、匀浆和超声之一种或几种提取方式处理而得金合欢粗提液,再经吸附树脂吸附后,以水和乙醇组成的洗脱液洗脱,并收集洗脱液而得。

[0022] 经测定,以本发明提供的方法制得各种金合欢的提取物,具有抑制酪氨酸酶活性的作用,能显著抑制黑色素生成。进一步实验验证,以此护理皮肤具有美白效果,可应用于食品、动物用饲料、药品、准药品和化妆品等产品。

[0023] 本发明技术方案实现的有益效果:

[0024] 本发明以单一的金合欢植物为原材料,尤其是金合欢植物的花蕾、树皮和树叶,使产品质量可控,效用稳定。

[0025] 本发明先使用极性溶剂进行提取,所得粗提液经吸附树脂吸附并洗脱后制得金合欢提取物。该技术方案简单高效,适合于以工业化方式对金合欢植物中的活性物质进行提取、利用和开发。

[0026] 本发明制取提取物的方法安全可靠,便于在食品、动物用饲料、药品、准药品和化妆品等产品中的应用。

附图说明

[0027] 图1为本发明金合欢提取物对黑色素生成的抑制作用;其中,A表示该栏为采用实施例2制得的提取物对黑色素生成的抑制情况;B表示该栏为实施例3制得的提取物对黑色素生成的抑制情况;C表示实施例4制得的提取物对黑色素生成的抑制情况。

具体实施方式

[0028] 以下结合附图详细描述本发明的技术方案。本发明实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

[0029] 实施例1 金合欢提取条件的优选

[0030] 新鲜金合欢10g,采用 $L_9(3_4)$ 正交试验(药物研究常用数学方法及计算机程序[P],贵州科技出版社,1997)进行提取工艺的优化,以料液比(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)为试验因素,以及空白列(D)。以提取率为指标进行正交设计试验,优化提取工艺条件。因素水平设计见表1,其中从生产成本考虑,提取时间一般不超过2小时,结果见表2。

[0031] 表1 正交试验因素水平

[0032]

水平	料液比 (A)	乙醇浓度 (B) /%	提取时间 (C) /小时
1	10	50	0.5
2	20	70	1.0
3	50	90	2.0

[0033] 表 2L₉(3₄) 正交试验设计及结果表

[0034]

试验号	料液比 (A)	乙醇浓度 (B) /%	提取时间 (C) /小时	空白 (D)	提取率%
1	1	1	1	1	8.44
2	1	2	2	2	7.96
3	1	3	3	3	7.24
4	2	1	2	3	9.10
5	2	2	3	1	9.64
6	2	3	1	2	5.30
7	3	1	3	2	12.6
8	3	2	1	3	8.38
9	3	3	2	1	6.56

[0035] 表 3 正交试验直观分析表

[0036]

	料液比 (A)	乙醇浓度 (B) /%	提取时间 (C) / 小时	空白 (D)
水平1	23.64	30.14	22.12	24.64
水平2	24.04	25.98	23.62	25.86
水平3	27.54	19.1	29.48	24.72
极差R	1.30	3.68	2.45	0.41

[0037] 表 4 正交试验方差分析表

[0038]

方差来源	平方和	自由度	均值	F值
料液比 (A)	3.07	2	1.53	9.88
乙醇浓度 (B) /%	20.72	2	10.36	66.75
提取时间 (C) /小时	10.08	2	5.04	32.48
误差	0.31	2	0.155	

[0039] $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$

[0040] 正交试验方差分析表明:置信度为 0.95 时,乙醇浓度和提取时间是显著性因素,料液比在所选择的三个水平中为不显著因素。直观分析可得, A3B1C3 即 50 倍料液比、50%乙醇浓度以及提取时间 2 小时,是金合欢提取物的最佳提取条件。因为料液比对提取率影响效果不显著,基于溶剂成本的考虑,实际生产中亦可以采用 20 倍料液比。

[0041] 实施例 2 金合欢花蕾提取物的制取

[0042] 将 100g 金合欢花蕾清洗后,与 2L70v/v% 乙醇溶液混合,在室温下,超声提取 1 小时,分离出粗提液,经减压蒸出乙醇溶液后,得到金合欢花蕾粗提物 6g。

[0043] 取金合欢花蕾粗提物 1g,用去离子水溶解后,上样到 AB-8 树脂填充柱,依次用去离子水、20v/v% 乙醇、40v/v% 乙醇、60v/v% 乙醇和 80v/v% 乙醇梯度洗脱,分别收集洗脱液,减压蒸出乙醇和水,分别得到水洗部位、20v/v% 乙醇部位、40v/v% 乙醇部位、60v/v% 乙醇部位和 80v/v% 乙醇部位的金合欢花蕾提取物,-20℃下冷冻保存。

[0044] 实施例 3 金合欢树皮提取物的制取

[0045] 将 50g 金合欢树皮清洗后,与 1L70v/v% 乙醇溶液混合,用循环逆流提取法提取 2 小时,分离出粗提液,经减压蒸出去离子水后,得到金合欢树皮粗提物 5g。

[0046] 取金合欢树皮粗提物 5g,用去离子水溶解后,上样到 X-5 树脂填充柱,依次用去离子水、20v/v% 乙醇、40v/v% 乙醇、60v/v% 乙醇和 80v/v% 乙醇梯度洗脱,分别收集洗脱液,减压蒸出乙醇和水,分别得到水洗部位、20v/v% 乙醇部位、40v/v% 乙醇部位、60v/v% 乙醇部位和 80v/v% 乙醇部位的金合欢树皮提取物,-20℃下冷冻保存。

[0047] 实施例 4 金合欢树叶提取物的制取

[0048] 将 200g 金合欢树叶清洗后,与 4L50v/v% 乙醇溶液混合,在室温下,搅拌提取 1.5 小时,分离出粗提液,经减压蒸出乙醇溶液后,得到金合欢树叶粗提物 8g。

[0049] 取金合欢树叶粗提物 1g,用去离子水溶解后,上样到 AB-8 树脂填充柱,依次用去离子水、20v/v% 乙醇、40v/v% 乙醇、60v/v% 乙醇和 80v/v% 乙醇梯度洗脱,分别收集洗脱液,减压蒸出乙醇和水,分别得到水洗部位、20v/v% 乙醇部位、40v/v% 乙醇部位、60v/v% 乙醇部位和 80v/v% 乙醇部位的金合欢树叶提取物,-20℃下冷冻保存。

[0050] 实施例 5 酪氨酸酶抑制活性的检测

[0051] 分别按照实施例 2、实施例 3 和实施例 4 制备的样品,溶于去离子水,配制成水溶液,用于测定酪氨酸酶抑制活性,以熊果苷为参照物。测定步骤为:酸碱缓冲溶液(pH6.8, 30mM) 70 μL、1.66mM 酪氨酸溶液 80 μL、样品溶液 80 μL 混合均匀,在 37℃恒温水槽中温育 5 分钟以上,加入酪氨酸酶溶液(1000U/ml) 10 μL,在 37℃恒温 10min 后,用酶标仪测定 475nm 波长的吸光度 A_{475} 。用去离子水替换样品水溶液,作为参比溶液同样测定吸光度,结

果见表 5。

[0052] 酪氨酸酶活性抑制率计算公式为:抑制率(%) = $(A_0 - (A_{475} - B)) / A_0 \times 100\%$, 其中 A_0 是参比溶液的吸光度, A_{475} 是样品溶液的吸光度, B 是样品水溶液稀释 3 倍后的吸光度。

[0053] 表 5 酪氨酸酶抑制活性的测定结果

	样品	样品溶液浓度 mg/ml	酪氨酸酶抑制率%
	实施例 2 (澳洲金合欢花蕾粗提物)	1.0	77.0
	实施例 2 (20v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	29.1
	实施例 2 (40v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	92.9
	实施例 2 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.1	43.8
	实施例 2 (60v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	85.0
	实施例 2 (80v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	61.0
	实施例 3 (澳洲金合欢树皮粗提物)	1.0	76.2
[0054]	实施例 3 (40v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	92.7
	实施例 3 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.1	35.1
	实施例 3 (60v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	67.0
	实施例 4 (澳洲金合欢树叶粗提物)	1.0	76.0
	实施例 4 (40v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	56.3
	实施例 4 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.1	15.4
	实施例 4 (80v/v%乙醇洗脱部位)	1.0	33.0
	熊果苷	0.5	43.0

[0055] 由表 5 可见, 分别从金合欢植物的花蕾、树皮和树叶获得的提取物, 经吸附树脂分离后, 所得 20v/v% 乙醇、40v/v% 乙醇、60v/v% 乙醇和 80v/v% 乙醇洗脱部位均能实现对酪氨酸酶活性的抑制, 其 40v/v% 乙醇洗脱部位对酪氨酸酶活性的抑制作用最强。

[0056] 实施例 6 清除自由基活性的检测

[0057] 分别按实施例 2、实例 3 和实例 4 方法制备得到的金合欢提取物, 用 DPPH 法测定其清除自由基活性, 以 V_c 为参照物。测定步骤为: 准确移取提取液 2mL 于 10mL 具塞试管中, 加入 2mL DPPH 乙醇溶液 ($2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$), 充分混匀, 室温静置, 30min 后用分光光度计测定 517nm 波长的吸光度 A_{517} (以乙醇为参比); 同时测定 2mL DPPH 溶液与 2mL 乙醇混合后的吸

光度 A_c , 以及 2mL 提取液与 2mL 乙醇溶液混合后的吸光度 A_0 。平行测定三次, 取平均值, 根据以下公式计算自由基清除率。

[0058] 自由基清除率 = $(1 - (A_{517} - A_0) / A_c) \times 100\%$ 。

[0059] 表 6DPPH 法清除自由基活性的检测结果

	样品名称	样品浓度	自由基清除率%
[0060]	实施例 2 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.020mg/ml	78.0
	实施例 2 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.017mg/ml	92.0
	实施例 2 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.009mg/ml	81.0
	实施例 2 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.002mg/ml	28.0
	实施例 2 (60v/v%乙醇洗脱部位)	0.027mg/ml	90.0
	实施例 2 (80v/v%乙醇洗脱部位)	0.027mg/ml	91.0
	实施例 3 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.030mg/ml	76.2
	实施例 4 (40v/v%乙醇洗脱部位)	0.049mg/ml	90.0
	V_c	0.005mg/ml	74.0

[0061] 由表 6 可见, 分别从金合欢植物的花蕾、树皮和树叶获得的提取物, 经吸附树脂分离后, 所得 20v/v% 乙醇、40v/v% 乙醇、60v/v% 乙醇和 80v/v% 乙醇洗脱部位均能实现对 DPPH 自由基的清除, 其 40v/v% 乙醇洗脱部位对自由基的清除作用最强。

[0062] 实施例 7 金合欢提取物对黑色素生成的抑制作用

[0063] 分别按照实施例 2、实施例 3 和实施例 4 制备的 40v/v% 乙醇洗脱部位样品, 溶于去离子水, 配制成 1mg/mL 水溶液, 用于测定对黑色素生成的抑制作用, 以相同浓度的熊果苷溶液为参照物。步骤为: 酸碱缓冲溶液 (pH6.8, 30mM) 70 μ L, 1.66mM 酪氨酸溶液 80 μ L, 样品溶液 80 μ L 混合均匀, 在 37°C 恒温水槽中温育 5 分钟以上, 加入酪氨酸酶溶液 (1000U/ml) 10 μ L, 在 37°C 恒温 4 小时, 结果见图 1。

[0064] 由图 1 可见, 与阴性空白对照和加入熊果苷的阳性对照相比, 加入实施例 2、实施例 3 和实施例 4 所制得的提取物的试样颜色均为褐色, 表明能显著抑制黑色素的生成。金合欢植物花蕾的提取物 (即实施例 2) 对黑色素生成的抑制作用最强 (试样呈浅褐色)。

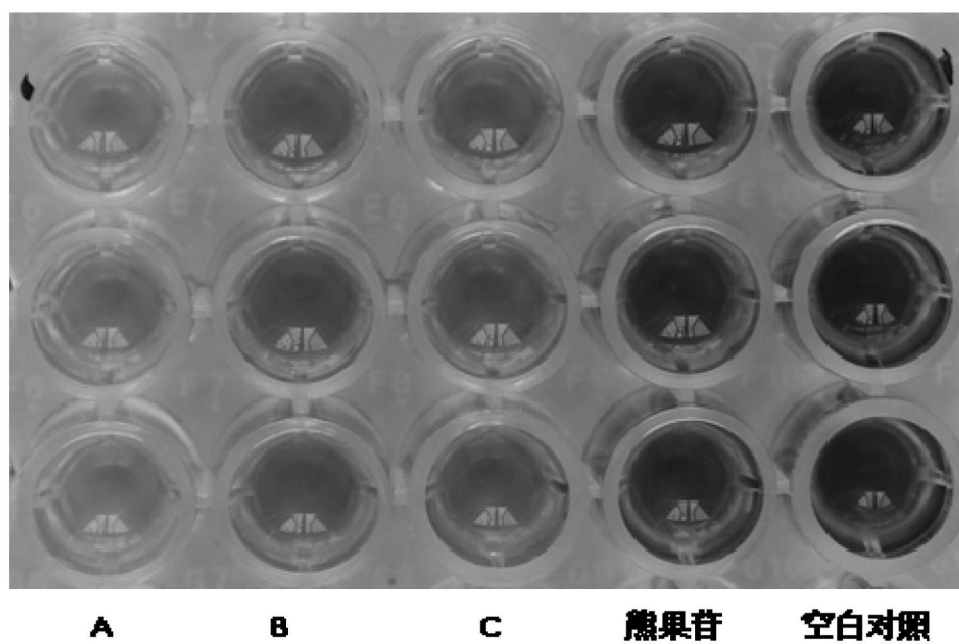


图 1