(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110680781 A
(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201911028357.X

(22)申请日 2019.10.28

(71)申请人 上海仪玳化妆品有限公司
地址 201609 上海市松江区叶榭镇叶新公路1228号1号厂房

(72)发明人 方国忠

(51)Int.Cl.
A61K 8/9789(2017.01)
A61K 8/9728(2017.01)
A61Q 19/02(2006.01)
A61Q 19/08(2006.01)

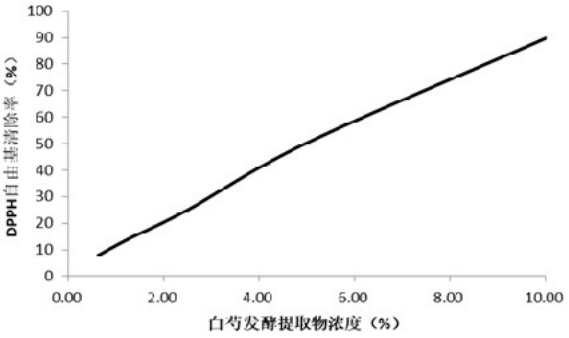
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种白芍发酵化妆品及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种白芍发酵化妆品及其制备方法与应用,要解决的是现有增白美容化妆品中的问题。本发明包括以下原料:酿酒酵母(10-50)mL、白芍干粉(2-25)g和水(480-530)g,酿酒酵母的菌种数为10^6-10^9 CFU/mL。本发明通过对白芍干粉进行两次发酵,对白芍干粉中的活性成分进行充分的发酵提取,最终发酵所得到的白芍发酵提取物可以作为化妆水、精华或者面膜液直接使用,大大的增加了白芍发酵化妆品中的白芍活性物的功效与安全性。



CN 110680781 A

1.一种白芍发酵化妆品，其特征在于，包括以下原料：酿酒酵母(10-50)mL、白芍干粉(2-25)g和水(480-530)g，酿酒酵母的菌种数为10^6-10^9 CFU/mL。

2.根据权利要求1所述的白芍发酵化妆品，其特征在于，包括以下原料：酿酒酵母40mL、白芍干粉10g和水500g，酿酒酵母的菌种数为10^8 CFU/mL。

3.根据权利要求1所述的白芍发酵化妆品，其特征在于，所述白芍干粉的目数为20-50目，白芍干粉为干燥后的白芍经粉碎机粉碎、过筛后得到。

4.一种如权利要求1-3任一所述的白芍发酵化妆品的制备方法，其特征在于，具体步骤如下：将白芍干粉、水和酿酒酵母混合得到初始体系，并对初始体系进行第一次发酵培养，得到第一发酵物后再次与植物乳杆菌混合得到二次体系，并对二次体系进行第二次发酵培养，通过灭菌、离心、取上清获得白芍发酵提取物。

5.根据权利要求4所述的白芍发酵化妆品的制备方法，其特征在于，所述第一次发酵培养和第二次发酵培养的温度为25-35℃，时间为24-72h。

6.根据权利要求4或5所述的白芍发酵化妆品的制备方法，其特征在于，所述第一次发酵产物与植物乳杆菌的比例为500g:(5-30)mL，植物乳杆菌的菌种数为10^6-10^9 CFU/mL。

7.根据权利要求4所述的白芍发酵化妆品的制备方法，其特征在于，所述灭菌的温度为105-121℃，灭菌时间为10-40min，灭菌压力为0.12MPa-0.21 MPa，离心的转速为3000-8000r/min，离心时间为10-30min，离心半径为9cm。

8.根据权利要求4所述的白芍发酵化妆品的制备方法，其特征在于，所述酿酒酵母和植物乳杆菌俊俊采用培养液或悬浮液的形式，酿酒酵母的培养液或悬浮液的pH值为5.0-7.0，植物乳杆菌的培养液或悬浮液的pH值为4.0-7.0。

9.一种如权利要求4-8任一得到的白芍发酵提取物在制备具有美白功能和/或清除DPPH自由基的产品中的应用。

一种白芍发酵化妆品及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化妆品领域,具体是一种白芍发酵化妆品。

背景技术

[0002] 白芍为毛茛科植物芍药(Paeonia lactiflora Pall.)的干燥根,主产于浙江、安徽、四川等地。性微寒,味苦酸,具有养血柔肝、缓中止痛、敛阴收汗的功用,其味甘、酸,性微寒,具有养血美容的功效。白芍提取液可以通过对细胞活力和细胞周期的作用来增强细胞的增殖能力,改善D-半乳糖诱导的小鼠皮肤成纤维细胞损伤,对其具有保护作用,证明宝少提取液可用于皮肤抗衰老产品的开发。除此之外,白芍大多用于美白作用的护肤产品中,其提取物对酪氨酸酶具有较好的抑制作用,同时也经常用于治疗色素型皮肤病黄褐斑的配方中。

[0003] 酪氨酸酶是黑色素生物合成途径中的主要限速酶,在黑色素生成过程中起促进作用,目前具有美白作用的中药来源化妆品主要是通过抑制该酶来减少皮肤中黑色素形成。一般认为,中药来源具美白作用的化妆品具有绿色、安全、易被市场接受等特点,因此在传统中药中寻求高效、安全、副作用小的天然来源酪氨酸酶抑制剂已成为热点研究领域,对色素型皮肤疾的治疗和增白美容化妆品配方等方面具重要意义。

发明内容

[0004] 本发明实施例的目的在于提供一种白芍发酵化妆品,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

一种白芍发酵化妆品,包括以下原料:酿酒酵母(10-50)mL、白芍干粉(2-25)g和水(480-530)g,酿酒酵母的菌种数为10^6-10^9 CFU/mL。

[0006] 作为本发明实施例进一步的方案:所述白芍发酵化妆品,包括以下原料:酿酒酵母40mL、白芍干粉10g和水500g,酿酒酵母的菌种数为10^8 CFU/mL。

[0007] 作为本发明实施例进一步的方案:酿酒酵母的ATCC编号为1012。

[0008] 作为本发明实施例进一步的方案:白芍干粉的目数为20-50目,优选为30目,白芍干粉为干燥后的白芍经粉碎机粉碎、过筛后得到。

[0009] 所述白芍发酵化妆品的制备方法,具体步骤如下:将白芍干粉、水和酿酒酵母混合得到初始体系,并对初始体系进行第一次发酵培养,得到第一发酵物后再次与植物乳杆菌混合得到二次体系,并对二次体系进行第二次发酵培养,通过灭菌、离心、取上清获得白芍发酵提取物。微生物法提取白芍干粉活性成分的过程中,最重要的是筛选出最合适发酵底物的菌类,然后培养足够量的微生物菌液或菌粉,接菌到调配好的发酵底物之中,发酵底物内不用加入其它的酶类和物质,所以微生物法提取相较于其它的提取方法更专一;微生物发酵法提取白芍干粉活性成分的过程一般都是在pH为7.0左右的环境下进行的并且不需要高温、高压,发酵过程的压力一般也是常压发酵,发酵温度一般也在20℃-50℃范围内;发酵

设备简单,操作安全方便;发酵之后的发酵液中没有污染环境的成分,不但不会对环境造成危害,还会保留其他的活性成分,充分提高了植物资源利用率。

[0010] 作为本发明实施例进一步的方案:第一次发酵培养和第二次发酵培养的温度为25-35℃,时间为24-72h,优选为28℃和48h。

[0011] 作为本发明实施例进一步的方案:第一次发酵产物与植物乳杆菌的比例为500g:(5-30)mL,植物乳杆菌的菌种数为10^6-10^9 CFU/mL。

[0012] 作为本发明实施例进一步的方案:植物乳杆菌的ATCC编号为8014。

[0013] 作为本发明实施例进一步的方案:酿酒酵母和植物乳杆菌俊俊采用培养液或悬浮液的形式,酿酒酵母的培养液或悬浮液的pH值为5.0-7.0,植物乳杆菌的培养液或悬浮液的pH值为4.0-7.0。

[0014] 作为本发明实施例进一步的方案:灭菌的温度为105-121℃(具体可为115℃),灭菌时间为10-40min(具体可为30min),灭菌压力为0.12MPa-0.21 MPa,离心的转速为3000-8000r/min(具体可为5000r/min),离心时间为10-30min(具体可为20min),离心半径为9cm。

[0015] 作为本发明实施例进一步的方案:白芍发酵提取物还可以进行脱色(具体可采用活性炭)、去味后得到的,不同浓度的白芍发酵提取物采用去离子水稀释得到。

[0016] 本发明还包括将制备方法得到的成品在制备具有美白功能和/或清除DPPH自由基的产品中的应用,该产品可以为面膜、精华液、爽肤水等化妆品中的任意一种。

[0017] 与现有技术相比,本发明实施例的有益效果是:

(1)本发明采用酿酒酵母和植物乳杆菌对白芍干粉进行发酵,保留了植物的全部功效成分及其活性,避免了提取方法造成的活性成分流失;

(2)本发明采用发酵法,在对白芍干粉有效成分提取过程中,不添加任何有机试剂,发酵温度和发酵pH温和,植物活性成分结构不被破坏,保持植物的天然活性,同时,节约生产成本,而且最大化的简化了生产步骤,使该发酵技术能够实现大量生产、工业化生产,并能够充分保证产品质量的稳定性;

(3)本发明提供的白芍发酵提取物中不添加香精等对化学成分,确保产品对人体的安全性。可以直接作为面膜或精华液或爽肤水的成品使用,比现有市面上的其他产品更加天然,不会给肌肤造成任何负作用;而且比普通提取方法获得更小的成分,更易让皮肤充分吸收;

(4)本发明提供的白芍发酵提取物中富含的蛋白质、多糖、黄酮等物质,与发酵滤液中的益生菌发酵产物成分具有协同作用,从而具有显著地抗氧化及抗衰老作用,并且具有一定的美白作用。

附图说明

[0018] 图1为白芍发酵化妆品的实施例2中不同浓度的白芍发酵提取物与DPPH自由基清除率的关系曲线。

[0019] 图2为白芍发酵化妆品中的实施例2中不同浓度的白芍发酵提取物与羟自由基清除率的关系曲线。

[0020] 图3为白芍发酵化妆品中的不同浓度的白芍发酵提取物与超氧阴离子自由基清除率的关系曲线。

[0021] 图4为白芍发酵化妆品中的实施例2中不同浓度的白芍发酵提取物与酪氨酸酶抑制率的关系曲线。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体实施方式对本专利的技术方案作进一步详细地说明。

[0023] 以下实施例中白芍干粉均购自北京同仁堂，酿酒酵母的ATCC编号为1012，植物乳杆菌的ATCC编号为8014。

[0024] 实施例1

1、菌种的活化：

挑取酿酒酵母菌落一环于液体培养基中，放入摇床中将菌种活化，得到活化后酿酒酵母。

[0025] 挑取植物乳杆菌菌落一环于液体培养基中，放入摇床中将菌种活化，得到活化后的植物乳杆菌。

[0026] 2、菌种的纯化：

将步骤1得到的活化后的菌液梯度稀释铺板，以便获取单菌落，得到纯化后的酿酒酵母和植物乳杆菌。

[0027] 3、菌种的扩大培养：

将步骤2得到的纯化后的酿酒酵母的菌种接种到液体培养基中，于28℃的摇床中培养，当OD值为1.0时，得到发酵菌菌液(菌种处在对数期，浓度为1×10^8 CFU/mL)。

[0028] 将步骤2得到的纯化后的植物乳杆菌的菌种接种到液体培养基中，于40℃的培养箱中培养，当OD值为1.0时，得到发酵菌菌液(菌种处在对数期，浓度为1×10^8 CFU/mL)。

[0029] 4、白芍发酵提取物的获得：

将20mL步骤3得到的酿酒酵母发酵菌菌液接种到10g的白芍干粉和500g的水中，得到初始体系(发酵体系中菌种总量和白芍干粉的配比为4×10^9CFU:10g)；将发酵体系于28℃摇床中发酵48h，得到第一发酵物；将10mL步骤3得到的植物乳杆菌发酵菌菌液接种到500g第一发酵物中，得到二次体系，并在40℃培养箱中发酵24h，得到第二发酵物，将第二发酵物于115℃中灭菌30min，使菌失活，得到灭菌后的第二发酵物；将灭菌后的第二发酵物于5000r/min、离心半径为9cm的条件下离心20min，弃沉淀，收集上清液，即为白芍发酵提取物。

[0030] 该实施例制备所得的白芍发酵提取物的外观为粘稠液体、颜色为透明无色至棕黄色。pH值4.0-6.3，粘度50-500cP，可溶性固含物含量0.5-5.0%，菌落总数小于50 CFU/mL，无致病菌检出。根据化妆品卫生标准GB7916-87，化妆品细菌总数不高于1000CFU/mL，所以此白芍发酵提取物符合化妆品质量要求。

[0031] 对该白芍发酵提取物进行成分分析，蛋白质检测方法参照GB5009.5-2010；粗多糖检测方法参照GB/T 5009.8-2008；氨基酸检测方法参照GB/T 5009.124-2003；总酚检测方法参照GB/T 8313-2008所得结果如下：

本实施例制得的白芍发酵提取物含蛋白质631.9μg/mL、粗多糖953.3μg/mL、总黄酮100.8μg/mL(以芦丁计)、总酚57.2μg/mL。

[0032] 实施例2、白芍发酵提取物在作为化妆品(面膜或精华液或爽肤水)中的应用：

一、白芍发酵提取物的安全性检测：

人体斑贴试验主要是用于检测化妆品终产品或原料的刺激性。本发明对实施例1中获得的白芍发酵提取物进行人体封闭式斑贴试验，旨在对其潜在皮肤刺激性进行评估。

[0033] 1、试验对象：

选择合适的志愿者30人，年龄范围在18-60岁随机选择。

[0034] 2、试验方法：

若为固体样品或半固体的样品，则称取0.020g-0.025g置于斑试器中备用；若是液体样品，则量取0.025mL-0.2mL滴加于滤纸片上，再将滤纸片置于斑试器内。本发明采用后者，每个样品均设置空白对照，在对照斑试器孔内加入与样品等量的样品溶剂，如蒸馏水或橄榄油，本发明采用蒸馏水。

[0035] 试验部位选为人体背部，利用无刺激性的胶带将斑试器固定贴敷于受试者背部。测试周期持续24h。为了试验结果的准确、可信和科学，在测试期间志愿者按照要求，不能摘掉斑试器，亦不可使受试部位接触水。24h后去除斑试器，静置30min后，等待压痕消失，观察皮肤的反应。如果试验结果为阴性，则需要在斑贴试验后24h和48h分别再观察一次。

[0036] 3、试验结果：

斑贴试验结果如下表1所示：

其中，*"-" = 阴性反应；

一级不良反应："±" = 可疑反应：仅有微弱红斑；

二级不良反应："+" = 弱阳性反应(红斑反应)：红斑、浸润、水肿、可有丘疹；

三级不良反应："++" = 强阳性反应(疱疹反应)：红斑、浸润、水肿、丘疹、疱疹，反应可超出受试区；

四级不良反应："+++" = 极强阳性反应(融合性疱疹反应)：明显红斑、严重浸润、水肿、融合性疱疹，反应超出受试区。

[0037] 判断标准：30 例中出现二级皮肤不良反应的人数多于2例，或出现任何1例三级或三级以上皮肤不良反应时，则判定受试物对人体有不良反应，反之，则视为对人体无不良反应。

[0038] 表1、实施例1获得的白芍发酵提取物的斑贴试验结果

样品名称	反应程度	反应例数（去除斑试器）			反应人数
		30分钟后	24小时后	48小时后	
空白	－	30	30	30	0
	±	—	—	—	
	＋	—	—	—	
	＋＋	—	—	—	
	＋＋＋	—	—	—	
白芍发酵提取物	－	30	30	30	0
	±	—	—	—	
	＋	—	—	—	
	＋＋	—	—	—	
	＋＋＋	—	—	—	

从表1中可以看出:实施例1得到的白芍发酵提取物均未产生可疑反应,说明 本发明提供的白芍发酵提取物均具有安全性,不会给人体带来不良反应。

[0039] 二、白芍发酵提取物的抗氧化性能检测:

1、DPPH自由基清除实验

取不同量的实施例1制备得到的白芍发酵提取物溶于去离子水中,制得一系列体积百分含量(2%、4%、6%、8%、10%)的白芍发酵提取物待测液。

[0040] DPPH自由基清除实验的具体实验步骤为:

(1)取等体积(一般为3mL)的白芍发酵提取物待测液与2×10^{-4}mol/L的DPPH溶液混匀(A_1管);

(2)取等体积的无水乙醇(待测物溶剂)与2×10^{-4}mol/L的DPPH溶液混匀(A_2管);

(3)取等体积的无水乙醇与白芍发酵提取物待测液混匀(A_3管);

(4)反应30min后,在517nm下测A_1、A_2、A_3管吸光度值。

[0041] 清除率计算公式为:清除率(%)=[$(A_2+A_3)-A_1$]/A_2

以白芍发酵提取物待测液的体积百分含量为横坐标,清除率为纵坐标,做出白芍发酵提取物对DPPH自由基清除作用曲线,见附图1。

[0042] 由图1可知,实施例1所得白芍发酵提取物对DPPH清除作用的IC50=4.09%,说明白芍发酵提取物具有较强的抗氧化能力可清除自由基,促进细胞代谢,增强细胞活力,改善机体的结构和功能,提高机体生命力,从而延缓细胞老化,发挥其抗衰老的作用。

[0043] 2、羟自由基清除实验

取不同量的实施例1制备得到的白芍发酵提取物溶于去离子水中,制得一系列体积百分含量(20%、40%、60%、80%、100%)的白芍发酵提取物待测液。

[0044] 对羟自由基清除实验的具体实验步骤为：

(1)在25ml比色管中加入2mmol/L $FeSO_4$ 3ml、1mmol/L $H_2O_2$3ml，摇匀;其中H_2O_2是最后加入并启动整个反应。

[0045] (2)接着加入6mmol/L水杨酸3ml，摇匀；

(3)于37℃水浴加热15min后取出，测其吸光度A_0；

(4)然后分别加入一定浓度的白芍发酵提取物待测液0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml；

(5)然后再分别加入蒸馏水0.8ml、0.6ml、0.4ml、0.2ml、0ml，摇匀，继续水浴加热15min，取出测其吸光度A_X。

[0046] (6)为消除后加的共1.0ml白芍发酵提取物待测液和蒸馏水所造成的体系吸光度值的降低，方法同上，恒温15min后测其吸光度值A00，加1ml蒸馏水，摇匀后再测一次其吸光度A_{XX}，$A_{降低}=A_{00}-A_{XX}$。

[0047] 如图2所示，白芍发酵提取物对羟自由基的清除作用明显，随白芍发酵提取物浓度增大，其清除羟自由基的能力逐渐增强，表明白芍发酵提取物清除羟自由基的能力与其浓度就有显著的量效关系。100%白芍发酵提取物能够清除55.80%羟自由基，对羟自由基清除作用的IC50=74.66%。

[0048] 3、超氧阴离子自由基清除实验

取不同量的实施例1制备得到的白芍发酵提取物溶于去离子水中，制得一系列体积百分含量(20%、40%、60%、80%、100%)的白芍发酵提取物待测液。

[0049] 对超氧阴离子自由基清除实验的具体实验步骤为：

(1)取4.5mL 0.05mol/L pH8.2的Tris-HCl缓冲液于试管中，加入4mL 去离子水，0.1mL样品，混匀，置于25℃水浴中预热10min；

(2)取出后迅速加入0.4 mL 25℃保温10 min 的邻苯三酚溶液(2.5 mmol/L，10 mmol/L HCl配制)。

[0050] (3)加入8mol/L 盐酸1mL 终止反应，空白组以蒸馏水做对照。

[0051] (4)于299nm处测定吸光度，计算清除率。A1为样品，A2对照。

[0052] 超氧阴离子清除率(%)=(A1-A2)/A1

如图3所示，白芍发酵提取物对超氧阴离子具有显著的清除作用。随白芍发酵提取物浓度升高，其对超氧阴离子的清除率逐渐增加。100%的白芍发酵提取物对超氧阴离子的的清除能力在95%左右，对羟自由基清除作用的IC50=20.05%。

[0053] 二、白芍发酵提取物的美白性能检测：

(1)C1、C2、T1、T2管的物质加入量参照表2。

[0054] (2)C2管配好摇匀后，在37℃水浴锅中水浴加热10min，波长475nm下调零。

[0055] (3)C1管溶液配好摇匀，37℃水浴10min后，加酪氨酸酶1ml，继续水浴10分钟，测定C1吸光度值。

[0056] (4)按(1)(2)同样方法，以T2调零测定T1吸光度值。

[0057] (5)计算样品对酪氨酸酶的活性抑制率T(%)。公式：T(%)=(C1- T1)/ C1 ×100%

表2

单位(mL)	C_1	C_2	T_1	T_2

0.05% L-酪氨酸	0.5	0.5	0.5	0.5
样品	0	0	0.5	0.5
PBS	2	2.5	1.5	2
100U/ml酪氨酸酶	0.5	0	0.5	0
总体积	3	3	3	3

白芍发酵提取物对酪氨酸酶的抑制率见图4，从图4和表3可以看出1%熊果苷为酪氨酸酶活性抑制实验的阳性对照，其对酪氨酸酶活性抑制率为99.52%。10%白芍原浆可抑制38.46%的酪氨酸酶活性。因此白芍发酵提取物具有一定的抑制酪氨酸酶活性的作用。

[0058] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0059] 此外，应当理解，虽然本说明书按照实施方式加以描述，但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案，说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见，本领域技术人员应当将说明书作为一个整体，各实施例中的技术方案也可以经适当组合，形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

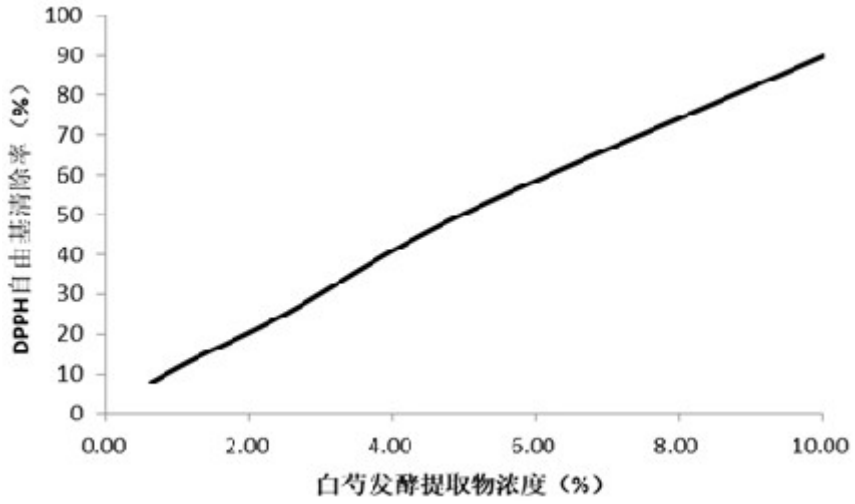

DPPH自由基清除率（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.00
2.00
4.00
5.00
8.00
10.00
白芍发酵提取物浓度（%）

图1

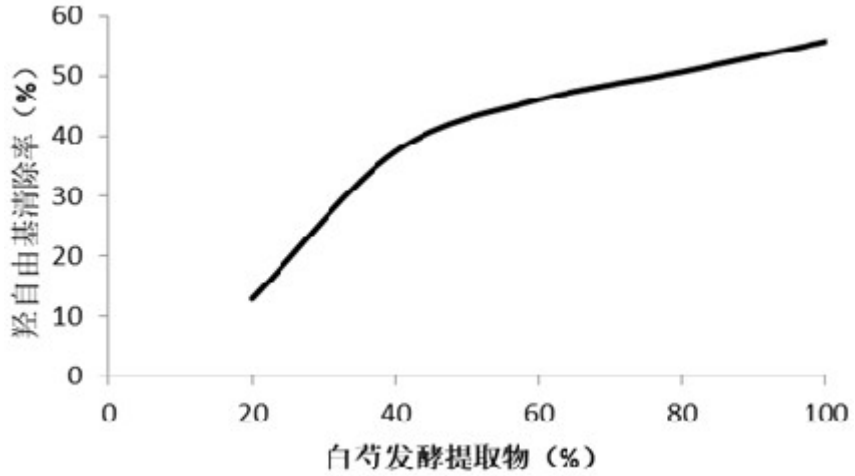

羟自由基清除率（%）
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
白芍发酵提取物（%）

图2

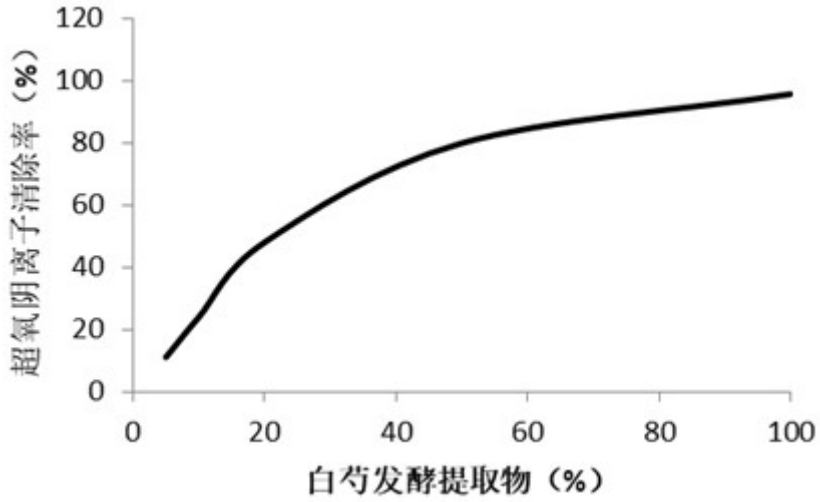

超氧阴离子清除率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
白芍发酵提取物（%）

图3

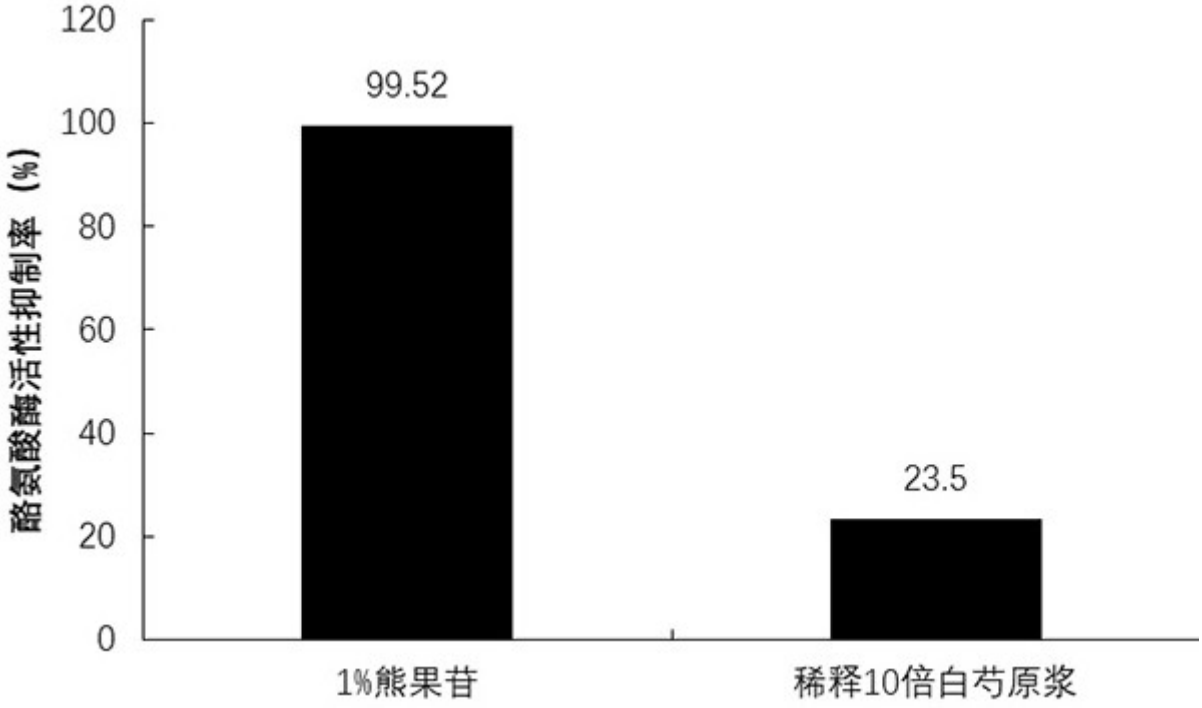

酪氨酸酶活性抑制率（%）
120
100
80
60
40
20
0
99.52
23.5
1%熊果苷
稀释10倍白芍原浆

图4