



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111201012 A

(43)申请公布日 2020.05.26

(21)申请号 201980002614.4

(22)申请日 2019.08.27

(30)优先权数据

10-2018-0112354 2018.09.19 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/010948 2019.08.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02020/060060 KO 2020.03.26

(71)申请人 东国制药(株)

地址 韩国首尔

(72)发明人 郑求英 黄暎植 韩秀旻 金英恩

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

代理人 薛琦

(51)Int.Cl.

A61K 8/9789(2006.01)

A61Q 19/02(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

A61K 36/23(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A23L 33/105(2006.01)

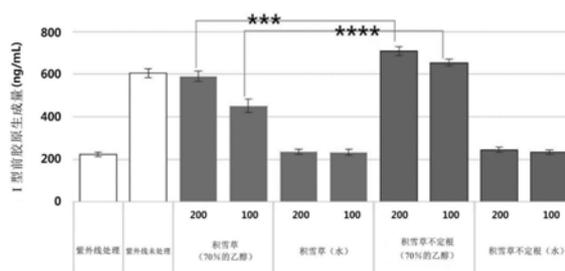
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物

(57)摘要

本发明涉及包含积雪草不定根的提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物,本发明的积雪草不定根提取物无细胞毒性、抗炎及抗氧化活性优秀、抑制黑色素色素及基质金属蛋白酶的生成、增进前胶原的生成的效果优异,因此可以有效地利用于用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品或皮肤外用剂等。



1. 一种用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物,其特征在于,包含积雪草不定根提取物作为有效成分。

2. 根据权利要求1所述的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物,其特征在于,通过利用碳数为1至4的低级醇或它们的混合溶剂来提取上述提取物。

3. 根据权利要求1所述的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物,其特征在于,上述组合物抑制黑色素及基质金属蛋白酶的生成并促进前胶原的生成。

4. 根据权利要求1所述的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物,其特征在于,上述组合物具有抗炎及抗氧化活性。

5. 根据权利要求1所述的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物,其特征在于,上述组合物为选自护肤水、柔肤水、爽肤水、收敛水、乳液、润肤液、保湿乳液、营养乳液、按摩霜、营养霜、眼霜、保湿霜、护手霜、精华液、营养精华液、面膜、洗面奶、卸妆水、卸妆乳液、卸妆霜、润肤露、沐浴露、香皂及粉末中的一种剂型。

6. 一种用于皮肤美白及皱纹改善的皮肤外用药学组合物,其特征在于,包含积雪草不定根提取物作为有效成分。

7. 一种用于预防或治疗黑色素沉着过度症的药学组合物,其特征在于,包含积雪草不定根提取物作为有效成分。

8. 根据权利要求7所述的用于预防或治疗黑色素沉着过度症的药学组合物,其特征在于,上述色素沉着过度症为雀斑、老年斑、肝斑、黑斑、褐色或黑色斑点、日光性色斑、蓝青色斑症、药物使用引起的色素沉着过度、壬辰性黄褐斑、或因包括擦伤和烫伤在内的创伤或皮肤炎症引起的炎症后色素沉着过度。

9. 根据权利要求7所述的用于预防或治疗皮肤色素沉着过度症的药学组合物,其特征在于,将上述组合物制备成选自注射剂、膏、贴剂、喷雾剂、软膏剂、硬膏剂、乳剂、搽剂、糊剂及泥敷剂中的一种剂型。

10. 一种用于预防或改善黑色素沉着过度的保健功能食品组合物,其特征在于,包含积雪草不定根提取物作为有效成分。

包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物。

背景技术

[0002] 随着老年人口的增加,可作为老化尺度的皮肤美容及可防止老化的抗氧化领域正成为主要关注焦点。由于老化引起的皮肤皱纹生成及体内抗氧化活性降低等可用作健康的标准。皮肤老化可根据原因分为内源性老化(intrinsic aging)和外源性老化(extrinsic aging)。众所周知,内源性老化是由皮肤表皮及真皮的生理功能随年龄的变化而引起的,而外源性老化是由大气污染、紫外线暴露及应激等环境造成的皮肤生理功能的变化所引起的。这些老化的共同机制可通过因持续暴露于氧化应激(oxidative stress)而导致体内的自由基(free radical)增加、分解作为真皮的结合组织的弹性蛋白(elastin)的弹性蛋白酶(elastase)的活性增加、分解透明质酸(hyaluronic acid)的透明质酸酶(hyaluronidase)的活性增加来解释。即,皮肤老化可以解释为弹性蛋白和透明质酸遭到破坏后导致真皮溃烂以及皮肤干燥,从而生成皱纹。并且,体内的自由基通过参与黑色素形成过程来激活酪氨酸酶(tyrosinase)也是生成黑斑和雀斑的原因。

[0003] 在日常生活中我们总是暴露在活性氧(reactive oxygen)产生的有害性中,由老化引起的有害性逐渐积累且抗氧化能力逐渐减少。在常规的身体条件下,抗氧化保护系统通过酶(例如,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)等)反应和非酶(例如,多酚、类黄酮等)反应的途径来去除活性氧。因此,为了表现出抗氧化活性,需要激活超氧化物歧化酶等抗氧化酶反应,或者摄取具有抗氧化作用的非酶物质。

[0004] 积极进行了有关皮肤健康及抗氧化的机制研究,随着研究水平的发达和技术力的增加,正在进行许多用于开发具有生物化学功效、效果的材料的研究。尤其,植物来源的材料在安全性方面得到认可而被长期使用,在韩国国内的情况下,正在积极开发以利用于民间或利用于中医的植物及生药成分为主要成分的功能性材料。尤其,在利用植物来源有用物质(类胡萝卜素、酚化合物、维生素等)的出于防止皮肤老化、脱发及抗氧化等目的的化妆品领域中,植物材料备受关注。

[0005] 然而,植物特性在于,生长速度缓慢,并且植物中的有用物质仅少量存在于植物的特定器官中或者二次代谢物质的种类及含量因品种而异,即使在相同的物种内,生产性也会因季节、场所、气候、栽培条件、植物体部位等而异。并且,最近,由于《名古屋议定书》生效,因此国外原料进口面临困境。随之,尝试了通过生物技术来生产依赖于植物的有用物质(二次代谢产物)的许多研究。其中,最有效的生产法为植物细胞培养法。此方法可通过培养基和培养环境及各种诱导子(elicitor)处理来有效地生产二次代谢产物。并且,可连续稳定地大量生产植物所产生的有用物质,而不受自然环境的制约(农药、重金属污染、季节控制等),因此可以说在商业上很重要。

[0006] 积雪草 (*Centella asiatica* (L.) Urban) 为伞形科多年生草本, 主茎向侧面匍匐, 节上生根, 叶片呈鳞片。由于积雪草主要生长于炎热潮湿的地区, 因此分布于非洲马达加斯加岛、印度洋沿海地区、印度南部及马来西亚群岛, 而在韩国局限于属于热带的济州岛及南部地区的岛。积雪草提取物含有积雪草皂苷 (asiaticoside)、羟基积雪草苷 (madecassoside)、积雪草酸 (asiatic acid)、羟基积雪草酸 (madecassic acid) 等, 对伤口的治疗非常有效并抵抗痴呆及胃肠道疾病有效, 因此积雪草提取物被用作治疗疾病的原料。

[0007] 另一方面, 韩国授权专利第1739422号公开了“包含来源于植物工厂的积雪草提取物作为有效成分的皮肤改善用组合物及用于预防或治疗增殖性皮肤疾病的组合物”, 韩国授权专利第1881417号公开了“包含薄荷醇、银杏叶、芦荟、绿茶、积雪草及何首乌提取物的化妆品组合物”, 但是, 没有记载有关本发明的包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 本发明是从如上所述的要求中得出的, 本发明人确认通过植物细胞培养技术生产的积雪草不定根的提取物的氧化氮 (nitric oxide, NO) 生成抑制能力、自由基清除能力及黑色素及基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotease, MMP) 的生成抑制效果显著优于积雪草提取物, 从而完成了本发明。

[0010] 解决问题的方案

[0011] 为了解决如上所述的技术问题, 本发明提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物。

[0012] 并且, 本发明提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的皮肤外用药学组合物。

[0013] 并且, 本发明提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于预防或治疗黑色素沉着过度症的药学组合物。

[0014] 并且, 本发明提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于预防或改善黑色素沉着过度的保健功能食品组合物。

[0015] 发明的效果

[0016] 本发明的积雪草不定根提取物无细胞毒性、抗炎及抗氧化活性优秀、抑制黑色素色素及基质金属蛋白酶的生成、增进前胶原的生成的效果优异, 因此可以有效地利用于用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品或皮肤外用剂等。

附图说明

[0017] 图1为确认积雪草或积雪草不定根的水或乙醇提取物对小鼠巨噬细胞的细胞毒性的结果。nor为未处理正常细胞; NMMA为单甲基-L-精氨酸 (Mono-methyl-L-arginine); indo为吲哚美辛 (indomethacin)。

[0018] 图2为对处理脂多糖 (LPS) 的小鼠巨噬细胞处理积雪草或积雪草不定根的水或乙醇提取物, 分析氧化氮的生成水平的结果。

[0019] 图3为确认积雪草或积雪草不定根的水或乙醇提取物对小鼠黑色素瘤(melanoma)细胞的细胞毒性的结果。

[0020] 图4为对小鼠黑色素瘤细胞处理积雪草或积雪草不定根的水或乙醇提取物后,测定黑色素水平的结果。

[0021] 图5对照射紫外线的人成纤维细胞处理积雪草或积雪草不定根的水或乙醇提取物后,分析基质金属蛋白酶的生成量变化的结果,A为有关基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的结果,B为有关基质金属蛋白酶-3(MMP-3)的结果。

[0022] 图6为对照射紫外线后的人成纤维细胞处理积雪草或积雪草不定根的水或乙醇提取物后,分析前胶原的生成量的结果。

具体实施方式

[0023] 为了实现本发明的目的,本发明提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物。

[0024] 积雪草不定根(adventitious root)是指通过去除部分野生积雪草的组织并将其以无菌状态引入器内来诱植物的全能性(totipotency)形成的不定根,积雪草不定根通过预培养(seed culture)一定时间后,在生物反应器中进行培养,从而可以大量生产,通过如上所述的器内培养方法生产的积雪草不定根基本上不含有有害成分,如残留农药(例如:二嗪磷(Diazinon)、双对氯苯基三氯乙烷(DDT)、甲霜灵(Metalaxyl))或重金属(例如:铅、镉)等,因此具有在自然状态的培养过程中可能发生的病虫害及病毒感染方面安全的优点。

[0025] 在本发明一实例的用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物中,上述提取物可以为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或它们的混合溶剂提取物,优选地,可以为乙醇提取物,更优选地,相对于干燥的积雪草不定根重量,可通过添加8~12倍的60~80%(v/v)的乙醇来常温提取22~26小时,但并不限于此。

[0026] 并且,上述积雪草不定根提取物还可包括通过提取处理获得的提取液;提取液的稀释液或浓缩液;通过干燥提取液来获得的干燥物;粗纯化物;或纯化物中的一种。

[0027] 在本发明中,“美白”是指抑制、阻止或缓解皮肤色素沉着过度。皮肤色素沉着过度包括雀斑、黑斑、紫外线照射后色素沉着过度、炎症后色素沉着过度、老年黑斑、褐色斑点或寿斑等。

[0028] 在本发明中,“皱纹改善”是指抑制、阻止皮肤上生成皱纹,或者缓解已生成的皱纹。在本发明中,皱纹生成是指因胶原蛋白的减少而产生,上述胶原蛋白的减少可能是由于过度的氧化应激或紫外线照射所致。

[0029] 本发明的化妆品组合物包含具有黑色素生成抑制能力、基质金属蛋白酶生成抑制能力及前胶原合成促进能力效果的积雪草不定根的提取物作为有效成分,因此本发明的化妆品组合物是具有皮肤美白及皱纹改善功能的化妆品组合物。

[0030] 并且,本发明的上述积雪草不定根的提取物的特征在于,与积雪草提取物相比,氧化氮生成抑制能力及自由基清除能力优秀。

[0031] 在本发明一实例的化妆品组合物中,上述用于皮肤美白及皱纹改善的化妆品组合物可具有选自自由护肤水、柔肤水、爽肤水、收敛水、乳液、润肤液、保湿乳液、营养乳液、按摩霜、营养霜、眼霜、保湿霜、护手霜、精华液、营养精华液、面膜、洗面奶、卸妆水、卸妆乳液、卸

妆霜、润肤露、沐浴露、香皂及粉末组成的组中的一种剂型,但并不限于此。由这些各个剂型组成的化妆品组合物可包含对该剂型的制剂化所需的适当的各种基剂和添加物,这些成分的种类和量可以由本领域技术人员容易地选择。

[0032] 在本发明的化妆品组合物的剂型为糊剂、膏或凝胶的情况下,作为载体成分可利用动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石或氧化锌等。

[0033] 在本发明的化妆品组合物的剂型为溶液或乳浊液的情况下,作为载体成分利用溶剂、溶剂化剂或乳化、乳浊剂,例如,具有水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇油、甘油脂族酯、聚乙二醇或山梨糖醇的脂肪酸酯。

[0034] 在本发明的化妆品组合物的剂型为悬浮液的情况下,作为载体成分可利用液相稀释剂,如水、乙醇或丙二醇;悬浮剂,如乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯及聚氧乙烯山梨糖醇酐酯;微晶纤维素、偏羟基铝、膨润土、琼脂或黄芪胶等。

[0035] 本发明的化妆品组合物的剂型为含表面活性剂的清洁剂情况下,作为载体成分可利用脂肪醇硫酸盐、脂肪醇醚硫酸盐、磺基琥珀酸单酯、羟乙基磺酸盐、咪唑啉鎓衍生物、甲基牛磺酸盐、肌氨酸盐、脂肪酸酰胺醚硫酸盐、烷基酰胺甜菜碱盐、脂肪醇、脂肪酸甘油酯、脂肪酸二乙醇酰胺、植物油、亚麻碱衍生物或乙氧基化甘油脂肪酸酯等。

[0036] 在本发明的化妆品组合物的剂型为粉末或喷雾剂的情况下,作为载体成分可利用乳糖、滑石、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙或聚酰胺粉末,尤其,在其剂型为喷雾剂的情况下,还可包含推进剂,如氯氟氢烃、丙烷-丁烷或二甲醚。

[0037] 在将本发明的积雪草不定根提取物产品化成化妆品的情况下,在有效成分在短时间内停留在皮肤上的卸妆剂、清洗剂等冲洗(wash-off)型的化妆品的情况下,可包含较高浓度的本发明的积雪草不定根提取物。相反,在有效成分长时间停留在皮肤上的化妆水、乳液、面霜、精华液等免洗(leave-on)型化妆品的情况下,与冲洗型化妆品相比,包含低浓度的积雪草不定根提取物也无妨。

[0038] 本发明还提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于皮肤美白及皱纹改善的皮肤外用药学组合物。在本发明的皮肤外用药学组合物中,上述积雪草不定根提取物可以为积雪草不定根的乙醇提取物,但并不限于此。

[0039] 并且,本发明提供包含积雪草不定根提取物作为有效成分的用于预防或治疗黑色素沉着过度症的药学组合物。

[0040] 在本发明中,术语“黑色素沉着过度(hyperpigmentation)”是指在皮肤或手和脚趾甲的特定部位中黑色素的过度增加,与其他区部位相比变黑或发暗。上述黑色素沉着过度疾病包括雀斑、老年斑、肝斑、黑斑、褐色或黑色斑点、日光性色斑、蓝青色斑症(cyanic melasma)、药物使用引起的色素沉着过度、壬辰性黄褐斑(gravidic chloasma)或因擦伤和烫伤等创伤或皮肤炎症引起的炎症后色素沉着过度等,但并不限于此。

[0041] 除了有效成分之,本发明的药学组合物可包含药学上可接受的载体,这些载体通常用于制剂中,乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、海藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁及矿物油等,但并不限于此。除了上述成分之外,本发明的药学组合物还可包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂、保存剂等。当加入

上述成分时,可考虑复合使用带来的皮肤稳定性、剂型化的简便性、有效成分的稳定性。

[0042] 可以口服给药或非口服给药本发明的药学组合物,在非口服给药的情况下,可局部涂敷于皮肤、静脉内注入、皮下注入、肌肉注入、腹腔注入、经皮给药等。考虑到将本发明的药学组合物应用于治疗或预防黑色素沉着过度症,优选地,局部涂敷于皮肤上。

[0043] 本发明的药学组合物可以按照本领域技术人员容易实施的方法,通过利用药学上可接受的载体或赋形剂来制剂化,从而能够以单位用量形式制备或者掺入多用量容器中来制备。此时,剂型还可制备成注射剂、膏、贴剂、喷雾剂、软膏剂、硬膏剂、乳剂、搽剂、糊剂及泥敷剂中的一种剂型,还可包括分散剂或稳定剂。

[0044] 本发明的药学组合物当包含有效量的积雪草不定根提取物时可提供皮肤美白及皱纹改善效果。在本发明中,“有效量”是指可抑制色素沉着或者具有皱纹改善效果的提取物的量。包含本发明的组合物中的积雪草不定根提取物的有效量可根据组合物的产品化形态、将积雪草不定根的提取物适用于皮肤的方法及停留在皮肤上的时间而异。例如,在将积雪草不定根提取物产品化成药品的情况下,与产品化成平常适用于皮肤的化妆品的情况相比,可包含高浓度的积雪草不定根提取物。因此,以积雪草不定根提取物的量为基准,日剂量为0.1mg/kg至100mg/kg,优选地为30mg/kg至80mg/kg,更优选地为50mg/kg至60mg/kg,每天可给药1~6次。包含本发明的积雪草不定根提取物作为有效成分的皮肤外用药学组合物的优选的剂量可根据患者的状态及体重、疾病的程度、药物形态、给药途径及时间而异,但是可以由本领域技术人员适当地选择。

[0045] 并且,本发明提供包含积雪草不定根的提取物作为有效成分的用于预防或改善黑色素沉着过度的保健功能食品组合物。

[0046] 在将本发明的保健功能食品组合物用作食品添加剂的情况下,可直接添加上述保健功能食品组合物或与其他食品或食品成分一起使用,可根据常规方法适当使用。可根据使用目的(预防或改善)适当使用有效成分的混合量。通常,当制备食品或饮料时,相对于原料,可添加15重量份以下的本发明的保健功能食品组合物,优选地,可添加10重量份以下的量。但是,在以保健为目的长时间摄入的情况下,上述量可以在上述范围以下,由于在安全性方面没有任何问题,因此能够以上述范围以上的量使用有效成分。

[0047] 对于上述保健功能食品的种类没有特别限制。作为可添加上述保健功能食品组合物的食品例,具有肉类、香肠、面包、巧克力、糖类、快餐类、饼干类、披萨、拉面、其他面类、口香糖类、包括冰淇淋类在内的乳制品、各种汤类、饮料、茶饮料、酒精饮料及维生素复合剂等,可包括常规意义上的所有保健食品。

[0048] 并且,可将本发明的保健功能食品组合物制备成食品,尤其功能性食品。本发明的功能性食品包含制备食品时通常添加的成分,例如,包含蛋白质、碳水化合物、脂肪、营养素及调味剂。例如,在制备成饮料的情况下,除了有效成分之外,可包含碳水化合物或香味剂作为额外成分。优选地,上述天然碳水化合物为单糖(例如,葡萄糖、果糖等)、二糖(例如,麦芽糖、蔗糖等)、寡糖、多糖(例如,糊精、环糊精等)或糖醇(例如,木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等)。上述香味剂可利用天然香味剂(例如,索马甜、甜菊提取物等)和合成香味剂(例如,糖精、阿斯巴甜等)。

[0049] 除了上述保健功能食品组合物之外,还可包含各种营养剂、维生素、电解质、风味剂、着色剂、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、

防腐剂、甘油、酒精、使用于碳酸饮料中的碳酸盐等。这样上述添加的成分的比例虽并重要，但是，相对于100重量份的本发明的保健功能食品组合物，通常选自0.01重量份至0.1重量份的范围。

[0050] 以下，通过实施例来详细说明本发明。但是，下述实施例仅用于例示本发明，本发明的内容并不限定于下述实施例。

[0051] 制备例1. 积雪草不定根提取物的制备

[0052] (1) 制备积雪草不定根70%的乙醇提取物

[0053] 向10g的干燥的积雪草不定根(由忠北大学高级园艺技术开发中心提供)中加入100ml的70% (v/v) 的乙醇水溶液后，常温提取24小时，利用0.45 μ m的过滤器过滤，减压浓缩并热风干燥。

[0054] (2) 制备积雪草不定根水提取物

[0055] 向10g的干燥的积雪草不定根中加入100ml的纯净水后，常温提取24小时，利用0.45 μ m的过滤器过滤，减压浓缩并热风干燥。

[0056] (3) 制备积雪草70%的乙醇提取物

[0057] 向10g的干燥的积雪草叶(购自皮尔法伯(法国))中加入100ml的70% (v/v) 的乙醇水溶液后，常温提取24小时，利用0.45 μ m的过滤器过滤，减压浓缩并热风干燥。

[0058] (4) 制备积雪草水提取物

[0059] 向10g的干燥的积雪草叶中加入100ml的纯净水后，常温提取24小时，利用0.45 μ m的过滤器过滤，减压浓缩并热风干燥。

[0060] 实施例1. 测定细胞毒性

[0061] 测定在上述制备例1中制备的积雪草不定根及积雪草的水或乙醇提取物的细胞毒性。将用0.5 μ g/ml的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 诱发炎症反应的小鼠巨噬细胞(RAW264.7) 以 2×10^5 细胞/孔接种于96-孔板并培养24小时后，处理50 μ g/ml的单甲基-L-精氨酸、2ng/ml的吲哚美辛(Indomethacin) 及100 μ g/ml或200 μ g/ml的各个提取物试样并培养48小时后，通过进行噻唑蓝(MTT) 测试来测定细胞存活率。

[0062] 其结果如图1所示，可知积雪草或积雪草不定根提取物没有细胞毒性。

[0063] 实施例2. 抗炎活性分析

[0064] 与上述实施例1相同的方式，将用脂多糖诱发炎症反应的RAW264.7细胞接种于96-孔板并培养24小时后，分别处理积雪草或积雪草不定根的提取物试样并培养48小时，然后利用格里斯试剂(Griess reagent) 测定氧化氮的生成量。

[0065] 其结果如图2所示，可确认在单甲基-L-精氨酸(Mono-methyl-L-arginine, NMMA) 处理组中氧化氮生成没有被抑制，但在吲哚美辛处理组(indo) 通过处理脂多糖减少了增加的氧化氮生成。并且，在处理积雪草不定根的70%的乙醇提取物的组中，可确认氧化氮生成被抑制。可知使用相同的试样的积雪草不定根的水提取物、以及积雪草的水提取物及乙醇提取物均没有氧化氮生成抑制活性。

[0066] 实施例3. 抗氧化活性分析

[0067] 分析了在制备例1中制备的积雪草或积雪草不定根的70%的乙醇提取物的抗氧化活性。简单地，混合190 μ l的0.1mM的2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 和10 μ l的提取物试样后，在暗室中反应30分钟，然后在517nm下测定

吸光度,评价自由基清除能力。

[0068] 其结果,如下述表1所示,确认积雪草不定根的70%的乙醇提取物的2,2-二苯基-1-苦基肼自由基清除活性比积雪草70%的乙醇提取物强。

[0069] 表1

[0070] 2,2-二苯基-1-苦基肼自由基清除活性

[0071]	积雪草不定根乙醇提取物	积雪草乙醇提取物
IC ₅₀ (μg/ml)	18.5±4.6	184.0±9.8

[0072] 实施例4. 评价美白功效

[0073] 为了评价在制备例1中制备的提取物的黑色素合成抑制效果,使用含10%的胎牛血清(FBS)的DMEM培养基培养小鼠黑色素瘤细胞(B-16melanoma cell),以 3×10^5 细胞/孔接种于6-孔板中并培养24小时后,处理50μg/ml的曲酸(kojic acid)或50μg/ml、100μg/ml及200μg/ml浓度的各提取物并培养三天。培养后,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗2次,对细胞处理胰蛋白酶后,从培养器中去下细胞,并通过离心来获得细胞沉淀物。向提取的黑色素中加入1ml的1N的氢氧化钠溶液,煮约10分钟以溶解黑色素,在400nm下测定吸光度。通过使用合成黑色素制成的标准直线来求出黑色素量,通过利用对照组的黑色素量的百分比来计算实验组的黑色素量。并且,通过噻唑蓝测试分析对B-16细胞的提取物的毒性。

[0074] 其结果确认,积雪草或积雪草不定根的水提取物及70%的乙醇提取物均没有细胞毒性(图3),积雪草及积雪草不定根的水提取物没有黑色素合成抑制能力。但是,积雪草不定根的70%的乙醇提取物在200μg/m、100μg/m及50μg/ml浓度处理条件下,分别具有78.8%、65.1%及46.8%的黑色素合成抑制效果,积雪草70%的乙醇提取物在200μg/ml、100μg/ml及50μg/ml浓度处理条件下,分别具有29.1%、22.5%及0%的黑色素合成抑制效果,可确认积雪草不定根的乙醇提取物的和色素合成抑制效果显著优于积雪草乙醇提取物(图4)。

[0075] 并且,分析了积雪草不定根的乙醇提取物和积雪草乙醇提取物的酪氨酸酶活性抑制能力。简单地,混合220μl的0.1M的磷酸钠缓冲液和20μl的200μg/ml的提取物试样后,添加40μl的1.5mM的L-酪氨酸、20μl的制备成1500unit/ml的蘑菇酪氨酸酶(mushroom tyrosinase),在37℃的温度下反应15分钟后,在490nm下测定吸光度,从而评价生成的多巴色素(dopachrome)的量。其结果如表2所示,可确认与积雪草70%的乙醇提取物相比,积雪草不定根70%的乙醇提取物的酪氨酸酶活性抑制能力具有显著差异。

[0076] 通过上述的结果,积雪草不定根的70%的乙醇提取物抑制黑色素色素的合成效果优秀,但是可以推断抑制酪氨酸酶的活性的效果是由其他抑制引起的,而不是由酶活性抑制引起的效果。

[0077] 表2

[0078] 酪氨酸酶抑制活性

[0079]	积雪草不定根乙醇提取物	积雪草乙醇提取物
酪氨酸酶活性抑制能力 (%)	26.6±1.7	30.6±11.5

[0080] 实施例5. 评价皱纹改善功效

[0081] 为了确认在制备例1中制备的提取物的皱纹改善功效,分析了基质金属蛋白酶-1(matrix metalloprotease-1,MMP-1)及基质金属蛋白酶-3蛋白合成抑制效果和前胶原蛋白的合成促进效果。简单地,在40mm细胞培养皿中加入2ml的DMEM培养液,以约 1.2×10^5 细胞/皿的浓度接种人成纤维细胞(fibroblast cell)后,在37℃的温度、5%的二氧化碳环境下培养24小时。随后,以 $144 \text{mJ}/\text{cm}^2$ 条件照射中波紫外线(UVB)后,用各提取物试样的培养基交换后培养3天。随后,回收细胞培养液,于4℃的温度下以7500rpm的条件离心5分钟后回收上清液,使用人体总基质金属蛋白酶-1(Human total MMP-1)/人体总基质金属蛋白酶-3试剂盒(美国明尼苏达州明尼阿波利斯市安迪生物(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA))确认基质金属蛋白酶-1和基质金属蛋白酶-3的蛋白质变化量的变化。

[0082] 其结果,与紫外线未处理组相比,紫外线照射处理的人成纤维细胞的基质金属蛋白酶-1蛋白质生成量增加约两倍,确认以 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度处理积雪草不定根的乙醇提取物或积雪草乙醇提取物后,基于紫外线照射处理的基质金属蛋白酶-1蛋白质的增加的生成量分别减少58.6%及23.1%水平,尤其,可知积雪草不定根的乙醇提取物具有与紫外线未处理组具有类似的水平,由此可知,积雪草不定根的乙醇提取物可以有效地抑制基质金属蛋白酶-1的生成(图5的A部分)。针对于基质金属蛋白酶-3蛋白质的生成量,在处理 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的积雪草不定根的乙醇提取物或积雪草乙醇提取物的条件下,可观察到分别具有36.9%及22.3%的基质金属蛋白酶-3蛋白质生成抑制效果(图5的B部分)。尤其,虽使用了相同的积雪草不定根,但是在用水提取的情况下,观察到未确认这种基质金属蛋白酶蛋白质的生成抑制效果,可通过这种结果确认,本发明的积雪草不定根的乙醇提取物可通过有效地抑制引起皱纹的基质金属蛋白酶-1和基质金属蛋白酶-3蛋白质的生成来有效地预防或改善皱纹。

[0083] 并且,为了确认本发明的各提取物对胶原蛋白生成的影响,以与确认上述基质金属蛋白酶蛋白质的生成抑制效果的实验条件相同的方式准备细胞,并利用I型前胶原C肽EIA(Procollagen Type I C Peptide EIA)试剂盒(日本志贺宝生物工程(Takara, Shiga, Japan))确认照射中波紫外线的细胞的培养液中I型前胶原蛋白的变化量的变化。

[0084] 其结果确认,与紫外线未处理组相比,紫外线照射处理的人成纤维细胞的I型前胶原蛋白的生成量显著减少,在处理 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的积雪草不定根的乙醇提取物或积雪草乙醇提取物的条件下,这样减少的I型前胶原蛋白的生成量分别增加319.4%和266.2%(图6)。如基质金属蛋白酶蛋白质的生成抑制能力实验结果所示,在积雪草不定根的水提取物中未确认到前胶原的生成增进效果。通过上述的结果可确认,本发明的积雪草不定根的70%的乙醇提取物促进I型前胶原的生成,通过抑制作为胶原蛋白分解酶的基质金属蛋白酶-1和基质金属蛋白酶-3的表达的作用,具有有效预防皱纹生成、改善所生成的皱纹的效果。

[0085] 剂型例1. 柔肤水(护肤水)的制备

[0086] 如下所示,根据常规的方法由下述表的组成制备含在制备例1-(1)中获得的积雪草不定根乙醇提取物的柔肤水(护肤水)。

[0087] 表3

[0088] 柔肤水组成

成分	含量(单位:重量百分比)
积雪草不定根乙醇提取物	2.0

甘油	5.0
1,3-丁二醇	3.0
聚乙二醇1500	1.0
尿囊素	0.1
DL-泛醇	0.3
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)	0.02
二苯甲酮-9	0.04
透明质酸钠	5.0
乙醇	10.0
辛基十二烷醇聚醚-16	0.2
聚山梨酯20	0.2
防腐剂、香、色素	微量
蒸馏水	剩余量
合计	100

[0090] 剂型例2. 营养水(乳液)的制备

[0091] 如下所示,根据常规的方法由下述表的组成制备含在制备例1-(1)中获得的积雪草不定根乙醇提取物的营养水(乳液)。

[0092] 表4

[0093] 营养水组成

成分	含量(单位:重量百分比)
积雪草不定根乙醇提取物	2.0
硬脂酸甘油酯 SE	1.5
硬脂醇	1.5
羊毛脂	1.5
聚山梨酯 60	1.3
[0094] 硬脂酸山梨糖醇	0.5
固化植物油	1.0
矿物油	5.0
海蛟油	3.0
三辛酸甘油酯	2.0
二甲硅油	0.8
醋酸生育醇酯	0.5

[0095]	羧基乙烯基聚合物	0.12
	甘油	5.0
	1, 3-丁二醇	3.0
	透明质酸钠	5.0
	三乙醇胺	0.12
	防腐剂、香、色素	微量
	蒸馏水	剩余量
	合计	100

[0096] 剂型例3. 营养霜的制备

[0097] 如下所示, 根据常规的方法由下述表的组成制备含在制备例1-(1)中获得的积雪草不定根乙醇提取物的营养霜。

[0098] 表5

[0099] 营养霜组成

成分	含量(单位:重量百分比)
积雪草不定根乙醇提取物	2.0
亲油性单硬脂酸酯	2.0
鲸蜡硬脂醇	2.2
硬脂酸	1.5
蜂蜡	1.0
聚山梨酯60	1.5
硬脂酸山梨糖醇	0.6
固化植物油	1.0
海蛟油	3.0
矿物油	5.0
三辛酸甘油酯	5.0
二甲硅油	1.0
硅酸钠镁	0.1
甘油	5.0
甜菜碱	3.0
三乙醇胺	1.0
透明质酸钠	4.0
防腐剂、香、色素	微量
蒸馏水	剩余量
合计	100

[0101] 剂型例4. 精华液的制备

[0102] 如下所示, 根据常规的方法由下述表的组成制备含在制备例1-(1)中获得的积雪草不定根乙醇提取物的精华液。

[0103] 表6

[0104] 精华液组成

[0105]

成分	含量(单位:重量百分比)
积雪草不定根乙醇提取物	2.0
甘油	10.0
甜菜碱	5.0
特聚乙二醇1500	2.0
尿囊素	0.1
DL-泛醇	0.3
乙二胺四乙酸二钠	0.02
二苯甲酮-9	0.04
羟乙基纤维素	0.1
透明质酸钠	8.0
羧基乙烯基聚合物	0.2
三乙醇胺	0.18
辛基十二烷醇	0.3
辛基十二烷醇聚醚-16	0.4
乙醇	6.0
防腐剂、香、色素	微量
蒸馏水	剩余量
合计	100

噻唑蓝

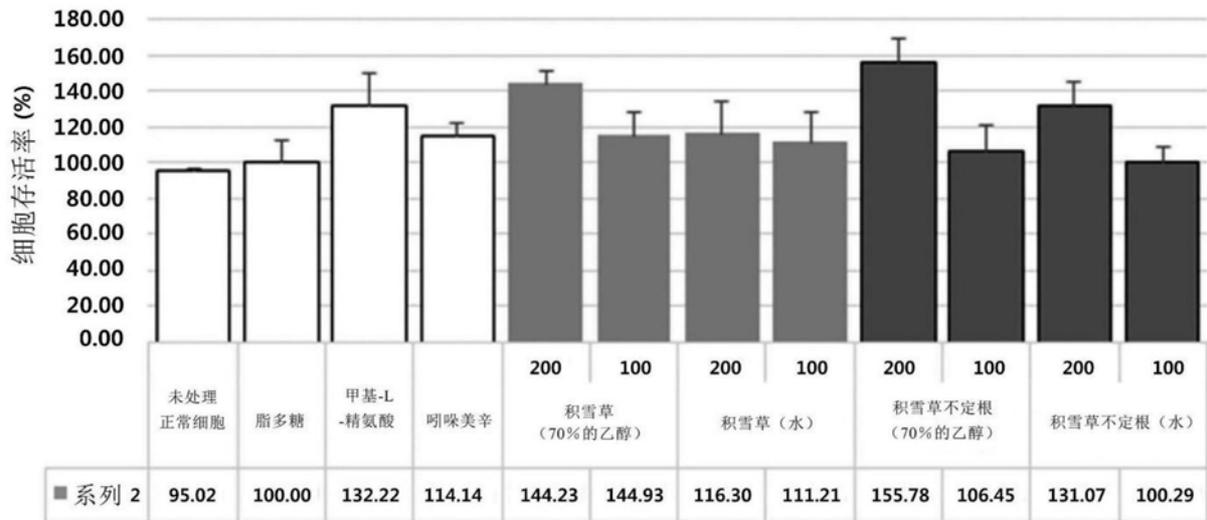


图1

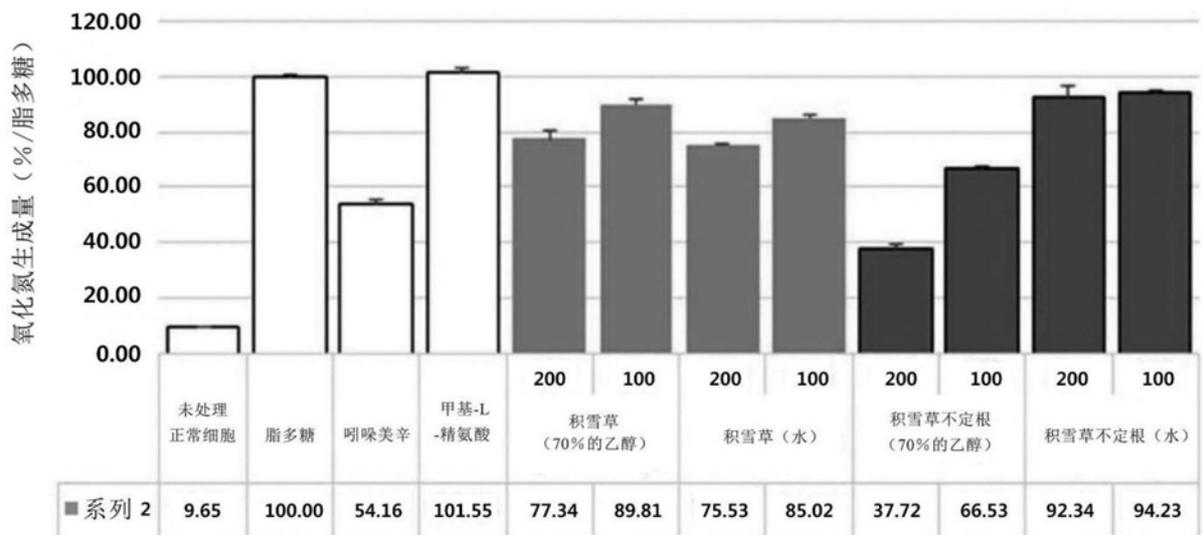


图2

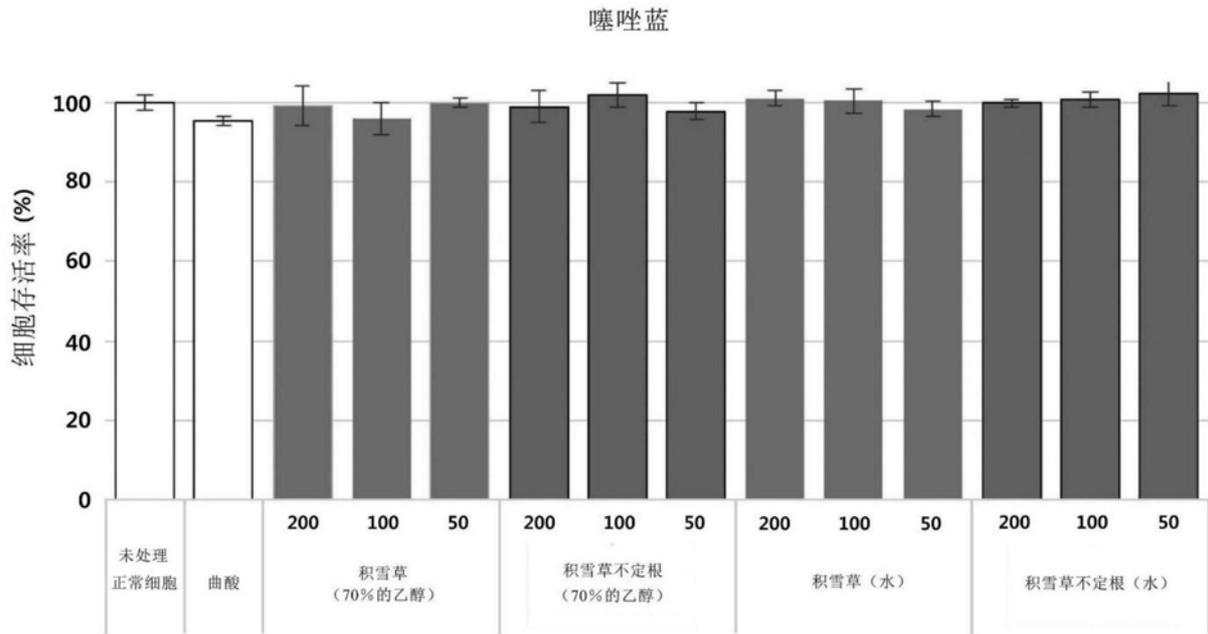


图3

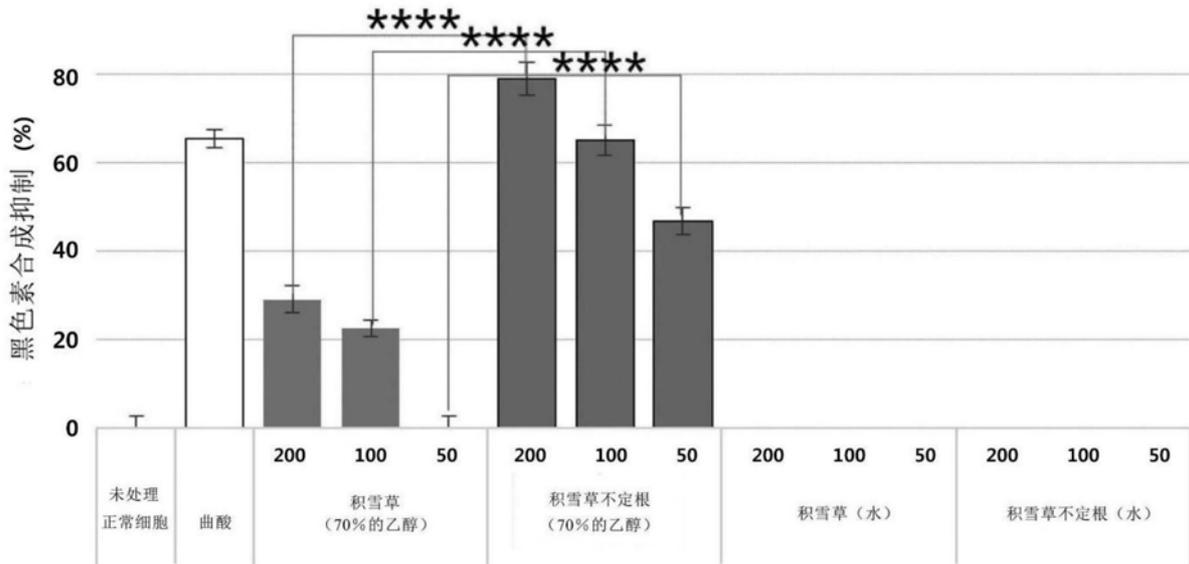


图4

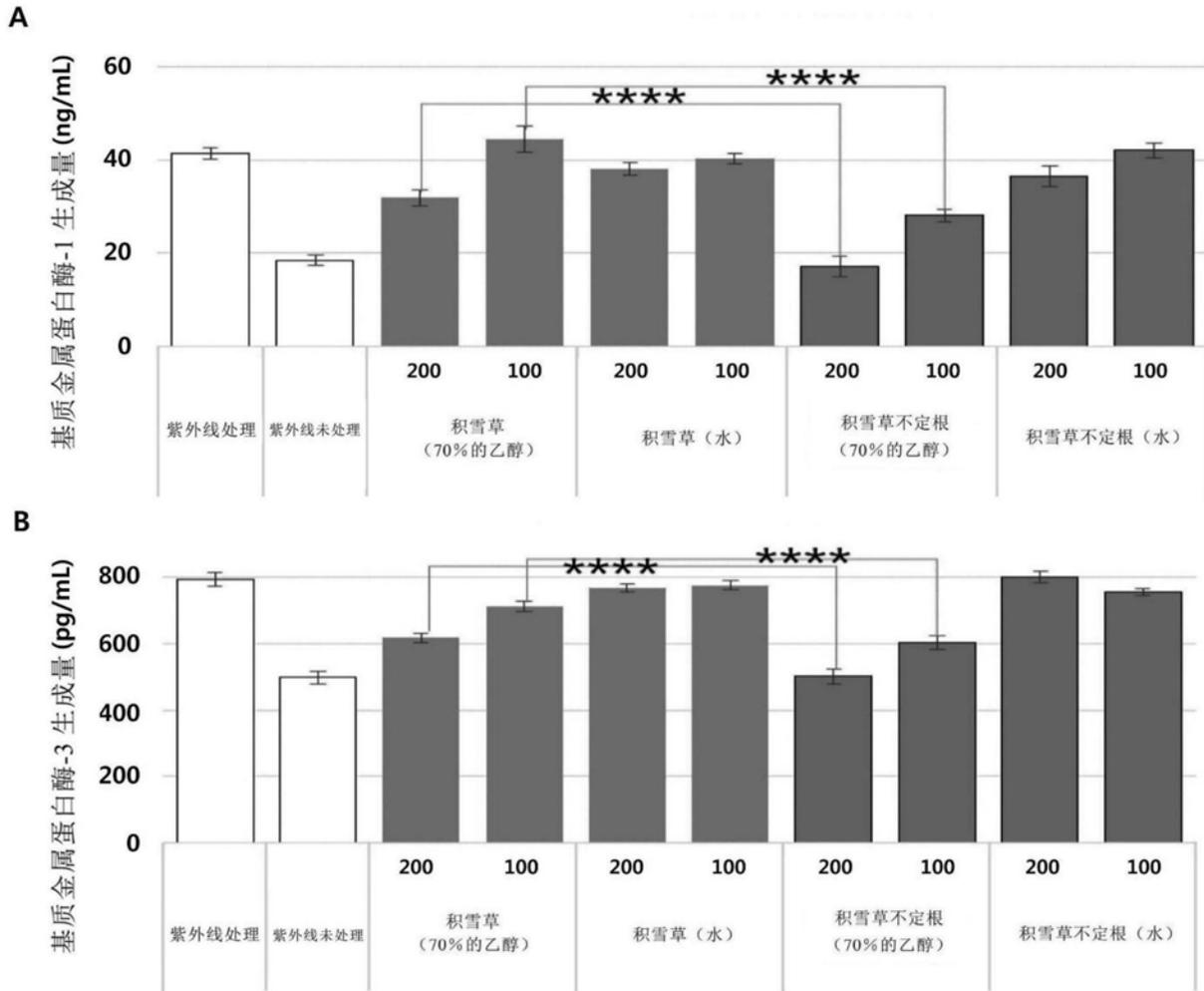


图5

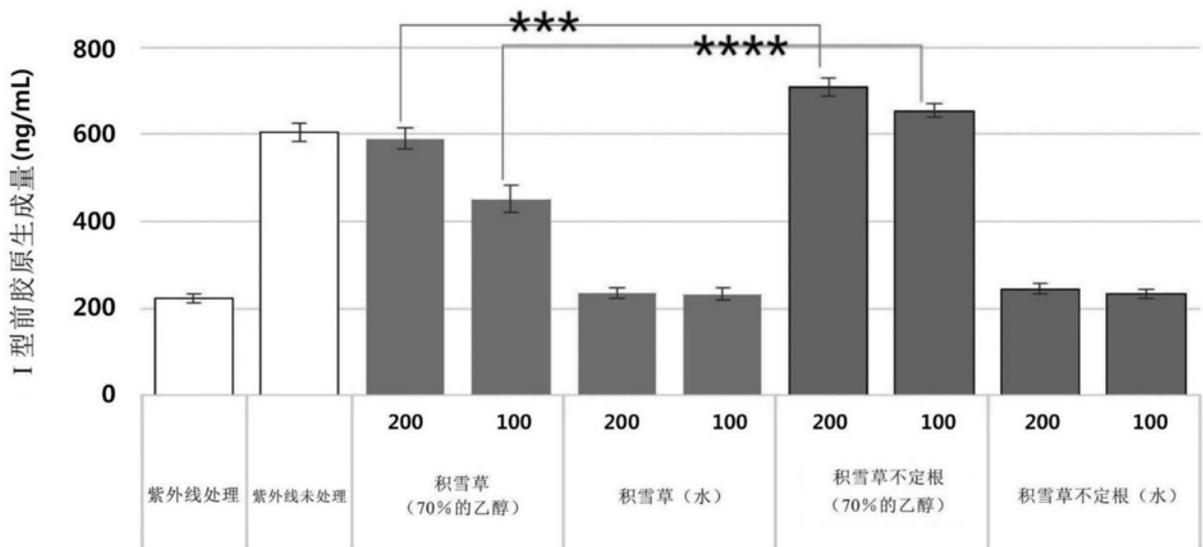


图6