



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103547253 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201280019509. X

A61Q 19/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 21

(30) 优先权数据

13/032, 187 2011. 02. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/025899 2012. 02. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/148527 EN 2012. 11. 01

(71) 申请人 阿克佐诺贝尔化学国际公司

地址 荷兰阿默斯福特

(72) 发明人 M·克格诺夫 O·杜瓦-克格诺夫

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 8/97 (2006. 01)

A61Q 19/00 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书45页 附图1页

(54) 发明名称

生物活性植物化妆品组合物及其生产方法

(57) 摘要

本发明涉及来源于植物细胞汁的膜和细胞浆级分的生物活性植物化妆品组合物。本发明也涉及制备这些生物活性植物化妆品组合物的方法和这些组合物在多种化妆品制剂中的用途和作为局部皮肤化妆品应用的用途。

1. 生物活性植物化妆品组合物,所述组合物包含:

来源于从新鲜植物生物质提取的细胞汁的细胞浆级分滤液,所述细胞浆级分滤液具有抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,和/或抗氧化剂和细胞生长刺激活性,其中所述新鲜植物生物质来自植物源,所述植物源选自自由莲花(莲(*Nelumbo nucifera*))和红三叶草(红车轴草(*Trifolium pratense*))组成的组;和

稳定剂,其中所述细胞生长刺激活性是由于至少一种细胞类型的增殖刺激,

其中根据以下步骤所述细胞浆级分滤液来源于细胞汁:

提供植物细胞汁,所述植物细胞汁是已从新鲜植物生物质中提取的;

在有效将植物细胞汁分离为膜级分和细胞汁上清的条件下处理植物细胞汁;

在有效将细胞汁上清分离为细胞质级分和细胞浆级分的条件下加工细胞汁上清;和

在有效得到细胞浆级分滤液的条件下精炼细胞浆级分,其中所述精炼包括对细胞浆级分进行温度处理步骤以得到凝结的细胞浆级分,和澄清凝结的细胞浆级分以得到细胞浆级分滤液。

2. 根据权利要求1的生物活性植物化妆品组合物,其中所述稳定剂选自防腐剂和抗氧化剂组成的组。

3. 根据权利要求2的生物活性植物化妆品组合物,其中所述防腐剂选自山梨酸钾、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸甲酯钠和柠檬酸组成的组。

4. 根据权利要求2的生物活性植物化妆品组合物,其中所述抗氧化剂是偏亚硫酸氢钠。

5. 根据权利要求2的生物活性植物化妆品组合物,其中所述抗氧化剂活性选自超氧化物清除活性和嗜中性粒细胞呼吸爆发抑制活性组成的组。

6. 根据权利要求1的生物活性植物化妆品组合物,其中所述细胞浆级分滤液包含所述生物活性植物化妆品组合物的约1和约10之间的重量百分比。

7. 根据权利要求6的生物活性植物化妆品组合物,其中所述生物活性植物化妆品组合物具有范围为约50和约190 μg 干物质/ml之间的 ICR_{50} 值的超氧化物清除效力,其中所述 ICR_{50} 值代表抑制50%的细胞色素C还原所需的在细胞浆中含有的干物质的浓度。

8. 根据权利要求1的生物活性植物化妆品组合物,其中所述细胞浆级分滤液具有范围为约1.0和125 μg 干物质/ml之间的细胞生长刺激效力。

9. 根据权利要求8的生物活性植物化妆品组合物,其中所述细胞浆级分滤液具有约110和190%之间的NRU值,其中所述NRU值代表细胞活力。

10. 根据权利要求1的生物活性植物化妆品组合物,其中所述生物活性植物化妆品组合物具有引起来自佛波醇十四酸酯乙酸酯刺激的嗜中性粒细胞的呼吸爆发的双相调节的能力,在于所述组合物以约1.0和5.0 μg 干物质/ml之间抑制所述呼吸爆发,并且以约120和180 μg 干物质/ml之间刺激所述呼吸爆发。

11. 根据权利要求1的生物活性植物化妆品组合物,其中所述生物活性植物化妆品组合物包含与表38或表39中所示特征基本相同的特征。

12. 适于对哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂,所述化妆品制剂包含化妆可用的载体和化妆有效量的根据权利要求1的生物活性植物化妆品组合物。

13. 根据权利要求12的化妆品制剂,其中所述化妆可用的载体选自亲水霜基底、亲

水乳液基底、亲水表面活性剂基底、疏水霜基底、疏水乳液基底,和疏水表面活性剂基底组成的组。

14. 根据权利要求 12 的化妆品制剂,其中所述生物活性植物化妆品组合物以范围为化妆品制剂总重量的约 0.001%和约 95%之间的量存在。

15. 根据权利要求 1 的生物活性植物化妆品组合物,其中所述植物源是莲花(莲(*Nelumbo nucifera*))。

16. 根据权利要求 1 的生物活性植物化妆品组合物,其中所述植物源是红三叶草(红车轴草(*Trifolium pratense*))。

17. 根据权利要求 12 的化妆品制剂,其中所述植物源是莲花(莲(*Nelumbo nucifera*))。

18. 根据权利要求 12 的化妆品制剂,其中所述植物源是红三叶草(红车轴草(*Trifolium pratense*))。

19. 制备生物活性植物化妆品组合物的方法,所述方法包括:

提供植物细胞汁,所述植物细胞汁是已从新鲜植物生物质提取的,其中所述新鲜植物生物质来自植物源,所述植物源选自莲花(莲(*Nelumbo nucifera*))和红三叶草(红车轴草(*Trifolium pratense*))组成的组;

在有效将植物细胞汁分离为膜级分和细胞汁上清的条件下处理植物细胞汁;

在有效将细胞汁上清分离为细胞质级分和细胞浆级分的条件下加工细胞汁上清;

在有效得到细胞浆级分滤液的条件下精炼细胞浆级分,所述细胞浆级分滤液具有抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,和/或抗氧化剂和细胞生长刺激活性,其中所述精炼包括对细胞浆级分进行温度处理步骤以得到凝结的细胞浆级分,和澄清凝结的细胞浆级分以得到细胞浆级分滤液;和

在有效得到稳定的生物活性植物化妆品组合物的条件下使细胞浆级分滤液稳定化,所述生物活性植物化妆品组合物展示出所述抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,或抗氧化剂和细胞生长刺激活性。

20. 根据权利要求 19 的方法,其中所述处理包括:

使植物细胞汁凝结以得到凝结的细胞汁混合物,和
将凝结的细胞汁分离为膜级分和细胞汁上清。

21. 根据权利要求 20 的方法,其中所述凝结包括:

使植物细胞汁去稳定化以得到凝结的细胞汁混合物,其中所述去稳定化是通过热处理、电膜处理、化学处理和/或其组合实现的。

22. 根据权利要求 21 的方法,其中所述热处理包括:

将植物细胞汁加热至诱导膜级分凝结所需的热处理温度,和
将经加热的细胞汁冷却至有效允许所述膜级分与所述细胞汁上清定量分离的温度。

23. 根据权利要求 22 的方法,其中所述加热在 45 至 70 摄氏度进行。

24. 根据权利要求 22 的方法,其中所述冷却在 30 至 45 摄氏度进行。

25. 根据权利要求 20 的方法,其中所述分离通过过滤或离心进行。

26. 根据权利要求 19 的方法,其中所述加工包括:

对细胞汁上清进行细胞质级分沉淀步骤以得到包含细胞质级分和细胞浆级分的细胞

质 / 细胞浆混合物, 和

分离细胞质级分与细胞浆级分。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述细胞质级分沉淀步骤通过等电滴定、电渗析和 / 或其组合进行。

28. 根据权利要求 27 的方法, 其中所述等电滴定包括:

将细胞汁上清的 pH 调节至约 2.5 和 6.5 之间。

29. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述分离通过过滤或离心进行。

30. 根据权利要求 19 的方法, 其中所述温度处理步骤包括:

将细胞浆级分加热至诱导细胞浆级分内的凝结所需的加热温度, 和
将细胞浆级分冷却至有效允许进一步定量分离所述细胞浆级分滤液的温度。

31. 根据权利要求 30 的方法, 其中所述加热温度是 80 至 95 摄氏度。

32. 根据权利要求 30 的方法, 其中所述冷却是冷却到至少低至约 15 摄氏度的温度。

33. 根据权利要求 19 的方法, 其中所述澄清通过过滤或离心进行。

34. 根据权利要求 33 的方法, 其中所述过滤包括:

真空过滤凝结的细胞浆级分以得到所述细胞浆级分滤液。

35. 根据权利要求 19 的方法, 所述方法还包括:

在所述精炼前立即将细胞浆级分的 pH 调节至约 3.0 至 4.0。

36. 根据权利要求 19 的方法, 其中所述稳定化包括:

在至少一种防腐剂和至少一种抗氧化剂的混合物中孵育所述细胞浆级分滤液以得到稳定的生物活性植物化妆品组合物。

37. 根据权利要求 36 的方法, 其中所述防腐剂选自山梨酸钾、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸甲酯钠, 和柠檬酸组成的组。

38. 根据权利要求 36 的方法, 其中所述抗氧化剂是偏亚硫酸氢钠。

39. 根据权利要求 19 的方法, 其中所述植物源是莲花 (莲 (Nelumbo nucifera))。

40. 根据权利要求 19 的方法, 其中所述植物源是红三叶草 (红车轴草 (Trifolium pratense))。

41. 通过根据权利要求 19 的方法制备的稳定的生物活性植物化妆品组合物。

生物活性植物化妆品组合物及其生产方法

与相关申请的交叉引用

[0001] 此申请是在 2008 年 5 月 7 日提交的美国专利申请系列号 12/116,924 的部分继续案,所述美国专利申请系列号 12/116,924 是在 2003 年 1 月 24 日提交的美国专利申请系列号 10/351,910,在 2008 年 10 月 28 日公布的现在的美国专利号 7,442,391 的分案,所述美国专利号 7,442,391 要求在 2002 年 1 月 25 日提交的美国临时专利申请序列号 60/351,886 的优先权益,其公开以其整体引入本文作为参考。

发明领域

[0002] 本发明涉及生物活性植物化妆品组合物及其生产方法及其用途。

发明背景

[0003] 在过去几十年间,化妆品工业已接受在多种化妆品制剂和产品中使用植物和植物产品。尽管此趋势预计将持续,就需要更精炼和质量更高的植物成分,所述成分一致地展示对化妆品工业和消费者有吸引力的特征。这些有吸引力的生物活性特征中的一些包括抗炎活性和抗氧化剂活性。着色、安全性、相容性和延长的货架期也是来源于植物成分的化妆品制剂的有价值的特征。

[0004] 化妆品工业已整体加强了对开发和销售“天然”化妆品制剂的支持力度,所述化妆品制剂使用目前工业上现有的多种单一或掺合的植物成分。此方法与基于合成成分的方法不同,在于允许化妆品工业从原料成分开发具有一致的产品完整性、性能和保质期的化妆品。使用植物成分的一大主要阻碍是成分,特别是有关生物活性植物成分的性能和稳定性的不一致性。现在使用的作为化妆品制剂成分的许多生物活性植物化妆品成分展示了效力丧失、气味偏差、不想要的着色变深和不理想的沉淀。这些负面属性增加了从生物活性植物成分制造的最最终产品相关的微生物污染和增殖、稳定性和安全性考虑的风险。

[0005] 为了保证质量、安全性和一致性,化妆品工业对于用于化妆品制剂的所有引入原料已开发和实施了多种标准操作程序和严格的规范控制。大多数(如果不是全部)现有的植物提取物不能遵从化妆品工业日益增加的控制和一致性参数。目前的植物提取方法限制了产品规范参数,留下许多质量、性能和相容性的可变窗口。另外,现有的提取方法不能传递在植物细胞内存在的全部活性谱。因此,由于用于生物活性植物化妆品成分的提取方法的不足,不能实现基于植物的化妆品制剂的全部潜能。

[0006] 用于从植物中提取生物活性成分的许多现有方法涉及对植物组织或对该组织中含有的目的生物活性成分,或对二者均有害的技术。此外,许多现有的提取和分离方法得到含有生物或化学污染物的粗植物提取物,所述污染物能够引起生物活性效力的丧失、增加的细胞毒性和缩短的货架期。此外,为了得到更精炼的植物提取物,现有的提取方法经常需要使用苛刻的化学溶剂。

[0007] 因此,存在对用于提取生物活性植物组合物的方法的需要,所述方法保留组合物的生物活性并从不同批次中得到一致的产品。此外,在化妆品工业中需要能够满足有关货架期、细胞毒性、质量和性能的工业标准的植物组合物。

[0008] 本发明涉及克服本领域的这些缺陷。

发明概述

[0009] 本发明涉及生物活性植物化妆品组合物,其包括(1)来源于从新鲜植物生物质提取的细胞汁的膜级分和(2)稳定剂。膜级分具有抗蛋白水解活性,细胞生长抑制活性,和/或抗蛋白水解和细胞生长抑制活性。抗蛋白水解活性是由于至少一种蛋白酶的抑制,并且细胞生长抑制活性是由于至少一种细胞类型的增殖抑制。

[0010] 本发明也涉及适于对哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂。所述生物活性植物化妆品制剂包括化妆可用的载体和化妆有效量的上述生物活性植物化妆品组合物。

[0011] 本发明也涉及抑制哺乳动物皮肤组织中的抗炎活性的方法。此方法涉及对皮肤组织应用有效增强皮肤组织中的抗蛋白水解活性的量的上述生物活性植物化妆品组合物。

[0012] 本发明也涉及使哺乳动物皮肤组织中的细胞紊乱正常化的方法。此方法涉及对皮肤组织应用有效抑制不想要的皮肤细胞过度增殖的量的上述生物活性植物化妆品组合物。

[0013] 本发明也涉及制备生物活性植物化妆品组合物的方法,其涉及提供已从新鲜植物生物质提取的植物细胞汁。然后在有效将其分离为膜级分和细胞汁上清的条件下处理植物细胞汁。在有效得到稳定的生物活性植物化妆品组合物的条件下转化膜级分,所述生物活性植物化妆品组合物展示抗蛋白水解,细胞生长抑制活性,和/或抗蛋白水解和细胞生长抑制活性,其中抗蛋白水解活性是由于至少一种蛋白酶的抑制,并且细胞生长抑制活性是由于至少一种细胞类型的增殖抑制。

[0014] 本发明也涉及由上面刚刚描述的方法制备的生物活性植物化妆品组合物。

[0015] 本发明也涉及适于对哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂。所述制剂包括化妆可用的载体和化妆有效量的上面刚刚描述的生物活性植物化妆品组合物。

[0016] 本发明也涉及抑制哺乳动物皮肤组织中的抗炎活性的方法,所述方法通过对皮肤组织应用有效增强皮肤组织中的抗蛋白水解活性的量的上述生物活性植物化妆品组合物。

[0017] 本发明还涉及使哺乳动物皮肤组织中的细胞紊乱正常化的方法,涉及对皮肤组织应用有效抑制不想要的皮肤细胞过度增殖的量的具有细胞生长抑制活性的生物活性植物化妆品组合物。

[0018] 本发明也涉及包含由上述方法制备的膜级分的生物活性植物化妆品组合物。

[0019] 本发明也涉及生物活性植物化妆品组合物,其包括(1)来源于从新鲜植物生物质提取的细胞汁的细胞浆(cell serum)级分,其中所述细胞浆级分具有抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,和/或抗氧化剂和细胞生长刺激活性,和(2)稳定剂。所述细胞生长刺激活性是由于至少一种细胞类型的增殖刺激。

[0020] 本发明也涉及适于对哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂,其包括化妆可用的载体和化妆有效量的上面刚刚描述的生物活性植物化妆品组合物。

[0021] 本发明还涉及增强哺乳动物皮肤组织中的抗氧化剂活性的方法,所述方法涉及对哺乳动物皮肤组织应用有效增加皮肤组织中的抗氧化剂活性的量的上述生物活性植物化妆品制剂。

[0022] 本发明也涉及刺激哺乳动物皮肤组织中的细胞增殖的方法,所述方法涉及对皮肤组织应用有效刺激皮肤组织中的成纤维细胞的增殖的量的上述生物活性植物化妆品制剂。

[0023] 本发明也涉及制备生物活性植物化妆品组合物的方法,所述方法涉及提供已从新

鲜植物生物质提取的植物细胞汁。然后在有效将其分离为膜级分和细胞汁上清的条件下处理植物细胞汁。在有效将细胞汁上清分离为细胞质级分和细胞浆级分的条件下加工细胞汁上清。在有效得到细胞浆级分滤液的情况下精炼细胞浆级分。在有效得到稳定生物活性植物化妆品组合物的条件下稳定细胞浆级分滤液,所述生物活性植物化妆品组合物展示抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,或抗氧化剂和细胞生长刺激活性。

[0024] 本发明也涉及由上面刚刚描述的方法制备的稳定的生物活性植物化妆品组合物。

[0025] 本发明也涉及适于对哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂,其包括化妆可用的载体和化妆有效量的由上述方法制备的生物活性植物化妆品组合物。

[0026] 本发明也涉及增强哺乳动物皮肤组织中的抗氧化剂活性的方法。此方法涉及对皮肤组织应用有效增加皮肤组织中的抗氧化剂活性的量的上述生物活性植物化妆品组合物。

[0027] 本发明还涉及刺激哺乳动物皮肤组织中的细胞增殖的方法。此方法涉及对皮肤组织应用有效刺激皮肤组织中的成纤维细胞的增殖的量的上述生物活性植物化妆品组合物。

[0028] 用于制备生物活性植物化妆品组合物的方法相比现有方法的优势在于,其得到的植物提取物捕获了植物细胞中含有的全部活性谱。然后能够将这些提取物分离为细胞浆或膜组分,同时仍然保持每种组分内含有的生物活性。此外,根据本发明的方法生产的组合物具有比其他传统植物提取物可证明的对皮肤更安全的细胞毒性谱。另外,本发明的组合物满足化妆品工业的微生物要求。因此,由于一致性、质量、安全性、货架期和有关抗炎和抗氧化剂能力的显著的生物活性效力,本发明的生物活性植物化妆品组合物是现有的植物化妆品成分的显著改进。

[0029] 本发明的生物活性植物化妆品组合物展示了对化妆品工业有价值的抗炎和抗氧化剂活性。此外,生物活性植物化妆品组合物的细胞毒性谱符合化妆品成分的工业标准,并展示了作为局部皮肤化妆品有利水平的细胞增殖刺激活性和一定的细胞生长抑制活性。本发明的制备生物活性植物化妆品成分的方法可用于多种植物以得到一致、稳定和高质量的生物活性植物化妆品组合物。

[0030] 本发明的生物活性植物化妆品组合物满足有关化妆品原料成分的微生物要求的工业标准。工业标准要求所有活性和非活性成分(即化妆品制剂的所有赋形剂)不是其在化妆品产品的完成的制剂组合物中的贡献。通常,这些完成的制剂组合物具有防腐系统,所述系统预防可能对产品的完整性有风险的微生物污染。在检测防腐系统的保护强度的一个工业使用标准中,对产品进行 28 天的挑战试验,在此期间在产品中接种微生物,观察所述产品是否经受住这些处理,不被污染。另外,在化妆品工业中,详细检查每种成分以确保微生物水平不过高以至于当产品没有最佳保藏时导致产品后续污染或对产品的货架期构成危险。

[0031] 特别地,工业标准统计学“在化妆品领域中活性成分的微生物要求规定,可接受每克或每毫升最高 100 个微生物的总微生物计数。此外样品(10g)必须不含大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、假单胞菌属物种(*Pseudomonas* sp.) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)”(G. A. Nowak, “Cosmetic Preparations,” Verlag fur Chem., Augsburg, 1:126(1985),其全部公开内容引入本文作为参考)。本发明的生物活性植物化妆品组合物满足上述要求,并且因此对完成的化妆品制剂组合物不构成风险。

[0032] 本发明的生物活性植物化妆品组合物具有高度有价值的关于皮肤的生物活性属性,包括,例如抗炎和抗氧化剂活性,以及细胞增殖刺激特征。众所周知,在新生和死亡的皮肤细胞之间存在平衡。在年轻和健康的皮肤中可见皮肤的最佳状态(即通常在年龄 25 岁以下的人中可见)。在此年龄以前,皮肤细胞处于调控状态并处于良好平衡的更新系统;从最深的基底层长出,并最终增殖(即,从皮肤深层上升)至顶部(即我们肉眼可见的层)。此细胞流出的平衡是更新平衡的一部分。随着成年人的衰老此平衡丧失,在新细胞长出后增殖速率变慢。增加或刺激细胞增殖的概念是基于恢复在“较年轻”皮肤中可见的最佳平衡。这已导致对细胞增殖刺激物例如类视黄醇和 AHA(α -羟基酸)的关注。这些成分基本上通过刺激作用模式增加增殖率,由于加速的细胞增殖导致更平滑、看起来更年轻的皮肤。本发明的生物活性植物化妆品组合物,特别是来源于细胞浆级分的组合物,展示了刺激细胞增殖的能力。

[0033] 在更复杂的方式中,增加的皮肤增殖是伤口愈合和皮肤病况的关键。在某些皮肤病况中,皮肤增殖倾向于过度增殖状态。这些病况近似并发展为疾病态,使其自身在皮肤上显现。例如牛皮癣、湿疹和头皮屑的病况都是过度增殖的病症。于是,皮肤细胞生长抑制剂是明显和建议的减缓增殖速率的方法,以使速率正常化。多种本发明的生物活性植物化妆品组合物,特别是来源于膜级分的组合物展示了这些细胞抑制属性。

[0034] 许多原因导致皮肤上出现炎症。这通常与损伤有关,现在专家们开始理解微炎症(micro-inflammation)的级联效应。皮肤的此微炎症能够由刺激性成分例如肥皂和细胞毒性成分,普通的紫外光例如最低限度的阳光,和在更激烈的方式下由强烈暴露于阳光导致。最近,炎症在皮肤衰老中的作用已被更清楚地理解并提示为形成自由基的间接途径,自由基的作用明确涉及膜脂氧化。因此,抗炎剂是重要的化妆品成分,但监管限制将其限制为作为药物使用。然而,本发明的生物活性植物化妆品组合物,特别是来源于膜级分的组合物,展示了抗炎属性。

[0035] 抗氧化剂的作用对营养和化妆品产品已变得越来越重要。抗氧化剂延迟、防御和帮助修复氧化降解的不利影响。在植物界中,大自然已提供了防御多种氧化因素的天然抗氧化剂。本发明的生物活性植物化妆品组合物,特别是来源于细胞浆级分的组合物,证明了这些抗氧化剂活性。

附图简述

[0036] 图 1 是示意图,其说明了用于制备本发明的生物活性植物化妆品组合物的方法的一个实施方案。

发明详述

[0037] 本发明涉及来源于植物的膜级分或细胞浆级分的生物活性植物化妆品组合物。本文中使用的术语“膜来源的化妆品组合物”一般指来源于植物的膜级分的本发明的生物活性植物化妆品组合物。术语“浆来源的化妆品组合物”一般指来源于植物的细胞浆级分的本发明的生物活性植物化妆品组合物。

[0038] 本发明也涉及用于生产本发明的生物活性植物化妆品组合物的方法,以及使用组合物的方法。

膜来源的化妆品组合物

[0039] 本发明的膜来源的化妆品组合物包括(1)来源于从新鲜植物生物质提取的细胞

汁的膜级分和 (2) 稳定剂。膜级分具有抗蛋白水解活性,细胞生长抑制活性,和 / 或抗蛋白水解和细胞生长抑制活性。抗蛋白水解活性是由于至少一种蛋白酶的抑制,并且细胞生长抑制活性是由于至少一种细胞类型的增殖抑制。适用于本发明的稳定剂的实例包括乳化剂、防腐剂、抗氧化剂、聚合物及其混合物。

[0040] 在本发明的一个方面,膜来源的化妆品组合物具有针对例如丝氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶的蛋白酶组的抗蛋白水解活性。丝氨酸蛋白酶的实例包括嗜中性粒细胞弹性蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂。基质金属蛋白酶的实例是明胶酶 B。在本发明的另一个方面,蛋白酶的抑制是可逆的。因为丝氨酸蛋白酶在以受控水平存在时具有某些积极生理作用,使用可逆抑制剂将不影响这些正常的酶促功能。可逆抑制将不会引起不可逆抑制剂能够导致的对防御和修饰机制不理想的长期修饰。

[0041] 本发明的膜来源的化妆品组合物具有范围为约 0.1 和约 25.0 μg 干物质 /ml 之间的 IC_{50} 值的抗蛋白水解效力。在本申请中使用的术语“ IC_{50} 值”代表实现 50% 的蛋白酶抑制所需的在膜级分中含有的干物质浓度。

[0042] 本发明的膜来源的化妆品组合物具有范围为约 25 和 500 μg 干物质 /ml 之间的 NRU_{50} 值的细胞生长抑制活性效力。在本申请中使用的术语“ NRU_{50} 值”代表将细胞类型的活力降低至 50% 所需的膜级分中的干物质浓度。由于膜来源的化妆品组合物的增殖抑制的细胞类型的实例是成纤维细胞。

[0043] 本发明的膜来源的化妆品组合物可来源于所有植物类型的膜级分。可用作本发明中新鲜植物生物质源的合适的植物的实例包括来自以下科的植物:菊科、豆科、唇形科和禾本科。特别地,已经过检测并发现适于作为新鲜植物生物质源的具体植物的实例包括,但不限于,红车轴草 (*Trifolium pratense*)、莲 (*Nelumbo nucifera*)、金盏花 (*Calendula officinalis*)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、薰衣草 (*Lavandula angustifolia*)、鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 和大麦 (*Hordeum vulgare*)。膜来源的化妆品组合物可来源于植物的花组织 (例如,红车轴草、莲、金盏花) 和 / 或来源于叶和茎组织 (例如,红车轴草、莲、鼠尾草)。

[0044] 在一个实施方案中,来源于植物细胞汁的膜级分构成膜来源的化妆品组合物的约 0.5 和约 95 之间的重量百分比。

[0045] 本发明的膜来源的化妆品组合物能够具有以下具体物理化学值:(1) 约 0.1 和 30% 之间的非挥发性残留物值;(2) 约 0.5 和 2.0 g/cm^3 之间的比重值;(3) 约 300 和 50,000cps 之间的粘度值;和 (4) 约 2.5 和 9.5 之间的 pH 值。

[0046] 本发明也涉及适于对包括人的哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂,其中所述制剂包括化妆可用的载体和化妆有效量的膜来源的化妆品组合物。用于本发明的合适的化妆可用载体的实例包括亲水霜基底、亲水乳液基底、亲水表面活性剂基底、疏水霜基底、疏水乳液基底,和疏水表面活性剂基底。在制剂的一个实施方案中,膜来源的化妆品组合物以范围为制剂总重量的约 0.001% 和约 90% 之间的量存在。

[0047] 本发明也涉及抑制哺乳动物皮肤组织中的抗炎活性的方法,所述方法涉及对皮肤组织应用有效增强皮肤组织中的抗蛋白水解活性的量的膜来源的化妆品组合物。

[0048] 本发明也涉及使哺乳动物皮肤组织中的细胞紊乱正常化的方法。此方法涉及对皮肤组织应用有效抑制不想要的皮肤细胞过度增殖的量的膜来源的化妆品组合物。

浆来源的化妆品组合物

[0049] 本发明的浆来源的化妆品组合物包括 (1) 来源于从新鲜植物生物质提取的细胞汁的细胞浆级分, 其中所述细胞浆级分具有抗氧化剂活性, 细胞生长刺激活性, 和 / 或抗氧化剂和细胞生长刺激活性, 和 (2) 稳定剂。所述细胞生长刺激活性是由于至少一种细胞类型的增殖刺激。适用于本发明的稳定剂的实例包括防腐剂和抗氧化剂。用于本发明的合适的防腐剂包括山梨酸钾、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸甲酯钠和柠檬酸。用于本发明的合适的抗氧化剂的实例是偏亚硫酸氢钠。

[0050] 在一个实施方案中, 浆来源的化妆品组合物的抗氧化剂活性包括超氧化物清除活性和中性粒细胞呼吸爆发抑制活性。浆来源的化妆品组合物具有范围为约 50 和 190 μg 干物质 /ml 之间的 ICR_{50} 值的超氧化物清除效力。在本申请中使用的术语“ ICR_{50} 值”代表抑制 50% 的细胞色素 C 还原所需的在细胞浆级分中含有的干物质的浓度。细胞浆来源的化妆品成分具有范围为约 1.0 和 125 μg 干物质 /ml 之间的细胞生长刺激效力和约 110 和 190% 之间的 NRU 值, 其中“NRU 值”代表细胞活力。浆来源的化妆品组合物以约 1.0 和 5.0 μg 干物质 /ml 之间抑制呼吸爆发, 并以约 120 和 180 μg 干物质 /ml 之间刺激呼吸爆发。浆来源的化妆品组合物具有引起呼吸爆发的双相调节的能力, 所述呼吸爆发来自佛波醇十四酸酯乙酸酯 (phorbol myristate acetate) 刺激的中性粒细胞。

[0051] 由于浆来源的化妆品组合物被刺激增殖的细胞类型的实例包括成纤维细胞。

[0052] 本发明的浆来源的化妆品组合物可来源于所有植物类型的细胞浆级分。可用作本发明中新鲜植物生物质源的合适植物的实例包括来自以下科的植物: 菊科、豆科、唇形科和禾本科。特别地, 已经过检测并发现适于作为新鲜植物生物质来源的具体植物的实例包括, 但不限于, 红车轴草、莲、金盏花、紫花苜蓿、薰衣草、鼠尾草和大麦。浆来源的化妆品组合物可来源于植物的花组织 (例如, 红车轴草、莲、金盏花) 和 / 或来源于叶和茎组织 (例如, 红车轴草、莲、大麦、薰衣草、紫花苜蓿和鼠尾草)。

[0053] 在一个实施方案中, 来源于植物细胞汁的细胞浆级分构成浆来源的化妆品组合物的约 1 和约 10 之间的重量百分比。

[0054] 本发明也涉及适于对哺乳动物局部应用的生物活性植物化妆品制剂, 其包括化妆可用的载体和化妆有效量的浆来源的化妆品组合物。合适的化妆可用载体的实例包括, 但不限于亲水霜基底、亲水乳液基底、亲水表面活性剂基底、疏水霜基底、疏水乳液基底和疏水表面活性剂基底。在一个实施方案中, 浆来源的化妆品组合物以范围为化妆品制剂总重量的约 0.001% 和 95% 之间的量存在。

[0055] 本发明还涉及增强哺乳动物皮肤组织中的抗氧化剂活性的方法, 其包括对皮肤组织应用有效增加皮肤组织中的抗氧化剂活性的量的浆来源的化妆品组合物。

[0056] 本发明也涉及刺激哺乳动物皮肤组织中的细胞增殖的方法, 其包括对皮肤组织应用有效刺激皮肤组织中的细胞增殖的量的浆来源的化妆品组合物。

制备生物活性植物化妆品组合物的全过程

[0057] 通过示例, 下面参考图 1 描述制备本发明的生物活性植物化妆品组合物的全过程。如图 1 所示, 收获、收集和洗涤新鲜植物 2 以得到新鲜植物生物质。对此新鲜植物生物质进行研磨、浸渍和冲压 4 以得到植物细胞汁 6 和滤饼 (press-cake) 8。然后使植物细胞汁 6 过滤通过尼龙网布 10 以得到经过滤的植物细胞汁 12。将经过滤的植物细胞汁 12 暴露于

微波处理 14 以凝结植物细胞汁 12。冷却凝结的植物细胞汁 16, 然后对其进行离心 18 以得到膜级分 20 和植物细胞汁上清 30。如下所述, 使用膜级分 20 制备膜来源的生物活性植物化妆品组合物 28 (即, 膜来源的化妆品组合物)。如下所述, 使用植物细胞汁上清 30 制备细胞浆来源的生物活性植物化妆品组合物 52 (即, 浆来源的化妆品组合物)。

[0058] 为了生产生物活性植物化妆品组合物 28, 将膜级分 20 掺入聚合物基质 22 并用制备的聚合物、防腐剂和抗氧化剂稳定 24。然后中和稳定的膜级分 26 以得到膜来源的生物活性植物化妆品组合物 28。

[0059] 为了生产生物活性植物化妆品组合物 52, 对植物细胞汁上清 30 进行等电沉淀 32 以得到含有细胞质级分 36 和细胞浆级分 38 的混合物。为了从细胞质级分 36 中分离细胞浆级分 38, 对混合物进行离心 34。然后对细胞浆级分 38 进行微波处理以引起凝结 42。依赖于植物来源, 在微波处理前, 首先调节细胞浆级分 38 的 pH。在凝结 42 后, 然后冷却混合物 44, 接着过滤 46 以得到细胞浆滤液 48。用防腐剂和抗氧化剂稳定 50 细胞浆滤液 48 以得到细胞浆来源的生物活性植物化妆品组合物 52。

制备膜来源的化妆品组合物的方法

[0060] 在一个实施方案中, 制备膜来源的化妆品组合物的方法如下。此方法涉及提供已从新鲜植物生物质提取的植物细胞汁。然后在有效将其分离为膜级分和细胞汁上清的条件 下处理植物细胞汁。得到的膜级分具有抗蛋白水解活性, 细胞生长抑制活性, 或抗蛋白水解和细胞生长抑制活性。然后在有效得到稳定的生物活性植物化妆品组合物的条件下转化膜级分, 所述生物活性植物化妆品组合物展示抗蛋白水解, 细胞生长抑制活性, 或抗蛋白水解和细胞生长抑制活性, 其中抗蛋白水解活性是由于至少一种蛋白酶的抑制, 并且细胞生长抑制活性是由于至少一种细胞类型的细胞生长的抑制。

[0061] 植物细胞汁可从所有植物类型提取。可用作本发明中新鲜植物生物质源的合适植物的实例包括但不限于来自以下科的植物: 菊科、豆科、唇形科和禾本科。特别地, 已经过检测并发现适于作为新鲜植物生物质源的具体植物的实例包括, 但不限于, 红车轴草、莲、金盏花、紫花苜蓿、薰衣草、鼠尾草和大麦。可使用植物的多种部分。例如, 可使用许多植物类型的茎和叶组织。对其他植物, 可使用花作为用于本发明的植物细胞汁源。例如, 本发明的一个实施方案使用红车轴草、莲或金盏花的花组织用于植物细胞汁的提取。在另一个实施方案中, 使用红车轴草、莲或鼠尾草的叶和茎组织。

[0062] 可使用多种提取技术提取植物细胞汁。然而, 所述提取技术应得到保存植物的生物活性组分的植物细胞汁。

[0063] 制备用于提取植物细胞汁的植物生物质的示例方法涉及收获、收集和洗涤新鲜植物。用于制备新鲜植物生物质的适于遵循的步骤包括, 例如下述步骤: (1) 保存植物细胞的内在水分含量; (2) 优化在收获地上植物组织期间使用的切割高度; (3) 在收获期间 (例如, 在切割地上植物组织期间) 保留植物的完整性; (4) 使植物生物质生物降解的环境影响和时间因素最小化; 和 (5) 在加工前 (例如, 在研磨和浸渍前) 清洁植物生物质。下面讨论这些步骤的每一个。

[0064] 保存内在水分含量: 进行的切割应避免由于水分损失的萎蔫。最佳条件是维持和保存天然水分含量的条件。

[0065] 最佳和优选的切割高度: 应在地上至少若干厘米处切割植物, 以限制在收集的生物

物质中的土壤和其他残渣的量。例如,可在大于或等于地上 5 厘米的高度处切割任意给定植物源(例如,紫花苜蓿、大麦、薰衣草或鼠尾草)的所有可用的叶和茎生物质。如果使用花组织作为植物生物质源,在提取植物细胞汁前从整株植物上分离花。

[0066] 在收获期间保存植物完整性:可通过切割植物的地上茎和叶组织收获植物生物质。以避免或最小化切碎、捣碎、压碎或其他类型植物损伤的方式进行切割。在由于所需设备类型不可能避免切碎的大规模工业收获中,小心地使能够导致在收集的植物中的微生物生长、水分损失、氧化、聚合、异构化和水解过程(即,不想要的分解代谢过程)加剧的损伤最小化。例如,在本发明的一个实施方案中,通过手工切割和收集薰衣草和鼠尾草全植物。在另一个实施方案中,使用收获设备切割紫花苜蓿和大麦组织。在该情况下,每种植物的最低地上切割高度大于或等于 5 厘米。此外,在切割期间和切割后特别注意使损伤最小化。在另一个实施方案中,通过手工收集金盏花全植物,然后分离花用于进一步加工。

[0067] 使降解的环境影响和时间因素最小化:应使切割的植物材料至加工设施的递送时间和生物质在阳光、高温和其他负面环境因素下的暴露最小化,以避免上述不想要的降解过程。例如,在本发明的一个实施方案中,紫花苜蓿和大麦从切割时到进一步加工的递送时间不超过 30 分钟。在另一个实施方案中,对经历长距离运输的植物进行切割后程序,所述切割后程序涉及立即将植物生物质置于含有冷冻凝胶包装的袋子的泡沫聚苯乙烯冷却器中,以帮助在过夜递送至加工设施期间维持新鲜和天然水分含量。对来自薰衣草、金盏花和鼠尾草的植物生物质进行这些程序。也可使用实现上述效果的其他切割后程序。

[0068] 在研磨和浸渍前的清洁步骤:一旦收获了植物组织,就进行在进一步加工前的洗涤步骤以去除土壤颗粒和来自植物的其他残渣。在避免引起细胞汁从生物质释放,导致损伤,或去除有价值的组分的条件下使用短时间的低压冲洗完成洗涤。例如,在本发明的一个实施方案中,用小于或等于 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 的水压在少于或等于 5 分钟内完成植物生物质的洗涤。残留水洗不合任何绿色或黄色的色素,这表明没有随后的损伤。从经洗涤的生物质中去除过量的水以维持干物质含量接近天然水平。

[0069] 在如上述收获了植物组织生物质后,进行植物组织生物质的进一步加工以得到植物细胞汁。在一个实施方案中,对收获的植物组织生物质进行研磨、浸渍和冲压以提取细胞内含物,即,细胞汁,和以将其与主要含有细胞壁的富含纤维的压滤饼分离。

[0070] 合适的加工方案的实例涉及下述步骤。可使用锤式粉碎机研磨植物以在短时间内得到小尺寸的植物组织颗粒而不显著增加生物质的温度。在一个实施方案中,使用改良的锤式粉碎机在少于或等于 10 秒的处理时间内产生最大尺寸小于或等于 0.5 厘米的经浸渍的植物颗粒,其中生物质温度的增加小于或等于 5°C 。

[0071] 如上所述,使经磨碎和浸渍的植物生物质的暴露最小化以避免不想要的分解代谢过程的影响。在植物生物质的研磨和浸渍后尽可能快地开始植物细胞汁的提取及其与压滤饼的分离。在短时间内加工植物生物质而不显著增加温度。在一个实施方案中,在研磨和浸渍后立即使用水平连续螺旋压力机(Compact Press “CP-6”, Vincent Corporation, FL)冲压植物生物质。圆锥体上的压力维持在 $24\text{kg}/\text{cm}^2$ 的水平,螺杆转速为 12rpm,温度增加小于或等于 5°C 。

[0072] 最初的细胞汁通常含有小纤维颗粒,所述颗粒能够吸收有价值的细胞汁组分并堵塞软管和泵。应通过过滤或低速离心去除上述颗粒。例如,在本发明的方法中使用植物细

胞汁以前,使在冲压步骤后产生的最初的细胞汁过滤通过四层尼龙纤维。

[0073] 一旦提取了植物细胞汁,就在下述过程中处理植物细胞汁,所述过程涉及(1)进行“膜级分凝结步骤”以得到凝结的细胞汁混合物和(2)对凝结的细胞汁混合物进行“膜级分分离步骤”以得到膜级分和细胞汁上清。在一个实施方案中,膜级分凝结步骤包括使细胞汁去稳定化以得到凝结的细胞汁混合物。可使用多种去稳定化技术实现去稳定化,包括例如,温度处理、电膜处理和化学处理。用于本发明的合适的温度处理可包括(1)将细胞汁提取物加热至诱导膜级分凝结所需的处理温度(例如,至约 45 和 70 摄氏度之间的温度)和(2)将细胞汁冷却至有效允许从所述细胞汁上清中进一步定量分离所述膜级分的温度(例如,至约 30 至 45 摄氏度的温度)。在实现去稳定化后,进行膜级分的分离步骤。此步骤包括,例如,使用包括过滤和离心的分离技术将凝结的细胞汁混合物分离为膜级分和细胞汁上清。

[0074] 在本领域中通常称作“蛋白质-维生素浓缩物”的新鲜得到的膜级分是具有植物原料来源特异性的浓郁颜色和特定气味的糊剂。膜级分主要由植物绿色部分中存在的叶绿体或大多由花中存在的有色体为代表。膜级分的组成主要包括磷脂、膜蛋白、叶绿素和类胡萝卜素。膜级分的干燥导致利用膜级分作为化妆品成分所需的许多有价值的性能的不可逆丧失。如果不干燥,不稳定的膜级分则迅速转化为具有强烈和非特征气味的深色不可分散和不溶的聚集物。因此,这些材料不可用作化妆品成分。下面描述的程序允许将新鲜得到的膜级分转化为稳定和活性的化妆品成分。

[0075] 一旦从细胞汁上清中分离膜级分,就在膜级分聚集前对膜级分进行制剂过程,所述过程包括以下步骤:(1)进行“稳定化步骤”以得到经稳定化的膜级分组分;(2)对经稳定化的膜级分组分进行“聚合物基质掺入步骤”以得到膜级分基质;和(3)对膜级分基质进行“中和步骤”以得到本发明的膜来源的化妆品组合物。

[0076] 在一个实施方案中,稳定化步骤包括混合非离子型乳化剂和至少一种抗氧化剂以及膜级分以得到经稳定化的膜级分组分。在聚合物基质掺入步骤中,将经稳定化的膜级分组分掺入聚合物基质以得到膜级分基质。用于本发明的合适的聚合物包括,例如,至少一种聚合物乳化剂和至少一种防腐剂。然后对膜级分基质进行中和步骤,所述步骤包括调节膜级分基质的 pH 至 2.5 和 6.5 之间的范围,得到在本申请中描述的膜来源的化妆品组合物。

[0077] 在另一个实施方案中,如下进行膜来源的化妆品组合物的稳定以得到约 100 克组合物:

(a) 膜级分的稳定化包括其与非离子型乳化剂聚山梨醇酯 80(吐温 80)和抗氧化剂(Tenox4)的混合。例如,剧烈混合 20 克新鲜的膜级分直至均质和 3.5 克吐温 80 和 0.1 克 Tenox4(丁基羟基茴香醚和丁基羟基甲苯的在油中的溶液),同时避免在混合时曝气。

(b) 聚合物乳化剂,丙烯酸酯类/C10-C30 丙烯酸酯交聚合物的分散剂的制备:例如,在 69.2 克温热的去离子水中分散 0.9 克 Pemulen TR-2 并使用温和搅拌混合至均一,避免曝气。平行地在单独的容器中组合 5 克甘油和 1 克 Phenonip(苯氧乙醇(和)对羟基苯甲酸甲酯(和)对羟基苯甲酸丁酯(和)对羟基苯甲酸乙酯(和)对羟基苯甲酸丙酯的混合物)并混合至均匀。在温和搅拌下,组合含有 Pemulen 和甘油的相与 Phenonip 并混合至均匀。

(c) 将膜级分掺入聚合物基质:例如,将含有膜级分、吐温 80 和 Tenox4 的相加入含有

Pemulen、甘油和 Phenonip 的相并剧烈搅拌混合,同时避免曝气。

(d) 产品的中和:例如,用 18% 的氢氧化钠 (NaOH) 水溶液中和含有膜级分和其他组分的批次并剧烈混合以产生具有 $\text{pH} = 5.0 \pm 0.4$ 的均匀系统。

[0078] 得到的多相产品是不透明的凝胶,其显示的性能完全满足化妆品成分的所有要求。发现在多相化妆品成分中的防腐剂和抗氧化剂的最佳组成对所有植物源非常类似,并且可有效使用 Pemulen 和 Carbopol 的不同组合。稳定性研究提示,通过所述方法从膜级分生产的化妆品成分在 8°C 稳定至少 4-6 月,维持物理化学完整性和活性。

制备浆来源的化妆品组合物的方法

[0079] 本发明也涉及制备展示抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,或抗氧化剂和细胞生长刺激活性的浆来源的化妆品组合物的方法。所述方法包括提供已从新鲜植物生物质提取的植物细胞汁,这已在有关膜来源的化妆品组合物的上文中描述。然后在有效将植物细胞汁分离为膜级分和细胞汁上清的条件下处理植物细胞汁。此步骤也和有关膜来源的化妆品组合物的上文中描述的相同。在有效将细胞汁上清分离为细胞质级分和细胞浆级分的条件下加工细胞汁上清。在有效得到细胞浆级分滤液条件下精炼细胞浆级分,所述细胞浆级分滤液具有抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,或抗氧化剂和细胞生长刺激活性。在有效得到稳定的生物活性植物化妆品组合物的条件下稳定化细胞浆级分滤液,所述生物活性植物化妆品组合物展示抗氧化剂活性,细胞生长刺激活性,或抗氧化剂和细胞生长刺激活性。

[0080] 植物细胞汁可从所有植物类型提取。可用作本发明中新鲜植物生物质源的合适植物的实例包括但不限于来自以下科的植物:菊科、豆科、唇形科和禾本科。特别地,已经过检测并发现适于作为新鲜植物生物质源的具体植物的实例包括,但不限于,红车轴草、莲、金盏花、紫花苜蓿、薰衣草、鼠尾草和大麦。

[0081] 如上所述,一旦将植物细胞汁分离为膜级分和细胞汁上清,就对细胞汁上清进行加工步骤。在一个实施方案中,所述加工步骤包括 (1) 进行“细胞质级分沉淀步骤”以得到包括细胞质级分和细胞浆级分的细胞质 / 细胞浆混合物,和 (2) 进行“细胞浆分离步骤”以分离细胞质级分与细胞浆级分。细胞质级分主要包括白色可溶性蛋白质;在 C3 植物中,这些蛋白质主要由酶核酮糖二磷酸羧化酶组成。细胞浆含有低分子量可溶性组分。

[0082] 细胞质级分沉淀步骤可包括使用合适的沉淀技术,包括例如,等电滴定和电渗析诱导细胞汁上清内的细胞质级分的沉淀。在一个实施方案中,等电滴定包括将细胞汁上清的 pH 调节为在约 2.5 和 6.5 之间。使用合适的分离技术,包括例如过滤和离心的技术诱导细胞质 / 细胞浆混合物分离为细胞质级分和细胞浆级分。例如,通过利用 5.0N 盐酸 (HCl) 调节为 $\text{pH} = 4.0$ 的滴定方法诱导沉淀。

[0083] 评估细胞质级分完全分离的定量标准是在随后的滤液或上清中缺乏可检测水平的高分子量蛋白质和 / 或缺乏核酮糖二磷酸脱羧酶。例如,可在冷冻离心中以大于或等于 3,000g 大于或等于 20 分钟分离沉淀的细胞汁上清,并且在具有 $\text{pH} = 4.0$ 的细胞浆中实现缺乏具有大于或等于 10,000 的分子量的蛋白质。

[0084] 通常将细胞浆称为“棕色汁”,尽管最初此澄清液体具有淡黄色和轻微的特征气味。在数小时内,不稳定的细胞浆不可逆地转化为具有大量沉淀物和强烈非特征气味的深棕色悬浮液。因此,“棕色汁”不能用作化妆品成分。下述程序允许精炼细胞浆(棕色汁)以得到稳定和具有活性的化妆品成分。这是通过从细胞浆中去除引起导致不想要的沉淀产生

和颜色和气味恶化的不可逆转化的主要成分实现。此程序包括：pH 调节、热处理、冷却、真空过滤和稳定化。一些特定的程序团 (regiment procedures) 可根据植物来源细胞浆而变化。应该注意,此程序必须在完成细胞浆和细胞质级分的分离后立即使用。

[0085] 一旦产生了细胞浆级分,就对其进行精炼过程。此精炼过程包括 (1) 进行“温度处理步骤”以得到凝结的细胞浆级分,和 (2) 进行澄清步骤以得到细胞浆级分滤液。用于本发明的合适的温度处理步骤包括 (1) 将细胞浆级分加热至诱导细胞浆级分内凝结所需的加热温度,和 (2) 立即将细胞浆级分冷却至有效允许进一步定量分离所述细胞浆级分滤液的温度。在一个实施方案中,加热温度为在约 80 和约 95 摄氏度之间,并且将被加热的细胞浆级分冷却到至少低至约 15 摄氏度的温度。用于本发明的合适的澄清步骤包括澄清凝结的细胞浆级分以得到细胞浆级分滤液,其中所述澄清包括例如过滤和离心的澄清技术。在一个实施方案中,过滤可包括真空过滤凝结的细胞浆级分以得到细胞浆级分滤液。在另一个实施方案中,在温度处理步骤前,将细胞浆级分的 pH 合适地调节至约 3.0 和 4.0 之间。

[0086] 在产生了细胞浆滤液后,就对其进行上述稳定化步骤以得到浆来源的化妆品组合物。在一个实施方案中,稳定化步骤包括在至少一种防腐剂和至少一种抗氧化剂的混合物中孵育细胞浆级分滤液以得到经稳定化的细胞浆级分滤液。用于本发明的合适的防腐剂包括例如,山梨酸钾、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸甲酯钠和柠檬酸。用于本发明的合适的抗氧化剂的实例是偏亚硫酸氢钠。

[0087] 在一个实施方案中,可如下进行细胞浆的稳定化:

(a) 例如,对从鼠尾草和金盏花得到的、通过利用 5.0N 盐酸 (HCl) 调节至 pH = 3.0 的滴定法诱导的细胞浆进行 pH 调节。这样的调节对从紫花苜蓿、大麦和薰衣草得到的细胞浆不是必需的。

(b) 对从所有可用的植物源得到的细胞浆进行热处理。例如,在温度探针控制下将细胞浆暴露于微波处理。持续此处理直到温度达到 90°C。温度探针指示诱导不想要的成分的完全凝结所需的点。一旦诱导了凝结,立即将被处理的细胞汁冷却至 10°C。

(c) 能够通过过滤或离心澄清凝结的细胞浆。例如,可通过双层 Whatman2 号滤器真空过滤凝结的细胞浆。丢弃沉淀物,并将滤液用于进一步加工。

(d) 滤液的稳定化包括的加入特定防腐剂和抗氧化剂并孵育所述混合物直到实现其完全的稳定化(通常需要大于或等于 30 分钟的充分混合)。

[0088] 经稳定化的细胞浆滤液显示了完全满足化妆品成分所有要求的性能。稳定性研究提示,通过这些方法从细胞浆生产的化妆品成分在室温稳定至少 10-12 个月(即,它们维持物理化学完整性和活性)。

实施例

实施例 1

来源于紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 101 的制备

[0089] 生物物质的制备。收获足够量的新鲜紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 植物生物物质(即,茎和叶组织)以得到约 100kg 干物质。经计算,新鲜紫花苜蓿植物生物物质中的干物质水平为 15.75%,需要收获约 635kg 新鲜紫花苜蓿植物生物物质以得到 100kg 干物质。注意保存植物生物物质的内在水分含量和避免由于水分损失而萎蔫。在地上至少 5 厘米处切割植物以限

制在收集的植物生物质中的土壤和其他残渣的量。以避免或最小化切碎、捣碎和压碎植物的方式进行切割。在切割后不多于 60 分钟将收获的植物递送至加工。这样做是为了最小化植物生物质暴露于阳光、高温和其他负面环境因素。在进一步加工前进行洗涤步骤以去除土壤颗粒和来自植物的其他残渣。通过在 $\leq 1\text{kg}/\text{cm}^2$ 水压下洗涤 ≤ 5 分钟收获的植物完成此洗涤步骤。残留水洗物不含任何绿色色素,表明合适的水压和洗涤持续时间。从洗涤后的生物质中去除过量的水。

[0090] 植物生物质的研磨、浸渍和冲压。在收获、收集和洗涤植物生物质后,然后对植物进行研磨、浸渍和冲压以提取细胞内含物(即,植物细胞汁)并将其与富含纤维的压滤饼分离。使用锤式粉碎机研磨紫花苜蓿生物质以在短时间内得到合适的小尺寸的植物组织颗粒并且不显著增加生物质的温度。将锤式粉碎机设定为在 ≤ 10 秒的处理时间内产生 ≤ 0.5 厘米的经浸渍的植物颗粒的最大尺寸。这仅导致 $\leq 5^\circ\text{C}$ 的生物质温度的增加。使用水平连续螺旋压力机(Compact Press“CP-6”,Vincent Corporation,FL)从植物生物质中提取植物细胞汁。将螺旋压力机圆锥体上的压力维持在 $24\text{kg}/\text{cm}^2$ 的水平,螺杆转速为 12rpm ,温度仅增加 $\leq 5^\circ\text{C}$ 。此处理得到压滤饼和植物细胞汁。最初的植物细胞汁含有小纤维颗粒,通过过滤通过 4 层尼龙纤维或通过使用低速离心将所述颗粒去除。

[0091] 分离膜级分与细胞汁。将滤过的植物细胞汁暴露于使用温度探针控制的微波处理。持续此处理直到细胞汁的温度达到 60°C 。一旦诱导凝结,将经处理的细胞汁立即冷却至 40°C 。使用大于或等于 $3,000\text{g}$,大于或等于 20 分钟的离心实现膜级分与凝结的细胞汁的分离。这得到膜级分(沉淀物)和含有细胞质级分和细胞浆级分(即,低分子量可溶性组分)的细胞汁上清。将细胞汁上清用于进一步加工以得到化妆品植物成分 101。保存膜级分用于制备对应物膜来源的化妆品组合物。

[0092] 分离细胞质级分与细胞汁上清。为了分离出细胞质级分,对细胞汁上清进行等电沉淀。使用利用 5.0N 盐酸(HCl)使细胞汁上清的 pH 变为 4.0 的滴定法诱导细胞质级分的沉淀。通过大于或等于 $3,000\text{g}$,大于或等于 20 分钟的离心实现沉淀的细胞质级分与细胞浆的分离。这得到细胞浆(上清),其能够进一步精炼以得到植物化妆品成分 101。

[0093] 处理细胞浆以产生化妆品植物成分 101。细胞浆的精炼包括以下步骤:热处理、冷却、过滤和稳定。在分离细胞浆和细胞质级分后立即进行精炼。将细胞浆暴露于使用温度探针控制的微波处理。持续此处理直到细胞浆的温度达到 90°C 。一旦诱导凝结,将经处理的细胞浆立即冷却至 10°C 。将凝结的细胞浆真空过滤通过双层 Whatman2 号滤器。丢弃沉淀物,并将得到的细胞浆滤液用于进一步处理(即,稳定化)。通过加入防腐剂和抗氧化剂并孵育混合物直至完全溶解来实现细胞浆滤液的稳定。使用的防腐剂和抗氧化剂包括下述: 0.1% 山梨酸钾、 0.1% 苯甲酸钠、 0.1% 对羟基苯甲酸甲酯钠和 0.2% 偏亚硫酸氢钠。此制备导致 18.1kg 干物质产量(或约 340 升)的化妆品植物成分 101 的产生,将其用于其物理化学和生物活性特性的表征。化妆品植物成分 101 的推荐储存条件包括在避光的密封容器中在 15 和 25°C 之间的温度储存。

实施例 2

来源于紫花苜蓿(Medicago sativa)细胞浆级分的化妆品植物成分 101 的产品规格

[0094] 根据在实施例 1 中的上述方法制备化妆品植物成分 101。如下所述进行化妆品植物成分 101 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物

成分 101 是澄清液体,其具有淡黄色和轻微的特征气味。在载体介质中未加入溶剂(即甘油、油或水)。

[0095] 表 1 总结了化妆品植物成分 101 的物理和化学数据。

表 1. 物理和化学数据

参数	方法	结果
固体含量, %	见实施例 25, “方法 1”	5.3
比重, g/cm ³	USP < 841 >	1.025
颜色	加德纳色标	6-7
折射率	USP < 831 >	1.342
pH	USP < 791 >	4.1
氧化还原电势, mV	见参考 [1]	70
电导率, S/m	见参考 [2]	0.96

参 考:[1]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 5-90; [2]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 8-21, 以其整体引入本文作为参考。

[0096] 表 2 描述了有关化妆品植物成分 101 的紫外光谱数据。

表 2. 紫外光谱

峰	参数	方法	结果
#1	开始, nm	USP<197>	400.0
	顶点, nm	-''-	324.5
	结束, nm	-''-	303.0
	高度, Abs	-''-	0.347
	面积, Abs x nm	-''-	21.197
#2	开始, nm	USP<197>	303.0
	顶点, nm	-''-	258.0
	结束, nm	-''-	253.0
	高度, Abs	-''-	1.471
	面积, Abs x nm	-''-	65.103

[0097] 表 3 总结了化妆品植物成分 101 的微生物分析数据。此数据证明,化妆品植物成分 101 满足有关菌落形成单位和不存在病原体的化妆品工业要求。

表 3. 微生物分析

参数	方法	结果
每克样品的菌落形成单位 (CFU)	USP<61>	<100
大肠杆菌	-''-	阴性
白色念珠菌	-''-	阴性
假单胞菌属物种	-''-	阴性
金黄色葡萄球菌	-''-	阴性

[0098] 测定化妆品植物成分 101 当在 15 和 25℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时,稳定 (即,维持物理和化学完整性) 至少 12-18 个月。未检测到毒性作用。在对照的临床评估中,化妆品植物成分 101 在 0-2,500 μg 干物质 /ml 的浓度范围内未表现出对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入的 50% 抑制 (NRU_{50})。阳性对照 (表皮生长因子) 的 $\text{NRU}_{50} > 2,500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 101 表现出超氧化物清除能力。在对照的临床评估中,化妆品植物成分 101 在 149 μg 干物质 /ml 的浓度表现出对细胞色素 C 还原的 50% 抑制 (ICR_{50})。阳性对照 (迷迭香酸) 的 $\text{ICR}_{50} = 26.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 101 是可生物降解的产品。

实施例 3

来源于大麦 (*Hordeum vulgare*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 201 的制备

[0099] 制备化妆品植物成分 201 的方法与在实施例 1 中描述的有关化妆品植物成分 101 的方法相同,具有如下所述的变异。使用大麦 (*Hordeum vulgare*) 的新鲜茎和叶组织作为植物生物质起始材料。经计算,在新鲜大麦植物生物质中的干物质水平为 13.67%,需要收获约 732kg 新鲜大麦植物生物质以得到 100kg 干物质。所述制备导致化妆品植物成分 201 的 15.1kg 干物质产量 (或约 433 升) 的产生。

实施例 4

来源于大麦 (*Hordeum vulgare*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 201 的产品规格

[0100] 根据实施例 3 中的上述方法制备化妆品植物成分 201。如下所述进行化妆品植物成分 201 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物成分 201 是澄清液体,其具有淡黄色和轻微的特征气味。在载体介质中未加入溶剂 (即甘油、油或水)。

[0101] 表 4 总结了化妆品植物成分 201 的物理和化学数据。

表 4. 物理和化学数据

参数	方法	结果
固体含量, %	见实施例 25, “方法 1”	3.5

比重, g/cm ³	USP < 841 >	1.019
颜色	加德纳色标	5-6
折射率	USP < 831 >	1.338
pH	USP < 791 >	4.1
氧化还原电势, mV	见参考 [1]	95
电导率, S/m	见参考 [2]	1.09

参 考:[1]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 5-90; [2]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 8-21, 以其整体引入本文作为参考。

[0102] 表 5 总结了化妆品植物成分 201 的紫外光谱数据。

表 5 紫外光谱

峰	参数	方法	结果
#1	开始, nm	USP<197>	400.0
	顶点, nm	-''-	333.5
	结束, nm	-''-	305.0
#2	高度, Abs	-''-	0.232
	面积, Abs x nm	-''-	14.254
	开始, nm	USP<197>	305.0
	顶点, nm	-''-	258.0
	结束, nm	-''-	233.0
	高度, Abs	-''-	1.268
	面积, Abs x nm	-''-	55.631

[0103] 微生物分析证明化妆品植物成分 201 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求（方法见上表 3）。

[0104] 测定化妆品植物成分 201 当在 15 和 25℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时, 稳定（即, 维持物理和化学完整性）至少 12-18 个月。未检测到毒性作用。在对照的临床评估中, 化妆品植物成分 201 在 0-2,500 μg 干物质 /ml 的浓度范围内未表现出对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入的 50% 抑制 (NRU₅₀)。阳性对照（表皮生长因子）的 NRU₅₀ > 2,500 μg/ml。化妆品植物成分 201 表现出超氧化物清除能力。在对照的临床评估中, 化妆品植物成

分 201 在 $160 \mu\text{g}$ 干物质 /ml 的浓度表现出对细胞色素 C 还原的 50% 抑制 (ICR_{50})。阳性对照 (迷迭香酸) 的 $\text{ICR}_{50} = 2.65 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 201 是可生物降解的产品。

实施例 5

来源于薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 301 的制备 [0105] 制备化妆品植物成分 301 的方法与在实施例 1 中描述的有关化妆品植物成分 101 的方法相同, 具有如下所述的变异。使用薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 的新鲜茎和叶组织作为植物生物质起始材料。经计算, 在新鲜薰衣草植物生物质中的干物质水平为 13.24%, 需要收获约 755kg 新鲜薰衣草植物生物质以得到 100kg 干物质。此外, 防腐剂和抗氧化剂混合物含有以下: 0.1% 山梨酸钾、0.1% 苯甲酸钠、0.1% 对羟基苯甲酸甲酯钠、0.1% 柠檬酸和 0.2% 偏亚硫酸氢钠。所述制备导致化妆品植物成分 301 的 18.5kg 干物质产量 (或约 444 升) 的产生。

实施例 6

来源于薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 301 的产品规格

[0106] 根据实施例 5 中的上述方法制备化妆品植物成分 301。如下所述进行化妆品植物成分 301 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物成分 301 是澄清液体, 其具有棕黄色和特征气味。在载体介质中未加入溶剂 (即甘油、油或水)。

[0107] 表 6 总结了化妆品植物成分 301 的物理和化学数据。

表 6. 物理和化学数据

参数	方法	结果
固体含量, %	见实施例 25, “方法 1”	4.2
比重, g/cm^3	USP < 841 >	1.020
颜色	加德纳色标	11-12
折射率	USP < 831 >	1.341
pH	USP < 791 >	3.9
氧化还原电势, mV	见参考 [1]	170
电导率, S/m	见参考 [2]	0.79

参 考: [1] Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 5-90; [2] Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 8-21, 以其整体引入本文作为参考。

[0108] 表 7 描述了有关化妆品植物成分 301 的紫外光谱数据。

表 7 紫外光谱

峰	参数	方法	结果
#1	开始, nm	USP<197>	400.0
	顶点, nm	“-”	260.2
	结束, nm	“-”	236.5
	高度, Abs	“-”	2.409
	面积, Abs x nm	“-”	135.505

[0109] 微生物分析证明化妆品植物成分 301 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求（方法见上表 3）。

[0110] 测定化妆品植物成分 301 当在 15 和 25℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时，稳定（即，维持物理和化学完整性）至少 12-18 个月。未检测到毒性作用。在对照的临床评估中，化妆品植物成分 301 在 0-400 μg 干物质 /ml 的浓度范围内未表现出对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入的 50% 抑制 (NRU_{50})。阳性对照（表皮生长因子）的 $\text{NRU}_{50} > 2,500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 301 表现出弹性蛋白酶抑制活性、明胶酶 B 抑制活性和超氧化物清除能力。

[0111] 下表 8 描述了有关化妆品植物成分 301 的生物活性结果。

表 8. 化妆品植物成分 301 的生物活性结果

活性	方法	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	K_i ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
弹性蛋白酶抑制	见实施例 25, “方法 5”	36.0	25.4
明胶酶 B 抑制	见实施例 25, “方法 6”	>100	无数据

[0112] 在对照的临床评估中，化妆品植物成分 301 在 158 μg 干物质 /ml 的浓度表现出对细胞色素 C 还原的 50% 抑制 (ICR_{50})。阳性对照（迷迭香酸）的 $\text{ICR}_{50} = 26.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 301 是可生物降解的产品。

实施例 7

来源于金盏花 (*Calendula officinalis*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 401 的制备

[0113] 制备化妆品植物成分 401 的方法与在实施例 1 中描述的有关化妆品植物成分 101 的方法相同，具有如下所述的变异。使用金盏花 (*Calendula officinalis*) 的新鲜花组织作为植物生物质起始材料。经计算，在新鲜金盏花植物生物质中的干物质水平为 7.80%，需要收获约 1,282kg 新鲜金盏花植物生物质以得到 100kg 干物质。在切割植物后和洗涤前从全植物上分离花。在切割植物后不多于 3 至 4 小时开始花的加工（即，从洗涤步骤开始到研磨前）。此外，在细胞浆级分的微波处理前，使用利用 0.5N 盐酸 (HCl) 的滴定法首先将细胞浆的 pH 调节为 pH3.0。所述制备导致 27.1kg 干物质产量（或约 704 升）的化妆品植物

成分 401 的产生。

实施例 8

来源于金盏花 (*Calendula officinalis*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 401 的产品规格

[0114] 根据实施例 7 中的上述方法制备化妆品植物成分 401。如下所述进行化妆品植物成分 401 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物成分 401 是澄清液体,其具有淡黄色和轻微的特征气味。在载体介质中未加入溶剂(即甘油、油或水)。

[0115] 表 9 描述了化妆品植物成分 401 的物理和化学数据。

表 9. 物理和化学数据

参数	方法	结果
固体含量, %	见实施例 25, “方法 1”	3.9
比重, g/cm ³	USP < 841 >	1.019
颜色	加德纳色标	4-5
折射率	USP < 831 >	1.340
pH	USP < 791 >	3.4
氧化还原电势, mV	见参考 [1]	160
电导率, S/m	见参考 [2]	0.40

参 考:[1]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 5-90; [2]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 8-21, 以其整体引入本文作为参考。

[0116] 表 10 总结了化妆品植物成分 401 的紫外光谱数据。

表 10 紫外光谱

峰	参数	方法	结果
#1	开始, nm	USP<197>	400.0
	顶点, nm	-''-	260.0
	结束, nm	-''-	232.5
	高度, Abs	-''-	1.171
	面积, Abs x nm	-''-	55.719

[0117] 微生物分析证明化妆品植物成分 401 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求(方法见上表 3)。

[0118] 测定化妆品植物成分 401 当在 15 和 25℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时, 稳定 (即, 维持物理和化学完整性) 至少 12-18 个月。未检测到毒性作用。在对照的临床评估中, 化妆品植物成分 401 在 0-2, 500 μg 干物质 /ml 的浓度范围内未表现出对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入的 50% 抑制 (NRU_{50})。阳性对照 (表皮生长因子) 的 $\text{NRU}_{50} > 2, 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 401 表现出对细胞增殖的刺激作用和超氧化物清除能力。在对照的临床评估中, 化妆品植物成分 401 刺激 3T3 成纤维细胞增殖。在从 5 至 100 μg 干物质 /ml 的范围中观察到此 10-15% 的刺激。阳性对照 (表皮生长因子) 的刺激 = 20-30%。在对照的临床评估中, 化妆品植物成分 401 表现出超氧化物清除能力, 导致在 153 μg 干物质 /ml 的浓度的对细胞色素 C 还原的 50% 抑制。阳性对照 (迷迭香酸) 的 $\text{ICR}_{50} = 26.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 401 是可生物降解的产品。

实施例 9

来源于鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 501 的制备

[0119] 制备化妆品植物成分 501 的方法与在实施例 1 中描述的有关化妆品植物成分 101 的方法相同, 具有如下所述的变异。使用鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 的新鲜茎和叶组织作为植物生物质起始材料。经计算, 在新鲜鼠尾草植物生物质中的干物质水平为 10.64%, 需要收获约 940kg 新鲜鼠尾草植物生物质以得到 100kg 干物质。在细胞浆级分的微波处理前, 使用利用 0.5N 盐酸 (HCl) 的滴定法首先将细胞浆的 pH 调节为 pH3.0。此外, 防腐剂和抗氧化剂混合物含有以下: 0.1% 山梨酸钾、0.1% 苯甲酸钠、0.1% 对羟基苯甲酸甲酯钠、0.1% 柠檬酸和 0.2% 偏亚硫酸氢钠。所述制备导致化妆品植物成分 501 的 14.9kg 干物质产量 (或约 370 升) 的产生。

实施例 10

来源于鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 细胞浆级分的化妆品植物成分 501 的产品规格

[0120] 根据实施例 9 中的上述方法制备化妆品植物成分 501。如下所述进行化妆品植物成分 501 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物成分 501 是澄清液体, 其具有棕黄色和特征气味。在载体介质中未加入溶剂 (即甘油、油或水)。

[0121] 表 11 描述了化妆品植物成分 501 的物理和化学数据。

表 11. 物理和化学数据

参数	方法	结果
固体含量, %	见实施例 25, “方法 1”	4.0
比重, g/cm^3	USP < 841 >	1.021
颜色	加德纳色标	8-9
折射率	USP < 831 >	1.340
pH	USP < 791 >	3.2
氧化还原电势, mV	见参考 [1]	190

电导率, S/m	见参考 [2]	0.99
----------	---------	------

参 考:[1]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 5-90 ;[2]Handbook of Chemistry and Physics, 第 80 版, CRC Press, 1999-2000, 8-21, 以其整体引入本文作为参考。

[0122] 表 12 总结了化妆品植物成分 501 的紫外光谱数据。

表 12 紫外光谱

峰	参数	方法	结果
#1	开始, nm	USP<197>	400.0
	顶点, nm	-''-	330.0
	结束, nm	-''-	306.5
	高度, Abs	-''-	0.260
	面积, Abs x nm	-''-	14.952
#2	开始, nm	USP<197>	306.0
	顶点, nm	-''-	259.0
	结束, nm	-''-	235.0
	高度, Abs	-''-	1.248
	面积, Abs x nm	-''-	57.844

[0123] 微生物分析证明化妆品植物成分 501 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求（方法见上表 3）。

[0124] 测定化妆品植物成分 501 当在 15 和 25℃之间的温度在避光密闭容器中储存时, 稳定（即, 维持物理和化学完整性）至少 12-18 个月。未检测到毒性作用。在对照的临床评估中, 化妆品植物成分 501 在 0-2, 430 μ g 干物质 /ml 的浓度范围内未表现出对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入的 50%抑制 (NRU₅₀)。阳性对照（表皮生长因子）的 NRU₅₀ > 2, 500 μ g/ml。化妆品植物成分 501 表现出弹性蛋白酶抑制活性、明胶酶 B 抑制活性和超氧化物清除能力（见下表 13）。

表 13. 化妆品植物成分 501 的生物活性结果

活性	方法	IC ₅₀ (μg/ml)	K _i (μg/ml)
弹性蛋白酶抑制	见实施例 25, “方法 5”	115.0	70.3
明胶酶 B 抑制	见实施例 25, “方法 6”	>100	无数据

[0125] 在对照的临床评估中,化妆品植物成分 501 表现出超氧化物清除活性,在 $>160 \mu\text{g}$ 干物质/ml 的浓度导致细胞色素 C 还原的 50% 抑制 (ICR₅₀)。阳性对照 (迷迭香酸) 的 ICR₅₀ = $26.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。化妆品植物成分 501 是可生物降解的产品。

实施例 11

来源于金盏花 (*Calendula officinalis*) 膜级分的化妆品植物成分 402 的制备

[0126] 制备化妆品植物成分 402 的方法与在实施例 7 中描述的有关化妆品植物成分 401 的方法相同,具有如下所述的变异。一旦分离滤过的细胞汁与膜级分 (沉淀物),就不再遵循实施例 7 中描述的方法。代替地,处理膜级分以得到化妆品植物成分 402,如下所述。

[0127] 处理膜级分以产生化妆品植物成分 402。使膜级分稳定化并将其掺入聚合物基质中。这在分离了膜级分与细胞汁后立即进行。为了制备约 100 克化妆品植物成分 402,通过将细胞膜级分与非离子型乳化剂聚山梨醇酯 80 (吐温 80) 和抗氧化剂 (Tenox4) 混合来稳定化细胞膜级分。具体地,猛烈混合 20 克新鲜的膜级分和 3.5 克吐温 80 和 0.1 克 Tenox4 (丁基羟基茴香醚和丁基羟基甲苯在油中的溶液) 直至均质,同时避免在混合期间曝气。

[0128] 一旦经稳定化,就将膜级分掺入聚合物基质 (即,聚合物乳化剂,丙烯酸酯类 / C10-C30 丙烯酸酯交联聚合物的分散剂)。如下制备聚合物基质:使用温和搅拌在 69.2 克温热的去离子水中分散 0.9 克 Pemulen TR-2 并混合至均匀,同时避免曝气。平行地,在单独的容器中组合 5 克甘油和 1.0 克 Phenonip (苯氧乙醇 (和) 对羟基苯甲酸甲酯 (和) 对羟基苯甲酸丁酯 (和) 对羟基苯甲酸乙酯 (和) 对羟基苯甲酸丙酯的混合物) 并混合直至均匀。使用温和搅拌,组合含有 Pemulen 和甘油的相与 Phenonip 并混合直至均匀。为了将膜级分掺入聚合物基质,将含有膜级分、吐温 80 和 Tenox4 的相加入含有 Pemulen、甘油和 Phenonip 的相,然后猛烈搅拌混合,同时避免曝气。通过用 18% 的氢氧化钠 (NaOH) 水溶液中和膜级分混合物并猛烈混合以产生具有 $\text{pH} = 5.0 \pm 0.4$ 的均匀系统实现膜级分混合物的稳定化。从 100kg 新鲜金盏花植物生物质 (约 1,282kg 具有 7.80% 干物质的新鲜金盏花生物质) 开始的此制备导致化妆品植物成分 402 的 9.5kg 干物质产量 (或约 205 升) 的产生,将其用于其物理化学和生物活性品质的表征。化妆品植物成分 402 的推荐储存条件包括在避光的密封容器中在 2 和 8°C 之间的温度储存。

实施例 12

来源于金盏花 (*Calendula officinalis*) 膜级分的化妆品植物成分 402 的产品规格

[0129] 根据实施例 11 中的上述方法制备化妆品植物成分 402。如下所述进行化妆品植物成分 402 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物成

分 402 是不透明的凝胶,其具有橙色和轻微的特征气味。利用与聚合物凝胶化的天然细胞汁组分配制化妆品植物成分 402 以确保最高水平的纯度均匀性、相容性、稳定性、安全性和效力。

[0130] 表 14 描述了化妆品植物成分 402 的物理和化学数据。

表 14. 物理和化学数据

参数	方法	结果
非挥发性残留物 (NVR), %	见实施例 25, “方法 2”	7.1
比重, g/c m ³	USP<841>	1.054
粘度, cps	USP<911>	15,800
pH	USP<791>	4.6
总类胡萝卜素,%NVR	见实施例 25, “方法 4”	0.86
叶黄素,%NVR	见实施例 25, “方法 4”	0.83

[0131] 表 15 总结了有关化妆品植物成分 402 的 L*a*b* 值数据。

表 15. L*a*b* 值

参数	方法	结果
L*	见实施例 25, “方法 3”	33.27
a*	—” —	20.36
b*	—” —	49.56

[0132] 微生物分析证明化妆品植物成分 402 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求 (方法见上表 3)。

[0133] 测定化妆品植物成分 402 当在 2 和 8℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时, 稳定 (即, 维持物理和化学完整性) 至少 12-18 个月。化妆品植物成分 402 是可生物降解的产品。未检测到毒性作用。在对照的临床评估中, 化妆品植物成分 402 在 0-354 μg 干物质 / ml 的浓度范围内未表现出对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入的 50% 抑制 (NRU₅₀)。阳性对照 (表皮生长因子) 的 NRU₅₀ > 2,500 μg/ml。化妆品植物成分 402 表现出弹性蛋白酶抑制活性和胰蛋白酶抑制活性。表 16 总结了化妆品植物成分 402 的某些生物活性结果。

表 16. 化妆品植物成分 402 的生物活性结果

活性	方法	IC ₅₀ (μg/ml)	K _i (μg/ml)
弹性蛋白酶抑制	见实施例 25, “方法 5”	21.0	0.68
胰蛋白酶抑制	见参考[1]	5.6	无数据

参考 [1] :Cannel R. J. P., Kellam S. J., Owsianka A. M. *Planta Medica*, 1988, 第 54 卷, 第 10-14 页, 以其整体引入本文作为参考。

实施例 13

来源于鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 膜级分的化妆品植物成分 502 的制备

[0134] 制备化妆品植物成分 502 的方法与实施例 11 中描述的有关化妆品植物成分 402 的方法相同, 具有以下变异。使用鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 的新鲜茎和叶组织作为植物生物物质起始材料。经计算, 在新鲜鼠尾草植物生物物质中的干物质水平为 10.64%, 需要收获约 940kg 新鲜鼠尾草植物生物物质以得到 100kg 干物质。此制备导致 6.7kg 干物质产量 (或约 124 升) 的化妆品植物成分 502 的产生。

实施例 14

来源于鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 膜级分的化妆品植物成分 502 的产品规格

[0135] 根据实施例 13 中的上述方法制备化妆品植物成分 502。如下所述进行化妆品植物成分 502 的分析以测定其多种物理化学、微生物、细胞毒性和生物活性特征。化妆品植物成分 502 是不透明的凝胶, 其具有绿色颜色和特征气味。利用与聚合物胶凝化的天然细胞汁成分已配制化妆品植物成分 502 以确保最高水平的纯度均匀性、相容性、稳定性、安全性和效力。

[0136] 表 17 描述了化妆品植物成分 502 的物理和化学数据。

表 17. 物理和化学数据

参数	方法	结果
非挥发性残留物, %	见实施例 25, “方法 2”	8.3
比重, g/c m ³	USP < 841 >	1.047
粘度, cps	USP < 911 >	5.200
pH	USP < 791 >	4.6

[0137] 表 18 描述了化妆品植物成分 502 的 L*a*b* 值。

表 18. L*a*b* 值

参数	方法	结果
L*	见实施例 25, “方法 3”	27.35
a*	—” —	-1.4

b*	-”-	16.97
----	-----	-------

[0138] 微生物分析证明化妆品植物成分 502 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求（方法见上表 3）。

[0139] 测定化妆品植物成分 502 当在 2 和 8℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时，稳定（即，维持物理和化学完整性）至少 12-18 个月。化妆品植物成分 502 是可生物降解的产品。未检测到毒性作用。化妆品植物成分 502 表现出弹性蛋白酶抑制活性和明胶酶 B 抑制活性。（见下表 19。）

活性	方法	IC ₅₀ (μg/ml)	K _i (μg/ml)
弹性蛋白酶抑制	见实施例 25, “方法 5”	30.0	12.0
明胶酶 B 抑制	见实施例 25, “方法 6”	<25.0	无数据

实施例 15

有关来自紫花苜蓿、大麦、薰衣草、金盏花和鼠尾草的化妆品植物成分制备的干物质的分布

[0140] 分析和比较了在生产化妆品植物成分 101, 201, 301, 401, 402, 501 和 502 期间收集的不同级分的干物质分布。

[0141] 表 20 显示了不同方法的 100kg 干物质在细胞汁和压滤饼之间的分布。经测定，本发明的方法允许在最初生物质干物质的约 20 至 40% 范围内的提取的产量转化为植物细胞汁。

表 20. 100kg 干物质在细胞汁和压滤饼之间的分布

产品	植物源				
	紫花苜蓿	大麦	薰衣草	金盏花	鼠尾草
新鲜生物质	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
细胞汁	32.7	28.5	28.1	37.6	21.9
压滤饼	67.3	71.5	71.9	62.4	78.1

[0142] 表 21 显示膜级分的干物质的产量在最初生物质干物质的 6% 至 13% 的范围中，和细胞汁干物质的 25% 至 45% 的范围中。基于高干物质产量，选择膜级分作为制备多相化妆品成分的预期来源。

表 21. 干物质在膜级分和细胞汁上清之间的分布

产品	植物来源				
	紫花苜蓿	大麦	薰衣草	金盏花	鼠尾草
新鲜生物质	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
细胞汁	32.7	28.5	28.1	37.6	21.9
膜级分	12.2	12.9	8.7	9.5	6.7
细胞汁上清	20.5	15.6	19.4	28.1	15.2

[0143] 本发明的方法允许干物质在细胞质级分和细胞浆之间的以下分布（见表 22）。

表 22. 干物质在细胞质级分和细胞浆之间的分布

产品	植物来源				
	紫花苜蓿	大麦	薰衣草	金盏花	鼠尾草
新鲜生物质	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
细胞汁	32.7	28.5	28.1	37.6	21.9
细胞汁上清	20.5	15.6	19.4	28.1	15.2
细胞质级分	2.3	0.4	0.8	0.9	0.2
细胞浆	18.2	15.2	18.6	27.2	15.0

[0144] 表 22 显示细胞质级分干物质的产量不超过最初生物质干物质的 2.5% 和后来的细胞汁上清干物质的 11%。大多数细胞汁上清干物质浓缩在细胞浆中：88.8%（紫花苜蓿），97.4%（大麦），95.9%（薰衣草），96.8%（金盏花）和 98.7%（鼠尾草）。基于高干物质产量，选择细胞浆作为可溶性化妆品成分的预期来源。

实施例 16

用于来自紫花苜蓿、大麦、薰衣草、金盏花和鼠尾草的化妆品植物成分的防腐剂和抗氧化剂的最佳组成

[0145] 经测定，防腐剂和抗氧化剂的最佳组成在所有植物来源（即，来自紫花苜蓿、大麦、薰衣草、金盏花和鼠尾草）中非常类似（见表 23）。

表 23. 稳定化细胞浆滤液所需的防腐剂和抗氧化剂（%）的最佳组成

组分	植物源				
	紫花苜蓿	大麦	薰衣草	金盏花	鼠尾草
防腐剂					
山梨酸钾	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
苯甲酸钠	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
对羟基苯甲酸甲酯钠	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
柠檬酸	-	-	0.1	-	0.1
抗氧化剂					
偏亚硫酸氢钠	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2

实施例 17

来自紫花苜蓿、大麦、薰衣草、金盏花和鼠尾草的化妆品植物成分的多种特征的比较 [0146] 在表 24 和 25 中显示了与化妆品植物成分相关的物理化学、光谱、微生物、毒理学、性能和效力数据。

表 24. 从细胞浆产生的化妆品成分的物理和化学性质

参数	化妆品植物成分和植物源				
	101 紫花苜蓿	201 大麦	301 薰衣草	401 金盏花	501 鼠尾草
固体含量, %	5.3	3.5	4.2	3.9	4.0
比重, g/cm ³	1.025	1.019	1.020	1.019	1.021
颜色	6-7	5-6	11-12	4.5	8-9
折射率	1.342	1.338	1.341	1.340	1.340
pH	4.1	4.1	3.9	3.4	3.2
氧化还原电势, mV	70	95	170	160	190
电导, S/m	0.96	1.09	0.79	0.40	0.99

表 25. 从细胞浆产生的化妆品成分的紫外光谱性质

峰	参数	化妆品植物成分和植物源				
		101 紫花苜蓿	201 大麦	301 薰衣草	401 金盏花	501 鼠尾草
1	开始, nm	400.0	400.0	400.0	400.0	400.0
	顶点, nm	324.5	335.5	260.5	260.0	330.0
	结束, nm	303.0	305.0	236.5	232.5	306.5
	高度, Abs	0.347	0.232	2.409	1.171	0.260
	面积, Abs x nm	21.197	14.254	135.505	55.719	14.952
2	开始, nm	303.0	305.0	-	-	306.5
	顶点, nm	258.0	258.0	-	-	259.0
	结束, nm	233.0	233.0	-	-	235.0
	高度, Abs	1.471	1.268	-	-	1.248
	面积, Abs x nm	65.103	55.631	-	-	57.844

[0147] 表 24 和表 25 中显示的数据证明, 尽管使用 5 种植物源原料 (甚至属于不同的植物科), 从多种细胞浆产生的化妆品植物成分的性质非常相似。此相似性对制造基于上述化妆品植物成分的高度标准化的天然产品能够非常有价值。

[0148] 表 26 中显示的数据证明, 所有检测的化妆品植物成分满足化妆品工业对 CFU 水平

(菌落形成单位)的要求。不存在病原体也满足工业对化妆品成分安全性的要求。

表 26. 从细胞浆产生的化妆品成分的微生物数据

参数	化妆品植物成分和植物源				
	101 紫花苜蓿	201 大麦	301 薰衣草	401 金盏花	501 鼠尾草
每克样品的菌落形成单位 (CFU)	<100	<100	<100	<100	<100
大肠杆菌	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
白色念珠菌	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
假单胞菌属物种	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
金黄色葡萄球菌	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0149] 另外,化妆品植物成分证明在大浓度范围内没有细胞毒性。例如,利用通常用于测定细胞毒性的涉及 3T3 成纤维细胞的中性红摄入 (NRU) 的检测评估化妆品植物成分的细胞毒性。在此体外检测群体中,NRU 值与活细胞数成比例。发现,即使在非常高的受检测的化妆品成分浓度时也未达到对 3T3 成纤维细胞的中性红摄入 (NRU) 的 50%抑制。在有关安全性谱的比较中,通过描述的方法产生的大多数化妆品植物成分与用作阳性对照的表皮生长因子 (EGF) 类似 (见表 27)。

表 27. 从细胞浆产生的化妆品成分和表皮生长因子 (EGF) 的细胞毒性数据

参数	化妆品植物成分和植物源					阳性对照
	101 紫花苜蓿	201 大麦	301 薰衣草	401 金盏花	501 鼠尾草	EGF
NRU ₅₀ , µg 干物质/mL	>2,500	>2,500	>400	>2,500	>2,430	>2,500
细胞形态学*	NCM	NCM	MLT	NCM	NCM	NCM

*NCM 正常细胞形态学 ;MLT :中等水平毒性

[0150] 当与通过传统方法从相同批次的干原料分离的水提取物或从相同植物源得到的

商业提取物比较时,从细胞浆产生的化妆品植物成分具有显著更高的安全性谱。例如,在下表中显示了有关金盏花的数据(见表 28)。

表 28. 从金盏花分离的化妆品植物成分 402、水提取物和商业提取物的细胞毒性数据

参数	受检测的产品			
	化妆品植物成分 402	水提取物	商业提取物	EGF
NRU ₅₀ , μg 干物质/mL	>2,500	41	2	>2,500
细胞形态学*	NCM	HLT	HLT	NCM

NCM:正常细胞形态学;HLT:高毒性水平

[0151] 从细胞浆产生的所有化妆品植物成分表现出抗氧化剂性能,或更具体地超氧化物清除能力。例如,测定了抑制 50% 的细胞色素 C 还原所需的浓度(ICR₅₀),使用迷迭香酸(RA)作为阳性对照(见表 29)。

表 29. 从细胞浆产生的化妆品成分和迷迭香酸的超氧化物清除能力

	化妆品植物成分和植物源					阳性对照
	101 紫花苜蓿	201 大麦	301 薰衣草	401 金盏花	501 鼠尾草	迷迭香酸
ICR ₅₀ , μg 干物质/mL	149	160	158	153	160	26.5

实施例 18

从膜级分产生的化妆品成分的表征

[0152] 在表 30 和 31 中显示了与选定的从膜级分产生的化妆品成分相关的物理化学、光学、微生物、毒理学、性能和效力数据。

表 30. 从膜级分产生的化妆品成分的物理化学性质

参数	化妆品植物成分和植物源	
	402 金盏花	502 鼠尾草
非挥发性残留物, %	7.1	8.3
比重, g/c m ³	1.054	1.047
粘度, cps	15,800	5,200
pH	4.6	4.6

表 31. 从膜级分产生的化妆品成分的 L*a*b* 值

	化妆品植物成分和植物源	
	402 金盏花	502 鼠尾草
L*	33.27	27.35
a*	20.36	-1.4
b*	49.56	16.97

[0153] 表 30 和表 31 中显示的数据证明了从叶和茎生物质（鼠尾草）和从花（金盏花）中得到的膜级分产生的化妆品成分的性质间的显著差异。一般来说，上述差异反映了主要集中在鼠尾草膜级分中的叶绿体和主要集中在金盏花中的有色体之间的差异。

[0154] 微生物分析显示出化妆品植物成分 402 和 502 满足有关 CFU 和不存在病原体的化妆品成分的化妆品工业要求（方法见上表 3）。

实施例 19

化妆品植物成分的抗炎和抗氧化剂分析：选定的实验模型的目的和基本原理

[0155] 分析了化妆品植物成分 101, 102, 201, 202, 301, 302, 401, 402, 501 和 502 以及其他化妆品植物成分的抗炎和抗氧化剂品质。这些分析的结果总结在此实施例 19 中，见下文。在实施例 20-24 中解释了程序和结果，见下文。

[0156] 所述程序涉及浓缩的浆来源和膜来源的化妆品植物成分的分布。这些成分表现出对于减少与炎症相关的结缔组织损伤的 2 种重要活性（抗蛋白水解活性和抗氧化剂活性）。抗蛋白水解活性的分布模式选择性地位于膜级分中以及随后位于多相植物化妆品成分中，而抗氧化剂活性的分布模式选择性地位于浆级分中以及随后位于可溶性化妆品成分中。膜来源的化妆品成分含有抑制两大类破坏性蛋白酶的组分，所述破坏性蛋白酶即以嗜中性粒细胞弹性蛋白酶示例的丝氨酸蛋白酶和以明胶酶 B 示例的基质金属蛋白酶。膜来源的化妆品成分实现炎性细胞的协同蛋白水解活性的抑制的潜能值得考虑将其用于抗炎制剂的局部应用。这些化妆品成分的抑制模式提示其作用是可逆的，并且，它们将不会引起不理想的对防御或修复机制的长期修饰。

[0157] 抗氧化剂活性在浆来源的化妆品成分中的选择性分布代表了掺入重要生物活性的另外的方向，所述生物活性减少由炎性细胞生成的活性氧类引起的损伤。从多种植物源

得到的浆来源的化妆品成分具有降低炎性细胞产生活性氧类的能力的有力的调节活性,而不是简单地中和氧化剂。在浆来源的化妆品成分的生成中应用的所描述的方法导致此调节活性和清除活性的保存。用于得到水性提取物的传统程序仅简单地单独实现清除活性的一些分布。

[0158] 一种类型的生物活性在膜来源的化妆品成分中的选择性分布,和另一种活性在从相同植物源得到的浆来源的化妆品成分中的选择性分布代表了应用新型局部制剂的机会,在所述制剂中在稳定的组合物中维持双相。

[0159] 评估了化妆品植物成分 101, 201, 301, 401, 402, 501 和 502 (在此处统称为“化妆品植物成分”) 的抗炎和抗氧化剂活性。炎性过程可引起的结缔组织损伤存在多种机制。导致炎性组织损伤的一个最终共同途径涉及白血细胞来源的蛋白水解酶对基质组分的破坏。因此,应用了用于评估不同化妆品植物成分抑制这些炎性蛋白酶的能力的测定。在评估中使用两种蛋白酶:嗜中性粒细胞弹性蛋白酶和嗜中性粒细胞明胶酶。这两种酶以协同方式降解人结缔组织的细胞外基质成分。此外,嗜中性粒细胞弹性蛋白酶可使机体自身对嗜中性粒细胞明胶酶的抑制性防御失活,而相反地,明胶酶能够使机体自身对弹性蛋白酶的防御失活。因此,能够抑制这两种酶的化妆品植物成分提供了对炎性损伤的显著保护。选定的测定允许这些化妆品植物成分的抑制活性的定量,并提供了有关抑制模式的一些基本特征的信息。

[0160] 除了降解性蛋白酶以外,炎性过程经常与活性氧类别从激活的细胞中的释放有关。这些活性类别包括超氧化物阴离子、羟基自由基、过氧化氢和次氯酸。这些氧化剂的生物作用能够导致人组织中重要的内源抗蛋白水解防御的失活。应用这样的测定,所述测定测量化妆品植物成分降低从激活的炎性细胞释放的活性氧类别的水平的能力。另外,使用这样的测定,所述测定定量化妆品植物成分中和内源和外源来源的活性氧类别的能力。

实施例 20

抗弹性蛋白酶活性的评估

[0161] 在炎性过程中,弹性蛋白酶活性与多种酶的作用直接相关,但嗜中性粒细胞弹性蛋白酶以最高浓度存在并且是针对包括弹性蛋白的最多种结缔组织组分的最活跃的蛋白酶。在评估测定中,使用嗜中性粒细胞弹性蛋白酶特异性的合成的可溶性肽底物(甲氧基琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Val-对硝基苯胺)抑制此酶。嗜中性粒细胞弹性蛋白酶源是来源于患有囊肿性纤维化患者的气道分泌物的纯化的酶制剂。抑制的浓度依赖性的分析导致抑制活性效力的定量。以得到 50% 抑制 (IC_{50}) 所需的每种化妆品植物成分内的干物质浓度表达此活性。另外,测定抑制常数, K_i 的值。抑制数据的图解分析也提供了与抑制模式(可逆或不可逆)相关的信息。因为当以受控的水平存在时,嗜中性粒细胞弹性蛋白酶具有正面的生理作用,不可逆抑制剂的滥用可损害酶的这些正常功能。

[0162] 表 32 描述了浆来源和膜来源的化妆品成分的体外弹性蛋白酶抑制研究的结果。

表 32. 化妆品植物成分的弹性蛋白酶抑制评估

化妆品植物成分(源)	IC_{50} ($\mu g/ml$)	K_i ($\mu g/ml$)
------------	--------------------------	----------------------

101(紫花苜蓿浆级分)	无抑制	无抑制
102(紫花苜蓿膜级分)	9.5	7.2
201(大麦浆级分)	无抑制	无抑制
202(大麦膜级分)	4.6	3.6
301(薰衣草浆级分)	36.0	25.4
302(薰衣草膜级分)	10.0	2.3
401(金盏花浆级分)	无抑制	无抑制
402(金盏花膜级分)	21.0	0.68
501(鼠尾草浆级分)	115.0	70.3
502(鼠尾草膜级分)	30.0	12.0
阳性对照 (Elhibin®)	4.0	3.4

[0163] 已经主要在从膜级分得到的化妆品成分中鉴定了弹性蛋白酶抑制活性。从紫花苜蓿、大麦和金盏花浆级分产生的化妆品成分未展示任何弹性蛋白酶抑制。从薰衣草和鼠尾草浆级分得到的化妆品成分与对应的从膜级分得到的化妆品成分相比未显示低得多的抑制活性。对于所有受检测的原料来源,发现弹性蛋白酶抑制活性在膜来源和浆来源的化妆品植物成分之间的上述分布模式。

[0164] 从膜级分得到的选定的化妆品成分表现出弹性蛋白酶抑制活性,其与用作阳性对照的特异性弹性蛋白酶抑制剂的活性在量上是可比较的。

[0165] 从膜级分得到的化妆品成分表现出与“经典的”简单竞争性和可逆弹性蛋白酶抑制剂一致的性能,而阳性对照具有复杂的抑制行为(包括一些不可逆的抑制活性)。

[0166] 从膜级分产生的化妆品成分对大多数破坏性炎性蛋白酶(嗜中性粒细胞弹性蛋白酶)的抑制性质使这些成分有资格作为用作抗炎剂的局部产品的有价值的成分。

实施例 21

金盏花产品的弹性蛋白酶抑制评估

[0167] 下文描述了金盏花产品的体外弹性蛋白酶抑制评估并总结在表 33 中。

表 33. 金盏花产品的弹性蛋白酶抑制评估

化妆品植物成分(源) 和提取物	IC ₅₀ (μg/ml)	K _i (μg/ml)
401(金盏花浆级分)	无抑制	无抑制
402(金盏花膜级分)	21.0	0.68
商业提取物(金盏花)	120.0	152.0
传统提取物(金盏花)	无抑制	无抑制

[0168] 从金盏花膜级分得到的化妆品成分 402 表现出最高的弹性蛋白酶抑制活性,但化妆品成分 401 没有可检测到的抑制活性,所述化妆品成分 401 从浆级分得到,来源于相同原料并在细胞汁分级过程中与膜级分分离。

[0169] 通过传统提取方法产生的水提取物是从相同批次的原料得到的并且未显示弹性蛋白酶抑制活性。

[0170] 来源于相同原料的商业提取物仅显示了最低的抗弹性蛋白酶活性。

[0171] 来源于相同原料的化妆品成分 402 显示了比商业提取物高约 2 个数量级的抗弹性蛋白酶活性。

实施例 22

化妆品植物成分的抗明胶酶活性的评估

[0172] 嗜中性粒细胞含有基质金属蛋白酶类别中的 2 种主要酶:嗜中性粒细胞胶原酶(MMP-8)和明胶酶 B(MMP-9),二者均与广泛的结缔组织破坏有关。因为弹性蛋白酶对天然胶原具有低活性,并且嗜中性粒细胞胶原酶自身不能单独溶解结缔组织蛋白,认为明胶酶 B 是对细胞外基质造成炎症损伤的主要贡献者。使用针对此酶的特异性测定评估化妆品植物成分抑制由炎症细胞来源的基质金属蛋白酶介导的细胞外基质降解的潜能。通过低分子量合成底物(APMA)的水解检测明胶酶 B 活性。明胶酶 B 的抑制剂以剂量依赖的形式减少酶反应产物形成的加速速率。当对反应混合物加入受检测的化妆品成分时发现此类酶抑制。

[0173] 下文描述了有关化妆品植物成分的抗明胶酶 B 数据并总结在表 34 中。

表 34. 化妆品植物成分的体外明胶酶 B 抑制评估

化妆品植物成分(源)	%抑制 [100 μ g/ml]
101(紫花苜蓿浆级分)	20
201(大麦浆级分)	32
301(薰衣草浆级分)	21
401(金盏花浆级分)	42
501(鼠尾草浆级分)	29
502(鼠尾草膜级分)	100
阳性对照(迷迭香酸)	91

[0174] 所有浆来源的化妆品植物成分都表现出适度的明胶酶 B 抑制活性。

[0175] 从鼠尾草膜级分得到的化妆品植物成分 502 表现出显著的明胶酶 B 抑制活性,超过浆来源的化妆品成分的对活性至少 3 倍。明胶酶 B 抑制活性在膜来源和浆来源的化妆品成分之间的分布模式与发现的抗弹性蛋白酶活性的分布模式类似。

[0176] 从鼠尾草膜级分得到的化妆品植物成分表现出与具有 $IC_{50} = 30 \mu$ g/ml 的阳性对照(迷迭香酸)可比较的有力的明胶酶 B 抑制活性($IC_{50} = 24.9 \mu$ g/ml)。

[0177] 膜来源的化妆品植物成分对明胶酶 B 的抑制性能提示,此成分具有作为抗炎局部

产品的活性组分价值。

实施例 23

化妆品植物成分的超氧化物清除活性的体外评估

[0178] 由激活的炎性细胞（内源或外源）生成的活性氧类别产生用于提供超氧化物清除活性的测量的特异性氧化剂。用于评估超氧化物清除活性的测定涉及抗氧化剂活性的一种形式，其有利于中和与氧化相关的损伤。为了以高产和可控的形式产生超氧化物阴离子，使用酶促系统（黄嘌呤氧化酶）。通过此酶的黄嘌呤至次黄嘌呤的转化产生大量超氧化物阴离子，其与提供的底物量是化学计量的。使用的测定是基于细胞色素 C 从其三价铁至亚铁形式的还原作为超氧化物水平的敏感测量。使用细胞色素 C 的还原检测通过黄嘌呤氧化酶作用于黄嘌呤产生的超氧化物阴离子的优势在于，相同的测量可用于检测经历“呼吸爆发”的激活的炎性细胞的超氧化物阴离子的释放。推测化妆品植物成分抑制细胞功能的一些方面，而不是作为细胞产生的活性氧类别的清除剂，所述化妆品植物成分降低呼吸爆发的量但不清除酶促产生的超氧化物阴离子。

[0179] 在下文和表 35 和 36 中描述了超氧化物清除数据。

表 35. 化妆品植物成分的超氧化物清除活性的评估

化妆品植物成分（源）	IC ₅₀ （μg/ml）
101（紫花苜蓿浆级分）	149
102（紫花苜蓿膜级分）	无抑制
201（大麦浆级分）	160
202（大麦膜级分）	无抑制
301（薰衣草浆级分）	158
302（薰衣草膜级分）	无抑制
401（金盏花浆级分）	153
402（金盏花膜级分）	无抑制
501（鼠尾草浆级分）	> 160
502（鼠尾草膜级分）	无抑制
阳性对照（迷迭香酸）	26.5

[0180] 超氧化物清除能力完全集中在浆来源的化妆品植物成分中。膜来源的化妆品植物成分没有表现出任何超氧化物清除能力。在所有检测的原料来源中发现超氧化物清除能力的上述分布模式。

[0181] 浆来源的化妆品植物成分表现出阳性对照（迷迭香酸）的约 20％的超氧化物清除

能力。

[0182] 浆级分的超氧化物清除能力提示,这些化妆品植物成分具有作为充当局部抗氧化剂和紫外线保护产品的保护性组分的价值。

表 36. 金盏花产品的超氧化物清除活性的评估

化妆品植物成分或提取物	IC ₅₀ (μg/ml)
401 (金盏花浆级分)	153
402 (金盏花膜级分)	无抑制
商业提取物 (金盏花)	> 160
传统提取物 (金盏花)	53

[0183] 金盏花浆来源的化妆品植物成分表现出显著的超氧化物清除能力,但膜来源的化妆品植物成分 (来源于相同原料) 没有可检测到的抑制能力。

[0184] 来源于相同原料的商业提取物显示了与浆来源的化妆品植物成分可比较的超氧化物清除能力。

[0185] 通过传统方法从相同批次的原料分离的水提取物表现出比浆来源的化妆品植物成分或商业提取物更高的超氧化物清除能力。

实施例 24

化妆品植物成分对嗜中性粒细胞呼吸爆发的作用的评估

[0186] 使用体外酶促产生的超氧化物阴离子来源,和使用由激活的炎性细胞 (即,嗜中性粒细胞) 产生的体内活性氧类别测量了在前面的实施例 23 中描述的不同化妆品植物成分的超氧化物清除活性。嗜中性粒细胞是特别重要的活性氧类别源,因为它们参与局部炎症位点的数量最多并且因为它们将一些类别,例如超氧化物阴离子和过氧化氢转化为抗氧化剂,例如次氯酸。检测由嗜中性粒细胞释放进细胞外环境的超氧化物是这些细胞产生多种活性氧类别,统称为“呼吸爆发”的总体活性水平的敏感测量。使用与用于检测酶促形成的超氧化物,即,高铁细胞色素 C 相同的试剂检测来源于嗜中性粒细胞的细胞外超氧化物。因为此分子是蛋白质并且不能进入嗜中性粒细胞,其不检测细胞内活性氧类别。

[0187] 使用佛波醇十四酸酯乙酸酯 (PMA) 作为体内呼吸爆发的刺激物,已知 PMA 模拟嗜中性粒细胞激活的至少两条独立途径的信号。PMA 激活的嗜中性粒细胞的细胞色素 C 还原速率与这些细胞中的呼吸爆发的量成比例。以在加入 PMA 之后 150 秒迟滞期后观察到的细胞色素 C 还原的最大速率的方式表示剂量依赖性抑制的结果。

[0188] 有关嗜中性粒细胞呼吸爆发抑制研究的数据的综述显示在表 37 中。

表 37. - 化妆品植物成分的嗜中性粒细胞呼吸爆发评估

化妆品植物成分 (源)和提取物	V _{最大}				剂量应答作用
	0 μg/ml	0.5 μg/ml	25.0 μg/ml	50.0 μg/ml	
对照(未刺激的)	1.96	-	-	-	-
对照(刺激的)	18.86	-	-	-	-
501(鼠尾草浆组分)	-	12.11	11.0	19.0	抑制/刺激
401(金盏花浆组分)	-	9.11	8.79	19.48	抑制/刺激
商业提取物 (金盏花)	-	15.15	11.29	10.33	仅抑制
传统提取物 (金盏花)	-	21.26	10.33	8.82	仅抑制

[0189] 受检测的化妆品植物成分 401 和 501 都表现出对来自 PMA 刺激的嗜中性粒细胞的呼吸爆发的双相调节。在低浓度,浆来源的化妆品植物成分显示了强抑制活性,但在高浓度此抑制活性被单独用 PMA 刺激的嗜中性粒细胞的上述呼吸爆发的净适度刺激替代。因此,浆来源的化妆品植物成分含有对嗜中性粒细胞具有刺激作用的组分,但这些组分仅具有中等效力,因为仅在高浓度上观察到刺激。另外,浆来源的化妆品植物成分含有在非常低浓度上抑制呼吸爆发的其他组分。在这些低浓度(~2.5 μg 干物质/ml)上的嗜中性粒细胞呼吸爆发的抑制不能简单地归因于超氧化物清除活性,所述超氧化物清除活性需要在高得多的干物质浓度(~150 μg/ml)上才可检测到。

[0190] 来源于金盏花的商业提取物没有显示任何刺激作用,并仅表现出呼吸爆发活性的抑制。

[0191] 通过传统方法从与浆来源的化妆品植物成分相同批次的金盏花分离的水提取物没有显示刺激活性。传统提取物没有保留任何在非常低浓度(2.5 μg/ml)的浆来源的化妆品植物成分中可见的对嗜中性粒细胞呼吸爆发的极其有效的抑制活性。

实施例 25

用于测定化妆品植物成分 101,201,301,401,402,501 和 502 的某些特征的方案

[0192] 下面是用于测定化妆品植物成分 101,201,301,401,402,501 和 502 的某些特征的多种方法。上述实施例通篇参考了这些方法。下文提及的“受检测的产品”或“检测样品”指化妆品植物成分 101,201,301,401,402,501 和 502。

[0193] 方法 1:测定固体含量的方法。测定固体含量的程序包括在 100℃的水浴中蒸发受检测的产品直到水分完全蒸发,在 105℃的烤箱中储存样品 3 小时,冷却至室温,并立即测定具有固体物质的容器的重量。

[0194] 方法 2:测定非挥发性残留物的方法。测定非挥发性残留物的程序包括在 105℃的烤箱中储存检测产品 5 小时,冷却并立即测定具有固体物质的容器的重量。

[0195] 方法 3:测定 L*a*b* 值的方法。测定 L*a*b* 值的程序利用具有 0°/45° 的测量几何的 Hunter Labscan 固定几何热量计。使用具有朝上的观察窗的标准光源 D₆₅。将具有受检测的产品的容器置于观察窗上并通过底部测量。使用以下 CIELAB 方程:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$DE^* = [(DL)^2 + (Da^*)^2 + (Db^*)^2]^{1/2}$$

$$DH = [(DE^*)^2 - (DL^*)^2 - (DC^*)^2]^{1/2}$$

[0196] 方法4:测量总类胡萝卜素含量和叶黄素含量的方法。用丙酮提取受检测的样品。在均质化和真空过滤后,用在甲醇中的30%氢氧化钾皂化所有提取物。用石油醚连续提取类胡萝卜素。在其他处理和重新溶解于乙醇后,在446nm处测量所有样品。

[0197] 为了测定叶黄素含量,使用来自每种样品提取物的另外的干燥样品用于HPLC分析。在MTBE和甲醇中重新溶解干燥的样品。使用具有(250×4.60mm I.D.)5μm C₁₈柱(“Vydac”)的反相HPLC系统。通过真实标准物的联合色谱法确认叶黄素的身份。叶黄素在乙醇中的摩尔吸收率系数是144,800cm⁻¹mol⁻¹。

[0198] 方法5:测定弹性蛋白酶抑制活性的方法。使用这样的测定来确定受检测的级分的弹性蛋白酶抑制活性,所述测定利用嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(“Elastin Products”生产的纯化酶制剂)和“Sigma”生产的合成肽可溶性底物甲氧基琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Val-对硝基苯胺。底物的酶促切割导致随时间增加的黄色颜色(405nm);增加含有抑制活性的受检测的级分的浓度降低了颜色产生的速率。抑制的浓度依赖性的分析允许定量抑制活性的效力,所述效力以实现50%抑制所需的每个受检测的级分中的干物质浓度(IC₅₀)表示,并提供了有关抑制模式的信息。

[0199] 为了测定IC₅₀,弹性蛋白酶的浓度为2.5μg/ml,底物浓度为150μM。为了测定K_i,底物浓度为100μM和200μM。

[0200] 方法6:测定明胶酶B抑制活性的方法。在洗去其他蛋白酶后,使用商业化的测定(“Amersham Pharmacia”生产的MMP-9活性ELISA),其通过免疫识别将明胶酶B特异性捕获在多孔微板上。通过明胶酶B的低分子量合成底物:APMA的水解在405nm处检测酶促活性。抑制的浓度依赖性的分析被用于测定受检测的产品干物质的效力。

[0201] 方法7:测定超氧化物清除活性的方法。使用利用黄嘌呤氧化酶(“Sigma”生产的纯化的酶制剂)的酶系统以高产量和可控的形式产生超氧化物阴离子。通过此酶的黄嘌呤至次黄嘌呤的转化产生大量超氧化物阴离子,并使用高铁细胞色素C至亚铁细胞色素C的还原作为超氧化物水平的敏感测量。当对反应体系加入受检测的级分时,亚铁细胞色素C水平的测量(550nm)允许测定其超氧化物清除活性。每孔的终浓度为75μM细胞色素C,425μm/L黄嘌呤,和10mU/ml黄嘌呤氧化酶。

[0202] 方法8:测定嗜中性粒细胞呼吸爆发的抑制的方法。使用佛波醇十四酸酯乙酸酯(Alexis Corporation, San Diego, Calif. 生产的PMA)作为嗜中性粒细胞表现出的呼吸爆发活性的触发物。通过测量亚铁细胞色素C水平实现对嗜中性粒细胞释放进细胞外环境的超氧化物阴离子的检测。PMA激活的嗜中性粒细胞的细胞色素C还原速率与这些细胞中的呼吸爆发的量成比例。以加入PMA之后150秒迟滞期后在550nm处观察到的细胞色素C还原的最大速率的方式表示剂量依赖性抑制的结果。

实施例 26

用于测定包括化妆品植物成分601和701的本发明的多种化妆品植物成分的某些特征的方案

[0203] 下面是用于测定本发明的多种化妆品植物成分,包括但不限于化妆品植物成分601和701的某些特征的多种方法。实施例通篇参考了这些方法。在特定的例子中,下文提及的“受检测的产品”或“检测样品”指化妆品植物成分601和/或701。

摩尔渗透压浓度

[0204] 摩尔渗透压浓度是溶质浓度的测量,其被定义为每 kg 溶液的溶质渗透压摩尔数。摩尔渗透压浓度测量每单位溶液质量的溶质颗粒的渗透压摩尔数。摩尔渗透压浓度与摩尔浓度不同,因为其测量溶质粒子的摩尔数而不是溶质的摩尔数。此区别的产生是由于一些化合物能够在溶液中解离,而其他化合物不能。离子化合物,例如盐能够在溶液中解离为其组分离子,因此在溶液的摩尔浓度和摩尔渗透压浓度之间不存在一一对应的关系。例如,氯化钠 (NaCl) 解离为 Na^+ 和 Cl^- 离子。因此,对溶液中的每 1 摩尔 NaCl,存在 2 渗透压摩尔的溶质粒子(即,1M NaCl 溶液为 20sm NaCl 溶液)。钠和氯离子都影响溶液的渗透压。非离子化合物不解离,每 1 摩尔溶质仅形成 1 渗透压摩尔溶质。例如,1M 葡萄糖溶液是 10sm(Widmaier, Eric P. ;Hershel Raff, Kevin T.Strang(2008).Vander' s Human Physiology, 第 11 版 McGraw-Hill. 第 108-112 页)。使用 3250 型渗压计 (Advanced Instruments, Inc) 测定成分的摩尔渗透压浓度。此仪器利用凝固点降低作为测量原理。凝固点是依赖于存在的溶解的颗粒及其数量,而不是其身份的依数性质。当溶质是电解质,例如多种盐和非电解质,例如碳水化合物时都出现凝固点降低。

干物质

[0205] 干物质反映成分中非挥发性组分的浓度。通过比较液体样品重量与液体组分蒸发后残留的干物质的重量测定干物质水平。利用一次性铝称量盘 (VWR25433-016), Ohaus Explorer E00640 天平 (Ohaus Corporation) 和设定为 105C 的 Shel Lab1400E 型烤箱 (VWR)。以 $(\text{'皮重'} + \text{'干重'} - \text{'皮重'}) / (\text{'皮重'} + \text{'湿重'} - \text{'皮重'}) * 100$ 计算干物质百分比。

颜色 (加德纳色标)

[0206] 在 ASTM D1544 中指定的加德纳色标是用于对具有范围从淡黄到棕红的颜色特征的传光样品分级的单个数字色标。通过玻璃标准品的色品定义标度,编号从最浅的 1 至最深的 18。在 Lovibond 加德纳比较器 3000 (The Tintometer Limited of Salisbury, UK) 上测定样品的加德纳颜色,所述仪器是通过与有色玻璃标准品直接比较肉眼测定样品的 3 场仪器。

折射率, nD

[0207] 通过在来自 Reichert Analytical Instruments (Depew, NY) 的 Arias500 折射计上测定折射率,所述折射计具有由来自 Cole-Parmer (Vernon Hills, Illinois) 的 Polystat12108-10 型温度控制器提供的温度调节。方法基于 Arias500 折射计的说明书,章节 6.0, 4.1 和 4.4-4.5。

pH 测定

[0208] pH 被定义为溶液中氢离子活性的十进制对数的负数, pH 用于测量溶液的酸度或碱度。

[0209] 在具有 pH/ATC 电极编号 300729.1 (Denver 仪器公司) 的来自 Denver 仪器公司 (Bohemia, NY) 的 pH 计 250pH 型 /ISE/ 电导仪上测定 pH 水平。方法是基于 Denver 仪器公司 301127.1 Rev. D 手册,第 ii 和 9-12 页。

λ 最大, nm

[0210] 在来自 Biochrom Ltd (Cambridge, UK) (以前属于 GEHealthcare, 原名为 Amersham

Biosciences) 的具有水加热比色皿座 (Amersham 零件 #80-2106-08) 的 Ultrospec4300pro UV/ 可见光分光光度计上测定 λ 最大, nm。方法是基于名为 SWIFT II 应用软件 UV/ 可见光分光光度计的 Amersham 手册号 80-2108-25 的章节 2 和 4, 和名为 Ultrospec4300pro UV/ 可见光分光光度计用户手册的 Amersham 手册号 80-2111-79 的第 7 和 15 页。通过 SWIFT II 软件套装 (Biochrom Ltd) 提供仪器控制, 和来自 Torrey Pines Scientific (Carlsbad, CA) 的 CB20 迷你循环器提供温度调节。

蛋白质的测定

[0211] 使用凯氏测氮法测量蛋白质的氮含量。

微生物限度

[0212] 微生物含量和限度: 根据美国药典 XXX, NF25, < 61 >, 微生物限度试验测定总平板计数, CFU/g; 霉菌和酵母, CFU/g; 大肠杆菌; 沙门氏菌属物种; 金黄色葡萄球菌; 假单胞菌属物种。

胰蛋白酶抑制

[0213] 胰蛋白酶是参与体内表皮增殖和炎症的蛋白水解酶。通过为使用 96 孔微滴定板 (微板) 和计算机控制的微板阅读器设计的动力学比色测定确定胰蛋白酶抑制活性。通过黄色的显色指示切割底物的酶促活性, 黄色显色测量为在 405nm 波长处的吸光度的增加。将相对阴性对照孔的吸光度增加的平均最大速率视为 100% 的酶活性, 并以酶活性降低至 50% 所需的孔中的样品浓度计算 IC_{50} 。较低的 IC_{50} 值指示较高的胰蛋白酶抑制活性。从 Sigma-Aldrich 得到 L-BAPA (N α -苯甲酰-L-精氨酸 4-硝基苯胺盐酸盐) 底物, 胰蛋白酶和溶剂试剂。使用 pH8.2 Tris-CaCl₂ 缓冲液制备胰蛋白酶和 L-BAPA 底物的工作溶液。使用去离子水作为缓冲试剂的溶剂, 作为阴性对照, 和作为制备样品的系列稀释物的稀释剂。每孔中的反应体积为 200 μ l, 胰蛋白酶浓度等于 60nM, 底物浓度等于 0.5mM。

酪氨酸酶抑制

[0214] 酪氨酸酶是含铜的单加氧酶, 其催化单酚邻羟基化成为对应的儿茶酚 (单酚酶或甲酚酶活性), 和单酚氧化成为对应的邻醌 (二酚酶或儿茶酚酶活性)。酪氨酸酶的这些功能在黑素生成期间的黑色素形成中起重要作用。黑色素产生是皮肤颜色的主要原因, 并在预防阳光诱导的皮肤损伤中起重要作用。然而, 黑色素产物在皮肤中的异常积累是包括肝斑、黄褐斑、雀斑和老年雀斑的色素沉着过度的原因, 这能够导致不理想的审美外观 (Jeon 等人 (2005) Bull. Korean Chem. Soc, 26 卷: 1135-1137)。

[0215] 酪氨酸酶是在黑色素生物合成中的重要酶。使用酪氨酸酶抑制测定寻找能够干扰蘑菇酪氨酸酶将 L-酪氨酸转化为 L-二羟基苯丙氨酸 (L-DOPA) 的能力的成分。

[0216] 通过为使用 96 孔微滴定板 (微板) 和计算机控制的微板阅读器设计的动力学比色测定确定酪氨酸酶抑制活性。通过棕色显色指示将 L-酪氨酸底物转化为 L-DOPA (L-3, 4-二羟基苯丙氨酸) 的酶促活性, 棕色显色测量为在 475nm 波长处的吸光度的增加。将相对阴性对照孔的吸光度增加的平均最大速率视为 100% 的酶促活性, 并以将酶活性降低至 50% 所需的孔中的样品浓度计算 IC_{50} 。较低的 IC_{50} 值指示较高的胰蛋白酶抑制活性。L-酪氨酸底物和蘑菇酪氨酸酶从 Sigma 得到。1X pH7.4 PBS (磷酸盐缓冲液) 缓冲溶液从 Gibco 得到。使用 PBS 用于制备蘑菇酪氨酸酶和 L-酪氨酸底物的工作溶液。使用去离子水作为阴性对照和作为制备样品的系列稀释物的稀释剂。每孔中的反应体积为 200 μ L,

蘑菇酪氨酸酶的浓度等于 13 单位 /mL, L- 酪氨酸底物浓度等于 0.5mM。

LDH(乳酸脱氢酶)释放细胞毒性法

[0217] LDH(乳酸脱氢酶)释放细胞毒性测定法是基于以下事实,即某些细胞组分物质一般隐藏在细胞内,而在细胞外介质中罕有。细胞活力的丧失导致细胞膜完整性的丧失和这些物质的释放。能够使用染料通过比色法测量细胞外 LDH 浓度,所述染料通过 LDH 转化为有色形式。因此能够通过如下测定检测物品的细胞毒性:将检测物品加入细胞培养物的生长培养基,在合适的孵育时间后测量培养基中的 LDH 浓度,并将结果与从健康的未处理细胞的阴性对照细胞培养物的生长培养基中得到的结果,以及从用已知细胞毒性剂处理的阳性对照细胞培养物中得到的结果相比较。

MatTek MelanoDerm 测定

[0218] MatTek Melanoderm 测定法测定检测物品对黑色素相关的皮肤色素沉着的作用(例如变白/变亮应用)。此测定是基于在模建人表皮及其颜色形成的正常人角化细胞和黑色素细胞的共培养物中的宏观和微观观察和终点黑色素含量测定。在研究期间维持和观察 Melanoderm 细胞培养物,用未处理的阴性对照与阳性对照,以及下述培养物对比,所述阳性对照的生长培养基已加入已知影响黑素生成的物质,所述培养物的生长培养基已加入检测物品。在研究结束时收获细胞培养物并对其使用比色法测量黑色素含量。

抗氧化剂活性

[0219] 抗氧化剂是减少由氧化引起的损伤的活性剂。通过 ORAC 检测,使用适用于 BioTek Instruments Inc(Winooski, VT) 的 Synergy2 微板阅读器的方法测定抗氧化剂活性,所述方法在 BioTek 的应用注释“Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC) Assays with Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader”中描述,所述应用注释可从 (www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf) 得到。在此测定中,AAPH(2,2'-偶氮二(2-氨基丙烷))产生损伤荧光探针(荧光素钠)的活性氧类别。抗氧化剂例如(R)-Trolox 甲醚阻止或减慢此损伤,其作用可通过荧光测量定量。在设定为 485nm 的激发波长和设定为 528nm 的发射波长处取得荧光读数,反应体积为 200 μ l, AAPH 浓度为 55mM,荧光素钠浓度为 1.33 μ M, (R)-Trolox 甲醚浓度范围在 80 μ M 和 2 μ M 之间。荧光素钠(Fluka46960), AAPH(Sigma440914)和 (R)-Trolox 甲醚(Fluka93509)从 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO) 得到。计算 AUC(曲线下面积)值作为比例(孔现在的荧光读数除以孔第一次荧光读数)之和。从具有 (R)-Trolox 甲醚的孔和具有检测物品的孔的 AUC 中减去具有去离子水的孔的平均 AUC 值以得到对应于抗氧化剂保留的荧光的 AUC。以孔的抗氧化剂相关的 AUC 的函数产生校准曲线,所述曲线显示了 (R)-Trolox 甲醚重量等价 ORAC 活性。然后以实现等于由 1 单位重量 (R)-Trolox 甲醚产生的抗氧化剂效果所需的单位重量检测物品计算检测物品的 ORAC 活性,较低的数值指示较高的 ORAC 活性。

DPPH(2,2-联苯-1-苦肟基)自由基清除活性

[0220] 自由基清除剂是在生物系统中与自由基反应的成分,其降低自由基诱导的损伤,并保护免受自由基的作用。通过适用于 SUN-SRi(Rockwood, TN) 的玻璃包被的聚丙烯 96 孔微滴定板(货号 400062)和 BioTek Instruments Inc(Winooski, VT) 的 Synergy2 微板阅读器的动力学比色法测定自由基清除活性,即 DPPH(2,2-联苯-1-苦肟基)自由基清除活性。在 515nm 波长处测量吸光度。在每个微板孔中的反应体积为 200 μ l, DPPH 的初始浓

度等于 114 μ M。使用 L- 抗坏血酸作为阳性对照。DPPH(Sigma D9132) 和 USP L- 抗坏血酸 (Sigma A-2218) 从 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO) 得到。计算反应的化学计量并表示为猝灭 1 单位重量 DPPH 所需的单位重量检测物品, 较低的数值指示较高的活性。此方法改编自在 (W.Brand-Williams 等人在 LWT-Food Science and Technology, 第 28 卷, 第 1 期, 1995, 第 25-30 页上发表的“Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”) 中描述的程序。

超氧化物清除测定

[0221] 超氧化物清除测定的方案改编自 Journal of Neuroscience Methods 97 (2000) 第 139-144 中的“Rapid Microplate Assay for Superoxide Scavenging Efficiency”。

实施例 27

来源于红三叶草 (红车轴草 (*Trifolium pratense*)) 细胞浆级分的化妆品植物成分 601 的制备

[0222] 制备化妆品植物成分 601 的方法与在实施例 1 中描述的有关化妆品植物成分 101 的方法相同, 具有如下所述的变异。使用红三叶草 (红车轴草 (*Trifolium pratense*)) 的新鲜茎、花和叶组织作为植物生物质起始材料。经计算, 在新鲜红三叶草植物生物质中的干物质水平为 15.16%, 需要收获约 560kg 新鲜红三叶草植物生物质以得到 100kg 干物质。所述制备导致化妆品植物成分 601 的 15.36kg 干物质产量 (或约 300 升) 的产生。

实施例 28

来源于红三叶草 (红车轴草 (*Trifolium pratense*)) 细胞浆级分的化妆品植物成分 601 的产品规格

[0223] 根据实施例 27 中的上述方法制备化妆品植物成分 601。

[0224] 如下所述进行化妆品植物成分 601 的分析以测定其多种物理化学、微生物和生物活性特征。化妆品植物成分 601 是澄清液体, 其具有黄色 - 微红色的颜色和特征气味。在载体介质中未加入溶剂 (即甘油、油或水)。

[0225] 表 38 总结了化妆品植物成分 601 的物理、化学和感官特征。

表 38 : 化妆品植物成分 601 的物理、化学和感官特征

特征	描述/范围
外观	澄清黄色-微红色的液体
气味	特征
在水中的溶解性	可任意比例溶解
颜色(加德纳色标)	5-7
干物质 (%)	4.5-6.1
折射率(nD)	1.3440 – 1.3460
pH	3.8-4.2
摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)	780-910
UV 最大, nm	350-358
总平板计数 (CFU / gm)	< 10
霉菌/ 酵母(CFU / gm)	< 10
大肠杆菌(CFU / gm)	阴性 / 10 gm
沙门氏菌属物种(CFU / gm)	阴性 / 10 gm
金黄色葡萄球菌(CFU / gm)	阴性 / 10 gm
假单胞菌属物种(CFU / gm)	阴性 / 10 gm

[0226] 通过凯氏测氮法测定化妆品植物成分 601 含有 0.101-0.104% 的氮, 显示其基本不含蛋白质。

[0227] 蛋白质, 包括在植物中的蛋白质, 能够在敏感个体中引起蛋白质接触皮炎。在与成因蛋白质材料接触后不久, 这些个体能够经历例如皮肤上的急性荨麻疹或出现水泡的症状, 常伴有瘙痒、灼伤和 / 或刺痛。(V. Janssens, 等人, “Protein contact dermatitis: myth or reality?”, British Journal of Dermatology 1995; 132: 1-6)。

[0228] 因此, 非常希望护肤品材料含有尽可能少的蛋白质。在本文中使用的“基本不含蛋白质”表示使用凯氏测氮法测定的小于 1% (从 0% 至 1%) 的总蛋白质含量。

[0229] 微生物分析表明化妆品植物成分 601 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求。测定化妆品植物成分 601 当在 15 和 25°C 之间的温度在避光密闭容器中储存时稳定 (即, 维持物理和化学完整性) 至少 12-18 个月。化妆品植物成分 601 是可生物降解的成分。

实施例 29

有关化妆品植物成分 601 红三叶草 (红车轴草 (*Trifolium pratense*)) 细胞浆级分的

活性和测定数据的总结

[0230] 根据蘑菇酪氨酸酶抑制效力检测,红三叶草浆级分能够抑制酪氨酸酶,取得约 0.02% w/v 的 IC_{50} 值。

[0231] 根据超氧化物清除测定(方案改编自 Journal of Neuroscience Methods 97(2000) 第 139-144 中的“Rapid Microplate Assay for Superoxide Scavenging Efficiency”),红三叶草浆级分能够清除超氧化物,取得约 0.03% w/v 的 IC_{50} 。

[0232] 根据 DPPH 自由基清除测定(方案基于 LWT-Food Science and Technology, 第 28 卷,第 1 期,1995,第 25-30 页中的“Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”),红三叶草浆级分能够猝灭 DPPH,完全猝灭 1 单位重量的 DPPH 需要约 9.5 单位干重的材料。

[0233] 根据氧自由基吸收能力测定(方案基于 BioTek Instruments 的应用注释“Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC) Assays with Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader”),红三叶草浆级分能够作为抗氧化剂,提供等于 1 单位重量的 (R)-Trolox 甲醚的 ORAC 作用需要约 4.4 单位干重的材料。

实施例 30

来源于莲花(莲(Nelumbo nucifera))细胞浆级分的化妆品植物成分 701 的制备

[0234] 制备化妆品植物成分 701 的方法与在实施例 1 中描述的有关化妆品植物成分 101 的方法相同,具有如下所述的变异。使用莲花(莲(Nelumbo nucifera))的新鲜茎、花和叶组织作为植物生物质起始材料。经计算,在新鲜莲花(莲(Nelumbo nucifera))植物生物质中的干物质水平为 20.7%,需要收获约 483kg 莲花(莲(Nelumbo nucifera))植物生物质以得到 100kg 干物质。所述制备导致化妆品植物成分 701 的 13kg 干物质产量(或约 262 升)的产生。

实施例 31

来源于莲花(莲(Nelumbo nucifera))细胞浆级分的化妆品植物成分 701 的产品规格

[0235] 根据实施例 30 中的上述方法制备化妆品植物成分 701。

[0236] 如下所述进行化妆品植物成分 701 的分析以测定其多种物理化学、微生物和生物活性特征。化妆品植物成分 701 是澄清液体,其具有黄色和特征气味。在载体介质中未加入溶剂(即甘油、油或水)。

[0237] 表 39 总结了化妆品植物成分 701 的物理、化学和感官特征。

表 39:化妆品植物成分 701 的物理、化学和感官特征

特征	描述/范围
外观	澄清黄色液体
气味	特征

特征	描述/范围
在水中的溶解度	可任意比例溶解
颜色(加德纳色标)	5-6
干物质 (%)	4.2-5.5
折射率(nD)	1.3370 – 1.3450
pH	3.9-4.4
摩尔渗透压浓度 (mOsm / kg)	460-610
UV 最大, nm	261-269
总平板计数(CFU / gm)	< 10
霉菌/ 酵母(CFU / gm)	< 10
大肠杆菌(CFU / gm)	阴性 / 10 gm
沙门氏菌属某种(CFU / gm)	阴性 / 10 gm
金黄色葡萄球菌(CFU / gm)	阴性 / 10 gm
假单胞菌属某种(CFU / gm)	阴性 / 10 gm

[0238] 通过凯氏测氮法测定化妆品植物成分 701 含有 0.166-0.167% 的氮, 提示其基本不含蛋白质。

[0239] 蛋白质, 包括在植物中的蛋白质, 能够在敏感个体中引起蛋白质接触皮炎。在与成因蛋白质材料接触后不久, 这些个体能够经历例如皮肤上的急性荨麻疹或出现水泡的症状, 常伴有瘙痒、灼热和 / 或刺痛。(V. Janssens, 等人, “Protein contact dermatitis: myth or reality?”, British Journal of Dermatology 1995; 132: 1-6)。

[0240] 因此, 非常希望护肤品材料含有尽可能少的蛋白质。在本文中使用的“基本不含蛋白质”表示使用凯氏测氮法测定的小于 1% (从 0% 至 1%) 的总蛋白质含量。

[0241] 微生物分析证明化妆品植物成分 701 满足化妆品成分有关 CFU 和不存在病原体的化妆品工业要求。测定化妆品植物成分 701 当在 15 和 25℃ 之间的温度在避光密闭容器中储存时稳定 (即, 维持物理和化学完整性) 至少 12-18 个月。

[0242] 化妆品植物成分 701 是可生物降解的成分。

实施例 32

有关莲花 (莲 (Nelumbo nucifera)) 浆级分的活性和测定数据的总结

[0243] 根据 MB Research 完成的 LDH 释放细胞毒性法 (MB Research 方案 701-01) 研究, 莲花浆级分在细胞培养基中以体积计高达 10% 的测试物品的浓度范围中未显示细胞毒性。

[0244] 根据 MatTek MelanoDerm 测定 (MB Research 方案 750-01), 在细胞培养基中浓度

为 5% v/v or 0.19% w/v 的莲花浆级能够在角化细胞 / 黑色素细胞培养模型中产生变亮 / 变白作用,这是通过低于阴性对照的黑色素水平约 30% 的减少和肉眼可见的确切的组织变亮测定的。

[0245] 根据进行的胰蛋白酶抑制效力检测,莲花浆级分能够抑制胰蛋白酶,计算的 IC_{50} 为约 0.04% w/v。

[0246] 根据超氧化物清除测定(方案改编自 Journal of Neuroscience Methods 97(2000) 第 139-144 页中的“Rapid Microplate Assay for Superoxide Scavenging Efficiency”),检测的莲花浆级分能够清除超氧化物,取得约 0.016% w/v 的 IC_{50} 。

[0247] 根据 DPPH 自由基清除测定(方案基于 LWT-Food Science and Technology, 第 28 卷,第 1 期,1995,第 25-30 页中的“Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”),莲花浆级分能够猝灭 DPPH,完全猝灭 1 单位重量的 DPPH 需要约 2.5 单位干重的材料。

[0248] 根据氧自由基吸收能力测定(方案基于 BioTek Instruments 的应用注释“Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC) Assays with Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader”),莲花浆级分能够作为抗氧化剂,提供等于 1 单位重量的 (R)-Trolox 甲醚的 ORAC 作用需要约 1.7 单位干重的材料。

尽管本文已详细描绘和描述了优选实施方案,对相关领域技术人员显而易见,可进行多种修饰、添加、取代等而不背离本发明的精神,因此应将这些修饰、添加、取代等视为在下文的权利要求书中定义的本发明的范围内。

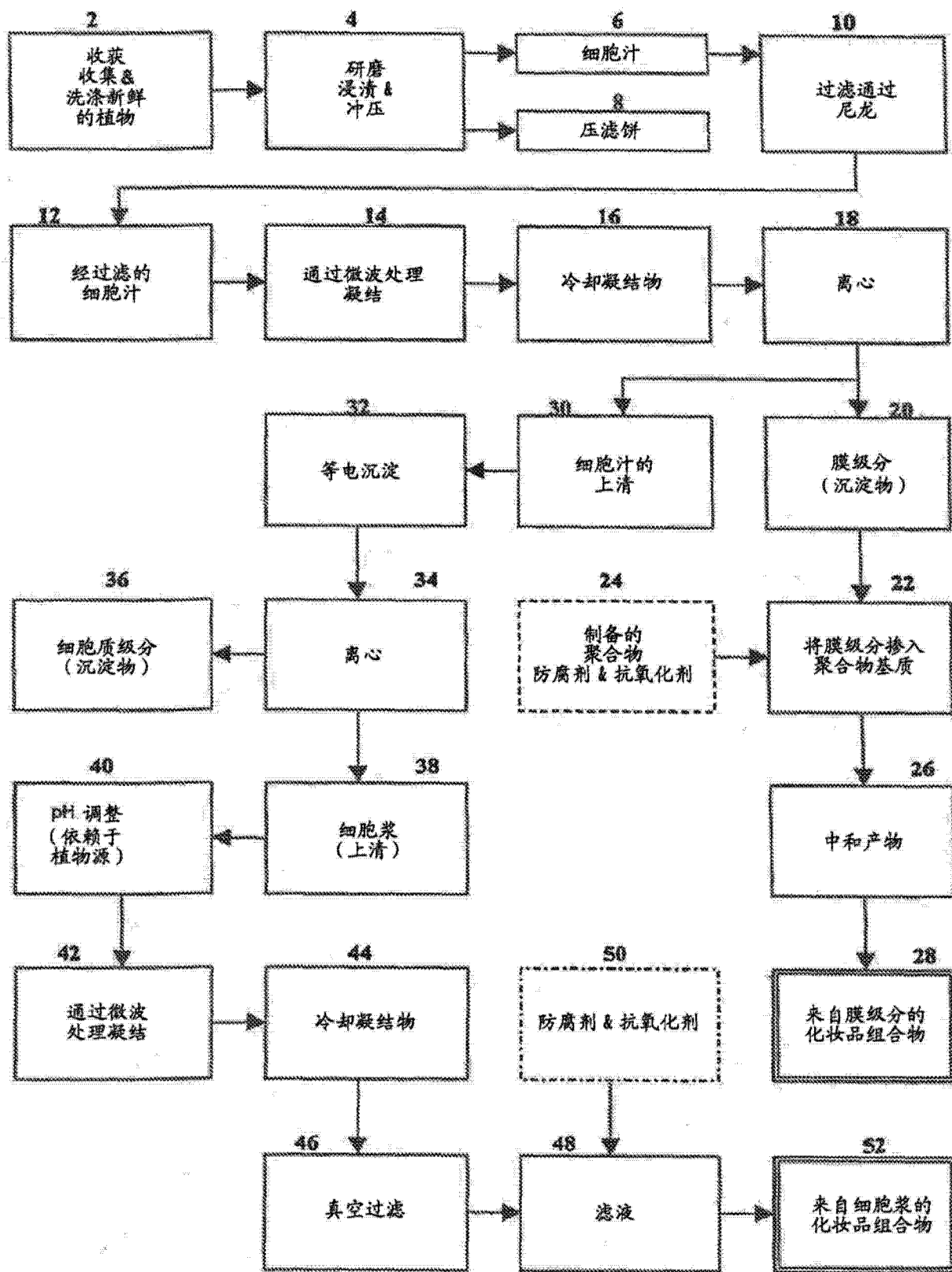


图 1