



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110522697 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201910927940.8

(22)申请日 2019.09.27

(71)申请人 广州环亚化妆品科技有限公司

地址 510663 广东省广州市高新技术产业
开发区广州科学城科林路15号

(72)发明人 刘林峰 胡根华 吴知情 何敬愉
陈亮 龚盛昭

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

A61K 8/9789(2017.01)

A61K 8/60(2006.01)

A61Q 19/02(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

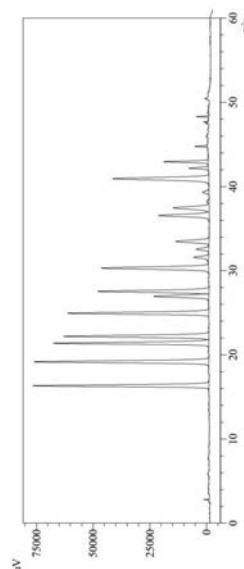
权利要求书2页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称

一种花色苷提取物的制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种花色苷提取物的制备方法和应用,所述花色苷提取物的制备方法采用在不同温度下对待提取物中的花色苷进行分步提取,并且利用阳离子交换树脂对得到的提取液进行提纯处理,使得整个制备过程不仅工艺简单、成本低、可重复性高,而且制备得到的花色苷提取物结构稳定,纯度高,具有很强的工业应用前景。本发明还提供了一种包含上述花色苷提取物的精华液,所述花色苷精华液具有良好的自由基清除能力,抗氧化能力强,同时,该精华液还能效抑制酪氨酸酶活性,抑制黑色素的生成;将该精华液应用于护肤品中,其美白抗光氧化功效显著稳定,安全无刺激。



1. 一种花色苷提取物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

(1) 将待提取物先进行酸性提取,得到第一提取液和第一提取渣,再将得到的第一提取渣进行升温提取,得到第二提取液和第二提取渣;

(2) 将步骤(1)得到的第一提取液和第二提取液混合、分离,得到上清液,将得到的上清液利用阳离子交换树脂进行提纯,并冷冻干燥,得到所述花色苷提取物。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述待提取物为欧洲越橘、桑葚、蓝莓或黑莓中的任意一种或至少两种的组合,优选为欧洲越橘;

优选地,步骤(1)所述酸性提取的方法为将待提取物与酸化水混合;

优选地,所述酸化水的pH为0.8-2.5;

优选地,所述酸化水中的酸为盐酸、硫酸、甲酸、乙酸或硝酸中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述酸化水中酸的体积百分含量为0.5-1%;

优选地,所述待提取物与酸化水的质量比为1:(5-20),优选为1:10;

优选地,步骤(1)所述酸性提取的温度为20-40℃,优选为25-35℃;

优选地,步骤(1)所述酸性提取的时间为1-5h;

优选地,步骤(1)所述酸性提取的次数为至少一次,优选为两次以上。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述升温提取的方法包括:将第一提取渣与乙醇水溶液混合并加热至回流温度;

优选地,所述第一提取渣与乙醇水溶液的质量比为1:(5-20),优选为1:10;

优选地,所述乙醇水溶液中乙醇的体积分数为40-80%;

优选地,步骤(1)中所述升温提取的温度为60-90℃;

优选地,步骤(1)中所述升温提取的时间为1-3h;

优选地,步骤(1)中所述升温提取的次数为至少一次。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述阳离子交换树脂为钠型732阳离子交换树脂;

优选地,步骤(2)中所述上清液的上样流速为0.5-5BV/h;

优选地,步骤(2)中所述利用阳离子交换树脂进行提纯包括:将得到的上清液利用阳离子交换树脂进行吸附、洗脱和回收;

优选地,所述洗脱包括:先利用体积浓度为70-90%的乙醇水溶液进行洗脱,然后依次使用乙醇体积分数为10-35%和40-90%的酸性乙醇溶液进行洗脱,收集体积分数为40-90%的酸性乙醇洗脱后的洗脱液;

优选地,所述酸性乙醇溶液为盐酸、硫酸或硝酸中的任意一种或至少两种的组合与乙醇的混合溶液;

优选地,所述洗脱的流速为0.5-5BV/h。

5. 一种花色苷提取物,其特征在于,所述花色苷提取物由如权利要求1-4任一项所述的制备方法制备得到;

优选地,在所述花色苷提取物中,所述花色苷的质量百分含量为20-55%。

6. 一种花色苷精华液,其特征在于,所述花色苷精华液包括如权利要求5所述的花色苷提取物。

7. 根据权利要求6所述的花色苷精华液, 其特征在于, 所述花色苷精华液包括花色苷提取物、去离子水、丁二醇、丙二醇、苯氧乙醇和对羟基苯乙酮;

优选地, 所述花色苷提取物在所述花色苷精华液中的质量百分含量为0.5-15%;

优选地, 所述花色苷提取物、去离子水、丁二醇、丙二醇、苯氧乙醇和对羟基苯乙酮的质量比为(1-10):(20-60):(30-50):(5-15):(0-0.5):(0-0.5)。

8. 一种根据权利要求6或7所述的花色苷精华液的制备方法, 其特征在于, 所述花色苷精华液的制备方法包括: 将花色苷提取物、丙二醇、丁二醇、对羟基苯乙酮和苯氧乙醇依次加入去离子水中, 搅拌, 得到所述精华液。

9. 一种护肤组合物, 其特征在于, 所述护肤组合物包括如权利要求6-8任一项所述的花色苷精华液或如权利要求5所述的花色苷提取物。

10. 根据权利要求9所述的护肤组合物, 其特征在于, 以所述护肤组合物的总质量为100%计, 所述护肤组合物包括如下质量分数的组分: 花色苷精华液10-20%、熊果苷1-5%、薄荷醇0.01-0.1%、保湿剂5-15%、乳化剂1-5%、防腐剂0.1-0.5%、香精0.1-0.5%和余量水;

优选地, 以所述护肤组合物的总质量为100%计, 所述护肤组合物包括如下质量比的组分: 花色苷精华液10-15%、熊果苷1-4%、薄荷醇0.02-0.08%、保湿剂5-12%、乳化剂1-5%、防腐剂0.1-0.5%、香精0.1-0.5%和余量水。

一种花色苷提取物的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及精细化工领域,具体涉及一种花色苷提取物的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 当代社会,色素是精细化工领域的重要材料。天然色素因其具有功效好、副作用较小、安全性高等优点而获得广大消费者的喜爱。以花色苷为代表的天然色素不仅满足人们化妆品色彩亮丽的需求,而且还具有美白、防晒、抗氧化及延缓衰老等多重护肤功效。天然植物色素相较于合成色素更加天然、环保、安全。花色苷是一类具有2-苯基苯并吡喃基本母核结构的植物次生代谢产物,具有美白、抗光老化等多种生物活性,是近年天然产物开发利用领域的热点之一。在欧洲,常见植物天然色素之一的花色苷被被称为“可以口服”的护肤品原料,是目前自然界中最有效的抗氧化物质。同时,花色苷作为天然色素因为其天然无毒的特性,被认为是很好的彩妆颜料和天然植物染发剂。随着现代提取分离技术的不断进步,花色苷提取物的纯度在不断提高。以花色苷作为功效成分的天然色素类化妆品在精细化工领域具有广阔前景,其产业化将有助于推进天然色素在精细化工领域的发展。

[0003] 目前,安全、有效、吸收好的添加剂较少,而是同时具有美白、抗衰老功效的添加剂更少,且多为组合物,成分复杂,存在一定风险。

[0004] 目前工业上常用的提取花色苷方法如回流提取法,热乙醇提取法、酸提法等提取方法得率低,杂质多。提取率较高的方法如高压均质提取、微射流提取等成本太高,不适合工业化大生产。

[0005] 目前较常用的纯化方法主要是采用大孔吸附树脂层析、有机溶剂萃取和超滤膜分离系统,大孔吸附树脂柱层析能有效的富集提取物中的天然花色苷,但大孔吸附树脂同时吸附杂质也较多,提取物花色苷纯度提高不显著。有机溶剂萃取的缺陷是溶剂残留过多且成本高。超滤膜分离系统由于长期使用,膜容易堵塞,而清洗或更换膜的成本都相对高,同样不适合工业化大生产。

[0006] CN107383115A公开了一种提取植物花色苷的方法,所述方法包括将含有花色苷的植物粉碎后加入低共熔溶剂;采用静电场超声提取法提取花色苷提取液;向花色苷提取液中加入凹土负载壳聚糖交联环糊精复合物得吸附在凹土负载壳聚糖交联环糊精复合物上的花色苷复合物沉淀;将花色苷复合物沉淀在有机溶剂中溶解解吸、离心得含有有机溶剂的花色苷上清液;将花色苷上清液过微孔滤膜得纯化的含有机溶剂的花色苷溶液;脱去花色苷溶液中的有机溶剂并去除多余水分得目标产物花色苷。本发明使用有机溶剂作为提取剂,残留多且成本高,该方法还利用了静电场超声提取花色苷,不利于工业化大生产。

[0007] 因此,开发一种高效低成本制备花色苷提取物的方法是目前需要应对的困难和挑战。

发明内容

[0008] 鉴于现有技术中存在的问题,本发明提供了一种花色苷提取物的制备方法和应

用,所述制备方法工艺简单、成本低、可重复性高,且制备得到的花色苷提取物中花色苷含量高、结构稳定。

[0009] 第一方面,本发明提供了一种花色苷提取物的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0010] (1) 将待提取物先进行酸性提取,得到第一提取液和第一提取渣,再将得到的第一提取渣进行升温提取,得到第二提取液和第二提取渣;

[0011] (2) 将步骤(1)得到的第一提取液和第二提取液混合、分离,得到上清液,将得到的上清液利用阳离子交换树脂进行提纯,并冷冻干燥,得到所述花色苷提取物。

[0012] 本发明所述花色苷提取物的制备方法采用在不同温度下对待提取物中的花色苷进行分步提取,并且创造性地利用阳离子交换树脂对得到的提取液进行提纯处理,使得整个制备过程不仅工艺简单、成本低、可重复性高,而且制备得到的花色苷提取物纯度高、结构稳定,具有很强的工业应用前景。

[0013] 本发明所述制备方法使用阳离子交换树脂对得到的提取液进行提纯,是由于花色苷是具有2-苯基苯并吡喃阳离子结构的衍生物,采用阳离子交换树脂对花色苷提取液进行吸附,其选择性高,可以使不带正电荷的有机物被充分分离出去,大大提高了花色苷提取物的纯度。

[0014] 本发明所述花色苷提取物指的是从含有花色苷的物质中提取得到的花色苷含量较高的混合物。

[0015] 优选地,步骤(1)所述待提取物为欧洲越橘、桑葚、蓝莓或黑莓中的任意一种或至少两种的组合,优选为欧洲越橘。

[0016] 优选地,步骤(1)所述酸性提取的方法为将待提取物与酸化水混合。

[0017] 优选地,所述酸化水的pH为0.8-2.5,例如可以是0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4或2.5等。

[0018] 优选地,所述酸化水中的酸为盐酸、硫酸或硝酸中的任意一种或至少两种的组合。

[0019] 优选地,所述酸化水中酸的体积百分含量为0.5-1%,例如可以是0.5%、0.52%、0.55%、0.6%、0.64%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%或1%等。

[0020] 优选地,所述待提取物与酸化水的质量比(第一料液比)为1:(5-20),例如可以是1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19或1:20等,优选为1:10。

[0021] 本发明优选待提取物与酸化水的质量比,是由于当两者质量比高于1:5,即酸化水过少,不能将待提取物中的花色苷完全提取出来,花色苷的提取率降低,而当两者质量比低于1:20,即酸化水过多,花色苷的提取率不再随着酸化水添加量的增加而增加,此时再过多添加酸化水会造成资源浪费和成本的升高。

[0022] 优选地,步骤(1)所述酸性提取的温度为20-40℃,例如可以是20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃或40℃等,优选为25-35℃。

[0023] 本发明优选酸性提取的温度,是由于当温度高于40℃,待提取物中会有有机杂质溶出,使得所述花色苷提取物中杂质增加,纯度降低;而当温度低于20℃,则不能将待提取物中的花色苷完全提取出来,花色苷提取率降低。

[0024] 优选地,步骤(1)所述酸性提取的时间为1-5h,例如可以是1h、1.5h、1.8h、2h、2.5h、3h、3.5h、4h、4.5h或5h等。

[0025] 优选地,步骤(1)所述酸性提取的次数为至少一次,优选为两次以上。

[0026] 优选地,步骤(1)中所述升温提取的方法包括:将第一提取渣与乙醇水溶液混合并加热至回流温度;

[0027] 优选地,所述第一提取渣与乙醇水溶液的质量比(第二料液比)为1:(5-20),例如可以是1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19或1:20等,优选为1:10。

[0028] 优选地,所述乙醇水溶液中乙醇的体积分数为40-80%,例如可以是40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%等。

[0029] 优选地,步骤(1)中所述升温提取的温度为60-90℃,例如可以是60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、88℃或90℃等。

[0030] 优选地,步骤(1)中所述升温提取的时间为1-3h,例如可以是1h、1.4h、1.6h、2h、2.5h、2.8h或3h等。

[0031] 本发明优选升温提取的时间为1-3h,是由于花色苷长期处于高温状态下容易发生一定程度的分解,结构稳定性降低。

[0032] 优选地,步骤(1)中所述升温提取的次数为至少一次。

[0033] 本发明所述制备方法采用在不同温度下对待提取物中的花色苷进行分步提取,这是综合考量了花色苷的提取率以及花色苷提取物纯度之间的平衡。本发明所述制备方法先在常温下进行酸性提取,得到纯度较高的花色苷提取液,再将提取后的提取渣与乙醇水溶液混合,加热回流进行高温提取,进一步收集提取渣中的花色苷。通过利用上述在不同温度梯度下分步提取的相互配合,既保证得到的花色苷提取物纯度高,也使得花色苷的总提取率较高。

[0034] 优选地,步骤(2)所述阳离子交换树脂为钠型732阳离子交换树脂。

[0035] 优选地,步骤(2)中所述上清液的上样流速为0.5-5BV/h,例如可以是0.5BV/h、0.7BV/h、0.8BV/h、1BV/h、1.5BV/h、2BV/h、2.5BV/h、3BV/h、3.5BV/h、4BV/h、4.5BV/h或5BV/h等。

[0036] 优选地,步骤(2)中所述利用阳离子交换树脂进行提纯包括:将得到的上清液利用阳离子交换树脂进行吸附、洗脱和回收。

[0037] 优选地,所述洗脱包括:先利用体积浓度为70-90%的乙醇水溶液进行洗脱,然后依次使用乙醇体积分数为10-35%和40-90%的酸性乙醇溶液进行洗脱,收集体积分数为40-90%的酸性乙醇洗脱后的洗脱液。

[0038] 所述70-90%,例如可以是70%、73%、75%、78%、80%、81%、85%、88%或90%等。

[0039] 所述10-35%,例如可以是10%、12%、15%、17%、19%、20%、22%、25%、27%、29%、30%、33%或35%等。

[0040] 所述40-90%,例如可以是40%、43%、45%、47%、50%、52%、55%、57%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%等。

[0041] 在利用阳离子交换树脂对得到的提取液进行提纯时,本发明所述制备方法优选进

行分步洗脱,首先利用体积浓度较高的乙醇水溶液去除多酚类杂质,然后利用乙醇体积分数较低的酸性乙醇溶液来进一步洗掉提取液中黄酮类杂质,最后利用体积分数较高的酸性乙醇溶液来收集提取液中花色苷,本发明通过上述分步洗脱的方法使得最终得到的洗脱液中花色苷含量以及纯度得到明显提升。

[0042] 优选地,所述酸性乙醇溶液为盐酸、硫酸或硝酸中的任意一种或至少两种的组合与乙醇的混合溶液。

[0043] 优选地,所述洗脱的流速为0.5-5BV/h,例如可以是0.5BV/h、0.6BV/h、0.8BV/h、1BV/h、1.4BV/h、2BV/h、2.5BV/h、3BV/h、3.5BV/h、4BV/h、4.5BV/h或5BV/h等。

[0044] 第二方面,本发明提供了一种花色苷提取物,所述花色苷提取物由如第一方面所述的制备方法制备得到。

[0045] 优选地,在所述花色苷提取物中,所述花色苷的质量百分含量为20-55%,例如可以是20%、21%、23%、25%、27.5%、28%、30%、33%、35%、37%、39%、39.7%、40%、41%、42%、46%、50%、52%或55%等。

[0046] 第三方面,本发明提供了一种花色苷精华液,所述花色苷精华液包括如第二方面所述的花色苷提取物。

[0047] 本发明所述花色苷精华液中包含花色苷提取物,使得该精华液具有良好的自由基清除能力,抗氧化能力强,同时还能有效抑制酪氨酸酶的活性,抑制黑色素的生成。

[0048] 优选地,所述花色苷精华液包括花色苷提取物、去离子水、丁二醇、丙二醇、苯氧乙醇和对羟基苯乙酮。

[0049] 优选地,所述花色苷提取物在所述花色苷精华液中的质量百分含量为0.5-15%,例如可以是0.5%、0.8%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.4%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%或15%等。

[0050] 优选地,所述花色苷提取物、去离子水、丁二醇、丙二醇、苯氧乙醇和对羟基苯乙酮的质量比为(1-10):(20-60):(30-50):(5-15):(0-0.5):(0-0.5),例如可以是4:46:39.2:10:0.5:0.3、5:44:39.2:11:0.4:0.4或10:40:35:14:0.5:0.5等。

[0051] 本发明优选控制上述各组分的质量比例在上述范围内,是为了保证所述花色苷精华液各组分能在体系中稳定存在,同时当把所述花色苷提取物应用于本发明所述护肤组合物时,各组分能与护肤组合物中的其他组分稳定配伍,均衡存在。

[0052] 第四方面,本发明提供了一种如第三方面所述的花色苷精华液的制备方法,所述花色苷精华液的制备方法包括:将花色苷提取物、丙二醇、丁二醇、对羟基苯乙酮和苯氧乙醇依次加入去离子水中,搅拌,得到所述精华液。

[0053] 本发明所述花色苷精华液的制备方法优选将各组分按照上述限定的顺序加入去离子水中,是为了保证精华液各组分均匀稳定,避免相互作用产生沉淀物质。

[0054] 第五方面,本发明提供了一种护肤组合物,所述护肤组合物包括如第三方面所述的花色苷精华液或如第二方面所述的花色苷提取物。

[0055] 本申请将如第三方面所述的精华液应用于护肤品中,其美白抗光氧化功效显著稳定,安全无刺激。

[0056] 优选地,以所述护肤组合物的总质量为100%计,所述护肤组合物包括如下质量分数的组分:花色苷精华液10-20%、熊果苷1-5%、薄荷醇0.01-0.1%、保湿剂5-15%、乳化剂

1-5%、防腐剂0.1-0.5%、香精0.1-0.5%和余量水。

[0057] 优选地,以所述护肤组合物的总质量为100%计,所述护肤组合物包括如下质量比的组分:花色苷精华液10-15%、熊果苷1-4%、薄荷醇0.02-0.08%、保湿剂5-12%、乳化剂1-5%、防腐剂0.1-0.5%、香精0.1-0.5%和余量水。

[0058] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0059] (1) 本发明所述花色苷提取物的制备方法采用在不同温度下对待提取物中的花色苷进行分步提取,并且创造性地利用阳离子交换树脂对得到的提取液进行提纯处理,使得整个制备过程不仅工艺简单、成本低、可重复性高,而且制备得到的花色苷提取物纯度高、结构稳定,具有很强的工业应用前景;

[0060] (2) 本发明所述花色苷精华液具有良好的自由基清除能力、抗氧化能力强,同时,该精华液还能抑制酪氨酸酶活性,抑制黑色素的生成;将该精华液应用于护肤品中,其美白抗光氧化功效显著稳定,安全无刺激。

附图说明

[0061] 图1是制备例2得到的花色苷精制液的HPLC图。

[0062] 图2是基于响应面法优化不同提取温度和不同第一料液比对得到的花色苷提取率影响的3D图。

[0063] 图3是步骤(2)中不同体积分数的酸性乙醇洗脱的花色苷提取物的纯度图。

[0064] 图4是实施例1得到的花色苷精华液在不同质量浓度下对DPPH自由基清除率的曲线图。

[0065] 图5是实施例1得到的花色苷精华液在不同质量浓度下对抑制酪氨酸酶活性抑制率的曲线图。

[0066] 图6是实施例1得到的花色苷精华液在不同质量浓度下对抑制B16细胞黑色素合成抑制率的曲线图。

具体实施方式

[0067] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0068] 下述实施例和对比例中所用的仪器如下:

[0069] 1、紫外可见分光光度计:型号为UV-1750,购于日本岛津公司;

[0070] 2、精密电子天平:型号为AE24,购于瑞士Starorius公司;

[0071] 3、水浴锅:型号为DSY-2-8,购于北京国华医疗器械厂;

[0072] 4、旋转蒸发器:型号为SY-2000型,购于上海荣亚生化仪器厂;

[0073] 5、高效液相色谱仪:型号为1200LC,购于安捷伦科技有限公司;

[0074] 6、C18 ECOSIL HPLC COLUMN色谱分析柱(250mm×4.6mm,5μm),以乙腈-0.2%磷酸超纯水为流动相进行梯度洗脱,流动相洗脱梯度为:0-55min,10-40%,流速0.8mL/min,柱温30℃,紫外检测波长520nm,进样量为10μL。

[0075] 下述实施例和对比例中所用的试剂如下:

[0076] 乙腈,色谱纯,购于天津市恒兴化学试剂制造有限公司;甲醇,色谱纯,购于天津市

恒兴化学试剂制造有限公司;无水乙醇,色谱纯,购于天津市恒兴化学试剂制造有限公司;标准品矢车菊素-3-o-葡萄糖苷,购于德国Sigma公司。

[0077] 制备例1

[0078] 本制备例提供了一种花色苷提取物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0079] (1) 将欧洲越橘鲜果破碎,得到待提取物;利用盐酸酸化水进行提取,其中,盐酸酸化水中盐酸的体积百分含量为0.64%,所述盐酸酸化水的pH为1.1,第一料液比为1:8,提取温度为20℃,提取时间2h,重复提取3次,得到第一提取液和第一提取渣,向得到的第一提取渣中加入体积分数为65%的乙醇水溶液,其中,第二料液比为1:10,提取时间2h,在80℃回流提取1次,得到第二提取液和第二提取渣;

[0080] (2) 将步骤(1)得到的第一提取液和第二提取液混合,并进行离心分离,得到上清液;将上述上清液加入钠型732阳离子交换树脂柱中进行吸附提纯,上样流速为1BV/h,先采用80%体积浓度的乙醇水溶液洗脱以去除其他多酚类杂质,然后用乙醇体积分数为40%的酸性乙醇溶液洗脱,洗脱流速为1BV/h,收集乙醇体积分数为40%的酸性乙醇洗脱部分,低温减压浓缩回收乙醇,得到花色苷精制液,将上述精制液通过真空冷冻干燥得到所述花色苷提取物。

[0081] 制备例2

[0082] 本实施例提供了一种花色苷提取物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0083] (1) 将欧洲越橘鲜果破碎,得到待提取物;利用盐酸酸化水进行提取,其中,盐酸酸化水中盐酸的体积百分含量为0.64%,所述盐酸酸化水的pH为1.1,第一料液比为1:10,提取温度为25℃,提取时间2h,重复提取2次,得到第一提取液和第一提取渣,向得到的第一提取渣中加入体积分数为65%的乙醇水溶液,其中,第二料液比为1:10,提取时间2h,在80℃回流提取1次,得到第二提取液和第二提取渣;

[0084] (2) 将步骤(1)得到的第一提取液和第二提取液混合,并进行离心分离,得到上清液;将上述上清液加入钠型732阳离子交换树脂柱中进行吸附提纯,上样流速为1BV/h,先采用80%体积浓度的乙醇水溶液洗脱以去除其他多酚类杂质,然后依次利用乙醇体积分数为30%和65%的酸性乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为1BV/h,收集体积分数为65%的酸性乙醇洗脱部分,低温减压浓缩回收乙醇,得到花色苷精制液,将上述精制液通过真空冷冻干燥得到所述花色苷提取物。

[0085] 制备例3

[0086] 本实施例提供了一种花色苷提取物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0087] (1) 将欧洲越橘鲜果破碎,得到待提取物;利用盐酸酸化水进行提取,其中,盐酸酸化水中盐酸的体积百分含量为0.64%,所述盐酸酸化水的pH为1.1,第一料液比为1:12,提取温度为40℃,提取时间2h,重复提取2次,得到第一提取液和第一提取渣,向得到的第一提取渣中加入体积分数为65%的乙醇水溶液,其中,第二料液比为1:10,提取时间2h,在80℃回流提取1次,得到第二提取液和第二提取渣;

[0088] (2) 将步骤(1)得到的第一提取液和第二提取液混合,并进行离心分离,得到上清液;将上述上清液加入钠型732阳离子交换树脂柱中进行吸附提纯,上样流速为1BV/h,先采用乙醇体积浓度为80%的乙醇水溶液洗脱以去除其他多酚类杂质,然后依次利用乙醇体积分数为30%和80%的酸性乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为1BV/h,收集体积分数为80%的酸

性乙醇洗脱部分,低温减压浓缩回收乙醇,得到花色苷精制液,将上述精制液通过真空冷冻干燥得到所述花色苷提取物。

[0089] 制备例4

[0090] 本实施例提供了一种花色苷提取物的制备方法,与制备例2的区别仅在于,省略了步骤(2)中采用乙醇体积浓度为80%的乙醇水溶液进行洗脱的过程。

[0091] 制备例5

[0092] 本实施例提供了一种花色苷提取物的制备方法,与制备例2的区别仅在于,省略了步骤(2)中利用乙醇体积分数为30%的酸性乙醇溶液进行洗脱的过程。

[0093] 制备例6

[0094] 本实施例提供了一种花色苷提取物的制备方法,与制备例2的区别仅在于,所述第一料液比为1:4。

[0095] 制备例7

[0096] 本实施例提供了一种花色苷提取物的制备方法,与制备例2的区别仅在于,所述第二料液比为1:4。

[0097] 制备例8-12

[0098] 与制备例2相比,步骤(2)中分别使用5%(实施例8)、25%(实施例9)、45%(实施例10)、85%(实施例11)和95%(实施例12)的酸性乙醇溶液代替65%的酸性乙醇溶液。

[0099] 对比制备例1

[0100] 本对比例提供了一种花色苷提取物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0101] (1)将欧洲越橘鲜果破碎,得到待提取物;利用盐酸酸化水进行提取,其中,盐酸酸化水中盐酸的体积百分含量为0.64%,所述盐酸酸化水的pH为1.1,料液比为1:10,提取温度为25℃,提取时间2h,重复提取2次,得到提取液和提取渣;

[0102] (2)将步骤(1)得到的提取液进行离心分离,得到上清液,;将上述上清液加入钠型732阳离子交换树脂柱中进行吸附提纯,上样流速为1BV/h,先采用80%体积浓度的乙醇水溶液洗脱以去除其他多酚类杂质,然后依次利用体积分数为30%和65%的酸性乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为1BV/h,收集体积分数为65%的酸性乙醇洗脱部分,低温减压浓缩回收乙醇,得到花色苷精制液,将上述精制液通过真空冷冻干燥得到所述花色苷提取物。

[0103] 对比制备例2

[0104] 本对比例提供了一种花色苷提取物的制备方法,具体包括以下步骤:

[0105] (1)将欧洲越橘鲜果破碎,得到待提取物;向待提取物中加入体积分数为65%的乙醇水溶液,在80℃回流提取1次,得到提取液和提取渣,其中,料液比为1:10,提取时间2h;

[0106] (2)将步骤(1)得到的提取液进行离心分离,得到上清液;将上述上清液加入钠型732阳离子交换树脂柱中进行吸附提纯,上样流速为1BV/h,先采用80%体积浓度的乙醇水溶液洗脱以去除其他多酚类杂质,然后依次利用体积分数为30%和65%的酸性乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为1BV/h,收集体积分数为65%的酸性乙醇洗脱部分,低温减压浓缩回收乙醇,得到花色苷精制液,将上述精制液通过真空冷冻干燥得到所述花色苷提取物。

[0107] 对比制备例3

[0108] 与制备例2的区别仅在于,利用大孔树脂替代钠型732阳离子交换树脂柱。

[0109] 性能测试1

[0110] (1) 花色苷含量(花色苷纯度):采用单一pH法测样品中花色苷含量,吸取4mL样品滤液用酸性乙醇水溶液定容至10mL,酸性乙醇水溶液为空白对照,显色30min,在535nm波长下测定吸光度,重复3次,根据以下公式计算花色苷总量:

[0111] 花色苷总量($\mu\text{g}/\text{mg}$) = $[(A_{\text{试液}} - A_{\text{对照液}}) \times 101.83] / [\text{吸取溶液量mL} / \text{样品干重mg}]$;

[0112] 其中,101.83为摩尔消光系数。

[0113] 测试表征结果见表1:

[0114] 表1

[0115]

样品	花色苷的提取率	花色苷提取物纯度
制备例1	74.6%	39.7%
制备例2	78.3%	53.4%
制备例3	77.0%	46.6%
制备例4	78.0%	43.2%
制备例5	76.2%	38.8%
制备例6	60.7%	36.6%
制备例7	65.4%	37.1%
制备例8	78.2%	10.6%
制备例9	78.0%	23.7%
制备例10	78.1%	46.3%
制备例11	78.3%	45.2%
制备例12	78.2%	43.9%
对比制备例1	69.8%	50.4%
对比制备例2	68.4%	47.3%
对比制备例3	77.6%	32.3%

[0116] 由制备例和性能测试可知,得到的花色苷的提取率最高可达78%以上,花色苷提取物的纯度最高可达53%以上。

[0117] 与制备例2相比,对比制备例1中未对花色苷待提取物进行升温提取,得到的花色苷的提取率明显低于制备例2,这是由于在酸化提取后未对第一提取渣中的花色苷进行进一步提取,花色苷提取不完全,提取率降低。

[0118] 与制备例2相比,对比制备例2中未对花色苷待提取物进行酸化提取,步骤(1)全部采用高温提取,而得到的花色苷的提取率低于制备例2,同时花色苷提取物的纯度大幅下降。这一方面是由于高温提取在将尽量多的花色苷进行提取的同时不可避免地带入很多有机杂质,使最终得到的花色苷提取物纯度下降,另一方面,由于花色苷长期处于高温条件下,结构不稳定,会发生一定程度的分解,造成一部分花色苷的损失,提取率降低,得到的花色苷提取物纯度也明显下降。

[0119] 与制备例2相比,对比制备例3中利用大孔树脂替代钠型732阳离子交换树脂柱,得到的花色苷提取物的纯度低于制备例2,这是由于大孔树脂选择度低,在吸附花色苷的同时也会吸附较多的杂质,使得花色苷提取物的纯度下降明显。

[0120] (2) 成分分析:利用高效液相色谱进行成分分析;

[0121] 此测试仅是为了验证本发明的花色苷提取物中具有丰富的花色苷组分,因此仅取了一组制备例进行表征。图1是制备例2得到的花色苷精制液的HPLC图,表2为制备例2提供的花色苷精制液的HPLC数据。

[0122] 表2

[0123]	花色苷种类	出峰时间(min)	峰面积	峰高	峰面积比(%)	峰高比(%)
	组分 1	16.328	1287135	77472	11.266	12.485
	组分 2	19.174	1406700	76919	12.312	12.396
	组分 3	21.380	1166757	68423	10.212	11.027
	组分 4	22.201	1199008	63992	10.494	10.313
	组分 5	24.944	1113599	62182	9.747	10.021
	组分 6	26.946	473688	24214	4.146	3.902
	组分 7	27.539	909845	48942	7.963	7.887
[0124]	组分 8	30.307	1002071	47331	8.771	7.628
	组分 9	31.601	123287	6462	1.079	1.041
	组分 10	32.562	99476	5438	0.871	0.876
	组分 11	33.475	312405	1714	2.734	2.371
	组分 12	36.560	481225	22396	4.212	3.609
	组分 13	37.457	399276	15846	3.495	2.554
	组分 14	39.324	55467	2775	0.485	0.447
	组分 15	40.935	954742	42396	8.356	6.832
	组分 16	42.174	110628	8591	0.968	1.384
	组分 17	42.947	237708	19550	2.081	3.151
	组分 18	44.769	43839	5666	0.384	0.913
	组分 19	47.676	11795	1857	0.103	0.299
	组分 20	48.305	36689	5357	0.321	0.863
	总计	-	11425342	620526	100	100

[0125] 从图1和表2中数据可以看出,花色苷精制液中主要含有20种不同的花色苷组分,分别为组分1-20,可以对照峰面积比计算出精制液中各花色苷的含量。

[0126] (3) 图2为利用Design-Expert.8.05通过boxbehnken响应面法软件对不同提取温度 and 不同第一料液比对得到的花色苷提取率影响的3D图。

[0127] 利用响应面法优化越橘花色苷提取试验,在制备例2的基础上,通过改变步骤(1)酸化提取的温度、第一料液比和提取时间,得到相应的提取率,具体试验设计与结果见表3,根据表3中的数据模拟出图2的3D图。

[0128] 表3

[0129]

试验号	A 提取温度(°C)	B 第一料液比	C 提取时间(h)	提取率(%)
1	40.00	10.00	1.00	74.16
2	20.00	8.00	2.00	74.66
3	30.00	8.00	3.00	76.11
4	30.00	10.00	2.00	78.09
5	30.00	10.00	2.00	78.30

[0130]

6	30.00	10.00	2.00	78.21
7	30.00	8.00	1.00	73.87
8	20.00	12.00	2.00	76.62
9	30.00	10.00	2.00	76.18
10	40.00	8.00	2.00	76.73
11	30.00	12.00	3.00	75.46
12	30.00	10.00	2.00	78.29
13	40.00	10.00	3.00	76.89
14	20.00	10.00	3.00	76.24
15	20.00	10.00	1.00	75.77
16	40.00	12.00	2.00	77.08
17	30.00	12.00	1.00	74.41

[0131] 从图2可知,基于响应面优化不同提取温度和不同第一料液比能得到的花色苷提取率最高可达78.3%,与本申请实施例2的提取率基本相同。

[0132] (4) 图3是制备例8、制备例9、制备例10、制备例2、制备例11和制备例12的步骤(2)中使用不同体积分数的酸性乙醇洗脱的花色苷提取物的纯度图。从图3和表1中可以看出,当洗脱液中酸性乙醇的体积分数在65%左右时得到的花色苷提取物的纯度最高,可达50%以上。

[0133] 实施例1

[0134] 本实施例提供了一种花色苷精华液及其制备方法。

[0135] 其中,所述花色苷精华液各组分的质量比为:花色苷提取物:去离子水:丁二醇:丙二醇:苯氧乙醇:对羟基苯乙酮的质量比为4:46:39.2:10:0.5:0.3,在所述花色苷提取物中,所述花色苷的质量百分含量为53.4%;

[0136] 其中,在所述花色苷精华液中花色苷提取物的质量百分含量为4%。

[0137] 所述制备方法为:将花色苷提取物、丙二醇、丁二醇、对羟基苯乙酮和苯氧乙醇依次加入去离子水中,搅拌均匀,得到所述精华液。

[0138] 实施例2

[0139] 本对比应用例提供了一种花色苷精华液及其制备方法。

[0140] 其中,所述花色苷精华液各组分的质量比为:制备例2制备得到的花色苷提取物:去离子水:丁二醇:丙二醇:苯氧乙醇:对羟基苯乙酮的质量比为2:47:30.2:20:0.5:0.3。

[0141] 所述制备方法为:将丁二醇、花色苷提取物、丙二醇、对羟基苯乙酮和苯氧乙醇依次加入去离子水中,搅拌均匀,得到所述精华液。

[0142] 实施例3

[0143] 本对比应用例提供了一种花色苷精华液及其制备方法。

[0144] 其中,所述花色苷精华液各组分的质量比为:制备例2制备得到的花色苷提取物:去离子水:丁二醇:丙二醇:苯氧乙醇:对羟基苯乙酮的质量比为4:47:30.2:20:0.5:0.3。

[0145] 所述制备方法为:将丁二醇、花色苷提取物、丙二醇、对羟基苯乙酮和苯氧乙醇依次加入去离子水中,搅拌均匀,得到所述精华液。

[0146] 实施例4

[0147] 与实施例1的区别仅在于:所述花色苷精华液各组分的质量比不同,具体为:制备例2制备得到的花色苷提取物:去离子水:丁二醇:丙二醇:苯氧乙醇:对羟基苯乙酮的质量比为4:20:40.2:30:0.5:0.3。

[0148] 实施例5

[0149] 与实施例1的区别仅在于:所述制备方法不同,具体为:将对羟基苯乙酮、苯氧乙醇、制备例2制备得到的花色苷提取物、丙二醇和丁二醇依次加入去离子水中,搅拌均匀,得到所述精华液。

[0150] 性能测试2

[0151] 对实施例提供的花色苷精华液进行性能测试,方法如下:

[0152] (1) 对DPPH自由基清除率:

[0153] 将实施例1制备得到的花色苷精华液配制成花色苷浓度分别为1.5mg/mL、2mg/mL、2.5mg/mL、3mg/mL、3.5mg/mL和4mg/mL进行DPPH自由基清除率的测试,将得到的数据绘制成曲线,具体如图4。

[0154] 由图4可知,花色苷精华液DPPH自由基半清除量 EC_{50} 可达2.6mg/mL,说明本发明得到的花色苷精华液具有良好的清除DPPH自由基能力。

[0155] 利用上述方法测试实施例2-5对DPPH自由基清除率,得到的花色苷精华液对DPPH自由基的半清除量 EC_{50} 见表3。

[0156] (2) 对酪氨酸酶活性的抑制率:

[0157] 将实施例1制备得到的花色苷精华液配制成花色苷浓度分别为1mg/mL、1.5mg/mL、2mg/mL、2.5mg/mL、3mg/mL和3.5mg/mL进行对酪氨酸酶活性的抑制率的测试,将得到的数据绘制成曲线,具体如图5。

[0158] 由图5可知,花色苷精华液酪氨酸酶活性半抑制量 IC_{50} 可达3.2mg/mL,说明本发明得到的花色苷精华液具有良好的抑制酪氨酸酶活性能力。

[0159] 利用上述方法测试实施例2-5的对酪氨酸酶活性的抑制率,得到的花色苷精华液酪氨酸酶活性的抑制率 IC_{50} 见表3。

[0160] 表3

[0161]	样品	自由基 DPPH 的半清除量 (mg/mL)	酪氨酸酶活性的半抑制量 (mg/mL)
	实施例 1	2.6	3.2
	实施例 2	3.9	6.0
	实施例 3	4.3	6.7
	实施例 4	8.7	13.6
	实施例 5	4.7	7.1

[0162] (3) 对细胞黑色素合成的抑制率:

[0163] 将实施例1制备得到的花色苷精华液配制成花色苷浓度分别为0.2mg/L、0.4mg/L、0.8mg/L、1.6mg/L和3.2mg/L进行对酪氨酸酶活性的抑制率的测试,将得到的数据绘制成曲线,具体如图6。

[0164] 由图6可知,当花色苷精华液浓度达到3mg/L时,对B16细胞黑色素合成的抑制率达到50%,这说明本发明得到的花色苷精华液具有较好的抑制黑色素合成能力。

[0165] 从上述数据可以看出,制备得到的花色苷精华液对自由基DPPH的半清除量 EC_{50} 最低能达到2.6mg/mL,对酪氨酸酶活性的半抑制量 IC_{50} 可以达到3.2mg/mL,这说明所述花色苷精华液具有良好的自由基清除能力,抗氧化能力强,同时,该精华液还能效抑制酪氨酸酶活性,抑制黑色素的生成。

[0166] 与实施例1相比,实施例2中改变了所述花色苷精华液各组分的质量比和加料顺序,得到的花色苷精华液对自由基DPPH的半清除量 EC_{50} 高于实施例1,这说明其对自由基的清除能力变差,抗氧化能力下降,同时,对酪氨酸酶活性的半抑制量 IC_{50} 也高于实施例1,这也说明该精华液对酪氨酸酶活性的抑制能力下降,对黑色素生成的抑制能力减弱。

[0167] 示例性地,应用例1和应用例2提供一种护肤组合物,包括如前所述的花色苷精华液。

[0168] 应用例1

[0169] 本应用例还提供一种护肤组合物,以所述护肤组合物的总质量为100%计,所述护

肤组合物包括如下质量分数的组分：

[0170]	组分名称	质量百分含量
	去离子水	余量
	花色苷精华液	15
	甲基葡糖醇聚醚-10	3
	甘油	2
	熊果苷	1.5
	聚山梨酯-60	1.5
	尿素	0.5
	PCA钠	0.5
	透明质酸钠	0.4
	食用酒精	0.3
	香精	0.2
	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	0.2
	羟苯甲酯	0.1
	羟苯丙酯	0.05
	薄荷醇	0.05
	EDTA二钠	0.05

[0171] 应用例2

[0172] 本应用例还提供一种护肤组合物,以所述护肤组合物的总质量为100%计,所述护肤组合物包括如下质量分数的组分：

[0173]	组分名称	质量百分含量
	去离子水	余量
	花色苷精华液	10
	甲基葡糖醇聚醚-10	3
	甘油	3
	熊果苷	2
	聚山梨酯-60	1.5
	尿素	0.5
	PCA钠	0.5
	透明质酸钠	0.4
	食用酒精	0.4
	香精	0.3
	碘丙炔醇丁基氨甲酸酯	0.2
	羟苯甲酯	0.1
	羟苯丙酯	0.05
	薄荷醇	0.05
	EDTA二钠	0.05

[0174] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细结构特征,但本发明并

不局限于上述详细结构特征,即不意味着本发明必须依赖上述详细结构特征才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用部件的等效替换以及辅助部件的增加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

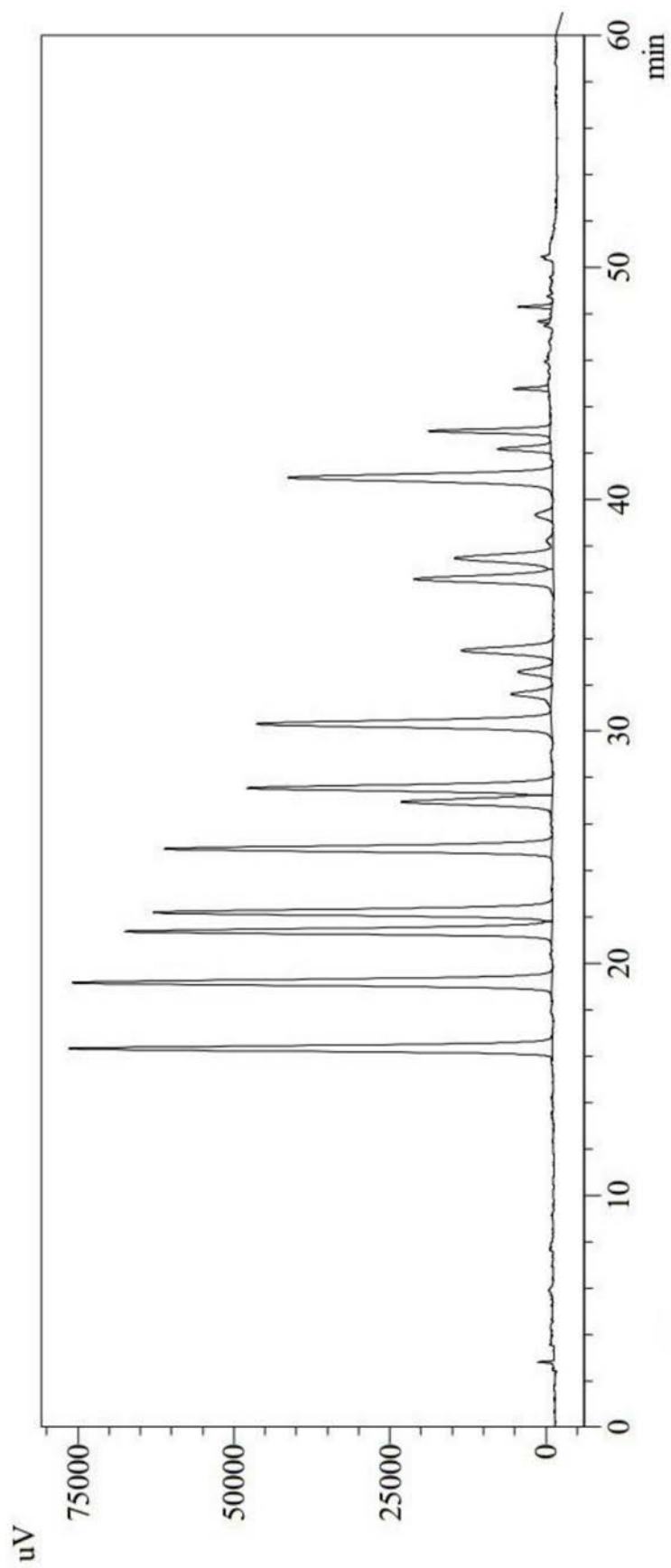


图1

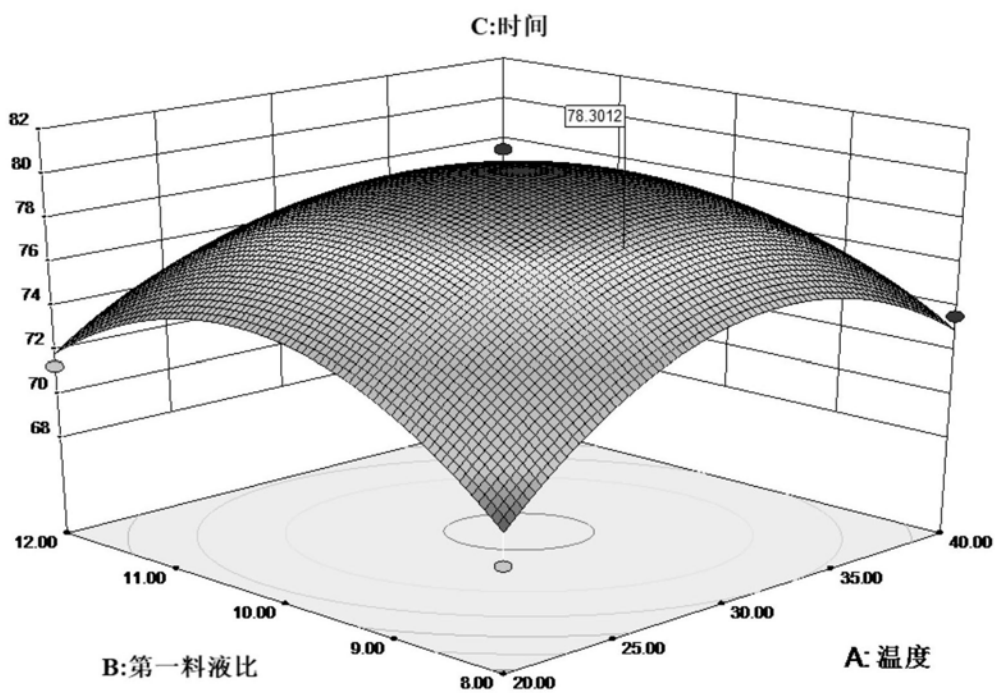


图2

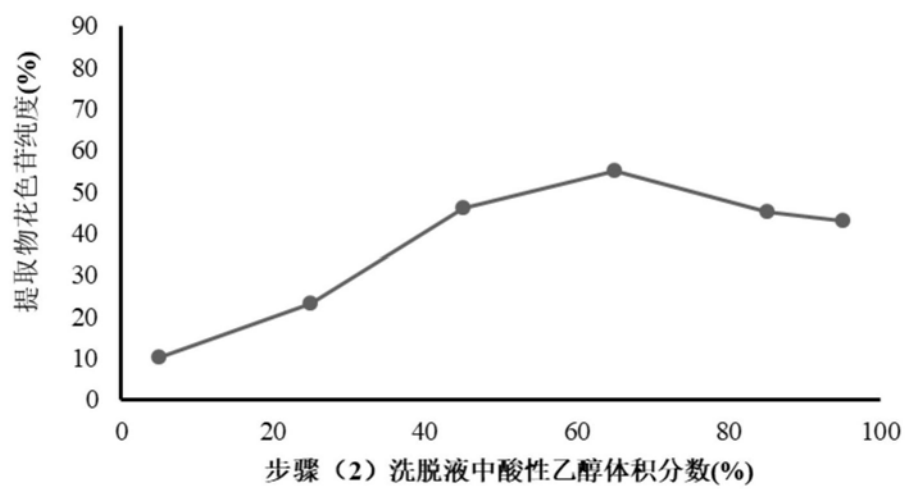


图3

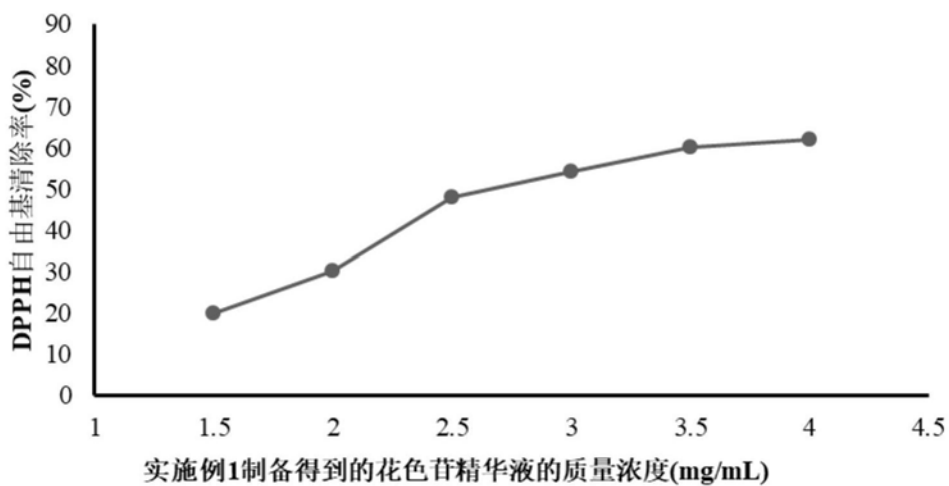


图4

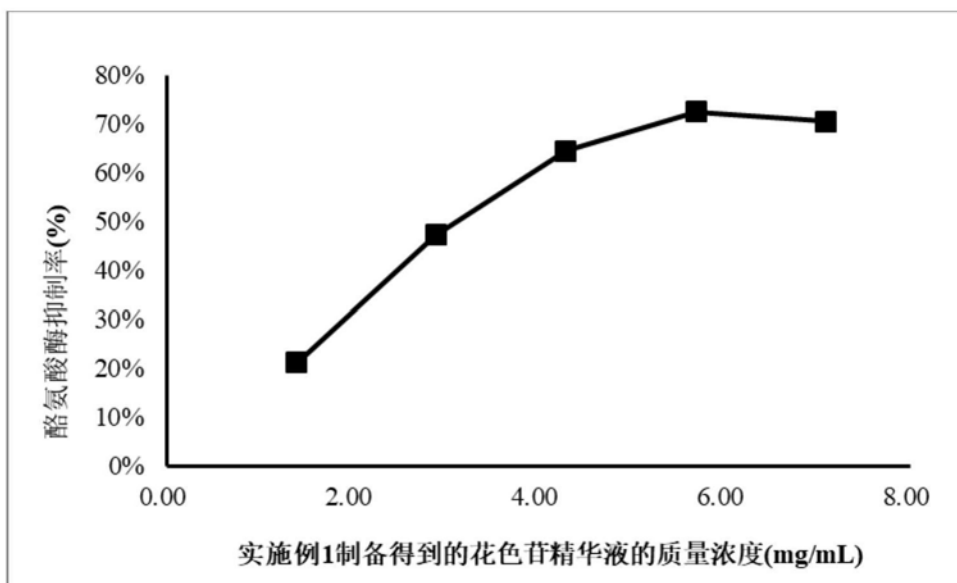


图5

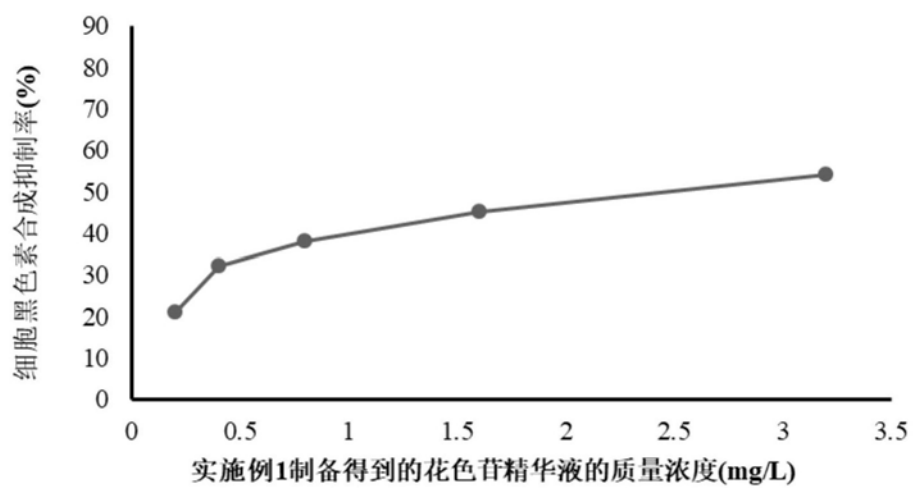


图6