



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111053716 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201911306311.X

A61P 17/10(2006.01)

(22)申请日 2019.12.18

A61P 17/00(2006.01)

(66)本国优先权数据

201911191700.2 2019.11.28 CN

(71)申请人 沅潮医药科技(上海)有限公司

地址 201400 上海市奉贤区光明A3工业园  
区顺福路415号1幢324室

(72)发明人 傅文燕 丁敏 胡适

(74)专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280

代理人 赵建敏

(51)Int.Cl.

A61K 8/9789(2017.01)

A61Q 19/00(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

A61K 36/82(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页

(54)发明名称

一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的  
用途

(57)摘要

本发明公开了一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,所述皮肤调节产品包括对抗痤疮、抗氧化、抗炎症、抗刺激、抗衰老或增强皮肤弹性的护肤产品、化妆品、营养药、皮肤病学用途产品。本发明的茯茶提取物意图通过针对痤疮丙酸杆菌的特异性作用抑制炎症,因此可以作为制备皮肤调节产品的用途。

1. 一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述皮肤调节产品包括对抗痤疮、抗氧化、抗炎症、抗刺激、抗衰老或增强皮肤弹性的护肤产品、化妆品、营养药、皮肤病学用途产品。

2. 根据权利要求1所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述皮肤病学用途产品为对抗痤疮或增强毛囊、抗脱发、增强皮肤弹性、抗衰老或除皱的皮肤病学用途产品。

3. 根据权利要求2所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述茯茶提取物是指水溶性的和/或脂溶性的提取物。

4. 根据权利要求2所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述茯茶提取物是指超临界CO<sub>2</sub>萃取物、有机溶剂提取物、水提取物或其混合物。

5. 根据权利要求4所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述有机溶剂提取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5cm,将茯茶粉末按照固液比为1:20的比例加入85%–95%乙醇,超声破壁至无肉眼可见茶粉及菌体,然后冷浸18–28小时,收集滤液,重复2–5次,滤液减压蒸馏,浓缩滤液,低温干燥,得粗提物,将粗提物经大孔树脂吸附脱色,85%–95%乙醇洗脱后,浓缩蒸干,低温冷冻干燥,得到茯茶有机溶剂提取物。

6. 根据权利要求4所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述水提取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5cm,将茯茶粉末按照固液比为1:10比例加入水,搅拌均匀,超声破壁至无肉眼可见茶粉及菌体,室温下静置2小时,放在沸水浴中煮2小时得到混合溶液;混合溶液取出冷却,超速离心,取上清;将上清以0.22μm滤膜过滤灭菌得到茯茶水提取物。必要时浓缩蒸干,低温冷冻干燥。

7. 根据权利要求4所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述超临界CO<sub>2</sub>萃取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5cm,然后完全碎裂茶粉及菌体,加水蒸汽预泡,提高水分含量达到40%为止,将预泡过的茯茶粉末装入萃取罐中,不断往罐中送入CO<sub>2</sub>,粗提物逐渐萃取出来,带有粗提物的CO<sub>2</sub>送往清洗罐,茯茶提取物进入水相,通过超临界CO<sub>2</sub>提取法提取产生粗制提取物,使用纤维素酶和α-淀粉酶的混合物将淀粉和纤维水解,反应结束,在温度为65℃的条件下热处理30分钟使所述酶变性,离心去除杂质;利用15kDa超滤柱消除残余蛋白质,将提取物用活性炭漂白并且随后过滤和回收,将产物以0.2μm滤膜过滤除菌,然后冻干或包装,获得茯茶超临界CO<sub>2</sub>萃取物。

8. 根据权利要求2所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述茯茶提取物通过针对痤疮丙酸杆菌的特异性作用抑制炎症,以用作皮肤调节产品。

9. 根据权利要求1所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所述皮肤调节产品选自抑制角质形成细胞中炎症介质的产品、抑制基质蛋白酶的基因表达的产品、抑制角质形成细胞中VEGF合成和释放的产品、促进细胞胶原蛋白表达的产品、增加细胞肌原纤蛋白合成的产品、维持干细胞干性的产品、刺激干细胞增殖的产品、促进毛囊乳头成纤维细胞中ATP合成或增强线粒体代谢活性的产品、增加微毛囊的细胞存活力或减轻微毛囊膜损伤的产品、通过清除和排除毒素增加皮肤抗微生物肽hBD3表达的产品、抑制活性氧产生的产品。

10. 根据权利要求1所述的茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途,其特征在于,所

述皮肤调节产品是以茯茶提取物为唯一的活性成份,或包含茯茶提取物的药物组合物。

## 一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药和保健食品技术领域,具体地说,涉及一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途。

### 背景技术

[0002] 茯茶,是以黑毛茶或粗老绿茶为原料,经过再加工的后发酵茶,属于中国六大基本茶类中黑茶的一种,也是全发酵茶。茯茶历史悠久,因其是在夏季伏天加工制作,其香气和作用又类似茯苓,故称茯茶。茯茶的主要形式为紧压茶,即在制作过程中为了便于运输和保藏,生产者将其紧压加工成砖的样式,使其外形看似像砖块,故又名“茯砖茶”。目前,茯茶也有散茶、饼茶等形式出售。茯茶主要销售于边疆地区如新疆、甘肃、西藏等地,俗称“边茶”或“边销茶”,沿“丝绸之路”远销中亚、西亚等四十余个国家,被誉为“古丝绸之路上的神秘之茶”、“丝绸之路上的黑黄金”。

[0003] 现代药理研究表明,茯茶具有显著的促消化、降血脂、养胃瘦身、调节糖代谢、抑制肿瘤细胞和增强免疫力等健康功效。长期饮用茯茶,能够促进人体新陈代谢、提高免疫力、增强体质、延缓衰老,具有明显的药理保健和病理预防作用。

[0004] 研究表明,茯茶的药理活性是茶叶本身活性成分和发酵过程中自然形成的一种优势菌-冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)共同作用的结果。冠突散囊菌对茯茶的品质和药理功效的发挥起了重要作用。冠突散囊菌在茯茶中称作“金花菌”,属于散囊菌目发菌科散囊菌属的一种灰绿色曲霉真菌,适合在土壤、茯砖茶、冬虫夏草、中药片和木屑中生长。冠突散囊菌由子囊果和菌丝组成。冠突散囊菌能生产丰富的天然活性成分,从而赋予了茯砖茶特有的色、香、味,也是茯茶促消化、降脂减肥、抑制肿瘤细胞和治疗心血管疾病等保健功效的物质基础。而冠突散囊菌在茯茶与茶叶共同发酵的过程中,还产生大量在茯茶中特有的生物活性物质。

[0005] 目前,对茯茶的研究有多篇报道。如,卢恒谦(安徽农业大学硕士论文,冠突散囊菌液态发酵制备速溶黑茶及其功能研究,导师岳鹏翔)报道了利用液体发酵制备速溶黑茶的工艺。袁勇(湖南农业大学硕士学位论文,茯茶“金花”菌提取物药理功效与化学成分的初步研究,导师刘仲华)报道了对冠突散囊菌孢子粉的提取分离研究。易凤英等(易凤英,刘素纯,袁潇,赵乐,冠突散囊菌子囊孢子破壁方法的研究,食品与机械2011,27(3):137-139.)报道了冠突散囊菌子囊孢子的破壁方法。Lu等(*Advance Journal of Food Science and Technology* 2016, 10(8):591-596.)报道了冠突散囊菌发酵黑茶中的有效成分研究。Zou等(*Molecules* 2014,19,17839-17847)报道了冠突散囊菌发酵产生的生物碱类化合物。Fu等(*Food Research International* 2011,44:2999-3005.)报道了茯茶的降血脂活性机理。Yan等(*Food and Agricultural Immunology* 2017,28(3):388-402.)报道了茯茶中的冠突散囊菌激活免疫的效果与机理。

[0006] 根据2013年09月26日,原国家质检总局批准对“泾阳茯砖茶”实施地理标志产品保护, [国家质量监督检验检疫总局《质检总局关于批准对运城盐池大盐(河东大盐)、运城盐

池黑泥、泾阳茯砖茶、宜君核桃、红川酒实施地理标志产品保护的公告》(2013年第137号)]对茯茶的质量技术要求进行了明确,方便后续对茯茶进行研究。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0009] 本发明的第一个方面提供了一种茯茶提取物在制备皮肤调节产品中的用途。

[0010] 所述皮肤调节产品包括对抗痤疮、抗氧化、抗炎症、抗刺激、抗衰老或增强皮肤弹性的护肤产品、化妆品、营养药、皮肤病学用途产品,所述皮肤病学用途产品为对抗痤疮或增强毛囊、抗脱发、增强皮肤弹性、抗衰老或除皱的皮肤病学用途产品。

[0011] 所述茯茶提取物是指水溶性的和/或脂溶性的提取物。在本发明的另一些实施例中,所述茯茶提取物是指超临界CO<sub>2</sub>萃取物、有机溶剂提取物、水提取物或其混合物。

[0012] 所述有机溶剂为乙醇。

[0013] 所述有机溶剂提取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5 cm,将茯茶粉末按照固液比为1:20 (m/v)的比例加入85%–95%乙醇,超声破壁至无肉眼可见茶粉及菌体,然后冷浸18–28小时,收集滤液,重复2–5次,滤液减压蒸馏,浓缩滤液,低温干燥,得粗提物,将粗提物经大孔树脂(AB-8大孔吸附树脂)吸附脱色,85%–95%乙醇洗脱后,浓缩蒸干,低温冷冻干燥,得到茯茶有机溶剂提取物。

[0014] 所述水提取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5cm,将茯茶粉末按照固液比为1:10 (m/v)比例加入水,搅拌均匀,超声破壁至无肉眼可见茶粉及菌体,室温下静置2小时,放在沸水浴中煮2小时得到混合溶液;混合溶液取出冷却,超速离心,取上清;将上清以0.22μm滤膜过滤灭菌得到茯茶水提取物。必要时浓缩蒸干,低温冷冻干燥。

[0015] 所述超临界CO<sub>2</sub>萃取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5cm,然后完全碎裂茶粉及菌体,加水蒸汽预泡,提高水分含量达到40%为止,将预泡过的茯茶粉末装入萃取罐中,不断往罐中送入CO<sub>2</sub>,粗提物逐渐萃取出来,带有粗提物的CO<sub>2</sub>送往清洗罐,茯茶提取物进入水相,通过超临界CO<sub>2</sub>提取法提取产生粗制提取物,使用纤维素酶和α-淀粉酶的混合物(浓度为各0.5%)将淀粉和纤维(纤维素、半纤维素等)水解,反应结束,在温度为65℃的条件下热处理30分钟使所述酶变性,离心去除杂质;利用15kDa超滤柱消除残余蛋白质(渗出物),将提取物用活性炭漂白并且随后过滤和回收,将产物以0.2μm滤膜过滤除菌,然后冻干或包装,获得茯茶超临界CO<sub>2</sub>萃取物。

[0016] 本发明所述的茯茶提取物意图通过针对痤疮丙酸杆菌的特异性作用抑制炎症,以用作皮肤调节产品,尤其是作为抗炎性药物或化妆品使用以对抗皮肤的炎症。

[0017] 本发明人发现茯茶提取物具有此前从未描述过的美容和皮肤病学用途。

[0018] 本发明的茯茶提取物是用来作为治疗或预防痤疮的化妆品、营养药或皮肤病学组合物,其包含与合适赋形剂组合的茯茶提取物。该组合物也可以包含选自皮脂调节剂、抗细菌和/或抗真菌剂、角质层分离剂和/或角质层调节剂、收敛剂、抗炎和/或抗刺激剂、抗氧化和/或自由基清除剂、结痂剂、老化剂或润湿剂的至少一种抗痤疮物质。本发明还涉及美容方法,将本发明的组合物施加至患病的皮肤区域,或患病的个体口服服用本发明的

组合物。

[0019] 所述皮肤调节产品可以选自抑制角质形成细胞中炎症介质的产品、抑制基质蛋白酶的基因表达的产品、抑制角质形成细胞中VEGF合成和释放的产品、促进细胞胶原蛋白表达的产品、增加细胞肌原纤维蛋白合成的产品、维持干细胞干性的产品、刺激干细胞增殖的产品、促进毛囊乳头成纤维细胞中ATP合成或增强线粒体代谢活性的产品、增加微毛囊的细胞存活力或减轻微毛囊膜损伤的产品、通过清除和排除毒素增加皮肤抗微生物肽hBD3表达的产品、抑制活性氧产生的产品(预防沙尘引起皮肤产生问题(如炎症等)的产品)。

[0020] 所述皮肤调节产品是以茯苓提取物为唯一的活性成份,或包含茯苓提取物的药物组合物。

[0021] 所述包含茯苓提取物的药物组合物是指茯苓提取物与药学上允许的一种或多种辅料构成的药物组合物。

[0022] 所述皮肤调节产品中茯苓提取物的含量为0.1~99wt%。

[0023] 所述皮肤调节产品中茯苓提取物的含量为0.5~90wt%。

[0024] 所述辅料为稀释剂、赋形剂、粘合剂、填充剂、崩裂剂、香味剂、甜味剂中的至少一种。

[0025] 所述茯苓提取物可以和药剂学上的常规药用辅料制成药物制剂。

[0026] 所述药物制剂是胶囊剂、混悬剂、片剂、粉剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂或注射剂中的至少一种。

[0027] 所述药物制剂的给药方式为口服、注射。

[0028] 在本发明的描述中,所述茯苓优选符合国家质量监督检验检疫总局《质检总局关于批准对运城盐池大盐(河东大盐)、运城盐池黑泥、泾阳茯砖茶、宜君核桃、红川酒实施地理标志产品保护的公告》(2013年第137号)中所述对茯苓的质量技术要求的泾阳茯苓。

[0029] 根据用途的类型,本发明还包括含有茯苓提取物为活性成分的组合物。所述组合物包含至少一种可药用的赋形剂,特别是皮肤病学可接受的赋形剂。如果该组合物是化妆品或皮肤病学组合物,则使用适于体外局部施加的赋形剂。

[0030] 本发明的组合物还可以包含本领域技术人员已知的至少一种药用佐剂,其选自增稠剂、防腐剂、香料、色料、化学或矿物遮光物、润湿剂、温泉水等。

[0031] 本发明的组合物还可以包含选自皮脂调节剂、抗细菌剂、抗真菌剂、角质层分离剂、角质层调节剂、收敛剂、抗炎/抗刺激剂、抗氧化/自由基清除剂、结痂剂、抗老化剂和/或润湿剂的至少一种抗痤疮化合物。

[0032] 术语“皮脂调节剂”例如指5- $\alpha$ -还原酶抑制剂,如活性物质5- $\alpha$ Avocuta®。锌及其葡萄糖酸盐、水杨酸盐和焦谷氨酸也具有皮脂抑制活性。也可以提到在12周应用后显著降低皮脂分泌速率的螺内酯,一种抗雄激素和醛固酮拮抗剂。其他的提取分子(例如来自西葫芦(Cucurbita pepo)的种子、南瓜种子油以及扇叶菜棕(palm cabbage))通过抑制5- $\alpha$ -还原酶转录和活性来限制皮脂产生。影响皮脂性质的其他脂源皮脂调节剂如亚油酸也可以使用。

[0033] 术语“抗细菌剂”和“抗真菌剂”指限制致病微生物如某些细菌如痤疮丙酸杆菌或某些真菌(糠秕马拉色菌(Malassezia furfur)生长或摧毁这些致病微生物的分子。最传统的是化妆品或营养药中通常使用的防腐剂,即具有抗细菌活性的分子(假防腐剂)如辛

酸衍生物(辛酰甘氨酸、辛酸甘油酯等),如己二醇和乙酰丙酸钠、锌和铜衍生物(葡糖酸盐和PCA)、植物鞘氨醇及其衍生物、过氧苯甲酰、吡罗克酮乙醇胺、巯氧吡啶锌、二硫化硒、益康唑、酮康唑、或局部用抗生素如红霉素和克林霉素等。

[0034] 术语“角质层调节剂”和“角质层分离剂”指调节或辅助表皮角质层死细胞消除的物质。常使用的角质层调节剂/角质层分离剂包括:最常使用的角质层调节剂/角质层分离剂包括:果实的 $\alpha$ -羟酸(AHAS)(柠檬酸、羟乙酸、苹果酸、乳酸等)、AHA酯、AHAS与其他分子的组合如苹果酸和杏仁蛋白的组合(Keratolite®)、羟乙酸或乳酸与精氨酸的组合或羟酸与脂质分子如LHA®(脂-羟酸)的组合、两性羟酸复合物(AHCare)、柳树皮(白柳树皮提取物)、壬二酸和其盐及酯、水杨酸及其衍生物如辛酰基水杨酸或与其他分子的组合如水杨酸和多糖( $\beta$ -羟酸或BHA)的组合、他扎罗汀、阿达帕林、以及类视黄醇的分子如维甲酸、视黄醛、异维甲酸和视黄醇。

[0035] 术语“收敛剂”指帮助收窄毛孔的物质,最常使用的是多酚、锌衍生物和北美金缕梅。

[0036] 术语“抗炎性/抗刺激剂”指限制由细胞因子或花生四烯酸代谢介质引起的炎症反应并且具有顺滑和抗刺激性质的物质。最常规的是甘草次酸(甘草衍生物)及其盐和酯、 $\alpha$ -没药醇、银杏(Ginkgo biloba)、金盏花(Calendula)、硫辛酸、 $\beta$ -胡萝卜素、维生素B3(烟酰胺尼古酰胺)、维生素E、维生素C、维生素B12、类黄酮(绿茶、槲皮素等)、番茄红素或叶黄素、鳄梨糖、鳄梨油精华素(avocado oleodistillate)、阿拉伯半乳聚糖、羽扇豆肽、羽扇豆总提取物、昆诺阿藜肽提取物、循环神经酰胺(Cycloceramide®)(噁唑啉衍生物)、抗糖化剂如肌肽、N-乙酰半胱氨酸、异黄酮例如染料木黄酮/染料木苷、黄豆苷原/黄豆苷、泉水或温泉水(雅漾(eau d'Avène)、理肤泉(eau de la Roche Posay)、圣泉薇(eau de SaintGervais)、依泉(eau d'Uriage)、珂玛德(eau de Gamarde)、枸杞(Lycium barbarum)提取物、植物氨基酸肽或复合物、局部用氨基苯砒、或抗炎药。

[0037] 术语“抗氧化/自由基清除剂”指减少或防止其他化学物质氧化的分子。可以组合使用的抗氧化/自由基清除剂优选地选自以下物质组成的组:硫醇和酚、甘草衍生物如甘草次酸和其盐及酯、 $\alpha$ -没药醇、银杏提取物、金盏花(Calendula)提取物、循环神经酰胺(Cycloceramide®)(噁唑啉衍生物)、鳄梨肽、微量元素如铜、锌和硒、硫辛酸、维生素B12、维生素B3(烟酰胺、尼古酰胺)、维生素C、维生素E、辅酶Q10、磷虾油(krill)、谷胱甘肽、丁羟甲苯(BHT)、丁羟茴醚(BHA)、番茄红素或叶黄素、 $\beta$ -胡萝卜素、多酚家族如单宁、酚酸、花青素、类黄酮,例如绿茶、红浆果、可可、葡萄、粉色西番莲(Passiflora incarnata)或柑橘(Citrus)的提取物,或异黄酮,例如染料木黄酮/染料木苷和黄豆苷元/黄豆苷。抗氧化剂类群还包括抗糖化剂如肌肽或某些肽、N-乙酰半胱氨酸以及抗氧化或自由基清除酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还蛋白还原酶及其拮抗剂。

[0038] 可以组合使用的生成瘢痕/修复屏障功能的物质优选地是维生素A、泛醇(维生素B5)、鳄梨呔鳄梨糖喃®(Avocadofurane®)、羽扇醇、玛卡肽提取物、昆诺阿藜肽提取物、阿拉伯半乳聚糖、氧化锌、镁、硅、羟基积雪草酸或积雪草酸、硫酸葡聚糖、辅酶Q10、葡糖胺及其衍生物、硫酸软骨素和总体糖胺聚糖(GAGs)、硫酸葡聚糖、神经酰胺、胆固醇、角鲨烷、磷脂、发酵或未发酵过的大豆肽、植物肽、海洋多糖、植物多糖或生物技术多糖,如藻类提

取物或蕨类提取物、微量元素、富含单宁的植物的提取物如从没食子酸衍生的单宁,其称作没食性单宁或可水解单宁,最初在栎树瘿中找到,和从黄烷单元聚合产生的儿茶素单宁,其模型由儿茶(*Acacia catechu*)提供。可以使用的微量元素优选地选自铜、镁、锰、铬、硒、硅、锌及其混合物组成的组。

[0039] 可以组合使用以治疗成熟受试者中痤疮的抗老化剂是抗氧化剂,尤其是维生素C、维生素A、视黄醇、视黄醛、任何分子量的透明质酸、鳄梨呔喃® (*Avocadofurane*®)、羽扇豆肽和玛卡肽提取物。

[0040] 最常使用的润湿剂/润肤剂是甘油或其衍生物、脲、吡咯烷酮羧酸及其衍生物、任何分子量的透明质酸、糖胺聚糖和海洋源、植物源或生物技术源的任何其他多糖,例如黄原胶、*Fucogel*®、某些脂肪酸如月桂酸、肉豆蔻酸、单不饱和以及多不饱和 $\omega$ -3、-6、-7和-9脂肪酸(亚油酸、棕榈油酸等)、向日葵油精华素(*sunflower oleodistillate*)、鳄梨肽和古朴阿苏果油(*cupuacu butter*)。

[0041] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和植物或动物不可皂化物组成组合物用作皮肤调节产品,例如,鳄梨和大豆不可皂化物和不可皂化的植物油或动物油浓缩物,例如,向日葵油或棕榈油浓缩物,或含有不可皂化物的植物油,例如,大豆油和菜籽油,以及不可皂化物的衍生物如鳄梨呔喃、甾醇酯和维生素衍生物。

[0042] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和鳄梨糖(见申请W02005/115421)组成组合物用作皮肤调节产品,所述组合物特别适于治疗皮肤屏障修复和炎症。

[0043] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和鳄梨肽(见国际申请W02005/105123)组成组合物用作皮肤调节产品,所述组合物特别适于治疗刺激和炎症。

[0044] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和鳄梨油(见国际申请W02004/012496、W02004/012752、W02004/016106、W02007/057439)组成组合物用作皮肤调节产品。

[0045] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和鳄梨呔喃®(鳄梨呔喃,其可以通过国际申请W001/21605中所述的方法获得)组成组合物用作皮肤调节产品。所述组合物特别适于治疗炎症、促进瘢痕形成和适于其抗老化性质。

[0046] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和鳄梨或大豆不可皂化物组成组合物用作皮肤调节产品。可以组合使用的鳄梨和大豆不可皂化物优选地分别是以大约1:3-2:3比例的鳄梨呔喃性不可皂化物和大豆不可皂化物的混合物。

[0047] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和羽扇醇(FR2822821, FR2857596)组成组合物用作皮肤调节产品。所述组合物特别适于支持瘢痕形成。

[0048] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和羽扇豆肽组成组合物用作皮肤调节产品,如根据申请W02005/102259中所述的方法获得的羽扇豆肽。所述组合物特别适于治疗炎症,并且因其抗老化性质而使用。

[0049] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯苓提取物可以和总羽扇豆提取物(见国际申请W02005/102259)组成组合物用作皮肤调节产品,所述组合物特别适于治疗刺

激。

[0050] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和羽扇豆油组成组合物用作皮肤调节产品,优选地是甜味白色羽扇豆油,如国际申请W098/47479中所述的甜味白色羽扇豆油。

[0051] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和玛卡肽提取物(见国际申请W02004/112742)组成组合物用作皮肤调节产品。所述组合物因其结痂性质和抗老化性质而特别优选。

[0052] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和稻肽(见国际申请2008/009709)组成组合物用作皮肤调节产品。所述组合物因其与刺激黑素形成和与黑色素转移相关的性质而特别优选。

[0053] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和循环神经酰胺(Cycloceramide®)(噁唑啉衍生物)组成组合物用作皮肤调节产品,如国际申请W02004/050052、W02004/050079和W02004/112741中所述的循环神经酰胺。所述组合物特别适于治疗炎症反应。

[0054] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和昆诺阿藜提取物组成组合物用作皮肤调节产品,尤其是肽提取物(见国际申请W02008/080974)。所述组合物特别适于治疗炎性疾病和皮肤屏障修复。

[0055] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和古朴阿苏果油(cupuacu butter)组成组合物用作皮肤调节产品。所述组合物因其润湿性质而特别优选。

[0056] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和油菜籽油精华素(rapeseed oleodistillate)组成组合物用作皮肤调节产品。

[0057] 在本发明的一些优选的实施例中,本发明的茯茶提取物可以和玉米油精华素(corn oleodistillate)组成组合物用作皮肤调节产品。

[0058] 除茯茶提取物之外,全部这些组合包含至少一种其他活性化合物,并且可以包含如上所述的两种、三种、四种或更多种活性化合物。

[0059] 除上述这些活性物质之外,单独或与上文提及的活性物质组合,本发明的茯茶提取物可以与本领域技术人员已知的防晒活性物质如UVB和/或UVA滤光物或遮光物或任何无机和/或有机遮光物或滤光物组合使用,所述技术人员将根据所寻求的保护程度调整它们的选择和其浓度。

[0060] 作为防晒活性物质的实例,可以具体提到二氧化钛、氧化锌、亚甲基双-苯并三唑基四甲基丁基酚(品牌名称:TINOSORB M)和双-乙基己氧苯酚甲氧苯基三嗪(品牌名称:TINOSORB S)、辛-水杨酸、丁基甲氧基二苯甲酰基甲烷、对苯二亚甲基二樟脑磺酸、4-甲基亚苄基樟脑、二苯酮、甲氧基肉桂酸乙基己酯、二甲基PABA乙基己酯和二乙基己基丁酰胺基三嗪酮。

[0061] 本发明的茯茶提取物可以和药学上或化妆品、营养品适用的载体以适于局部施加或口服施用的多种制剂形式制备。

[0062] 根据第一变例,多种制剂适于局部施加,并且包括乳膏剂、凝胶剂、乳化剂、乳液剂、香膏剂、洗剂、油剂、水溶液剂或氢化-醇或乙醇酸溶液剂、粉剂、贴剂、喷雾剂或用于外部施加的任何其他产品。

[0063] 根据第二变例,多种制剂适于口服施用,其中可以在膳食补充剂或膳食组合物中包含所述茯苓提取物。

[0064] 在本发明背景下,可以以硬质或软质明胶或植物胶囊剂的形式提供膳食补充剂。所述膳食补充剂因而可以含有以重量计10%至100%的茯苓提取物。

[0065] 在不限制的情况下,也可以在膳食组合物如食物、饮料和营养药中并入本发明的茯苓提取物,所述膳食组合物包括以下制品:

[0066] 1) 乳制品如乳酪、黄油、乳和其他乳状饮料,含有乳产品、冰淇淋和酸乳的混合物和糊状食品;

[0067] 2) 基于脂肪的制品如人造黄油、糊状食品、蛋黄酱、烹调用脂肪、油炸用油和维纳格雷酸辣沙司(vinaigrette);

[0068] 3) 由谷物组成的基于谷物的制品,如面包和面食制品,无论这些食品是否经过烹煮、烘焙或加工;

[0069] 4) 糖果如巧克力、糖食、口香糖、甜品、顶端配料(topping)、清凉果汁饮料(sorbet)、蛋糕糖衣(icing)和其他饰菜(garnishe);

[0070] 5) 酒精或无酒精饮料,包括苏打水和其他软饮料、果汁、膳食补充物、饮料形式的正餐代用品如在品牌名称Boost™和Ensure™下销售的那些正餐代用品,和;

[0071] 6) 多种制品如蛋类、加工食品如汤、即用型面食制品调味汁、准备好的菜肴和相同类型的其他制品。

[0072] 可以借助技术如混合、灌注、注射、掺混、吸附、揉捏和喷洒直接且无其他修饰下将茯苓提取物并入食物中、营养药中、膳食产品,尤其高蛋白产品中或饮料中。

[0073] 可以根据建立适于患者的药物治疗法、尤其皮肤病学疗法时通常所考虑的标准例如,该患者的年龄或体重、该患者整体状态的严重性、对所述疗法的耐受性、明显的副作用和皮肤类型,确定本发明化合物和组合物的施用模式及给药方案和最佳植物制剂形式。

[0074] 本发明还涉及美容治疗痤疮的方法,尤其是将本发明的化妆品组合物施加至患病的皮肤区域。

[0075] 本发明还涉及通过口服途径美容治疗痤疮的方法,尤其是患病的个体口服服用本发明的营养药组合物。

[0076] 本发明还涉及茯苓提取物用于制备治疗或预防痤疮的化妆品、营养药或皮肤病学组合物的用途。

[0077] 在美容或皮肤病学用途的背景下,将会优选地以适于局部施加的制剂形式配制所述组合物。

[0078] 在用于食物中的背景下,针对营养或美容目的(美容食物),将会优选地以适于口服施用的制剂形式配制所述组合物。

[0079] 优选的,本发明所述及茯苓提取物还包括刺激增殖、维持干细胞活性的特异性作用抗衰老、促愈合。如下述实施例所述茯苓提取物对人表皮干细胞细胞具有以增加ALDH阳性细胞比率、Ki67比率的表达的作用。

[0080] 优选的,本发明所述及茯苓提取物意图通过针对痤疮丙酸杆菌的特异性作用抑制炎症。茯苓提取物特异地锁定在病变发展和加重中发挥核心作用的痤疮炎性过程。因而,下文提出的实施例显示茯苓提取物针对角质形成细胞具有以下几种作用:

[0081] 抗炎作用:抑制炎症早期介质(IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )和晚期介质(IL-8);对角质形成细胞诱导 MMP (MMP-2和MMP-9)的抑制作用;对VEGF释放的抑制作用。

[0082] 茯苓提取物也对痤疮丙酸杆菌具有以下作用:抑制痤疮丙酸杆菌诱导IL-8;抑制痤疮丙酸杆菌诱导MMP-9。

[0083] 在本发明的一些方面,本发明还包括所述的茯苓提取物局部或口服施用用于维持/或增加皮肤活力和弹力、减少皮肤损伤、抗衰老等用途。例如实施例所述维持/增加皮肤细胞I型 胶原蛋白、抗光诱导的皮肤损伤和衰老等。

[0084] 在本发明的另一方面,本发明还包括所述的茯苓提取物局部或口服施用用于增强毛囊和 减少皮肤附属器损失、优选脱发的用途。例如实施例所述维持和/或增加V型胶原蛋白和/或 肌原纤维蛋白-1表达和/或用于增加皮肤成纤维细胞、毛囊成纤维细胞增殖和/或用于增加细胞 存活力和/或ATP合成和/或线粒体活性和/或减轻细胞损伤和/或减轻细胞衰老。

[0085] 在本发明的一个实施方案中,美容化妆用护理方法包括将本发明的茯苓提取物或包含其 的组合局部应用至选自如下的身体的全部或部分:腿,足,腋,手,大腿,腹部,颈线, 颈,胳膊,躯干,背部,面部,包括皮肤附属器,优选毛发,和/或头皮,更有利地为头皮。

[0086] 在本发明的背景下术语“衰老”以及术语“皮肤衰老”用于描述皮肤外观上出现的可见变化 以及那些通过触摸可察觉的可见变化,例如像,在非限制意义上的皱纹、细纹、粗糙、表情 纹、妊娠纹、不连续性、深皱纹、松弛、皮肤下垂(如脸颊下垂、眼袋、双下巴)、毛孔大 小的增加、失去弹性、失去回弹性、失去紧致性、弹性组织变性、异常分化、角化过度、角化病、皮肤颜色变化(如斑点、发红或眼袋)、色素沉着过度的区域的形成(如老年斑、黄 褐斑、或雀斑)、失去柔滑性、橘皮样皮肤、失去胶原蛋白结构以及角质层、真皮、表皮、血管系统(例如蜘蛛静脉或毛细血管扩张的形成)、或靠近皮肤的这些组织的其他组织学变 化。皮肤衰老是一个具有两个主要部分的过程,这两个主要部分为:时序衰老,这归因于时 间的流逝;和光诱导的衰老,这归因于暴露于紫外线辐射的水平并且被称作光老化。若干环 境因素如暴露于烟草烟雾、暴露于污染、以及气候条件(如寒冷和/或风)的总和也促成了 皮肤衰老。在本发明的背景中,“皮肤抗衰老治疗”为一种用于防止、延迟、和/或减轻人类 皮肤衰老的治疗。

[0087] 由于采用上述技术方案,本发明具有以下优点和有益效果:

[0088] 本发明的茯苓提取物意图通过针对痤疮丙酸杆菌的特异性作用抑制炎症,茯苓提 取物针 对角质形成细胞具有以下几种作用:茯苓提取物通过抑制角质形成细胞中炎症介 质或基质蛋 白酶的基因表达以及抑制角质形成细胞中VEGF合成和释放实现对抗痤疮的药 学功能;通过 促进细胞胶原蛋白表达、增加细胞肌原纤维蛋白合成、维持干细胞干性以及刺 激干细胞增殖实 现抗衰老功能;通过促进毛囊乳头成纤维细胞中ATP合成或增强线粒体代 谢活性、增加微 毛囊的细胞存活力或减轻微毛囊膜损伤,实现增强毛囊、抗脱发的皮肤病 学用途;通过清除 和排除毒素、增加皮肤抗微生物肽hBD3表达、抑制活性氧产生预防由亚 洲沙尘引起的皮肤 问题,为抗衰老皮肤护理、痤疮对抗、防脱发、预防沙尘影响等皮肤护理 提供了一种新的途 径。

## 具体实施方式

[0089] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例对本发明做进一步的说明。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

### [0090] 实施例1

[0091] 茯茶提取物的制备方法包括以下步骤:

[0092] 取茯茶研成粉末,粉末直径不超过0.5cm,用干式破壁机完全碎裂茯茶粉末,加水蒸汽预泡,提高水分含量达到40%为止,将预泡过的茯茶粉末装入萃取罐中,不断往罐中送入CO<sub>2</sub>,粗提物逐渐萃取出来。带有粗提物的CO<sub>2</sub>送往清洗罐,茯茶提取物进入水相,通过超临界CO<sub>2</sub>提取法提取产生粗制提取物,使用纤维素酶和 $\alpha$ -淀粉酶的混合物(浓度为各0.5%)将淀粉和纤维(纤维素、半纤维素等)水解,反应结束,在温度为65°C的条件下热处理30分钟使所述酶变性,离心去除杂质;利用15kDa超滤柱消除残余蛋白质(留取渗出物),将提取物用活性炭漂白并且随后过滤和回收,将产物以0.2 $\mu$ m滤膜过滤除菌,然后冻干或包装,获得茯茶超临界CO<sub>2</sub>萃取物。

[0093] 按照同样的方法制备普洱茶提取物,作为后续实验的对照品。

### [0094] 实施例2

#### [0095] 茯茶提取物增强I型胶原蛋白

[0096] 将实施例1制备的茯茶提取物加入到人皮肤成纤维细胞(ATCC)的培养液(DMEM培养液)中(茯茶提取物在培养液的终浓度为0.5%质量体积比),以证实茯茶提取物在细胞水平上促进I型胶原蛋白合成。

[0097] 胶原蛋白的测定是使用PICP试剂盒(前胶原蛋白I型C肽酶免疫测定试剂盒,R&D Systems)进行定量。使用DMEM培养液将人皮肤成纤维细胞以 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔等分到6孔板中。确认细胞粘附后,将作为有效成分的茯茶提取物溶解于培养液(茯茶提取物在培养液的终浓度为0.5%质量体积比)作为处理组,相同浓度的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液。在37°C、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中培养24小时,测定细胞裂解物中I型胶原蛋白的含量,结果如表1所示,结果显示茯茶提取物可以有效促进胶原蛋白表达。

#### [0098] 表1胶原蛋白浓度

[0099]	处理组	对照组	空白组
I型胶原蛋白浓度 $\mu$ g/ml	0.030	0.002	0.002
增加率(%)	1500	-	-

### [0100] 实施例3

#### [0101] 茯茶提取物对皮肤模型的影响

[0102] 利用实施例1制备的茯茶提取物进行本实施例。

[0103] 通过紫外线照射皮肤进行了在紫外线照射下皮肤衰老的情况试验,在紫外线照射下皮肤中表皮-真皮结合部位的胶原纤维网络受损。因此,胶原纤维的量和形态用作皮肤衰老的指标。

[0104] 将实施例1制备的茯茶提取物溶于DMEM培养基中,茯茶提取物终浓度为0.5%质量体积比,作为处理组;相同浓度的普洱茶提取物作为对照组,以未含有任何茶提取物的相同DMEM培养基作为空白组。每次照射前,在无毛小鼠的皮肤表面涂布茯茶提取物100 $\mu$ l,30

分钟后进行紫外线照射实验。紫外线照射的方法如下：采用两支40W长波紫外线灯管和两支40W中波紫外线灯管（产自飞利浦公司，长波为320-400nm，中波为280-320nm。），灯管 距离皮肤35cm。每天照射2小时，连续照射6周。利用紫外线强度测定仪（北京师范大学 光电仪器厂）检测，辐照强度累积为长波165J/cm<sup>2</sup>，中波紫外线4.667J/cm<sup>2</sup>。6周处死动物，将接受紫外线照射的无毛小鼠的皮肤组织用马松三色法 (Masson's Trichrome) 染色，用光学显微镜观察检测染色面积，对照组的染色面积作为标准面积100%，处理组的染色面积和对照组的染色面积结果如表2所示，从表2中可以看出，茯苓提取物即处理组相比对照组可以明显增强胶原纤维网络面积，提示茯苓提取物可以用于制备抗光衰老产品。

[0105] 表2

[0106]	平均值	SD	p值
空白组	100	4.5	
对照组	102.61	7.11	p>0.05
处理组	164.51	14.7	p<0.05

[0107] 人造皮肤(购自MatTek, Ashland, USA的EpiDermFT™) 在专用培养基 (EFT-400) 中稳定 18小时。在人造皮肤的表面上涂布浓度为0.5% (质量体积比, DMEM培养基) 的100μl实施例1制备的茯苓提取物作为有效成分, 作为处理组; 相同浓度的普洱茶提取物作为对照组, 以空白DMEM培养基作为空白组。30分钟后进行紫外线照射, 将人造皮肤置于40W中波紫外线光源 (产自飞利浦公司) 正下方10cm处进行辐照 (辐照时间: 5min, 累计辐照剂量: 30mJ/cm<sup>2</sup>), 然后进行常规培养。24小时后, 将人造皮肤组织用10%甲醛固定, 并用石蜡包埋, 用马松三色法 (Masson's Trichrome: M&T) 染色并切成5μm的组织, 从而观察计算胶原纤维 (collagen fibers) 的染色面积, 结果如表3所示, 结果显示, 实施例1制备的茯苓提取物 在光照条件下具有抗衰老作用。

[0108] 表3

[0109]	平均值	SD	p值
空白组	100	7.92	
对照组	96.51	5.55	p>0.05
处理组	144.51	12.73	p<0.05

[0110] 实施例4

[0111] 对实施例1制备的茯苓提取物进行预防和治疗痤疮的作用实验。

[0112] 角质形成细胞单层模型; L-1α、IL-1β、IL-8、MMP-2和MMP-9表达的研究、角质形成细胞/痤疮丙酸杆菌共培养模型; MMP-9表达的研究、角质形成细胞单层模型; 对IL-1α和VEGF的作用研究、角质形成细胞/痤疮丙酸杆菌共培养模型; 对IL-8产生的作用研究的模型建立、实验方法、实时RT-PCR方法和结果计算参考专利 (CN102481245B)。结果如下:

[0113] 茯苓提取物对初始炎症介质: IL-1α和IL-1β的影响, 分析编码IL-1α和IL-1β的基因的表达。

[0114] 在48小时处理后, 测试0.5%和1%茯苓提取物显著抑制角质形成细胞中的IL-1α基因表达 (如表4所示) 和IL-1β基因表达 (如表5所示), 1%的普洱茶提取物作为对照组, 空白组仅含有培养基。

[0115] 表4: 角质形成细胞中的IL-1α基因表达

[0116]	IL-1 $\alpha$ 分析	RQ	抑制%	p值
	空白	1		
	1%普洱茶提取物	0.95	-5	$p > 0.05$
	0.5%茯茶提取物	0.32	-68	$p < 0.05$
	1%茯茶提取物	0.15	-85	$p < 0.05$

[0117] 表5:角质形成细胞中的IL-1 $\beta$ 基因表达

	IL-1 $\beta$ 分析	RQ	抑制%	p值
[0118]	空白	1		
	1%普洱茶提取物	0.98	-2	$p > 0.05$
	0.5%茯茶提取物	0.15	-85	$p < 0.05$
[0119]	1%茯茶提取物	0.08	-92	$p < 0.05$

[0120] 表4和表5的结果显示,茯茶提取物能有效的抑制角质形成细胞IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达,有效对抗炎症。

[0121] 茯茶提取物对IL-8表达的影响:次级炎症介质

[0122] 1.分析编码IL-8的基因的表达

[0123] 在48小时处理后,测试0.5%和1%茯茶提取物显著抑制角质形成细胞中的IL-8基因表达(如表6所示)。

[0124] 表6:角质形成细胞中的IL-8基因表达

[0125]	IL-8分析	RQ	抑制%	p值
	空白	1		
	1%普洱茶提取物	0.96	4	$p > 0.05$
	0.5%茯茶提取物	0.21	-79	$p < 0.05$
	1%茯茶提取物	0.12	-88	$p < 0.05$

[0126] 从表6的数据可以看出,茯茶提取物抑制角质形成细胞中的IL-8基因表达,有效的抑制炎症的发生。

[0127] 2.对受到痤疮丙酸杆菌刺激的角质形成细胞中IL-8产生的影响。

[0128] 用痤疮丙酸杆菌悬液处理角质形成细胞极强烈地刺激IL-8释放,一种炎症次生标记(如表7所示)。用茯茶提取物预处理60分钟抑制了角质形成细胞释放IL-8,IL-8生产的抑制在0.5%开始并且在5%达到完全。

[0129] 表7:分析角质形成细胞/痤疮丙酸杆菌共培养物中的IL-8

	平均 IL-8 (pg/ml)	刺激% (相对于未处理而言的痤疮丙酸杆菌对照)	抑制% (相对于阳性痤疮丙酸杆菌对照而言计算)
未刺激的对照	88.5		
阳性对照: 痤疮丙酸杆菌对照	1044.5	+1180	
[0130] 痤疮丙酸杆菌对照 +5%普洱茶提取物	1011.31		
痤疮丙酸杆菌对照 +0.5%茯茶提取物	755.3		-28
痤疮丙酸杆菌对照 +1%茯茶提取物	356.5		-66
痤疮丙酸杆菌对照 +5%茯茶提取物	15.2		-100

[0131] 从表7的数据可以看出, 茯茶提取物可以有效地降低由痤疮丙酸杆菌介导的IL-8释放, 具有显著抑制痤疮丙酸杆菌介导炎症的作用。

[0132] 茯茶提取物对基质蛋白酶MMP-2和MMP-9的影响

[0133] 1. MMP-2表达的分析

[0134] 用0.5%茯茶提取物处理角质形成细胞48小时导致MMP-2基因表达的显著抑制(-75%抑制)(如表8所示)。

[0135] 表8: 角质形成细胞中的MMP-2基因表达

MMP-2	RQ	抑制%	p值
空白	1		
0.5%普洱茶提取物	1.05		p>0.05
0.5%茯茶提取物	0.255	-75	p<0.01

[0137] 从表8的数据可以看出, 茯茶提取物可以有效地降低角质形成细胞MMP-2的基因表达, 具有显著抑制炎症扩散的作用。

[0138] 2. MMP-9表达的分析

[0139] 在参与痤疮病理的基质蛋白酶当中, MMP-9发挥特别重要的作用。实际上, 这种蛋白酶受促炎性细胞因子正调节, 还受痤疮丙酸杆菌正调节。

[0140] 如表9中所示, Q-PCR结果的分析显示: 用茯茶提取物处理48小时后抑制角质形成细胞中的MMP-9基因表达(在0.5%时-45%抑制和在1%时-69%抑制)。

[0141] 表9: 角质形成细胞中的MMP-9基因表达

MMP-9	RQ	抑制%	p值
空白	1		
1%普洱茶提取物	1.05		p>0.05
0.5%茯茶提取物	0.55	-45	p<0.01
1%茯茶提取物	0.31	-69	p<0.01

[0143] 从表9的数据可以看出,茯苓提取物可以有效地降低角质形成细胞MMP-9的基因表达,具有显著抑制炎症扩散的作用。

[0144] 类似地,还在角质形成细胞/痤疮丙酸杆菌共培养模型中评价对MMP-9表达的调节(如表10所示)。使用这个模型,展示了痤疮丙酸杆菌细菌悬液对MMP-9基因表达的刺激性影响(+55%)。相反,用茯苓提取物预处理角质形成细胞对抗痤疮丙酸杆菌的这种刺激性作用并且还抑制这种刺激性作用(相对于用细菌悬液处理的角质形成细胞,-51%和-67%)。

[0145] 表10:角质形成细胞/痤疮丙酸杆菌共培养物中的MMP-9基因表达

	MMP-9	RQ	抑制%	<i>p</i> 值
[0146]	未处理的对照	1		
	阳性对照: 痤疮丙酸杆菌	1.55	+55	$p < 0.05$
	痤疮丙酸杆菌+1%普洱茶提取物	1.58	+58	$p < 0.05$
[0147]	痤疮丙酸杆菌+0.5%茯苓提取物	0.75	-51	$p < 0.05$
	痤疮丙酸杆菌+1%茯苓提取物	0.51	-67	$p < 0.05$

[0148] 从表10的数据可以看出,茯苓提取物可以有效地降低痤疮丙酸杆菌介导的MMP-9的基因表达,具有显著抑制痤疮丙酸杆菌介导炎症的作用。

[0149] 茯苓提取物对血管发生(VEGF)的影响

[0150] 研究了茯苓提取物对角质形成细胞合成和释放VEGF的潜在抑制性影响,结果呈现于表11中。PMA刺激角质形成细胞24小时诱导VEGF的大量和明显释放(+266%)。相反,用茯苓提取物预处理角质形成细胞24小时对这种作用并且显著地抑制这种作用。

[0151] 表11:分析角质形成细胞中的VEGF

	VEGF	平均 VEGF (pg/ml)	刺激% (相对于未处理对照而言的 PMA)	抑制% (相对于 PMA 而言的茯苓提取物)	<i>p</i> 值
[0152]	未刺激的对照	300.42			
	阳性对照 (PMA)	800.56	+266		$p < 0.05$
	1%普洱提取物	784.55			$p < 0.05$
	0.5%茯苓提取物	500.34		-37.2	$p < 0.05$
	1%茯苓提取物	410.26		-48.8	$p < 0.05$

[0153] 从表11的数据可以看出,茯苓提取物可以有效地降低VEGF的分泌,具有显著抑制局部血管炎症的作用。

[0154] 实施例5

[0155] 实施例1制备的茯苓提取物增强毛囊成纤维V型胶原蛋白表达

[0156] 正常人成纤维细胞在添加终浓度为0.5%和1%质量体积比的茯苓提取物的FGM培养基(Lonza公司生产)中培养48小时,培养条件为37°C、5%CO<sub>2</sub>,然后除去细胞培养基。以1%质量体积比的普洱茶提取物的FGM培养基作为对照,不含任何茶提取物的相同FGM培养

基用作空白对照。将细胞层用氢氧化铵裂解液 (MIBio公司生产) 在4℃裂解10分钟,然后在缓冲溶液 (PBS) 中稀释至1/4000的抗-胶原蛋白V抗体测定V型胶原蛋白。60分钟后,应用稀释至1/25000的二级抗体达60分钟。在洗涤后,加入ECL显示溶液 (赛默飞生产),测定荧光 (ENVision,PerkinElmer)。将荧光结果相对于对照培养基得到的荧光 (对照) 进行标准化,使其与在每个条件下得到的胶原蛋白量相关,所示结果为3次测定的平均值 (n=3) (SD:标准偏差),结果如表12所示。

[0157] 表12毛囊成纤维细胞V型胶原蛋白表达情况

组别	平均值	SD	p 值
空白	100	6.5	
普洱茶提取物 1%(w/v 培养基)	94	7.1	$p > 0.05$
茯苓茶提取物 0.5%(w/v 培养基)	134	15.6	$p < 0.05$
茯苓茶提取物 1%(w/v 培养基)	204	19.8	$p < 0.05$

[0160] 结论:在所分析的毛囊来源成纤维细胞中,所述茯苓茶提取物使V型胶原蛋白表达增加至少34%和104%,显示茯苓茶提取物显著增强胶原蛋白表达的性质,可以用于增强毛囊和减少脱发方面的药物或化妆品、营养药中。

[0161] 实施例6

[0162] 茯苓茶提取物增加肌原纤维蛋白-1合成

[0163] 将正常人成纤维细胞在FGM培养基 (Lonza公司生产) 中培养48小时,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>。将作为有效成分的实施例1制备的茯苓茶提取物溶解于培养液 (茯苓茶提取物在培养液的终浓度为0.5%和1%质量体积比作为处理组,1%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养48小时,采集成纤维细胞,然后用裂解缓冲液 (碧云天公司生产) 4℃裂解30分钟以进行免疫印迹法 (Western Blots),通过BCA方法测定了蛋白质浓度。将所有样品相对于蛋白质总量进行标准化 (n=3),使用抗-肌原纤维蛋白-1抗体 (LS-BIO),二抗为过氧化物酶-偶联的抗体,利用化学发光底物进行定量研究 (Protein Simple),结果如表13所示。

[0164] 表13肌原纤维蛋白-1表达

组别	平均值	SD	p值
空白 [仅培养基]	100	6	
普洱茶提取物1% (w/v培养基)	102.5	11.1	$p > 0.05$
茯苓茶提取物0.5% (w/v培养基)	165.6	15.5	$p < 0.05$
茯苓茶提取物1% (w/v培养基)	205.4	25.2	$p < 0.05$

[0166] 结论:与对照相比,本发明实施例1制备的茯苓茶提取物显示出在成纤维细胞中的肌原纤维蛋白-1合成增加。

[0167] 实施例7

[0168] 茯苓茶提取物促进毛囊乳头成纤维细胞中ATP合成增加

[0169] 将来自毛囊乳头的非病理性人成纤维细胞在DMEM培养基上培养24小时,然后将作为有效成分的实施例1制备的茯苓茶提取物溶解于培养液 (茯苓茶提取物在培养液的终浓度为

0.5% 和1%质量体积比作为处理组,1%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养6天,茯茶提取物的终浓度为0.5%和1%质量体积比。在6天后通过酶促法(荧光素/荧光素酶络合物;ATP Bioluminescence kit Roche Diagnostics)测量ATP含量(如表14所示)。

[0170] 表14 ATP含量

组别	平均值	SD	p 值
空白[仅培养基]	100	10.5	
普洱茶提取物 1%(w/v 培养基)	92	7.8	$p > 0.05$
茯茶提取物 0.5%(w/v 培养基)	156	17.5	$p < 0.05$
茯茶提取物 1%(w/v 培养基)	178	20.5	$p < 0.05$

[0173] 结论:茯茶提取物与对照相比显示出ATP合成增加,证实其具有用于增强毛囊的活性的用途。

[0174] 实施例8

[0175] 实施例1制备的茯茶提取物增强毛囊乳头成纤维细胞的线粒体代谢活性

[0176] 将毛囊乳头的非病理性人成纤维细胞在DMEM培养基中培养24小时,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>。将作为有效成分的实施例1制备的茯茶提取物溶解于培养液(茯茶提取物在培养液的终浓度为0.5%和1%质量体积比作为处理组,1%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养6天。在琥珀酸脱氢酶的存在下、通过MTT (3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓溴化物)的还原测量了成纤维细胞的线粒体活性。将所得沉淀物用DMSO提取,然后于540nm测量DMSO溶液的光密度(如表15所示)。

[0177] 表15相对线粒体活性

	平均值	SD	p值
空白[仅培养基]	100	14.3	
普洱茶提取物1% (w/v培养基)	91.3	11.3	$p > 0.05$
茯茶提取物0.5% (w/v培养基)	138.4	20.5	$p < 0.05$
茯茶提取物1% (w/v培养基)	176.5	25.5	$p < 0.05$

[0179] 结论:本发明实施例1制备的茯茶提取物与对照相比,显示出毛囊乳头成纤维细胞的线粒体活性增加,该线粒体活性参与毛囊的增强。

[0180] 实施例9

[0181] 实施例1制备的茯茶提取物对微毛囊的作用

[0182] 茯茶提取物重建方法:微毛囊模型包括将乳头成纤维细胞、来自毛囊外鞘的角质形成细胞和黑素细胞在三维上共培养,由于能够整合各种细胞类型之间的神经-表皮-间质相互作用,该细胞模型构成了最接近毛囊的重建器官模型。

[0183] 将非病理性乳头成纤维细胞在DMEM培养基中培养3天形成单层表皮乳头。然后,将黑素细胞和毛囊外鞘的角质形成细胞加入到上述单层表皮乳头中以形成微毛囊;培养24小时,将作为有效成分的实施例1制备的茯茶提取物溶解于培养液(茯茶提取物在培养液的终

浓度为0.5%质量体积比作为处理组,0.5%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组(仅有培养液。)在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养48小时。处理48小时,对培养基和微毛囊采样用于分析。

[0184] 通过PrestoBlue方法(Thermo Fisher Scientific)测量了微毛囊的细胞存活力,处理48小时后进行测定,表16中的数值表示为对照进行标准化后的平均值%。

[0185] 表16相对细胞活力

[0186]

	平均值	SD	p值
空白[仅培养基]	100	9.5	
普洱茶提取物0.5% (w/v培养基)	97.2	3.3	p>0.05
茯苓提取物0.5% (w/v培养基)	164.5	21.5	p<0.05

[0187] 结论:本发明实施例1制备的茯苓提取物具有增加微毛囊的细胞存活力的能力,使其成为对增强毛囊具有活性的茯苓提取物,因此,所述茯苓提取物可以作为制备防脱发的药物或化妆品的用途。

[0188] 评估微毛囊水平上的膜损伤的减轻

[0189] 利用乳酸脱氢酶检测法,通过比色法测量细胞损伤,使得能够基于培养基中受损细胞中乳酸脱氢酶活性的测量来定量细胞损伤。细胞膜损伤的增加和细胞溶解导致乳酸脱氢酶活性增加,其与裂解细胞的数量成比例。将非病理性乳头成纤维细胞在DMEM培养基中培养3天形成单层表皮乳头。然后,将黑素细胞和毛囊外鞘的角质形成细胞加入到上述单层表皮乳头中以形成微毛囊;培养24小时,将作为有效成分的实施例1制备的茯苓提取物溶解于培养液(茯苓提取物在培养液的终浓度为0.5%质量体积比作为处理组,0.5%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液。)在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养48小时,然后利用乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(碧云天生产)检测培养基中的乳酸脱氢酶活性(如表17所示)。

[0190] 表17相对细胞损伤

[0191]

	平均值	SD	p值
空白[仅培养基]	100	12.5	
普洱茶提取物0.5% (w/v培养基)	93	6.1	p>0.05
茯苓提取物0.5% (w/v培养基)	35	10.5	p<0.05

[0192] 结论:本发明实施例1制备的茯苓提取物具有减轻细胞膜损伤的能力,使其成为对增强毛囊具有活性的茯苓提取物,增强毛囊促进了脱发的减少,即本发明实施例1制备的茯苓提取物可以作为防脱发的药物或化妆品的用途。

[0193] 实施例10茯苓提取物维持干细胞干性和增殖活性

[0194] 利用实施例1制备的茯苓提取物进行本实施例。

[0195] 将人表皮干细胞(ESC, ATCC)以 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔等分到6孔版中,培养基采用DMEM培养基。确认细胞粘附后,将作为有效成分的实施例1制备的茯苓提取物溶解于培养液(茯苓提取物在培养液的终浓度为0.5%质量体积比作为处理组,0.5%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液。)在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养24小时。利用流式细胞术检测ESC细胞的ALDH阳性率和Ki67阳性率,结果如表18所示。

[0196] 表18 ALDH阳性率和Ki67阳性率

[0197]		处理组	对照组	空白组	p值(处理组vs.对照组)
	ALDH阳性率	58.5%	29.1%	26.7%	p<0.05
	Ki67阳性率	45.5%	15.5%	18.3%	p<0.05

[0198] 结果显示,茯茶提取物具有非常强的维持表皮干细胞干性和刺激表皮干细胞增殖的作用。

[0199] 实施例11

[0200] 实施例1制备的茯茶提取物应对亚洲沙尘引起的人角质形成细胞中的活性氧产生

[0201] 亚洲沙尘是起源于中国、蒙古、中亚和俄罗斯等国沙漠的一种气候现象。在这些地方,沙子或黄色沙尘随风刮向东并落到地上。几乎每年春季北京等北方地区都会受到亚洲沙尘的影响。亚洲沙尘包含有机和无机物质,并且其物理性质和组成是不同的,其甚至包含可能具有生物效应的金属。亚洲沙尘中包含的大颗粒保留在原地或其周围,而直径为10 μm或更小的微粒(颗粒物10;PM10),近年来持续爆发的PM2.5也属于这类气候污染。

[0202] 据报道,微粒在被吸入时可以深入到达亚段支气管和肺的气体交换区域并可能损伤呼吸系统(Yanagisawa et al,Exp Biol Med232:1109-1118,2007;Kim et al, J Biosci28(1):77-81, 2003)。亚洲沙尘对人呼吸疾病方面的健康影响已经有大量报道。在小鼠实验性研究中,在被灌注亚洲沙尘的小鼠肺中发现氧化应激相关指数增大(Naota et al.,Toxicol Pathol.2010 Sep30.临床上,如果皮肤直接暴露于亚洲沙尘,它可能通过过敏反应导致接触性皮炎。此外,已知干燥和强烈的亚洲沙尘暴通过使皮肤丧失水分导致皮肤干燥、角质化、瘙痒、痤疮、特应性等。近来,关于亚洲沙尘对皮肤的有害作用也有报道,如研究显示亚洲沙尘导致角质形成细胞中包括细胞因子白介素6和白介素8的促炎性因子的增加(Choi et al.,Toxicol Lett.15;200(1-2):92-9.2010)。

[0203] 人表皮新生角质形成细胞细胞培养24小时,培养基为DMEM培养基,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>。将作为有效成分的实施例1制备的茯茶提取物溶解于培养液(茯茶提取物在培养液的终浓度为0.5%和1%质量体积比作为处理组,1%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液。),然后分别加入30μg/mL亚洲沙尘样品,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养24小时。亚洲沙尘样品是在亚洲沙尘季节期间在国贸三期A座大楼(北京市)的阳台屋顶上收集的。将人表皮新生角质形成细胞用10mL磷酸缓冲盐(phosphate buffered saline,PBS)洗涤两次,并使用G1omax20/20发光检测仪在加入1mM鲁米诺和20单位/mL辣根过氧化物酶(HRP)1分钟后在2mL PBS中测量化学发光,结果如表19所示。

[0204] 表19活性氧相对水平

	平均值 (%)	SD	p 值
[0205] 未加入亚洲尘土对照	13.14	2.15	
空白对照	100	6.67	
普洱茶提取物 1%(w/v 培养基)	105.32	11.21	p<0.05
[0206] 茯茶提取物 0.5%(w/v 培养基)	41.25	5.68	p<0.05
茯茶提取物 1%(w/v 培养基)	20.78	7.56	p<0.05

[0207] 结果显示,本发明实施例1制备的茯茶提取物可以抑制由亚洲沙尘介导的正常人

角质形成细胞中活性氧的产生。

[0208] 实施例12

[0209] 实施例1制备的茯茶提取物对毒素去毒和排除因子、抗微生物肽的表达作用

[0210] 同实施例11,人表皮新生角质形成细胞培养24小时,培养基为DMEM培养基,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>。将作为有效成分的实施例1制备的茯茶提取物溶解于培养液(茯茶提取物在培养液的终浓度为0.5%和1%质量体积比作为处理组,1%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液。),然后分别加入30μg/mL亚洲沙尘样品,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养24小时。亚洲沙尘样品是在亚洲沙尘季节期间在国贸三期A座大楼(北京市)的阳台屋顶上收集的。实验各组细胞用10mL磷酸盐缓冲液洗涤两次,并使用TRIzol (Invitrogen)从细胞中分离出总RNA(total RNA)。再次使用RNA试剂盒(Qiagen)对分离出的RNA进行纯化并使用Bioanalyzer2100(Agilent)分析RNA的质量(quality)。使用Superscript逆转录酶(RT)II试剂盒(Superscriptreverse transcriptase(RT)II kit)由分离出的RNA合成cDNA,并通过实时反转录聚合酶链反应(real-time reverse transcription polymerase chain reaction,qPCR)对cDNA进行定量分析。使用TaqMan基因表达分析试剂盒(TaqMan gene expression assay kit,Applied Biosystems)对GSTT1(Hs00184475\_m1)、NQO1(Hs01045994\_m1)和hBD3(hs00218678\_m1)的表达水平进行检测,结果如表20~22所示。

[0211] 表20 NQO1相对表达水平

	平均值(%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	140.56	18.56	
空白对照	100	11.27	
普洱茶提取物1%(w/v培养基)	106.12	8.67	p>0.05
茯茶提取物0.5%(w/v培养基)	266.36	30.15	p<0.05
茯茶提取物1%(w/v培养基)	487.36	45.22	p<0.05

[0213] 表21 GSTT1相对表达水平

	平均值(%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	401.56	45.22	
空白对照	100.00	9.57	
普洱茶提取物1%(w/v培养基)	113.31	12.23	p>0.05
茯茶提取物0.5%(w/v培养基)	378.61	41.22	p<0.05

[0215] 茯茶提取物1%(w/v培养基)	587.68	70.55	p<0.05
------------------------	--------	-------	--------

[0216] 表22 hBD3相对表达水平

	平均值(%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	256.75	30.11	
空白对照	100.00	12.33	
普洱茶提取物1%(w/v培养基)	93.35	10.17	p>0.05

茯茶提取物0.5% (w/v培养基)	197.69	15.98	p<0.05
茯茶提取物1% (w/v培养基)	499.26	50.76	p<0.05

[0218] 结果所示,本发明实施例1制备的茯茶提取物可以增加去毒素蛋白NQO1、天然免疫因子的皮肤抗微生物肽hBD3和排除毒素的酶的GSTT1在正常人角质形成细胞中的表达。

[0219] 实施例13

[0220] 实施例1制备的茯茶提取物对抗氧化蛋白基因的表达作用

[0221] 同实施例11,人表皮新生角质形成细胞细胞培养24小时,培养基为DMEM培养基,培养条件为37℃、5%CO<sub>2</sub>。将作为有效成分的实施例1制备的茯茶提取物溶解于培养液(茯茶提取物在培养液的终浓度为0.5%和1%质量体积比作为处理组,1%质量体积比的普洱茶提取物作为对照组,空白组仅有培养液。),然后分别加入30μg/mL亚洲沙尘样品,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件的培养箱中继续培养24小时。亚洲沙尘样品是在亚洲沙尘季节期间在国贸三期A座大楼(北京市)的阳台屋顶上收集的。实验各组细胞用10mL磷酸盐缓冲液洗涤两次,并使用TRIzol (Invitrogen)从细胞中分离出总RNA(total RNA)。再次使用RNA试剂盒(Qiagen)对分离出的RNA进行纯化并使用Bioanalyzer2100 (Agilent)分析RNA的质量(quality)。使用Superscript逆转录酶(RT) II试剂盒(Superscript reverse transcriptase (RT) II kit)由分离出的RNA合成cDNA,并通过实时反转录聚合酶链反应(real-time reverse transcription polymerase chain reaction,qPCR)对cDNA进行定量分析。使用TaqMan基因表达分析试剂盒(TaqMan gene expression assay kit, Applied Biosystems)对GPX1(Hs00829989\_gH)、过氧化氢酶(Hs00156308\_m1)、TRX1(Hs01555212\_g1)和PRDX1(Hs00602020\_mH)的表达水平进行检测,结果如表23~26所示。

[0222] 表23 GPX1相对表达水平

[0223]

	平均值(%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	165.66	18.66	
空白对照	100.00	7.15	
普洱茶提取物1% (w/v培养基)	109.12	6.18	p>0.05
茯茶提取物0.5% (w/v培养基)	198.22	210.35	p<0.05
茯茶提取物1% (w/v培养基)	455.33	50.62	p<0.05

[0224] 表24过氧化氢酶相对表达水平

[0225]

	平均值(%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	256.56	30.11	
空白对照	100.00	16.67	
普洱茶提取物1% (w/v培养基)	93.31	10.81	p>0.05
茯茶提取物0.5% (w/v培养基)	194.13	20.74	p<0.05
茯茶提取物1% (w/v培养基)	398.44	41.94	p<0.05

[0226] 表25 TRX1相对表达水平

[0227]

	平均值(%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	164.18	19.65	
空白对照	100.00	18.66	

普洱茶提取物1% (w/v培养基)	115.91	8.94	p>0.05
茯苓提取物0.5% (w/v培养基)	208.81	22.84	p<0.05
茯苓提取物1% (w/v培养基)	299.32	35.31	p<0.05

[0228] 表26 PRDX1相对表达水平

	平均值 (%)	SD	p值
未加入亚洲尘土	301.57	32.66	
空白对照	100.00	9.91	
普洱茶提取物1% (w/v培养基)	123.31	5.57	p>0.05
茯苓提取物0.5% (w/v培养基)	291.54	18.85	p<0.05
茯苓提取物1% (w/v培养基)	466.69	50.02	p<0.05

[0230] 结果所示,本发明实施例1制备的茯苓提取物可以增加清除活性氧的抗氧化酶GPX1、过氧化氢酶、TRX1和PRDX1的相对表达水平,可以有效对抗亚洲尘土介导的氧化应激反应。

[0231] 实施例14

[0232] 实施例1制备的茯苓提取物抗衰老护肤的试验

[0233] 按照质量百分数,本发明实施例1制备的茯苓提取物4%,丁二醇5%,尼泊金酯0.2% 以及水90.8%,分别称取各原料组分,将上述原料组分混合,获得抗衰老护肤水。

[0234] 进一步对所制得的抗衰老护肤水进行检测,结果如下:抗衰老护肤水为褐红色透明溶液,气味芬芳宜人,喷洒于皮肤表面后,感觉十分清爽,肤感佳。

[0235] 抗衰老护肤水在常温下货架贮存3年后,未发生变质,产品各项感观指标、理化指标、卫生指标均符合相应的国家标准;将所制得的抗衰老护肤水在40±1℃条件下进行24h的耐热测试,然后恢复室温,检测发现护肤水在恢复室温后并未出现任何浑浊,且恢复室温后的护肤水各项感观指标、理化指标、卫生指标均符合相应的国家标准。将所制得的抗衰老护肤水在-15±1℃条件下进行24h的耐寒测试,然后恢复室温,检测发现护肤水在恢复室温后并未出现任何浑浊,且恢复室温后的护肤水各项感观指标、理化指标、卫生指标均符合相应的国家标准。

[0236] 选择志愿者24名,性别随机。并分别随机在每位志愿者的左脸颊或右脸颊中的一侧脸颊,以及左眼角和右眼角中的一侧眼角使用本实施例制备的抗衰老护肤水,并作为实验组;志愿者未使用本发明制备的抗衰老护肤水的一侧脸颊和眼角作为对照组。

[0237] 志愿者于每日早晚各涂一次本实施例制备的抗衰老护肤水,使用周期为6周,在测试周期内不得使用其他化妆品。然后,采用皮肤弹性测试仪(Bareiss)和脸部皱纹成像仪(Visia),对比分析本实施例制备的抗衰老护肤水对志愿者皮肤弹性和皱纹改善情况,结果如表27所示:

[0238] 表27

检测项目	抗衰老护肤水
皱纹	与对照组相比,实验组皱纹深度变浅,效果十分明显
皮肤弹性	与对照组相比,实验组皮肤弹性明显提高

[0240] 结果显示本实施例制备的抗衰老护肤水明显具有抗皱纹、增强皮肤弹性作用。

[0241] 实施例15

[0242] 实施例1制备的茯茶提取物制备抗衰老护肤乳液

[0243] 按照质量百分数,辛酸/癸酸甘油三酯10%,白油5%,硬脂醇2%,甘油3%,黄原胶0.5%,山梨坦硬脂酸酯2.5%,蔗糖椰油酸酯2.5%,一水柠檬酸1%,尼泊金酯0.5%,香茅醇0.1%以及水69.9%,本发明实施例1制备的茯茶提取物3%。分别称取各组分原料,然后,按照如下步骤制备抗衰老护肤乳液,具体步骤如下:

[0244] 1) 在水相锅中,加入黄原胶、甘油、山梨坦硬脂酸酯和蔗糖椰油酸酯,搅拌均匀,升温至80-85℃,即得水相;

[0245] 2) 在油相预处理锅内,加入辛酸/癸酸甘油三酯、白油以及硬脂醇混合,并搅拌均匀,加热至80-85℃,即得油相;

[0246] 3) 经过滤将油相全部吸入真空乳化釜中,并开动刮板搅拌。然后再经过滤吸入水相,完成后依次开快速搅拌和真空乳化,乳化结束,保温搅拌几分钟后,开冷却水降温搅拌;

[0247] 4) 当降温至45℃左右,加入一水柠檬酸和水,充分搅拌均匀,并调节至混合体系pH至中性;

[0248] 5) 在混合体系中依次加入尼泊金酯、本发明实施例1制备的茯茶提取物、香茅醇,重新抽真空,开动刮板,搅拌均匀,并开冷却水继续降温至38℃以下;

[0249] 6) 停冷却水,破真空,并对混合体系进行理化指标检验,经检验合格后,过滤出料,即得到抗衰老护肤乳液。

[0250] 选择志愿者30名,性别随机。并分别随机在每位志愿者的左脸颊或右脸颊中的一侧脸颊,以及左眼角和右眼角中的一侧眼角使用本实施例制备的抗衰老护肤乳液,并作为实验组;志愿者未使用本发明制备的抗衰老护肤乳液的一侧脸颊和眼角作为对照组。

[0251] 志愿者于每日早晚各涂一次本实施例制备的抗衰老护肤乳液,使用周期为4周,在测试周期内不得使用其他化妆品。然后,采用皮肤弹性测试仪和脸部皱纹成像仪,对比分析本实施例制备的抗衰老护肤乳液对志愿者皮肤弹性和皱纹改善情况,结果如表28所示:

[0252] 表28

检测项目	抗衰老护肤乳液
皱纹	与对照组相比,实验组皱纹深度变浅,效果十分明显
皮肤弹性	与对照组相比,实验组皮肤弹性明显提高

[0254] 结果显示,本实施例所制备的抗衰老护肤乳液具有非常好的抗皱纹,提高皮肤弹性作用。

[0255] 实施例16

[0256] 化妆品制剂的实例

[0257] 本发明提供几种用于局部施加、尤其适用于痤疮的组合物。

[0258] (1) 清洁霜的配比如表29所示:

[0259] 表29

原料/品牌名称	%
纯水	QSP 100%
阿拉同恩 (Arlatone)	10-30%
椰油基葡糖苷	5-20%

羟丙基瓜尔胶	1-5%
辛酰甘氨酸	0-2%
尼泊金酯	0-2%
香茅醇	0-1%
柠檬酸	0-1%
锌PCA	0-1%
茯茶提取物	0.01-5%

[0261] (2) 调节皮脂的抗痤疮乳剂的配比如表30所示：

[0262] 表30

原料/品牌名称	%
PEG40 硬脂酸酯	1%-5%
PEG5 硬脂酸甘油	1%-5%
地蜡	1%-5%
单硬脂酸甘油酯	1%-5%
失水山梨醇硬脂酸酯	0%-2%
鲸蜡醇	0%-2%
苹果酸氢酯醇	5%-20%

[0263]

维生素 E	0%-1%
5- $\alpha$ Avocuta	1%-5%
茯茶提取物	0.01%-5%
丁二醇	1%-5%
吡罗克酮乙醇胺 (Piroctolamine)	0%-1%
苯甲酸	0%-1%
甘油	1%-10%
黄原胶	0%-1%
锌 PCA	0%-2%
米淀粉	1%-5%
尼龙 6	0%-2%
聚丙烯酰胺凝胶	1%-5%
维生素 B6	0%-1%
覆盆子酮	0%-1%
纯水	QSP100%

[0264]

[0265] (3) 抗炎性抗痤疮乳剂的配比如表31所示：

[0266] 表31

	原料/品牌名称	%
	PEG40 硬脂酸酯	1%-5%
	PEG5 硬脂酸甘油	1%-5%
	地蜡	1%-5%
	单硬脂酸甘油酯	1%-5%
	失水山梨醇硬脂酸酯	0%-2%
	鲸蜡醇	0%-2%
	苹果酸氢酯醇	5%-20%
[0267]	维生素 E	0%-1%
	维生素 B3	1%-5%
	玛卡肽提取物	1%-5%
	茯茶提取物	0.01%-5%
	丁二醇	1%-5%
	吡罗克酮乙醇胺	0%-1%
	苯甲酸	0%-1%
	甘油	1%-10%
	黄原胶	0%-1%
	锌 PCA	0%-2%
	米淀粉	1%-5%
	尼龙 6	0%-2%
[0268]	聚丙烯酰胺凝胶	1%-5%
	维生素 B6	0%-1%
	香茅醇	0%-1%
	纯水	QSP100%

[0269] (4) 修复性抗痤疮乳剂的配比如表32所示：

[0270] 表32

[0271]	原料/品牌名称	%
	PEG40硬脂酸酯	1%-5%
	PEG5硬脂酸甘油	1%-5%
	地蜡	1%-5%
	单硬脂酸甘油酯	1%-5%
	失水山梨醇硬脂酸酯	0%-2%
	鲸蜡醇	0%-2%
	苹果酸氢酯醇	5%-20%

维生素E	0%-1%
泛醇	0%-5%
玛卡肽提取物	1%-5%
茯茶提取物	0.01%-5%
丁二醇	1%-5%
吡罗克酮乙醇胺	0%-1%
尼泊金酯	0%-1%
甘油	1%-10%
黄原胶	0%-1%
锌PCA	0%-2%
米淀粉	1%-5%
尼龙6	0%-2%
聚丙烯酰胺凝胶	1%-5%
维生素B6	0%-1%
香茅醇	0%-1%
纯水	QSP100%

[0272] (5) 调节角质层的抗痤疮乳剂的配比如表33所示：

[0273] 表33

[0274]

原料/品牌名称	%
---------	---

[0275]	异壬酸异壬酯	1%-10%
	异鲸蜡醇硬脂酸酯	1%-10%
	PEG40 硬脂酸酯	1%-5%
	PEG5 硬脂酸甘油	1%-5%
	尼泊金酯	0%-1%
	C16-C18 鲸蜡醇	0%-2%
	PPG/SMDI 聚合物	0%-1%
	水杨酸	0%-2%
	角鲨烷凝胶	0%-2%
	二辛醚	1%-10%
	苹果酸氢酯醇	1%-10%
	向日葵提取物	1%-10%
	氨丁三醇	1%-5%
	丁二醇	1%-10%
	柠檬酸三钠	0%-1%
	小核菌胶	0%-1%
	聚丙烯酰胺凝胶	0%-1%
	维生素 C	0%-2%
	甘氨酸	0%-2%
	香茅醇	0%-1%
	维生素 E	0%-2%
	柠檬酸	0%-1%
	茯茶提取物	0.01%-5%
纯水	QSP 100%	

[0276] (6) 抗老化抗痤疮乳剂的配比如表34所示：

[0277] 表34

原料/品牌名称	%
异壬酸异壬酯	1%-10%
异鲸蜡醇硬脂酸酯	1%-10%
PEG40 硬脂酸酯	1%-5%
PEG5 硬脂酸甘油	1%-5%
尼泊金酯	0%-1%
C16-C18 鲸蜡醇	0%-2%
PPG/SMDI 聚合物	0%-1%
水杨酸	0%-2%

[0278]

[0279]

角鲨烷凝胶	0%-2%
二辛醚	1%-10%
苹果酸氢酯醇	1%-10%
向日葵提取物	1%-10%
氨丁三醇	1%-5%
丁二醇	1%-10%
柠檬酸三钠	0%-1%
小核菌胶	0%-1%
米淀粉	1%-5%
聚丙烯酰胺凝胶	0%-1%
维生素 C	0%-2%
甘氨酸	0%-2%
香茅醇	0%-1%
维生素 E	0%-2%
柠檬酸	0%-1%
视黄醇	0%-5%
玛卡肽提取物	0.1%-5%
茯茶提取物	0.01%-5%
纯水	QSP 100%

[0280] (7) 抗菌抗痤疮滚搽棒 (stick roll-on) 的配比如表35所示:

[0281] 表35

[0282]

原料/品牌名称	%
蓖麻油	QSP 100%
油醇	10%-20%

棕榈油	10%-20%
聚甘油-3-蜂蜡	10%-20%
小烛树蜡	10%-20%
锂蒙脱石	10%-20%
二氧化钛	0%-5%
茯茶提取物	0.01%-5%
雪亚脂	0%-5%
维生素E	0%-1%

[0283] (8) SPF 50+抗痤疮防晒霜的配比如表36所示：

[0284] 表36

原料/品牌名称	%
B4 纯水	QSP100%
氧化钛	10%-20%
环五硅氧烷	5%-15%
棕榈酸辛酯	5%-15%
C12-C15 烷基苯甲酸酯	5%-10%
戊酸癸酯	5%-10%
氧化锌	5%-10%
甘油	1%-5%
PEG-45/十二烷甘醇共聚物	1%-5%
茯茶提取物	0.01%-5%
氯化钠	1%-5%
糊精棕榈酸酯	1%-2%
维生素 E	0%-2%
尼泊金酯	0%-2%
羟丙基瓜尔胶	0%-1%
芦荟 (Aloe vera)	0%-1%
苏打碱液	0%-1%
EDTA2-Na	0%-1%
葡萄糖酸锌	0%-1%

[0287] (9) SPF 50+抗痤疮防晒喷雾剂的配比如表37所示：

[0288] 表37

原料/品牌名称	%
甘油辛酰癸酸酯 (Glycerol caprylocaprate)	5%-20%
环五硅氧烷	10%-20%
二辛酰碳酸酯	5%-20%
Tinosorb S (天来施 S)	1%-10%
氧化钛 100	10%-20%
锂蒙脱石	0%-5%
$\alpha$ -生育酚	0%-2%
月桂基葡萄糖苷-甘油硬脂酸酯 (Lauryl-glucoside glystearate)	0%-10%
B4 纯水	QSP 100%
柠檬酸	0%-2%
戊二醇	0%-5%
甘油	0%-5%

黄原胶	0%-2%
茯茶提取物	0.01%-5%
真芦荟	0%-1%
葡萄糖酸锌	0%-1%
尼泊金酯	0%-2%
Tinsorb M (天来施 M)	1%-10%

[0291] (10) 擦剂1的配比如表38所示:

[0292] 表38

原料/品牌名称	%
Arlatone duo (阿拉同恩多)	5%-20%
苹果酸	1%-10%
小核菌胶	1%-10%
尼泊金酯	0%-1%
辛酰甘氨酸	0%-1%
苏打	0%-1%
茯茶提取物	0.01%-5%
酸式焦磷酸钠	0%-1%
柠檬酸	0%-1%
纯水	QSP 100%
香茅醇	0%-1%

[0294] (11) 以下是一个擦剂的具体配方的配比,如表39所示:

[0295] 表39

原料/品牌名称	%
Arlatone duo (阿拉同恩多)	30%
汉生胶	0.2%
甘油 (99%)	2%
尼泊金酯	0.2%
向日葵油	2%
香茅醇	0.2%
茯茶提取物	3.4%
去离子水	62%

[0297] 上述擦剂的制备步骤如下:

[0298] 1) 将去离子水加热至80℃,将汉生胶分散到水相中,搅拌均匀。

[0299] 2) 缓慢搅拌并加入Arlatone duo;保持温度在75℃持续搅拌,使得原料均匀分散。

[0300] 3) 加入甘油,继续搅拌,降温。

[0301] 4) 待温度降低至35℃,加入茯茶提取物、尼泊金酯、向日葵油和香茅醇,即完成制备 抗衰老擦剂。

[0302] 选择志愿者40名,性别随机。并分别随机在每位志愿者的左脸颊或右脸颊中的一侧脸颊,以及左眼角和右眼角中的一侧眼角使用本实施例制备的抗衰老擦剂,并作为实验组;志愿者未使用本发明制备的抗衰老擦剂的一侧脸颊和眼角作为对照组。

[0303] 志愿者于每日早晚各涂一次本实施例制备的抗衰老擦剂,使用周期为8周,在测试周期内不得使用其他化妆品。然后,采用皮肤弹性测试仪和脸部皱纹成像仪,对比分析本实施例制备的擦剂对志愿者皮肤弹性和皱纹改善情况,结果如表40所示:

[0304] 表40

检测项目	抗衰老擦剂
皱纹	与对照组相比,实验组皱纹深度变浅,效果十分明显
皮肤弹性	与对照组相比,实验组皮肤弹性明显提高

[0306] 结果显示,本实施例所制备的抗衰老擦剂具有非常好的抗皱纹、提高皮肤弹性作用。

[0307] 实施例17

[0308] 茯茶提取物成分初步研究:将泾阳茯砖茶16KG粉碎,利用实施例1所述方法提取茯茶提取物300g。

[0309] 将上述茯茶提取物分散于1000mL蒸馏水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇充分萃取,将总提物经柱层析得到分段产物:石油醚提取物(2g)、乙酸乙酯提取物(70g)、正丁醇提取物(81g)、水提取物(40g)四个极性从小到大的组分。

[0310] 实施例18

[0311] 茯茶有机溶剂提取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,茶粉直径不超过0.5cm,将茯茶粉末按照固液比为1:20(m/v)的比例加入85%-95%乙醇,超声破壁至无肉眼可见茶粉及菌体。然后冷浸18-28小时,收集滤液,重复2-5次,滤液减压蒸馏,浓缩滤液,低温干燥,得粗提物,将粗提物经大孔树脂(AB-8大孔吸附树脂,东鸿化工)吸附脱色,

85%-95%乙醇洗脱后,浓缩蒸干,低温冷冻干燥,得到茯茶有机溶剂提取物。

[0312] 实施例19

[0313] 茯茶水提取物的制备方法包括以下步骤:取茯茶研成粉末,茶粉直径不超过0.5cm,将茯茶粉末按照固液比为1:10(m/v)比例加入水,搅拌均匀,超声破壁至无肉眼可见茶粉及菌体。然后室温下静置2小时,放在沸水浴中煮2小时得到混合溶液;混合溶液取出冷却,超速离心,取上清;将上清以0.22 $\mu$ m滤膜过滤灭菌得到茯茶水提取物。必要时浓缩蒸干,低温冷冻干燥。

[0314] 以上所述仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,虽然本发明已以较佳实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专利的技术人员在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述提示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明方案的范围内。