



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107982080 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201711383763.9

(22)申请日 2017.12.20

(71)申请人 汉义生物科技(北京)有限公司  
地址 100020 北京市朝阳区呼家楼(京广中心)1号楼26层13室

(72)发明人 张可 谭昕 于朝晖 陈征  
吴亚南 李萌

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038  
代理人 刘海罗

(51)Int.Cl.  
A61K 8/34(2006.01)  
A61K 8/9789(2017.01)  
A61Q 19/02(2006.01)

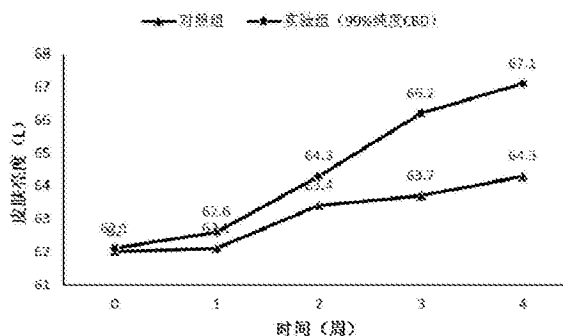
权利要求书1页 说明书13页 附图5页

## (54)发明名称

大麻二酚或大麻提取物在制备美白产品中的用途

## (57)摘要

本发明属于医药和日化领域,涉及大麻二酚或大麻提取物在制备美白产品中的用途。具体地,本发明涉及选自如下的(1)-(2)中的任一项在制备抑制酪氨酸酶活性、抑制黑色素形成或者抑制黑素细胞生成的药物或试剂中的用途:(1)大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;(2)含有大麻二酚的植物提取物。大麻二酚或者大麻提取物能够有效地抑制酪氨酸酶的活性,具有良好的皮肤美白效果。



1. 选自如下的(1) — (2)中的任一项在制备抑制酪氨酸酶活性、抑制黑色素形成或者抑制黑素细胞生成的药物或试剂中的用途:

(1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

(2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述黑色素为优黑素。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述大麻提取物中大麻二酚的含量为10% — 99%、20% — 95%、30% — 95%或40% — 95%。

4. 选自如下的(1) — (2)中的任一项在制备皮肤美白产品中的用途:

(1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

(2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中,所述含有大麻二酚的植物提取物中大麻二酚的含量为10% — 99%、20% — 95%、30% — 95%或40% — 95%。

6. 根据权利要求4所述的用途,其中,所述皮肤美白产品为组合物;优选地,所述组合物为膏霜、乳剂、喷雾剂、凝胶剂或贴剂。

7. 一种皮肤美白产品,其包含有效量的选自如下的(1) — (2)中的任意一种:

(1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

(2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物;

优选地,还包含一种或多种药学上或者生理学上可接受的辅料。

8. 根据权利要求7所述的皮肤美白产品,其中,所述含有大麻二酚的植物提取物中大麻二酚的含量为10% — 99%、20% — 95%、30% — 95%或40% — 95%。

9. 根据权利要求7所述的皮肤美白产品,其中,所述皮肤美白产品为组合物;优选地,所述组合物为膏霜、乳剂、喷雾剂、凝胶剂或贴剂。

10. 一种皮肤美白产品套装,其包含独立包装的权利要求7至9中任一权利要求所述的皮肤美白产品。

11. 一种在体内或体外的抑制酪氨酸酶活性、抑制黑色素形成或者抑制黑素细胞生成的方法,包括给予有需求的受试者或者细胞以有效量的选自如下的(1) — (2)中的任一项的步骤:

(1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

(2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

12. 一种皮肤美白方法,包括给予有需求的受试者以有效量的选自如下的(1) — (2)中的任一项的步骤:

(1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

(2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

## 大麻二酚或大麻提取物在制备美白产品中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药和日化领域,涉及大麻二酚或大麻提取物在制备美白产品中的用途。

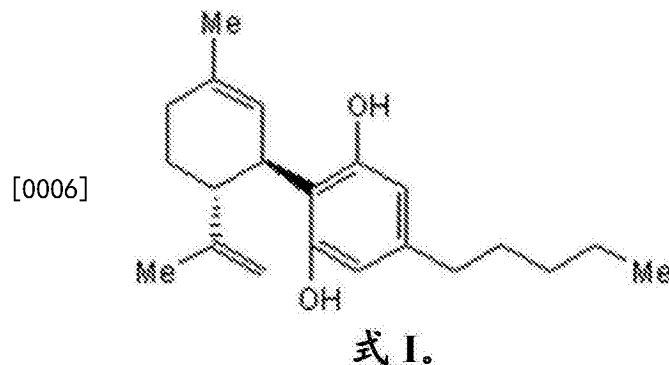
### 背景技术

[0002] 黑素细胞是皮肤的重要组成细胞之一,呈树状突起。黑素细胞通过合成黑色素形成皮肤颜色。皮肤颜色的深浅是由黑素细胞合成黑色素数量的多少决定。黑色素为高分子生物色素,主要由两种醌型的聚合物:优黑素(又称为真黑素)和褐黑素组成。其中,优黑素是主要的色素。

[0003] 从生物化学的角度来看,酪氨酸为制造黑色素的主要原料;酪氨酸酶(EC1.4.18.1)是酪氨酸转变为黑色素的主要限速酶,该酶活性大小决定着黑色素形成的数量。酪氨酸在含高价铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )的酪氨酸酶作用下,氧化生成3,4-二羟基苯丙氨酸(多巴),再由酪氨酸酶氧化为多巴醌,进一步氧化为5,6-二羟基吲哚,聚合后生成优黑素(真黑素)。在黑色素合成中,多巴醌还可通过另外的途径生成褐黑素。

[0004] 由于黑色素(melanin)形成过程中酪氨酸酶是一主要限速酶,为了达到理想的美白效果,对于酪氨酸酶的抑制就变得尤为关键。

[0005] 大麻二酚(Cannabidiol, CBD)是大麻素类物质中的一种,通常从天然植物大麻中提取。大麻二酚无精神效应,对焦虑、抑郁、惊厥和肿瘤等均具有治疗作用。其结构式如下面的式I所示:



[0007] 目前,尚需要开发新的酪氨酸酶抑制剂和美白产品。

### 发明内容

[0008] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,惊奇地发现,大麻二酚或者大麻提取物(特别是大麻叶提取物)能够有效地抑制酪氨酸酶的活性。本发明人进一步发现,大麻二酚或者大麻提取物(特别是大麻叶提取物)具有良好的皮肤美白效果。由此提供了下述发明:

[0009] 本发明的一个方面涉及选自如下的(1) - (2)中的任一项在制备抑制酪氨酸酶活性、抑制黑色素形成或者抑制黑素细胞生成的药物或试剂中的用途:

[0010] (1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯；

[0011] (2) 含有大麻二酚的植物提取物；优选地，为含有大麻二酚的大麻提取物；优选地，为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

[0012] 在本发明的一些实施方式中，所述黑色素为优黑素。

[0013] 在本发明的一些实施方式中，所述含有大麻二酚的植物提取物中大麻二酚的含量为10%—99%、20%—95%、30%—95%或40%—95%。

[0014] 所述大麻二酚或者含有大麻二酚的植物提取物可以参照本领域知悉方法制得，或者通过商购获得。所述大麻提取物也可以参照本发明的制备例1—2制得。

[0015] 本发明的另一方面涉及选自如下的(1) — (2) 中的任一项在制备皮肤美白产品中的用途：

[0016] (1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯；

[0017] (2) 含有大麻二酚的植物提取物；优选地，为含有大麻二酚的大麻提取物；优选地，为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

[0018] 在本发明的一些实施方式中，所述大麻提取物中大麻二酚的含量为10%—99%、20%—95%、30%—95%或40%—95%。

[0019] 在本发明的一些实施方式中，所述皮肤美白产品为组合物；优选地，所述组合物为膏霜(护肤膏霜)、乳剂、喷雾剂、凝胶剂或贴剂。

[0020] 本发明的再一方面涉及一种皮肤美白产品，其包含有效量的选自如下的(1) — (2) 中的任意一种：

[0021] (1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯；

[0022] (2) 含有大麻二酚的植物提取物；优选地，为含有大麻二酚的大麻提取物；优选地，为含有大麻二酚的工业大麻提取物；

[0023] 优选地，还包含一种或多种药学上或者生理学上可接受的辅料。

[0024] 在本发明的一些实施方式中，所述含有大麻二酚的植物提取物中大麻二酚的含量为10%—99%、20%—95%、30%—95%或40%—95%。

[0025] 在本发明的一些实施方式中，所述皮肤美白产品为组合物；优选地，所述组合物为膏霜(护肤膏霜)、乳剂、喷雾剂、凝胶剂或贴剂。

[0026] 按照重量百分比计算，组合物中含有0.1%—90%的有效成分(大麻二酚和/或含有大麻二酚的植物提取物)，以及一种或多种药学上或者生理学上可接受的辅料。在本发明的一些实施方式中，组合物中含有0.1%—90%、0.1%—50%、0.1%—20%、0.1%—10%、0.1%—9%、0.1%—8%、0.1%—7%、0.1%—6%、0.1%—5%、0.1%—4%、0.1%—3%、0.1%—2%、0.1%—1%、0.1%—0.9%、0.1%—0.8%、0.1%—0.7%、0.1%—0.6%、0.1%—0.5%、0.1%—0.4%、0.1%—0.3%或0.1%—0.2%的有效成分。

[0027] 术语“生理学上可接受的”是指生理学相容的，特别是皮肤外用产品中使用的与皮肤接触时可以使用的，例如不产生对皮肤的刺激性等副作用。特别是例如化妆品中可以使用的稀释剂、表面活性剂、增稠剂、润肤剂等。

[0028] 可以参照本领域技术人员知悉的方法，将组合物制成可作为人用的适当的施用形式或剂量形式，例如膏霜(护肤膏霜)、乳剂、喷雾剂、凝胶剂或贴剂。

[0029] 本发明还涉及一种皮肤美白产品套装，其包含独立包装的本发明中任一项所述的

皮肤美白产品。

[0030] 本发明的再一方面涉及一种在体内或体外的抑制酪氨酸酶活性、抑制黑色素形成或者抑制黑素细胞生成的方法,包括给予有需求的受试者或者细胞以有效量的选自如下的(1) — (2)中的任一项的步骤:

[0031] (1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

[0032] (2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

[0033] 本发明的再一方面涉及一种皮肤美白方法,包括给予有需求的受试者以有效量的选自如下的(1) — (2)中的任一项的步骤:

[0034] (1) 大麻二酚或其药学上可接受的盐或酯;

[0035] (2) 含有大麻二酚的植物提取物;优选地,为含有大麻二酚的大麻提取物;优选地,为含有大麻二酚的工业大麻提取物。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,对于有需求的受试者,每天至少施用一次,例如1次、2次、3次或者3次以上;施用所持续时间为至少1周、至少2周、至少3周、至少4周或者更长时间。当每天施用多于1次时,两次施用之间的时间间隔为至少2小时、至少4小时、至少6小时或至少8小时。施用的剂量从低于为得到所需美白效果而要求的水平开始,逐渐增加剂量,直到得到所需的效果。例如,当以膏霜或乳剂形式施用,每1平方厘米皮肤施用的量大约为至少0.001g、至少0.005g、至少0.01g、至少0.02g、至少0.03g、至少0.04g、至少0.05g、至少0.06g、至少0.07g、至少0.08g、至少0.09g或至少0.1g。

[0037] 在本发明的一些实施方式中,美白效果通过皮肤亮度值来表示,所述皮肤亮度值可以通过LAB色差仪测定。

[0038] 本发明中,所述大麻提取物为以选自大麻的茎、叶、果实、果壳、根和花中的任意一种或者多种为原料的提取物。优选地,所述大麻提取物为大麻叶提取物。所述大麻优选为工业大麻。

[0039] 本发明中,所述乙醇或乙醇溶液的浓度,如果没有特别是说明,均为重量百分比(wt%)。

[0040] 本发明中,所述大麻提取物或大麻叶提取物中的大麻二酚的含量,如果没有特别是说明,均为重量百分比(wt%)。

[0041] 本发明中,术语“护肤膏霜”是指符合化妆品标准QB/T 1857的产品。

[0042] 术语“受试者”可以指接受本发明美白产品的动物,特别是哺乳动物,例如人。

[0043] 发明的有益效果

[0044] 本发明取得了如下技术效果中的一项或者多项:

[0045] (1) 大麻二酚或者大麻提取物(特别是大麻叶提取物)能够有效地抑制酪氨酸酶的活性。

[0046] (2) 大麻二酚或者大麻提取物(特别是大麻叶提取物)能够有效地抑制黑色素的合成。

[0047] (3) 大麻二酚或者大麻提取物(特别是大麻叶提取物)具有良好的皮肤美白效果。

[0048] (4) 大麻二酚或者大麻提取物(特别是大麻叶提取物)能够制备皮肤美白产品,并且没有毒副作用。

## 附图说明

- [0049] 图1:不同浓度的CBD(纯度99%)对酪氨酸酶的抑制率。
- [0050] 图2:不同浓度的大麻叶提取物B(含95% CBD)对酪氨酸酶的抑制率。
- [0051] 图3:不同浓度的大麻叶提取物A(含约50% CBD)对酪氨酸酶的抑制率。
- [0052] 图4:不同浓度的大麻叶提取物B(含95% CBD)对细胞相对存活率的影响。
- [0053] 图5:不同浓度(0.2%、1%、5%)的大麻叶提取物B(含95% CBD)作用于B16细胞后,细胞内酪氨酸酶活性变化。以33mM熊果苷为阳性对照,以细胞空白为阴性对照,对实验数据进行显著性分析( $p < 0.05$ ),其中\*\*表示在ANOVA TEST检验下 $p\text{-value} < 0.01$ 。
- [0054] 图6:不同浓度的大麻叶提取物B(含95% CBD)作用B16细胞后,细胞产生黑色素变化量。以33mM熊果苷为阳性对照,以细胞空白为阴性对照,对实验数据进行显著性分析,其中\*\*表示在ANOVA TEST检验下 $p\text{-value} < 0.01$ 。
- [0055] 图7:大麻叶提取物A(含约50% CBD)对皮肤亮度的影响曲线。其中,L表征皮肤亮度,其值越大,颜色越偏向白色。
- [0056] 图8:大麻叶提取物B(含95% CBD)对皮肤亮度的影响曲线。其中,L表征皮肤亮度,其值越大,颜色越偏向白色。
- [0057] 图9: CBD(纯度99%)对皮肤亮度的影响曲线。其中,L表征皮肤亮度,其值越大,颜色越偏向白色。

## 具体实施方式

[0058] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

### [0059] 制备例1:大麻叶提取物A(含约50% CBD)的制备和检测

#### [0060] 1. 大麻叶提取物A的制备

- [0061] (1) 将大麻叶洗净,自然阴干或 $30^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ 烘干;
- [0062] (2) 粉碎,然后过40目筛;
- [0063] (3) 将筛上的粗粉,用10倍量的70%的乙醇回流提取2次,每次1.5小时,合并提取液;
- [0064] (4) 在 $60^{\circ}\text{C}$ 下,减压浓缩至相对密度1.02,上大孔树脂SP-825(日本三菱公司生产),依次2倍体积(BV)水、4倍体积45%乙醇、4-6倍体积75%乙醇洗脱,然后用3BV 95%乙醇冲柱再生;
- [0065] 5) 将75%乙醇洗脱部分在 $60^{\circ}\text{C}$ 下,减压浓缩至相对密度0.90-0.95,然后在 $60^{\circ}\text{C}$ 、-0.10MPa真空的条件下干燥8-12h。

[0066] 由此得到大麻叶提取物,命名为大麻叶提取物A。

#### [0067] 2. 大麻叶提取物A中CBD的含量测定

[0068] 大麻二酚的含量参照《中国药典》2015年版四部高效液相法(通则0512)进行测定,如下:

[0069] 色谱条件与系统适用性试验：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(C18, 4.6 × 150mm, 4μm), 以乙腈-水(体积比为70:30)为流动相, 检测波长为210nm, 流速为1ml/min, 柱温为35℃。理论板数按大麻二酚峰计算应不低于2000。

[0070] 对照品溶液的制备：精密量取大麻二酚对照品溶液(1.0mg/ml) 0.5ml, 置50ml量瓶中用90%的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

[0071] 供试品溶液的制备：精密称量本品25mg, 置25ml量瓶中用90%的乙醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取1ml, 置100ml量瓶中用90%的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

[0072] 测定法：精密量取对照品溶液和供试品溶液各10μl注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算, 即得。

[0073] 计算公式如下：

$$[0074] \quad \text{大麻二酚的含量} = \frac{A_{\text{sam}} \times C_{\text{std}} \times 25}{A_{\text{std}} \times W_{\text{sam}} \times (1 - R_{\text{wat}}\%)} \times 100\%$$

[0075] 上式中：

[0076]  $A_{\text{sam}}$ 为供试品大麻二酚的峰面积；

[0077]  $R_{\text{wat}}\%$ 为供试品中含水量；

[0078]  $W_{\text{sam}}$ 为供试品称样量；

[0079]  $A_{\text{std}}$ 为对照品大麻二酚的峰面积；

[0080]  $C_{\text{std}}$ 为对照品大麻二酚标识浓度；

[0081] 水分测定：以卡尔费休水分仪及卡尔费休试液测定, 测定值以三组平行试验的结果取平均值, 记做 $R_{\text{wat}}\%$ 。

[0082] 测得大麻叶提取物A中大麻二酚的含量为49.8wt%。

[0083] 制备例2: 大麻叶提取物B(含95% CBD)的制备

[0084] 1. 大麻叶提取物B的制备

[0085] (1) 取自然阴干或30℃—60℃烘干的大麻叶, 以7倍量乙醇(V/W)加热回流1.5小时；

[0086] (2) 过滤除去残渣；

[0087] (3) 滤液用5%的氢氧化钠水溶液萃取2次, 其中氢氧化钠水溶液中含有20wt%的乙醇；

[0088] (4) 将萃取液与适量的5%硫酸溶液混合, 混合液的pH值为3；

[0089] (5) 使用2倍或1倍体积的乙酸乙酯提取2次, 然后40℃, -0.10MPa回收溶剂；

[0090] (6) 随后上MCI柱层析(75—150μm, 日本三菱生产), 依次以2BV纯水、3BV的50%乙醇、5BV的75%乙醇洗脱, 然后用3BV 95%乙醇冲柱再生；

[0091] (7) 将75%乙醇洗脱部分, 60℃下, 减压浓缩至相对密度0.90—0.95, 然后在60℃、-0.10MPa真空的条件下干燥8—12h。

[0092] 由此得到大麻叶提取物, 命名为大麻叶提取物B。

[0093] 2. 大麻叶提取物B中CBD的含量测定

[0094] 按照制备例1中的方法进行测定, 测得大麻叶提取物B中大麻二酚的含量为95wt%。

[0095] 制备例3:护肤膏霜(1)的制备

[0096] 处方如下面的表1所示。

[0097] 表1

相	试剂	用量(质量百分比)
油相	二十烷基二十二烷醇 及二十烷葡萄糖苷	2
	山嵛醇	3.5
	凡士林	1
	棕榈酸乙基己酯	6
	大麻籽油	1.5
	大麻叶提取物 A	2
水相	丁二醇	5
	水	79.0

[0099] 其中:

[0100] 大麻叶提取物A为制备例1制得;大麻籽油购自云南汉素生物科技有限公司,COA报告表明其不含CBD;

[0101] “二十烷基二十二烷醇及二十烷葡萄糖苷”购自SEPPIC公司,试剂名为“MONTANOV 202”(下同)。

[0102] 制备工艺如下:

[0103] (1) 称取油相各组分,并在搅拌条件下加热至75℃,保温灭菌;

[0104] (2) 称取水相各组分,并在搅拌条件下加热至80℃,保温灭菌;

[0105] (3) 将油相加入水相中,均质3-5分钟后,低速搅拌降温至室温,得到产品,其中均质的操作是使用IKA T18 digital ULTRA TURRAX均质器,8000rpm/3min。

[0106] 制得护肤霜膏(1)。

[0107] 制备例4:护肤膏霜(2)的制备

[0108] 处方如下面的表2所示。

[0109] 表2



相	试剂	用量 (质量百分比)
[0110] 油相	二十烷基二十二烷醇 及二十烷葡萄糖苷	2
	山嵛醇	3.5
	凡士林	1
	棕榈酸乙基己酯	6
	大麻籽油	1.5
	大麻叶提取物 B	1
水相	丁二醇	5
	水	80.0

[0111] 其中:大麻叶提取物B为制备例2制得;大麻籽油购自云南汉素生物科技有限公司,COA报告表明其不含CBD。

[0112] 制备工艺参照前面的制备例3进行。

[0113] 制得护肤霜膏(2)。

[0114] 制备例5:护肤膏霜(3)的制备

[0115] 处方如下面的表3所示。

[0116] 表3

相	试剂	用量 (质量百分比)
[0117] 油相	二十烷基二十二烷醇 及二十烷葡萄糖苷	2
	山嵛醇	3.5
	凡士林	1
	棕榈酸乙基己酯	6
	大麻籽油	1.5
	CBD (纯度 99%)	1
水相	丁二醇	5
	水	80.0

[0118] 其中:大麻二酚(纯度99%)购自云南汉素生物科技有限公司;大麻籽油购自云南汉素生物科技有限公司,COA报告表明其不含CBD。

[0119] 制备工艺参照前面的制备例3进行。

[0120] 制得护肤霜膏(3)。

- [0121] 对照制备例:对照膏霜的制备
- [0122] 参照制备例3的处方,除了不使用活性成分即大麻叶提取物A,其余成分完全相同。
- [0123] 制备工艺参照前面的制备例3进行。
- [0124] 制得对照霜膏。
- [0125] 实施例1:体外实验
- [0126] 1. 实验细胞、试剂和仪器
- [0127] B16细胞,购自北京协和医院。
- [0128] 大麻二酚(纯度99%)购自云南汉素生物科技有限公司。
- [0129] 大麻叶提取物A(含约50% CBD)为制备例1制得。
- [0130] 大麻叶提取物B(含95% CBD)为制备例2制得。
- [0131] DMEM高糖培养基和胎牛血清均购自美国GIBCO生命技术公司。
- [0132] 左旋多巴、TritonX-100、MTT均购自美国Sigma公司。
- [0133] 熊果苷购自bioland公司。
- [0134] 0.05%胰蛋白酶(含EDTA)购自美国GIBCO生命技术公司。
- [0135] 酪氨酸酶:CAS#:9002-10-2,购自北京Solarbio科技有限公司。
- [0136] 紫外分光光度计,日本岛津,UV-2201。
- [0137] WJ-80A-II型CO<sub>2</sub>恒温培养箱,上海圣科仪器设备有限公司。
- [0138] 酶联免疫检测仪,赛默费世尔仪器有限公司。
- [0139] 2. 实验方法
- [0140] (1) 酪氨酸酶抑制率测定
- [0141] 收集对数生长期的B16细胞,经胰蛋白酶消化,完全培养基(DMEM高糖培养基+10%胎牛血清)终止消化,计数;将细胞悬浮液调整为 $10 \times 10^4$ 个细胞/mL,接种于96孔培养板,每孔加入100 $\mu$ L细胞悬浮液,边缘孔用无菌的PBS填充,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,吸取培养基(DMEM高糖培养基+10%胎牛血清),每孔分别加入实验样品100 $\mu$ L,并设置对照组(即不加样品只有培养基的孔)。作用72小时后,加入50 $\mu$ L 1%的TritonX-100溶液裂解细胞,迅速放入-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱冻存1小时,随后室温融化,使细胞内的酪氨酸酶释放出细胞外,37 $^{\circ}$ C预温后加入50 $\mu$ L的1%左旋多巴溶液,37 $^{\circ}$ C反应2小时,于490nm波长下测定每孔吸光度值,每一个样品浓度设置3个以上副孔,取平均值。
- [0142] 实验样品:
- [0143] 每孔的终浓度分别为0.1%、1%、2%、3%的CBD(纯度99%);
- [0144] 每孔的终浓度分别为0.1%、0.5%、1%、2%的大麻叶提取物B;
- [0145] 每孔的终浓度分别为0.50%、1%、2%、3%的大麻叶提取物A。
- [0146] 酪氨酸酶抑制率 =  $1 - (\text{每个浓度的各孔平均吸光度值} - \text{对照组平均吸光值}) \times 100\%$ 。
- [0147] (2) MTT实验
- [0148] 收集对数生长期状态良好的细胞B16,经胰蛋白酶消化,完全培养基终止消化,计数;将细胞悬浮液调整浓度为 $10 \times 10^4$ cells/ml,接种至96孔培养板,每孔加入100 $\mu$ L细胞悬浮液,边缘孔用无菌的PBS填充,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h;吸取培养基,每孔加入不同浓度样品10 $\mu$ L,基础培养基90 $\mu$ L,细胞对照孔加入100 $\mu$ L基础培养基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养

箱中培养24h;培养结束前4h,吸取含有样品的培养基,每孔加入10 $\mu$ l 5mg/ml MTT溶液,基础培养基90 $\mu$ l,继续培养4h后终止培养;小心吸去孔内溶液,每孔加入100 $\mu$ l DMSO溶液,37 $^{\circ}$ C溶解10min,震荡,于490nm波长下,使用酶标仪进行检测。测定每孔吸光度值,每一个浓度设置3个以上副孔,取平均值。

[0149] 存活率=(每个浓度的各孔平均吸光度值-对照组平均吸光值) $\times$ 100%。

[0150] 实验样品:

[0151] 每孔的终浓度分别为5%、1.67%、0.56%、0.19%、0.06%的大麻叶提取物B。

[0152] (3) 酪氨酸酶活力测定

[0153] 收集对数生长期的B16细胞,经胰蛋白酶消化,完全培养基终止消化,计数;将细胞悬浮液调整为 $10\times 10^4$ 个细胞/mL,接种于96孔培养板,每孔加入100 $\mu$ L细胞悬浮液,边缘孔用无菌的PBS填充,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,吸取培养基,每孔加入实验样品100 $\mu$ L,作用48h,加入50 $\mu$ L 1%的TritonX-100溶液裂解细胞,迅速放入-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱冻存1h,随后室温融化,使细胞内的酪氨酸酶释放出细胞外,37 $^{\circ}$ C预温后加入50 $\mu$ L的1%左旋多巴溶液,37 $^{\circ}$ C反应2h,于490nm波长下测定每孔吸光度值,每一个浓度设置3个以上副孔,取平均值。

[0154] 实验样品:

[0155] 每孔的终浓度为0.2%、1%、5%的大麻叶提取物B。

[0156] 对照品为:33mM熊果苷和细胞空白(只有培养基)。

[0157] 酪氨酸酶活力=(每个浓度的各孔平均吸光度值-对照组平均吸光值) $\times$ 100%。

[0158] (4) 黑色素含量测定

[0159] 收集对数生长期状态良好的B16细胞,经胰蛋白酶消化,完全培养基终止消化,计数;将配置的细胞悬浮液调整为 $5\times 10^4$ 个细胞/mL加入6孔培养板,每孔加入2mL细胞悬浮液,置于培养箱37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>条件下培养过夜;吸取培养基,每孔加入不同浓度大麻提取物2mL,作用48h,吸弃培养基,经胰蛋白酶消化,收集至离心管中,离心得到细胞沉淀,PBS洗涤1次,加入1M NaOH(含10%DMSO)溶液裂解,放入80 $^{\circ}$ C水浴锅中,水浴30min;振荡混匀,吸取至96孔板;于475nm波长下测定吸光度值。

[0160] 相对黑色素含量=(每个浓度的各孔平均吸光度值-对照组平均吸光值) $\times$ 100%。

[0161] 3. 实验结果

[0162] (1) 大麻提取物对酪氨酸酶抑制作用

[0163] 如图1、图2和图3所示。

[0164] 结果显示,CBD(99%纯度)、大麻叶提取物B(含95% CBD)和大麻叶提取物A(含49.8% CBD)均对酪氨酸酶具有有效的抑制作用,并且对每个药物而言,随着用量的增加,对酪氨酸酶的抑制率提高。

[0165] (2) B16-MTT实验结果

[0166] 如图4所示。

[0167] 结果显示,在一定的范围内,B16细胞的存活率随大麻叶提取物浓度的增大而降低,并且具有一定的浓度依赖性。当浓度5%的大麻叶提取物B(含95% CBD)作用48小时下,细胞活率最低,为90.88%;其它浓度下细胞存活率均在90.88%之上。不同浓度下对比没有显著性差异,表现无细胞毒性。

[0168] (3) 酪氨酸酶活力变化结果

[0169] 如图5所示。

[0170] 结果显示,浓度为0.2%、1%、5%的大麻叶提取物B均能够显著降低细胞内酪氨酸酶活力;随着大麻叶提取物B浓度的增大,酪氨酸酶活力降低,其中浓度为5%的大麻叶提取物B对酪氨酸酶的抑制效果最佳,可使酪氨酸酶活力降至73.13%。

[0171] (4) 黑色素含量变化结果

[0172] 如图6所示。

[0173] 结果显示,不同浓度的大麻叶提取物B(含95% CBD)可以显著减少细胞黑色素的合成量,甚至可使B16细胞内黑色素含量降到之前的73.79%;阳性对照为79.24%;并且随着大麻叶提取物B(95% CBD)浓度的增大,黑色素含量变低。不同浓度的大麻叶提取物对黑色素合成的影响和熊果苷相对比没有显著性差异。

[0174] 实施例2:细胞毒性实验(MTT)

[0175] 1. 实验样品

[0176] 制备例1制得的大麻叶提取物A(含约50% CBD)。

[0177] 制备例2制得的大麻叶提取物B(含95% CBD)。

[0178] 大麻二酚(纯度99%)购自云南汉素生物科技有限公司。

[0179] 大麻籽油购自云南汉素生物科技有限公司,COA报告表明其不含CBD。

[0180] 人永生表皮细胞,购自北京协和医院。

[0181] MTT购自美国Sigma公司。

[0182] DMEM高糖培养基和胎牛血清均购自美国GIBCO生命技术公司。

[0183] PBS购自美国Corning公司。

[0184] WJ-80A-II型CO<sub>2</sub>恒温培养箱,上海圣科仪器设备有限公司。

[0185] 酶联免疫检测仪,赛默费世尔仪器有限公司。

[0186] 2. 实验方法

[0187] 收集对数生长期的人永生表皮细胞,调整细胞悬液浓度,以每孔100 $\mu$ l细胞悬液加至96孔板,5% CO<sub>2</sub>,37 $^{\circ}$ C 孵育,至细胞密度5000个/孔。换液加入不同浓度梯度的实验样品(如下面的表4),以不含实验样品的培养液为对照。在5% CO<sub>2</sub>,37 $^{\circ}$ C 条件下孵育24小时,每孔加入20 $\mu$ l MTT溶液(5mg/ml,即0.5% MTT),继续培养4小时。使药物与MTT充分反应,可先离心后弃去培养液,小心用PBS冲2-3遍后,再加入含MTT的培养液。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入150 $\mu$ l 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10分钟,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD值490nm处测量各孔的吸光值。

[0188] 细胞存活率 = (测定孔OD值 - 空白对照OD值) / (细胞对照组OD值 - 空白对照OD值) \* 100%。

[0189] 表4:人永生表皮细胞细胞毒性实验所用样品的配方(各组分含量均为质量百分比)

[0190]

	空白	样品 A	样品 B	样品 C	样品 D	样品 E
去离子水	99	98	88	86	85	86
椰油酰胺丙基甜菜碱	1	1	1	1	1	1
聚丙烯酸酯交联聚		1	1	1	1	1

[0191]

合物-6						
大麻籽油			10	10	10	10
CBD (99%纯度)						2
大麻叶提取物 B				2		
大麻叶提取物 A					3	

[0192] 3. 实验结果

[0193] 如下面的表5所示。

[0194] 表5

[0195]

样品名称	样品在每孔中的终浓度	细胞存活率
空白	1.00%	80.78%
空白	0.50%	85.40%
空白	0.20%	86.80%
样品A	1.00%	72.75%
样品A	0.50%	78.82%
样品A	0.20%	86.98%
样品B	1.00%	64.06%
样品B	0.50%	73.90%
样品B	0.20%	74.64%
样品C	1.00%	74.88%
样品C	0.50%	78.38%
样品C	0.20%	83.20%
样品D	1.00%	75.93%

样品D	0.50%	73.49%
样品D	0.20%	87.95%
样品E	1.00%	75.12%
样品E	0.50%	79.48%
样品E	0.20%	84.56%

[0196] 结果显示,大麻籽油的添加,对细胞有一定毒性。CBD (99%纯度)、大麻叶提取物B (含95% CBD) 和大麻叶提取物A (含约50% CBD) 能够在一定程度上促进细胞增殖,消除大麻籽油的影响。

### [0197] 实施例3:皮肤美白实验

#### [0198] 1. 实验样品、仪器和实验对象

[0199] 实验样品:制备例3—5制得的护肤膏霜(1) — (3)。对照制备例制得的对照膏霜。

[0200] 仪器:LAB色差仪(MPA9,德国CK电子公司生产)

[0201] 对象:每个实验样品的测试人员均为25人,其中男10人,女15人,年龄均在30—55岁之间。

#### [0202] 2. 实验方法(以一个实验样品为例)

[0203] 1) 受试者涂抹样品前,先将实验部位洗净,晾干后涂抹样品。受试者左、右手臂内侧对称地各确定4\*4cm大小的面积,分别作为受试区域和对照区域。

[0204] 2) 受试者将适量(约0.5g) 膏霜均匀涂抹于测试区域,同时受试者将对照膏霜(作为空白基质)均匀涂抹在对照区域。每天早晚各涂抹1次,两次间隔约8—10小时。实验期间,受试者在实验部位不能涂抹任何化妆品。

[0205] 3) 受试者在连续使用样品后每周同一时间,使用Lab色差仪测试皮肤肤色变化,取平均值。持续4周。

[0206] 4) 统计每次所测数值:对照组(25人的右臂对照区域)和实验组(25人的左臂受试区域)皮肤亮度值(LAB值)。

#### [0207] 3. 实验结果

[0208] 如表6—8以及图7—9所示。

[0209] 表6:护肤膏霜(1),使用大麻叶提取物A

		平均皮肤亮度值	
[0210]	时间(周)	对照组	实验组
	<b>0</b>	<b>62.3</b>	<b>62.4</b>
	<b>1</b>	<b>62.6</b>	<b>63.1</b>
[0211]	<b>2</b>	<b>62.9</b>	<b>64.3</b>
	<b>3</b>	<b>63.7</b>	<b>66.5</b>
	<b>4</b>	<b>64.1</b>	<b>68</b>

[0212] 表7:护肤膏霜(2),使用大麻叶提取物B

时间 (周)	平均皮肤亮度值	
	对照组	实验组
0	62.3	62.3
1	62.5	63.1
2	63.6	64.7
3	63.8	66.3
4	64.3	67.2

[0214] 表8: 护肤膏霜 (3), 使用99%纯度的CBD

时间 (周)	平均皮肤亮度值	
	对照组	实验组
0	62	62.1
1	62.1	62.6
2	63.4	64.3
3	63.7	66.2
4	64.3	67.1

[0216] 在使用样品前, 3个实验组的皮肤亮度与对照组的皮肤亮度无明显差异。结果显示, 使用样品后, 第1周皮肤亮度值变化不明显, 但在第2—4周, 3个实验组的皮肤亮度值均明显增加。

[0217] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

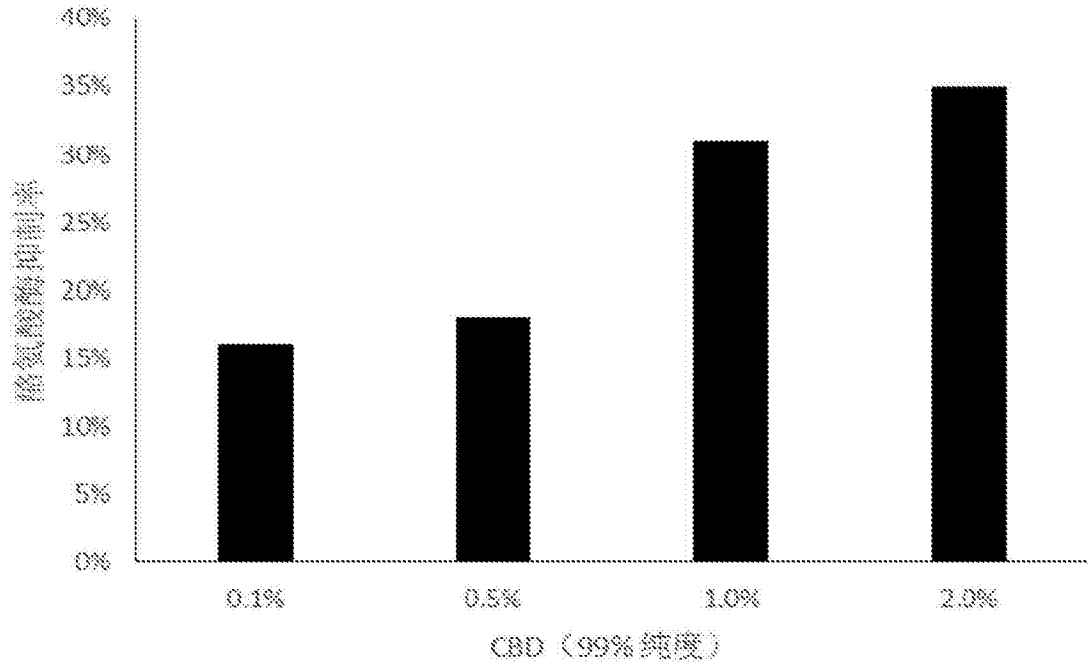


图1

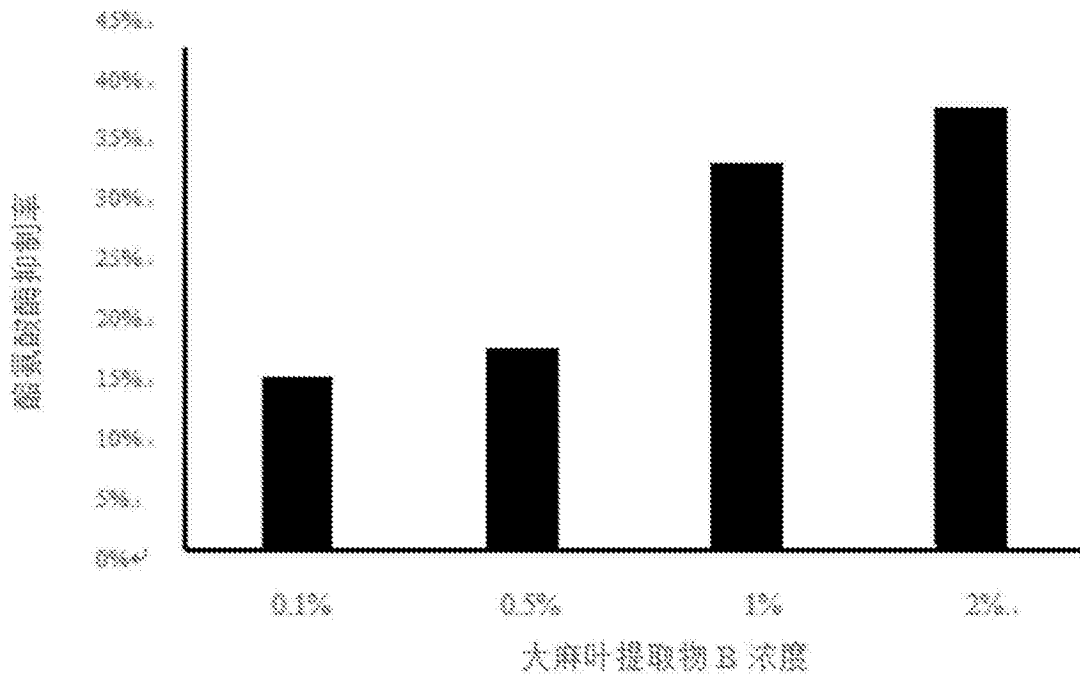


图2



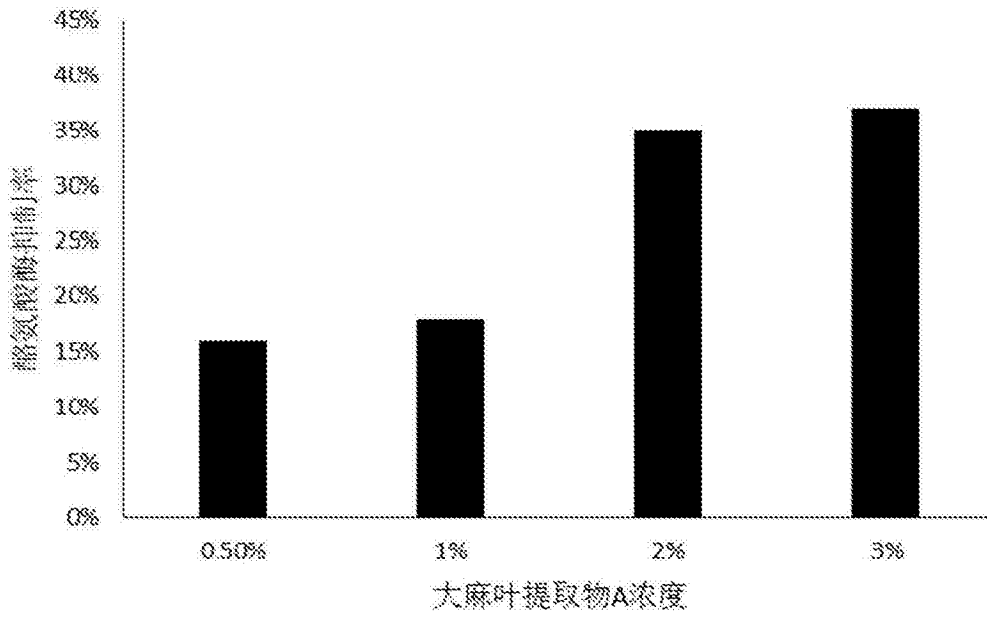


图3

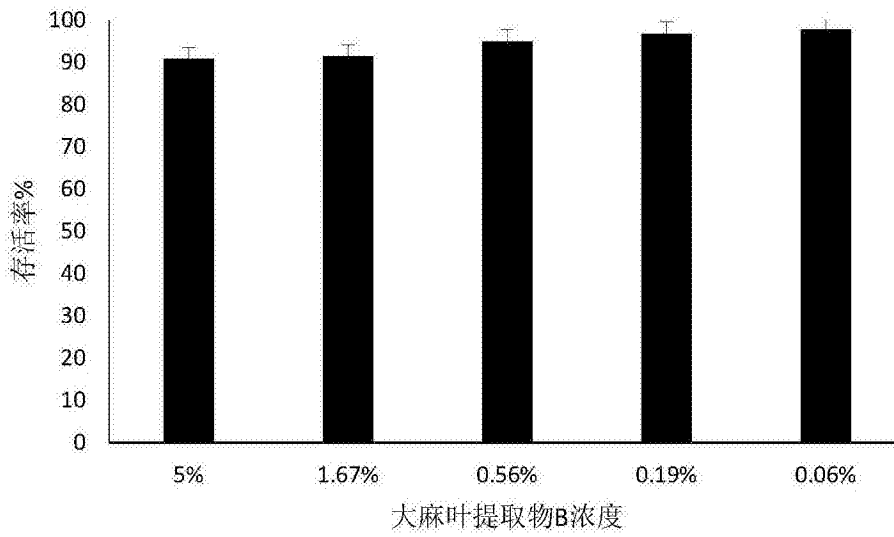


图4

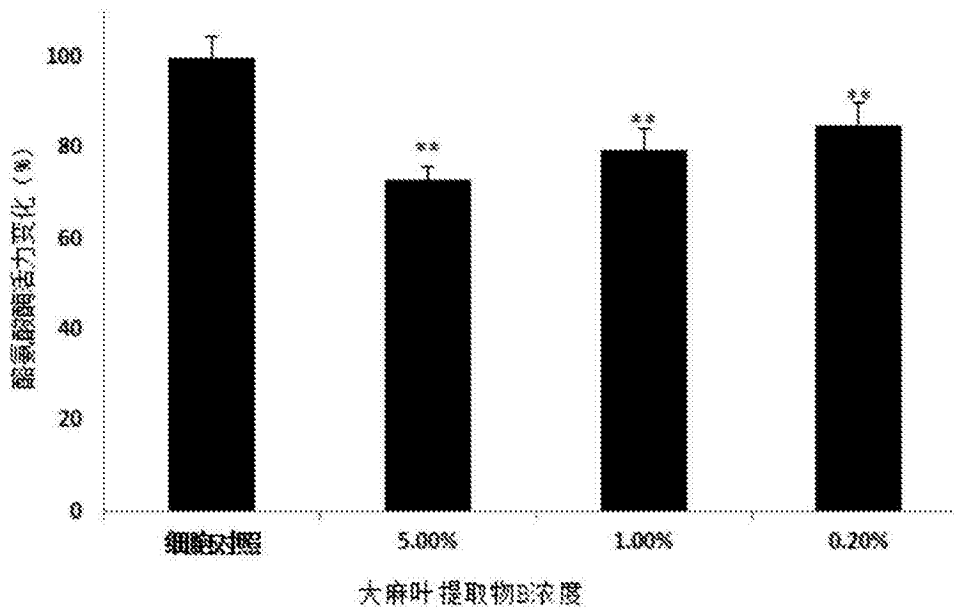


图5

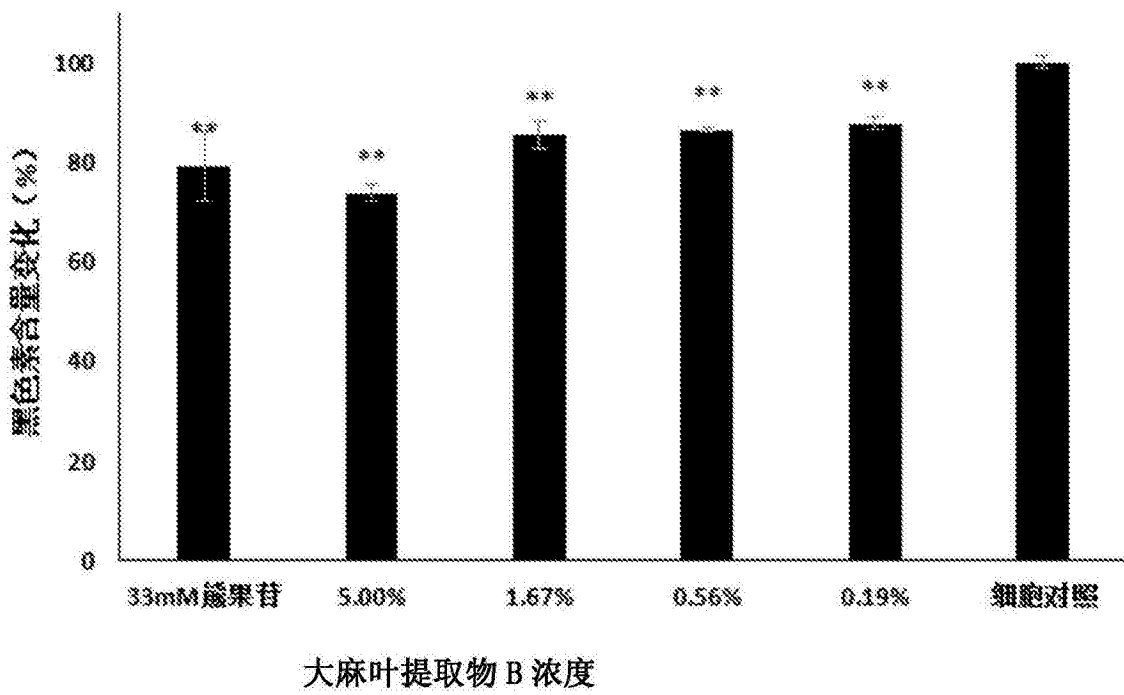


图6

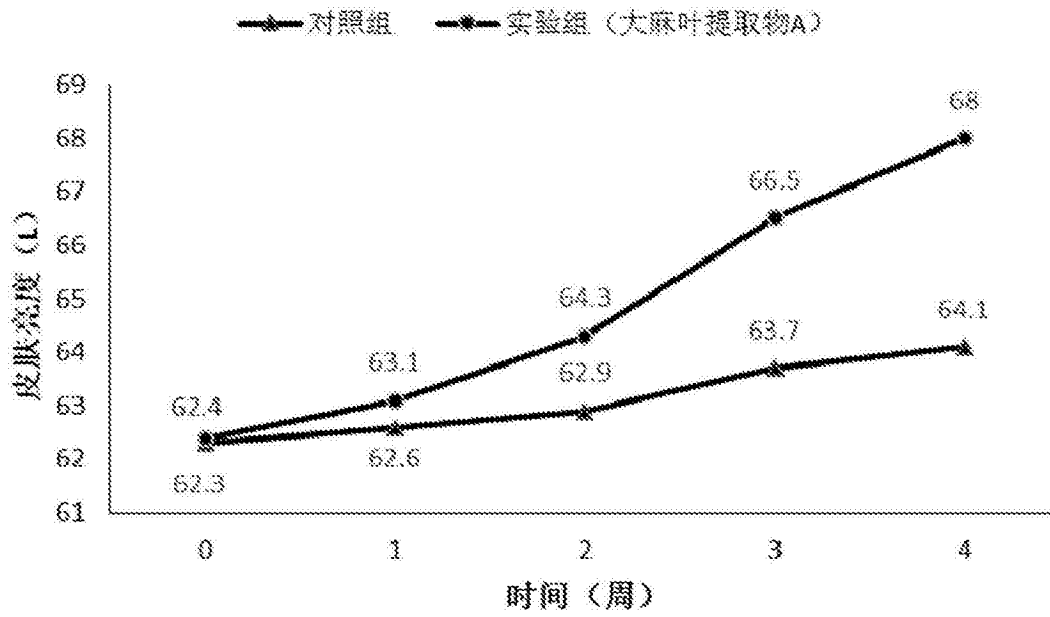


图7

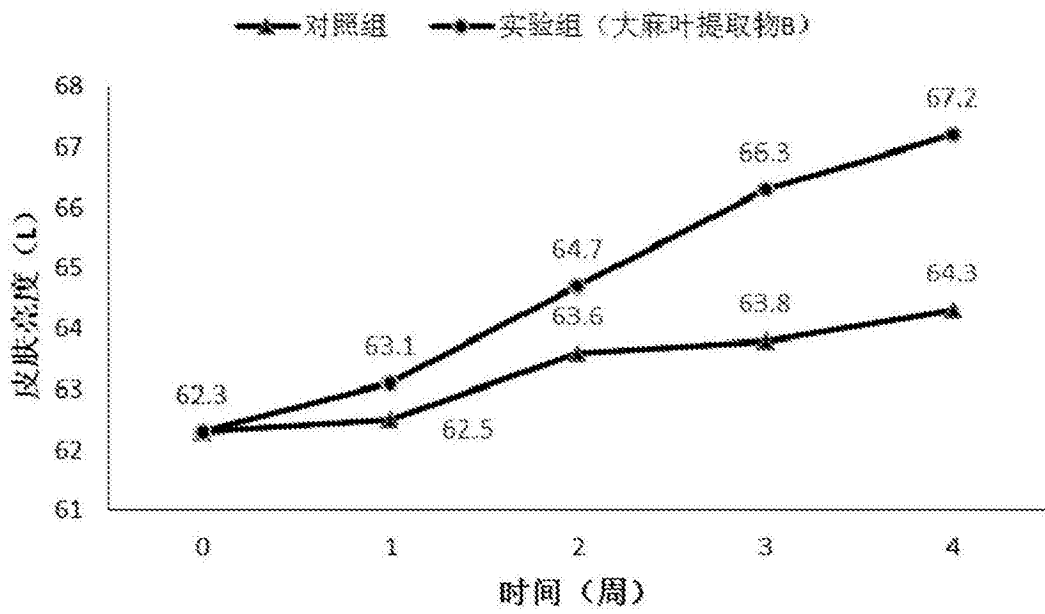


图8

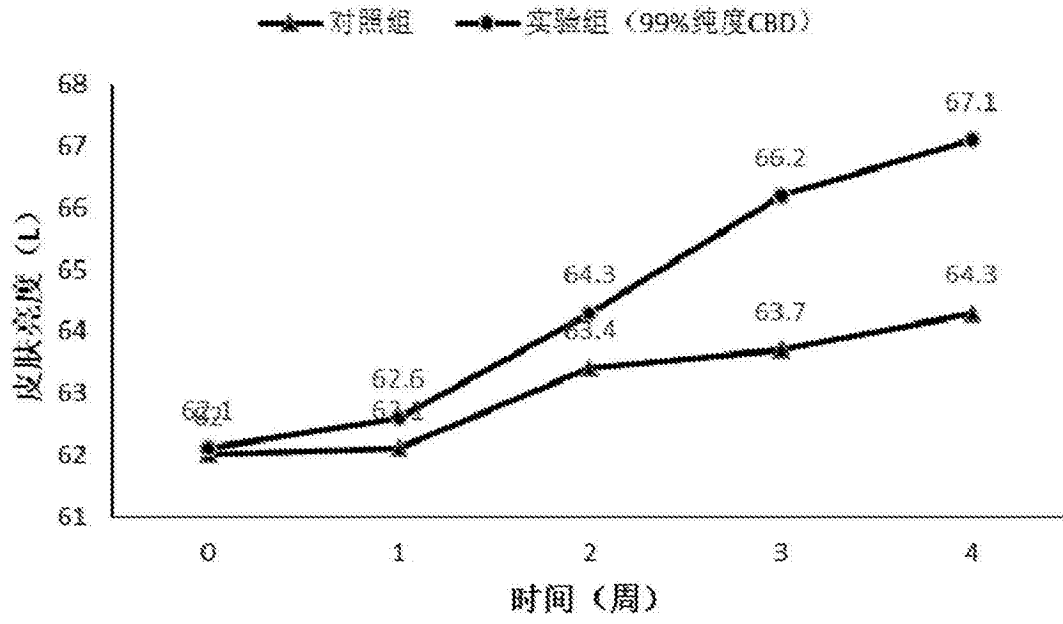


图9