



(10) 授权公告号 CN 112236199 B

(45) 授权公告日 2023.07.18

(21) 申请号 201980030840.3

(22) 申请日 2019.04.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112236199 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(30) 优先权数据
1853216 2018.04.12 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/059298 2019.04.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/197548 FR 2019.10.17

(73) 专利权人 爱西美公司
地址 摩纳哥摩纳哥

(72) 发明人 玛丽-克里斯汀·塞甘

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290
专利代理师 孙雪 张淑珍

(51) Int.Cl.
A61K 8/9783 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101899082 A, 2010.12.01
US 2011129453 A1, 2011.06.02
Alam M ,Ferdosh S ,Ghafoor K , et al.. "Clinacanthus nutans: a review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine". 《Asian Pacific Journal of Tropical Medicine》. 2016, 393-399.

张勇, 张宏武, 邹忠梅. "榼藤子种仁化学成分研究". 《中国药学杂志》. 2008, 1063-1065.

审查员 余乐乐

权利要求书2页 说明书14页

(54) 发明名称

榼藤种子提取物及其生产方法、以及该提取物的化妆品应用

(57) 摘要

本发明涉及一种通过选择性水解种子中积累的代谢物来生产榼藤属(Entada genus)种子提取物的方法。本发明还涉及使用这种方法生产的提取物、包含该提取物的组合物、以及该提取物的化妆品和皮肤护理应用。

1. 一种用于生产富含榼藤酰胺A(entadamide A)的榼藤属(genus Entada)种子提取物的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 内源酶的活化阶段,所述活化阶段通过在机械搅拌下以0.02至2的种子/水重量比分散所述种子而进行;

(ii) 步骤(i)中获得的分散体的酶水解阶段,所述酶水解阶段通过在25°C至100°C的温度下、2分钟至12小时的时间周期内、4至8的pH下的热处理而进行;

(iii) 步骤(ii)中以热化学方式获得的分散体中的酶活性的抑制阶段,所述阶段依次包括以下步骤:

a) 以0.1至10的抑制剂/水体积比,添加不可逆地抑制所述内源酶的活性的试剂;

b) 在25°C至75°C的温度下、2分钟至12小时的时间周期内,

对步骤(iii/a)中获得的反应介质进行热处理;

c) 在减压下去除步骤(iii/a)中提及的抑制剂,以获得富含榼藤酰胺A且含有天然的未水解的榼藤子苷的水性滤液;

(iv) 向步骤(iii/c)中获得的水性滤液中添加化妆品上可接受的溶剂,随后进行将pH调节为3至7的步骤,

其中,所述内源酶为 β -葡萄糖苷酶;并且

步骤(iii/a)的内源酶活性的抑制剂是添加有葡萄糖的水或与水可混溶的有机溶剂,所述有机溶剂为选自乙醇、甲醇、丙醇及其异构体、丁醇及其异构体、戊醇、己醇以及它们的混合物的醇。

2. 如权利要求1所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,将所述种子去壳、粉碎或研磨,并使其任选地变成粉末。

3. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,所述种子源自如下种中的一个或多个:榼藤子(*Entada phaseoloides*)、眼镜豆(*Entada rheedei*)、小叶榼藤(*Entada parvifolia*)、鸭榼藤(*Entada pursaetha*)、鸭腱藤(*Entada scandes*)、巨豆榼藤(*Entada gigas*)和非洲榼藤(*Entada africana*)。

4. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,所述种子源自如下种:榼藤子。

5. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,所述提取物在所述步骤(iv)后包含重量含量为1mg/g至5mg/g的榼藤酰胺A、重量含量为9mg/g至85mg/g的榼藤子苷以及重量含量不超过0.2mg/g的微量的榼藤酰胺A葡萄糖苷。

6. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,所述榼藤子苷/榼藤酰胺A的重量比为15至25,榼藤酰胺A葡萄糖苷/榼藤酰胺A的重量比小于0.5。

7. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,步骤(i)的所述种子/水重量比为0.1至1。

8. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,步骤(ii)的所述热处理中的温度为45°C至60°C。

9. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的方法,其中,步骤(ii)的所述热处理的时间周期为10分钟至1小时。

10. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,步骤(ii)的所述热处理期间的pH为4至6。

11. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,所述步骤(iii/a)的内源酶活性的抑制剂为乙醇。

12. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,所述抑制剂/水体积比为0.5至5。

13. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,步骤(iii/b)的所述热处理中的温度为45℃至60℃。

14. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,步骤(iii/b)的所述热处理的时间周期为10分钟至1小时。

15. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,步骤(iv)的所述化妆品上可接受的溶剂为二醇溶剂或甘油,所述二醇溶剂选自1,3-丙二醇、1,2-丙二醇、甲基丙二醇、苯氧基丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇、1,2-己二醇、1,2-二羟基乙烷、二甘醇、二丙二醇、三甘醇、三丙二醇、二乙氧基二甘醇、戊二醇、2-甲基-2,4-戊二醇、1,2-辛二醇以及它们的混合物。

16. 如权利要求15所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,所述溶剂是1,3-丙二醇。

17. 如权利要求1或2所述的用于生产富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的方法,其中,步骤(iv)调节pH为4.5。

18. 一种富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物,所述富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物通过权利要求1-17中任一项所述的方法获得。

19. 如权利要求18所述的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物,所述富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物包含重量含量为1mg/g至5mg/g的榭藤酰胺A、重量含量为9mg/g至85mg/g的榭藤子苷和重量含量不超过0.2mg/g的微量的榭藤酰胺A葡萄糖苷。

20. 权利要求18或19所述的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物作为如下试剂的化妆品用途:用于预防或对抗对皮肤有害的太阳辐射的影响的试剂。

21. 如权利要求20所述的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的化妆品用途,所述太阳辐射为紫外线-B辐射。

22. 权利要求18或19所述的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物作为如下试剂的化妆品用途:用于预防或对抗由大气污染、接触化学异物或多烟气氛而引起的皮肤症状的试剂。

23. 权利要求18或19所述的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物作为如下试剂的化妆品用途:对维持存在于皮肤表面的微生物群的内稳态有用的试剂。

24. 一种化妆品或皮肤护理组合物,所述化妆品或皮肤护理组合物包含作为主要活性成分的权利要求18或19所述的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物、以及在生理上与皮肤或附属物相容的一种或多种添加剂。

25. 如权利要求24所述的组合物,其中,相对于所述组合物的总重量,所述提取物的量为1wt%至10wt%。

榼藤种子提取物及其生产方法、以及该提取物的化妆品应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种获得从植物材料中获得并富含感兴趣的代谢物的提取物的方法、由该方法生产的提取物和包含该提取物的组合物,以及它们的化妆品和皮肤护理 (dermocosmetic) 应用。

背景技术

[0002] 根据世界卫生组织,自远古时代以来,在传统医学中(特别是在获得现代合成药物的成本仍然较高的工业化程度较弱社会中)就使用了因其对人类健康有益的特性而具备“药用植物”资格的植物(Sofowora A.等,Afr.J.Tradit.Alternate supplement.Med., 2013,vol.10,pp.210-229)。

[0003] 因此,其中之一,属于“榼藤(Entada)”属且更广泛地属于豆科植物科的榼藤子(Entada phaseoloides)种长期以来一直被用于非常规的印度药(Ayurvedic medicines)、中药甚至部落药物中(Deepa C.等,Int.J.Curr.Int.J.Curr.Res.Biosci.Plant Biol., 2017,vol.4,pp.92-99)。由于这种植物主要生长在热带地区,如马达加斯加、南非、印度、澳大利亚等印度洋沿岸国家的沿海森林,因此其分布相当国际化(Deepa C.等,Int.J.Curr.Res.Biosci.Plant Biol.,2017,vol.4,pp.92-99)。它也在亚洲例如在喜马拉雅山脉中东部海拔高达1300米被发现(Singh O.等,J.Asian Natur.Products Res.,2011,vol.13,pp.682-687),或甚至在中国被准确地以“榼藤子(Entada phaseoloides(L.) Merrill)”的名称命名(Xiong H.等,Acta Pharmaceutica Sinica,2010,vol.45,pp.624-626和引用的参考文献)。植株形态为攀缘藤本植物(长可达2米、宽13厘米)之一,在其开花后结有大豆荚。每个豆荚含有10至20粒红褐色的种子,外壳非常坚硬,其形状类似于直径达10厘米的物镜(Sugimoto S.等,J.Natur.Medicines,2018,vol.72,pp.12-19)。

[0004] 在该植物(作为一个整体)及其主要器官(茎、叶和种子)中公认的药用价值很多,并且极其多样:镇痛剂、抗炎药、抗关节炎药、抗糖尿病药、抗氧化剂、保肝药、抗菌剂、解痉药、止咳药、收敛剂等。然而,迄今为止进行的药理学实验和研究主要是在植物种子上进行的(Deepa C.等,Int.J.Curr.Res.Biosci.Plant Biol.,2017,vol.4,pp.92-99)。一方面,一旦将它们的白色果肉简单地粉碎和研磨,这些种子确实有着广泛的用途:治疗黄疸、便秘、蛇咬伤、腹痛,但也有作为毛发生长刺激剂、催情剂、催吐剂、驱虫剂等的用途(Barua C.C.等,Int.J.Res.Biosciences,2015,vol.4,pp.88-97;Barua C.C.等,J.Pharm.Pharmacol.,2014,vol.2,pp.1-18)。另一方面,对榼藤子种子的植物化学成分的分析揭示了几种感兴趣的次级代谢物的积累和储存(Shodhganga等,2005,URL地址:shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/42603/9/09_chapter4.pdf)。尤其是,存在丰富的皂苷,通常在植物中该皂苷是环状三萜或类固醇的油状糖苷,并且在榼藤子的情况中该皂苷在酸水解后会释放出含藤子酸的晶体皂苷元,以及阿拉伯糖和木糖的糖苷。显著的抗炎活性以及抗糖尿病和降血脂活性尤其归因于榼藤子种子的皂苷(Barua C.C.等,J.Pharm.Pharmacol.,2014,vol.2,pp.1-18和引用的参考文献)。其次,榼藤子种子含有大

量酚酸和其它类黄酮,主要以糖复合物的形式存在,例如在关于植物的文献中经常提到的实物“榭藤子苷(phaseoloidin)”,并且表征之后,其为尿黑酸(homogentisic acid)的2-O- β -D-吡喃葡萄糖苷衍生物(Barua A.K.,*Phytochem.*,1988,vol.27,pp.3259-3261)。此后,如此丰富的酚类化合物使这些种子在逻辑上成为获得强大和有营养的天然抗氧化剂的首选原材料(Barua C.C.等,*Int.J.Pharm.Bio.Sci.*,2015,vol.6,pp.366-376)。另外,以该攀缘植物的原始方式,已经证明在这些种子中存在称为“榭藤酰胺(entadamide)”的硫代酰胺结构,这是日本学者在1980年代中期首次分离和表征的(Ikegami F.等,*Chem.Pharm.Bull.*,1985,vol.33,pp.5153-5154&*Phytochem.*,1987,vol.26,pp.1525-1526)。准确地,根据种子中两种结构的数量,将这些代谢物称为“榭藤酰胺A”和“榭藤酰胺B”。它们在化学上对应于化合物“反式-N-(2-羟乙基)-3-甲硫基-丙烯酰胺”和“N-(2-羟乙基)-3,3-双(甲硫基)-丙烯酰胺”。很快,在其表征之后,在证明对脂氧合酶具有抑制作用之后,它们都被提议作为新的抗炎药物(Ikegami F.等,*Chem.Pharm.Bull.*,1989,vol.37,pp.1932-1933)。

[0005] 当局部施用到皮肤上时,通过两种包含榭藤子种子的粉碎浆料的测试制剂(软膏和糊剂)也观察到相同的抗炎优势。它们确实显示出至少与众所周知的非类固醇抗炎药双氯芬酸相当的功效(Dawane J.S.,*N.Am.J.Med.Sci.*,2011,vol.3,pp.513-517)。同样地,在皮肤护理方面,但更具体地仅涉及榭藤酰胺A,也可以指出由申请人提交的EP 3103436专利申请,其中在该发明的示例性试验中,化合物“(E)-N-(2-羟乙基)-3-甲基硫代丙烯酰胺”(即榭藤酰胺A的合成复制品)对抗太阳辐射显示出广谱的防护活性。因此,在其中合乎逻辑地在用于光保护的化妆品或皮肤护理组合中请求保护了榭藤酰胺A。同样对于该榭藤酰胺A分子、也对于“榭藤酰胺A-葡萄糖苷”,最近的一篇文章强调了它们对黑色素产生的抑制作用,类似于物质中的参考化合物熊果苷的作用(Sugimoto S.等,*J.Nat.Med.*,2018,vol.72,pp.12-19)。其作者在考虑到它们的结构被认为与目前商业可得的“化妆品药物”不太相似之后,甚至通过以下结论预言了所有的榭藤酰胺衍生物的有利前景:“榭藤酰胺衍生物可有望用作一种新型的化妆品”(Sugimoto S.等,*J.Nat.Med.*,2018,vol.72,pp.12-19)。

[0006] 基于这些观察,并且响应于将天然来源的创新的、安全的和有效的活性成分并入化妆品产品中的不断增长的需求,申请人在其过去的专利申请之后进一步增长了对榭藤酰胺衍生物的兴趣,但这一次是通过以这些代谢物的最佳含量设计来自榭藤种子的植物提取物,以用于化妆品目的。

[0007] 对于该植物,有限的认识是,在其种子中积累的许多代谢物主要以前体的形式存在,随着它们与具有特定构型或构象的一种或多种糖苷的缀合,有时生物活性较低(Kren V.,*Glycoscience*,2008,pp.2589-2644)。因此,对于榭藤酰胺A而言,这些糖苷是 β -D-吡喃葡萄糖和 β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖(Xiong H.等,*Acta Pharmaceutica Sinica*,2010,vol.45,pp.624-626),对于尿黑酸而言,这些糖苷是 β -D-吡喃葡萄糖(Barua A.K.,*Phytochem.*,1988,vol.27,pp.3259-3261)或甚至是三萜皂苷中发现的N-乙酰氨基葡萄糖(Iwamoto Y.等,*J.Nat.Med.*,2012,vol.66,pp.321-328)。另一个困难是对处于糖基化形式的榭藤酰胺A的观察,该形式在水溶液中不稳定,并且不利地演变形成具有缺乏定义的结构副产物,因此没有任何化妆品利益。

发明内容

[0008] 因此,考虑到上述情况,本发明旨在解决的技术问题是以工业规模开发一种方法,该方法用于获得富含榭藤酰胺A(确切地说是处于游离或苷元形式的榭藤酰胺A)的榭藤种子提取物。因此,该方法将涉及前体糖苷的水解步骤,以及最终获得可直接用于化妆品的提取物的途径,即,无需任何分离和由此的纯化步骤。

[0009] 在目标提取物的设计中要解决的问题还在于需要避免伴随的提取物其它组分的水解。因此,必须特别避免通常期望存在的由其糖基化前体和榭藤子苷同时水解而产生的尿黑酸。确实众所周知,除了根据欧洲法规(EC)No 1272/2008的分类标准作为皮肤和眼睛刺激物之外,这种酸-酚容易氧化成醌类,其聚合并由此形成难溶于水且颜色非常深的色素(Consdén R.等,Biochem J.,1951,vol.50,pp.274-278)。因此,含有尿黑酸的提取物随时间不稳定,并且趋向于自发地演变成有色沉淀,因此使得这种提取物与化妆品制剂所规定的要求的不一致。最后,要避免的另一个缺陷是对存在于提取物中的皂苷的同时水解,这是因为同时水解将导致它们传统上公认的生物活性损失,并且形成苷元三萜烯化合物,因此难溶于水中,并因此倾向于再次导致提取物中出现沉淀。

[0010] 为了实现这些目的,申请人最初转向化学水解技术,然后认识到不可能获得上述预期的选择性。然后,申请人转向酶水解技术,其对于本领域技术人员已知具有更高的选择性(Wang J.等,African J.Biotech.,2011,vol.10,pp.14160-1466)。内源水解酶、特别是糖苷酶的使用似乎是解决本发明提出的技术问题的机会,已在榭藤子种所属的豆科的某些植物中报道了所述糖苷酶的存在(Sripuan T.等,1998,Proceedings of the twenty-four congress on Science and Technology of Thailand,Bangkok,Program and abstracts,ISBN 974-86505-5-3,pp.638-639)。一方面,其已使得能够避免外源水解酶的添加,外源水解酶可能随后难以从最终提取物中除去。另一方面,最近的文献特别报道了几种为其种子而栽培的植物中的内源 β -葡萄糖苷酶,特别是针对在它们食品中的用途,它们将大量糖苷型异黄酮转化为苷元异黄酮,并最终提高它们的生物利用率的能力(Fujita A.等,Appl.Biochem.Biotechnol.,2015,vol.176,pp.1659-1672)。

[0011] 在此基础上,申请人寻求利用种子植物的这种内源酶活性,以便以原始方式实现选择性水解。然而,已初步证明,榭藤子种子的水解酶在本质上的选择性较差。随后作为对比,并且这是本发明的基础,申请人已经发现,根据一组合适的操作条件的连续提取程序使得能够获得对例如存在于榭藤子种子中的主要糖缀合代谢物进行非常高选择性的酶促水解,其选择性通过取决于底物性质的水解动力学差异而实现。

[0012] 换言之,本发明的发明人已经证明,在非常精确控制的条件下(溶剂、浓度、温度、pH和水解时间),通过新实施的酶促活化步骤和随后的失活步骤,与技术假设相反,内源 β -葡萄糖苷酶对榭藤子苷和榭藤酰胺A的 β -D-吡喃葡萄糖苷形式的水解不再同时发生。特别地,根据这些受控条件,本发明的发明人已经发现,在该方法的精确阶段将某些有机溶剂引入到水解介质中,使得能够通过使内源糖苷酶不可逆地失活而快速停止酶促水解过程。通过如此调节代谢物的各自敏感性,最终能够限制为仅对榭藤酰胺A的糖苷进行水解。

具体实施方式

[0013] 关于本领域能够解决该问题的技术水平,现有技术首先揭示了相当丰富的关于称

为“EAE”的酶法水相提取 (Enzymatic Aqueous Extraction) 的文献 (Muniglia L. 等, 书 “Green Chemistry and Sustainable Technology” 的部分, 2014, pp.167-204)。这主要是出于“绿色化学”目的提出的, 并且在植物底物的情况下, 也就是在提取过程中, 其决不是基于植物中存在的化合物之一的原位选择性水解。本发明也不同于国际申请W0 95/10530的主题, 并且不同于其优先权申请, 该优先权申请涉及从一种或多种 β -葡萄糖苷酶生产富含苷元异黄酮的植物提取物的方法, 以便将大多数的葡萄糖苷异黄酮转化为苷元异黄酮。与本发明不同的是, 没有关于植物中存在的物质、特别是葡萄糖苷异黄酮的选择性水解的报道。

[0014] 因此, 本发明的第一个目的是提供一种生产富含榭藤酰胺A的榭藤属 (genus *Entada*) 种子提取物的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0015] (i) 内源酶、优选 β -葡萄糖苷酶的活化阶段, 所述活化阶段通过在机械搅拌下以约0.02至约2的种子/水重量比分散所述种子而进行;

[0016] (ii) 步骤(i)中获得的分散体的酶水解阶段, 所述酶水解阶段通过在约25°C至约100°C的温度下、约2分钟至约12小时的时间周期内、约4至约8的pH下的热处理而进行;

[0017] (iii) 步骤(ii)中以热化学方式获得的分散体中的酶活性的抑制阶段, 所述阶段依次包括以下步骤:

[0018] a) 以约0.1至约10的抑制剂/水体积比, 添加不可逆地抑制所述内源酶的活性的试剂;

[0019] b) 在约25°C至约75°C的温度下、约2分钟至约12小时的时间周期内, 对步骤(iii/a)中获得的反应介质进行热处理;

[0020] c) 在减压下去除步骤(iii/a)中提及的抑制剂, 以获得富含榭

[0021] 藤酰胺A且含有天然的未水解的榭藤子苷的水性滤液;

[0022] (iv) 向步骤(iii/c)中获得的水性滤液中添加化妆品上可接受的溶剂, 随后进行将pH调节为约3至约7的步骤。

[0023] 通过在步骤(iv)结束时获得的“富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物”, 首先必须了解满足以下标准中的至少一种的提取物:

[0024] -富含处于游离形式(苷元)的榭藤酰胺A的提取物, 且该提取物不再含有榭藤酰胺A葡萄糖苷(entadamide A glucone)或仅含有重量含量不超过200ppm(或0.2mg/g)的微量的榭藤酰胺A葡萄糖苷;

[0025] -富含榭藤酰胺A的提取物, 特别是通过与根据仅允许回收非常少量的苷元代谢物的水醇型传统提取获得的提取物相比较;

[0026] -包含重量含量为约1mg/g至约5mg/g的榭藤酰胺A、优选含量约2mg/g至约3mg/g的榭藤酰胺A的提取物;

[0027] -包含重量含量为约9mg/g至约85mg/g的榭藤子苷、优选含量为约30mg/g至约60mg/g的榭藤子苷的提取物;

[0028] -其中榭藤子苷/榭藤酰胺A的重量比为约15至约25、优选约20的提取物;

[0029] -其中榭藤酰胺A葡萄糖苷/榭藤酰胺A的重量比小于0.5、优选小于0.1的提取物;

[0030] -其特征不在于榭藤酰胺A葡萄糖苷向榭藤酰胺A的转化率至少为90%、优选为99%的提取物;

[0031] -未通过色谱法进行任何分离步骤的提取物。

[0032] 特别地,富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物包含重量含量为约1mg/g至约5mg/g的榼藤酰胺A、重量含量为约9mg/g至约85mg/g的榼藤子苷以及重量含量不超过0.2mg/g的微量的榼藤酰胺A葡萄糖苷。

[0033] 其次,“富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物”应理解为至少满足以下标准之一的提取物:

[0034] -不含尿黑酸或仅含有微量尿黑酸的提取物,其最大含量不超过几十ppm,优选50ppm(或0.05mg/g);

[0035] -包含重量含量为约3mg/g至约40mg/g皂苷、优选含量为约10mg/g至约20mg/g皂苷的提取物;

[0036] -含有最佳量的榼藤子苷的提取物,榼藤子苷的提取率至少为90%、优选为100%。

[0037] 根据本发明的优选实施方式,本发明所述的“榼藤属种子”是指一些完整或去壳、发芽或未发芽的种子,所述种子预先经粉碎或研磨并且能够变成粉末状。这些种子获得自如下种中的一个或多个:榼藤子(*Entada phaseoloides*)、眼镜豆(*Entada rheedei*)、小叶榼藤(*Entada parvifolia*)、鸭榼藤(*Entada pursaetha*)、鸭腱藤(*Entada scandes*)、巨豆榼藤(*Entada gigas*)和非洲榼藤(*Entada africana*),这与它们的同义词或它们作为“亚种”资格(Ohashi H.等,Taiwania,2010,vol.55,pp.43-53)所宣布的它们的植物成分的相似性有关(Deepa C.等,Int.J.Curr.Res.Biosci.Plant Biol.,2017,vol.4,pp.92-99; Sugimoto S.等,J.Natur.Medicines,2018,vol.72,pp.12-19;Abu Sufian Md.等,Int.Res.J.Pharm.,2015,vol.6,pp.411-414)。有利地,它们是源自如下种的种子:榼藤子或眼镜豆。非常特别地,它们是来自榼藤子种的种子。

[0038] 根据本发明优选的实施方式,将种子去壳、粉碎或研磨,并使其任选地变成粉末状态。

[0039] 根据本发明优选的实施方式,步骤(i)的种子/水重量比为约0.1至约1、优选约0.2。

[0040] 根据本发明优选的实施方式,步骤(ii)的热处理中的温度为约45°C至约60°C、优选约55°C。

[0041] 根据本发明优选的实施方式,步骤(ii)的热处理的持续时间为约10分钟至约1小时、优选约30分钟。

[0042] 根据本发明优选的实施方式,在步骤(ii)的热处理期间将pH调节为约4至约6。

[0043] 根据本发明优选的实施方式,步骤(iii/a)中使用的抑制内源酶活性的试剂是与水可混溶的有机溶剂,有利地为添加有葡萄糖的水,或选自乙醇、甲醇、丙醇及其异构体、丁醇及其异构体、戊醇、己醇以及它们的混合物的醇。有利地,所述试剂是乙醇或甲醇。非常特别地,所述试剂是乙醇。

[0044] 根据本发明优选的实施方式,步骤(iii/a)的抑制剂/水体积比为约0.5至约5、优选约1。

[0045] 根据本发明优选的实施方式,步骤(iii/b)的热处理中的温度为约45°C至约60°C、优选约55°C。

[0046] 根据本发明优选的实施方式,步骤(iii/b)的热处理的持续时间为约10分钟至约1

小时、优选约30分钟。

[0047] 根据本发明优选的实施方式,步骤(iv)中使用的化妆品上可接受的溶剂为二醇溶剂(glycolic solvent),有利地选自1,3-丙二醇、1,2-丙二醇(propylene glycol)、甲基丙二醇、苯氧基丙二醇、1,2-丁二醇(butylene glycol)、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇、1,2-己二醇、1,2-二羟基乙烷(乙二醇)、二甘醇、二丙二醇、三甘醇、三丙二醇、二乙氧基二甘醇、戊二醇、己二醇、1,2-辛二醇(caprylyl glycol)、甘油(丙三醇)以及它们的其混合物。有利地,所述溶剂是1,3-丙二醇或1,2-丁二醇或甘油。非常特别地,所述溶剂是1,3-丙二醇。

[0048] 根据本发明优选的实施方式,步骤(iv)调节pH为约4.5。

[0049] 作为本发明第一目的的示例性实例,根据包含以下步骤的方法生产富含榭藤酰胺A的榭藤子种的种子提取物:

[0050] (i) 在机械搅拌下将10g去壳后磨碎的榭藤子种子置于50g水的悬浮液中,活化内源性 β -葡萄糖苷酶;

[0051] (ii) 在55°C的温度下对悬浮液进行酶水解30分钟;

[0052] (iii) 添加50mL乙醇,使反应介质温度达到55°C再保持30分钟,然后过滤以获得澄清的滤液;

[0053] (iv) 将步骤(iii)中获得的100g滤液(“粗提物”)添加到7.3g的1,3-丙二醇中,其在减压下蒸发,引入50mL水后,在减压下重新蒸发,添加几滴6N HCl并用24.3g水调节,得到水二醇提取物(hydroglycolic extract,在下文的制剂和试验1至试验7中称为“榭藤种子提取物”),并在这些条件下含有:

[0054] • 2.5mg/g的榭藤酰胺A;

[0055] • 43mg/g的榭藤子苷;

[0056] • 10mg/g至15mg/g的皂苷;

[0057] • 榭藤子苷/榭藤酰胺A的重量比小于20;

[0058] • 榭藤酰胺A葡萄糖苷/榭藤酰胺A的重量比小于0.1;

[0059] • 不可检测量的尿黑酸,至少小于50ppm(或0.05mg/g);

[0060] • 不可检测量的榭藤酰胺A葡萄糖苷,至少小于50ppm(或0.05mg/g)。

[0061] 本发明还涉及一种富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物,其可通过如上定义的方法获得。

[0062] 根据本发明的另一目的是可通过本发明所述方法获得的、用于其化妆品或皮肤护理用途的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物,这是因为所述提取物对皮肤显示出一系列有益的反应,如以下试验1至试验7所示:

[0063] -对抗具有反式尿刊酸(trans-urocanic acid)的内源性光保护剂的光诱导异构化的能力,以及由此的限制太阳辐射紫外线B组分(UV-B: λ 290nm-320nm)的免疫抑制作用的能力(参见以下试验1a)。在反式尿刊酸向顺式尿刊酸的光诱导异构化方面,对于本发明所述提取物的此种光抑制活性,应注意的是,这是本发明的另一重要方面,未水解的榭藤子苷在抗UV-B辐射的此种光保护活性中的显著贡献(迄今尚不为申请人所知)大于至少25%(参见以下试验1b);

[0064] -所述提取物具有强抗氧化活性,其在皮肤水平上对抗产生源自氧的反应性物质

或自由基($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 OH^{\cdot} 等)的任何氧化应激方面是令人感兴趣的。当在用ABTS(2,2'-联氮二-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))(参见以下试验2a)和DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼)(参见以下试验2b)的试验背景下对所述提取物进行评估时,观察到了此种效应;

[0065] -限制光诱导的蛋白质(即半乳凝素-7(galectin-7))过度生产的能力,对该蛋白质标记物的此种作用构成了提取物有效对抗由UV-B诱导的免疫抑制的效率的另一个指征(参见以下试验3);

[0066] -限制由UV-B辐射诱导的IL-8和TNF- α 型促炎细胞因子介质(指定的用于研究UV-B的炎症效应的标记物)释放的能力(参见以下试验4和试验5);

[0067] -有效对抗太阳辐射的其它成分的能力,例如紫外线-A辐射(UV-A: λ 320nm-400nm)或可见光辐射(VIS: λ 400nm-700nm),特别是对抗蓝光(λ 380nm-470nm),其中所述提取物由于其抗氧化性而能够对抗基质金属蛋白酶(MMP-1)的过度生产(其由蓝光诱导并降解胶原)(参见以下试验6);

[0068] -在培养的人皮肤外植体上限制由UV-B、UV-A和VIS辐射组合诱导并用嘧啶二聚体("CPD")的量表示的DNA损伤的能力(参见以下试验7);

[0069] -保护表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)共生菌免受UVB诱导的损伤的能力(参见以下试验8)。

[0070] 对于上述试验之一(试验2),应注意本发明所述提取物与申请人提交的专利申请EP 3103436中提及的榭藤酰胺A的合成复制品之间的比较值。

[0071] 根据本发明优选的实施方式,可通过本发明所述方法获得的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的化妆品用途涉及预防或对抗对皮肤有害的太阳辐射的影响,特别是对抗紫外线-B辐射(UV-B: λ 290nm-320nm),是否增强局部施用的光保护制剂的有效性或更普遍地减缓光老化。

[0072] 根据本发明的另一优选的实施方式,由于本发明所述的提取物的抗氧化特性,可通过本发明所述方法获得的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的用途涉及预防或对抗由压力(如大气污染、接触化学异物或多烟气氛)而引起的皮肤症状。

[0073] 本发明的另一优选的实施方式涉及可通过本发明所述方法获得的、由于其抗炎特性而用于治疗痤疮、皮脂溢、酒渣鼻或特应性皮炎的皮肤护理用途的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物。

[0074] 由于可通过本发明所述方法获得的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物所表现出的光保护特性和抗氧化特性,本发明的另一个优选实施方式是其在维持存在于皮肤表面的微生物群的内稳态中的化妆品用途。

[0075] 最后,本发明的另一个目的涉及用于化妆品或皮肤护理用途的组合物,所述组合物包含作为主要活性成分的如上所定义的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物、以及在生理上与皮肤或附属物相容的一种或多种添加剂。

[0076] 有利地,相对于组合物的总重量,在目标组合物中如上所定义的富含榭藤酰胺A的榭藤属种子提取物的量为1wt%至10wt%、优选1.5wt%至5wt%。

[0077] 本发明所述的组合物适合于局部皮肤给药,以通常用于此类给药的所有形式呈现。通过非限制性信息,组合物可以处于如下形式:混悬剂、洗剂、霜剂、水性或水醇凝胶、散剂和各种乳液(可任选地为微乳剂或纳米乳剂)等。

[0078] 本发明所述的组合物可含有本领域技术人员已知的且可在化妆品或皮肤护理领域相容的、作为生理学上可接受的添加剂的至少一种添加剂,所述添加剂选自油、蜡、硅橡胶、表面活性剂、助表面活性剂、增稠剂和/或凝胶剂、保湿剂、润肤剂、有机或无机滤光剂(filter)、光稳定剂、除醛供体防腐剂(aldehyde donor preservative)之外的防腐剂、染料、吸油剂(matifying agent)、张力剂(tensor)、螯合剂、香料等以及它们的混合物。

[0079] 本发明所述的组合物可进一步包含一种或多种额外的活性剂,其选自(但不限于此)脱糖剂(deglycation agent)、增加胶原蛋白或弹性蛋白的合成或防止其降解的试剂、增加糖胺聚糖或蛋白聚糖的合成或防止其降解的试剂、促进细胞增殖的试剂、增色剂、抗氧化剂或抗自由基剂或抗污染剂、保湿剂、排水剂或排毒剂、抗炎剂、脱皮剂、安慰和/或抗刺激剂、作用于微循环(抗黑眼圈)的试剂、增强皮肤防御系统的试剂、有利于增强屏障功能的试剂、刺激细胞代谢(细胞生长、产生对皮肤有用的生物分子(如胶原蛋白))的试剂、对抗心理压力的有害影响的试剂、分子伴侣、限制与皮脂过度生产相关的缺陷的试剂、靶向某些皮肤病变(如特应性皮炎、酒渣鼻、愈合障碍)的试剂、以及它们的混合物。

[0080] 非常特别地,在本发明所述的用途和组合物中,能够通过本发明所述方法获得的富含榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物是去壳并研磨的榼藤子的种子的提取物。

[0081] 仅作为说明,下面通过含有富含上述榼藤酰胺A的榼藤属种子提取物的本发明所述组合物制剂的以下实施例对本发明进行示例性说明。

	制剂 A (霜剂) -局部施用: 光老化	(质量百分比)
	榭藤子种子提取物	2%
	氢化聚异丁烯	7%
	肉豆蔻酸异丁酯	3%
	棕榈酸十六烷基酯	7%
	乙二醇单硬脂酸酯	5%
	山梨醇月桂酸酯	2%
	聚山梨醇酯 20	2%
	卡波姆 (丙烯酸酯/丙烯酰胺共聚物&矿物油)	0.3%
	苯氧乙醇	0.5%
[0082]	水	qsp100%
	制剂 B (凝胶) -局部施用: 抗污染	(质量百分比)
	榭藤子种子提取物	4%
	卡波姆 (丙烯酸酯/丙烯酰胺共聚物&矿物油)	1.5%
	苯甲酸钠	0.2%
	山梨酸	1%
	1,3-丁二醇	10%
	甘油	5%
	氢氧化钠	0.13%
	苯氧乙醇	0.9%
[0083]	水	qsp 100%

[0084] 实施例

[0085] 仅作为说明,下面还通过在本发明说明书中上述的以下试验(试验1至试验7)来对本发明进行说明。

[0086] 试验3至试验5的实验均在D17重建的人表皮(称为“EHR”,供应商: **Skinethic®**)上进行,该人表皮在维持培养基中培养,然后在存在或不存在本发明所述的榭藤种子提取物的情况下以300mJ/cm²剂量(**Waldmann®**灯)辐照。培养24小时后,收集上清液,然后按照以下方案进行蛋白质分析。

[0087] 试验1:证明榭藤子种子提取物对抗反式尿刊酸的光诱导异构化的能力

[0088] 进行了两个系列的实验,第一个是300mJ/cm²的固定剂量UV-B辐射(试验1a),第二个是可变剂量的UV-B辐射(试验1b),并使用榭藤酰胺A的合成复制品(即化合物“(E)-N-(2-羟乙基)-3-甲基丙烯酰胺”,其为专利申请EP 3103436的主题)作为对照。

[0089] 实验上,该试验在pH为5.5的0.01M柠檬酸盐缓冲液中进行,微酸性pH更多地与反

式尿刊酸标记物所在的浅表皮肤层的酸性有关。因此,将待辐照的溶液(20mL),即含有或不含有本发明所述的提取物的对照,置于玻璃培养皿中,未覆盖,然后在室温下使用UV-B烘箱(LabOSI®)进行UV-B辐照。然后,在通过HPLC分析之前,将等分试样(500 μ L)取样到HPLC小瓶中,立即在低温(+4/+8 $^{\circ}$ C)下避光保存。由此,得到了色谱图,并测定了反式尿刊酸的残留量。

[0090] 下表1a中整理了试验1a中获得的结果:

[0091] 表1a

化合物	反式尿刊酸% (300mJ/cm ²)	反式尿刊酸的增长%
[0092] 反式尿刊酸 (未经辐照的对照)	100	N / A
反式尿刊酸 (经辐照的对照)	37	N / A
对照(经辐照) + 2%的榭藤种子的提取物	53	+ 43%
[0093] 对照(经辐照) + 3%的榭藤种子的提取物	56	+ 51%
对照(经辐照) + 5%的榭藤种子的提取物	64	+ 73%

[0094] 以上表1a中的结果强调了,在所试验的最低浓度下,本发明所述的榭藤种子提取物可有效防止反式尿刊酸光异构化为顺式尿刊酸。

[0095] 实验上关于试验1b,本研究以与上述试验1a几乎相同的方式进行,首先在规定的实验条件下对如下进行检查:反式尿刊酸生成大量的顺式尿刊酸,其可通过HPLC分析进行测量。

[0096] 辐照剂量为64mJ \cdot cm⁻²和128mJ \cdot cm⁻²。下表1b整理了试验1b中获得的结果:

[0097] 表1b

化合物	尿刊酸的反式 \rightarrow 顺式异构化的抑制%	
	64 mJ/cm ²	128 mJ/cm ²
[0098] 对照: 榭藤酰胺 A (1 mM)	34	40
榭藤种子的提取物 (榭藤酰胺 A(1 mM) + 榭藤子苷)	54	59

[0099] 上表1b的结果首先强调了,本发明所述的榭藤种子提取物可有效地针对UV-B辐照保护反式尿刊酸,具有限制其光异构化的能力。然后,这些结果突出了榭藤子苷在提取物的光保护能力中的重要贡献。

[0100] 试验2:证明榭藤子种子提取物的抗氧化活性

[0101] 进行了两个系列的实验,第一个使用测试ABTS或酸2,2'-联氮二-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(试验2a),第二个使用测试DPPH或1,1-二苯基-2-苦基肼(试验2b)。抗坏血酸作为参比抗氧化剂。

[0102] 实验上,根据测试ABTS,通过事先将7mM的2,2'-联氮二-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐与2.45mM过硫酸钾按体积到体积混合16小时,获得氧化ABTS盐(2,2'-联氮二-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)的二铵盐)的母液。然后在水中稀释该溶液,在试验条件下,在734nm处获得0.5的吸光度。在96孔微板的每个孔中,放置100 μ L待评估的本发明所述提取物的溶液和150 μ L氧化ABTS溶液。6分钟后,在734nm处测量吸光度。

[0103] 所得结果整理在如下表2a中:

[0104] 表2a

化合物	EC ₅₀
榭藤提取物	74mg/L (即 9.6 μ M 当量榭藤子苷)
榭藤子苷	8.3 μ M
抗坏血酸	24 μ M

[0106] 实验上,通过DPPH试验,在96孔微型板的每个孔中放置100 μ L的待评估活性溶液和100 μ L的1,1-二苯基-2-苦基肼的乙醇溶液(DPPH-Aldrich D913-2)(200 μ M)。30分钟后,在517nm处测量吸光度。

[0107] 所得结果整理在下表2b中:

[0108] 表2b

化合物	EC ₅₀
榭藤提取物	0.84mg/L (即 109 μ M 当量榭藤子苷)
榭藤子苷	540 μ M
抗坏血酸	25 μ M

[0110] 表2a和表2b中的结果强调了,榭藤子苷是一种接近抗坏血酸的强抗氧化剂,它赋予提取物可用于化妆品应用的活性。

[0111] 试验3:证明榭藤子种子提取物限制蛋白质半乳凝素-7分泌的能力

[0112] 实验上,在辐照和收集上清液后,使用ELISA试剂盒(人类半乳凝素-7R&D系统DY13339,供应商:Biotechne)对半乳凝素-7(一种凋亡蛋白)进行测定。首先将抗半乳凝素-7捕获抗体附着于96孔板的孔底。然后,在洗涤和封闭后,将100 μ L所收集的HER的不同培养上清液放置在孔中。样品中存在的半乳凝素-7分子因此被特异地固定在捕获抗体上,而那些没有被固定的则在冲洗步骤中被去除。然后将次级检测抗体(携带生物素化位点)加入到孔中。洗涤后,加入链霉亲和素-HRP(其是对生物素具有高亲和力的蛋白),并固定在次级抗体的生物素化位点上。在最后的冲洗步骤去除多余的链霉亲和素-HRP后,加入过氧化物酶底物,并在20分钟后用含有硫酸的溶液猝灭反应。在450nm处用分光光度法测定比色强度。

[0113] 所得结果整理在下表3中：

[0114] 表3

	化合物	分泌的半乳凝素-7%	半乳凝素-7 分泌的抑制%
	对照（未经辐照的 EHR）	100	N/A
[0115]	对照（经辐照的 EHR）	1084	N/A
	对照（经辐照的 EHR） + 2.5%的榼藤种子提取物	301	-72%

[0116] 表3的结果强调了，在UV-B辐射剂量下，本发明所述的榼藤种子提取物能够减少超过70%的由重建的人表皮分泌的半乳凝素-7的量。

[0117] 试验4：证明榼藤子种子提取物限制IL-8型促炎介质释放的能力

[0118] 实验上，在辐照和收集上清液后，使用“人CXCL8/IL-8免疫分析D8000C”型的ELISA试剂盒（供应商：Biotechne）进行细胞因子IL-8（是UV-B下炎症增加的代名词）的测定。使用与半乳凝素-7的测定相同的技术。

[0119] 所得结果整理在下表4中：

[0120] 表4

	化合物	分泌的 IL-8%	IL-8 分泌的抑制%
	对照（未经辐照的 EHR）	100	N/A
[0121]	对照（经辐照的 EHR）	1213	N/A
	对照（经辐照的 EHR） + 1.5%的榼藤种子提取物	221	-80%

[0122] 表4的结果强调了，在UV-B辐射剂量下，本发明所述的榼藤种子提取物能够大大减少IL-8的分泌。

[0123] 试验5：证明榼藤子种子提取物限制炎性介质 (TNF- α) 释放的能力

[0124] 实验上，在辐照并收集上清液后，使用“Quantikine人TNF- α 免疫测定DTA00C”型的ELISA试剂盒（供应商：Biotechne），采用与半乳凝素-7和IL-8相同的分析技术，对细胞因子TNF- α （在免疫反应中起重要作用并在光诱导免疫抑制中占有优势地位的促炎细胞因子）进行了测定。

[0125] 所得结果整理在下表5中：

[0126] 表5

	化合物	分泌的 TNF- α %	TNF- α 分泌的抑制%
	对照（未经辐照的 EHR）	100	N/A
[0127]	对照（经辐照的 EHR）	229	N/A
	对照（经辐照的 EHR） + 1.5%的榼藤种子提取物	165	-28%

[0128] 表5的结果强调了，在UV-B辐射剂量下，本发明所述的榼藤种子提取物能够减少TNF- α 的分泌。

[0129] 试验6：证明榼藤子种子提取物限制蓝光诱导的MMP-1金属蛋白酶过表达的能力

[0130] 原代人成纤维细胞 (“NHDF”) 分离自17岁患者的乳房成形术。将NHDF在补充有4.5g/L葡萄糖和10%FCS的DMEM介质中培养。将它们保持在10%CO₂、37°C的气氛中。在D-3, 将成纤维细胞以15,000个细胞/cm²的比率接种在24孔板中。在D-1, 将NHDF与本发明所述的榅藤种子提取物在37°C和10%CO₂下孵育24小时。在D0, 重新开始处理, 将细胞暴露于30J/cm²剂量的蓝光下 (灯 **Waldmann**[®], 具有Fluocompact灯泡LIGHTTECH LTC 36w/2G11 CL 380nm-470nm)。辐照后, 将细胞在37°C和10%CO₂下再孵育额外24小时, 收集培养物上清液以进行MMP-1金属蛋白酶 (Abcam试剂盒, ab100603) 的ELISA测定。将获得的结果相对于每种条件的细胞数量进行归一化, 并进行一式三份的统计分析。使用N-乙酰-半胱氨酸 (“NAC”) 作为标准抗氧化剂。

[0131] 所得结果整理在下表6中:

[0132] 表6

化合物	分泌的 MMP-1%	MMP-1 分泌的抑制%
对照 (未经辐照的 NHDF)	100	N/A
对照 (经辐照的 NHDF)	214	N/A
[0133] 对照 (经辐照的 NHDF) + N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 5 mM	61	-71%
对照 (经辐照的 NHDF) + 0.05%的榅藤种子提取物	46	-79%

[0134] 表6的结果强调了本发明所述的榅藤种子提取物的功效与N-乙酰-半胱氨酸相当。

[0135] 试验7: 证明榅藤子种子提取物在培养的人皮肤外植体上限制由UV-B、UV-A和VIS辐射组合诱导的DNA损伤的能力。

[0136] 在用解剖刀制作约1cm²的皮肤方块之后, 使用原位免疫染色技术对培养中的人皮肤的外植体 (人皮肤从42岁和56岁的高加索妇女的颞部区域的头皮获得) 进行证明。外植体的培养包括将它们置于含有4.5g/L葡萄糖、补充有抗生素 (青霉素-链霉素-两性霉素) 的“DMEM”生长培养基中, 并用浓度为2.5%的本发明所述的榅藤种子提取物进行局部处理, 在37°C和5%CO₂下进行48小时。

[0137] 在施用提取物之后, 在太阳模拟器 (SUNTEST CPS+) 中辐照外植体。辐照后, 立即重新开始处理, 并将外植体培养24小时。

[0138] 在培养时间结束时, 将外植体冷冻, 然后使用低温切片机 (cryotome) 获得每个外植体的5μm厚的横截面。使用特异性抗体对嘧啶二聚体 (“CPD”) 进行免疫染色。然后使用落射荧光显微镜观察皮肤的每个切片或截面, 对于每个截面在x20放大倍数下拍摄三张照片, 然后使用图像分析软件进行标记的荧光总量的测量。将各条件的结果与对照条件进行比较。

[0139] 所得结果整理在下表7中:

[0140] 表7

	化合物	荧光总量 (UA)	CPD 的减少%
[0141]	对照 (未经辐照的外植体)	921116	N/A
	对照 (经辐照的外植体)	4987094	N/A
[0142]	对照 (经辐照的外植体) + 2.5%的榿藤种子提取物	1915520	-61%

[0143] 表7的结果强调了,在一定剂量的太阳辐射下,本发明所述的榿藤种子提取物能够显著限制由太阳辐射诱导的嘧啶二聚体(CPD)的形成。

[0144] 试验8:示出了榿藤子种子提取物保护共生细菌表皮葡萄球菌免受UVB诱发的损伤的皮肤微生物群保护试验

[0145] 实验上,试验在空心管(tubo)中进行。在存在或不存在1%、1.5%和2.5%的感兴趣提取物的情况下,使细菌菌株表皮葡萄球菌(Alliance Bioexpertise ATCC 12228)经受 $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、 $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ 和 $300\text{mJ}/\text{cm}^2$ 的UV-B辐照(Waldmann灯,辐照度 $0.73\text{mW}/\text{cm}^2$)。

[0146] 然后,将 $100\mu\text{L}$ 悬浮液置于TSA琼脂(BioMérieux,ref 43011)上,然后在 37°C 下在需氧培养条件下孵育。24小时后进行细菌菌落的手动计数。结果表示为CFU(菌落形成单位)相对于未经辐照的对照(代表细菌生存力)的百分比。

[0147] 结果示于下表8中:

[0148] 表8

	化合物	CFU (细菌生存力) %		
		未经辐照	$100\text{ mJ}/\text{cm}^2$	$150\text{ mJ}/\text{cm}^2$
[0149]	未经处理的表皮葡萄球菌	100	77	49
	表皮葡萄球菌 + 1%的榿藤提取物	99	89 (+16%)	73 (+49%)
	表皮葡萄球菌 + 1.5%的榿藤提取物	98	95 (+23%)	89 (+82%)
	表皮葡萄球菌 + 2.5%的榿藤提取物	97	97 (+26%)	94 (+92%)

[0150] 表8中的结果强调了,在UV-B辐照下,本发明所述的榿藤种子提取物能够保护表皮葡萄球菌(皮肤微生物组的主要细菌组分)免于细胞死亡。