

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 24 日 (24.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/252800 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/352 (2006.01) A61K 8/368 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) A61K 8/63 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61K 8/37 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) A23B 7/154 (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01) A23L 3/3481 (2006.01)
A61K 8/365 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/092511

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 24 日 (24.06.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910529625.X 2019年6月19日 (19.06.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 范柳萍(FAN, Liuping); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。于群(YU, Qun); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。李进伟

(LI, Jinwei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING TYROSINASE INHIBITION ACTIVITY

(54) 发明名称: 一种增强酪氨酸酶抑制活性的方法

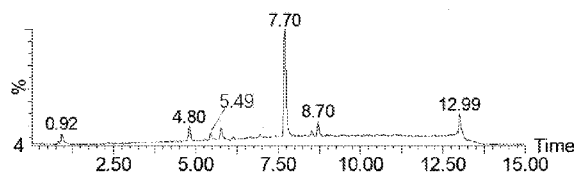


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for improving tyrosinase inhibition activity, which falls within the technical field of the deep processing of fruits and vegetables. In the present invention, a tyrosinase inhibitor is composed of phenolic acids at a concentration of 0.6-1.8 mg/mL and a saponin at a concentration of 0.5-1.5 mg/mL; the phenolic acids are three of quercetin, cinnamic acid, ferulic acid, gallic acid and isorhamnetin; the usage amount ratio of any three components of the phenolic acids is 1 : (1-10) : (1-10); and the saponin includes one of protodioscin, dioscin and sarsasapogenin. In the present invention, the tyrosinase inhibitor is formed by compounding a polyphenol and the saponin, the minimum relative activity of treated tyrosinase can reach 5 percent, and the polyphenol with the three components can generate a synergistic effect; and the saponin can be deglycosylated at a high temperature to generate polyphenol polymers and other substances with a high tyrosinase inhibition function. Therefore, the inhibition effect of the tyrosinase inhibitor on the tyrosinase is greatly improved.

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：本发明公开了一种增强酪氨酸酶抑制活性的方法，属于果蔬精深加工技术领域。本发明以0.6-1.8mg/mL浓度的酚酸和0.5-1.5mg/mL浓度的皂苷组成酪氨酸酶抑制剂；所述酚酸是槲皮素、肉桂酸、阿魏酸、没食子酸、异鼠李素中的三种；酚酸任意三种组分用量比为1：(1-10)：(1-10)；所述皂苷包括原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、菝葜皂苷元中的一种。本发明采用多酚和皂苷复配成酪氨酸酶抑制剂，处理后酪氨酸酶相对活性最低可达5%，且三种组分的多酚可产生协同效应；高温会使得皂苷去糖基化，生成多酚聚合物等高酪氨酸酶抑制作用的物质，因此大大提高了酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用。

一种增强酪氨酸酶抑制活性的方法

技术领域

本发明涉及一种增强酪氨酸酶抑制活性的方法，属于果蔬精深加工技术领域。

背景技术

酪氨酸酶是细菌、真菌、植物、哺乳动物以及人体中黑色素形成的关键限速酶，是导致新鲜果蔬、饮料产生褐变、人体皮肤黑色素产生的原因之一。而酪氨酸酶抑制剂可以通过抑制酪氨酸酶的活性，有效的减少黑色素和食品体系褐变的产生，从而降低因酪氨酸酶产生的不利影响，因此，近年来随着酪氨酸酶抑制剂不断发现，对它的研究开发也日益受到人们重视。酚类物质（槲皮素、阿魏酸、肉桂酸）、皂苷（薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷）是果蔬产品中常见的活性成分，具有抗焦虑、利尿、改善睡眠质量、降血糖、抗肿瘤、改善记忆、抗衰老、降低烦躁和疲劳感等功能，同时它们对美白也具有显著效果。

现有的酪氨酸酶抑制剂根据其来源主要分为动物来源（蚕丝胶、胶原肽等），植物来源（桔梗皂苷、杨梅素、儿茶素、芦荟苷等），微生物来源（葡萄孢菌、曲酸等），化学合成物（维生素 C、超氧化物歧化酶、过氧化氢等）。目前有关酪氨酸酶抑制剂的研究主要集中在单一活性成分对酪氨酸酶活性的影响，其中人工合成化合物副作用较强，而天然活性成分则存在抑制效果不显著的特点。

发明内容

针对上述问题，本发明以槲皮素、肉桂酸和阿魏酸为代表多酚，以原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷为代表皂苷，经过加热处理的方法提高其对酪氨酸酶的抑制作用。

本发明的第一个目的是提供一种增强酪氨酸酶抑制剂活性的方法，通过加热处理的方式提高酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用；所述酪氨酸酶抑制剂由 0.6-1.8 mg/mL 浓度的酚酸和 0.5-1.5 mg/mL 浓度的皂苷组成；所述加热处理条件为：加热温度为 130-170℃，时间为 30-120 min。

本发明的第二个目的是提供一种酪氨酸酶抑制剂，该酪氨酸酶抑制剂由 0.6-1.8 mg/mL 浓度的酚酸和 0.5-1.5 mg/mL 浓度的皂苷组成。

在本发明一种实施方式中，所述酚酸是槲皮素、肉桂酸、阿魏酸、没食子酸、异鼠李素中的三种，包括但不限于以下几种组合：

- (a) 槲皮素，肉桂酸和阿魏酸；
- (b) 槲皮素，没食子酸和阿魏酸；

(c) 槲皮素, 没食子酸和异鼠李素;

(d) 槲皮素, 肉桂酸和异鼠李素;

(e) 槲皮素, 阿魏酸和异鼠李素。

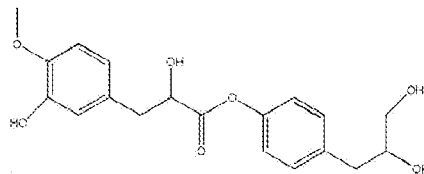
在本发明一种实施方式中, 酚酸任意三种组分用量比为 1: (1-10): (1-10)。

在本发明一种实施方式中, 所述皂苷包括原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、菝葜皂苷元中的一种。

本发明的第三个目的是提供所述酪氨酸酶抑制剂在美容保健、色素型皮肤病的治疗、病虫害防治以及食品保鲜等方面的应用。

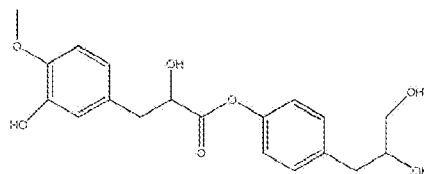
本发明的第四个目的是提供一种含有上述酪氨酸酶抑制剂的组合物。

在本发明一种实施方式中, 所述组合物还包括式 (I) 所示的化合物:



(I)。

本发明的第五个目的是提供一种具有抑制酪氨酸酶活性的化合物, 所述化合物的结构式如式 (I) 所示:



(I)。

本发明的有益效果:

(1) 本发明采用多酚和皂苷复配成酪氨酸酶抑制剂, 处理后酪氨酸酶相对活性最低可达 5%, 且三种组分的多酚可产生协同效应;

(2) 高温会使得皂苷去糖基化, 生成多酚聚合物等高酪氨酸酶抑制作用的物质, 因此大大提高了酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用。

附图说明

图 1 为槲皮素、肉桂酸、阿魏酸混合物加热前液质图;

图 2 为槲皮素、阿魏酸、肉桂酸经 150℃ 加热 30min 后混合物的液质图;

图 3 为新生成物质结构图。

具体实施方式

1、酪氨酸酶活性的测定方法: 采用分光光度法, 用 2.8 mL 2.5 mM L-多巴溶液作为底物,

取处理好的抑制剂溶液 100 μL ，然后加入 100 μL 0.2 mg/mL 的酪氨酸酶溶液在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min 后在 475 nm 下测量其吸光值变化，以未加抑制剂的酪氨酸酶活性记为 100%，计算公式如下：

$$\text{酪氨酸酶相对活性}/\% = (\text{B}_2 - \text{B}_1) / (\text{A}_2 - \text{A}_1) \times 100$$

A_1 和 A_2 表示空白组在 0 min 和 15 min 时的吸光值， B_1 和 B_2 表示样品在 0 min 和 15 min 时的吸光值。

2、相互作用的评价方法：参考 Fan 等（2017, Food&Function）和 Cai 等（2012, Journal of Agricultural and Food Chemistry）等文献，具体方法为：用 2.8 mL 2.5 mM L-多巴溶液作为底物，取不同处理方法和不同配比的抑制剂溶液 100 μL ，然后加入 100 μL 0.2 mg/mL 的酪氨酸酶溶液在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min 后在 475 nm 下测量其吸光值变化。

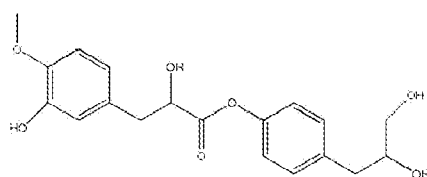
当 Vab (或 Vabc , Vabcd) - $\text{V}^* < -0.1$ 为协同效应(SY); 当 $-0.1 < \text{Vab}$ (或 Vabc , Vabcd) - $\text{V}^* < +0.1$ 为叠加效应(AD); 当 Vab (或 Vabc , Vabcd) - $\text{V}^* > +0.10$ 为次叠加效应(SU)。

实施例 1:

本发明的技术方案包括以下步骤：

- 1)多酚混匀：将槲皮素，肉桂酸和阿魏酸按照 5mM 槲皮素+5mM 肉桂酸+5mM 阿魏酸配比混合；
- 2)皂苷与多酚混匀：将步骤 1)中多酚与浓度为 1.0 mg/mL 的原薯蓣皂苷混合；
- 3)加热：将步骤 2)中的样品溶液在 150 $^{\circ}\text{C}$ 下进行加热处理，时间为 30 min；
- 4)测定其对酪氨酸酶的抑制作用，将上述不同处理后的溶液稀释成不同浓度，通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用，结果见表 1。

由图 1 和 2 可知，在 150 $^{\circ}\text{C}$ 、30min 的加热条件下，新生成了保留时间为 10.11min 的物质，且根据浓度推断，此物质可能是由于阿魏酸经过酯化反应生成的新物质。由图 3 可知，可推测出生成的新物质的结构式如式 (I) 所示：



(I)。

实施例 2:

本发明的技术方案包括以下步骤：

- 1)多酚混匀：将槲皮素，肉桂酸和阿魏酸按照 5mM 槲皮素+0.5mM 肉桂酸+5mM 阿魏酸

配比混合；

2)皂苷与多酚混匀：将步骤 1)中多酚与浓度为 0.5 mg/mL 的原薯蓣皂苷混合；

3)加热：将步骤 2)中的样品溶液在 150℃下进行加热处理，时间为 30 min；

4)测定其对酪氨酸酶的抑制作用，将上述不同处理后的溶液稀释成不同浓度，通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用，结果见表 1。

实施例 3：

本发明的技术方案包括以下步骤：

1)多酚混匀：将槲皮素，没食子酸和阿魏酸按照 5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸+5mM 阿魏酸配比混合；

2)皂苷与多酚混匀：将步骤 1)中多酚与浓度为 1.5 mg/mL 的菝葜皂苷元混合；

3)加热：将步骤 2)中的样品溶液在 130℃下进行加热处理，时间为 30 min；

4)测定其对酪氨酸酶的抑制作用，将上述不同处理后的溶液稀释成不同浓度，通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用，结果见表 1。

实施例 4：

本发明的技术方案包括以下步骤：

1)多酚混匀：将槲皮素，没食子酸和异鼠李素按照 5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸+0.5mM 异鼠李素配比混合；

2)皂苷与多酚混匀：将步骤 1)中多酚与浓度为 1.0 mg/mL 的原薯蓣皂苷混合；

3)加热：将步骤 2)中的样品溶液在 170℃下进行加热处理，时间为 30 min；

4)测定其对酪氨酸酶的抑制作用，将上述不同处理后的溶液稀释成不同浓度，通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用，结果见表 1。

实施例 5：

本发明的技术方案包括以下步骤：

1)多酚混匀：将槲皮素，肉桂酸和异鼠李素按照 5mM 槲皮素+5mM 肉桂酸+0.5mM 异鼠李素配比混合；在本发明一种实施方法中，其特征在于，所述槲皮素，阿魏酸和异鼠李素的用量为 5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸+0.5mM 异鼠李素。

2)皂苷与多酚混匀：将步骤 1)中多酚与浓度为 1.0 mg/mL 的原薯蓣皂苷混合；

3)加热：将步骤 2)中的样品溶液在 150℃下进行加热处理，时间为 30 min；

4)测定其对酪氨酸酶的抑制作用，将上述不同处理后的溶液稀释成不同浓度，通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用，结果见表 1。

实施例 6:

本发明的技术方案包括以下步骤:

- 1)多酚混匀: 将槲皮素, 阿魏酸和异鼠李素按照 5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸+0.5mM 异鼠李素配比混合;
- 2)皂苷与多酚混匀: 将步骤 1)中多酚与浓度为 1.0 mg/mL 的原薯蓣皂苷混合;
- 3)加热: 将步骤 2)中的样品溶液在 150℃下进行加热处理, 时间为 30 min;
- 4)测定其对酪氨酸酶的抑制作用, 将上述不同处理后的溶液稀释成不同浓度, 通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用, 结果见表 1。

表 1 酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的作用效果

酪氨酸酶抑制剂	酪氨酸酶相对活性 (%)	V _{abc}	V* ² (V _a ×V _b ×V _c)	V _{abc} -V* ²
实施例 1	33.62	0.7870	0.9819	-0.195 SY
实施例 2	48.71	0.7739	0.9039	-0.130 SY
实施例 3	40.30	0.8196	0.9605	-0.141 SY
实施例 4	44.23	0.7344	0.8724	-0.138 SY
实施例 5	35.24	0.7252	0.8918	-0.167 SY
实施例 6	35.33	0.7644	0.9467	-0.182 SY

由表 1 可知, 任意三种酚酸复配都能产生协同作用。另外, 采用本发明方法制备的酪氨酸酶抑制剂处理酪氨酸酶, 酪氨酸酶相对活性最低可达 33.62%, 对酪氨酸酶具有较好的抑制效果。

对比例 1: 不同组分的酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制活性的影响

1、采用实施例 1 的方法, 区别在于, 步骤 1)分别按照表 2~4 中的多酚配方将多酚混匀, 其它参数条件同实施例 1, 通过分光光度法测定其对酪氨酸酶的抑制作用, 结果见表 2~4。

由表 2~4 可知, 单一酚酸对酪氨酸酶呈现激活的作用效果, 但当与槲皮素复配后呈现了明显的抑制作用。双组分多酚和四组分多酚组合的抑制剂只能达到叠加效应, 不能实现协同效应。

2、按照实施例 1 的方法, 区别在于, 采用单一酚酸, 即 5 mM 槲皮素、5 mM 肉桂酸、5 mM 阿魏酸、5 mM 没食子酸、5 mM 异鼠李素, 其它参数条件同实施例 1, 测得的酪氨酸酶相对活性 (%) 分别为 80.69%、102.32%、107.56%、97.25%、82.52%。

表 2 双组分多酚组成的酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的作用效果

酪氨酸酶抑制剂	酪氨酸酶相对活性 (%)	Vab	V^{*2} ($V_a \times V_b$)	$V_{ab} - V^{*2}$
5mM 槲皮素 + 5mM 阿魏酸	105.95	1.0595	0.9402	0.119 SU
5mM 槲皮素 + 0.5mM 没食子酸	101.42	1.0142	0.8672	0.147 SU
5mM 槲皮素 + 5mM 没食子酸	109.35	1.0935	0.8213	0.272 SU
5mM 槲皮素 + 0.5mM 肉桂酸	107.65	1.0765	0.8161	0.260 SU
5mM 槲皮素 + 5mM 肉桂酸	98.58	0.9858	0.8865	0.099 AD
5mM 槲皮素 + 0.5mM 异鼠李素	102.55	1.0255	0.8547	0.171 SU

注：SY 为协同效应；AD 为叠加效应；SU 为次叠加效应。

表 3 三组分多酚组成的酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的作用效果

酪氨酸酶抑制剂	酪氨酸酶相对活性 (%)	Vabc	V^{*2} ($V_a \times V_b \times V_c$)	$V_{abc} - V^{*2}$
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸+5mM 阿魏酸	83.26	0.8326	0.9097	-0.077 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸+0.5mM 肉桂酸	88.26	0.8826	0.8330	0.050 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸+5mM 肉桂酸	83.70	0.8370	0.9048	-0.068 AD
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸+0.5mM 肉桂酸	89.35	0.8935	0.7889	0.105 SU
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸+5mM 肉桂酸	76.30	0.7630	0.8570	-0.094 AD
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸+5mM 异鼠李素	75.06	0.7506	0.6764	0.074 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸+5mM 异鼠李素	67.90	0.6790	0.7142	-0.035 AD
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸+0.5mM 异鼠李素	82.45	0.8245	0.8262	-0.002 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 肉桂酸+0.5mM 异鼠李素	79.21	0.7921	0.8210	-0.029 AD
5mM 槲皮素+5mM 肉桂酸+5mM 异鼠李素	67.90	0.6790	0.7301	-0.051 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 肉桂酸+5mM 异鼠李素	70.21	0.7021	0.6722	0.030 AD
5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸+5mM 异鼠李素	69.05	0.6905	0.7750	-0.084 AD

注：SY 为协同效应；AD 为叠加效应；SU 为次叠加效应。

表 4 四组分多酚组成的酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的作用效果

酪氨酸酶抑制剂	酪氨酸酶相对活性 (%)	Vabcd	V^{*3} ($V_a \times V_b \times V_c \times V_d$)	$V_{abcd}-V^{*3}$
5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸 +0.5mM 没食子酸+0.5mM 肉桂酸	89.47	0.8947	0.9227	-0.028 AD
5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸+5mM 没食子+5mM 肉桂酸	98.89	0.9889	0.9492	0.040 AD
5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸 +0.5mM 没食子酸+5mM 肉桂酸	91.69	0.9169	1.0022	-0.085 AD
5mM 槲皮素+5mM 阿魏酸+5mM 没食子酸+0.5mM 肉桂酸	99.17	0.9917	0.8738	0.118 SU
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸 +0.5mM 肉桂酸+0.5mM 异鼠李素	87.26	0.8726	0.8380	0.035 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸 +0.5mM 肉桂酸+5mM 异鼠李素	81.72	0.8172	0.6861	0.131 SU
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸 +5mM 肉桂酸+0.5mM 异鼠李素	86.70	0.8670	0.9103	-0.043 AD
5mM 槲皮素+0.5mM 没食子酸 +5mM 肉桂酸+5mM 异鼠李素	81.16	0.8116	0.7452	0.066 AD
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸 +0.5mM 肉桂酸+0.5mM 异鼠李素	91.41	0.9141	0.7937	0.120 SU
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸 +0.5mM 肉桂酸+5mM 异鼠李素	84.21	0.8421	0.6498	0.192 SU
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸 +5mM 肉桂酸+0.5mM 异鼠李素	92.80	0.9280	0.8621	0.066 AD
5mM 槲皮素+5mM 没食子酸 +5mM 肉桂酸+5mM 异鼠李素	83.93	0.8393	0.7058	0.134 SU

注：SY 为协同效应；AD 为叠加效应；SU 为次叠加效应。

对比例 2：加热处理对酪氨酸酶抑制剂抑制酪氨酸酶活性的影响

1、按照实施例 1 的方法，区别在于，不进行加热处理，其它参数条件同实施例 1，测得的酪氨酸酶相对活性为 78.82%，而加热处理后酪氨酸酶相对活性为 33.62%（实施例 1），说明加热处理有利于酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用。

2、按照实施例 1 的方法，区别在于，将加热温度设置为 100℃，其它参数条件同实施例 1，测得的酪氨酸酶相对活性为 70.56%，而采用 150℃加热处理后酪氨酸酶相对活性为 33.62%（实施例 1），说明温度过低会影响酪氨酸酶抑制剂的作用。

3、按照实施例 1 的方法，区别在于，将加热温度设置为 200℃，其它参数条件同实施例 1，测得的酪氨酸酶相对活性为 65.78%，而采用 150℃加热处理后酪氨酸酶相对活性为 33.62%（实施例 1），说明温度过高会影响酪氨酸酶抑制剂的作用。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一种增强酪氨酸酶抑制剂活性的方法，其特征在于，通过加热处理的方式提高酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用；所述酪氨酸酶抑制剂由 0.6-1.8 mg/mL 浓度的酚酸和 0.5-1.5 mg/mL 浓度的皂苷组成；所述加热处理条件为：加热温度为 130-170℃，时间为 30-120 min。

2、一种酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，该酪氨酸酶抑制剂由 0.6-1.8 mg/mL 浓度的酚酸和 0.5-1.5 mg/mL 浓度的皂苷组成。

3、根据权利要求 2 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，所述酚酸由槲皮素、肉桂酸、阿魏酸、异鼠李素、没食子酸中的任意三种组成。

4、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，所述酚酸包括但不限于以下几种组合：

- (a) 槲皮素，肉桂酸和阿魏酸；
- (b) 槲皮素，没食子酸和阿魏酸；
- (c) 槲皮素，没食子酸和异鼠李素；
- (d) 槲皮素，肉桂酸和异鼠李素；
- (e) 槲皮素，阿魏酸和异鼠李素。

5、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸任意三种组分用量比为 1：(1-10)：(1-10)。

6、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸由 5mM 槲皮素、5mM 肉桂酸和 5mM 阿魏酸组成。

7、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸由 5mM 槲皮素、0.5mM 肉桂酸和 5mM 阿魏酸组成。

8、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸由 5mM 槲皮素、0.5mM 没食子酸和 5mM 阿魏酸组成。

9、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸由 5mM 槲皮素、0.5mM 没食子酸和 0.5mM 异鼠李素组成。

10、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸由 5mM 槲皮素、5mM 肉桂酸和 0.5mM 异鼠李素组成。

11、根据权利要求 3 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，酚酸由 5mM 槲皮素、5mM 阿魏酸和 0.5mM 异鼠李素组成。

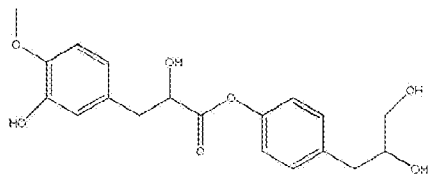
12、根据权利要求 2 所述的酪氨酸酶抑制剂，其特征在于，所述皂苷是原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、菝葜皂苷元中的一种。

13、权利要求 2 所述的酪氨酸酶抑制剂在美容保健、色素型皮肤病的治疗、病虫害防治

以及食品保鲜等方面的应用。

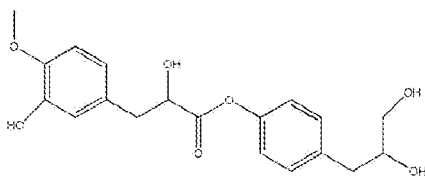
14、含权利要求 2 所述的酪氨酸酶抑制剂的组合物。

15、根据权利要求 14 所述的组合物，其特征在于，所述组合物还包括式 1 所示的化合物：



(I)。

16、一种具有抑制酪氨酸酶活性的化合物，其特征在于，所述化合物的结构式如式 (I) 所示：



(I)。

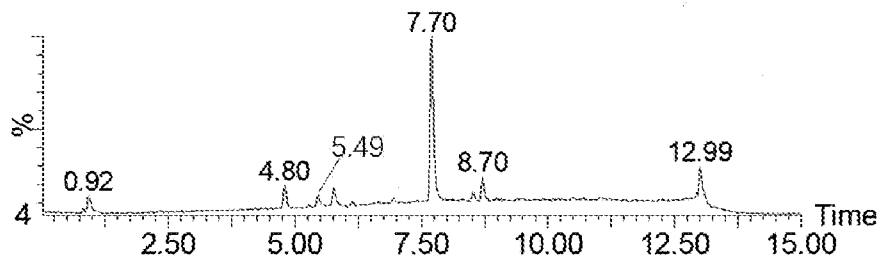


图 1

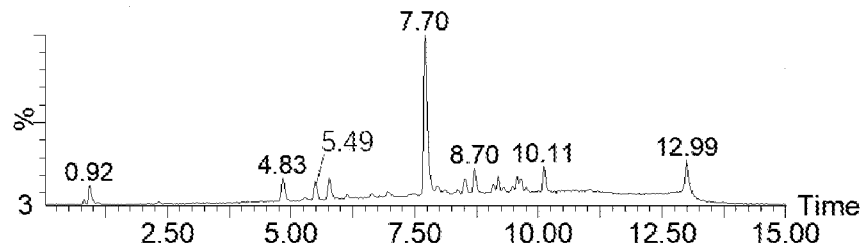


图 2

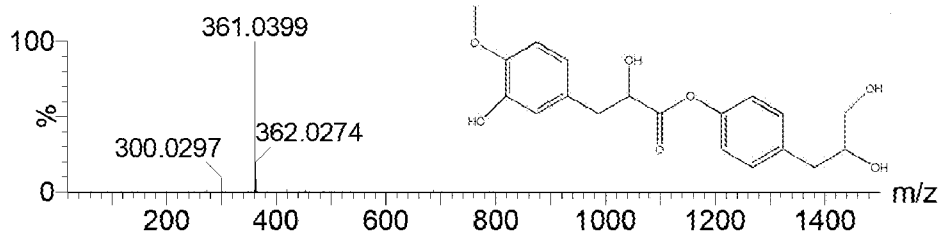


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/092511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352(2006.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 31/58(2006.01)i; A61K 31/216(2006.01)i; A61K 8/49(2006.01)i; A61K 8/36(2006.01)i; A61K 8/365(2006.01)i; A61K 8/368(2006.01)i; A61K 8/63(2006.01)i; A61K 8/37(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61Q 19/02(2006.01)i; A23B 7/154(2006.01)i; A23L 3/3481(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P; A61Q; A23B; A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, CNABS(CN), CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI(CN), ISI-WEB OF SCIENCE, REGISTRY, CAPLUS: 槲皮素, Quercetin, 肉桂酸, CINNAMIC ACID, 没食子酸, Gallic acid, 阿魏酸, Ferulic acid, 异鼠李素, Isorhamnetin, 原薯蓣皂苷, protodioscin, Dioscin, 薯蓣皂苷, 菝葜皂苷元, Sarsasapogenin, Tyrosinase, 酪氨酸酶 et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Qun Yua et al., "Five individual polyphenols as tyrosinase inhibitors: Inhibitory activity, synergistic effect, action mechanism, and molecular docking." <i>Food Chemistry</i> , Vol. 297, 27 May 2019 (2019-05-27), 124910, see pages 1-10, in particular abstract, sections 1 and 4, table 1	2-14
Y	Chun Liang et al., "Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china." <i>Food Chemistry</i> , Vol. 134, 07 March 2012 (2012-03-07), see pages 1146-1148, in particular abstract	2-14
A	张伟等 (ZHANG, Wei et al.), "高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响 (Effect of high-temperature heat treatment of Psoralea corylifolia on the activity of Tyrosinase)" <i>中国实验方剂学杂志 (Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae)</i> , Vol. 20, No. 3, 28 February 2014 (2014-02-28), pp. 845-849	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 March 2020

Date of mailing of the international search report

19 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/092511

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Methods for treatment of the human or animal body (PCT Article 17(2)(a) and Rule 39.1(iv)). The examiner has still performed a search on the basis that the subject matter of claim 13 is amended to “a use of the tyrosinase inhibitor of claim 2 in preparing a drug which treats a pigment-type skin disease”.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/092511

A. 主题的分类 A61K 31/352(2006.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 31/58(2006.01)i; A61K 31/216(2006.01)i; A61K 8/49(2006.01)i; A61K 8/36(2006.01)i; A61K 8/365(2006.01)i; A61K 8/368(2006.01)i; A61K 8/63(2006.01)i; A61K 8/37(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61Q 19/02(2006.01)i; A23B 7/154(2006.01)i; A23L 3/3481(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类														
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; A61P; A61Q; A23B; A23L 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, CNABS(CN), CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI(CN), ISI-WEB OF SCIENCE, REGISTRY, CAPLUS: 槲皮素, Quercetin, 肉桂酸, CINNAMIC ACID, 没食子酸, Gallic acid, 阿魏酸, Ferulic acid, 异鼠李素, Isorhamnetin, 原薯蓣皂苷, protodioscin, Dioscin, 薯蓣皂苷, 菝葜皂苷元, Sarsasapogenin, Tyrosinase, 酪氨酸酶 等														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>Qun Yua 等, . "Five individual polyphenols as tyrosinase inhibitors: Inhi- bitory activity, synergistic effect, action mechanism, and molecular do- cking." Food Chemistry, 第297卷, 2019年 5月 27日 (2019 - 05 - 27), 124910, 见第1-10页, 尤其是摘要, 第1和4节, 表1</td> <td>2-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Chun Liang 等, . "Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china." Food Chemistry, 第134卷, 2012年 3月 7日 (2012 - 03 - 07), 见第1146 - 1148页, 尤其是摘要</td> <td>2-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>张伟 等, . "高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响." 中国实验方剂学杂志., 第20卷, 第3期, 2014年 2月 28日 (2014 - 02 - 28), 第845-849页</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	Qun Yua 等, . "Five individual polyphenols as tyrosinase inhibitors: Inhi- bitory activity, synergistic effect, action mechanism, and molecular do- cking." Food Chemistry, 第297卷, 2019年 5月 27日 (2019 - 05 - 27), 124910, 见第1-10页, 尤其是摘要, 第1和4节, 表1	2-14	Y	Chun Liang 等, . "Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china." Food Chemistry, 第134卷, 2012年 3月 7日 (2012 - 03 - 07), 见第1146 - 1148页, 尤其是摘要	2-14	A	张伟 等, . "高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响." 中国实验方剂学杂志., 第20卷, 第3期, 2014年 2月 28日 (2014 - 02 - 28), 第845-849页	1-16
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
Y	Qun Yua 等, . "Five individual polyphenols as tyrosinase inhibitors: Inhi- bitory activity, synergistic effect, action mechanism, and molecular do- cking." Food Chemistry, 第297卷, 2019年 5月 27日 (2019 - 05 - 27), 124910, 见第1-10页, 尤其是摘要, 第1和4节, 表1	2-14												
Y	Chun Liang 等, . "Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china." Food Chemistry, 第134卷, 2012年 3月 7日 (2012 - 03 - 07), 见第1146 - 1148页, 尤其是摘要	2-14												
A	张伟 等, . "高温处理补骨脂对酪氨酸酶活性的影响." 中国实验方剂学杂志., 第20卷, 第3期, 2014年 2月 28日 (2014 - 02 - 28), 第845-849页	1-16												
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☐ 见同族专利附件。														
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的 公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体 说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解 发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是 新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并 且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发 明不具有创造性 "&" 同族专利的文件														
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期												
2020年 3月 9日		2020年 3月 19日												
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员												
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		肖瑛												
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(010)-62089320												

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 13
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 治疗人体或者动物体的方法（专利合作条约17（2）（a）（i）以及细则39.1（iv））。但审查员还是针对如果权利要求13的主题被修改为“权利要求2所述的酪氨酸酶抑制剂在制备用于治疗色素型皮肤病的药物中的用途”而进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。