



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102740869 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201080063299. 5

(72) 发明人 韩泰准 朴真喜

(22) 申请日 2010. 09. 08

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

(30) 优先权数据

10-2010-0011456 2010. 02. 08 KR

代理人 倪小敏

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 07

(51) Int. Cl.

A61K 36/04 (2006. 01)

A61P 17/00 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2010/006099 2010. 09. 08

审查员 王知非

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/096628 KO 2011. 08. 11

(73) 专利权人 仁川大学校产学协力团

地址 韩国仁川广域市

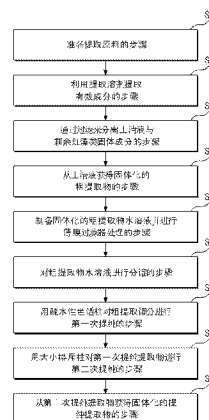
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

由红藻类制备无毒性紫外线屏蔽用提取物的方法及利用该方法的无毒性紫外线屏蔽剂

(57) 摘要

本发明提供一种无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,该方法包括:步骤(a),准备好从紫菜或角叉菜中选择的一种以上红藻类;步骤(b),在上述准备好的红藻类中添加碳原子数为1至5的酒精与水的体积比为1:9至9:1的混合溶剂,在30℃~60℃的温度保持以提取有效成分;以及步骤(c),对包含上述有效成分及剩余红藻类固体成分的混合溶剂进行过滤来分离为上清液与剩余红藻类固体成分。本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,由于使用紫菜或角叉菜作为提取原料,因此,含有类菌胞素氨基酸的紫外线屏蔽用提取物的产出率相对地明显高于从其他绿藻类、褐藻类及红藻类植物中提取的产出率。并且,从紫菜或角叉菜中提取的紫外线屏蔽用提取物,由于其光毒性和细胞毒性非常低,不会对皮肤造成厚重感甚至由残留物导致的异物感,同时还可用作没有对刺激性皮炎、接触性皮炎、光过敏性皮炎或光毒性皮炎等皮肤刺激或过敏反应以及毒性等副作用的紫外线屏蔽剂的主要成分。



1. 一种无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,包括:
步骤(a),准备好从紫菜或角叉菜中选择的一种以上红藻类;
步骤(b),在上述准备好的红藻类中添加碳原子数为1至5的醇与水的体积比为1:9至9:1的混合溶剂,在30℃~60℃的温度保持以提取有效成分;以及
步骤(c),对包含上述有效成分及剩余红藻类固体成分的混合溶剂进行过滤来分离为上清液与剩余红藻类固体成分。
2. 根据权利要求1所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,上述步骤(a)的红藻类被粗碎。
3. 根据权利要求1所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括使用上述步骤(c)的剩余红藻类固体成分,反复进行一次至三次步骤(b)及步骤(c)的步骤。
4. 根据权利要求1所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括步骤(d),在该步骤(d)中,使上述分离出的上清液通过薄膜过滤器,来去除杂质。
5. 根据权利要求1所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括步骤(e),在该步骤(e)中,对上述分离出的上清液进行浓缩和干燥,来获得固体化的粗提取物。
6. 根据权利要求5所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括:
步骤(f),使上述固体化的粗提取物溶解于水并通过薄膜过滤器,来去除杂质;以及
步骤(g),使上述去除杂质后的粗提取物水溶液以水和碳原子数为1至5的醇的浓度梯度展开,来获得吸收280nm~400nm的紫外线波长的粗提取馏分。
7. 根据权利要求6所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括步骤(h),在该步骤(h)中,使上述粗提取馏分通过疏水性色谱柱,来获得第一次提纯提取物。
8. 根据权利要求7所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,上述疏水性色谱柱的硅胶的表面结合有从疏水性烷基、疏水性芳基、疏水性氰基及疏水性胺基构成的组中选择一个疏水性官能团。
9. 根据权利要求7所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括步骤(i),在该步骤(i)中,使上述第一次提纯提取物通过大小排斥柱,来获得第二次提纯提取物。
10. 根据权利要求9所述的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其特征在于,还包括步骤(j),在该步骤(j)中,对上述二次提纯提取物进行浓缩和干燥,来获得固体化的提纯提取物。
11. 一种无毒性紫外线屏蔽剂,其特征在于,包含通过如权利要求1至10中任一项所述的制备方法制备的无毒性紫外线屏蔽用提取物。
12. 根据权利要求11所述的无毒性紫外线屏蔽剂,其特征在于,上述无毒性紫外线屏蔽用提取物含有类菌胞素氨基酸作为有效成分。
13. 根据权利要求12所述的无毒性紫外线屏蔽剂,其特征在于,上述无毒性紫外线屏蔽用提取物包含帕里叮、海燕属-330及施诺琳作为类菌胞素氨基酸。

14. 根据权利要求 13 所述的无毒性紫外线屏蔽剂,其特征在于,上述无毒性紫外线屏蔽用提取物还包含紫菜属 -334 作为类菌胞素氨基酸。

由红藻类制备无毒性紫外线屏蔽用提取物的方法及利用该方法的无毒性紫外线屏蔽剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种由红藻类制备无毒性紫外线屏蔽用提取物的方法及利用上述提取物的无毒性紫外线屏蔽剂,更具体地涉及一种由红藻类中类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)含量相对高的紫菜或角叉菜制备无毒性紫外线屏蔽用提取物的方法以及利用上述无毒性紫外线屏蔽用提取物的紫外线吸收特性的无毒性紫外线屏蔽剂。

背景技术

[0002] 太阳紫外线不仅会引起以红斑为代表的急性皮肤反应,而且长时间暴露于太阳紫外线环境时,将引发皮肤老化和皮肤癌。到达地表上的太阳光线中包含的紫外线(Ultraviolet Ray, UV ray)根据波长大致划分为两个区域,分为长波 UV-A (320nm-400nm)和中波 UV-B (280nm-320nm)。

[0003] 其中,当能量相对大的 UV-B 被皮肤层吸收时,将引发急性皮肤脱落、DNA 变异或致癌。

[0004] 另一方面,据有关报告内容,UV-A 的能量虽然小于 UV-B,但相比 UV-B,可渗透至皮肤更深层,引起早期皮肤老化现象,而且它将导致生成活性氧或者引发 IL-1 β 和 TNF- α 等炎症症状,最终引起基因表达的变化,UV-A 将激活 NF- κ B 和 AP-1 等转录因子。因 UV-A 激活转录因子,将引发称为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP's)的一系列胶原蛋白溶解酶和弹力蛋白溶解酶,由此导致的胶原蛋白量的减少和纤维素的分段现象最终将引发典型的光老化现象。并且,UV-A 很容易被作为皮肤色素体的尿刊酸(urocanic acid)或 DNA 等吸收,最终生成活性氧,与蛋白质和脂类等重要分子产生反应,从而破坏重要的生命分子或导致其丧失功能。

[0005] UV-B 的量随着不同季节、同一天的不同时间、云量、纬度等发生变化,而 UV-A 则是常年以比较恒定量到达地表上,因此,要想实现持续的皮肤护理,应更多地保护皮肤远离 UV-A。为了保护皮肤免受紫外线的破坏而使用的紫外线屏蔽剂(Sunscreen)大致划分为无机粒子形态和有机化合物形态。无机粒子形态的紫外线屏蔽剂包括作为超微矿物粒子的氧化锌、二氧化钛、二氧化铁等类型的无机粒子,上述无机粒子粘附于皮肤表面,起到反射太阳光线(紫外线)的屏障作用。无机粒子形态的紫外线屏蔽剂可保持皮肤的清凉,防御自然的太阳光线(紫外线),而且不会被皮肤吸收,因此,不会造成皮肤问题,但它会对皮肤造成厚重感,而且在皮肤上留下残留物。另一方面,有机化合物形态的紫外线屏蔽剂包含聚硅氧烷-15 (Dimethico-diethylbenzalmalonate, Parsol)、苯甲酮(Sodium Dihydroxy Dimethoxy Disulfobenzophenone)、对氨基苯酸(p-Aminobenzoic acid, PABA)等紫外线吸收性非常好的活性合成化合物,可阻挡 UV-A 渗透至皮肤深层并在胶原蛋白纤维或其他组织中引起老化的现象和由 UV-B 引起晒斑(Sunburn)或皮肤癌等现象,但容易引起皮炎或过敏,容易被溶解或生成活性氧。最近有报告还称,上述有机化合物可能引起包括内分泌系统

障碍的副作用。

[0006] 因此,迫切需要开发一种不会对皮肤造成厚重感和因残留物导致的异物感,同时不会导致刺激性皮炎、接触性皮炎、光过敏性皮炎或光毒性皮炎等皮肤刺激或过敏反应以及毒性等副作用的紫外线屏蔽剂用天然素材。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明是为了解决上述的问题而提出的,本发明的一个目的是提供一种无光毒性或细胞毒性等并且因具有出色的紫外线吸收能力而能够作为紫外线屏蔽剂的主要成分使用的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法。

[0009] 并且,本发明的再一个目的是提供一种利用无毒性紫外线屏蔽用提取物的无毒性紫外线屏蔽剂。

[0010] 解决问题的手段

[0011] 本发明的发明人经无数次实验发现,从红藻类中的紫菜和角叉菜中提取包含被认为是 UV-A 屏蔽物质的类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids,MAA)的紫外线屏蔽用提取物时,相比从其他绿藻类、褐藻类及红藻类植物提取的情况,具有更高的产出率,还发现从上述紫菜和角叉菜中提取的紫外线屏蔽用提取物的光毒性及细胞毒性非常低,由此完成了本发明。

[0012] 为了达到本发明的一个目的,本发明提供一种无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,其包括:步骤(a),准备好从紫菜或角叉菜中选择的一种以上红藻类;步骤(b),在上述准备好的红藻类中添加碳原子数为 1 至 5 的酒精与水的体积比为 1:9 至 9:1 的混合溶剂,在 30℃~60℃ 的温度保持以提取有效成分;以及步骤(c),对包含上述有效成分及剩余红藻类固体成分的混合溶剂进行过滤来分离为上清液与剩余红藻类固体成分。

[0013] 优选地,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步骤(d),在该步骤(d)中,使上述分离出的上清液通过薄膜过滤器,来去除杂质。

[0014] 并且,优选地,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步骤(e),在该步骤(e)中,对上述分离出的上清液或去除杂质后的上清液进行浓缩和干燥,来获得固体化的粗提取物。

[0015] 并且,优选地,在上述固体化的粗提取物未经薄膜过滤器去除杂质的情况下,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步骤(f),在该步骤(f)中,使上述固体化的粗提取物溶解于水并通过薄膜过滤器,来去除杂质。

[0016] 并且,优选地,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步骤(g),在该步骤(g)中,使通过上述步骤(f)去除杂质后的粗提取物水溶液以水和碳原子数为 1 至 5 的酒精的浓度梯度展开,来获得吸收 280nm~400nm 的紫外线波长的粗提取馏分。此时,为了测量是否吸收紫外线波长,可使用紫外检测器(UV detector),还可补充使用折射率(refractive index,RI)。

[0017] 并且,优选地,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步骤(h),在该步骤(h)中,使上述粗提取馏分通过疏水性色谱柱,来获得第一次提纯提取物。

[0018] 并且,优选地,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步

骤(i),在该步骤(i)中,使上述第一次提纯提取物通过大小排斥柱(Size Exclusion Column),来获得第二次提纯提取物。

[0019] 并且,优选地,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可包括步骤(j),在该步骤(j)中,对上述二次提纯提取物进行浓缩和干燥,来获得固体化的提纯提取物。

[0020] 为了达到本发明的再一个目的,本发明提供一种包含通过上述制备方法制备的无毒性紫外线屏蔽用提取物的无毒性紫外线屏蔽剂。此时,紫外线屏蔽用提取物含有类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)作为有效成分,所含类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)的种类有帕里叮(Palythine)、海燕属-330(Asterina-330)及施诺啉(Shinorine),还补充包含紫菜属-334(Porphyra-334)。由于类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)具有环己酮(cyclohexanone)或环己胺(cyclohexenimine)色素体结构,因此,很好地吸收UV-A(320nm~400nm)区域的紫外线,其吸光系数与人造紫外线屏蔽剂(Sunscreen)的吸光系数相似。

[0021] 发明的效果

[0022] 本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法,由于使用紫菜或角叉菜作为提取原料,因此,含有类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)的紫外线屏蔽用提取物的产出率相对地明显高于从其他绿藻类、褐藻类及红藻类植物中提取时的产出率。并且,从紫菜或角叉菜中提取的紫外线屏蔽用提取物,由于其光毒性和细胞毒性非常低,不会对皮肤造成厚重感甚至由残留物导致的异物感,同时还可用作没有刺激性皮炎、接触性皮炎、光过敏性皮炎或光毒性皮炎等皮肤刺激或过敏反应以及毒性等副作用的紫外线屏蔽剂的主要成分。

附图说明

[0023] 图1表示本发明的一优选实施例的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法的流程。

[0024] 图2为表示根据利用人类红血细胞的光溶血试验法得出的从紫菜中提取的无毒性紫外线屏蔽用粗提取物(PE)和第二次提纯提取物(P7)的光毒性结果的曲线图。

[0025] 图3为表示从紫菜中提取的无毒性紫外线屏蔽用粗提取物(PE)的浓度为500 μ g/ml时的、由利用人类红血细胞的光溶血试验法得出的光毒性结果的照片。

[0026] 图4为表示从紫菜中提取的无毒性紫外线屏蔽用第二次提纯提取物(P7)的浓度为250 μ g/ml时的、由利用人类红血细胞的光溶血试验法得出的光毒性结果的照片。

具体实施方式

[0027] 本发明的一实施方式涉及一种无光毒性或细胞毒性等且因紫外线吸收能力出色而能够作为紫外线屏蔽剂的主要成分的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法。下面,将参照图1,分步骤说明本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法。但图1表示一优选实施例的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法的流程,本发明的技术思想并不因此受到限定或限制,显然能够由本发明所属技术领域的普通技术人员进行各种变形并实施。

[0028] 准备提取原料的步骤S1

[0029] 使用从紫菜(Porphyra)或角叉菜(Chondrus)中选择的一种以上作为提取原料。紫菜或角叉菜是红藻类(Rhodophyta)植物的一种,根据本发明人的研究,含有类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)的紫外线屏蔽用提取物的产出率相对地明显高于从其他绿藻类、褐藻类及红藻类植物中提取时的产出率。

[0030] 优选地,使用干燥的紫菜或角叉菜,更优选地,使用粗碎的紫菜或角叉菜。粗碎的紫菜或角叉菜,由于表面积非常大,可提高在提取溶剂作用下的提取速度及提取产出率。紫菜或角叉菜可通过乳钵(研钵)或粉碎装置等完成粗碎。

[0031] 利用提取溶剂提取有效成分的步骤 S2

[0032] 在粗碎的紫菜或角叉菜等红藻类中添加提取溶剂,保持规定温度以提取有效成分。此时,使用水、酒精或者水与酒精的混合溶剂作为提取溶剂,优选地,使用酒精与水的体积比为 1:9 至 9:1 的混合溶剂,更优选地,使用酒精与水的体积比为 4:1 的混合溶剂。酒精与水的体积比小于 1:9 的情况下,酒精含量过少,导致提取速度及提取产出率降低;而酒精与水的体积比大于 9:1 的情况下,酒精含量的增加带来的提取速度及提取产出率的增加率不高,导致经济性降低,酒精与水的体积比为 4:1 的情况下,提取速度、提取产出率及经济性表现最佳。

[0033] 酒精使用碳原子数为 1 至 5 的酒精,优选地使用甲醇或乙醇,更优选地使用甲醇。使用甲醇的情况下,其提取速度及提取产出率高于其他酒精。

[0034] 提取温度的范围不受到很大限制,优选地约为 30℃~60℃。提取温度小于 30℃的情况下,提取速度及提取产出率过低;提取温度超过 60℃的情况下,导致部分酒精气化,而无法用于提取。

[0035] 通过过滤来分离上清液与剩余红藻类固体成分的步骤 S3

[0036] 利用提取溶剂提取完有效成分后,对包含有效成分及剩余红藻类固体成分的混合溶剂进行过滤,来分离为上清液与剩余红藻类固体成分。关于用于过滤的过滤材料,只要能够有效分离上清液与剩余红藻类固体成分,则其种类不受到很大限制,具体可使用过滤纸(Filter paper)或过滤布等,气孔大小约在 0.1 μm ~ 0.005mm 范围内。

[0037] 另一方面,完成第一次提取后,通过过滤而分离出的剩余红藻类固体成分中存在未提取的类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)等有效成分,为了提高最终提取产出率,将上述剩余红藻类固体成分添加至混合溶剂,反复进行一次至三次提取后通过过滤来分离上清液与剩余红藻类固体成分的过程。

[0038] 并且,虽然未在图 1 中表示,但本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物的制备方法还可选择性地包含使分离出的上清液通过薄膜过滤器(Membrane filter)来去除杂质的步骤。薄膜过滤器是具有纳米大小的气孔(约小于 100nm)的膜,起到一种从上清液去除包含在过滤上清液中的杂质或污染物质等的作用。

[0039] 从上清液获得固体化的粗提取物的步骤 S4

[0040] 对经过过滤分离或薄膜过滤器处理后的上清液进行浓缩及干燥过程来实现固体化,从而获得粗提取物。

[0041] 优选地,上清液的浓缩采用减压浓缩方法,上清液的干燥采用冻结干燥方法。在采用减压浓缩方法的情况下,在低温条件下可容易使提取溶剂蒸发,采用冻结干燥方法的情况下,由于在低温条件下提取物实现固体化,因而能够防止提取物的有效成分在热作用下

改性。

[0042] 制备固体化的粗提取物水溶液并进行薄膜过滤器处理的步骤 S5

[0043] 将固体化的粗提取物溶解于水,来制备粗提取物水溶液。另一方面,在粗提取物水溶液的粗提取物在其制备过程中未经薄膜过滤器处理的情况下,使粗提取物水溶液通过薄膜过滤器来去除杂质等。去除杂质后的粗提取物水溶液经过后述的分馏及提纯步骤。并且,虽未在图 1 中图示,但通过过滤来分离上清液与剩余红藻类固体成分的步骤 S3 中,经过滤及薄膜过滤器处理后的上清液也可进行后述的分馏及提纯处理。

[0044] 对粗提取物水溶液进行分馏的步骤 S6

[0045] 使去除杂质后的粗提取物水溶液或在通过过滤来分离上清液与剩余红藻类固体成分的步骤 S3 中经过滤及薄膜过滤器处理后的上清液,以水和酒精的浓度梯度展开,从展开的粗提取物水溶液中,获得吸收 280nm ~ 400nm 的紫外线波长的粗提取馏分。此时,酒精使用碳原子数为 1 至 5 的酒精,优选地使用甲醇。关于水-酒精浓度梯度的展开,具体例子可以例举依次展开水、50 体积 % 的酒精水溶液的方法。另一方面,为了测量展开的粗提取物水溶液或上清液中吸收 80nm ~ 400nm 的紫外线波长的分馏部分,使用紫外检测器(UV detector),还可补充使用折射率(refractive index, RI)。

[0046] 用疏水性色谱柱对粗提取馏分进行第一次提纯的步骤 S7

[0047] 使所搜集的粗提取馏分通过疏水性色谱柱,来获得第一次提纯提取物。此时,使用的疏水性色谱柱其类型不受限制,具体而言,在由琼脂糖胶(agarose gel)、硅胶或有机高分子树脂形成的基体粒子的表面结合有从疏水性烷基、疏水性芳基、疏水性氰基及疏水性胺基构成的组中选择一个疏水性官能团。疏水性烷基有丁基、辛基、十八烷基等;疏水性芳基有苯基乙基;疏水性氰基有氰基丙基;疏水性胺基有氨基丙基。并且,优选地,本发明使用的疏水性色谱柱的硅胶表面结合有从疏水性烷基、疏水性芳基、疏水性氰基及疏水性胺基构成的组中选择一个疏水性官能团,作为这种疏水性色谱柱,市面上有日本资生堂公司的 CAPCELL PAK C8、CAPCELL PAK C18 等。其中,CAPCELL PAK C18 是在胶囊类型的硅胶的表面蒸镀(vacuum evaporation)硅(Silicone)高分子来形成单层,在单层的表面结合十八烷基。尤其,在本发明中,使用 CAPCELL PAK C18 UG120 作为疏水性色谱柱的情况下,流动相(mobile phase)则使用醋酸水溶液。

[0048] 用大小排斥柱对第一次提纯提取物进行第二次提纯的步骤 S8

[0049] 使第一次提纯提取物通过大小排斥柱(Size Exclusion Column),来获得第二次提纯提取物。此时,使用的大小排斥柱若可用于水溶性系统,则其类型不受很大限制,具体地可以是资生堂公司的二氧化硅基水溶系列大小排斥柱(KW-800 系列、KW-400 系列)、多羟甲基丙烯酸酯(Polyhydroxy Methacrylate)基的大小排斥柱(OHPak 系列)等。

[0050] 从第二次提纯提取物获得固体化的提纯提取物的步骤 S9

[0051] 对第二次提纯提取物进行浓缩和干燥,来获得固体化的提纯提取物。特征在于,优选地,第二次提纯提取物的浓缩采用减压浓缩方法,干燥则采用冻结干燥方法。采用减压浓缩方法的情况下,在低温条件下可容易使水等溶剂蒸发,采用冻结干燥方法的情况下,由于在低温条件下提纯提取物实现固体化,因而能够防止提纯提取物的有效成分在热作用下改性。

[0052] 本发明的再一实施方式涉及一种利用通过本发明的制备方法制备的无毒性紫外

线屏蔽用提取物的无毒性紫外线屏蔽剂。

[0053] 本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物含有类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids,MAA) 作为有效成分,含有帕里叮(Palythine)、海燕属-330 (Asterina-330) 及施诺啉(Shinorine) 作为类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids,MAA),选择性地还含有紫菜属-334(Porphyra-334),因而 UV-A 吸收性能出色。并且,本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物(尤其是第二次提纯提取物)的光毒性或细胞毒性非常低,可用作无毒性紫外线屏蔽剂的主要成分。

[0054] 有关紫外线屏蔽剂的具体组成,包含约 0.05 ~ 10 重量%的本发明的无毒性紫外线屏蔽用提取物、约 5 ~ 40 重量%的乳状介质、约 1 ~ 10 重量%的乳化剂、微量的辅助剂以及余量的水等水状介质作为活性成分。

[0055] 乳状介质有链烷烃(paraffin)或矿物油等碳氢油、石蜡(paraffin wax)、天然油、硅油、棕榈酸异丙酯等脂肪酸酯、硬脂醇等脂肪醇等,乳状介质构成“油中水”(water in oil)或“水中油”(oil in water)状态的乳状成分。

[0056] 乳化剂(Emulsifier)有山梨醇酯(Sorbitan ester,商标名 SPAN)、乙氧基化山梨醇酯(Ethoxylated Sorbitan ester,商标名 Tween)、硅多元醇(Silicone Polyol)、硬脂酸钾、乙氧基化脂肪酸酯等。

[0057] 辅助剂有通常包含在紫外线屏蔽剂中的润滑剂(Emolient)、保湿剂、抗氧化剂、乳化稳定剂、增粘剂、防腐剂、芳香剂、着色剂等。

[0058] 以下,通过具体实施例对本发明进行更明确的说明。但下述实施例并不限定本发明的保护范围。

[0059] 1. 提取原料的甄别

[0060] 从国内海水中采取绿藻类(Green algae,绿藻门)、褐藻类(Brown algae,褐藻门)、红藻类(Red algae,红藻门)样本,使用滤纸去除水分后在乳钵进行粗碎,每个样本准备 100g 的提取原料。在 100g 提取原料中添加 10ml 的具有 80 体积%甲醇浓度的水溶液(由甲醇体积 80 及水体积 20 组成的混合溶剂),在约 45℃温度条件下使用搅拌机搅拌 5 分钟,提取有效成分后,使用过滤纸进行过滤,以约 280nm ~ 400nm 波长的紫外线进行扫描,检索提取液的紫外线吸收能力。

[0061] 表 1 表示从绿藻类样本提取的提取液的紫外线吸收能力结果;表 2 表示从褐藻类样本提取的提取液的紫外线吸收能力结果;表 3 表示从红藻类样本提取的提取液的紫外线吸收能力结果。

[0062] 表 1

[0063]

绿藻类种类	显示吸收峰值的紫外线波长(nm)
石莼(UlvalactucaL.)	未检测出
孔石莼(UlvapertUSAKjellman)	未检测出
牡丹菜(UlvaconglobataKjellman)	未检测出

[0064] 表 2

[0065]

褐藻类种类	显示吸收峰值的紫外线波长(nm)
筛状孔叶藻(<i>Agarum cribrosom</i> Bory)	未检测出
绳藻(<i>Cordafilum Lamouroux</i>)	未检测出
葡萄昆布(<i>Ekloniastolonifera</i>)	未检测出
带形解氏藻(<i>Kjellmaniellacrassifolia</i> Miyabe)	未检测出
羊栖菜(<i>Hizikia fusiforme</i>)	未检测出
海带(<i>Laminaria japonica</i>)	未检测出
海蒿子(<i>Sargassum confusum</i> Agardh)	335
鼠尾藻(<i>Sargassum thunbergii</i> O. Kuntze)	未检测出
铜藻(<i>Sargassum horneri</i> C. Agardh)	未检测出
无肋马尾藻(<i>Sargassum fulvellum</i> Agardh)	未检测出
三角藻(<i>Sargassum tortile</i> C. Agardh)	未检测出
扇状石枝藻(<i>Spathoglossum pacificum</i> Yendo)	322
萱藻(<i>Scytosiphon lomentaria</i> J. Agardh)	未检测出
坛状鹿角菜(<i>Pelvetia wrightii</i> Yendo)	332
树状团扇藻(<i>Pardina aborescens</i> Holmes)	305
裙带菜(<i>Undaria pinnatifida</i> Suringar)	337

[0066] 表 3

[0067]

红藻类种类	显示吸收峰值的紫外线波长(nm)
细脉顶群藻(<i>Acrosorium polyneurum</i> Okamura)	未检测出
盾果藻(<i>Carpopeltis affinis</i> Okamura)	328, 334
粗枝软骨藻(<i>Chondria crassicaulis</i> Harvey)	327, 329
角叉菜(<i>Chondrus ocellatus</i> Holmes)	326
珊瑚藻(<i>Corallina officinalis</i> Linne)	326
盾果藻(<i>Carpopeltis affinis</i> Okamura)	305
石花菜(<i>Gelidium amansii</i> Lamouroux)	329, 333
扁江蓠(<i>Gracilaria textorii</i> J. Agardh)	未检测出
蜈蚣藻(<i>Grateloupia filicina</i> J. Agardh)	330
菩提藻(<i>Grateloupia filicina</i> C. Agardh)	330
带形蜈蚣藻(<i>Grateloupia turuturu</i> Yamada)	330
叉枝藻(<i>Gymnogongrus flabelliformis</i> Harvey)	334
嫩杉藻(<i>Gigartina tenella</i> Harvey)	326
小海萝(<i>Gloiopeltis complanata</i> Yamada)	320
海萝藻(<i>Gloiopeltis furcata</i> J. Agardh)	329, 332
长枝蜈蚣藻(<i>Grateloupia prolongata</i> J. Agardh)	未检测出
曲刺沙菜(<i>Hypnea sarda</i> Holmes)	332
鸡脚菜(<i>Halymenia acuminata</i> J. Agardh)	329
长枝沙菜(<i>Hypnea charoides</i> Lamouroux)	320
链状节荚藻(<i>Lomentaria catenata</i> Harvey)	330
圆紫菜(<i>Porphyra suborbiculata</i> Kjellman)	334
条斑紫菜(<i>Porphyra yezoensis</i>)	337
拟厚膜藻(<i>Pachymeniopsis elliptica</i> Yamada)	328, 330, 334
日本束果藻(<i>Phacelocarpus japonicus</i> Okamura)	300
鸡毛藻(<i>Pterocladia tenuis</i> Okamura)	334
海头红(<i>Plocamium telfairiae</i> Harvey)	322 (微量; trace)
裂膜藻(<i>Schizymenia dubyana</i> J. Agardh)	334

[0068] 如表 1 所示,在绿藻类中未发现具有 280nm ~ 400nm 波长的紫外线的吸收峰值;如表 2 所示,在褐藻类中,从 16 种中的 5 种发现了具有 280nm ~ 400nm 波长的紫外线的吸收峰值,但相比从红藻类中发现的吸收峰值其高度低,而表现出了相对低的有效成分含量。红

藻类则如表 3 所示,在 27 种的 24 种发现了具有 280nm ~ 400nm 波长的紫外线的吸收峰值,在除海头红(*Plocamium telfairiae*)之外的 26 种发现的吸收峰值的高度大于在褐藻类中出现的吸收峰值,而表现出了相对高的有效成分含量。

[0069] 得知所调查的大部分红藻类提取物中存在紫外线吸收物质的可能性后,以红藻类提取物为对象,将 4 种类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA),即帕里叮(Palythine)、海燕属-330 (Asterina-330)、施诺啉(Shinorine)、紫菜属-334 (Porphyra-334) 作为标准物质使用,分析了红藻类提取物内的类菌胞素氨基酸成分的含量,结果如表 4 所示。通过使用高效液相色谱法完成了分析工作。

[0070] 表 4

[0071]

红藻类种类	类菌胞素氨基酸提取产出率(%, 提取原料干燥重量为准)				
	帕里叮	海燕属-330	施诺琳	紫菜属-334	4 种菌胞素氨基酸全部
条斑紫菜(<i>Porphyra yezoensis</i>)	0.225540	0.131668	0.228878	1.099902	1.685989
角叉菜(<i>Chondrus ocellatus</i>)	1.058505	0.448038	0.173267	-	1.276576
蜈蚣藻(<i>Grateloupia filicina</i>)	0.43331	0.000412	0.315449	-	0.749172
海萝藻(<i>Gloiopeltis furcata</i>)	0.342213	0.009644	0.030747	0.261463	0.644067
拟厚膜藻(<i>Pachymeniopsis elliptica</i>)	0.411870	0.006765	0.159964	-	0.578598
盾果藻(<i>Carpopeltis affinis</i>)	0.29995	0.005995	0.090416	-	0.396367
带形蜈蚣藻(<i>Grateloupia turuturu</i>)	0.190443	0.002925	0.115745	-	0.309112
叉枝藻(<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>)	0.000482	0.000161	0.297636	0.000097	0.298375
石花菜(<i>Gelidium amansii</i>)	0.024122	0.120514	0.123046	-	0.267681

[0072] 如表 4 所示,就 4 种类菌胞素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAA)标准物质的总含量为准的产出率而言,在紫菜(*Porphyra*)提取物中约为 1.7%,在角叉菜(*Chondrus*)提取物中约为 1.3%,相对高于其他红藻类提取物(约 0.3~0.7%)。并且,紫菜提取物包含全部 4 种标准物质,紫菜属-334 的含量非常高。并且,角叉菜提取物包含除紫菜属-334 之外的其他 3 种标准物质,帕里叮的含量非常高。基于上述分析结果,选择紫菜和角叉菜作为紫外线屏蔽用提取物的候选原料。

[0073] 2. 由紫菜制备紫外线屏蔽用提取物

[0074] (1) 粗提取物(PE)的制备

[0075] 将 100g 干燥紫菜(*Porphyra yezoensis*)放入管形瓶(vial),添加 20ml 的 80 体积 % 的甲醇水溶液(由甲醇体积 80 及水体积 20 组成的混合溶剂)后,在保持 45℃ 的恒温水槽中保持 3 小时以提取有效成分。然后,使用过滤纸(whatman No. 2)对管形瓶内的内容物进行过滤,分离为上清液与剩余红藻类固体成分。通过反复上述提取及过滤操作对分离出的剩余红藻类固体成分再进行两次提取。将分离出的上清液全部收集之后,对其反复进行真空干燥和浓缩,进行两次提取。然后,对溶液进行过滤(whatman No. 2),对于剩余固体成分,采用相同方式尝试两次提取。将通过这些过程获得的提取液全部收集,使用真空蒸发器进行浓缩和干燥,获得固体化的粗提取物(*Pophyra extract*, PE)。

[0076] (2) 粗提取馏分的制备

[0077] 将 10ml 固体化的粗提取物添加至 90ml 蒸馏水中进行溶解来制备粗提取物水溶液后,使其通过气孔大小为 0.45nm 的薄膜过滤器(格尔曼,美国)进行过滤,来去除杂质。使去除杂质后的粗提取物水溶液在 Prep LC 系统[由双缸泵(江东(Koto),日本)、自动注射器(auto injector)、紫外/折射率检测器(UV/RI detector)、分馏装置(fraction collector)构成]相中以水-甲醇浓度梯度(首先是水,然后是 50 体积 % 的甲醇水溶液)展开(展开速度为 5ml/min)之后,使用紫外检测器及折射检测器,获得吸收 280nm ~ 400nm 的紫外线波长的粗提取馏分。

[0078] (3) 提纯提取物(P7)的制备

[0079] 使所获得的粗提取馏分在由 UG120 保护柱(guard column)(资生堂,日本)保护的疏水性色谱柱(Capcellpak C18 UG120 半制备柱,资生堂,日本)中与 0.2 体积 % 的醋酸水溶液一同以 10ml/min 的速度展开,完成一次提纯。使第一次提纯提取物在大小排斥柱(Ohpak 2002;资生堂,日本)中与水一同以 2.5ml/min 的速度展开,来进行第二次提纯。第二次提纯提取物为亮黄色的液体,使用真空蒸发器对其进行浓缩和冻结干燥,来获得固体化的提纯提取物(P7)。

[0080] 3. 从紫菜中提取的紫外线屏蔽用提取物的毒性实验

[0081] (1) 光毒性(phototoxicity)

[0082] 采用 3T3 NRU 光毒性试验法(The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test, 3T3 NRU PT, 3T3 成纤维细胞中性红摄取试验)和光溶血试验法(Photohemolysis Test)对光毒性进行了评价,其中,3T3 NRU 光毒性试验法是从紫菜中提取的提取物 PE 和 P7 在人体光毒性结果表现出良好的一致性的 OECD (经济合作与发展组织)的化学物质评价方法,光溶血试验法能够有效检索依赖氧气的细胞膜的损伤。3T3 NRU 光毒性试验法中使用了源于老鼠的成纤维细胞(NIH/3T3),光溶血试验法中使用了人类红血球(Human Erythrocyte)。

[0083] 3T3 NRU 光毒性试验法(The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test, 3T3 NRU PT, 3T3 成纤维细胞中性红摄取试验)作为对于化妆品光毒性评价的替代试验法,2004 年 4 月被采纳为 OECD 毒性试验标准。根据该评价方法,利用作为源于小鼠的成纤维细胞的 3T3 细胞(cell),对于照射光的细胞和未照射光的细胞,利用 NRU 试验比较了细胞毒性水平,当其差异(PIF, photoirritation factor, 光刺激因子)达到 5 倍以上时,认为是光毒性物质。

[0084] 表 5 表示采用 3T3 NRU 光毒性试验法对从紫菜中提取的提取物 PE 和 P7 进行光毒

性试验的结果。

[0085] 如表 5 所示,作为提纯提取物的 P7 的平均半数致死量(IC_{50} ,是指将通常预计具有毒性的规定量的物质投入动物体内时导致实验对象动物的一半以上死亡的量)浓度与是否照射紫外线无关,超过 1000 mg/ml,PIF 值也表现为 1,因此,上述 P7 被认为是无光毒性物质(non-phototoxic substance)。并且,就作为粗提取物的 PE 而言,平均半数致死量的浓度低于 P7,毒性水平相对高,但 PIF 值小于 5,因此,PE 也被认为是无光毒性物质。

[0086] 表 5

[0087]

提取物类型	3T3 NRU 光毒性试验结果		
	平均 IC_{50} 浓度 (UV-, mg/ml)	平均 IC_{50} 浓度 (UV+, mg/ml)	PIF [IC_{50} (UV-) / IC_{50} (UV+)]
PE	932.5	215.0	4.34
P7	>1000	>1000	1

[0088] 图 2 为表示根据利用人类红血细胞的光溶血试验法得出的从紫菜中提取的无毒性紫外线屏蔽用粗提取物(PE)和第二次提纯提取物(P7)的光毒性结果的曲线图。并且,图 3 为表示从紫菜中提取的无毒性紫外线屏蔽用粗提取物(PE)的浓度为 500 μ g/ml 时的,由利用人类红血细胞的光溶血试验法得出的光毒性结果的照片,图 4 为表示从紫菜中提取的无毒性紫外线屏蔽用第二次提纯提取物(P7)的浓度为 250 μ g/ml 时的、由利用人类红血细胞的光溶血试验法得出的光毒性结果的照片。图 2 至图 4 中,UV- 表示未照射紫外线的状态,UV+ 表示照射了紫外线的状态。在图 2 至图 4 中所示的光溶血实验中使用的紫外线照射量为 UVA 15J/cm²。

[0089] 根据利用人类红血球的光溶血试验法得出的光毒性结果与根据 3T3 NRU 光毒性试验法得出的光毒性试验结果几近相同。

[0090] (2) 细胞毒性(Cytotoxicity)

[0091] 对于从紫菜中提取的提取物 PE 和 P7,实施了针对人类角质细胞(keratinocyte) HaCaT 的细胞毒性试验(cytotoxicity test)。细胞毒性评价使用了中性红法(Neutral red assay)。

[0092] 表 6 表示从紫菜中提取的提取物 PE 和 P7 针对人类角质细胞(keratinocyte) HaCaT 的细胞毒性试验结果。

[0093] 如表 6 所示,PE 和 P7 的对 HaCaT 的半数致死量浓度均显示为 5mg/ml 以上,被认为是无细胞毒性物质(non-cytotoxic substance)。

[0094] 表 6

[0095]

提取物的种类	IC_{50} 浓度(mg/ml)
PE	> 5
P7	> 5

[0096] 如上所述,从紫菜中提取的粗提取物与提纯提取物均被认为是无毒性紫外线屏蔽用提取物,上述提取物可用作紫外线屏蔽剂等化妆原料组成物的主要成分。此时,化妆原料组成物可制备成面霜、乳液、凝胶、补剂或喷雾等类型,紫外线屏蔽用提取物的含量在不会对皮肤产生毒性的范围内合理选择。

[0097] 产业上的可利用性

[0098] 根据本发明的方法制备的紫菜或角叉菜的提取物可用于紫外线屏蔽用化妆品的有效成分。

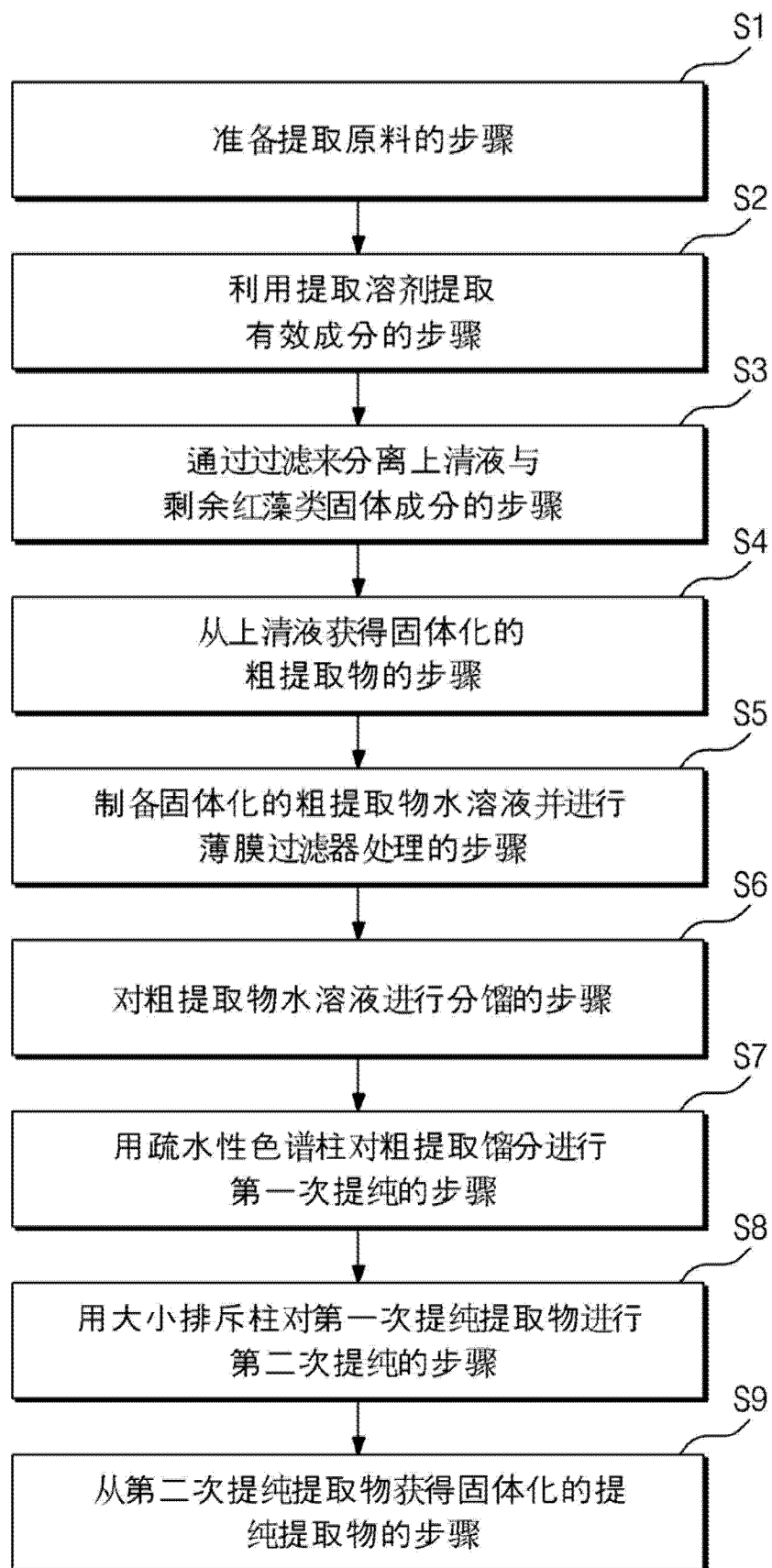


图 1

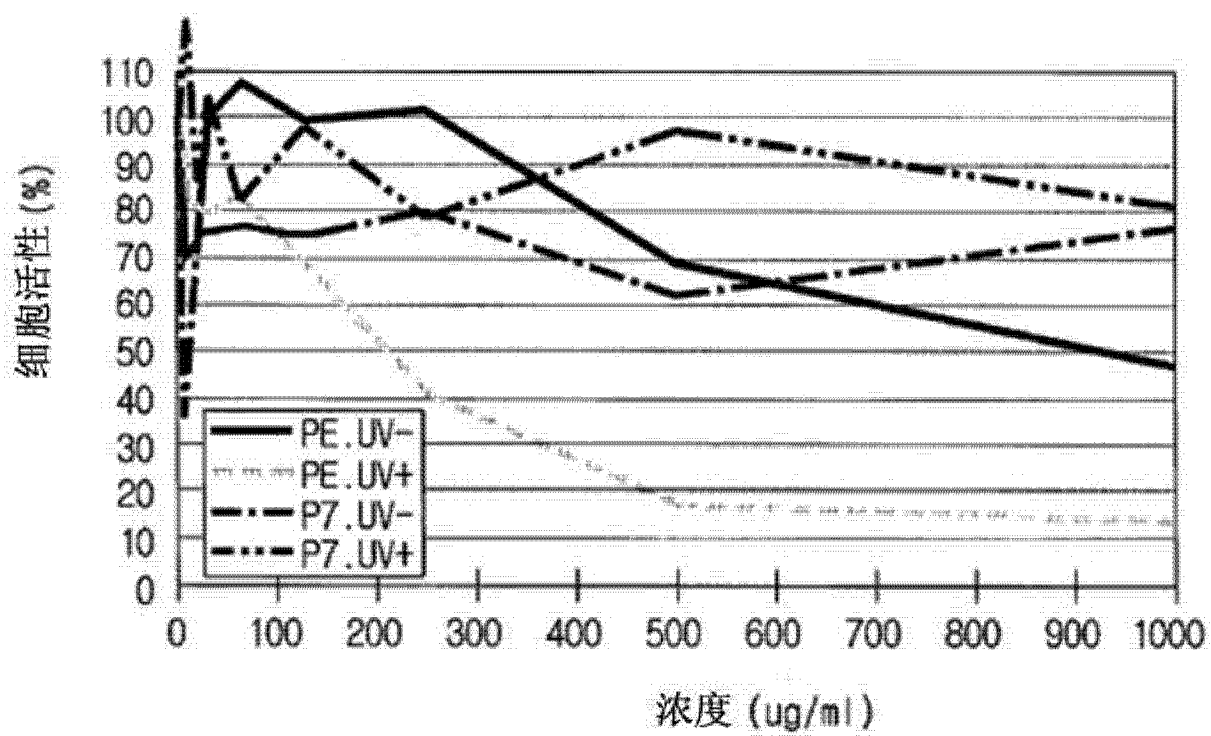


图 2

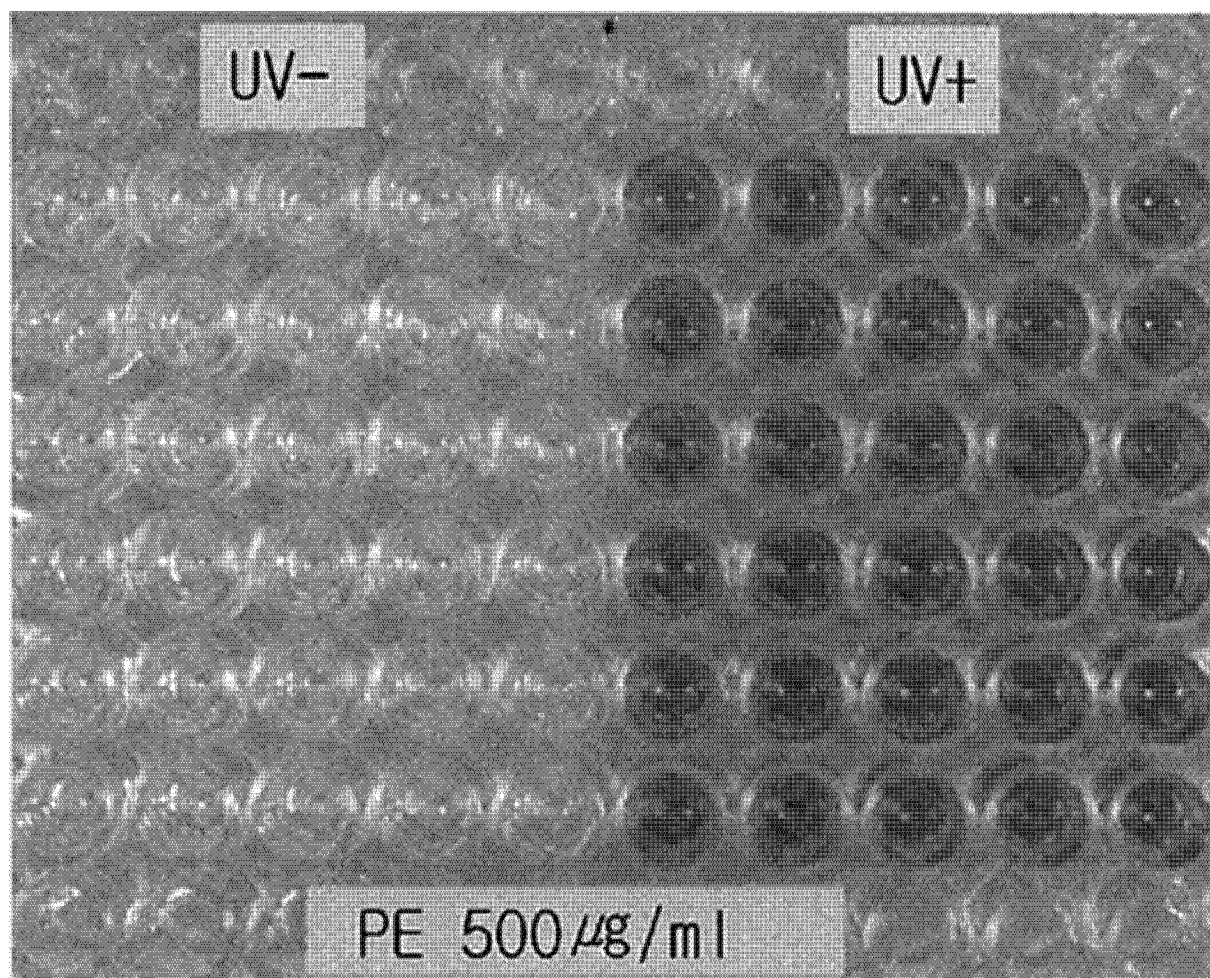


图 3

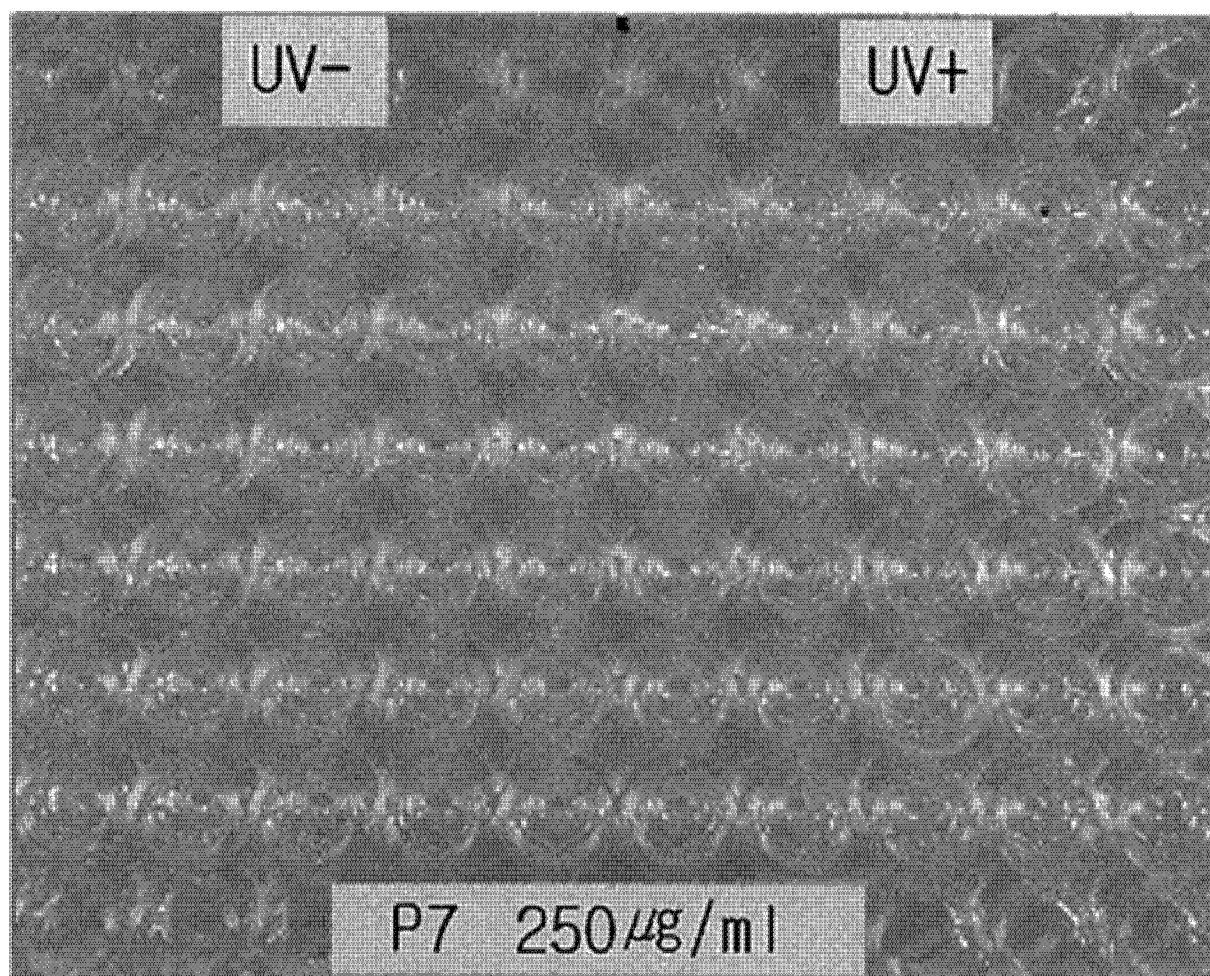


图 4