



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116159011 A

(43) 申请公布日 2023.05.26

(21) 申请号 202310314971.2

A61P 17/02 (2006.01)

(22) 申请日 2023.03.28

(71) 申请人 水羊化妆品制造有限公司

地址 410000 湖南省长沙市长沙高新开发
区谷苑路390号

(72) 发明人 高畅 张廷志 颜少慰 崔俊毅
李丽

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

专利代理师 温可睿

(51) Int. Cl.

A61K 8/9789 (2017.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

黑参总皂苷提取物的制备方法及其在化妆品中的应用

(57) 摘要

本发明涉及化妆品技术领域,尤其涉及黑参总皂苷提取物的制备方法及其在化妆品中的应用。本发明提供了利用乙醇提取、正丁醇萃取和大孔吸附树脂纯化得到黑参总皂苷提取物的制备方法,所获得的黑参总皂苷提取物中具有丰富的人参皂苷Rg3、Rg5和Rk1等活性物质,能够将其应用到具有抗炎舒缓、修护紧致功效的化妆品中。

1. 黑参总皂苷提取物的制备方法,其特征在于,包括将黑参依次经乙醇提取、正丁醇萃取和大孔吸附树脂纯化,得到。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述乙醇提取步骤中,采用70%的乙醇水溶液进行提取,获得提取液;

所述黑参和乙醇的固液比为1:(20~30)g/mL;所述粗提步骤的温度为50~60℃,提取时间为3~4h。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,所述正丁醇萃取步骤中,所述正丁醇为水饱和正丁醇,

所述提取液与正丁醇的体积比为1:1;萃取次数为2~3次,所述萃取后还包括减压浓缩获得提取物的步骤。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述大孔吸附树脂纯化步骤中,提取物以水稀释至质量分数为0.5%~1%上样,上样量为2~3倍柱体积,然后依次以3倍柱体积的水和6倍柱体积的70%乙醇水溶液洗脱,收集不含色素的70%乙醇洗脱液。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述不含色素的70%乙醇洗脱液经50℃旋转蒸发浓缩后冻干,所述冻干时的温度为-45℃,真空度小于10Pa,冻干时间为3d。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的制备方法,其特征在于,在所述乙醇提取之前将黑参干燥并粉碎至60~80目;

所述干燥温度为50~60℃,所述干燥时间为24~30h。

7. 权利要求1~6任一项所述制备方法获得的黑参总皂苷提取物。

8. 权利要求7所述的黑参总皂苷提取物在制备具有抗炎舒缓、修护紧致功效的化妆品中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述抗炎包括降低炎症因子的含量;所述舒缓包括抑制中性粒细胞聚集;所述修护包括促进皮肤伤口愈合;所述紧致包括促进I型胶原蛋白基因表达。

10. 具有抗炎舒缓、修护紧致功效的化妆品,其特征在于,包括权利要求1~6任一项所述制备方法获得的黑参总皂苷提取物,以及其他可接受的辅料或助剂。

黑参总皂苷提取物的制备方法及其在化妆品中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化妆品技术领域,尤其涉及黑参总皂苷提取物的制备方法及其在化妆品中的应用。

背景技术

[0002] 黑参是以传统中药制作方法之一“九蒸九晒”的原理为依托,将生晒参经过浸润、清洗、分选蒸制、烘干等工序加工而成。蒸制晾晒的工序要经过九次反复制作。生晒参在这个过程中,成分上发生微量变化,皂苷含量增加、燥性成分减少,颜色逐渐成黑褐色的黑参。查阅大量文献可知,黑参有着广泛的生物活性,其中研究的较多的是抗肿瘤活性和抗氧化活性;同时还有一些研究显示黑参具有降压保肝、降低血糖、保护中枢神经以及化妆品美白应用的功效。

[0003] 稀有参皂苷是原型人参皂苷的代谢衍生物,无法直接从植株中提取,只能通过转化或代谢原型人参皂苷而获得,这些稀有参皂苷成分具备更多样更强大的生物活性,可以称得上是人参皂苷家族中的“贵族”。借由高效液相色谱的分析,人们发现通过多次蒸晒,原先在白参中含量极低的稀有皂苷如人参皂苷Rg3、人参皂苷Rg5以及人参皂苷Rk1等等在黑参中得到了显著性的提升。现如今国内外的化妆品研究多集中在生晒参、红参以及黑参其他活性物质方面,针对于黑参及其皂苷提取物的研究相对较少,也无相关黑参总皂苷作为单一原料、非组合物在化妆品领域的功效验证。因此探究黑参皂苷提取物在化妆品原料上的应用具有一定的前景。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供黑参总皂苷提取物的制备方法及其在化妆品中的应用。本发明提供的制备黑参总皂苷提取物的方法简单快捷,获得的黑参总皂苷纯度高,没有其他副产物的产生,能够应用于化妆品的原料。

[0005] 本发明提供了黑参总皂苷提取物的制备方法,包括将黑参依次经乙醇提取、正丁醇萃取和大孔吸附树脂纯化,得到。

[0006] 本发明提供的制备黑参总皂苷提取物的方法,经过了优化和改进,相较于现有技术能够获得高纯度的黑参总皂苷,人参皂苷Rg3、Rg5和Rk1等活性物质的含量显著提高,且没有其他副产物的产生。相较于其他参数下的提取方案,本发明提供的提取方法具有更高的收率,1kg黑参能收获42g的纯度约97.25% (以人参皂苷Re计)的黑参总皂苷。

[0007] 本发明所述黑参总皂苷提取物的制备方法中,采用70%的乙醇水溶液对黑参进行提取,获得提取液。

[0008] 在所述乙醇提取步骤中,黑参和乙醇的固液比为1:(20~30)g/mL,温度为50~60℃,提取时间为3~4h。

[0009] 进一步的,在所述乙醇提取步骤之前,需要将黑参干燥并粉碎,过筛后得到60~80目黑参粉末;所述干燥温度为50~60℃,所述干燥时间为24~30h。在乙醇提取步骤之后,需

要将黑参粉末和乙醇的混合液过滤,将滤液减压浓缩后冻干得到黑参提取物粉末;所述减压时的温度为50~60℃。

[0010] 本发明所述黑参总皂苷提取物的制备方法中,所述正丁醇为水饱和正丁醇。

[0011] 在所述正丁醇萃取步骤中,所述黑参提取物溶液与正丁醇的体积比为1:1,萃取次数为2~3次,所述黑参提取物溶液的浓度为2%。在萃取后将黑参正丁醇提取物溶液减压浓缩得到不含正丁醇的黑参提取物。

[0012] 在所述大孔吸附树脂纯化步骤中,上样液为经正丁醇萃取纯化后的黑参提取物,洗脱液包括水和70%乙醇;黑参提取物以水稀释至质量分数为0.5%~1%上样,上样量为2~3倍柱体积,然后依次以3倍柱体积的水和6倍柱体积的70%乙醇水溶液洗脱,弃去色素段的洗脱液,收集不含色素的70%乙醇洗脱液。

[0013] 进一步的,在所述大孔吸附树脂纯化之后将70%乙醇洗脱液经50℃旋转蒸发浓缩,冻干后得到黑参总皂苷提取物,所述冻干的时间为3天,温度为-45℃,真空度<10Pa。

[0014] 在一些具体的实施例中,大孔树脂需要提前活化预处理,所述活化预处理的步骤包括将树脂和水混合后过柱,依次用NaOH溶液、水、HCl溶液和水进行洗脱,所述NaOH溶液和HCl溶液的浓度为0.5mol/L。

[0015] 利用本方案提供的提取纯化工工艺即乙醇提取、正丁醇萃取、大孔树脂吸附得到了纯度较高的黑参总皂苷提取物,最终得到黑参总皂苷提取物纯度以人参皂苷Re计约为97.25%,粗略估计约为81.69%,纯度较高。

[0016] 本发明提供了利用本发明所述制备方法得到的黑参总皂苷提取物。

[0017] 本发明通过试验发现,利用所述高纯度的黑参总皂苷提取物进行细胞功效测试验证其表现出抑制TNF- α 炎症因子释放的作用,具有良好的抗炎功效。进行斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制测试、斑马鱼胚胎行为学测试两组实验,验证了所述黑参总皂苷提取物表现出显著抑制斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集以及缓解SDS带来的刺激强度的作用,具有良好的舒缓效果。进行斑马鱼胚胎尾鳍修护促进率实验,验证了所述黑参总皂苷提取物能显著促进斑马鱼胚胎尾鳍再生,具有促进修护效果。进行斑马鱼I型胶原蛋白基因表达促进测试,验证了所述黑参总皂苷提取物能显著促进斑马鱼colla1b基因表达,具有促进I型胶原蛋白再生效果,具有良好的紧致功效。

[0018] 因此本发明提供了所述的黑参总皂苷提取物在制备具有抗炎舒缓、修护紧致功效的化妆品中的应用。其中,所述抗炎包括降低炎症因子的含量;所述舒缓包括抑制中性粒细胞聚集。所述修护包括促进皮肤伤口愈合;所述紧致包括促进I型胶原蛋白基因表达。

[0019] 本发明还提供了具有抗炎舒缓、修护紧致功效的化妆品,其包括利用本发明所述制备方法获得的黑参总皂苷提取物,以及其他可接受的辅料或助剂。所述辅料包括但不限于稀释剂、吸收剂、润湿剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、包衣材料、溶剂、pH调节剂、缓冲剂、抗氧化剂、金属离子螯合剂、抑菌剂或等渗调节剂。所述助剂包括但不限于催化剂、引发剂、乳化剂、分散剂、阻聚剂、终止剂、分子量调节剂、扩链剂、中和剂、脱水剂或溶剂。

[0020] 进一步的,本发明所述化妆品的剂型包括膏霜类、乳液类、水剂类、凝胶类、油剂类、粉剂类、散粉、气雾剂类、膜类、冻干类中的至少一种。

[0021] 本发明还提供了一种改善肌肤状态的方法,其包括使用本发明所述的化妆品。所述使用的方法包括涂抹、熏蒸、外敷或注射,本发明对此不做限定。

[0022] 本发明提供的制备黑参总皂苷提取物的方法具体采用乙醇浸提法、液液萃取和树脂吸附法,所需要的仪器设备较为普遍、工艺流程较为简单,大型工厂有广泛的应用实践经验,有利于工艺方法的实际放大和节能降耗。利用本发明制备的黑参总皂苷建立的细胞功效评价和斑马鱼功效评价模型,能够为后续探究黑参总皂苷提取物在抗炎舒缓、修护紧致的化妆品中的应用提供依据。

附图说明

- [0023] 图1示香草醛-高氯酸法测定人参皂苷Re的标准曲线;
- [0024] 图2示人参皂苷Rg3含量;
- [0025] 图3示人参皂苷Rg5含量;
- [0026] 图4示人参皂苷Rk1含量;
- [0027] 图5示ELISA检测各组炎症因子TNF- α 含量;
- [0028] 图6示斑马鱼模型舒缓测试结果代表性图;
- [0029] 图7示黑参总皂苷提取物舒缓实验结果;
- [0030] 图8示斑马鱼胚胎尾鳍修护促进率代表性图;
- [0031] 图9示斑马鱼I型胶原蛋白基因相对表达量柱状图。

具体实施方式

[0032] 本发明提供了黑参总皂苷提取物的制备方法及其在化妆品中的应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0033] 本发明采用的试材皆为普通市售品,皆可于市场购得。

[0034] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0035] 制备例1总皂苷标准曲线绘制(香草醛-高氯酸比色法)

[0036] 1、人参皂苷Re标准溶液配制

[0037] 用药勺取人参皂苷Re标准品放在电子天平上,称取约10mg后,放置在10mL容量瓶中,然后用甲醇定容。

[0038] 2、1%香草醛-高氯酸溶液配制

[0039] 准确称量一定质量的香草醛试剂,加入高氯酸使香草醛浓度为1% (现配现用)。

[0040] 3、标准曲线绘制

[0041] 用移液枪分别精密吸取0.0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 μ L的人参皂苷Re标准溶液,置于10mL具塞试管中,水浴60 $^{\circ}$ C挥干溶剂。然后再加入0.5mL的香草醛-高氯酸溶液,混合均匀。将具塞试管放入60 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中加热15min后,再放入冰水中冷却2min。冷却后恢复至室温,酶标仪540nm。以吸光度值为纵坐标Y,人参皂苷Re标准溶液浓度为横坐标X,绘制标准曲线,见图1。

[0042] 如图1所示。所测得的数据经过回归分析,以吸光度值为纵坐标(Y),人参皂苷Re质量为横坐标(X),得到回归方程为: $Y=0.002X-0.0196$, $R^2=0.9989$ 。在浓度0~120 μ g的范围

内,人参皂苷Re质量与吸光度线性关系良好。

[0043] 4、总皂苷含量

[0044] 由3得到的人参皂苷Re的含量 $\times 0.84$,即得总皂苷含量。

[0045] 关于总皂苷含量的检测方法,根据最新版《中国药典》,利用香草醛-高氯酸比色法进行含量检测;同时因为总皂苷是一类物质,没有标准品,因此《药典》使用人参皂苷Re进行估算总皂苷的含量。为了科学和严谨性,有文献(朱海林,林红强,谭静,et al.林下山参不同部位的人参总皂苷与单体皂苷的含量分析[J].特产研究,2019,41(1):5.)提出总皂苷的实际含量需要再乘以0.84(0.84本身也是一个估值)。

[0046] 实施例1黑参总皂苷提取物的制备及皂苷纯度和含量检测

[0047] 1、制备黑参提取物

[0048] 将黑参置于50~60℃烘箱干燥24h后,使用中药粉碎机粉碎并过60~80目筛,得到黑参粉末。称取一定质量的黑参粉末加入70%乙醇作为提取溶剂,固液比为1:20;然后置60℃的油浴锅中提取3.5h后,利用圆形滤纸抽滤,滤液备用;再经60~65℃减压浓缩至干,冻干机冻干成粉。

[0049] 2、黑参提取物萃取优化

[0050] 将步骤1制备得到的黑参提取物粉末加水溶解,使固形物含量浓度为2%。然后加入水饱和正丁醇溶液进行萃取,反复萃取2~3次,收集正丁醇相进行减压浓缩,得到黑参正丁醇相提取物。

[0051] 3、大孔树脂吸附纯化得到黑参总皂苷

[0052] (1)、树脂活化预处理:

[0053] 称取一定量的D-101树脂加入纯净水,使树脂和水的体积达到100mL,然后上柱。首先先用0.5mol/L的NaOH溶液约200mL进行洗脱,然后用水洗脱至pH为中性后,再加入0.5mol/L的盐酸水溶液约200mL进行洗脱,最后用水洗脱至pH为中性。

[0054] (2)、树脂吸附皂苷过程:

[0055] 将步骤2提取制备的黑参正丁醇相提取物,加水得到0.5%~1%浓度的水溶液。将所述0.5%~1%黑参正丁醇相提取物上柱完成后,先用约300mL的纯净水水洗至无色,再用约600mL的70%乙醇水溶液根据洗脱液颜色进行分段洗脱,并收集非色素段的洗脱液。将洗脱液利用旋转蒸发器在50℃的条件下进行浓缩,然后利用冻干机将浓缩液冻干成粉得到黑参总皂苷提取物。

[0056] 4、检测总皂苷纯度以及人参皂苷含量

[0057] (1)、利用香草醛-高氯酸比色检测法检测3个提取和纯化工序得到的黑参总皂苷提取物中总皂苷的纯度,结果见表1。结果显示最终得到黑参总皂苷提取物纯度以人参皂苷Re计约为97.25%,粗略估计约为81.69%,纯度较高。

[0058] 表1不同提取和纯化工序提取到的总皂苷占比

	乙醇提取得到的黑参总皂苷提取物中总皂苷纯度	正丁醇萃取得到的黑参总皂苷提取物中总皂苷纯度	大孔树脂吸附纯化得到的黑参总皂苷提取物中总皂苷纯度	
[0059]	药典《香草醛-高氯酸比色检测法》(以人参皂苷 Re 为指标) 计算总皂苷占比 (%)	28.94	51.89	97.25
	药典提及乘 0.84 更接近真实情况下总皂苷含量。将以上数据乘 0.84 的结果如右所示 (%)	24.31	43.59	81.69

[0060] (2)、利用高效液相色谱法对现有黑参提取物制备工艺所获得的黑参提取物和本发明中制备得到的黑参总皂苷提取物中的功效活性物质人参皂苷进行检测,检测步骤如下:

[0061] 1、液相与色谱柱

[0062] 液相型号:Agilent 1260Infinity II;

[0063] 色谱柱:InfinityLab Poroshell 120EC-C18 3.0×150mm 2.7-Micron with Column ID

[0064] 2、色谱条件

[0065] 流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱;0~5min 70%A~50%A,5~13min 50%A~45%A,13~20min 45%A~55%A,20~30min 55%A~55%A,30~32min 55%A~30%A,32~37min 30%A~30%A,37min~39min 30%A~70%A,39min~45min 70%A~70%A;检测波长203nm,进样量1uL,柱温30℃,流速0.4mL/min。

[0066] 检测结果如表2和图2~4所示,从结果可以看出,与现有技术相比,利用本方案提供的制备方法纯化后得到的黑参总皂苷提取物中,人参皂苷Rg3、Rg5和Rk1等特征性皂苷含量都有了约3倍含量的提升。

[0067] 表2

	人参皂苷 Rg3 含量	人参皂苷 Rg5 含量	人参皂苷 Rk1 含量
[0068] 利用 CN113599314B 工艺方法得到的黑参提取物	3.9mg/g	5.6mg/g	39.1mg/g
经本发明纯化步骤得到的黑参总皂苷提取物	14.3mg/g	15.3mg/g	104.3mg/g

[0069] 实施例2细胞模型测试,验证黑参总皂苷提取物的抗炎功效

[0070] 1、培养基及溶液配制

[0071] (1)、RPMI 1640完全培养基:向RPMI 1640培养基中加入FBS使其含量为10%。

[0072] (2)、LPS:以1×PBS缓冲液为稀释液,配制1mg/mL的LPS溶液。

[0073] 2、黑参总皂苷提取物对RAW264.7细胞分泌炎症因子TNF-α的影响

[0074] (1)、细胞接种:将RAW264.7细胞按4500个/孔接种于96孔板,置于37℃,5% CO₂培

养箱中培养24h。

[0075] (2)、实验分组:设置阴性对照组(NC)、阳性对照组(PC)和样品组。样品组中共设3个浓度梯度,各组均设6个复孔。

[0076] (3)、LPS诱导炎症反应:将1mg/mL的LPS溶液稀释至2 μ g/mL,按50 μ L/孔加至孔板中,阴性对照组加等量培养基,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养4h。

[0077] (4)、待测样品稀释与加样:以完全培养基为稀释液,按照样品试验浓度梯度100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL配制不同浓度的样品工作液,100 μ L/孔,阴性对照组和阳性对照组加等量完全培养基,置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱内培养24h后在显微镜下观察细胞形态。

[0078] (5)、取孔板中的上清,通过ELISA法检测TNF- α 含量,操作步骤如下:

[0079] A预先计算好所需的酶标条,实验前30min拿出试剂盒,恢复至室温;

[0080] B标准品梯度稀释:用标准品&样品稀释液将标准品倍比稀释为500,250,125,62.5,0pg/mL;

[0081] C收集细胞培养上清液到无菌离心管中,离心(4 $^{\circ}$ C,1000 \times g,20min),取上清后,适当浓度稀释作为检测样本;

[0082] D各反应孔中加入100 μ L标准品工作液及检测样本,各组均设2个复孔,于37 $^{\circ}$ C孵箱孵育90min;

[0083] E弃去液体,甩干,各反应孔中加入100 μ L生物素标记抗体工作液至反应孔中,于37 $^{\circ}$ C孵箱孵育60min;

[0084] F弃去液体,甩干,各反应孔中加入300 μ L洗涤液,浸泡1~2min后甩干,重复4次;

[0085] G各反应孔中加入100 μ L HRP标记链霉亲和素工作液至反应孔中,于37 $^{\circ}$ C孵箱孵育30min;

[0086] H各反应孔中加入300 μ L洗涤液,间隔30s,甩干洗涤液。重复4次;

[0087] I各反应孔中加入90 μ L显色剂至反应孔中,于37 $^{\circ}$ C避光显色15min左右;

[0088] J各反应孔中加入50 μ L终止液,即刻用酶标仪450nm波长下测量OD值;

[0089] K根据标准品的已知浓度和所测OD值计算标准曲线回归方程($R^2 > 0.99$),将样品孔的OD值代入计算所测样品的浓度,再乘稀释倍数即得到原样品的实际TNF- α 浓度。

[0090] 3、统计分析

[0091] 采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据统计分析并绘制图表,计量资料以 $x \pm s$ 表示,组间差异采用one-way ANOVA分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0092] 4、结果分析

[0093] 通过ELISA检测各组炎症因子TNF- α 含量,根据实验结果得到标曲 $y = 0.001x + 0.0908$, $R^2 = 0.9986$ (横坐标 x 为样品TNF- α 含量,纵坐标 y =吸光度),根据标曲的吸光度反推TNF- α 含量,其变化趋势如图5所示(****代表与阳性组对比,具有极显著性差异;**代表与阳性组对比,具有强显著性差异)。结果显示,经LPS诱导后,阳性对照组TNF- α 含量较阴性对照组显著提高,模型构建成功;较阳性对照组,黑参总皂苷样品具有显著降低TNF- α 分泌量的效果,且呈现剂量依赖的趋势,因此黑参总皂苷提取物具有一定的抗炎功效。

[0094] 实施例3斑马鱼模型测试,验证黑参总皂苷提取物的舒缓功效1、斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制测试方法

[0095] 1.1、实验原理

[0096] 斑马鱼胚胎的中性粒细胞和人体中性粒细胞在形态、生化和生理功能上高度相似。中性粒细胞是在损伤或病菌入侵部位第一批出现的白细胞,作用于清除感染或有害物质。应用硫酸铜诱导斑马鱼胚胎侧线区域神经丘细胞损伤而引起中性粒细胞聚集的模型进行测试,比较受试物处理组和模型对照组的鱼胚胎侧线区域的中性粒细胞的数量变化,计算中性粒细胞抑制率以评价原料、配方或产品的舒缓功效。

[0097] 1.2、实验方法

[0098] 挑选健康的受精后3天大的斑马鱼胚胎。测试需设定模型对照组(硫酸铜工作液)、阳性对照组(硫酸铜工作液+吡啶美辛工作液)和受试物组(硫酸铜工作液+受试物)。

[0099] (1) 模型对照组设置:随机挑选24尾鱼胚胎,转移至3cm培养皿中,加入5mL含0.16mg/L五水硫酸铜的鱼胚胎培养液。

[0100] (2) 阳性对照组设置:随机挑选24尾鱼胚胎,转移至3cm培养皿中,加入5mL含0.16mg/L五水硫酸铜和0.0036mg/L吡啶美辛的鱼胚胎培养液。

[0101] (3) 受试物处理:随机挑选24尾鱼胚胎,转移至3cm培养皿中,加入5mL含0.16mg/L五水硫酸铜和受试物的鱼胚胎培养液。放置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养40~45min。

[0102] (4) 鱼胚胎固定染色:将每测试组鱼胚胎于多聚甲醛中固定至少1h后,用PBST处理鱼胚胎3次,每次5min,然后用50%乙醇处理3min。用苏丹黑染色溶液对鱼胚胎进行室温染色1h后,用70%乙醇浸洗4次,每次5min,然后用PBST处理2次,每次5min。用漂白溶液处理鱼胚胎10min,如在试管里处理,则需保持盖子打开。然后用70%乙醇溶液处理5min,PBST处理1min,用清澈液1(含有20%甘油和0.25%KOH的溶液)处理15min,清澈液2(含有50%甘油和0.25%KOH的溶液)处理10min,再用PBST处理3min。

[0103] (5) 样本的显微分析:将鱼胚胎侧身摆放。然后放到体式显微镜下对鱼胚胎尾部进行拍照。

[0104] (6) 数据和结果计算:计数每尾鱼胚胎从肛门起四分之三尾部侧线区域的中性粒细胞数目

[0105] (7) 结果计算:算中性粒细胞聚集抑制率:

[0106] 抑制率 = $(C - T / C) \times 100\%$ ----- (1)

[0107] (1) 式中:T—受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值;C—模型对照组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值;对受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目和模型对照组中性粒细胞数目进行双尾T检验,取得p值。

[0108] (8) 测试有效性验证:各测试组暴露完成后至少90%鱼胚胎存活,否则对应测试组结果无效;每批次测试须设置阳性对照组,要求每批次测试阳性对照组鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制率为正数且 $p < 0.05$ 。

[0109] 2、斑马鱼胚胎行为学舒缓功效测试

[0110] 2.1、实验原理

[0111] 斑马鱼胚胎对于外界刺激物质敏感,常用作外界污染物的检测。斑马鱼胚胎发育至24h(24hours post-fertilization,简称“24hpf”,下同)会产生自发的自旋运动。斑马鱼胚胎的自旋运动频率与其受到的外界刺激直接相关。因此,以斑马鱼胚胎的自旋运动频率为指标,建立的斑马鱼刺激模型常用于评价化妆品原料的舒缓功效。

[0112] 2.2、实验方法

[0113] (1) 将待测样品溶于Holt-Buffer或甲醇配制成母液,使用Holt-Buffer培养液将其稀释至实验组浓度(甲醇终体积分数为1%)。随机挑选发育健康、状态一致、24hpf的斑马鱼胚胎置于96孔板中,每孔5枚,分别加入上述浓度的样品稀释液,每孔200 μ L,每个浓度设置3个复孔,处理1h,同时设置空白对照组(Holt-Buffer培养液处理)。

[0114] (2) 处理结束后,采用倒置显微镜录像记录30s内斑马鱼胚胎的自旋运动次数。将斑马鱼胚胎未出现死亡且自旋运动次数与空白对照组对比无显著增加的浓度组别分别确定为样品的无可观察效应浓度(NOEC)。

[0115] (3) 在NOEC浓度之内梯度稀释设置样本浓度组。随机挑选健康、状态一致、24hpf的斑马鱼胚胎置于96孔板中,每孔5枚,分别加入样品浓度溶液,每孔200 μ L,每个浓度设置3个复孔,处理1h,同时设置空白对照组。处理结束后,除去96孔板中的溶液,用SDS对样本进行稀释,即得到样品与SDS混合液(SDS的终浓度为250 μ mol/L),处理15min,然后采用倒置显微镜录像记录30s内斑马鱼胚胎的自旋运动次数。根据式①计算刺激强度,并通过比较斑马鱼胚胎刺激强度的变化来评估样品的舒缓功效。

[0116] 计算公式如下:

[0117] 刺激强度= $n/m \times 100\%$ ①,式中,n为处理组斑马鱼胚胎自旋运动的平均次数/次;m为空白对照组斑马鱼胚胎自旋运动的平均次数/次;

[0118] (4) 采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据统计分析并绘制图表,组间差异采用one-way ANOVA分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0119] 3、斑马鱼胚胎尾鳍修护促进率

[0120] 3.1、实验原理

[0121] 当受到伤害时,皮肤必须快速重生来修复皮肤屏障。在胚胎阶段,伤口愈合十分迅速且不会留下伤疤;但过了胚胎阶段,伤口愈合需经过凝血、炎症、皮肤再生、血管重生和肉芽组织的形成,最终形成伤疤等步骤。斑马鱼在伤口修复过程中,除了不会形成凝血外,其余步骤和人类相同。斑马鱼伤口皮肤愈合非常迅速,紧接着炎症细胞迁移至伤口形成由巨噬细胞、纤维细胞、血管和胶原蛋白组成的肉芽组织。因此,斑马鱼和人类伤口愈合的主要步骤原理十分一致,可以作为人体皮肤修护功效的检测筛查模型。

[0122] 3.2、实验方法

[0123] 挑选健康的受精后3天大的斑马鱼胚胎。

[0124] (1) 损伤模型:使用三卡因溶液麻醉斑马鱼胚胎,于显微镜下用实验解剖刀切除斑马鱼胚胎尾鳍。

[0125] (2) 模型对照组设置:随机挑选24尾鱼胚胎,转移至96-孔板中的其中24孔,每孔含一粒鱼胚胎和0.2mL鱼胚胎培养液。

[0126] (3) 阳性对照组设置:随机挑选24尾鱼胚胎,转移至96-孔板中的其中24孔,每孔含一粒鱼胚胎和0.2mL熟地黄提取物溶液。

[0127] (4) 受试物处理:随机挑选24尾鱼胚胎,转移至96-孔板中的其中24孔,每孔含一粒鱼胚胎和0.2mL受试物溶液。放置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 $3 \pm 0.5\text{h}$ 。

[0128] (5) 样本的显微分析:用三卡因将斑马鱼麻醉,然后放到体式显微镜下对鱼胚胎尾部进行侧面拍照。

[0129] (6) 数据和结果计算:计数每尾鱼胚胎尾鳍长度

[0130] (7) 结果计算: 计算尾鳍修护促进率:

[0131] 抑制率 = $(B-A/A) \times 100\%$ ----- (2)

[0132] (2) 式中: B—受试物处理组鱼胚胎尾鳍长度的平均值; A—模型对照组鱼胚胎尾鳍长度的平均值; 对受试物处理组鱼胚胎尾鳍长度和模型对照组尾鳍长度进行双尾T检验, 取得p值。

[0133] (8) 测试有效性验证: 各测试组暴露完成后至少90%鱼胚胎存活, 否则对应测试组结果无效; 每批次测试须设置阳性对照组, 要求每批次测试阳性对照组鱼胚胎尾鳍修护促进率为正数且 $p < 0.05$ 。

[0134] 4、斑马鱼I型胶原蛋白基因表达促进测试

[0135] 4.1、实验原理

[0136] 胶原蛋白是人体的细胞外基质蛋白中含量最高的, 其中I型胶原蛋白是皮肤中最丰富的蛋白质。斑马鱼的I型胶原蛋白分布与人体相同, 且显示出与人类的高度保守性, 它们的先天表达在受精后6天大时显著下降, 并在受精后10到12天之间变得非常低。测试斑马鱼I型胶原蛋白基因 (coll1a1a、coll1a1b和coll1a2) 表达, 比较处理组和空白对照组斑马鱼I型胶原蛋白基因相对表达量变化, 计算I型胶原蛋白基因表达促进率可以评价原料或产品的抗皱和紧致功效。

[0137] 4.2、实验方法

[0138] 挑选健康的受精后6天大的斑马鱼。

[0139] (1) 空白对照组设置: 随机挑选36尾斑马鱼, 转移至24-孔板中的其中3个孔, 每孔含12尾斑马鱼和2.5mL鱼胚胎培养液。

[0140] (2) 受试物处理: 随机挑选36尾斑马鱼, 转移至24-孔板中其中3个孔, 每孔含12尾斑马鱼和2.5mL受试物溶液。放置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 $24 \pm 1\text{h}$ 。收集每孔中的12尾斑马鱼于1.5mL管中, 除去溶液, 加入0.5mL RNAlater溶液, 冰冻储存。

[0141] (3) RNA提取: 除去RNAlater溶液, 用PBS溶液冲洗3次。置于冰浴, 除去PBS溶液, 加入500 μL Trizol试剂。用颗粒杵对胚胎进行均质化, 冰浴10min。加入100 μL 三氯甲烷, 涡旋1min, 冰浴5min。离心样本20min, 转移上层溶液至1.5mL离心管, 加入250 μL 异丙醇, 涡旋1min, 置于冰浴10min, 离心样本20min。除去所有上清液, 加入500 μL 乙醇, 涡旋1min, 离心样本5min, 冰浴10min。重复此步骤3次。除去乙醇, 离心样本5min, 在通风橱中打开盖子风干样品10min。加入10 μL 无DNase/RNase超纯蒸馏水, 55°C 加热15min。

[0142] (4) cDNA合成: 用无DNase/RNase超纯蒸馏水将RNA样本稀释至1000ng/7 μL 。用含gDNA Eraser的PrimerScript RT试剂盒 (Takara; Cat no. RR047A) 将RNA合成为cDNA, 冰冻储存。

[0143] (5) 进行实时RT-PCR:

[0144] 为每个引物准备引物混合物及实时PCR主混合物。用无DNase/RNase超纯蒸馏水将cDNA样本稀释10倍。每孔PCR用96孔板加入9 μL PCR主混合物及1 μL 稀释cDNA样本。用光学胶膜密封PCR用96孔板, 离心孔板5min, 进行实时PCR扩增。

[0145] (6) 数据和结果计算: 收集实时PCR数据。Ct作为扩增结果, 以 β -actin基因扩增量作为管家基因, 计算每个基因 (coll1a1a, coll1a1b和coll1a2) 的相对表达量作为测试结果。

[0146] (7) 结果计算: 计算尾鳍修护促进率:

[0147] 抑制率 = $(E-F/F) \times 100\%$ ----- (3)

[0148] (3)式中:E—受试物处理组斑马鱼胶原蛋白基因相对表达量;F—空白对照组斑马鱼胶原蛋白基因相对表达量;对受试物处理组斑马鱼胶原蛋白基因相对表达量和空白对照组斑马鱼胶原蛋白基因相对表达量进行双尾T检验,取得p值。

[0149] (8)测试有效性验证:各测试组暴露完成后至少90%鱼胚胎存活,否则对应测试组结果无效。

[0150] 5、结果分析

[0151] 5.1、斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制实验结果如表3和图6所示,可以看出,样品在1%配方添加浓度下对斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制率为40% ($p=0.0000000020$)。样品能显著抑制斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集,具有舒缓效果,支持舒缓功效宣称。

[0152] 表3

	样品名称	黑参总皂苷提取物		
	样品编号	VI-20221857S-3		
[0153]	测试	配方添加浓度	结果	舒缓功效评价
	斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制率	1%	40% ($p=0.0000000020$)	显著

[0154] 5.2、斑马鱼胚胎行为学舒缓功效测试实验结果如图7所示,可以看出,黑参总皂苷提取物显著性缓解SDS对斑马鱼胚胎产生刺激,且刺激缓解与黑参总皂苷提取物的浓度呈现剂量依赖的趋势。值得注意的是,与阳性对照组相比,1%浓度下的黑参总皂苷提取物对SDS带来的刺激强度具有更好的缓解作用,提示了黑参总皂苷提取物可能具有较好的舒缓功效,甚至其的舒缓效果可能要强于阳性对照组(甘草酸二钾)。

[0155] 5.3、斑马鱼胚胎尾鳍修护促进率实验结果如表4和图8所示,可以看出,样品在1%配方添加浓度下对斑马鱼胚胎尾鳍修护促进率为11% ($p=0.011$)。样品能显著促进斑马鱼胚胎尾鳍再生,具有促进修护效果,可以作为修护功效的支持证据。

[0156] 表4

	样品名称	黑参总皂苷提取物		
	样品编号	VI-20221857S-3		
[0157]	测试	配方添加浓度	结果	修护功效评价
	斑马鱼胚胎尾鳍修护促进率	1%	11% ($p=0.011$)	显著

[0158] 5.4、斑马鱼I型胶原蛋白基因表达促进测试结果如表5和图9所示,可以看出,样品在0.2%配方添加浓度下对斑马鱼coll1a1a、coll1a1b和coll1a2基因表达的促进率分别为-18% ($p=0.015$), 38% ($p=0.0016$), 15% ($p=0.16$)。样品能显著促进斑马鱼coll1a1b基因

表达,具有促进I型胶原蛋白再生效果,支持抗皱和紧致功效宣称。

[0159] 表5

样品名称	黑参总皂苷提取物		
样品编号	VI-20221857S-3		
测试	配方添加浓度	结果	抗皱和紧致功效评价
[0160] 斑马鱼 I 型胶原蛋白基因 colla1a 表达促进率	0.2%	-18% (p=0.015)	显著
斑马鱼 I 型胶原蛋白基因 colla1b 表达促进率		38% (P=0.0016)	
斑马鱼 I 型胶原蛋白基因 colla2 表达促进率		15% (P=0.16)	

[0161] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

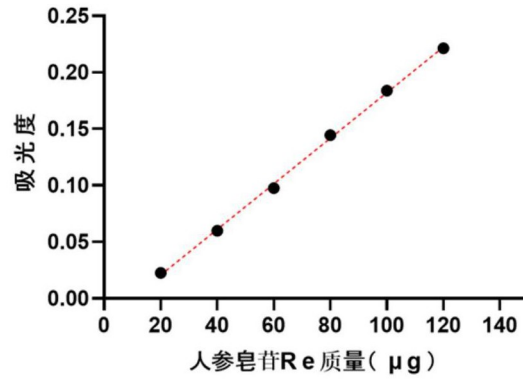


图1

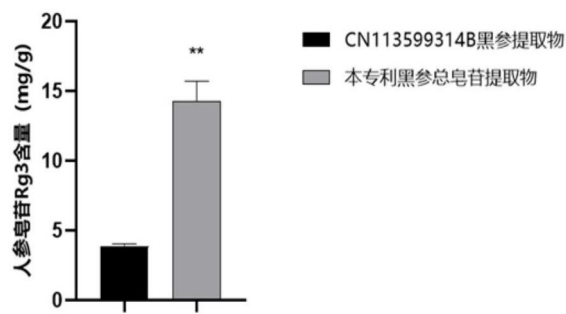


图2

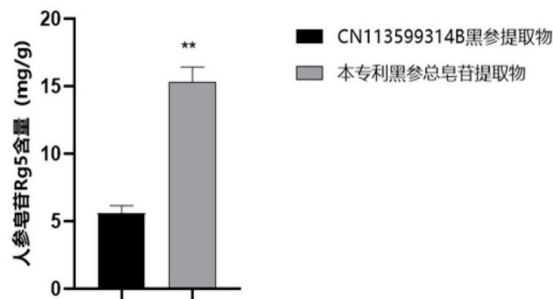


图3

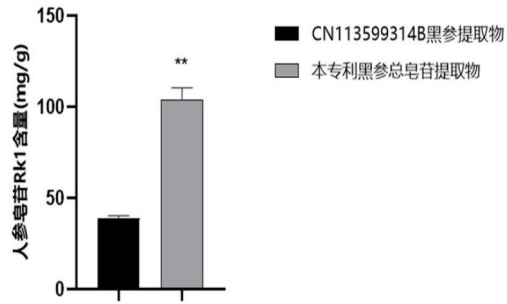


图4

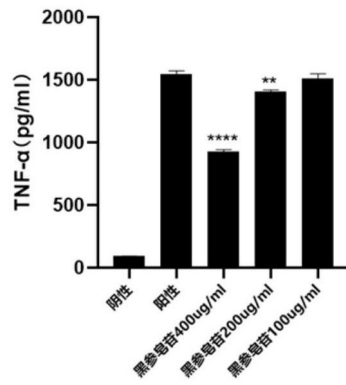


图5

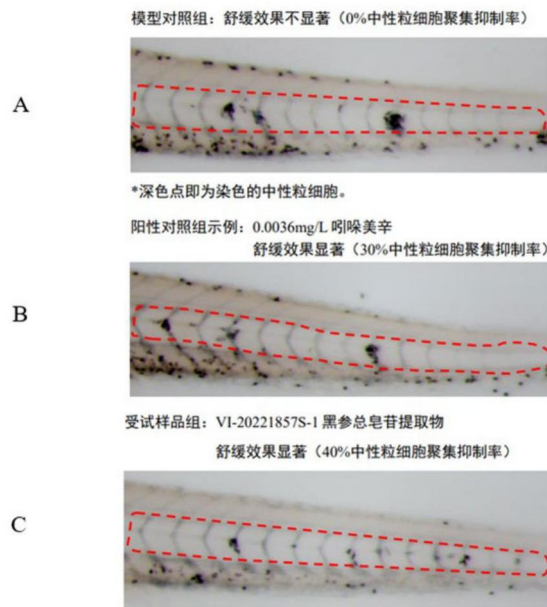


图6

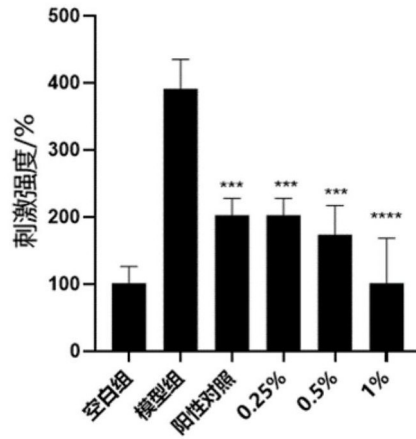


图7

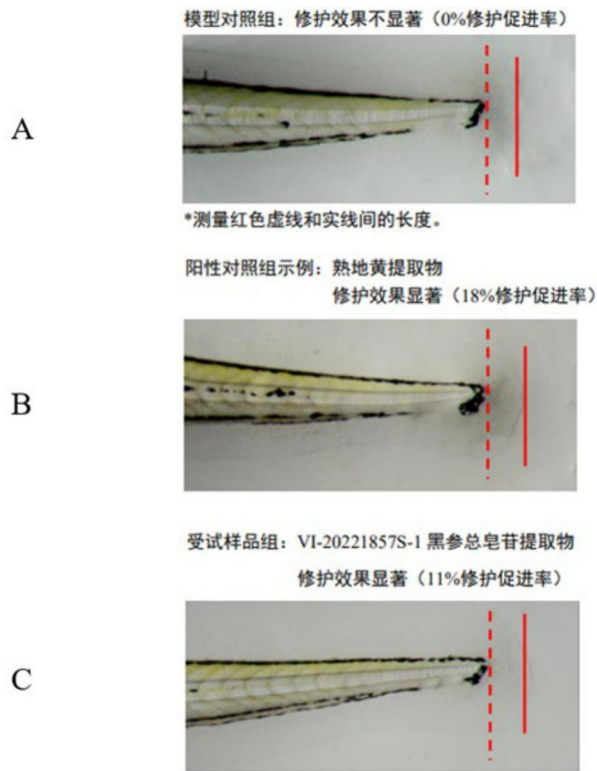
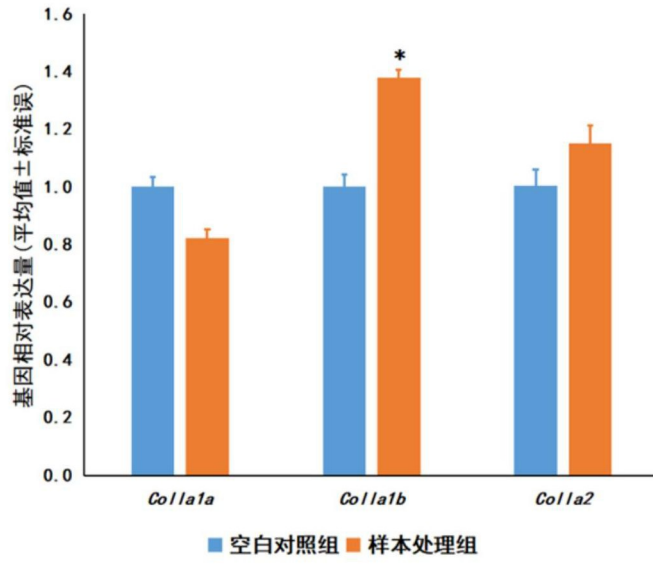


图8



* $p < 0.05$.

图9