



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0034561

(51)⁸ A61K 8/60; A61K 36/48; A61K 8/02; (13) B
A61Q 19/08; A61K 8/97; A61Q 19/00;
A61K 31/7048

(21) 1-2018-02836

(22) 28/09/2016

(86) PCT/KR2016/010848 28/09/2016

(87) WO 2018/062581 05/04/2018

(45) 25/01/2023 418

(43) 25/09/2019 378A

(73) AMOREPACIFIC CORPORATION (KR)

100, Hangang-daero, Yongsan-gu, Seoul, 04386, Republic of Korea

(72) Young Gyu KANG (KR); Myo Yeon KIM (KR); Hyang Tae CHOI (KR); Jun Seong PARK (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHẾ PHẨM BẢO CHẾ SỬ DỤNG BÊN NGOÀI DA CHỐNG LÃO HÓA CHỨA
XYANIDIN-3-O-GLUCOSIT VÀ TINH CHẤT ĐẬU NÀNH LÊN MEN (NATTO
GUM) LÀM THÀNH PHẦN HOẠT TÍNH

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm bảo chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm thành phần hoạt tính. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến chế phẩm bảo chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa hỗn hợp của xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men, nhờ đó có hiệu quả ức chế collagenaza. Chế phẩm bảo chế sử dụng bên ngoài da theo sáng chế có hiệu quả chống oxy hóa vượt trội như sự loại bỏ hiệu quả các gốc tự do có hại cho da, và hiệu quả chống lão hóa vượt trội như tăng cường độ đàn hồi của da và giảm nếp nhăn trên da thông qua sự ức chế hoạt tính và biểu hiện của collagenaza.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa hỗn hợp của xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men, nhờ đó thể hiện hiệu quả ức chế collagenaza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Da là lớp màng chắn bảo vệ chính của cơ thể người, thực hiện chức năng bảo vệ các cơ quan khác nhau trong cơ thể khỏi những thay đổi về nhiệt độ và độ ẩm, và các kích thích môi trường bên ngoài như là tia UV và các chất ô nhiễm, và đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự cân bằng nội môi *in vivo*. Tuy nhiên, các kích thích vật lý và hóa học quá mức từ môi trường bên ngoài, áp lực, thiếu hụt dinh dưỡng và các yếu tố tương tự làm suy giảm chức năng bình thường của da và gia tăng hiện tượng lão hóa da như là giảm độ đàn hồi, keratin hóa và hình thành nếp nhăn và hiện tượng tương tự.

Để ngăn ngừa các hiện tượng này và giữ cho da đàn hồi hơn và khỏe mạnh hơn, có các nỗ lực để sản xuất các mỹ phẩm chứa các chất có hoạt tính sinh lý thu được từ các loài thực vật, vi sinh vật và sinh vật tương tự khác, để duy trì chức năng bên trong của da và kích hoạt các tế bào da, do đó ngăn sự lão hóa da hiệu quả. Tuy nhiên, hầu hết các nguyên liệu thô làm mỹ phẩm hiện tại có các vấn đề khác nhau như thể hiện hiệu quả không đủ hoặc gây ra các tác dụng phụ cho da.

Xyanidin-3-O-glucosit là loại antoxyanin và cũng được gọi là chrysanthemin, và nó có cấu trúc trong đó xyanidin được liên kết bằng liên kết glycosidic với cacbon số 3 của

glucozo. Nó là sắc tố biểu thị các màu sắc khi được chứa nhiều trong trái cây như quả mọng và ngũ cốc, và được biết đến là có các hiệu quả chống oxy hóa. Ngoài ra, các báo cáo gần đây chỉ ra rằng xyanidin-3-O-glucosit có hiệu quả trong việc phòng ngừa ung thư hoặc các bệnh về tim (Cooke et al., International journal of cancer 119.9 (2006): 2213-2220; Serraino et al., Life sciences 73.9 (2003): 1097-1114). Tuy nhiên, người ta còn chưa biết liệu xyanidin-3-O-glucosit có hiệu quả chống lão hóa trong việc duy trì độ đàn hồi và cải thiện nếp nhăn trên da bằng cách ức chế hoạt tính của collagenaza.

Trong khi đó, tinh chất đậu nành lên men là chất có độ nhớt cao thu được khi đậu nành được lên men bởi các vi khuẩn gram dương được gọi là trực khuẩn còi *Bacillus subtilis*. Trong những năm gần đây, mỹ phẩm chứa tinh chất đậu nành lên men có hiệu quả giữ ẩm tốt cũng như có vai trò như chất làm đặc đã được đưa ra bán. Tuy nhiên, tương tự như xyanidin-3-O-glucosit, người ta còn chưa biết liệu tinh chất đậu nành lên men có hiệu quả chống lão hóa trong việc duy trì độ đàn hồi của da và cải thiện nếp nhăn trên da bằng cách ức chế hoạt tính của collagenaza hoặc liệu tinh chất đậu nành lên men có tăng cường hoạt tính chống oxy hóa hoặc hiệu quả chống lão hóa của xyanidin-3-O-glucosit.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nỗ lực để tìm ra chất tự nhiên có thể tối đa hóa hiệu quả chống lão hóa, và kết quả là đã phát hiện ra rằng chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men có thể ức chế sự hình thành các gốc tự do và triệt giảm hiệu quả biểu hiện của collagenaza và do đó thể hiện hiệu quả chống oxy hóa và hiệu quả chống lão hóa vượt trội, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Tài liệu kỹ thuật trước

Tài liệu phi sáng chế

1. Cooke et al., International journal of cancer 119.9 (2006): 2213-2220
2. Serraino et al., Life sciences 73.9 (2003): 1097-1114

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính ức chế sự hình thành các gốc tự do trong da và triệt giảm sự biểu hiện của collagenaza, nhờ đó có hiệu quả chống lão hóa.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để cải thiện độ đàn hồi của da chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để cải thiện nếp nhăn trên da chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các tác nhân để cải thiện độ đàn hồi của da để bào chế chế phẩm sử dụng bên ngoài da (cụ thể là, mỹ phẩm hoặc dược phẩm).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các tác nhân để cải thiện nếp nhăn trên da để bào chế chế phẩm sử dụng bên ngoài da (cụ thể là, mỹ phẩm hoặc dược phẩm).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo sáng chế có hiệu quả chống oxy hóa vượt trội như sự loại bỏ hiệu quả các gốc tự do có hại cho da, và hiệu quả chống lão hóa vượt trội như tăng cường độ đàn hồi của da và giảm nếp nhăn trên da thông qua sự ức chế hoạt tính và biểu hiện của collagenaza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Nhìn chung, các danh pháp được sử dụng trong bản mô tả này đã được biết đến phổ biến và có nghĩa thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

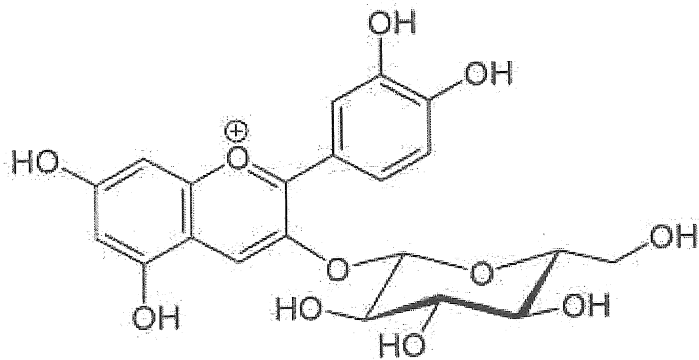
Theo phương án của sáng chế, hiệu quả ức chế của xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men lên quá trình oxy hóa DPPH được đo bằng cách trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men với lượng bằng nhau, và kết quả đã xác nhận rằng hỗn hợp trộn này thể hiện hiệu quả chống oxy hóa vượt trội hơn so với khi sử dụng xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men đơn lẻ, hoặc sử dụng tinh chất đậu nành lên men kết hợp với delphinidin-3-O-glucosit là loại sắc tố antoxyanin khác. Ngoài ra, hiệu quả ức chế của xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men đối với collagenaza được đo bằng cách trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men với lượng bằng nhau hoặc gần với lượng bằng nhau, và kết quả đã xác nhận rằng hỗn hợp trộn này thể hiện hiệu quả chống lão hóa vượt trội hơn so với việc sử dụng xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men đơn lẻ, hoặc sử dụng tinh chất đậu nành lên men kết hợp với delphinidin-3-O-glucosit.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính.

Ngoài ra, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để cải thiện độ đàn hồi da hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính.

Xyanidin-3-O-glucosit theo sáng chế có cấu trúc được biểu diễn bởi công thức hóa học 1 dưới đây, và có thể được chiết xuất trực tiếp từ thực vật giàu xyanidin-3-O-glucosit

bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này và, có thể mua và sử dụng xyanidin-3-O-glucosit và xyanidin-3-O-glucosit được sử dụng hoặc tinh sạch.



Công thức hóa học 1

Theo sáng chế, tinh chất đậu nành lên men được sản xuất bằng cách cấy trực khuẩn cở *Bacillus subtilis* hoặc vi khuẩn *Bacillus licheniformis* hoạt hóa vào trong các đậu nành và tiến hành lên men. Tinh chất đậu nành lên men là chất có độ nhớt sản sinh ra trên bề mặt của đậu nành khi trực khuẩn cở *Bacillus subtilis* hoặc vi khuẩn *Bacillus licheniformis* được cấy vào trong đậu nành và được lên men ở nhiệt độ xác định, và nó có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế ở dạng bột sau khi tinh sạch và kết tinh. Là loại hạt đậu được lên men để tạo ra tinh chất đậu nành lên men, hạt đậu nành được ưu tiên hơn cả, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Khi sử dụng chế phẩm, trong đó tinh chất đậu nành lên men được trộn với xyanidin-3-O-glucosit, giả sử rằng điện tích âm trên axit polygamma-glutamic chứa trong tinh chất đậu nành lên men tương tác với điện tích dương trên xyanidin-3-O-glucosit để cân bằng cấu trúc của xyanidin-3-O-glucosit, nhờ đó tiếp tục tăng cường hiệu quả chống oxy hóa và chống lão hóa của xyanidin glucosit.

Theo sáng chế, chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để chống lão hóa chứa xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm các thành phần hoạt tính có đặt điểm là nó thể hiện các hiệu quả chống lão hóa, cụ thể là, hiệu quả cải thiện nếp nhăn trên

da và hiệu quả cải thiện độ đàn hồi của da bằng cách triệt giảm sự biểu hiện của collagenaza là enzym phân hủy collagen của mô da và do đó giảm độ đàn hồi của da. Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này, “enzym phân hủy collagen” và “collagenaza” được sử dụng thay thế cho nhau.

Ngoài ra, theo sáng chế, xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men có thể được trộn với tỉ lệ nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:10, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:9, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:7, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:5, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:3, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3:2 đến 2:3, và còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5:4 đến 4:5, và tốt nhất là chúng có thể được trộn với tỉ lệ khối lượng là 1:1. Khi chúng được trộn theo tỉ lệ khối lượng nằm trong khoảng ở trên, hỗn hợp trộn này thích hợp để tối đa hóa hiệu quả ức chế của xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men đối với sự biểu hiện của collagenaza và có thể đáp ứng tính ổn định của chế phẩm.

Ngoài ra, theo sáng chế, chế phẩm có thể chứa xyanidin-3-O-glucosit với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5% theo khối lượng trên tổng khối lượng của chế phẩm, và chế phẩm chứa tinh chất đậu nành lên men với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5% theo khối lượng trên tổng khối lượng của chế phẩm. Khi tổng lượng của hai thành phần hoạt tính nhỏ hơn 0,02% theo khối lượng, thì hiệu quả ức chế đối với sự biểu hiện của collagenaza không đáng kể, và khi tổng lượng này vượt quá 10% theo khối lượng, thì độ nhớt của chế phẩm tăng quá mức.

Khi chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo sáng chế được bào chế thành dạng mỹ phẩm, hỗn hợp này có thể được bào chế thành dạng nước mỹ phẩm làm mềm da, nước mỹ phẩm làm se da, nước mỹ phẩm dưỡng da, kem mắt, kem dưỡng, kem mát xa, kem làm sạch, bột làm sạch, nước làm sạch, bột, tinh chất hoặc mặt nạ và các dạng của nó không bị giới hạn cụ thể. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất phụ gia thường được sử dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm hoặc lĩnh vực khoa học da bao gồm các chất

béo, dung môi hữu cơ, chất hòa tan, chất làm đặc, chất tạo keo hóa, chất làm mềm, chất chống oxy hóa, chất tạo huyền phù, chất làm ổn định, chất tạo bọt, chất tạo hương, chất có hoạt tính bề mặt, nước, chất nhũ tương hóa ion hoặc chất nhũ tương hóa không ion, chất độn, chất cô lập, chất tạo chelat, chất bảo quản, vitamin, chất chẹn, chất làm ẩm, tinh dầu, thuốc nhuộm, chất tạo màu, chất hoạt hóa ưa nước hoặc chất hoạt hóa kỵ nước, túi lipid hoặc các thành phần khác thường được sử dụng trong mỹ phẩm. Các chất phụ gia này được chứa với lượng thường được sử dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm hoặc lĩnh vực khoa học da. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa chất tăng cường sự hấp thụ của da để tăng hiệu quả cải thiện da.

Ngoài các chất được đề cập ở trên, chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo sáng chế có thể chứa các thành phần khác nằm trong khoảng mà không làm giảm hiệu quả chính, tốt hơn là có thể có tác dụng hiệp đồng với tác dụng chính. Ngoài ra, chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo sáng chế còn bao gồm các chất làm ẩm, chất làm mềm, chất hấp thụ tia cực tím, chất bảo quản, chất diệt khuẩn, chất chống oxy hóa, chất điều chỉnh pH, thuốc nhuộm hữu cơ hoặc vô cơ, chất tạo hương vị, chất làm lạnh hoặc chất chống chảy nhiều mồ hôi. Lượng trộn của các thành phần ở trên có thể dễ dàng được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong phạm vi không ảnh hưởng đến mục đích và hiệu quả của sáng chế, và lượng trộn có thể nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5% theo khối lượng, đặc biệt là, nằm trong khoảng từ 0,01% đến 3% theo khối lượng trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây bằng các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng các ví dụ được đưa ra chỉ với mục đích minh họa, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế sẽ được xác định bằng phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ tham chiếu 1

Sử dụng xyanidin-3-O-glucosit để thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế được mua từ Sigma.

Ví dụ tham chiếu 2

Như là ví dụ so sánh của chế phẩm theo sáng chế, sử dụng delphinidin-3-O-glucosit, là một loại antoxyanin, được mua từ Sigma.

Ví dụ tham chiếu 3

Tinh chất đậu nành lên men để thử nghiệm hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế được điều chế và sử dụng như sau:

(1) Quy trình khử trùng bằng nhiệt:

Các hạt đậu nành được ngâm trong nước khoảng từ 10 đến 15 giờ, rửa kỹ bằng nước ion hóa (nước chưng cất sơ cấp), và thực hiện khử trùng bằng nhiệt trong nồi hấp với nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 121°C trong khoảng 2 giờ.

(2) Quy trình nuôi cấy:

Các hạt đậu nành đã khử trùng được làm lạnh đến 40°C, và chất cấy hoạt hóa của trực khuẩn cò *Bacillus subtilis* được cấy với lượng từ 5 đến 10% của tổng khối lượng hạt đậu nành và sau đó nuôi ở 35°C đến 40°C trong 36 giờ. Trực khuẩn cò *Bacillus subtilis* được cấy với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^7 tế bào/ml đến 1×10^8 tế bào/ml trong dung dịch dinh dưỡng có nồng độ 8 g/l được sử dụng làm chất cấy.

(3) Quy trình chiết xuất và tinh sạch:

Bổ sung lượng nước ion hóa thích hợp vào môi trường nuôi cấy đậu nành đã được nuôi cấy, và khuấy hỗn hợp đủ để cho phép nguyên liệu nhót trên bề mặt của đậu nành được hòa tan trong nước ion hóa và sau đó được lọc để thu được phần chiết trong suốt.

(4) Quy trình kết tinh:

Bổ sung lượng dung môi thích hợp như metanol, etanol, axeton và các dung môi

tương tự vào phần chiết trong suốt để giảm độ tan trong nước để thu được kết tủa trắng. Sau đó, dung môi có trong kết tủa đã thu được làm khô bằng cách làm bay hơi để thu được bột tinh chất đậu nành lên men.

Điều chế các ví dụ từ 1 đến 3 và các ví dụ so sánh từ 1 đến 3

Các ví dụ từ 1 đến 3 được điều chế bằng cách trộn xyanidin-3-O-glucosid của ví dụ tham chiếu 1 và tinh chất đậu nành lên men được điều chế trong ví dụ tham chiếu 3 theo các tỉ lệ khối lượng được thể hiện trong bảng 1 dưới đây, và tổng khối lượng là giống nhau cho tất cả.

Ngoài ra, khi các ví dụ so sánh cho các ví dụ từ 1 đến 3, các ví dụ so sánh từ 1 đến 3 được điều chế bằng cách trộn delphinidin-3-O-glucosid của ví dụ tham chiếu 2 và tinh chất đậu nành lên men được điều chế trong ví dụ tham chiếu 3 theo các tỉ lệ khối lượng được thể hiện trong bảng 1 dưới đây, và tổng khối lượng là như nhau trong các ví dụ từ 1 đến 3.

Bảng 1

(Đơn vị: % khối lượng)

	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Xyanidin-3-O-glucosid	50	25	10	-	-	-
Delphinidin-3-O-glucosid	-	-	-	50	25	10
Tinh chất đậu nành lên men	50	75	90	50	75	90
Tổng cộng	100	100	100	100	100	100

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm hiệu quả chống oxy hóa

Để đánh giá hiệu quả chống oxy hóa của ví dụ 1 đến 3 là hỗn hợp của xyanidin-3-O-glucosid và tinh chất đậu nành lên men, hiệu quả ức chế của xyanidin-3-O-glucosid đơn

lẻ, tinh chất đậu nành lên men đơn lẻ, và các ví dụ so sánh từ 1 đến 3 trong đó delphinidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men được trộn, đối với sự oxy hóa DPPH được đo bằng sự thay đổi trong sự hấp thụ tạo ra bởi sự giảm DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) và so sánh.

Xyanidin-3-O-glucosit (ví dụ tham chiếu 1), tinh chất đậu nành lên men (ví dụ tham chiếu 3), các ví dụ từ 1 đến 3, các ví dụ so sánh từ 1 đến 3, và trolox là chất chống oxy hóa tổng hợp (đối chứng dương) được trộn với 190 μ l dung dịch DPPH 100 μ M (trong etanol) và điều chế thành mỗi hỗn hợp với nồng độ giống nhau là 10.000 ppm. Hỗn hợp được hòa tan đến nồng độ phản ứng cuối cùng lần lượt là 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, và 15,63 ppm, và bổ sung 10 μ l mỗi hỗn hợp để tạo ra dung dịch phản ứng và sau đó cho phản ứng ở 37°C trong 30 phút, và đo độ hấp thụ ở 540 nm. Các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 2 dưới đây, và IC₅₀ có nghĩa là nồng độ mẫu khi độ hấp thụ giảm 50% bởi mỗi mẫu bổ sung.

Bảng 2

Các chất thử nghiệm	IC ₅₀ (ppm)
Trolox (đối chứng dương)	43,3
Xyanidin-3-O-glucosit	231,5
Delphinidin-3-O-glucosit	287,5
Tinh chất đậu nành lên men	Không hiệu quả
Ví dụ 1	39,2
Ví dụ 2	108,5
Ví dụ 3	203,7
Ví dụ so sánh 1	58,6
Ví dụ so sánh 2	143,5
Ví dụ so sánh 3	255,8

Như được thể hiện trong bảng 2, khi tinh chất đậu nành lên men được sử dụng đơn lẻ, thì không có hiệu quả chống oxy hóa đáng kể. Tuy nhiên, ví dụ 1 trong đó trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng là 1:1 thể hiện giá trị IC50 tương tự như giá trị IC50 của trolox, chứng tỏ rằng hỗn hợp trộn này có hiệu quả chống oxy hóa vượt trội hơn so với khi sử dụng xyanidin-3-O-glucosit đơn lẻ. Ngoài ra, trong các trường hợp của ví dụ 2 trong đó trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng là 1:3 và ví dụ 3 trong đó trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng là 1:9, hiệu quả chống oxy hóa không vượt trội bằng hiệu quả chống oxy hóa theo ví dụ 1 có tỉ lệ khối lượng là 1:1, nhưng hiệu quả vượt trội hơn nhiều so với khi sử dụng xyanidin-3-O-glucosit đơn lẻ. Ngoài ra, các ví dụ từ 1 đến 3 có hiệu quả chống oxy hóa vượt trội hơn so với các ví dụ so sánh từ 1 đến 3, trong đó trộn delphinidin-3-O glucosit với tinh chất đậu nành lên men thay cho xyanidin-3-O-glucosit với lượng tương đương. Do đó, chế phẩm theo sáng chế được xác nhận rằng có các hiệu quả chống oxy hóa vượt trội.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm hiệu quả chống lão hóa

Để đánh giá hiệu quả chống lão hóa của ví dụ từ 1 đến 3, là hỗn hợp của xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men, khả năng ức chế của xyanidin-3-O-glucosit đơn lẻ, tinh chất đậu nành lên men đơn lẻ, và ví dụ so sánh từ 1 đến 3 trong đó trộn delphinidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men, về sản lượng collagenaza được đo bằng cách so sánh với tocopherol hoặc EGCG. Tocopherol và EGCG là các chất đã được biết đến là có chức năng ngăn sự lão hóa của da bằng cách tái sinh các tế bào biểu bì của da.

Nguyên bào sợi người (được sản xuất bởi Cascade Biologics) (Portland, OR, Hoa Kỳ) được gieo giống với lượng 5.000 tế bào/giếng trong đĩa chuẩn mirco 96 giếng chứa môi trường DMEM chứa 2,5% theo khối lượng huyết thanh bào thai bò, và nuôi cấy cho đến khi phát triển đến khoảng 90%. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong DMEM không

có huyết thanh trong 24 giờ, sau đó xử lý bằng 10 μ g xyanidin-3-O-glucosit (ví dụ tham chiếu 1), tinh chất đậu nành lên men (ví dụ tham chiếu 2), các ví dụ từ 1 đến 3, các ví dụ so sánh từ 1 đến 3 được hòa tan trong DMEM không có huyết thanh ở cùng nồng độ là 50 ppm trong 24 giờ và sau đó được xử lý với mỗi tocophrol và EGCG (được sản xuất bởi Sigma Aldrich) ở nồng độ là 50 μ M trong 24 giờ. Và, sau đó thu môi trường nuôi cấy tế bào.

Sau đó, đo mức sản lượng của collagenaza trong môi trường nuôi cấy tế bào được thu bằng cách sử dụng thiết bị đo collagenaza (Amersham Pharmacia, Hoa Kỳ). Đầu tiên, bổ sung môi trường nuôi cấy tế bào đã thu vào đĩa 96 giếng phủ đồng đều các kháng thể collagenaza sơ cấp, và thực hiện phản ứng kháng thể-kháng nguyên trong máy điều nhiệt (36°C) trong 3 giờ.

Sau 3 giờ, bổ sung các kháng thể collagenaza thứ cấp liên kết với nhóm mang màu (chromophore) vào đĩa 96 giếng và phản ứng trong 15 phút. Sau 15 phút, bổ sung chất cảm ứng hiện màu để thực hiện hiện màu ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và khi bổ sung axit sulfuric 1M lần nữa để dừng phản ứng (hiện màu), màu của dung dịch phản ứng xuất hiện là màu vàng, và điều này xác nhận rằng mức độ màu vàng là khác nhau phụ thuộc vào tiến trình phản ứng.

Sự hấp thụ của đĩa 96 giếng có màu vàng được đo ở 450 nm sử dụng máy đo hấp thụ, và tính toán mức độ tổng hợp collagenaza bằng phương trình tính toán 1 dưới đây. Ở đây, độ hấp thụ phản ứng của môi trường nuôi cấy tế bào thu được từ nhóm trong đó không có thành phần được xử lý được sử dụng làm đối chứng. Tức là, mức độ biểu hiện của collagenaza trong nhóm không được xử lý được đặt là 100, và mức độ biểu hiện của collagenaza trong các nhóm được xử lý bằng các chất thử nghiệm được xác định tương đối. Các kết quả được minh họa trong bảng 3 dưới đây.

Phương trình tính toán 1

$$\text{Mức độ biểu hiện của collagenaza (\%)} = \frac{\text{Độ hấp thụ của nhóm tế bào được xử lý chất thử nghiệm}}{\text{Độ hấp thụ của nhóm đối chứng}} \times 100$$

Bảng 3

Các chất thử nghiệm	Mức độ biểu hiện của collagenaza (%)
Nhóm không được xử lý	100
Tocopherol	73
EGCG	59
Xyanidin-3-O-glucosit	78
delphinidin-3-O-glucosit	84
Tinh chất đậu nành lên men	94
Ví dụ 1	51
Ví dụ 2	67
Ví dụ 3	75
Ví dụ so sánh 1	61
Ví dụ so sánh 2	73
Ví dụ so sánh 3	80

Như được minh họa trong bảng 3, khi sử dụng tinh chất đậu nành lên men đơn lẻ, sự biểu hiện của collagenaza khó bị ức chế. Tuy nhiên, ví dụ 1 trong đó trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng là 1:1 ức chế hiệu quả biểu hiện của collagenaza *in vitro* so với khi sử dụng xyanidin-3-O-glucosit đơn lẻ, và có khả năng ức chế tuyệt vời sự biểu hiện của collagenaza so với tocopherol và EGCG đã được biết là các chất chống lão hóa. Ngoài ra, trong các trường hợp ví dụ 2 trong đó trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng là 1:3, và ví dụ 3 trong đó trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng là

1:9, hiệu quả ức chế sự biểu hiện của collagenaza là không vượt trội bằng ví dụ 1 có tỉ lệ khối lượng là 1:1, nhưng hiệu quả vượt trội hơn nhiều so với khi sử dụng xyanidin-3-O-glucosit đơn lẻ. Ngoài ra, các ví dụ từ 1 đến 3 có hiệu quả ức chế biểu hiện của collagenaza vượt trội hơn so với các ví dụ so sánh từ 1 đến 3, trong đó trộn delphinidin-3-O-glucosit với tinh chất đậu nành lên men thay cho xyanidin-3-O-glucosit với lượng tương đương. Do đó, điều này xác nhận rằng chế phẩm theo sáng chế có các hiệu quả chống lão hóa, cụ thể là, hiệu quả cải thiện độ đàn hồi của da và cải thiện nếp nhăn trên da bằng cách ức chế biểu hiện của collagenaza.

Mặc dù các phần cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các kỹ thuật cụ thể chỉ đơn thuần là các phương án ưu tiên và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế sẽ được xác định bằng phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ngoài ra, ví dụ về công thức của chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da chứa chế phẩm theo sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn dưới đây. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ công thức 1: Nước mỹ phẩm dưỡng da

Điều chế nước mỹ phẩm dưỡng da theo phương thức thông thường có thành phần được thể hiện trong bảng 4 dưới đây (đơn vị: % khối lượng).

Bảng 4

Các thành phần	Lượng
Nước tinh khiết	Lượng dư
Glyxerin	8,0
Butylen glycol	4,0
Chiết xuất axit hyaluronic	5,0
Beta glucan	7,0

Cacbome	0,1
Xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men (ví dụ 1)	0,05
Caprylic/capric triglyxerit	8,0
Squalen	5,0
Xetearyl glucosit	1,5
Sorbitan stearat	0,4
Xetearyl ancol	1,0
Trietanolamin	0,1

Ví dụ công thức 2: Kem dưỡng

Điều chế kem dưỡng theo phương thức thông thường có thành phần được thể hiện trong bảng 5 dưới đây (đơn vị: % khối lượng).

Bảng 5

Các thành phần	Lượng
Nước tinh khiết	Lượng dư
Glyxerin	3,0
Butylen glycol	3,0
Parafin lỏng	7,0
Beta glucan	7,0
Cacbome	0,1
Xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men (ví dụ 1)	3,0
Caprylic/capric triglyxerit	3,0
Squalen	5,0

Xetearyl glucosit	1,5
Sorbitan stearat	0,4
Polysorbat 60	1,2
Trietanolamin	0,1

Ví dụ công thức 3: Kem mát xa

Điều chế kem mát xa theo phương thức thông thường có thành phần được thể hiện trong bảng 6 dưới đây (đơn vị: % khối lượng).

Bảng 6

Các thành phần	Lượng
Nước tinh khiết	Lượng dư
Glyxerin	8,0
Butylen glycol	4,0
Parafin lỏng	45,0
Beta glucan	7,0
Cacbome	0,1
Xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men (ví dụ 1)	1,0
Caprylic/capric triglyxerit	3,0
Sáp ong	4,0
Xetearyl glucosit	1,5
Sorbitan sesquioleat	0,9
Vaselin	3,0
Parafin	1,5

Ví dụ công thức 4: Mặt nạ

Điều chế mặt nạ theo phương thức thông thường có thành phần được thể hiện trong bảng 7 dưới đây (đơn vị: % khối lượng).

Bảng 7

Các thành phần	Lượng
Nước tinh khiết	Lượng dư
Glycerin	4,0
Rượu polyvinyl	15,0
Chiết xuất axit hyaluronic	5,0
Beta glucan	7,0
Allantoin	0,1
Xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men (ví dụ 1)	0,5
Nonylphenyl ete	0,4
Polysorbat 60	1,2
Etanol	6,0

Ví dụ công thức 5: Thuốc mỡ trong chế phẩm sử dụng bên ngoài da

Điều chế thuốc mỡ theo phương thức thông thường có thành phần được thể hiện trong bảng 8 dưới đây (đơn vị: % khối lượng).

Bảng 8

Các thành phần	Lượng
Nước tinh khiết	Lượng dư
Glycerin	8,0
Butylen glycol	4,0
Parafin lỏng	15,0

Beta glucan	7,0
Cacbome	0,1
Xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men (ví dụ 1)	1,0
Caprylic/capric triglyxerit	3,0
Squalen	1,0
Xetearyl glucosit	1,5
Sorbitan stearat	0,4
Xetearyl ancol	1,0
Sáp ong	4,0

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da để cải thiện độ đàn hồi của da và cải thiện nếp nhăn trên da chứa hỗn hợp xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men làm thành phần hoạt tính,

trong đó hỗn hợp được bào chế bằng cách trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:10.

2. Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo điểm 1, trong đó tinh chất đậu nành lên men được sản xuất bằng cách cấy trực khuẩn cở *Bacillus subtilis* hoặc vi khuẩn *Bacillus licheniformis* hoạt hóa vào đậu nành và thực hiện lên men.

3. Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo điểm 2, trong đó tinh chất đậu nành lên men được sản xuất bằng cách cấy trực khuẩn cở *Bacillus subtilis* hoạt hóa vào đậu nành và thực hiện lên men.

4. Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo điểm 1, trong đó hỗn hợp được bào chế bằng cách trộn xyanidin-3-O-glucosit và tinh chất đậu nành lên men theo tỉ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:3.

5. Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa xyanidin-3-O-glucosit với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5% theo khối lượng trên tổng khối lượng của chế phẩm, và chế phẩm này chứa tinh chất đậu nành lên men với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 5% theo khối lượng trên tổng khối lượng của chế phẩm.

6. Chế phẩm bào chế sử dụng bên ngoài da theo điểm 1, trong đó khi chế phẩm sử dụng bên ngoài da được bào chế ở dạng mỹ phẩm, chế phẩm này được bào chế thành dạng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm nước mỹ phẩm làm mềm da, nước mỹ phẩm làm se da, nước mỹ phẩm dưỡng da, kem mắt, kem dưỡng, kem mát xa, kem làm sạch, bột làm sạch, nước làm sạch, dạng bột, tinh chất và mặt nạ.