

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>  
A61K 7/48



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00807527.1

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1198577C

[22] 申请日 2000.2.14 [21] 申请号 00807527.1

[30] 优先权

[32] 1999.3.18 [33] US [31] 60/124,959

[86] 国际申请 PCT/EP2000/001180 2000.2.14

[87] 国际公布 WO2000/056270 英 2000.9.28

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.13

[71] 专利权人 荷兰联合利华有限公司

地址 荷兰鹿特丹

[72] 发明人 S·穆克赫杰 D·里克

S·S·哈比夫 R·L·魏因考夫

审查员 王灵茹

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 39 页

[54] 发明名称 皮肤化妆品组合物

[57] 摘要

含有葡聚糖或麦芽糖糊精和弱羧酸的皮肤化妆品组合物。葡聚糖增强弱酸的抗衰老活性，并减轻有时由弱酸性活性物质引起的皮肤刺激性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种皮肤化妆品组合物，它包含：
  - (i) 占组合物重量 0.5-20%的葡聚糖或麦芽糖糊精；
  - 5 (ii) 选自乙醇酸和乳酸的、占组合物重量 4-20%的具有高于 2 的 pKa 的弱羧酸；  
和
  - (iii) 化妆上可接受的载体，  
其中所述的组合物是水包油型乳状液，并所述组合物的 pH 为 3
- 10 - 6。
  2. 一种处理衰老、光致老化、干燥、有细纹或皱纹皮肤的非治疗用途的化妆方法，该方法包括在所述皮肤上涂抹权利要求 1 的组合物。
  3. 一种减轻由弱羧酸引起的皮肤刺激性或刺痛的非治疗用途的
  - 15 化妆方法，该方法包括局部使用占组合物重量 0.5-20%的在化妆上可接受的载体中的葡聚糖或麦芽糖糊精。

## 皮肤化妆品组合物

### 5 本发明领域

用于人体皮肤的化妆品组合物，它包含葡聚糖或麦芽糖糊精和弱羧酸。

### 10 本发明背景

改善皮肤外观的化妆产品逐渐受到消费者的欢迎。消费者经常力图减轻或延缓皮肤衰老或光致老化(如有细纹和皱纹)、干燥和松垂的迹象。除了抗衰老之外消费者还追求化妆品的其它益处。

15 用在局部使用产品中的一些成分具有潜在的刺激性，尤其是对于具有“敏感性皮肤”的人群。这种刺激性通常感受为刺痛或烧灼感。

例如，已经证实羧基酸和一些其它弱羧酸可以传递化妆品的益处，如改善光致损伤或自然衰老的皮肤的外观、使皮肤具有光泽、  
20 治疗老年斑等。不幸的是，它们在高浓度下的使用偶尔可能会刺激皮肤，如使用后皮肤发红和有刺痛感。出于美学的原因，最常以水包油型乳状液的形式来传递这些活性物质。实际上，为了防止对皮肤组织的有害影响和不能接受的刺激程度，最终组合物的 pH 应当高于 3。当水溶性弱酸从酸性 pH 下的水包油型乳状液中释放出来时，  
25 它常常引起严重的刺痛。刺痛在使用之后瞬间产生，通常在使用之后 5-8 分钟达到最强，然后强度开始减小。

可以通过降低组合物中活性成分的含量或者通过减少活性成分对皮肤的渗透来改善刺激性。这两种方法的一个严重缺陷在于削弱了功效。可以通过提高组合物的 pH 来减轻与弱酸相关的刺激性，但

是由于该方法减少了酸对皮肤的渗透，从而降低了功效。理想的是既减轻或消除弱酸的潜在刺激性，同时又保持它们的功效。

因此，需要用来防止或减轻皮肤刺激性的组合物和方法。

5 Coury 等(美国专利 5,618,850)公开了包含与葡聚糖聚合物共轭的多羟基酸的化妆品组合物。EP 691126 (Beiersdorf)公开了用于治疗敏感性皮肤的具有低潜在刺痛的化妆品组合物。该组合物含有色素以整合 AHA。Coury 和 Beirsdorf 公开的组合物的一个严重缺点是共轭或螯合作用显著降低了活性物质的传递以及其功效。目前使用的绝大多数活性物质的分子量低于 1000 道尔顿。活性物质对皮肤的渗透  
10 随其分子量急剧下降(参考: Transdermal Delivery of Drugs; 第 III 卷, 7-8 页。Agis F. Kydonieus and Bret Berner (ed) CRC Press, Inc Boca Raton, Fl, 1987)。聚合物具有高(>>1000 道尔顿)分子量。活性物质与聚合物葡聚糖的共轭使其成为高分子量的分子，因此将显著降低它的渗透。

15 D1 (WO 98/56345)公开了一种包含环糊精化合物和水杨酸或水杨酸的衍生物、局部涂于皮肤的化妆品组合物，该组合物是硅氧烷包水型乳状液的形式。

D4 (Drug and Cosmetic Industry, Jan 1994, 24 页)公开了 $\alpha$ -羟基酸在治疗干燥和极干燥皮肤以及清洁毛孔中的应用。

20 弱酸的螯合将减少可用于传递的酸的量。

减轻刺痛的另一方法是用强的碱金属碱来配制酸。Yu 等(美国专利 4,105,783)建议使用氢氧化铵或有机碱。不幸的是，该方法提高了组合物的 pH，降低了弱酸渗透皮肤的能力，因此降低了其功效(参见 Sah 等, J. Cosmet. Sci. 49, 257-273, 1998)。

25 明确地存在对于含弱酸的化妆品组合物的需求，该组合物可减轻刺痛但不降低皮肤的传递。

LAREX 的公告(1998 年 3 月 23 日)公开了使用多糖(阿拉伯半乳聚糖)来增强含 80%  $\alpha$ -羟基酸的护肤乳液的脱落性能，并且这样做并

没有增加刺激性。但是本发明的目的是降低刺激性，而不是仅仅不使其增加。作为本发明的一部分，发现其它多糖、葡聚糖和麦芽糖糊精可降低由于使用弱羧酸而引起的刺激性，但阿拉伯半乳聚糖则没有这种效果。此外，发现葡聚糖可增强羟基酸的抗衰老功效，这一点与阿拉伯半乳聚糖不同。

5

## 本发明简述

本发明提供了一种皮肤化妆品组合物，它包含：

- 5 (i) 占组合物重量 0.5-20% 的葡聚糖或麦芽糖糊精；  
(ii) 占组合物重量 0.01-20% 的具有高于约 2 的 pKa 的弱羧酸；  
和  
(iii) 化妆上可接受的载体。

10 本发明也包括使皮肤中的成纤维细胞和角化细胞分化来刺激胶原合成的化妆方法，该方法通过将本发明的组合物涂在皮肤上来进行。

本发明也包括一种化妆方法，该方法通过将本发明的组合物涂在皮肤上来治疗或延缓衰老、慢性老化(chronoaged)、光致老化、干燥、有细纹或皱纹的皮肤；增加角质层的坚固性和弹性；改善肤色；并逐渐提高皮肤质量。

15 本发明还提供了一种用于降低由局部使用含弱羧酸的组合物引起的皮肤刺激性的方法，该方法包括局部使用在化妆上可接受的载体中的葡聚糖或麦芽糖糊精。因此，根据本发明的这种方法，葡聚糖或麦芽糖糊精可以与弱酸共存于同一组合物中，或者它可以由单独的组合物使用。

20

## 本发明详述

除特别指出外，所有的量都按水包油型乳状液的重量计。

25 本文中所用的术语“皮肤”包括脸、脖子、胸部、背部、手臂、腋窝、手和头皮的皮肤。

本文中所用的术语“刺激性”、“刺痛”和“烧灼感”、“发炎”和“发红”是同义词，可互换使用。

分子量以道尔顿(D)表示。后面有字母“KD”的数字表示化合物

的分子量，读作数字 x 1,000，例如 10 KD 指 10,000 D 的分子量。

### 葡聚糖

5 葡聚糖和麦芽糖糊精都是葡萄糖均聚物。

葡聚糖是具有几个葡萄糖侧链的 $\beta$ -1,6-葡聚糖，侧链主要通过 1,3-键，但是部分也通过 1,4-和 1,2-键结合到大分子的主链上。平均来说，在主链中存在 95%的葡萄糖残基。它是通过某种细菌由含有蔗糖的营养培养基产生的。葡聚糖的分子量通常在 5 KD - 2,000 KD 范围内，  
10 优选 5 KD - 1,000 KD，以保持抗刺激性功效，并最低程度增加制剂的粘度。

### 麦芽糖糊精

15 麦芽糖糊精 $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$  (CAS Reg. No. 9050-36-6)是无甜味的营养糖类聚合物，由主要通过 $\alpha$ -1,4-键连接的 D-葡萄糖单元构成，具有小于 20 的 DE (葡萄糖当量)。它们是通过用安全和适当的酸和/或酶使玉米淀粉部分水解，以白色粉末或浓缩溶液的形式得到的。麦芽糖糊精的适当来源是 Grain Processing Corp.的 Maltrin<sup>®</sup>。Maltrin<sup>®</sup>含  
20 有麦芽糖糊精和玉米糖浆固体。

本发明组合物中葡聚糖或麦芽糖糊精的量为组合物重量的 0.5 - 20%，优选 1 - 15%，最优选 1 - 10%。

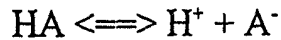
### 弱羧酸

25

适合用于本发明组合物的弱羧酸为离解常数 pKa 高于约 2 的酸。优选 pKa 高于约 3，最优选在约 3-约 5 的范围内。

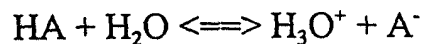
### pKa 的概念

酸是具有失去质子趋势的一类物质，而碱是具有接受质子趋势的一类物质。因此每种酸 HA 都有一种共轭碱 A<sup>-</sup>：



5 因此，乳酸-乳酸盐离子是共轭酸-碱对的一个例子。

这样定义的酸只能通过与碱反应表现出它们的特性。在水溶液中，酸与水反应，后者作为碱。



10 由下述平衡常数表达式定量地给出了相对于水的碱浓度的 HA 的酸浓度：

$$K = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-] / [\text{H}_2\text{O}][\text{HA}] ,$$

其中括号表示摩尔浓度。

15 由于几乎所有的测量都在稀释的水溶液中进行，水的浓度基本上保持恒定，其活性可以被认为是一致的。用 H<sup>+</sup>表示溶剂化质子，我们有：

$$K_a = [\text{H}^+][\text{A}^-] / [\text{HA}] ,$$

其中 K<sub>a</sub> 是酸的解离(或电离)常数。该式可被写成下面的形式：

$$\text{pK}_a = \text{pH} + \log [\text{HA}] / [\text{A}^-]$$

其中 pK<sub>a</sub> 是 K<sub>a</sub> 的反对数，当 HA 与 A<sup>-</sup> 的浓度相等时，pK<sub>a</sub> 等于 pH。

20 α-羧基酸的 pK<sub>a</sub> 通常在 2-4 之间，一元羧酸的 pK<sub>a</sub> 在 3-5 之间，α-氨基酸的 pK<sub>a</sub> 在 2-3 之间，水杨酸的 pK<sub>a</sub> 为 3.0。

通过用强碱如氢氧化钠(NaOH)进行滴定，得到弱水溶性酸的 pK<sub>a</sub>。在滴定中点，即加入了 0.5 摩尔当量碱的点的截距，在数值上等于酸的 pK<sub>a</sub>。

25 测定一个已知弱酸的 pK<sub>a</sub> 的步骤如下：

### 材料

待测定其 pK<sub>a</sub> 的纯酸样品；无 CO<sub>2</sub> 的去离子蒸馏水(通过使去离

子蒸馏水沸腾5分钟制得); 检定为 0.1005-0.0995 N 的商品 0.1 N NaOH 容量标准, 如 Fisher Scientific SS276; 校准为 100 ml 的玻璃滴定管; 125 ml 锥形瓶 pH 仪, 如具有用于 pH 的标准组合电极的 Corning Model 140; 在 25°C 检定至  $\pm 0.01$  pH 单位的 pH 缓冲剂, pH 分别为 4.00、7.00 和 10.00, 如 Fisher Scientific SB101、SB107 和 SB115; 磁力搅拌器。

### 方法

确定所有的玻璃器皿和设备都是清洁的。根据需要进行酸洗。准备至少 50 ml 酸的 0.1 当量溶液, 用于在无  $\text{CO}_2$  的蒸馏水中测定其 pKa。避免过分摇动以免将  $\text{CO}_2$  引入溶液。将最终溶液盖上直到使用之前。根据 pH 仪生产商的说明书, 用三种 pH 为 7.00、3.00 和 10.00 的缓冲剂校准 pH 仪。在样品中用去离子水清洗电极。用 0.1 N NaOH 标准溶液装满滴定管。将 50.0 ml 的 0.1 N 酸溶液加入到 125 ml 锥形瓶中。将搅拌棒放入锥形瓶。

将 pH 电极插入酸溶液。放置并固定电极, 以使其不妨碍搅拌棒。记录下初始 pH。开始缓慢搅拌, 使 pH 读数不受影响。在烧瓶上安置滴定管, 以向 0.1 N 酸溶液中增量加入 0.1 N 标准 NaOH。检验初始 pH 并开始增量加入碱。记录加入碱的体积和得到的 pH 读数。目的是记录 0.2 - 0.3 单位的 pH 变化或约 5 ml 的体积增加, 无论哪个首先达到上述变化。继续增量加入直到加入了至少 60 ml 碱, 并且 pH 不再急剧变化。

以碱的体积作为 x 轴, pH 作为 y 轴, 将得到的数据绘制成图。绘出观察到的点, 并将这些点连成一条光滑曲线。确定加入碱的体积以得到当量点, 即在该体积下加入了 1 标准当量的碱, 并且酸被完全中和: 当曲线的陡斜部分为垂直时, 当量点体积相当于曲线垂直部分处的碱的体积。如果曲线的陡斜部分不垂直, 可通过找出在界定 pH 急剧变化的两个端点处的碱的体积来得到当量点。这两个体

积的平均值即为当量点。

为了确定 pKa, 首先通过将当量点的碱的体积二等分(即 $\div 2$ )找出滴定中点。滴定的中点是指在该点加入了 0.5 标准当量的碱, 并且一半(50%)的酸被中和, 对应于滴定中点的 pH 为酸的 pKa。这是在 50% 的酸被中和时的 pH, 也就是说酸的 50% 以非离子形式的分子存在, 50% 以阴离子形式存在。

适当的弱羧酸的例子包括但不限于:  $\alpha$ -或 $\beta$ -羟基酸、二羧酸、三羧酸、抗坏血酸、草氨酸以及它们的混合物。由于它们的抗衰老功效, 优选的羧酸为:

酸	pKa
乙醇酸	3.8
乳酸	3.8
苹果酸	3.4
$\beta$ -羟基丁酸	4.7
乙酸	4.75
琥珀酸	4.2
柠檬酸	3.1
抗坏血酸	4.1
水杨酸	3.0
草氨酸	2.4

10 以及它们的混合物。

本发明组合物中弱酸的量为组合物重量的 0.01-20%, 优选 1-15%, 最优选 2-12%。在低于 2% 的酸浓度下有极轻微的刺痛; 在高于 12% 的浓度下抗衰老功效没有显著增加。

应当理解, 根据组合物 pH 的不同, 酸可以以盐的形式存在, 如铵或钾或钠盐。

15 虽然本发明组合物可以具有通常在 2.5-10 范围内的任何 pH, 但是当其处于酸性 pH 下时, 优选在 3-6, 最优选在 3-5 的 pH 下时, 本

发明的组合物特别有用，这是由于这样的组合物虽然有效，但特别有刺激性。

5 本发明的组合物含化妆上可接受的载体来作为弱羧酸和葡聚糖或麦芽糖糊精的稀释剂、分散剂或载体，从而当该组合物被用于皮肤时促进它们的分布。

载体可以是含水的或是乳状液。当存在水时，它的量可以在 5-99% 重量范围内，优选 40-90% 重量，最理想的是在 50-85% 重量之间。

10 根据本发明，优选载体含至少占载体重量 50% 的水。为了提高羟基酸的皮肤传递，优选本发明组合物为水包油型乳状液(参见 Sah 等, J. Cosmet. Sci. 49, 257-273, 1998)。这样改进的传递经常伴随着刺激性/刺痛的增加，使得葡聚糖在这种乳状液中的使用变得特别关键。在优选的本发明的水包油型乳状液中，按组合物重量计，水占本发明乳状液重量的至少 50%，最优选 50-85% 重量。

15 除了水以外，相对挥发的溶剂也可以在本发明的组合物中作为载体。最优选的是一羟基  $C_1-C_3$  链烷醇。这类醇包括乙醇、甲醇和异丙醇。一羟基链烷醇的量可以在 1-70% 重量范围内，优选 10-50% 重量，最理想的是 15-40% 重量。

20 润肤材料也可以作为化妆上可接受的载体。这些材料可以是硅油和合成酯的形式。润肤剂的量可以是 0.1-50% 重量范围内的任何一点，优选在 1-20% 重量。

25 硅油可被分为挥发性和非挥发性。本文中所用的术语“挥发性物质”指那些在环境温度下具有可测量的蒸气压的物质。优选挥发性硅油选自含 3-9 个，优选 4-5 个硅原子的环状或线性聚二甲基硅氧烷。线性挥发性硅氧烷材料在 25°C 的粘度通常小于约 5 Mpas (厘沲)，而环状材料的粘度通常小于约 10 Mpas (厘沲)。用作润肤材料的非挥发性硅油包括聚烷基硅氧烷、聚烷基芳基硅氧烷和聚醚硅氧烷共聚物。在本发明中有用的基本上不挥发的聚烷基硅氧烷包括，例如在 25°C 的粘度为约 5-约 2500 万 Mpas (厘沲) 的聚二甲基硅氧烷。优选的

用在本发明组合物中的非挥发性润肤剂为在 25℃ 的粘度为约 10-约 400 Mpas (厘沲)的聚二甲基硅氧烷。

酯润肤剂有:

(1) 具有 10-20 个碳原子的脂肪酸的链烯基或烷基酯。它的例子  
5 包括新戊酸异二十醇酯、异壬酸异壬酯、肉豆蔻酸油酯、硬脂酸油酯和油酸油酯。

(2) 醚-酯, 如乙氧基化脂肪醇的脂肪酸酯。

(3) 多元醇酯。令人满意的多元醇酯有一和二脂肪酸乙二醇酯、  
一和二脂肪酸二乙二醇酯、一和二脂肪酸聚乙二醇(200-6000)酯、一  
10 和二脂肪酸丙二醇酯、单油酸聚丙二醇 2000 酯、单硬脂酸聚丙二醇  
2000 酯、单硬脂酸乙氧基化丙二醇酯、一和二脂肪酸甘油酯、聚脂  
肪酸聚甘油酯、单硬脂酸乙氧基化甘油酯、单硬脂酸 1,3-丁二醇酯、  
二硬脂酸 1,3-丁二醇酯、脂肪酸聚氧乙烯多元醇酯、脂肪酸失水山梨  
醇酯和脂肪酸聚氧乙烯失水山梨醇酯。

(4) 蜡酯, 如蜂蜡、鲸蜡、肉豆蔻酸肉豆蔻酯、硬脂酸硬脂醇酯  
15 和山萘酸二十醇酯。

(5) 甾醇酯, 它的例子有脂肪酸胆甾醇酯。

本发明的组合物中也可以包括具有 10-30 个碳原子的脂肪酸作为  
化妆上可接受的载体。这类物质的例子有壬酸、月桂酸、肉豆蔻酸、  
20 棕榈酸、硬脂酸、异硬脂酸、羟基硬脂酸、油酸、亚油酸、蓖麻油  
酸、花生酸、山萘酸和芥酸。

本发明的组合物中也可以使用多元醇型的保湿剂作为化妆上可  
接受的载体。保湿剂有助于增加润肤剂的功效, 减少起皮, 刺激累  
积皮肤的除去, 并改善皮肤感觉。典型的多元醇包括甘油、聚亚烷  
25 基二醇, 更优选亚烷基多元醇及它们的衍生物, 包括丙二醇、一缩  
二丙二醇、聚丙二醇、聚乙二醇及其衍生物、山梨醇、羟丙基山梨  
醇、己二醇、1,3-丁二醇、1,2,6-己三醇、乙氧基化甘油、丙氧基化甘  
油以及它们的混合物。为了取得最佳结果, 优选保湿剂为丙二醇或

透明质酸钠。保湿剂的量可以是组合物重量的 0.5-30%范围内的任何一点, 优选在 1-15%之间。

本发明的组合物中也可以使用增稠剂作为化妆上可接受的载体的一部分。典型的增稠剂包括交联丙烯酸酯(如 Carbopol® 982)、疏水改性的丙烯酸酯(如 Carbopol® 1382)、纤维素衍生物和天然树胶。有用的纤维素衍生物有羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、乙基纤维素和羟甲基纤维素。适用于本发  
5 明的天然树胶包括瓜尔胶、黄原胶、菌核、角叉菜聚糖、果胶以及这些树胶的组合物。增稠剂的量可以在 0.0001-5%重量范围内, 通常为 0.001-1%重量, 最理想的是 0.01-0.5%重量。  
10

综合起来, 水、溶剂、硅氧烷、酯、脂肪酸、保湿剂和/或增稠剂将以 1-99.9%的量组成化妆上可接受的载体, 优选 80-99%重量。

油或油性物质可以与乳化剂一起存在以提供油包水型乳状液或水包油型乳状液, 这在很大程度上取决于所用乳化剂的平均亲水亲油平衡(HLB)。  
15

表面活性剂也可以存在于本发明的化妆品组合物中。表面活性剂的总含量为组合物重量的 0.1-40%, 优选为 1-20%, 最好为 1-5%。表面活性剂可以选自阴离子型、非离子型、阳离子型和两性活性物质。特别优选的非离子型表面活性剂为具有 C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub> 脂肪醇或每摩尔疏水物与 2-100 摩尔环氧乙烷或环氧丙烷缩合的酸性疏水物的物质、与 2-20 摩尔烯化氧缩合的 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 烷基酚、乙二醇的一和二脂肪酸酯、甘油单脂肪酸酯、失水山梨醇、一和二 C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> 脂肪酸、嵌段共聚物(环氧乙烷/环氧丙烷)、聚氧乙烯山梨糖醇酐以及它们的组合物。烷基多葡糖苷和糖类脂肪酰胺(如甲基葡糖酰胺)也是合适的非离子型表面活  
20 性剂。  
25

优选的阴离子型表面活性剂包括肥皂、烷基醚硫酸盐和磺酸盐、烷基硫酸盐和磺酸盐、烷基苯磺酸盐、烷基和二烷基磺基琥珀酸盐、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> 酰基羟乙基磺酸盐、酰基谷氨酸盐、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> 烷基醚磷酸盐以及

它们的组合物。

在本发明的化妆品组合物中可以存在各种类型的其它活性成分。活性物质被定义为除润肤剂和仅提高组合物的物理特性的成分之外，有益于皮肤的物质。尽管对这类物质没有限定，但通常的例子包括加入的抗皮脂(anti-sebum)成分和防晒剂。

防晒剂包括那些通常用于阻挡紫外线的物质。具有代表性的这类化合物有 PABA、肉桂酸酯和水杨酸酯的衍生物。例如，可以使用 avobenzophenone (Parsol 1789<sup>®</sup>) 甲氧基肉桂酸辛酯和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮(也称为氧苯酮)。甲氧基肉桂酸辛酯和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮可从市场上分别以 Parsol MCX 和 Benzophenone-3 的商标买到。本组合物中所用的防晒剂的精确量可根据所需的防太阳紫外线辐射的程度而变化。

优选保护所述的化妆品组合物以避免可能的有害微生物的生长。因此，需要防腐剂。合适的防腐剂包括对羟基苯甲酸的烷基酯、乙内酰胺衍生物、丙酸盐和各种季铵化合物。本发明特别优选的防腐剂为对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯氧基乙醇和苯甲醇。所用防腐剂的量通常为组合物重量的约 0.1% - 2%。

本发明的组合物主要打算作为局部应用于人体皮肤上的产品，特别是作为改进衰老和光致老化皮肤的外观的制剂。

在使用时，从适当的容器或涂敷器具中将一定量的组合物，例如 1 - 100 ml 涂于皮肤的暴露区域，如果需要，再用手或手指或适当的设备将其抹开和/或按摩使其渗入皮肤。

### 产品形态和包装

本发明的皮肤化妆品组合物可以是任何形态，如被配制成化妆水、凝胶、乳液、液态膏霜或膏霜。组合物可以被装入适合其粘度和顾客预期用途的适当容器中。例如，乳液或液态膏霜可被装进瓶

子或滚珠涂敷器具或推力驱动式喷雾装置(propellant-driven aerosol device)或装有适于手指操作的泵的容器中。当组合物为膏霜时，可简单地将其储存在不会变形的瓶子或挤压式容器如软管或有盖的广口容器中。因此本发明也提供装有本文所定义的化妆上可接受的组合物的密闭容器。

本组合物也可被装进胶囊中，如被结合到本文作为参考的美国专利第 5,063,057 号中所描述的胶囊。

下面的具体实施例进一步说明本发明，但是本发明并不局限于此。

#### 10 供应商名单

<u>活性成分</u>	<u>供应商</u>
葡聚糖	Sigma, Dextran Products Corp.
麦芽糖糊精	Grain Processing Corp.
阿拉伯半乳聚糖	Larex, Inc.
乙醇酸	Dupont
乳酸	Purac America, Inc.
琥珀酸	Sigma
氯化可的松(水溶性)	Sigma

#### 实施例 1

本实施例测量了由含乙醇酸的制剂引起的刺痛。

15 自然条件下的刺痛测试过程：这是一个随机的、双重隐蔽研究，其中每位受验者评估了用于对侧的鼻唇褶皱处的一种测试制剂和一种对照制剂或者两种测试制剂。在资格认定阶段，每位受验者评估了一种 8%乙醇酸测试制剂与一种载体对照样(0%乙醇酸)。建立了对乙醇酸的左/右平衡敏感度的受验者取得资格。在接下来的每个测试

20 中，利用最多 20 名具有资格的受验者(最少 15 名)，在每个测试日进

行成对比较, 在整个研究过程中, 刺痛测试之间最少间隔 3 天。临产品测试之前, 受验者遵守用 Ivory 肥皂洗涤 15 秒的制度, 以增强刺痛反应。临用产品之前在测试部位感到有任何刺痛/烧灼感的任何受验者不涂抹产品。然后研究人员将一种测试制剂和一种对照制剂或测试制剂同时涂抹在适当的左/右测试部位, 并且轻轻地按摩, 但要使其完全渗入皮肤。在 7.5 分钟期间, 受验者用一个自我评估调查表对两种制剂引起刺痛的可能性进行了比较。

刺痛/烧灼感倾向: 在下表所示时间、采用下述等级评估了左和右内脸颊以及鼻子的褶皱处感觉到的刺痛/烧灼感的程度。

0- 无刺痛/烧灼感, 1- 极轻微的刺痛/烧灼感, 2- 轻微的刺痛/烧灼感, 3- 中等的刺痛/烧灼感, 4- 中度强烈的刺痛/烧灼感, 5- 强烈的刺痛/烧灼感, 6- 极度的刺痛/烧灼感。

统计显著性的判定: 在基线后的每个评估时间点, 进行了参数的双 t 检验(双 t 即 two-tailed, 双尾), 以比较在包括成对比较检验的各个处理之间根据基线的属性变化程度, 在这些分析中受验者作为块(参考 Statistical Methods, Snedecor and Cochran, Iowa State University Press, 1980 年第 7 版, 第 84-86 页)。该检验可以采用指定 T 和 PRT 选项, 用 SAS 软件程序 MEANS 来进行。

对于刺痛/烧灼感的强制选择: 在每个评估点(0、2.5、5.0 和 7.5 分钟), 如下分析了对强制选择评估“脸的哪一侧有更强烈的刺痛?”的回答: 采用参数的双 t 检验(双尾)将选择处理 A 的受验者人数与选择处理 B 的受验者人数进行了比较。统计显著性确定为  $p \leq 0.1$ 。用该评估方法由几个成对比较检验得到的结果如表 1B、2B、3B 和 4B(见下文)所示。

## 制备一种水包油型乳膏(基础配方 A):

全化学名或 CTFA 名	在制剂中的有效含量%	商品名和公认的活性物质%
去离子水	46.54	
乙二胺四乙酸二钠	0.05	Sequesterene Na2
硅酸铝镁	0.6	Veegum Ultra
对羟基苯甲酸甲酯	0.15	对羟基苯甲酸甲酯
二甲基硅油	0.01	DC Antifoam Emulsion
1,3-丁二醇	3.0	1,3-丁二醇
羟乙基纤维素	0.5	Natrosol 250HHR
甘油, USP	2.0	甘油 USP
黄原胶	0.2	Keltrol 1000
三乙醇胺	1.2	三乙醇胺, 99%
硬脂酸	3.0	Pristerene 4911
对羟基苯甲酸丙酯 NF	0.1	对羟基苯甲酸丙酯 NF
氯化硬脂酸甘油酯	1.5	Naturechem GMHS
十八醇	1.5	Lanette 18DEO
棕榈酸异硬脂醇酯	6.0	Protachem ISP
辛酸 C12-15 醇酯	3.0	Hetester FAO
聚二甲基硅氧烷	1.0	Silicone Fluid 200 (50cts)
胆甾醇 NF	0.5	胆甾醇 NF
硬脂酸失水山梨醇酯	1.0	硬脂酸失水山梨醇酯
丁基化羟基甲苯	0.05	Embanox BHT
乙酸生育酚酯	0.1	乙酸维生素 E 酯
硬脂酸聚乙二醇-100 酯	2.0	MYRJ 59
硬脂酰乳酸钠	0.5	Pationic SSL
去离子水	适量, 使达到 99.80	

\* 除另外注明外，活性物质含量近似于 100%。

采用自然条件下的刺痛测试测定了包含或不含 8%乙醇酸的基础配方 A 的刺痛/烧灼感。所得结果概括在表 1A 和 1B 中。

表 1A

5 刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6 级)	基础配方 A (pH7.2)	基础配方 A+8%乙醇酸 (pH3.8)
使用之后瞬间	0.05	1.05*
使用之后 2.5 分钟	0.25	1.85*
使用之后 5.0 分钟	0.25	2.00*
使用之后 7.5 分钟	0.35	2.15*

\*  $p < 0.05$

表 1B

对刺痛/烧灼感的强制选择：哪一侧更严重？

使用之后 7.5 分钟的结果

	基础配方 A (pH7.2)	基础配方 A+8%乙醇酸 (pH3.8)
指出更不舒适(刺痛/烧灼感)的受验者人数	0	20

10 \*  $p < 0.05$

比较了含量为 8%和 4%时乙醇酸的刺痛/烧灼感倾向。所得结果概括在表 1C 中。

15

表 1C

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均 程度(0-6 级)	基础配方 A+4% 乙醇酸(pH3.8)	基础配方 A+8% 乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.45	1.35*
使用之后 2.5 分钟	0.60	1.75*
使用之后 5.0 分钟	0.60	1.95*
使用之后 7.5 分钟	0.55	1.65*

\* p &lt; 0.05

5 从表 1A-1C 的结果可以看出，在 pH3.8 下 8%乙醇酸明显比基础配方或 4%乙醇酸更刺痛。虽然可以通过提高 pH 或降低有效含量来减轻刺痛，但是组合物中的这种变化显著影响皮肤传递性，并且由此影响活性物质的功效。

### 10 实施例 2

本实施例测量了在 pH3.8 时，葡聚糖 10 KD 对基础配方 A 中乙醇酸刺痛的影响。自然条件下的刺痛测试和基础配方 A 如实施例 1 所述。

15 制备不含乙醇酸、碱和葡聚糖的基础配方 A。将葡聚糖溶解在单独的烧杯中，该烧杯中装有乙醇酸+碱(氢氧化铵)和少量来自制剂的水(需要的量不超过 5%)---这样，首先用少于 5%的水制成初始基础配方 A。然后在冷却阶段迅速将乙醇酸/葡聚糖溶液加入到基础配方 A 中(通常在大约 45℃ 的温度)。所得结果概括在表 2A、2B 和 2C 中。

表 2A

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6级)	基础配方 A+8%乙醇酸+5%葡聚糖 10 KD (pH3.8)	基础配方 A+8%乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.73	1.32*
使用之后 2.5 分钟	0.53	1.11*
使用之后 5.0 分钟	0.26	0.68*
使用之后 7.5 分钟	0.26	0.52

\* p &lt; 0.1

表 2B

5 对刺痛/烧灼感的强制选择: 哪一侧更严重?  
使用之后 2.5 分钟的结果

	基础配方 A+8%乙醇酸+5%葡聚糖 10KD (pH3.8)	基础配方 A+8%乙醇酸(pH3.8)
指出更不舒适(刺痛/烧灼感)的受验者人数	5	14*

\* p &lt; 0.1

表 2C

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6级)	基础配方 A+8%乙醇酸+5%葡聚糖 10KD (pH3.8)	基础配方 A+4%乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.28	0.11
使用之后 2.5 分钟	1.11	0.89
使用之后 5.0 分钟	1.08	0.83
使用之后 7.5 分钟	0.94	0.72

10 从表 2A 和 2B 的结果可以看出, 葡聚糖显著降低了含 8%乙醇酸的基础配方 A 的刺痛/烧灼感倾向。在表 2C 中, 两种制剂在刺痛

反应上的差异不是统计显著的，从而得出结论：葡聚糖将含 8%乙醇酸制剂的刺痛降低至含 4%乙醇酸制剂的程度。

### 实施例 3

5

本实施例测试了在 pH3.8 时，葡聚糖 10KD 对基础配方 A 中琥珀酸刺痛的影响。测试过程和基础配方 A 如实施例 1 所述。除了用琥珀酸代替乙醇酸之外，如实施例 2 所述制备测试制剂。所得结果概括在表 3A 和 3B 中。

10

表 3A

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6 级)	基础配方 A + 8%琥珀酸 + 5%葡聚糖 10KD (pH3.8)	基础配方 A + 8%琥珀酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.17	0.33*
使用之后 2.5 分钟	0.27	0.83*
使用之后 5.0 分钟	0.55	0.55
使用之后 7.5 分钟	0.61	0.61

\*  $p < 0.1$

表 3B

对刺痛/烧灼感的强制选择：哪一侧更严重？

15

使用之后 2.5 分钟的结果

	基础配方 A + 8%琥珀酸 + 5%葡聚糖 10KD (pH3.8)	基础配方 A + 8%琥珀酸(pH3.8)
指出更不舒适(刺痛/烧灼感)的受验者人数	5	14*

\*  $p < 0.05$

从表 3A 和 3B 的结果可以看出，使用后 2.5 分钟葡聚糖显著降低了含 8%琥珀

酸的基础配方 A 的刺痛/烧灼感倾向。

#### 实施例 4

- 5 本实施例测试了葡聚糖对乳液中乙醇酸刺痛的影响。测试如实施例 1 所述。制备具有下述配方的水包油型乳液(基础配方 B):

全化学名或 CTFA 名	在制剂中的有效含量%	商品名和公认的活性物质%
硅酸铝镁	0.550	Veegum Ultra
1,3-丁二醇	2.4	丁二醇
乙二胺四乙酸二钠	0.05	Clewat-N
黄原胶	0.15	Keltrol
单月桂酸十甘油酯	2.0	Nikkol Decaglyn 1-L
甘油	8.0	Maruko RG
三乙醇胺	2.0	TEA (99%)
对羟基苯甲酸甲酯	0.195	对羟基苯甲酸甲酯
对羟基苯甲酸丙酯	0.05	对羟基苯甲酸丙酯
异硬脂酰乳酸钠	0.1	Pationic ISL
羧甲基纤维素钠	0.15	Cellulose gum 9H4XF
油酸乙酯	0.6	Nofable EO-90
角鲨烷	2.0	Nikkol Squalane
三(2-乙基己酸)甘油酯	3.6	Panaceat 800B
液体矿脂	5.8	Carnation Min Oil
硬脂酸	0.3	Pristerene 4911
十六醇十八醇混合物	0.5	Conol 30RC
对羟基苯甲酸丁酯	0.05	对羟基苯甲酸丁酯
氢化大豆磷脂	0.075	Basis LP-20H (20-30%)

胆甾醇	0.05	胆甾醇
dl- $\alpha$ 亚油酸/油酸生育酚酯	0.05	亚油酸维生素 E 酯混合物
二丁基羟基甲苯	0.05	BHT
乙醇酸	2.80	Glypure 70 (70%)
乙醇酸/氢氧化铵溶液	5.08	GA Mixture NL (82.6%)
4-叔丁基-4-甲氧基二苯甲酰基甲烷	0.1	Parsol 1789
4-甲氧基肉桂酸乙基己基酯	0.1	Parsol MCX
二-(2-辛基十二烷基)-N-十二烷酰-L-谷氨酸酯	0.2	Amiter LG-OD
3-甲基-1,3-丁二醇	1.6	Isopreneglycol
聚丙烯酰胺/C13-14 异链烷烃/Laureth 7	1.0	Sepigel 305
十六酸十八酸葡萄糖酯混合物/十六醇十八醇混合物	0.5	Montanov 68
氢氧化铵,使 pH 达到 3.8	0-2.0	氢氧化铵
香料	0.098	Fleur J412225 QUT
去离子水	使达到 100% (59.8%)	去离子水

\* 除另外注明外活性物质含量近似于 100%。

除了乙醇酸/碱/葡聚糖之外,用所有成分制成乳状液浓缩物,并且不含所有的水。在一个单独的烧杯中,将乙醇酸+碱+葡聚糖+全部水的约 5%合并,并混合直到葡聚糖完全溶解。迅速将该混合物加入  
5 到乳状液中。然后用碱将 pH 调节至合适的 pH,然后加入剩余的水

使达到 100%。

所得结果概括在表 4A 和 4B 中。

表 4A

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6 级)	基础乳液 B+8%乙醇酸+ 5%葡聚糖 10KD (pH3.8)	基础乳液 B+8% 乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.22	0.22
使用之后 2.5 分钟	0.61	1.05
使用之后 5.0 分钟	0.83	0.83
使用之后 7.5 分钟	0.93	0.93

5

表 4B

对刺痛/烧灼感的强制选择: 哪一侧更严重?

使用之后 2.5 分钟的结果

	基础乳液 B+8%乙醇酸+ 5%葡聚糖 10KD (pH3.8)	基础乳液 B+8% 乙醇酸(pH3.8)
指出更不舒适(刺痛/ 烧灼感)的受验者人数	6	10

从表 4A 和 4B 的结果可以看出, 葡聚糖降低了含 8%乙醇酸的基础配方 B 的刺痛/烧灼感倾向。

10

#### 实施例 5

测试了加入的葡聚糖分子减轻刺痛的能力。测试过程和配方 A 如实施例 1 所述。基础配方 C 如下:

15

全化学名或 CTFA 名	在制剂中的有效含量%
硅酸铝镁	0.3
乙二胺四乙酸二钠	0.05
羟基苯甲酸甲酯	0.15
1,3-丁二醇	3.0
黄原胶	0.2
羟乙基纤维素	0.25
浓缩甘油	2.0
三乙醇胺	1.2
异硬脂酰乳酸钠	0.5
单硬脂酸甘油酯	1.5
单硬脂酸失水山梨醇酯	1.0
单硬脂酸聚乙二醇酯(150 EO)	1.09
单硬脂酸聚乙二醇酯(40 EO)	0.910
十八醇	1.5
硬脂酸	2.0
棕榈酸异硬脂醇酯	6.0
辛酸异十六醇酯	3.0
聚甲基硅氧烷	1.0
胆甾醇	0.5
二丁基羟基甲苯	0.05
对羟基苯甲酸丙酯	0.1
dl-乙酸生育酚酯	0.1
乙醇酸	5.7
氢氧化钾	1.1
香料	0.09
去离子水	66.710

所得结果概括在表 5A、5B 和 5C 中。

表 5A

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6级)	基础配方 C + 4%乙醇酸 +5%葡聚糖 40KD (pH3.8)	基础配方 C+4% 乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.27	0.16
使用之后 2.5 分钟	0.77	2.05*
使用之后 5.0 分钟	1.11	1.94*
使用之后 7.5 分钟	0.77	1.66*

\* p &lt; 0.1

表 5B

5

刺痛/烧灼感倾向: 葡聚糖 10K 和葡聚糖 464K

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6级)	基础配方 A + 8%乙醇 酸+ 5%葡聚糖 464KD (pH3.8)	基础配方 A+8%乙醇 酸+ 5%葡聚糖 10KD (pH3.8)
使用之后瞬间	0.7	0.6
使用之后 2.5 分钟	1.05	1.1
使用之后 5.0 分钟	0.8	0.85
使用之后 7.5 分钟	0.75	0.85

表 5C

刺痛/烧灼感倾向: 葡聚糖 10KD 和葡聚糖 40KD

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6级)	基础配方 A + 8%乙醇 酸+ 5%葡聚糖 40KD (pH3.8)	基础配方 A+8%乙醇 酸+ 5%葡聚糖 10KD (pH3.8)
使用之后瞬间	0.68	0.74
使用之后 2.5 分钟	1.0	1.05
使用之后 5.0 分钟	0.95	0.74
使用之后 7.5 分钟	0.79	0.58

从表 5A、5B 和 5C 的结果可以看出，各种分子量的葡聚糖能同样好地减轻刺痛。

#### 对照实施例 6

5

本实施例测试了各种化合物减轻刺痛的能力。测试过程和基础配方 A 如实施例 1 所述。所得结果概括在表 6A 和 6B 中。

表 6A

氢化可的松

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6 级)	基础配方 A + 8%乙醇酸 + 0.1%氢化可的松(pH3.8)	基础配方 A+8%乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.94	0.76
使用之后 2.5 分钟	0.68	0.58
使用之后 5.0 分钟	0.36	0.36
使用之后 7.5 分钟	0.21	0.21

10

表 6B

阿拉伯半乳聚糖

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6 级)	基础配方 A+ 8%乙醇酸+ 5%阿拉伯半乳聚糖(pH3.8)	基础配方 A+8%乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.89	0.47
使用之后 2.5 分钟	1.0	0.78
使用之后 5.0 分钟	0.89	0.63
使用之后 7.5 分钟	0.63	0.52

表 6A 和 6B 的结果表明氢化可的松和阿拉伯半乳聚糖都不能减轻刺痛。实际上，加入 5%阿拉伯半乳聚糖(表 6B)轻微地加重了抗衰老霜的刺痛。

15

## 实施例 7

本实施例测试了葡聚糖对各种活性物质分子向皮肤各层传递性的影响。

- 5           过程：通过在实验室中的皮肤吸收(PCA)测试测量了活性物质的皮肤传递性。用植皮的猪皮和 Bronaugh 流通池进行了测试。从 Buckshire Farms 获得只用水冲洗过的 3-4 周大的母猪背部皮肤。将猪皮储存在-70℃直至使用。将猪皮在室温下解冻，用 Norelco 电动剃须刀轻轻地剃去毛，用 Padgett 植皮刀将猪皮切成 510 μm 厚，用穿孔器将其冲成 18 mm 的圆片，将其放置在 37℃、pH 为 7.1 的 Hank 平衡盐缓冲剂流量为 5 ml/min 的 Bronaugh 渗滤池中。经 30 分钟平衡后，采用 ServoMed EP1 蒸发计测量经过表皮的水的损失。将每小
- 10           时的水损失>5 g/m<sup>2</sup>的猪皮圆片放回渗滤池。将 2 μL 产品供给皮肤圆片，该产品含有未标记的活性物质和少量用 3H 或 14C 以约 30 微居里/克产品放射标记过的活性物质。通过一个置换体积移液管传递所述产品，并且用套在端部为棉的涂敷器具上的胶乳指套将产品涂抹在直径 9 mm 的暴露的猪皮表面。接触时间为 6 小时，以 1 或 2 小时的间隔将接受流体(receptor fluid)取样进闪烁管。在终点时，用三份水的约 1 ml 等分试样清洗猪皮表面，从设备中取出猪皮圆片，并用
- 15           1/3 棉纸(Kim Wipe)吸干。用 Scotch 透明胶带将猪皮上表面带状剥离(tape-strip)9 次以得到角质层，用解剖刀将表皮与真皮分离。通过液体闪烁光谱测定法进行的分析包括了构成整个平衡和放射标记的物质回收所需的全部试样，包括传递期间残留在涂敷器具上的产品、被水洗掉的和棉纸上过量除去的产品、带状剥离的角质层、表皮、
- 20           真皮(在 NCS 消化后计算的)、接受流体、空的 Bronaugh 池、滤纸和清洗移液管。通过从放射标记的测试产品的六个加权的 2 μL 等分试样的最小值的平均测定放射性减去残留在涂敷器具上的物质，在理论上确定了所提供的剂量。数据以猪皮组织各部分中的剂量百分比

表示,  $<0.1$  的 p 值被认为是统计显著的。

测试了葡聚糖对含乙醇酸或琥珀酸的基础配方 A 的传递性的影响。

所得结果概括在表 7A 和 7B 中。

5

表 7A

猪皮组织	基础配方 A+8% 乙醇酸, pH=3.8	基础配方 A+8%乙醇酸 +5%葡聚糖 10KD, pH=3.8
角质层	4.6	6.6
表皮+真皮	3.8	4.4
接受流体	7.5	5.6
总量	15.9	16.6

表 7B

猪皮组织	基础配方 A+8% 琥珀酸, pH=3.8	基础配方 A+8%琥珀酸 +5%葡聚糖 10KD, pH=3.8
角质层	2.4	2.4
表皮+真皮	3.4	3.2
接受流体	0.8	0.3
总量	6.6	5.9

从表 7A 和 7B 的结果可以看出, 葡聚糖对乙醇酸或琥珀酸向不同皮肤组织层的传递性没有不利影响。事实上, 葡聚糖的存在定向增加了乙醇酸的传递性(表 7A)。

10

因此, 实施例 1-5 的结果表明葡聚糖减轻了由弱酸引起的刺痛。其它已知的抗刺激性物质如氢化可的松以及另一种多糖阿拉伯半乳聚糖未减轻由弱羧酸引起的刺痛(对照实施例 6)。与多数先有技术不同, 葡聚糖的加入对活性物质向皮肤各层的传递性没有不利影响(实施例 7)。实施例 8-10 研究将葡聚糖与酸性活性物质结合使用的其它

15

好处: 葡聚糖增强酸性活性物质抗衰老功效的能力。

## 实施例 8

本实施例研究了葡聚糖对羧基酸在皮肤成纤维细胞中合成胶原的能力的影响。

- 5 胶原是主要的皮肤蛋白质，它由真皮中的成纤维细胞合成。胶原的合成随着衰老或光致损伤而减少。胶原 I 是以被称作前胶原 I 的前体分子首先形成的。前胶原 I 产量的增加是由于使用测试化合物而引起胶原含量增加的一个标志。

- 方法：从 Clonetics Corp., San Diego, CA. 购买新生人体真皮的成纤维细胞。从 Life Technologies, NY. 购买用于细胞培养的全部材料。以大约 10,000/孔的密度将细胞(在第 5 代与第 10 代之间)接种在 96 孔板内部的 48 孔中,孔中装有 DMEM (Dulbecco 改进的 Eagle 培养基)、高葡萄糖, 向其中追加 2 mM L-谷氨酰胺、10%胎牛血清、抗生素以及抗真菌溶液。然后使细胞生长至融合 2 天。在融合时, 除去培养基, 并用无血清的 DMEM 洗涤细胞, 向各孔中加入 200  $\mu$ l 测试化合物在无血清的 DMEM 中的溶液。在总共 6 个孔中对每种剂量进行平行测定。使用下表 8 中所示浓度的测试化合物。对照样不含测试化合物。24 小时之后, 除去溶液, 再向细胞中加入 100  $\mu$ l 相同的溶液。24 小时之后, 除去所有溶液, 以 0.5% 的浓度加入抑肽酶, 将溶液储存直至在 4 $^{\circ}$ C 进行分析。

- 20 为了分析溶液中的前胶原 I, 将它们在 DMEM 中进行稀释(在 200  $\mu$ l DMEM 中大约 20  $\mu$ l 试样)。按照制造商的说明书安装 BioRad slot blot 设备(BioRad Labs, CA)。简要地说, 将硝化纤维素膜和 3 张滤纸在 TRIS 缓冲盐水(TBS, pH7.3)中润湿, 并将其放在设备中, 滤纸在下面, 膜在上面。向各孔中加入 100 ml TBS, 并进行真空过滤。向各孔中加入 100  $\mu$ l 的试样溶液, 并进行重力过滤。这时来自测试溶液的前胶原被附着在膜上。从设备中取出膜, 将其放在旋转摇动器上的封闭溶液(在 D-PBS 中的 5%奶粉)中, 在室温下放置 1 小时, 或

在 4℃ 放置一整夜。然后将膜放在 1.5 mL 在含 0.1% BSA 的 TBS (抗体与缓冲剂/BSA 的比例为 1: 100) 中的大鼠抗人前胶原氨基末端 Ab (Chemicon MAB1912) 的密封袋中, 在摇动条件下, 在室温下温育 1.5 小时, 或在 4℃ 温育一整夜。然后将膜取出, 在 TBS/0.1% 吐温中洗涤 3 次, 共 5 分钟。然后将膜放在 2 mL 在含 0.1% BSA 的 TBS (抗体与缓冲剂/BSA 的比例为 1: 1000) 中的生物素化抗鼠结合过氧化物酶的 Ab (Vector Labs) 的密封袋中, 在摇动条件下, 在室温下温育 1 小时, 或在 4℃ 温育一整夜。然后将膜在 TBS/0.1% 吐温中洗涤 3 次, 共 5 分钟。用来自 Vectastain Elite Kit (Vector Labs) 的溶液 A (抗生物素蛋白) 和 B (生物素化辣根过氧化物酶) 各 30 μl 将 3 mL PBS 温育 30 分钟。在摇动条件下将膜在产生的溶液的密封袋中放置 30 分钟。然后将膜取出, 在 TBS/0.1% 吐温中洗涤 2 次, 共 5 分钟。然后用下述溶液对膜进行染色: 12.5 mg 3-氨基 9-乙基吖唑 (Sigma)、3.125 mL N,N-二甲基甲酰胺 (Sigma)、21.5 mL pH 为 5.2 的 0.2 M 醋酸盐缓冲剂和 12.5 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。将膜染色直至显出红/棕色, 停止反应, 在自来水中洗涤 2 次, 共 10 分钟。用彩色复印机制出污点的浊度。用激光密度计 (来自 Pharmacia KLB 的 Ultrosan XL) 扫描彩色复制品。用经测试化合物处理的细胞的光学密度与对照品的比率 X 100 来计算百分比的增长。

所得结果概括在表 8 中。

表 8

处理	胶原 (对照样的%)
0.001%葡聚糖 10KD	120*
0.1%葡聚糖 10KD + 2 mM 乙醇酸	120*
0.01%葡聚糖 10KD + 2 mM 乙醇酸	120*
0.001%葡聚糖 10KD + 2 mM 乙醇酸	120*
0.001%阿拉伯半乳聚糖 50-70KD	110
0.1%阿拉伯半乳聚糖 50-70KD + 2 mM 乙醇酸	110
0.01%阿拉伯半乳聚糖 50-70KD + 2 mM 乙醇酸	110
0.001%阿拉伯半乳聚糖 50-70KD + 2 mM 乙醇酸	110

\*  $p < 0.05$

表 8 的结果表明葡聚糖与乙醇酸的结合使前胶原 I 的含量显著增加, 而阿拉伯半乳聚糖与乙醇酸的结合则没有这种效果。

5

#### 实施例 9

本实施例研究了葡聚糖对乳酸引起角化细胞分化潜在性的影响。

10

角化细胞是表皮中的主要细胞类型, 角化细胞经受引起角质细胞形成的分化程序, 角质细胞形成角质层并提供保护性的屏障, 防止水的损失和有害物质与病原体的进入。角化细胞分化的一个突出特点是在紧靠角化细胞质膜的下方形成高度不溶的交联包膜(CE)。角化细胞 CE 的产生由转谷氨酰胺酶 K(Tgase K)催化, 该酶使细胞内的某些前体蛋白质交联。视黄酸是对改进光致老化皮肤外观极为有效的物质(Weiss 等, JAMA, 259:527, 1988), 据报道它可增加皮肤中的转谷氨酰胺酶 K(也称作 Tgase I)。因此, 增加 Tgase-K 活性的物质具有向皮肤提供益处的可能性。

15

方法：将正常人体角化细胞以 4000 个细胞/孔接种在 96 孔板上，并使细胞在从 Clonetics Corp 获得的角化细胞生长培养基(KGM)中生长。用各种浓度的测试化合物对细胞处理 48 小时，在处理 24 小时之后间歇地改变培养基。每个测试使用 6 个孔进行平行测定。在温育阶段的最后，测量细胞的两个参数---I. DNA 和 II. 转谷氨酰胺酶蛋白质。

I. 用 Rago 等在 Anal.Biochem 191:31-34, 1990 中所述的方法测量 DNA。从板中抽出培养基，用磷酸盐缓冲盐(PBS)将细胞洗涤 3 次。将细胞冷冻并解冻 2 次，每次 5-10 分钟。将 100  $\mu$ l 的 Hoescht 染料(从 Calbiochem 购买)溶液(1  $\mu$ g/ml, 在 PBS 中)加入到各孔中，用箔将板盖上，使其在室温下放置 10 分钟。然后在微孔荧光微量培养板读取器(ex/em 360/450 nm)上得到读数。采用标准来计算每孔中 DNA 的量(a)。

II. 将染料除去，并用 PBS 将细胞再清洗 3 次，准备测定转谷氨酰胺酶(Tgase)。向各孔中加入 200  $\mu$ l 在 PBS 中的 5% Carnation 脱脂奶粉(封闭溶液)，并在室温下放置 1 小时。然后将该溶液抽出，并向各孔中加入 100  $\mu$ l 人体  $\alpha$ Tgase 1 单克隆抗体(生物医学技术)，该抗体以 1/2000 在 1% 的在 PBS 中的牛奶溶液中稀释。将板在 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。然后将溶液除去，用在 PBS 中的 1%牛奶/0.05%吐温将各孔洗涤 4 次。将与辣根过氧化物酶结合的抗小鼠 Fab'在 1%牛奶/0.05%吐温/PBS 中以 1:4000 进行稀释，并向各孔中加入 100  $\mu$ l 该溶液，在 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。然后将该溶液抽出，再用在 PBS 中的 1%牛奶/0.05%吐温洗涤 3 次。通过将 2 mg 邻苯二胺(Sigma)溶解在 5 ml 柠檬酸盐缓冲剂中，并加入 1.65  $\mu$ l 30%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 来制备底物溶液。向各孔中加入 100  $\mu$ l 该底物溶液，并在黑暗中温育 5 分钟。通过加入 50  $\mu$ l 4N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>使反应终止。在 490 nm 测定吸光度(b)。角化细胞分化被表示为转谷氨酰胺酶吸光度(b)/ $\mu$ g DNA (a)。

在两个独立的实验中得到的结果概括在表 9A 和 9B 中。

表 9A

处理	未处理对照品的百分比
2 mM 乳酸盐 + 0.1%葡聚糖 10KD	115.3 +/- 9.9*
2 mM 乳酸盐 + 0.01%葡聚糖 10KD	104.3 +/- 7.0
2 mM 乳酸盐+0.1%阿拉伯半乳聚糖 50-70KD	99.8 +/- 11.2
2 mM 乳酸盐+0.01%阿拉伯半乳聚糖 50-70KD	106.2 +/- 8.5
2 mM 乳酸盐 + 0.1%葡聚糖 464 KD	119.2 +/- 8.0*
2 mM 乳酸盐 + 0.01%葡聚糖 464 KD	126.2 +/- 10.4*

\* p &lt; 0.05

表 9B

处理	未处理对照品的百分比
0.1%葡聚糖 10KD	114.1 +/- 5.5*
0.01%葡聚糖 10KD	104.6 +/- 5.6

\* p &lt; 0.05

- 5 表 9A 和 9B 的结果表明乳酸与葡聚糖(10KD 或 464KD)的结合显著增加了角化细胞的分化, 而乳酸与阿拉伯半乳聚糖的结合则没有这种效果。

#### 实施例 10

10

本实施例研究了葡聚糖对乙醇酸的抗皮肤衰老功效的影响。

过程: 本研究是两种制剂的为期 12 周的两侧对照使用测试。

要求受验者来实验室进行预筛选以确定他们的两前臂上是否有中等程度的光致损伤皮肤。

15

要求取得资格的受验者在 12 周期间另外再来 6 次。在基线(0 周)、4、8 和 12 周进行了目视评估。对于整个受验者群的左/右应用来说,

产品分配是随机和平衡的。指导受验者在家里在左/右臂上使用适当的产品，在 12 周内，每天涂两次，每次大约 1 克。每个成对比较至少有 15 名取得资格的受验者完成研究。采用下述 10 点等级对光致损伤(类似褶皱的/有皱纹的)皮肤进行临床(目视)评估:

- 5            0 = 没有  
               1-3 = 轻微  
               4-6 = 中等  
               7-9 = 严重

进行下面的成对比较:

- 10            成对比较 I: 基础配方 A 与基础配方 B + 8%乙醇酸。  
               成对比较 II: 基础配方 A + 8%乙醇酸与基础配方 A + 8%乙醇酸 + 5%葡聚糖 10KD.

15            采用 Pratt-Lehmann 版的 Wilcoxon 带标号秩检验在统计学上评定从基线开始的平均变化的大小，该变化可归于用在该分析中作为块的受验者进行的处理。此外，为了比较一个方格内两次处理从基线开始的变化程度，也采用了 Pratt-Lehmann 版的非参数 Wilcoxon 带标号秩检验。

所得结果概括在表 10A 和 10B 中。

表 10A

- 20            光致损伤皮肤的平均改善(8%乙醇酸与基础配方)

周	8%乙醇酸	基础配方
0	0	0
4	-0.19	-0.22
8	-0.66*	-0.53
12	-1.0	-0.84

\* : 8%乙醇酸明显提供了显著大于基础配方的改善效果( $p < 0.05$ ).

表 10B

光致损伤皮肤的平均改善(8%乙醇酸与 8%乙醇酸+5%葡聚糖  
10KD)

周	8%乙醇酸	8%乙醇酸+5%葡聚糖 10KD
0	0	0
4	-0.25	-0.25
8	-0.59	-0.75*
12	-1.0	-1.0

\* 8%乙醇酸+5%葡聚糖提供了显著大于 8%乙醇酸的改善效果(p  
5 = 0.059).

### 实施例 11

本实施例测量了麦芽糖糊精(Maltrin®180)在 pH3.8、对基础配方  
10 A 中的乙醇酸刺痛的影响。自然条件下的刺痛测试和基础配方 A 如  
实施例 1 所述。

表 11A

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平 均程度(0-6 级)	基础配方 A + 8%乙醇酸+ 5%麦芽糖糊精 180 (pH3.8)	基础配方 A+8% 乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.69	1.00
使用之后 2.5 分钟	1.06	1.44
使用之后 5.0 分钟	0.69	1.31*
使用之后 7.5 分钟	0.44	1.13*

\* p < 0.1

15

表 11B

对刺痛/烧灼感的强制选择: 哪一侧更严重?

使用之后瞬间、2.5、5.0 和 7.5 分钟的结果

	基础配方 A+8%乙醇酸+5%麦芽糖糊精 180 (pH3.8)[指出更刺痛/烧灼感的受验者人数]	基础配方 A+8%乙醇酸 (pH3.8)[指出更刺痛/烧灼感的受验者人数]
使用之后瞬间	5	11
使用之后 2.5 分钟	4	12*
使用之后 5.0 分钟	3	13*
使用之后 7.5 分钟	2	14*

p &lt; 0.1

5

表 11C

刺痛/烧灼感倾向

刺痛/烧灼感的平均程度(0-6 级)	基础配方 A + 8%乙醇酸+ 5%麦芽糖糊精 180(pH3.8)	基础配方 A+4%乙醇酸(pH3.8)
使用之后瞬间	0.69	0.63
使用之后 2.5 分钟	0.75	0.94
使用之后 5.0 分钟	0.44	0.75
使用之后 7.5 分钟	0.25	0.81*

p &lt; 0.1

10

从表 11A 和 11B 的结果可以看出, 麦芽糖糊精显著降低了含有 8%乙醇酸的基础配方 A 的刺痛/烧灼感倾向。表 11C 的结果表明含有麦芽糖糊精的制剂比基础配方 A 具有更轻的刺痛。

### 实施例 12

15

实施例 12 举例说明本发明的局部用组合物。该组合物可以用常规方法进行加工。它们适用于化妆用途。特别是该组合物适合于衰老和/或紫外线损伤的皮肤, 以改进其外观和感觉, 也适用于健康

的皮肤, 以防止或延缓其老化。

在本发明范围内的典型的水包油型乳状液如下:

<u>化学名称</u>	<u>重量%</u>
葡聚糖 10KD	4
乙醇酸	7
丙二醇	1
甘油	1
羟乙基纤维素	0.5
硅酸铝镁	0.5
咪唑烷基脲	0.5
乙二胺四乙酸四钠	0.05
凡士林	2
棕榈酸异丙酯	5
聚二甲基硅氧烷	0.5
胆甾醇	0.5
十六醇	0.5
异硬脂酸	3
硬脂酸聚乙二醇-40 酯	1
硬脂酸聚乙二醇-100 酯	1
硬脂酸失水山梨醇酯	1
氢氧化铵	使 pH 达到 4.0
去离子水	适量, 使达到 100%

在本发明范围内的另一种典型的水包油型乳状液如下:

<u>化学名称</u>	<u>重量%</u>
麦芽糖糊精	5
乙醇酸	10
丙二醇	1
羟乙基纤维素	0.5
硅酸铝镁	0.5
咪唑烷基脲	0.2
凡士林	2
棕榈酸异丙酯	5
聚二甲基硅氧烷	0.5
胆甾醇	0.5
硬脂酸	3
异硬脂酸	1.5
硬脂酸甘油酯	1.5
硬脂酸聚乙二醇-40 酯	1
硬脂酸聚乙二醇-100 酯	1
硬脂酸失水山梨醇酯	1
十六醇	0.5
氢氧化铵	使 pH 达到 3.8
去离子水	适量, 使达到 100%

在本发明范围内的一种典型的油包水型分散体如下:

<u>化学名称</u>	<u>重量%</u>
新戊酸异硬脂醇酯	20
辛酸聚乙二醇-8 酯/癸酸甘油酯	6
辛酸十六烷酯	17
二油酸聚甘油-6 酯	15
环二甲基硅酮	20
异硬脂酸甘油酯	0.5
异硬脂酸	0.5
神经酰胺 III	0.1
聚丙二醇-5-cetheth-20	3
L-乳酸/乳酸钾	6
羟基辛酸	0.1
去离子水	1.3
葡聚糖 100KD	10

制备在本发明范围内的下述水包油型乳状液:

<u>化学名称</u>	<u>重量%</u>
黄原胶	0.2
乙二胺酒石酸二钠	0.1
PCA 钠	0.5
重氮二苯基脲	0.3
二氧化钛	1
硬脂酸	3
环二甲基硅酮	0.3
十六醇	0.5
硬脂酸甘油酯	0.5
硬脂酸聚乙二醇-100 酯	0.5
steareth -2	0.2
卵磷脂	0.5
生育酚	0.2
甲氧基肉桂酸辛酯	6
葡聚糖 10K	6
乙醇酸	3
苹果酸	2
乳酸	2
三乙醇胺	使 pH 达到 3.8
去离子水	适量, 使达到 100%

应当理解, 本文中说明和描述的本发明的具体形式只是具有代表性的例子。只要不背离本公开的内容, 则可对所列举的实施方案进行各种改变, 包括但不限于本说明书中所建议的改变。因此, 在  
5 确定本发明的完整范围时, 应当参考随后附带的权利要求书。