

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03819056.7

[51] Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/14 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 36/718 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100577144C

[22] 申请日 2003.8.12 [21] 申请号 03819056.7

[30] 优先权

[32] 2002.8.14 [33] KR [31] 10-2002-0048073

[86] 国际申请 PCT/KR2003/001626 2003.8.12

[87] 国际公布 WO2004/016239 英 2004.2.26

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.7

[73] 专利权人 SK 化学株式会社

地址 韩国京畿道

[72] 发明人 李淳根 郭义宗 韩昌均 金周玄

[56] 参考文献

KR99-79378A 1999.11.5

CN1332002A 2002.1.23

审查员 王海鹏

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 1 页 说明书 21 页

[54] 发明名称

用于预防和治疗痤疮的局部制剂

[57] 摘要

公开一种用于预防或治疗痤疮的局部制剂，特别是通过以下途径预防或治疗痤疮的局部制剂：该制剂的抗致痤疮菌，痤疮丙酸杆菌的抗菌活性；通过抑制 5α -还原酶来抑制过量皮脂的产生；抑制粉刺、角质层分离和抗炎作用。所述局部制剂包含得自至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的提取物。

1. 一种用于预防或治疗痤疮的局部制剂，所述制剂包含选自刀豆和侧柏的东方医药的提取物，其中所述侧柏为金钟柏的种子；所述提取物通过用选自如下的溶剂提取：甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甘油、丙二醇和 1, 3-丁二醇。

2. 根据权利要求 1 的局部制剂，其中得自该东方医药的该提取物在该局部制剂中的含量为 0.001-20.0wt%。

3. 权利要求 1 或 2 的局部制剂，其中该提取物包含 0.01-10wt% 刀豆和 0.01-10wt% 侧柏。

4. 制备用于权利要求 1-3 中任一项的局部制剂的提取物的方法，包括：

(a) 分别粉化刀豆和侧柏，

(b) 在至少一种选自以下的提取溶剂中热提取该粉末：甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甘油、丙二醇、1, 3-丁二醇，

(c) 将该提取物过滤，和

(d) 在减压下浓缩并冻干产物。

5. 根据权利要求 4 的方法，其包括：分别粉化刀豆和侧柏，将粉末混合并提取该混合粉末；或者分别粉化刀豆和侧柏，提取各粉末并混合该提取物。

6. 根据权利要求 1 或 2 的局部制剂，其中该制剂的剂型为乳剂、凝胶、填塞物、化妆液或化妆皂、药用软膏或贴剂。

用于预防和治疗痤疮的局部制剂

发明领域

本发明涉及通过以下途径预防或治疗痤疮的局部制剂：该制剂的抗致痤疮菌，痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*) 的抗菌活性；通过抑制 5α -还原酶来抑制过量皮脂的产生；抑制粉刺、角质层分离和抗炎作用。所述局部制剂包含得自至少一种选自刀豆 (*Cavalia gladiata*)、侧柏 (*Biota orientalis*) 和黄连 (*Coptis chinensis*) 的东方医药的提取物。

相关技术领域描述

痤疮在青少年中的发病率为 90%，但也偶而见于 20 或 30 多岁的成人。痤疮 (或寻常痤疮) 是一种慢性炎症或在皮脂腺和毛囊中形成的疾病，其中发病机理包括过量分泌皮脂，毛囊表皮角化异常，厌氧皮肤移生细菌、痤疮丙酸杆菌的过度生长和其它原因。痤疮一般见于脸、胸、背、颈和臂，最显著的皮肤部位，特征为粉刺、脓疱、狼疮、微结或疤痕。

在痤疮早期，过度分泌的皮脂积聚在毛囊，而毛囊由于皮脂的压力进而肿胀，导致发生粉刺，其中毛囊关闭的粉刺成为白色痤疮 (白头粉刺)，而毛囊尖端轻微打开的粉刺成为黑色痤疮 (黑头粉刺)。当痤疮进一步发展时，细菌引起炎症，从而导致发生二种不同类型的症状：呈现微红色皮肤和微小粉刺的丘疹类型与呈现脓的脓疱类型。青少年和成人的痤疮之间存在一些差别，如表 1 总结。

表 1. 青少年和成人痤疮之间的差别

分类	青少年痤疮	成人痤疮
发生位置	额, 全脸, 皮脂腺所在 的任何部位	与青少年相比趋于位于脸的下部位如颊、嘴周 围和咽喉
发生季节	春天和夏天, 与皮脂腺 活动有关	全年发生, 无季节性暴发
症状	同时形成过量皮脂、皮 脂分泌活化部位微粉 刺出现	同时形成皮肤干燥, 微小痤疮隆起反复(发射 外观类型), 治疗进程缓慢, 痤疮遗迹残留
原因	生长期生理不稳定	与身体的生理和心理状况如激素不平衡、睡眠 不足、疲劳、压力和月经密切相关。与皮肤症 状相关性小

如表 1 所示, 在春天和夏天当皮脂分泌活跃时, 青少年痤疮在额和脸的所有部位形成, 且它们非常可能在油性皮肤上形成。相比之下, 成年人痤疮趋于在全年中于有限的部位形成, 并已知与脂质含量的相关性很小或没有。这种形成受身体的生理和心理状况, 例如激素不平衡、压力、饮食习惯无规律和弱身体状况影响, 因此意味着其病因学的复杂性。即使在相当好地治疗成人痤疮之后, 也非常可能发生色素沉积产生雀斑, 而且受影响的皮肤表面有时在该部位凹陷形成痤疮内陷。已知造成成人痤疮的引起很大关注的激素是通过刺激皮脂腺来分泌皮脂的雄激素和雌激素, 雄激素的拮抗剂。当二种激素的平衡被破坏时, 导致过量皮脂分泌, 结果形成痤疮。

已努力研制出不同的药物用于治疗痤疮, 它们包括用于抑制致痤疮菌的增殖的抗生素如红霉素和过氧化二苯和用于调节皮脂分泌的雌激素, 但是它们中大部分一般都有不良反应。在化妆品中, 已研制和试验了用于除去角蛋白的维生素 A 衍生物和用于抑制致痤疮菌的增殖的三氯酸和水杨酸。但是, 这些活性成分表现的作用小, 并且一般与不良作用如皮肤烧灼、皮肤过敏和光过敏有关。而且, 在

用这些活性成分给药时通常观察到痤疮复发。因此，不存在能够预防和治疗痤疮的真正产品。

发明概述

为努力研制出一种用于治疗或预防痤疮的新局部制剂，本发明者已根据与东方医药有关的不同出版物的内容，用据说已知涉及痤疮治疗机理(抗菌活性、抑制过量皮脂产生、角质层分离、抗炎作用等)的活性成分进行广泛的实验。结果，本发明者发现，刀豆、侧柏和黄连非常有效地预防和治疗痤疮，并且其刺激性很小或没有。

因此，本发明的一个目的是提供一种用于预防或治疗痤疮的局部制剂，它包含得自至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的提取物。

本发明的另一目的是提供一种对痤疮表现治疗效果且刺激性很小或没有的东方医药组合物。

发明详述

本发明涉及一种用于预防或治疗痤疮的局部制剂，它包含得自至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的提取物。

下面更为详细地描述本发明：

本发明涉及一种通过以下途径预防或治疗痤疮的局部制剂：抗致痤疮菌，痤疮丙酸杆菌的抗菌活性，通过抑制 5α -还原酶来抑制皮脂的过量产生，抑制粉刺形成、角质层分离和抗炎作用。所述制剂包含得自至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的提取物。

刀豆是一种一年生植物，并属于豆科。由于它的豆壳看起来象切草机，因此它一般称为刀豆。它一般在韩国南部和中国的江河区域及南部栽培。它的根和外壳也用作医药。已知刀豆包含维生素 A 和 C、水解酶脲酶、血球凝集素和刀豆氨酸。它古代以来已在中国被用作高质量食物和东方医药，例如用于治疗由冷汗导致的打嗝、呕吐和胃痛的医药的原料。目前，在民间治疗领域，已知刀豆有效地治疗

化脓性疾病，例如臭鼻和痔。

黄连是多年生草本植物，属于毛茛科，从最初起其根茎用作东方医药的原料。已知它是一种安全的植物，因为它不导致对皮肤和粘膜的刺激。已报道黄连包含生物碱，例如小檗碱、黄连碱、黄连宁、巴马亭和非洲防己碱以及黄柏酮和黄柏内酯。它在中国用于治疗烫伤、化脓性感染、感染性皮炎，臭鼻、腮炎症、渗出性多形性红斑、并用作胃肠和肠疾病的医药的原料。

侧柏是金钟柏的种子，属于柏科。新鲜的侧柏看起来呈浅黄色或黄白色，而陈久的侧柏看起来呈黄褐色并渗漏油。通常，侧柏在中国的不同地区栽培，其种子包含大约 14%的油和少量的皂苷。它已用于治疗焦虑和便秘，并还用作治疗炎症和脱毛的医药的原料以及镇静剂。

本发明的提取物可以通过以下步骤制备：分别粉化刀豆、侧柏和黄连，在至少一种选自以下的提取溶剂中热提取该粉末：蒸馏水、甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甘油、丙二醇、1,3-丁二醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、苯、己烷、二乙醚和二氯甲烷，将提取物过滤，在减压下浓缩并冻干产物。

刀豆、侧柏和黄连的混合提取物是通过以下方法制备的：分别粉化刀豆、侧柏和黄连，将粉末混合，并提取混合的粉末；或者分别粉化刀豆，侧柏和黄连，提取各粉末并将提取物混合。

当使用混合提取物时，本发明的制剂包含来自二种不同种类的东方医药的提取物，其中各提取物包含 0.01-10wt%刀豆和 0.01-10wt%侧柏；0.01-10wt%刀豆和 0.001-5wt%黄连；或 0.01-10wt%侧柏和 0.001-5wt%黄连。此外，该制剂包含得自三种不同的种类的东方医药的提取物，其中各提取物包含 0.01-10wt%刀豆和 0.01-10wt%侧柏和 0.001-5wt%黄连。如果浓度低于上述范围，则效力可以忽略；在浓度超出上述范围的情况下，出现对皮肤的不良作用和与制剂有关的技术问题。

优选来自至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的提取物的

含量为 0.001 wt%-20.0 wt%。如果含量低于 0.001 wt%，则治疗效力非常低；在超出 20.0 wt%的情况下，出现对皮肤的不良作用和与制剂有关的技术问题

本发明的制剂可以是同时含有药学上可接受的载体或赋形剂的乳剂、凝胶、填塞物、化妆液或化妆皂或者药用软膏或贴剂的形式。各特定的制剂可以根据常规方法制备。

用于局部给药的本发明制剂的有效剂量可以根据形状、大小、发病部位和患者的年龄而变，且一般每天应用二次至多次。

包含至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的本发明的局部制剂非常有效地预防和治疗痤疮。

以下特定的实施例意在例示本发明，不应将其理解为对所附的权利要求定义的本发明保护范围的限定。

实施例 1：制备刀豆、侧柏和黄连的提取物

用于本发明的得自刀豆、侧柏和黄连的提取物如下制备：

分别用蒸馏水洗涤 200 g 刀豆、侧柏和黄连，干燥并用为东方医药特别设计的粉碎机粉化，并往产物中加入大约 10 倍体积的 80%乙醇溶剂。80℃下加热 8 小时进行提取，使用配备冷凝器的设备以防止溶剂蒸发。

用 400 目滤布过滤提取物，并将剩余物过滤一次。将各东方医药提取物冷却至室温，用 Whatman 2 号滤纸过滤，并在 48℃和减压下使用配备冷凝器 (Buchi Rotavapor R-124, Water Bath B-480, 瑞士制造, Eyela A-3S Tokyo rikakikai) 的蒸馏仪器回收蒸发的溶剂来浓缩滤液，然后冻干，最后得到 15.8 g 刀豆提取物、8.9 g 侧柏提取物和 14.6 g 黄连提取物，为干重。

实施例 2：评价对 5 α -还原酶的抑制作用

在 4℃以下的温度下制备用于测定得自东方医药的提取物的抗睾酮 5 α -还原酶活性的抑制作用的睾酮 5 α -还原酶。通过吸入二乙醚

来麻醉 8 周龄的白色雌性 Sprague-Dawley 大鼠，并断颈处死，然后进行肝切除。用 PBS (磷酸盐缓冲盐水) 将提取的肝洗涤三次，并加入 3 体积冰冷的缓冲液 (50 mM 磷酸钠, pH 6.8, 0.25M 蔗糖, 1mM 二硫苏糖醇)，然后用单元均化器 (Polytron Homogenizer) 粉碎，得到均化的悬浮液。为从如此得到的悬浮液中分离 5 α -还原酶，将该悬浮液超声波处理 5 分钟并离心 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 分钟) 以制备蛋白层。

将上清液再悬浮在上述的缓冲液中，并在 -80 $^{\circ}$ C 下储存。根据 Bradford 法对如此得到的蛋白悬浮液进行蛋白定量，并用 ELISA 读数器测定其精确的值。

为评价对 5 α -还原酶活性的抑制作用，往 50 μ l 反应溶液中加入 10 μ l 抑制剂或受试样品的乙醇溶液 (包含东方医药提取物的 70% 乙醇溶液)，并将蛋白悬浮液加到体积为 100 μ l 的反应溶液。该反应溶液包含 50mM Na₂HPO₄ (pH 6.8)、25 mM KCl、500 mM NADPH 和 50 mM (3H) 睾酮。反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 分钟，并加入 250 μ l 反应终止试剂 (70% 环己烷和 30% 乙酸乙酯的混合物) 以终止反应。为从终产物中获得甾族化合物，将反应物离心以制备上清液，并将上清液在通风橱中放置 1 天以蒸发反应溶剂，然后将所得的剩余物溶于 20 μ l 氯仿。将产物点在 TLC 板上，并用显影溶液 (甲苯: 丙酮 = 4: 1) 在 TLC 室内显色 30 分钟，将显影板与 hyperfilm 接触 3 天。用密度计测定接触区域，并如下式 1 所示计算抗睾酮 5 α -还原酶的抑制率。结果总结于表 2 和 3 中。

式 1

$$\text{抗睾酮 5}\alpha\text{-还原酶的抑制率 (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

其中 A 为不加入样品时睾酮至二氢睾酮的转化率，而 B 为加入样品时睾酮至二氢睾酮的转化率。

表 2

活性成分	浓度 (%)	对 5 α -还原酶的抑制率 (%)
刀豆	0.1	100.0
	0.01	38.3
侧柏	0.1	100.0
	0.01	94.0
	0.001	34.7
黄连	0.1	100.0
	0.01	44.9
壬二酸	1.0	100.0
	0.1	19.8

表 3

活性成分	依赖于浓度的对 5 α -还原酶的抑制率 (%)		
	0.1%	0.05%	0.01%
侧柏: 刀豆 (50: 50)	100	100	35.2
侧柏: 黄连 (50: 50)	100	100	46.9
刀豆: 黄连 (50: 50)	100	100	31.7
刀豆: 侧柏: 黄连 (34: 33: 33)	100	100	66.8
刀豆: 侧柏: 黄连 (70: 20: 10)	100	100	92.6

如表 2 所示, 三种不同种类提取物(刀豆、侧柏和黄连)中的每一种都表现抗 5 α -还原酶活性的抑制作用。此外, 当至少二种不同种类的提取物经适宜的比率混合并溶于 70%乙醇以制备 0.1、0.05 和 0.01%(w/v)提取物时, 与包含单一种类的提取物的提取物相比, 待测定的提取物即使在低浓度下也表现出明显较高的抗 5 α -还原酶活性的抑制作用。这些结果表明适宜比率的混合提取物表现出协同抗 5 α -还原酶活性的抑制作用。本领域技术人员理解, 表现出协同抗 5 α -还原酶活性的抑制作用的本发明组合物不限于前述的组合物。

实施例 3: 评价抗痤疮病原体的抗菌活性

以这样的方式测定三种提取物(刀豆、侧柏和黄连)的抗菌活性:

用预定浓度的冻干粉化的提取物处理在液体培养基中培养的痤疮病原体(痤疮丙酸杆菌)，然后在无氧培养箱中培养，然后测定抗痤疮病原体(痤疮丙酸杆菌)的最小抑制浓度(MIC)。

全部过程如下：

在强化的梭菌培养基中于 37℃ 下将痤疮病原体(痤疮丙酸杆菌)培养 3 天，然后继续传代培养直至表现出显著活性。

第一，在液体培养方法中，将 10ml 强化梭菌培养基引入带螺旋盖的管中，并在 121℃ 下灭菌 20 分钟。灭菌后，往液体培养基中滴加 0.5ml 单独灭菌的液体石蜡以避免与氧的接触。冷却培养基，然后接种微生物至培养基，并在 37℃ 下培养 72 小时以上。

第二，在固体培养方法中，通过将 0.1% 琼脂加到强化的梭菌培养基而制备的 10 ml 固体培养基引入带螺旋盖的管中，并在 121℃ 下灭菌 20 分钟。冷却培养基，然后使用接种铂圈接种微生物至培养基，并在 37℃ 下穿刺培养 72 小时。

第三，在平皿培养方法中，将如固体培养方法制备和灭菌的琼脂培养基倾入平皿并冷却。完全冷却和凝固后，将平皿置于厌氧瓶，将 10 ml 水引入复合气体(CO₂ 10.5%，H₂ 9.6%，N₂ 79.9%)，并保持盖住瓶盖，然后在 37℃ 下培养 72 小时。

取 1 ml 包含充分传代培养的痤疮丙酸杆菌的培养基，将其接种于包含 9ml 强化梭菌培养基的培养基中，借此得到 10 倍稀释的培养基。重复相同的过程得到 10⁻¹ 和 10⁻⁵ 倍稀释的培养基。

将包含刀豆、侧柏、黄连的各均匀溶液和至少两种它们的组合充分溶于 10 ml 70% 乙醇以得到 2 倍稀释的溶液。通过 0.2μm 膜过滤器将溶液过滤以除去细菌。将强化的梭菌-琼脂培养基灭菌，冷却至 50℃，并往其中加入过滤除菌的提取物至浓度为 10μg/ml-0.1 mg/ml。将 1 ml 稀释培养基(稀释至 10⁻¹-10⁻⁵ 的进行传代培养的痤疮丙酸杆菌培养基)分散在陪替氏培养皿中，并分散具有一定浓度的每种琼脂培养基，然后混合并保持静置以凝固琼脂培养基。凝固后，将培养基放置在进一步配备 gas-pak 的厌氧瓶中。在 37℃ 下培养 3

天后，对形成的菌落数进行计数，与对照组比较，并根据结果计算抑制率。抗痤疮丙酸杆菌的抑制率如表 4 和 5 所示。

表 4

对痤疮丙酸杆菌的 MIC	提取物浓度 (%)					
	0.50	0.10	0.05	0.03	0.01	0.005
刀豆	-	-	-	-	±	+
侧柏	-	-	-	±	+	+
黄连	-	-	-	-	-	±
过氧化二苯	-	± ^{**}	+ ^{***}	+	+	+

*生长抑制

**假阳性

***阳性

如表明抗痤疮丙酸杆菌的抗菌活性的表 4 所示，可以观察到低浓度 (0.03%) 提取物的抗菌活性，而致痤疮菌在高浓度 (大于 0.1%) 下完全杀死，同时各提取物在其抗痤疮丙酸杆菌的 MIC 方面表现很小的差异。因此，可以认为本发明的东方医药的提取物即使在极低浓度下也对痤疮丙酸杆菌表现出显著的杀菌作用。

表 5

提取物	不同浓度的抗菌活性 (%)			
	0.1%	0.05%	0.01%	0.005%
侧柏: 刀豆 (50: 50)	100	100	85.7	33.2
侧柏: 黄连 (50: 50)	100	100	89.8	44.9
刀豆: 黄连 (50: 50)	100	100	92.3	49.7
刀豆: 侧柏: 黄连 (34: 33: 33)	100	100	92.4	46.8
刀豆: 侧柏: 黄连 (70: 20: 10)	100	100	92.6	48.6

如结果所示，与包含单一提取物的组合物相比，包含至少两种一

定比率的得自刀豆、侧柏和黄连的提取物的组合物表现轻微提高的抗菌活性。特别是，观察到包含一定比率的三种不同的得自刀豆、侧柏和黄连的提取物的组合物在各种浓度下表现优良的抗菌活性和抗 5 α -还原酶的抑制作用。

实施例 4：评价对过度角化的抑制活性

所有的皮肤细胞通过适宜的代谢过程，控制它们的增殖和剥落而有助于保持皮肤稳态。因此，皮肤的再生率可以间接通过观察角质层剥落率来测定，所述角质层剥落率一般评价与角质层分离有关的皮肤变色水平来测定。

在提取物效力的评价中，使用裸鼠进行用于促进角质层分离的第一筛选。各提取物样品通过以下方法制备：将在实施例 1 中制备的干燥粉末化提取物溶于 70%乙醇，并如上述制备包括乙醇酸和乳酸的阳性对照。实验如下进行：

用 10% SDS 将裸鼠的皮肤洗涤 30 分钟，然后让皮肤干燥以进行实验。用山坡状小室覆盖 0.4 ml 乙酸银水溶液，并用密封贴剂处理 30 分钟，然后用光显影溶液浸润以用乙酸银使部分贴剂变黑。进一步用各提取物样品在变黑的部分处理密封贴剂，并在大约 24 小时后除去。应用提取物前的着色指数和除去提取物之后 24 小时的变色指数是通过比色计测定的(变色指数越高，则角质层分离作用越大)。

表 6

样品	出现剥落	应用的提取物的浓度 (%)		
		0.2	0.1	0.05
刀豆	均匀	++ ¹⁾	+	+
侧柏	均匀	+ ²⁾	± ³⁾	- ⁴⁾
黄连	均匀	++	±	-
乙醇酸	均匀	2wt% (pH4) ++		
乳酸	均匀	2wt% (pH4) ++		

1) 明显变色，

- 2) 变色,
- 3) 轻微变色,
- 4) 无变化

通过使用至少二种不同的已在第一筛选中表明具有效力的得自溶于 70%乙醇溶液的刀豆、侧柏和黄连的提取物来完成促进角质层分离的第二定量作用。将通常用作自动晒黑产品的皮肤变色剂的二羟基丙酮用作着色剂。实验过程如下:

选择 20 名 20 出头至 35 岁左右的人, 并选择它们的前臂的内部作为试验部位。在着色前测定内部的皮肤亮度, 然后用在山坡状小室内的 10%二羟基丙酮着色。24 小时后, 用比色计观察着色部分, 并且每天将 0.4ml 浓度分别为 0.05%、0.1%和 0.2%的包含至少二种溶于 70%乙醇的提取物的各样品应用 30 分钟, 然后每天用比色计观察应用部分。将在二羟基丙酮应用 24 小时后用比色计测定的值设为 100, 并将日变色水平转化成%。评价变色部分恢复至正常颜色的时间。

式 2

对过度角化的抑制率 = $[(\text{对照组} - \text{试验组}) / \text{对照组}] \times 100$

表 7

样品	不同浓度的恢复时间(天)			抑制率(%)
	0.2wt%	0.1wt%	0.05wt%	
对照	19			-
刀豆: 侧柏 (50: 50)	10	13	16	15.8-47.4
刀豆: 黄连 (50: 50)	10	12	14	26.3-47.4
侧柏: 黄连 (50: 50)	11	13	15	21.0-42.1
刀豆: 侧柏: 黄连 (34: 33: 33)	9	11	14	26.3-52.6
刀豆: 侧柏: 黄连 (70: 20: 10)	9	11	13	31.6-52.6

如表 7 所示, 包含至少二种提取物的混合组合物在浓度为 0.2%

时表现的抑制率为 47.4-52.6,表明本发明的提取物能够在短时间内将二羟基丙酮导致的皮肤变色变回正常皮肤颜色。包含至少二种提取物的混合组合物表现比包含单一提取物的组合物更高的角质层分离作用,特别是包含三种提取物,刀豆、侧柏和黄连的混合组合物表现最高的抗过度角化的抑制活性。

实施例 5: 抗炎作用

1)使用 SD 大鼠进行的角叉菜胶足水肿方法

分别腹膜内施用 30 mg/kg 量的在实施例 1 中制备的刀豆、侧柏、黄连提取物和它们的混合物。1 小时后,将 0.5 ml 0.1%角叉菜胶溶液注射至后足底以引起炎症。在注射角叉菜胶时和给药 4 小时测定大鼠足体积变化,并根据式 3 计算抑制率。结果如表 8 所示。

式 3

抑制率(%)=[(1-ΔV_{处理组})/ ΔV_{对照组})]×100 (ΔV: 足体积变化)

表 8

样品	抑制率(%)
刀豆	68.8±12
侧柏	46.0±10
黄连	62.3±13
刀豆:侧柏(50:50)	63.1±8
刀豆:黄连(50:50)	70.4±15
刀豆:侧柏:黄连(34:33:33)	75.8±9
刀豆:侧柏:黄连(70:20:10)	78.4±10
阿斯匹林	35.2±6

2) Ba1b.c 耳水肿试验

为测定提取物的抗炎作用,将引起刺激的物质,5.0%苯扎氯铵、

2.5%巴豆油和 3000iu/g 视黄酸(阴性对照)溶于 70%乙醇溶液,并将它以 0.3 mg/耳局部应用于小鼠耳(6 只小鼠/组),以引起水肿。在分别引起水肿之后的 15 分钟和 6 小时,将各提取物和对照物(0.3 mg/耳)局部应用于小鼠耳。在应用引起刺激的物质 24 小时后,用钻孔器切下小鼠的应用部分,并将其称重。根据测微计测定的平均值来评价水肿程度。如果如表 9 所示。

表 9

样品	对耳重量的抑制率(%)	对耳厚度的抑制率(%)
刀豆	49.2	53.8
侧柏	28.8	30.6
黄连	36.0	38.9
刀豆:侧柏(50:50)	34.1	35.3
刀豆:黄连(50:50)	44.7	48.0
侧柏:黄连(50:50)	32.3	34.6
刀豆:侧柏:黄连 (34:33:33)	46.0	54.2
刀豆:侧柏:黄连 (70:20:10)	45.3	58.6
甘草酸	38.4	42.7
消炎痛	45.6	52.0

式 4

$$\text{抑制率}(\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

A: 对照组耳厚度的平均值(阴性对照处理后的耳厚度-没有处理的耳厚度)

B: 样品组耳厚度(样品处理后的耳厚度-没有处理的耳厚度)

如表 8 和 9 所示,用提取物处理的组表现出类似于作为阳性对照的甘草酸和消炎痛的抗水肿抑制活性。特别是刀豆的提取物以及刀豆、侧柏和黄连的混合提取物表现优良的抗水肿抑制作用,它比阴性对照溶液的作用高 110-200%。

实施例 6: 使用白兔的耳评价对粉刺的减轻作用

试验系统-此试验一般被采纳用于评价处理。购得4月龄和重2-3 kg的新西兰白色雄兔，使熟悉1周，其中仅选择用裸眼确定的健康兔。

试验材料-关于试验组，分别使用溶于70%乙醇溶液的刀豆、侧柏、黄连的粉末化的提取物(0.1%(w/v))和它们的混合物，使用溶于70%乙醇溶液的1.0%壬二酸作为阳性对照，并将70%乙醇溶液本身用作阴性对照。

试验系统的分类-每天将肉豆蔻酸异丙酯(Sigma)应用于兔子的双耳，持续2周，以引起粉刺。选择裸眼观察表现典型粉刺的兔子，并进行分组，其中考虑到粉刺严重程度每组包含6只兔子。在IPM给药2周后，观察兔耳外观表现为毛囊和粉刺形成的严重扩大、表皮和毛囊的严重过度角化，以及焦痂形成和严重炎症。

受试材料的给药方法-给试验组和阳性对照兔的右耳以及对照兔的左耳每天施用一次0.5 ml的数量，并用拭子铺开，持续2周。2周后，评价双耳。

<裸眼观察>

将裸眼测定的标准分成7个等级，0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5和3.0。评价粉刺的面积。粉刺治疗时间为2周，测定粉刺的恶化和减轻。结果如表10所示。

<裸眼测定标准>

0: 与对照组比无差别

0.1: 0和1之间的症状

1: 表现充血、毛细管出血、毛囊的轻微角化和扩大

1.5: 1和2之间症状

2: 中等程度的毛囊角化和扩大

2.5: 2和3之间的症状

3: 过度严重的毛囊角化和扩大，表现出曲型的粉刺

表 10

样品	给药前(左耳)	给药后(右耳)	抑制率(%)
刀豆	1.76±0.12	1.21±0.08	31.3
侧柏	1.74±0.10	1.44±0.12	17.2
黄连	1.78±0.09	1.18±0.13	33.7
刀豆:侧柏(50:50)	1.73±0.12	1.12±0.09	35.3
刀豆:黄连(50:50)	1.69±0.14	1.14±0.09	32.5
侧柏:黄连(50:50)	1.62±0.07	1.09±0.14	32.7
刀豆:侧柏:黄连(34:33:33)	1.76±0.10	1.04±0.008	40.9
刀豆:侧柏:黄连(70:20:10)	1.79±0.09	1.05±0.11	41.3
壬二酸	1.58±0.12	1.13±0.14	28.5
70%乙醇	1.76±0.10	1.73±0.09	1.7

<用图像分析观察>

用裸眼观察之后,用戊巴比妥钠麻醉各试验组,并切下它的双耳,然后在基底上分离大小为大约 2.5×1.5 cm 的组织,并将其在温水(50℃)中浸泡 3 分钟。分离组织上的表皮,将其内侧向上放置在玻片上,固定并在室温下干燥。用实体显微镜(×20)观察图像,并用图像分析器计算组织上的粉刺数和它的面积。结果如表 11 所示。

表 11

样品	给药前(左耳)粉刺面积/数目 (cm ²)	给药后(右耳)粉刺面积/数目 (cm ²)	抑制率(%)
刀豆	0.30±0.02	0.16±0.02	46.7
侧柏	0.32±0.01	0.23±0.01	28.1
黄连	0.30±0.02	0.17±0.02	43.3
刀豆:侧柏(50:50)	0.31±0.02	0.16±0.01	48.4
刀豆:黄连(50:50)	0.29±0.01	0.19±0.01	34.5
侧柏:黄连(50:50)	0.31±0.02	0.17±0.02	45.2
刀豆:侧柏:黄连 (34:33:33)	0.32±0.01	0.11±0.02	55.4
刀豆:侧柏:黄连 (70:20:10)	0.32±0.01	0.11±0.02	65.6
壬二酸	0.30±0.02	0.18±0.02	40.0
70%乙醇	0.31±0.01	0.30±0.02	3.2

如表 11 所示,表现比作为阳性对照的壬二酸(40.0%)更高的粉刺减少率(面积/计数比率)的提取物是刀豆(46.7%)、黄连(43.3%)和包含至少二种提取物的组合物。特别是包含刀豆:侧柏:黄连(70: 20: 10)的提取物表现出比阳性对照高 1.6 倍的粉刺减少率。显示粉刺减少率的这个实验表明裸眼和图像分析所观察的结果彼此类似。

根据痤疮形成机理总结实验,表明本发明提取物表现出抗致痤疮菌,痤疮丙酸杆菌的抗菌活性,过量皮脂产生的抑制作用,粉刺溶解作用,过度角化抑制作用和抗炎作用,而且对皮肤是安全的。

实施例 7: 评价对人皮肤的刺激

为测试皮肤安全性,将据说表现出抗痤疮的治疗和预防功效的包含刀豆、侧柏和黄连的提取物和至少二种不同东方医药的混合提取物制成乳剂的形式,并用它们进行人皮肤刺激试验(人贴剂试验)。将 20 μ l 制备的受试材料(10%贴剂基质)滴加到 finn 室内,用 70%乙醇洗涤并干燥,将其置于试验部位,30 名年龄为 20-30 的健康人的前臂内部,然后用多微孔带固定。应用贴剂 24 小时后,揭下贴剂,并用油笔标记受试部位。观察在应用 30 分钟和 24 小时后的皮肤反应并根据如下标准进行评价:

在表 12 中,将平均反应分为 $\pm$ (1 点)、+(2 点)、++(3 点)和+++ (4 点)。测定标准为排列在 1 以下的 1 级(无刺激范围),排列在 3 以下的 2 级(轻微刺激范围),排列在 5 以下的 3 级(中度刺激范围)和排列在 5 以上的 4 级(强刺激范围)。

表 12

样品	24 小时				48 小时				平均反应 (n=30)	等级
	±	+	++	+++	±	+	++	+++		
痤疮乳剂基质	4	-	-	-	-	-	-	-	2.00	2
基质+刀豆*0.3wt%	2	-	-	-	-	-	-	-	1.00	1
基质+侧柏**0.3wt%	6	-	-	-	-	-	-	-	2.75	2
基质+黄连***0.1wt%	4	-	-	-	-	-	-	-	2.00	2
基质+刀豆 0.3wt%+ 侧柏 0.3wt%	4	-	-	-	-	-	-	-	2.00	2
基质+刀豆 0.3wt%+ 黄连 0.1wt%	3	-	-	-	-	-	-	-	1.50	2
基质+侧柏 0.3wt%+ 黄连 0.1wt%	4	-	-	-	-	-	-	-	2.00	2

*刀豆

**侧柏

***黄连

如表 12 所示，痤疮乳剂基质表现安全范围的刺激水平，除了刀豆(1 级)之外的所有东方医药表现大于 2 级的刺激水平。黄连由于色素沉着因而在低浓度下测定。

实施例 8 和对比实施例 1：制备乳剂

将表现最高粉刺溶解和减少作用的刀豆、侧柏和黄连的混合提取物制成乳剂，其成分和它们的用量如表 13 所述。制备过程如下：

表 13

成分	实施例 8 (wt%)	对比实施例 (wt%)
1. cetearyl 醇	5.00	5.00
2. 聚山梨醇酯-60	0.80	0.80
3. 二甲聚硅氧烷共聚物	0.80	0.80
4. 环甲基硅氧烷	4.00	4.00
5. 霍霍巴油	2.00	2.00
6. 蒸馏水	至多 100	至多 100
7. 刀豆: 侧柏: 黄连 (70: 20: 10)	0.50	不存在
8. 尼泊金甲酯	0.20	0.20
9. 1, 3-丁二醇	8.00	8.00
10. 卡波姆	0.15	0.15
11. 黄原胶	0.05	0.05
12. 聚丙烯酰胺/C13-14 异链烷烃/laures-7	1.20	1.20
13. 咪唑烷基脲	0.20	0.20
14. 三乙醇胺	0.15	0.15
15. 香料	0.10	0.10

将油相中存在的原料(成分 1-5)精确称重,引入附加的油相槽并通过在 75℃下加热来溶解。将存在于水相的原料(成分 6-9)称重,并引入乳化槽中。将原料(成分 10-11)称重,用蒸馏水弄湿,并引入乳化槽中。

在 75℃下加热来溶解乳化槽中的成分。在真空下将油相中的成分引入乳化槽,并在 75℃下使用均化器(3500 rpm)和踏板混合器(25 rpm)乳化 5 分钟。往槽中加入成分 12,并分散 3 分钟。

将成分 13 和 14 溶解并分散在少量蒸馏水中,将其引入槽中以进行中和。在真空下去除泡沫并冷却至 50℃以后,加入香料,分散并冷却至 35℃,将所得的组合物熟化以制备乳剂。

实施例 9 和对比实施例 2: 制备贴剂

表 14

成分	实施例 9 (wt%)	对比实施例 (wt%)
1. 甘油	15.00	15.00
2. 聚丙烯酸	2.00	2.00
3. 丙烯酸酯共聚物	2.00	2.00
4. 氢氧化铵	0.40	0.10
5. EDTA 二钠	0.05	0.05
6. 酒石酸	0.20	0.20
7. 尼泊金甲酯	0.20	0.20
8. 乙醇	1.00	1.00
9. 甘草酸二钾	0.10	0.10
10. 香料	0.05	0.05
11. 刀豆: 侧柏: 黄连 (70: 20: 10)	0.50	-
12. 丙二醇	5.00	5.00
13. 蒸馏水	至多 100	至多 100

将成分 1-6 称重, 引入溶解槽, 并在室温下均匀搅拌以制备粘性溶液。将成分 7-10 在室温下溶解, 引入溶解槽并均匀搅拌。将成分 11-13 加热至 60℃, 溶解并以等分试样的少量体积引入, 由此得到贴剂用凝胶。使用带有涂料器帽的包衣装置将包含所述成分的贴剂用凝胶以 700g/m² 的数量均匀涂布在具有大小为 1m×1m 的硅化处理粘合剂层的聚酯薄膜上, 以制备无孔聚乙烯薄膜。将该多层层压材料切成直径为 1.5cm 的圆形贴剂形式, 并将其引入陷凹层压的薄膜纸, 低密度聚乙烯和铝, 由此最终制备临床贴剂。

实施例 10: 乳剂和贴剂的临床试验

评价实施例 8 和对比实施例 1 (15 人的试验组和 15 人的对照组), 以及实施例 9 和对比实施例 2 (15 人的试验组和 15 人的对照组) 对痤疮的减轻作用。给 60 名年龄为 10-20 岁的有痤疮症状健康人局部应用该乳剂每天两次 (在早上和晚上), 应用贴剂每天一次 (在晚上应用并在第二天早上除去), 持续 1 个月, 评价痤疮的治疗和预防作用。试验前, 给试验的皮肤和痤疮症状打分并照相。应用乳剂和贴剂 1

个月后，根据照相和裸眼观察确定痤疮的预防和治疗程度。测定标准见表 15。

表 15

等级	皮肤症状测定标准
0	正常症状
1	可以忽略的粉刺数量或没有形成炎症
2	显著的粉刺数量和大小，但没有形成炎症
3	少量炎性丘疹
4	少量且广泛分布的晶状和炎性粉刺
5	少量和小尺寸的丘疹结节
6	显著数量的炎性结节
7	非常显著数量的炎性结节
8	严重晶状粉刺
9	严重囊泡和炎性结节

根据表 15 的测定标准确定等级，其中如果受试者的痤疮症状等级下降 3 个以上等级，则评价为效力优越；如果等级下降 1-2 个等级，则评价为效力中等；如果等级没有下降，则评价为无效力；如果等级升高，则评价为恶化。表 16 表示根据测定标准使用本发明的乳剂和贴剂痤疮预防和治疗的临床结果。

表 16

试验组		效力优越	中等效力	无效力	恶化	不良作用
乳剂	试验组	12 (80%)	2 (13.3%)	0	0	1 (6.7%)
	对照	0	5 (33.3%)	9 (60%)	0	1 (6.7%)
贴剂	试验组	11 (73.3%)	4 (26.7)	0	0	0
	对照	0	6 (40%)	9 (60%)	0	0

总结表 16 的结果，包含刀豆、侧柏和黄连的乳剂和贴剂与不含它们的乳剂和贴剂相比表现出抗痤疮的预防和治疗作用的改善。

实施例 11：毒性试验

如下测定刀豆、侧柏和黄连的提取物的毒性：用水稀释溶于二甲亚砜(DMSO)的提取物，并以 100 mg/kg 的量对各只小鼠(每组 10 只)给药，然后观察 7 天。没有小鼠死亡。

如前述，包含得自至少一种选自刀豆、侧柏和黄连的东方医药的提取物的本发明局部制剂通过抑制 5 α -还原酶活性、抗痤疮丙酸杆菌的抗菌活性、抗炎作用、抑制粉刺形成和角质层分离而非常有效地预防和治疗痤疮。