

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

A61K 7/42

A61K 7/48



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01820075.3

[43] 公开日 2004年3月10日

[11] 公开号 CN 1481233A

[22] 申请日 2001.12.28 [21] 申请号 01820075.3

[30] 优先权

[32] 2001.1.10 [33] KR [31] 2001/1236

[86] 国际申请 PCT/KR01/02285 2001.12.28

[87] 国际公布 WO02/055047 英 2002.7.18

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.5

[71] 申请人 高台有限公司

地址 韩国汉城

[72] 发明人 朴德勋 张东逸 金国铉

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

[54] 发明名称 包含熊果苷和葡糖苷酶作为活性成分的增白皮肤组合物

[57] 摘要

本发明涉及包含熊果苷和葡糖苷酶作为活性成分的增白皮肤和/或脱色组合物。葡糖苷酶是一种将熊果苷水解成氢醌和葡萄糖的酶。在本发明的组合物中,熊果苷和葡糖苷酶是分离的,仅在施用于皮肤前混合。然后,熊果苷水解成氢醌和葡萄糖,并且通过氢醌抑制黑素生成来实现增白作用。本发明的组合物在安全性和稳定性方面显示出优越性。

ISSN 1008-4274

1. 一种使皮肤脱色的组合物，其包含作为活性成分的熊果苷和葡糖苷酶。
2. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其包含 0.05-5.0% 的熊果苷，75-150  
5 单位葡糖苷酶/3% 熊果苷。
3. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其中所述熊果苷选自提取自植物的天然熊果苷或通过化学合成而合成的化学熊果苷。
4. 按照权利要求 3 的皮肤脱色组合物，其中所述天然熊果苷包括熊果叶提取物。
- 10 5. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其中葡糖苷酶分离自包含所述葡糖苷酶的植物或微生物提取物。
6. 按照权利要求 5 的皮肤脱色组合物，其中所述植物选自杏树、大麦、燕麦属植物。
7. 按照权利要求 6 的皮肤脱色组合物，其中所述微生物是黑曲霉。
- 15 8. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其中熊果苷和葡糖苷酶在一个容器中被物理分离，并且仅在施用于皮肤前混合以启动酶反应。
9. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其中在一种制剂中，葡糖苷酶包含于可用于化妆品的胶囊中，并且熊果苷包含胶囊化的葡糖苷酶。
10. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其适用于化妆品。
- 20 11. 按照权利要求 1 的皮肤脱色组合物，其适用于外用药膏。
12. 按照权利要求 10 的皮肤脱色组合物，其中所述组合物适用于多种形式：营养霜，调色剂，乳液，按摩霜，眼霜，眼部精华素，清洁形式，清洁霜、粉；爽身水，体霜，体油，体用精华素，面膜。

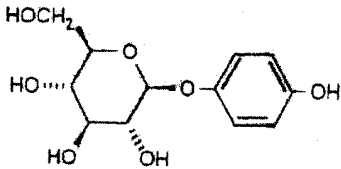
## 包含熊果苷和葡糖苷酶作为活性成分的增白皮肤组合物

5

技术领域

本发明涉及包含熊果苷和葡糖苷酶的增白皮肤组合物。更具体地，在化学式 1 中描述的熊果苷以及将熊果苷水解成氢醌和葡萄糖的葡糖苷酶包含于通式中。另外，熊果苷和葡糖苷酶是分离的，仅在施用于皮肤前被混合。

## 化学式 1

背景技术

通常，皮肤色素沉着是由于在紫外线照射的皮肤黑素细胞中黑色素合成增加而产生的。通过连续的酪氨酸氧化合成黑色素。酪氨酸被氧化酶—葡糖苷酶催化，并转变成多巴醌。多巴醌自发形成黑色素。黑色素吸收太阳紫外线起保护作用，但也引起肤色疾病，例如黑斑病，特定区域的黑斑。为达到增白皮肤的目的，在化妆品中包含脱色素组合物。

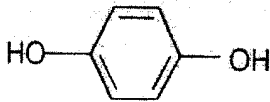
起初，通过抑制黑素生成过程的一些步骤来实现皮肤的脱色素作用。氢醌，熊果苷，曲酸，抗坏血酸及它们的衍生物适于皮肤的脱色。含有上述成分的来自熊果（韩国专利申请号 2000-035398）、桑葚和苹果（韩国专利号 1998-147412）的植物提取物包含于化妆品中，用于皮肤脱色。

然而，脱色剂例如抗坏血酸，曲酸，谷胱甘肽，桑葚提取物容易失去稳定性而引起皮肤发炎。而且，曲酸和它的衍生物，最有效的酪氨酸酶抑制剂之一，大规模生产脱色剂成本昂贵。太阳光和热可以诱导熊果

苷的脱色和抑制酪氨酸酶减少的功效。因此，公认熊果苷比氢醌的脱色作用差。

氢醌—最有效的增白化合物，广泛用于非处方药膏和皮肤科医生的处方中。已报道了许多氢醌的临床研究（Arndt 等., JAMA. 194: 965-967, 5 1965），所述氢醌具有针对色素沉着过度例如黑斑病的脱色作用。在化学式 2 中描述的氢醌抑制酪氨酸酶，酪氨酸酶是在黑色素生成过程中的一种必需酶。特别地，酪氨酸酶可通过其羟化酶活性催化酪氨酸转变成二羟基苯丙氨酸（多巴），由于它的氧化酶活性多巴转变成多巴醌。

化学式 2:



10

尽管氢醌具有一定的功效，但它是不稳定和活性化合物，并且在化妆品制剂如胶囊、乳剂中容易导致脱色。不幸的是，即使低浓度的氢醌也能诱导过敏接触性皮炎和皮肤急性或慢性炎症（Choudat 等., *J. Ind. Med.* 45(6): 376-80, 1988）。为避免这类副作用，根据患者的易感性严格控制剂量（Pearl E. 等., *Archi. Dermatol.* 131:1453-1457, 1995）。15

熊果苷是氢醌的一个葡糖苷，它和  $\beta$ -D-葡萄糖相连接。尽管熊果苷用于增白化妆品类，但它不容易被皮肤吸收，并且具有比氢醌差的增白作用。熊果苷抑制酪氨酸酶活性的作用约为氢醌的 1/1000。（Kazuhisa Maeda 和 Minoru Fukuda, *Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in* 20 *human melanocyte culture. J. Pharm. Exp. Therap.* 1996; 276(2): 765-769）。

一种利用添加了氮的表面活性剂的方法已用来增强熊果苷的皮肤吸收（美国专利号 5,759,528）。许多研究人员和研究已致力于开发新的增白衍生物，但几乎没有成功的报道公布。总之，尽管熊果苷更稳定并且几乎不具有皮肤问题，但由于与氢醌相比，熊果苷具有较低的皮肤吸收率，25 较低的增白作用，使得熊果苷还没有广泛应用。

目前，氢醌是最有效的增白组合物。由于它的副作用如皮肤毒性和不稳定性，需要一种新的具有低皮肤刺激性和高稳定性的有效增白组合

物。

为克服前述的和其它缺点，本发明提供了一种新的皮肤增白组合物，在施用于皮肤前，通过混合熊果苷和葡糖苷酶来最小化皮肤刺激性和最大化稳定性。

5

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种无毒、无刺激性、无致敏性的制剂，该制剂表现对人皮肤脱色的高功效。

10 本发明的另一个目的是提供皮肤增白组合物，其包含在化学式 1 中描述的熊果苷和葡糖苷酶作为活性成分。

可将组合物的熊果苷含量调至总量的 0.05-5%，优选 0.1-3.5%。以 3%的熊果苷为基础，可将组合物中葡糖苷酶的含量调至 75-150 个单位。熊果苷和葡糖苷酶浓度不足可导致增白作用不足，太多的熊果苷和葡糖酶可导致皮肤发炎。

15 上述提及的熊果苷可以是天然的熊果苷、用化学方法得到的熊果苷或者用生物技术制成的熊果苷。优选地，分离自熊果叶的天然熊果苷或熊果提取物本身可用于本发明。

葡糖苷酶是一种将葡萄糖苷键水解成葡萄糖和苷元的酶。葡糖苷酶在酵母、细菌、真菌和动物的消化器官中普遍存在。最近，克隆了葡糖苷酶基因，并且可用生物技术来生产葡糖苷酶。使上述本发明具体化的葡糖苷酶的来源不受限制。依照本发明，将含有葡糖苷酶的植物或微生物提取物加入到化妆品中。优选地，所述植物可以是杏树、大麦或燕麦属植物，所述微生物可以是黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。不限制本发明描述的将熊果苷水解为氢醌的葡糖苷酶的来源。

25 在本发明组合物中，熊果苷和葡糖苷酶是分开的，仅在施用于皮肤前被混合。于是，熊果苷水解成氢醌和葡萄糖，并通过抑制黑素生成的氢醌实现增白作用。本发明组合物在安全性和稳定性方面显示了优越性。

30 本发明组合物可以加入到化妆品例如调色剂、乳液、凝胶、乳剂、乳膏、软膏中。必要时，上述组合物中可加入防腐剂、抗氧化剂、着色剂、香料、表面活性剂、增稠剂、湿润剂、紫外线吸收剂或表面活性剂。

优选将活性佐剂和/或其它活性成分的体积调至总量的 0.01-20%。

意图将本发明组合物施用于局部色素的损伤部位，该组合物一般以溶液、凝胶、单一或复合的乳剂、微胶囊或脂质体的形式用于医用目的。如果在一个制剂中组合物包含熊果苷和葡糖苷酶，可将一种组分，优选葡糖苷酶包囊于微胶囊、脂质体或脂囊泡中以阻止水解反应，直至将它们施用于皮肤。因此，可以使稳定性最大化。

利用通常在有机物分析中使用的薄层层析（TLC）法来确认葡糖苷酶将熊果苷完全水解成氢醌和葡萄糖。

为证实包含熊果苷和葡糖苷酶的组合物比单一氢醌组合物更稳定，在 37°C 孵育包含熊果苷和葡糖苷酶的反应混合物 10 分钟，并在冰水中通过冷却作用终止反应。在 400 nm 处测量吸光度，脱色度可以用熊果苷溶液和氢醌溶液的程度比率来表示。结果证实包含熊果苷和葡糖苷酶的混合物组合物的稳定性优于氢醌的稳定性。因为水解加速和葡糖苷酶的浓度成比例，则由于葡糖苷酶浓度减少，稳定性增强。

在本发明的另一个优选实施方案中，通过针对施用于健康成年志愿者的闭合贴片（occlusive patch）的皮肤刺激试验检验该组合物的安全性。结果表明，除了释放氢醌之外，包含熊果苷和葡糖苷酶的混合物组合物未显示任何刺激作用。然而，作为对照实验的同样浓度的氢醌组合物显示阳性刺激作用。这可解释为相对于一次性高浓度刺激物而言，皮肤更能适应逐渐增加量的刺激物。

此外，将包含熊果苷和葡糖苷酶的组合物施用于志愿者手臂皮肤因紫外线照射人工诱发的色素损伤部位。结果，包含熊果苷和葡糖苷酶的组合物显示比仅包含熊果苷或仅包含氢醌的组合物更有效。

## 25 附图简述

图 1 表示证实葡糖苷酶将熊果苷水解成氢醌和葡萄糖的薄层层析（TLC）。

- 1 熊果苷和葡糖苷酶
- 2 葡萄糖
- 3 氢醌
- 30 4 熊果苷

### 实施本发明的最佳方式

本发明实用的和当前优选的实施方案如下文所说明。

然而，考虑到本发明的内容，可以理解，那些本领域的技术人员可在本发明范围内进行修改和改进。

5

#### 优选的实施方案 1: 用葡糖苷酶产生的熊果苷水解产物

0.05%熊果苷 (sigma, 美国) 和 20 单位/ml 的  $\beta$ -1,4-葡糖苷酶 (sigma, 美国, EC 3.2.1.21) 在 37°C, 0.1 M 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 中反应 30 分钟。反应结束之后, 利用在流动溶剂中进行薄层层析来确定氢醌的产生, 所述溶剂为正-丁醇, 乙醇, 水按 5:3:2 比例混合的混合物。

10

然后, 干燥 TLC 板, 用炭化溶液 (10% CuSO<sub>4</sub> 的 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 喷洒, 并立即用空气加热枪干燥。计算帖片的 Rf 值。

根据表 1, 在 TCL 中仅观测到氢醌和葡萄糖。因此推断熊果苷被葡糖苷酶完全水解。

15 表 1

物质	Rf 值
熊果苷	0.2
氢醌	0.9
葡萄糖	0.1
熊果苷+葡糖苷酶	0.9, 0.1

\*Rf=溶质的流动距离/溶剂展开的整体距离

#### 优选实施方案 2: 混合组合物的稳定性试验

通过脱色比较熊果苷-葡糖苷酶混合的制剂与单独氢醌制剂的制剂稳定性。100 mM 熊果苷分别与 1、10 和 20 单位/ml 葡糖苷酶在 1 ml 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 中 37°C 反应 10 分钟。通过在冰水中冷却终止反应。然后, 加入 20% 的冰三氯乙酸 (TCA) 以消除葡糖苷酶的活性。12000 rpm 离心混合物。37°C 孵育上清液 24 小时, 在 400 nm 处测量吸光度。氢醌的脱色度视为 100%, 计算其它样品相对于氢醌的比率。100 mM 熊果苷和 100 mM 氢醌溶液 (sigma, 美国) 作为对照。在表 2 中, 当葡糖苷

25

酶浓度降低时，由于水解作用的加速与葡糖苷酶的浓度成比例，则稳定性增强。

表 2

物质	吸光度 (400 nm)	脱色率 (氢醌溶液脱色的 %)
缓冲液	0.002	0.5%
氢醌溶液	0.356	100%
熊果苷溶液	0.005	1.40%
熊果苷+1 $\mu$ l 葡糖苷酶	0.012	3.37%
熊果苷+10 $\mu$ l 葡糖苷酶	0.094	26.4%
熊果苷+20 $\mu$ l 葡糖苷酶	0.168	47.2%

5 \*氢醌的脱色率视为 100%，其它与氢醌溶液相比较

优选的实施方案 3：由熊果苷-葡糖苷酶反应引起的原发刺激对皮肤的抑制作用

通过对 30 个健康成年人进行闭合贴片试验来检验熊果苷和葡糖苷酶混合物的皮肤刺激。将包含优选实施方案 2 的熊果苷和葡糖苷酶溶液的测试贴片施用于志愿者手臂的下部。24 小时后，去除贴片。在去除贴片后的 30 分钟到 48 小时内观察皮肤状况，皮肤刺激程度按表 3a 所述进行分类。

15 表 3b 显示了刺激试验的结果。氢醌溶液表现出很强的皮肤刺激，而熊果苷和葡糖苷酶混合溶液几乎不表现皮肤刺激。



表 3a

标记	指示
? +	不确定的反应，无形的红斑
+	弱反应（无水疱），红斑，丘疹
++	强烈反应（有水疱），红斑，丘疹，水疱
+++	极强的阳性反应，大疱
---	阴性

表 3b

物质	反应	
	24h	48h
缓冲液	—	—
氢醌溶液	+++	+++
熊果苷溶液	—	—
熊果苷+1 $\mu$ l 葡糖苷酶	—	—
熊果苷+10 $\mu$ l 葡糖苷酶	—	—
熊果苷+20 $\mu$ l 葡糖苷酶	—	—

5 优选实施方案 4：熊果苷-葡糖苷酶混合的制剂的皮肤增白作用

制备基于上述优选实施方案的实用制剂，并用于增白皮肤。分别制备包含熊果苷的制剂 1 和包含葡糖苷酶的制剂 2，仅在施用前混合，并以 10:1 的制剂 1 和制剂 2 混合物的比率施用于皮肤。然后，比较各自功效。

10 挑选年纪在 25-30 岁之间的成年志愿者，每 10 人为一组，参加 6 个星期的活体研究。用 1.5 MED 的紫外光（紫外灯；飞利浦(Philips) TL20 w/12UV, TM02/09UV）照射志愿者的前臂下部，诱导产生直径为 1.5 cm 的 4 个圆形色素区。诱导着色一天进行两次，持续两天。一天两次施用作为试验制剂的制剂 1 和制剂 2 以 10:1 的比例混合而成的混合物以及比较制剂 1-3，持续 6 个星期。然后，观察皮肤的增白效果。结果，不含脱色剂  
15 的制剂或仅含有熊果苷的制剂未显示皮肤增白作用。尽管包含氢醌的制剂具有皮肤增白作用，但证实它会导致皮肤问题。相反，包含熊果

苷和葡糖苷酶的混合物制剂比其它制剂具有更好的脱色作用，且没有任何副作用。

表 4a

成分 (%)	制剂 1	制剂 2	比较制剂 1	比较制剂 2	比较制剂 3
熊果苷	3.0	—	—	3.0	—
葡糖苷酶	—	1000 单位	—	—	—
氢醌	—	—	—	—	2.0
甘油	10.0	1.0	10.0	10.0	10.0
丙二醇	5.0	0.5	5.0	5.0	5.0
羧甲基纤维素	0.3	0.03	0.3	0.3	0.3
透明质酸 (Hyaluronic acid)	10.0	1.0	10.0	10.0	10.0
pH 调节剂	适量	适量	适量	适量	适量
去离子水	至 100	至 100	至 100	至 100	至 100

5 表 4b

制剂	皮肤脱色效果			
	有效	轻微有效	无效	副作用
制剂 1 和制剂 2 混合物(10:1)	6	3	1	—
比较制剂 1	—	2	8	—
比较制剂 2	—	3	7	—
比较制剂 3	5	2	—	3

下面是包含依照本发明的组合物的精华素的优选实施例。

将混合物施用于面部之前，在手上以 10:1 的比率混合制剂1和制剂2。

5 <制剂实施例 1> 利用本发明的成分制备精华素

制剂1		制剂2	
成分	百分比 (%)	成分	百分比 (%)
熊果苷	3.0	葡糖苷酶	1000 单位
甘油	10.0	甘油	1.0
丙二醇	5.0	丙二醇	0.5
羧甲基纤维素	0.3	羧甲基纤维素	0.03
透明质酸	10.0	透明质酸	1.0
pH 调节剂	适量	pH 调节剂	适量
香料	少量	香料	少量
防腐剂	少量	防腐剂	少量
色素	少量	色素	少量
去离子水	至 100	去离子水	至 10

## &lt;制剂实施例 2&gt; 利用本发明的成分制备水包油化妆品乳剂

制剂1		制剂2	
成分	百分比 (%)	成分	百分比 (%)
熊果苷	3.0	葡糖苷酶	1000 单位
蜡	3.0	蜡	0.3
液体石蜡	4.0	液体石蜡	0.4
甘油	10.0	甘油	1.0
羧基烯类聚合物	0.1	羧基烯类聚合物	0.01
多溶剂合物 60	1.1	多溶剂合物 60	0.11
丙二醇	5.0	丙二醇	0.5
pH 调节剂	适量	pH 调节剂	适量
香料, 防腐剂, 色素	少量	香料, 防腐剂, 色素	少量
去离子水	至 100	去离子水	至 10

## &lt;制剂实施例 3&gt; 利用本发明的成分制备面膜

制剂1		制剂2	
成分	百分比 (%)	成分	百分比 (%)
熊果苷	3.0	葡糖苷酶	1000 单位
聚乙烯醇	14.0	聚乙烯醇	1.4
甘油	10.0	甘油	1.0
羧甲基纤维素	0.3	羧甲基纤维素	0.03
PEG4000	1.0	PEG4000	0.1
丙二醇	5.0	丙二醇	0.5
pH 调节剂	适量	pH 调节剂	适量
香料, 防腐剂, 色素	少量	香料, 防腐剂, 色素	少量
去离子水	至 100	去离子水	至 10

## &lt;制剂实施例 4&gt; 利用本发明的成分制备营养霜

制剂 1		制剂 2	
成分	百分比 (%)	成分	百分比 (%)
熊果苷	3.0	葡糖苷酶	1000 单位
液体石蜡	10.0	液体石蜡	1.0
丙二醇	5.0	丙二醇	0.5
蜡	7.0	蜂蜡	0.7
甘油	10.0	甘油	1.0
聚山梨酸酯 60	1.3	聚山梨酸酯 60	0.13
pH 调节剂	适量	pH 调节剂	适量
香料, 防腐剂, 色素	少量	香料, 防腐剂, 色素	少量
去离子水	至 100	去离子水	至 10

工业适用性

- 5 本发明的皮肤增白剂包含熊果苷和葡糖苷酶，其通过葡糖苷酶的水解反应逐渐产生氢醌。本发明的脱色作用高于氢醌的脱色作用，并且不引起任何皮肤问题，贮存过程中无不必要的反应。因此，本发明适用于具有化妆品组合物、皮肤病学或药物组合物的增白产品。

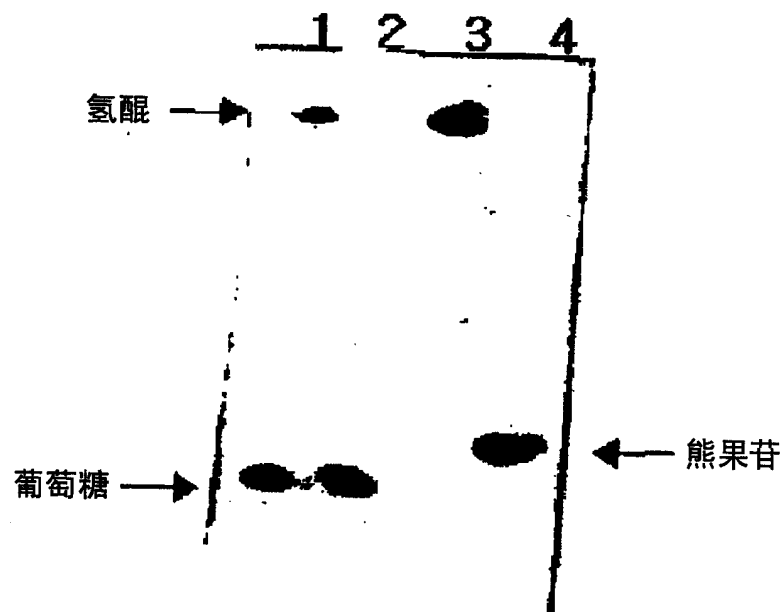


图 1