

Hydagen F, ein neuer Hautfeuchtigkeitsregulator - Methoden und Ergebnisse des Wirkungsnachweises

RAINER OSBERGHAUS, CHRISTIAN GLOXHUBER,
HANS-GEORG van RAAY und SIEGFRIED BRAIG*

Synopsis — Screening procedures for the *in vitro* testing of potential regulators of skin moisture are proposed. In addition, FMIR analysis has the potential for comparing the *in vivo* hydration condition of stratum corneum after the application of cosmetic emulsions. Hydagen F, a partial sodium salt of a polyhydroxycarboxylic acid, performed positively in these tests. Good tolerance for this new cosmetic ingredient is expected in view of extensive toxicological studies.

1. Einleitung

Die Erforschung der Grundlagen der Hautfeuchtigkeitsregulation hat Anfang der 50er Jahre durch die Dermatologie entscheidenden Auftrieb erhalten. Es konnte nachgewiesen werden, daß durch ein Gemisch wasserlöslicher Verbindungen, das als Hauptkomponenten 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure, Aminosäuren, Lactate, Harnstoff und verschiedene Zucker enthält, Feuchtigkeit in den obersten Hautschichten festgehalten wird. In der Kosmetikliteratur ist dieses System unter dem Begriff Natural Moisturizing Factor (NMF) bekannt.

Weiterhin ist erwiesen, daß die Erscheinungsform der im kosmetischen Sinne trockenen, rauen und rissigen Haut nicht vom Fettgehalt, sondern in besonderem Maße vom Wassergehalt des Stratum corneum abhängt.

Nachdem dieser Zusammenhang erkannt war, hat es zahlreiche Versuche gegeben, durch kosmetische Wirkstoffe in diesen Mechanismus einzugreifen. Auf dem Markt wurden Präparate mit „Feuchtigkeitsfaktoren“ und „moisturizing cremes“ angeboten, deren Anzahl eine ständig steigende Tendenz aufweist.

* Aus den Laboratorien der Henkel KGaA, Düsseldorf.

Das Hauptproblem bei der Entwicklung und Prüfung von Hautfeuchtigkeitsregulatoren liegt darin, daß die Messung ihrer Effekte schwierig ist. Da die meßtechnische Erfassung von Effekten jedoch Voraussetzung zum Auffinden von Wirkstoffen ist, befaßten auch wir uns zunächst mit der Entwicklung von Prüfmethoden. Über die Resultate dieser Arbeiten und die Entwicklung eines neuen Wirkstoffes wird im folgenden berichtet.

2. Meßmethoden

2.1 *In vitro*-Nachweise

Für ein Screening potentieller Hautfeuchtigkeitsregulatoren wurden die folgenden *in vitro*-Modelle entwickelt:

2.1.1 *Ermittlung der Gleichgewichtsfeuchte*

Proben der zu untersuchenden Substanzen (ca. 300-500 mg) wurden mit einer definierten Menge Wasser angefeuchtet und bei 23° 24 Stunden verschiedenen Luftfeuchtigkeitsgehalten (1 %, 30 %, 47 %, 65 %, 89 % und 100% relative Feuchtigkeit) ausgesetzt. Die Werte der aufgenommenen bzw. abgegebenen Wassermengen wurden gravimetrisch bestimmt und graphisch aufgetragen. Aus den hieraus resultierenden Kurven kann diejenige relative Feuchtigkeit ermittelt werden, bei der weder Wasserabgabe noch Wasseraufnahme erfolgt. Dieser Wert, den wir als Gleichgewichtsfeuchte bezeichnen, ist ein Maß für das Wasserretentionsvermögen einer Substanz. Je niedriger der Wert liegt, um so positiver ist das Produkt zu beurteilen. Aus der Steilheit der Kurve läßt sich weiterhin das Wasseraufnahmevermögen (Hygroskopizität) der Substanz ablesen.

2.1.2 *Messungen an der Schweineepidermis*

Als Modell wurde Schweineepidermis gewählt, weil sie der menschlichen Haut in ihrem Aufbau ähnlich ist.

2.1.2.1 *Gewinnung der Schweineepidermis*

Unmittelbar nach dem Töten der Schweine wurden die Borsten der Haut mittels einer Haarschermaschine (Scherkopf 0,1 mm) abgeschnitten. Die Schweine wurden in 50-60° warmem Wasser ca. 3-5 Minuten gebrüht, die Epidermis anschließend abgeschält und bei -20° bis zum Gebrauch gelagert.

2.1.2.2 Bestimmung der Wasserretention sowie der Rehydratation von Schweineepidermis

Ausgestanzte Epidermisstückchen (1 x 2 cm) wurden 2 Stunden in eine 10-prozentige Lösung der Prüfsubstanz gelegt, unter standardisierten Bedingungen mittels einer kleinen Presse abgetupft und 24 Stunden zwischen 2 Klammern frei hängend in einem 100ml Erlenmeyerkolben bei 23° und 30% bzw. 50% relativer Feuchtigkeit (eingestellt durch Schwefelsäure-Wasser-Mischungen) getrocknet. Die Austrocknung der imprägnierten Probe auf X-% des Anfangsgewichtes wurde mit dem entsprechenden Wert einer in reines Wasser gelegten Epidermis (Blindwert) verglichen. Die Verbesserung der Wasserretention sowie der Rehydratation gegenüber dem Blindwert wurde in Δ % H₂O angegeben. Die Abweichungen betragen bei den jeweiligen Doppelversuchen maximal ± 2 absolute Einheiten. Bei größeren Abweichungen wurde der Versuch wiederholt. Die Rehydratation wurde durch 24-stündiges Trocknen der imprägnierten und abgetupften Schweineepidermis bei 30% relativer Feuchtigkeit und anschließende 24-stündige Inkubation bei 90% relativer Feuchtigkeit analog bestimmt.

2.1.2.3 Elastizitätsmessungen von Schweineepidermis

Das elastische Verhalten der Epidermis wird durch den Hydratationszustand des Stratum corneum maßgeblich beeinflusst. Wird die mit Feuchtigkeitsregulatoren imprägnierte Schweineepidermis bei konstanter Luftfeuchtigkeit getrocknet, so kann die hydratisierende Wirkung der Prüfsubstanzen durch vergleichende Elastizitätsmessungen mit der in Wasser gelagerten Epidermis bestimmt werden. Hierzu werden ausgestanzte Epidermisstückchen (1 x 6 cm) zwei Stunden in 10-proz. wäßrigen Lösungen des zu prüfenden Produktes gelegt und unter standardisierten Bedingungen abgetrocknet (vgl. 2.1.2.2). Die Proben wurden zwischen zwei Klammern frei hängend bei 90% relativer Feuchte 24 Stunden inkubiert und in einer Zugprüfmaschine* bei 0-50 p Belastung mit einem Vorschub von 10 mm/min gedehnt. Als Maß für die Elastizität wurde die Dehnung in mm angegeben, die im linearen Teil der Kraft-Dehnungskurven bei einer Belastung zwischen 5-30 p gemessen wurde.

2.2 In vivo-Nachweis

Entscheidend für den Wirkungsnachweis ist der Nachweis der Feuchtigkeitsretention am Menschen. Bei diesen Prüfungen muß unbedingt darauf

* Fa. Zwick & Co., [Type 1402], Einsingen/Donau

geachtet werden, daß auch tatsächlich am Wirkungsort gemessen wird, d.h., daß bei Bestimmungen des Wassergehaltes nur die Feuchtigkeit des Stratum corneum erfaßt wird. Hierfür ist z.B. die von N.A. Putnam 1972 (1) und von der Dow Chemical Corp. 1974 (2) beschriebene FMIR-Analyse* prinzipiell geeignet.

Die Methode beruht darauf, daß die menschliche Haut bei 1645 cm^{-1} und 1545 cm^{-1} zwei charakteristische starke Absorptionsbanden zeigt, von denen die sog. Amid I-Bande des Hautproteins mit der OH-Deformationsschwingung des Wassers zusammenfällt, während die andere — Amid II-Bande — dem Protein allein zuzuordnen ist. Durch Anwesenheit von Wasser wird das Intensitätsverhältnis Amid I/II entsprechend erhöht. Das beobachtete Intensitätsverhältnis Amid I/II ist somit ein Maß für die Feuchtigkeit der Haut.

Wir verwendeten einen "Skin Analyzer" der Wilks Scientific Corp., Norwalk/USA, mit weit herausgeführter Kristallhalterung und zwei spiegelbildlich angeordneten FMIR-Einheiten, die auf einem Rahmen in einem IR-Gitterspektrometer (Perkin-Elmer, Mod. 621) montiert waren. Bei der praktischen Durchführung der Messung wurde die Unterarminnenseite der Testpersonen mittels einer entsprechenden Vorrichtung mit einem konstanten Druck von $0,3\text{ kp/cm}^2$ gegen den Germaniumkristall (Außenfläche $2 \times 5\text{ cm}$) dieser FMIR-Anordnung gepreßt.

An der mit der Haut des Unterarms in direkter Berührung stehenden Germaniumoberfläche wird bei den Frequenzen, die die Probe zu absorbieren vermag, die innere Totalreflexion vermindert und dadurch der IR-Strahlung das Spektrum der Hautoberfläche „aufgeprägt“.

Da die Eindringtiefe der Strahlung bei Verwendung des Kristalls nur einige Mikron beträgt, beziehen sich die Ergebnisse ausschließlich auf die oberste Hautschicht (Stratum corneum), die Ziel der Untersuchung ist. Das charakteristische Hautspektrum in diesem IR-Bereich zeigt die folgende Abbildung 1.

* FMIR = Frustrated Multiple Internal Reflection

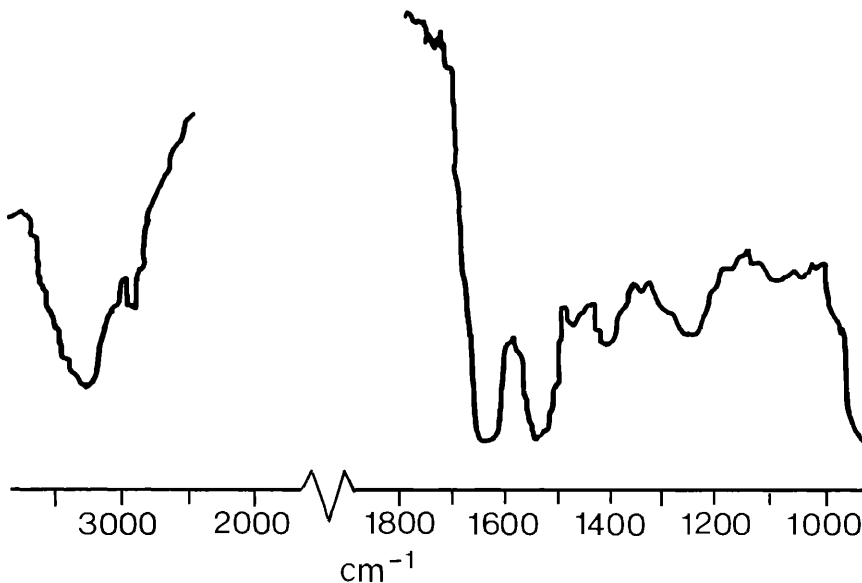
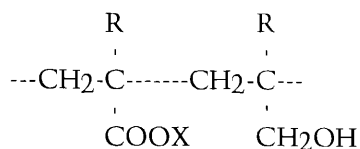


Abb. 1: IR-Spektrum der Haut

3. Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung von Hydagen F

Bei der Suche nach geeigneten Hautfeuchtigkeitsregulatoren für kosmetische Präparate gelangten wir zu einem Partial-Na-Salz einer Polyhydroxycarbonsäure, deren Struktur in idealisierter Form wie folgt angegeben werden kann:



wobei R = H, -CH₂OH oder -COOX bedeuten
und X = H oder Na sein kann (3).*

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung sind im folgenden zusammengefaßt:

* Dieses Produkt ist der Firma Henkel KGaA inzwischen unter der Bezeichnung Hydagen F
warenzeichenrechtlich geschützt.

3.1 *In vitro*-Tests

3.1.1 *Messung der Gleichgewichtsfeuchte*

Hydagen F wurde im Vakuumexsikkator über konz. H₂SO₄ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Messung wurden jeweils 20 Proben mit einer definierten Wassermenge angefeuchtet und bei verschiedenen Feuchten, wie unter 2.1.1 beschrieben, gelagert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Wasseraufnahme bzw. -abgabe, die sich nach 24 Stunden einstellten, sind aus Abbildung 2 ersichtlich.

Hieraus ergibt sich eine „Gleichgewichtsfeuchte“ von 41 % rel. Feuchte, d.h., oberhalb dieser rel. Feuchte nimmt Hydagen F Wasser auf und unterhalb dieses Wertes gibt das Produkt allmählich Wasser ab.

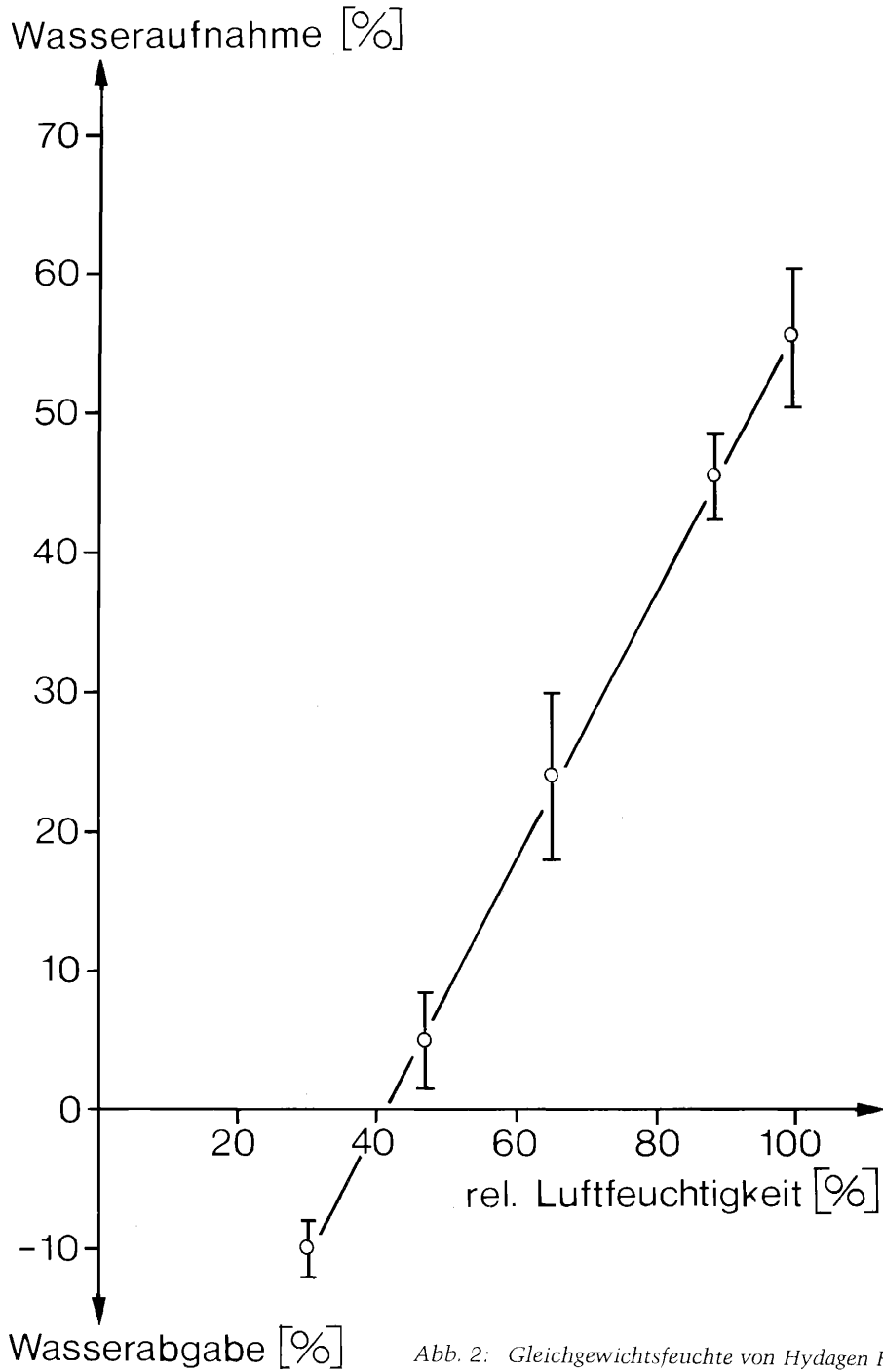
Der entsprechende Wert betrug für Kochsalz ca. 75 % rel. Feuchte und für ein dem NMF nacherstelltes synthetisches Produkt ca. 58 % rel. Feuchte.

J.H. Blank (4) stellte fest, daß bei rel. Feuchten von 60% ein Gleichgewichtszustand besteht, bei dem der Feuchtigkeitsgehalt der Hornhaut nicht unter 10mg/100mg Trockengewicht abfallen kann, und daß oberhalb dieser rel. Feuchte das Stratum corneum weich und elastisch bleibt. Unterhalb von 60% rel. Feuchte kann die Hornhaut austrocknen und brüchig werden.

Demnach würde Kochsalz, obwohl es bei hohen Feuchten extrem viel Wasser aufzunehmen vermag, bei durchschnittlichen Luftfeuchtigkeiten von 40-60% rel. Feuchte eher austrocknend als hydratisierend wirken. Da die Gleichgewichtsfeuchte von Hydagen F bei ca. 41% rel. Feuchte liegt, ist die Voraussetzung, der Austrocknung des Stratum comeum entgegenzuwirken, prinzipiell gegeben.

3.1.2 *Bestimmung der Wasserretention und Rehydratation von mit Hydagen F behandelter Schweineepidermis*

Nach der in Abschnitt 2.1.2.2 beschriebenen Methode wurden Wasserretention und Rehydratation von Schweineepidermis bestimmt, die mit wäßrigen Hydagen F-Lösungen behandelt worden waren. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von jeweils 20 Einzelmessungen zusammengestellt. Auch in diesem Modell zeigt Hydagen F gute wasserretinierende sowie rehydratisierende Eigenschaften.



Produkt	Wasserretention $\Delta\%$ H ₂ O nach Austrocknung bei		Rehydratation $\Delta\%$ Wasseraufnahme bei
	30% r.F.	50% r.F.	90% rel.F.
Wasser (Vergleichswert)	0	0	0
Hydagen F (10-proz. Lsg.)	10,2 \pm 2,1	16,9 \pm 3,5	27,6 \pm 7,9

Tabelle 1

Ergebnisse der Wasserretention und Rehydratation von Schweineepidermis, die mit Hydagen F behandelt wurde.

3.1.3 Ergebnisse der Dehnungsmessungen der mit Hydagen F behandelten Schweineepidermis

Da Dehnungsmessungen mit biologischem Material stets uneinheitlich sind, ist eine größere Zahl von Messungen erforderlich. Aus jeweils 40 Einzelmessungen resultierten für die Wasserbehandlung (Vergleichswert) Dehnungswerte von 0,3 - 0,5 mm; für die mit Hydagen F behandelte Epidermis hingegen Dehnungswerte von 3,3 \pm 0,7 mm. Typische Kraft-Dehnungsdiagramme einer lediglich mit Wasser und einer mit 10-proz. wäßriger Hydagen F-Lösung behandelten Epidermis zeigt Abbildung 3.

Die nur mit Wasser behandelte Epidermis ist unelastisch und trocken, während die mit Hydagen F behandelte Haut noch genügend Wasser enthält und daher elastisch und dehnbar ist.

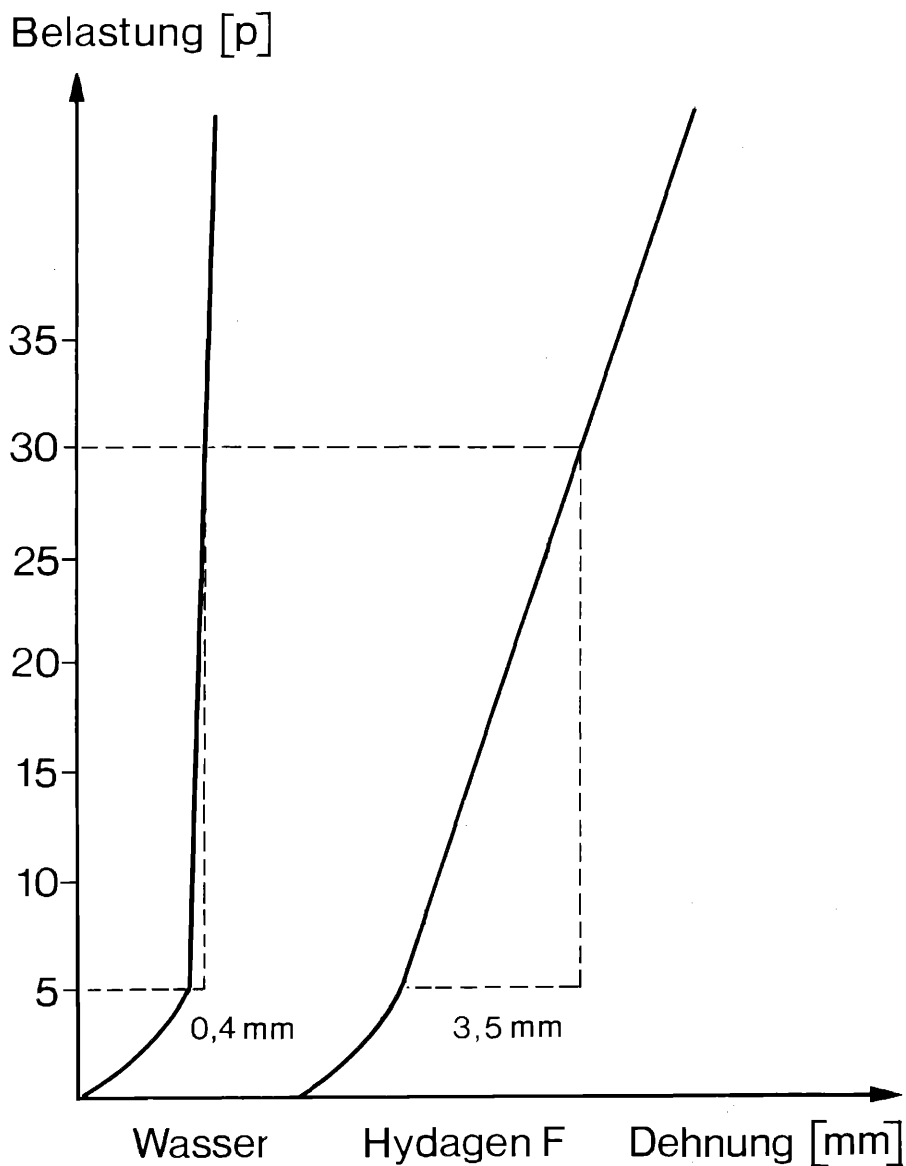


Abb. 3: Kraft-Dehnungsdiagramme von Schweineepidermis nach 24 Stunden Inkubation bei 90% rel. Feuchte.

3.2 *In vivo*-Prüfung von Hydagen F

Zur *in vivo*-Prüfung der hauthydratisierenden Wirkung wurden 3% Hydagen F in folgende O/W-Rahmenrezeptur eingearbeitet und an 11 weiblichen Probanden im Vergleich zur entsprechenden wirkstofffreien Emulsion getestet:

Paraffinöl 40 cP	17,0 %
Myritol 318® (Henkel)	2,0 %
Lanette 0® (Henkel)	2,5 %
Stearinsäure	2,8 %
Carbopol 940® (Goodrich)	0,5 %
Hydagen F®	3,0 %
Triisopropanolamin	3,16%
Phenonip® (Nipa Lab.)	0,1 %
Wasser	68,94%

3.2.1 *Applikation der Cremes*

Die Unterarminnenseite der Testpersonen wurde mit Äther entfettet, mit einer Syndet-Seife intensiv gewaschen, 1 Minute mit Leitungswasser gespült, dann noch zweimal mit der Syndet-Seife für jeweils 15 Sekunden gewaschen und sorgfältig mit Wasser abgespült. Zur Trocknung wurde der Arm abgetupft und 5 Minuten gefönt. Nach weiteren 5 Minuten erfolgte die erste Messung an einer zuvor markierten Teststelle von 10 cm² der Unterarminnenseite. Darauf wurde eine eingewogene Menge Creme mit einem stumpfen Plexiglasspatel auf die markierte Fläche 2 Minuten lang einmassiert und die überschüssige Creme sorgfältig abgestrichen und zurückgewogen. Die aufgetragene Crememenge betrug 10 ± 2 mg/cm². Nach Einziehen der Creme (2,5 Minuten) erfolgte die zweite Messung. Weitere Messungen wurden 0,5 Stunden und 1,5 Stunden nach der ersten Messung durchgeführt. Für die vergleichenden Untersuchungen wurde an einem Arm die wirkstoffhaltige und an dem anderen die wirkstofffreie Creme appliziert.

3.2.2 *Vorversuche zur FMIR-Analyse Hydagen F-haltiger Cremes*

Bei den Messungen können sich aufgrund von Überlagerungen der charakteristischen IR-Banden durch Bestandteile der Emulsionsgrundlagen sowie durch den Wirkstoff selbst Schwierigkeiten ergeben. Diese Faktoren mußten daher zunächst überprüft werden.

a) *Creme ohne Hydagen F*

Das Spektrum der mit Äther und Seife gereinigten und anschließend getrockneten Haut des linken Armes einer Versuchsperson zeigte im betreffenden IR-Bereich praktisch nur die Amid I-Bande (1645 cm^{-1}), die Amid II-Bande (1545 cm^{-1}) sowie einen geringen Carboxylgehalt (1400 cm^{-1}) an. Das Intensitätsverhältnis Amid I zu Amid II (Auswertungsverfahren nach der Basislinienmethode) betrug ca. 1,3.

Die Haut wurde sodann mit der wirkstofffreien Creme behandelt (3.2. 1) und 2,5 Minuten, 30 Minuten sowie 90 Minuten nach Applikation der Creme vermessen. Alle drei Spektren zeigten praktisch ein identisches Bild.

Die ermittelten Intensitätsverhältnisse, Amid I zu Amid II, ergaben folgende Werte:

Messung nach 2,5 min.: 1,2

Messung nach 30,0 min.: 1,4

Messung nach 90,0 min.: 1,4

Innerhalb der Fehlergrenzen sind die Ergebnisse von unbehandelter Haut und behandelter Haut gleich, d.h., es erfolgte keine meßbare Erhöhung des Wassergehaltes der Hautoberfläche. Die Bestandteile der Emulsionsgrundlage störten bei der Messung nicht.

b) *Creme mit 3% Hydagen F*

Wiederum wurde die zuvor gereinigte, unbehandelte Haut sowie die mit Hydagen F-Creme behandelte Haut am rechten Arm vermessen.

Das Spektrum des unbehandelten rechten Arms war praktisch identisch mit dem des unbehandelten linken Arms. Das Intensitätsverhältnis Amid I zu Amid II betrug wiederum ca. 1,3.

Die Amid II-Bande wurde nun von der asymmetrischen C-O-Valenzschwingung der vorhandenen Carboxylat-Anionen unterlagert, weshalb eine entsprechende Korrektur der Intensität der 1545 cm^{-1} -Bande erfolgte. Dies geschah durch Subtraktion der bei 1400 cm^{-1} gemessenen Intensität des gleichen Spektrums, multipliziert mit dem natürlichen Intensitätsverhältnis der asymmetrischen und symmetrischen C-O-Valenzbande (1500 bzw. 1400 cm^{-1}) des Carboxylat-Anions. Für diesen Faktor wurde in unserem Fall der Wert 1,5 festgelegt, der einen guten Mittelwert für verschiedene Carboxylate darstellt; danach ergaben sich folgende Intensitätsverhältnisse für Amid I zu Amid II:

Messung 2,5 min. nach Applikation der Creme: 2,1

Messung 30,0 min. nach Applikation der Creme: 3,3

Messung 90,0 min. nach Applikation der Creme: 2,7

Das Verhältnis der Amid I- zur Amid II-Bande hatte folglich gegenüber der Creme ohne Hydagen F deutlich zugenommen und zeigte damit einen höheren Wassergehalt des Stratum corneum an.

Quantitative (prozentuale) Aussagen sind jedoch nur bedingt möglich, da die Auswertung der Bandenintensitäten mit der Basislinienmethode nach subjektivem Ermessen erfolgen muß.

3.2.2 *Tests mit mehreren Probanden und Zusammenfassung der Versuchsergebnisse*

Nach den unter 3.2.2 beschriebenen orientierenden Versuchen wurde die O/W-Creme an 10 weiteren Testpersonen vermessen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann festgestellt werden, daß bei Anwendung der Creme ohne Hydagen F in allen Fällen bereits nach 0,5 Stunden bzw. 1,5 Stunden ein starker Rückgang des Wassergehaltes des Stratum corneum zu verzeichnen war. Der Mittelwert des Intensitätsverhältnisses Amid I/Amid II betrug 1,4. Dieser Quotient war bei den entsprechenden Versuchen mit Hydagen F deutlich erhöht (Mittelwert: 2,7).

Die Differenz der Mittelwerte ohne und mit Hydagen F ist signifikant. Somit darf eine erhöhte Wasserretention der Haut durch Anwendung der Hydagen F-Creme als sichergestellt gelten.

3.3 *Toxikologische Untersuchungen*

Als potentieller kosmetischer Wirkstoff wurde Hydagen F umfangreichen toxikologischen Prüfungen unterzogen. Die akute Toxizität wurde an Mäusen bei oraler Applikation untersucht und ergab einen LD₅₀-Wert von > 5 g/kg. Zur Prüfung der subakuten Toxizität wurde ein 90-Tage-Test an Ratten unter SPF-Bedingungen durchgeführt. Bei Versuchsende wurden bei allen Ratten zahlreiche Parameter des Blutes und Harns untersucht. Die inneren Organe wurden nach Tötung der Tiere gewogen und histologisch untersucht. Selbst bei einer Dosis von 5000 ppm wurden keine Befunde beobachtet, die auf eine toxische Wirkung der Testsubstanz zurückzuführen wären. Weiterhin wurde die Hautverträglichkeit an haarlosen und weißen Mäusen sowie an Albino-Kaninchen und an Meerschweinchen

getestet. Die Schleimhautverträglichkeitsprüfung erfolgte am Kaninchen-
 auge.

In keinem dieser Tests wurden toxische Reaktionen festgestellt.

Tabelle 2:

Amid I / Amid II — Bandenverhältnis als Kriterium der Feuchtigkeitsretention.

Proband Nr.	gereinigte und getrocknete Haut		2,5 Minuten n. Applikation der Creme	0,5 Stunden n. Applikation der Creme	1,5 Stunden n. Applikation der Creme
1	links 1,3 rechts 1,3	ohneHydagen F mit Hydagen F	1,2 2,1	1,4 3,3	1,4 2,7
2	links 1,5 rechts 1,7	ohneHydagen F mit Hydagen F	1,9 2,1	1,3 2,5	1,4 3,2
3	links 1,7 rechts 1,5	ohneHydagen F mit Hydagen F	1,8 2,0	1,6 2,3	1,7 2,6
4	links 1,1 rechts 1,1	ohneHydagen F mit Hydagen F	1,2 3,9	1,3 2,0	1,3 2,4
5	links 1,1 rechts 1,7	ohneHydagen F mit Hydagen F	2,0 2,0	1,0 3,7	0,9 2,0
6	links 1,4 rechts 1,3	ohneHydagen F mit Hydagen F	1,2 1,9	1,8 **	1,6 **
7	links 1,1 rechts 1,1	ohneHydagen F mit Hydagen F	3,0 3,6	1,9 3,4	1,3 2,8
8	links 1,2 rechts 1,6	ohneHydagen F mit Hydagen F	1,9 4,0	1,2 5,7	1,8 2,1
9	links 1,1 rechts 1,4	ohneHydagen F mit Hydagen F	3,6 2,7	1,6 **	2,1 **
10	links 1,2 rechts 1,2	ohneHydagen F mit Hydagen F	3,8 2,5	1,2 3,3	1,7 2,1
11	links 1,2 rechts 1,2	ohneHydagen F mit Hydagen F	3,9 3,5	1,4 1,9	1,5 3,0

** Auswertung wegen sehr kleiner Intensitäten nicht möglich.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden in vitro-Screening-Modelle zur Prüfung potentieller Hautfeuchtigkeitsregulatoren vorgestellt; weiter wird über die FMIR-Analyse als Möglichkeit zur vergleichenden in vivo-Messung des Hydratationszustandes des Stratum corneum nach Applikation kosmetischer Emulsionen berichtet.

Hydagen F, ein Partial-Natriumsalz einer Polyhydroxycarbonsäure, zeigte in diesen Tests ein besonders positives Verhalten. Die Verträglichkeit dieses neuen kosmetischen Wirkstoffs wurde durch umfangreiche toxikologische Untersuchungen abgesichert.

Literaturhinweise

- (1) Puttnam, N.A., J. Soc. Cosmetic Chemists **23** (4), 209-226 (1972).
- (2) Dow Chemical Corp., Steinhauer, A.F., DOS 2.-32.161 vom 4.7.1974.
- (3) DT-AS 2404046, bekanntgemacht am 21.4.1977 (Henkel).
- (4) Blank, J.H., J. Invest. Dermatol. **18**, 433-440 (1952).