

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01

計畫名稱：化妝品原料之研發與應用(一)

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：陳榮秀

計畫主持人：

子計畫主持人：陳榮秀、楊朝成

洪偉章、林清宮

張妙玲、丁秀玉

蔡玫琳

中華民國 95 年 2 月 28 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01

計畫名稱：子計畫 1：植物萃取液在化粧品上之應用

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：陳榮秀

計畫主持人：

子計畫主持人：陳榮秀



中華民國 95 年 02 月 27 日

## 一、摘要：

天然植物含有許多對化粧品有用之成分，本計畫評估植物萃取液應用在美白、防曬、保濕及抗老化化粧品等之可行性，本計畫實施方式採用不同植物萃取液，利用酪胺酸酶、紫外線吸收能力、DPPH、TEAC 抗氧化方法等探討其活性及產品應用之效能。在產品評估方面利用本校現有之膚質八合一 MPA580 檢測設備，評估這些原料在化粧品使用之可行性，透過科學方法之評估，提供化粧品製造業或研發單位在開發類似產品時之參考。

## 二、前言

中醫藥為中華民族五千年文化演進下的資產，擁有豐富的植物資源與大量的醫學文獻古籍為支撐的依據。基於文化背景與語言的優勢，則有利於進入這領域對歷史相關文獻的收尋與理解。而在研究發展過程中，研究目標來源取得容易與否及成本支出程度，皆會影響研究發展的過程與限制，故在研究所需的中草藥藥材取得容易下，且花費成本在合理範圍內，則有助於研究試驗的運用。另外，分析市場的商機與未來發展趨勢，傳統藥用植物或是民間草藥，即是中草藥植物更是具有發展的潛力。除了使用上的安全性已歷經時代的佐證外，目前全世界接受中草藥及其相關製品的人口數，更是持續增加中，年產值更是可觀。而當各國為中草藥及其製品開啟方便之門時，我們更應

該善用老祖先所遺留的智慧，配合各項優勢，好好運用發揚光大。故，當消費意識成為主導主流時，有效性與安全性已列為基本的要求，因此，主流意識訴求的“天然來源”則將成為未來另一股的風潮趨勢。

中國大陸 Hu, G 等人將菊花(*Chrysanthemum ramat*)及番紅花(*Crocus sativus* L)之酒精萃取物調製成防曬乳液，並且與化學合成之防曬成分(2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid)所調製成之防曬乳液比較，結果發現植物萃取液之紫外線吸收能力雖然不如化學防曬劑，但是其對於皮膚之保護能力卻與化學防曬劑相當，推論其原因是因為植物萃取液中除含有紫外線吸收物質外，同時也含有其他能使皮膚減輕發炎或曬傷的成分，所以能減少皮膚曬傷的機會，此結果令中藥在防曬化妝品的應用燃起很大的希望。此外植物萃取液在頭髮化妝品亦有很多用途，例如蘆薈、金盞花、洋甘菊、薑、金縷梅等，詳細應用例子如下表：

植物名	學名	原料名稱	主要用途
蘆薈	<i>A. barbadensis</i> Mill	Aloe vera extract	保濕、滋養主要用於頭皮乾燥
金盞花	<i>Calendula officinalis</i> L.	Calendula extract	用於頭皮刺激症狀之鎮靜與舒緩
洋甘菊	<i>Matricaria chamomilla</i> . L.	Chamomile fluid extract	具鎮靜作用，可維持頭皮之健康
薑	<i>Zingiber officinale</i>	Ginger root extract	促進血液循環，增進頭皮健康與頭髮生長
金縷梅	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamaelis extract	具收斂作用，可改善頭皮及頭髮油膩現象
迷迭香	<i>Rosmarinus</i>	Rosemary extract or oil	具收斂與抗氧化作用，可改善

	<i>officinalis L.</i>		頭皮油膩，促進頭髮生長
茶樹	<i>Melaleuca alternifolia Ch.</i>	Tea tree oil	具抗菌及消炎作用，可改善頭皮屑症狀
小麥胚芽	<i>Triticum sp.</i>	Wheat germ oil	具抗氧化及柔膚作用，可改善頭皮與頭髮乾澀

### 三、方法

#### 1. 植物萃取液抗氧化能力分析：

※DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 測定法：

取 375ul 之待測 sample 乙醇溶液，再加入已配製好之 20mg/l DPPH 乙醇溶液 750ul，反應 30 分鐘後測 517nm 吸光值。

※ABTS free radical 測定法：

取 1.5ml 去離子水，再分別加入 ABTS(1000uM) 0.25ml、 $H_2O_2$ (500uM)0.25ml、Peroxidase (44units/ml)0.25ml、置於暗室中反應 1 小時後加入測試樣品 0.25ml，反應 10 分鐘後測 734nm 吸光值。

※Liposome system 測定法：

加入 1cc 的 Liposome(10mg/1cc 的  $NaH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  緩衝液)、1cc 的  $FeCl_3$ (400uM)、1cc 的待測樣品、1cc 的 Ascorbic Acid(400uM) 均勻混合後反應 36 小時，再加入 0.1cc 的 TBHQ(10mg/1cc 甲醇)、2cc 的 TCA-TBA-HCL，100°C 加熱 15

分鐘，2000rpm 離心 10 分鐘後測 535nm 吸光值。

## 2. 植物萃取液美白活性評估：

### ※體外(*in vitro*)酪胺酸酶抑制活性測定

分別取定量中藥酒精萃取物，加入 70 units mushroom tyrosinase，再加入 0.5 ml L-tyrosine (0.1 mg/ml) 中，於 37 °C 放置 60 分鐘。利用分光光度計測量波長 475 nm 之吸收值，將未加任何藥材之吸光值減去待測藥材之吸光值除以未加任何藥材之吸光值再乘以 100 即為該藥材之酪胺酸酶體外活性抑制百分比。比較中藥萃取物與美白成分之酪胺酸酶體外抑制活性。

## 3. 植物萃取液防曬活性測定

※取 2 ml 之 0.01 % 稀釋液 (0.123 mg/ 5 ml 溶於 12.5 g methylene chloride, 37.5 g cyclohexane, 50 g isopropanol) 置於紫外線光譜儀測試管中，然後以紫外線光譜儀在 250~400 nm 之光源進行樣品紫外線吸收測定。

### ※防曬係數測定

※經過背景校正後，將含中藥產品 (2 mg/cm<sup>2</sup>) 均勻塗抹在貼有特製材質(Transpore<sup>TM</sup> tape) 之測試石英板上，再以 *In vitro* SPF 測試儀(型式 UV1000S)，任選五個區域測量 280~400 nm 之紫外線的穿透率，由電腦計算各種波長之紫外線的穿透率及 SPF 值，重複測定三次求取平均值。

#### 4. 植物萃取液之抗老化效果評估：

將不同濃度之植物萃取液 extracts 加入纖維母細胞培養液中，3 天後將細胞固定，再以膠原蛋白 I 及 III 型之抗體進行膠原蛋白誘導能力之偵測，以評估植物萃取液之抗老化效果。

#### 四、結果：

本計畫初步篩選出多種具有抗氧化能力之中草藥，例如五倍子、丁香、牡丹皮等，另外也由 30 種中藥篩選出甘草(*Glycyrrhiza glabra*)、桑枝(twig of *Morus alba*)、桑白皮(root-bark of *Morus alba*)、牡丹皮(*Paeonia suffruticosa* ANDREWS)、木瓜(*Chaenomeles speciosa*)等具有酪胺酸酶抑制活性，這些中藥以桑枝的抑制能力最強；在防曬方面則由 30 種常用中藥篩選出甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)、陳皮(*Citrus reticulata* Blanco)、黃芩(*Scutellaria baricalensis* GEORGI)、金銀花(*Lonicera japonica* Thunb)、黃連(*Coptis chinensis* Franch)、丹參(*Salvia*

*miltiorrhiza* Bge)、黃柏(*Phellodendron chinense* schneid)等具有紫外線吸收能力，其中以黃連、黃芩及陳皮的效果最好。此外紫草在抗老化方面也具有潛力。

## 五、結論：

中草藥應用在護膚、美容上流傳已久，古代人已將天然動植物應用於化粧上：如用鳳仙花染指甲、指甲花染髮、無患子洗髮、動物油脂護膚；後來隨著科技的進步，更能由天然物中取得有效成分，且將中草藥應用於化粧品符合當今世界化粧品發展的潮流，加上國人有許多人對於中草藥研發具有豐富經驗，因此有潛力能將天然物加以研究製造出一系列無毒、無害、無副作用、具有營養和療效的化粧品，以提昇產業水準，並將具我國祖先藥學智慧之化粧品推向國際舞台。

## 六、參考文獻

1. Bernard, P. and Berthon, J. Y. 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *International journal of Cosmetic Science*. 22, 219-226.
2. Boots the chemist Ltd. The guide to practical measurement of UVA/UVB ratios. The Boots Chemist, PLC, Nottingham, England.
3. Cabanes, J. et al. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 982-985.
4. *Cosmetics & toiletries* 1996. Natural and Botanical products formulary. Vol 111, 81-94.
5. Easton, A. Women have deadly desire for paler skin in the



- Philippines. *The Lancet* 352, 555.
6. Fitzpatrick, T. B. 1995. Pathophysiology of hypermelanoses. *Clin. Drug. Invest.* 10 (suppl. 2)
  7. Goihman-Yahr, M. 1996. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clinics in Dermatology.* 14,153-160.
  8. Lee, K. T. et al., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science.* 19, 291-298.
  9. Lin, C.-G., Kao, Y.-T., Liu, W.-T., Huang, H.-H., Chen, K.-C. and Lin, H.-C. 1996. Cytotoxic effects of *Bacillus anthracis* lethal toxin on macrophage-like cell line. *Current Microbiology* 33, 224-227.
  10. Luckewicz, W. 1990. Determination of ascorbyl dipalmitate in cosmetic whitening powders by differential scanning calorimetry. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41. 359-367.
  11. Maeda K. et al. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosm. Chem.* 42, 361-368.
  12. Masuda, M. et al. 1996. Skin lighteners. *Cosmet. Toil.* 111, 65-75.
  13. Melo, P. S., Duran, N., and Haun, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. 2000. *Toxicology letters* 116, 237-242.
  14. Merot, F., Seniuta, R., Benita, G. and Masson, Ph. 1992. Method for quantifying cutaneous pigmentation in animals and preliminary study in humans. *International Journal of Cosmetic Science.* 14, 173-182.
  15. Motoyoshi, K., Ota, Y., Takuma, Y. and Takenouchi, M. 1998. Wrinkles from UVA exposure. 113, 51-56.
  16. Phillips, B. J. 1996. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro* 10, 69-76.
  17. Schallreuter, K. U. et al. 1994. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 263. 1444-1446.
  18. Shin, N. H. et al. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical And Biophysical Research Communications.* 243, 801-803.
  19. Shirota, S. et al. 1994. Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 266-269.

20. Smith, J. 1996. State of the industry: the Asia-Pacific cosmetics and toiletries sector, 1995. *DCI*. 24-34.
21. Stern, M. Klausner, M., Alvarado, R., Renskers, K., and Dickens, M. 1998. Evaluation of the EpiOcular tissue model as an alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 12, 455-461.



# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

子計畫 2：利用簡易有機方法合成多酚類化合物應用於美白的功能

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC-94-01 子計畫(2)

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

總計畫主持人：陳榮秀

子計畫主持人：楊朝成

計畫參與人員：楊朝成、林小菁、張嘉苓、蔡哲秀

執行單位：化粧品科技研究所

中華民國 95 年 02 月 28 日

## 摘要

本研究主要利用簡易有機反應方法合成一系列(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物，進一步以體外試驗進行抑制酪胺酸酵素的能力，並與維生素 C 及麴酸比較其美白的功效。

關鍵字：(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺、酪胺酸酵素、美白。

## Abstract

In this study we aim to originally synthesize a series of highly productive (polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl)amines and observe their *In vitro* efficacy test for skin-whitening by the tyrosinase inhibition test.

Key words : (polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl)amines, skin-whitening, tyrosinase.

## 前言

當今全球化粧品與美容相關市場高達 2 仟億美元，且該產業並以每年 7% 速度成長，超越世界 GDP 成長率的兩倍之多。如此龐大商機主要來自(1)提高外在吸引力是人類自古以來之基本需求；(2)化粧品廠商善用現代化媒體力量主攻廣告與行銷策略；(3)化粧品科技的進展滿足消費者的心理期待，並轉為廠商行銷手法之一環。

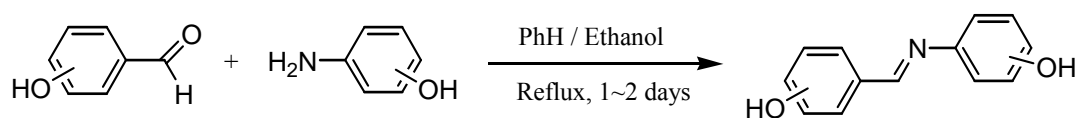
化粧品市場之成長主要來自產品功效之提昇，而整體護膚功效分析，與護膚產品相關的基本功能有七項，依序分別為抗老、保濕、去角質、潔膚、消炎、美白、防曬等，而在東方亞洲國家中以中國、日本、韓國與台灣對美白的訴求特別強烈。因此，廠商及各研究機構投入大量研究人力與金錢致力於美白產品原料與配方之開發。

從文獻報導中指出，1998 年 N.-H. Shin 從桑椹中萃取之 oxyresveratrol 對 Dopa oxidase 之抑制  $IC_{50}$  為  $1\mu M$  比麴酸強許多，文中也指出，當苯環上羥基取代基轉變成甲氧基或醣基取代時，其抑制效果極速下降。但 Oxyresveratrol 不管從天然萃取或由合成方法取得皆不易。2002 年 S. Y. Kim 報導其合成 (3-methoxy-benzylidene)-(4'-methoxy-phenyl)amine 化合物對 Dopa oxidase 之抑制效果較麴酸佳。因此，本論文將合成 (polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl)amines 一系列化合物，利用體外抑制酪胺酸酵素的效果，探討其對黑色素形成抑制能力。

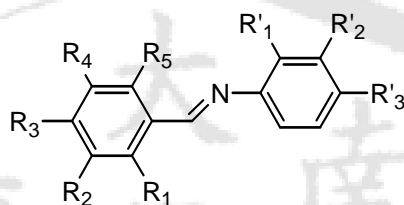
## 結果與討論

### 一、 合成(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物：

利用羥醛(oxybenzaldehyde)與胺基苯酚(aminophenol)進行氮親核性加成脫水反應後，經由  $^1\text{H}$  及  $^{13}\text{C}$  NMR 測試鑑定其結構，得到完全反應之亞胺(imine)化合物(compound 1~15)，如表一所示。



Compound 1~14



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R' <sub>1</sub>	R' <sub>2</sub>	R' <sub>3</sub>
<b>1</b>	OH	H	H	H	H	H	OH	H
<b>2</b>	H	H	OH	H	H	H	OH	H
<b>3</b>	H	OH	H	H	H	H	H	OH
<b>4</b>	OH	H	H	OH	H	H	OH	H
<b>5</b>	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
<b>6</b>	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
<b>7</b>	H	OH	H	OH	H	H	H	OH
<b>8</b>	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
<b>9</b>	OH	OH	H	H	H	H	OH	H
<b>10</b>	H	OH	OH	H	H	H	H	OH
<b>11</b>	OH	OH	OH	H	H	OH	H	H
<b>12</b>	OH	OH	OH	H	H	H	OH	H
<b>13</b>	OH	OH	OH	H	H	H	H	OH
<b>14</b>	OH	H	OH	OH	H	OH	H	H

表一、製備(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物：

二、體外抑制酪胺酸酵素之測試：主要參考文獻報導方法，利用酪胺酸在緩衝液中，經由酪胺酸酵素催化反應，分別加入不同濃度的我們合成多酚酯類及醯胺化合物與空白對照組測試，藉由分光光度計在 540 nm 波長吸收值，計算其對酪胺酸酵素之抑制效果。其詳細步驟如下：

材料：

- a. 酪胺酸緩衝溶液(Tyrosine Buffer Solution)：  
以磷酸緩衝溶液(PBS)配製 0.5 %酪胺酸(L-Tyrosine)。
- b. 酪胺酸酶溶液(Tyrosinase Solution):  
將酪胺酸酶(Tyrosinase) 溶於磷酸緩衝溶液(15 units/ $\mu$ l)，分裝後儲存於 -20°C 冰箱。

方法：

- a. 分別取不同濃度之待測樣品(S) 加入適量酪胺酸溶液及 5 $\mu$ l (75 unit) mushroom 酪胺酸酶（最終體積為 1 ml）及取相同濃度待測樣品(NT)但不加入酪胺酸溶液只加入 5 $\mu$ l (75 unit) mushroom 酪胺酸酶（最終體積為 1 ml）當扣色組，另外取 1ml 酪胺酸溶液同樣加入 5 $\mu$ l 酪胺酸酶當作正向對照組(PC)以及 1ml 酪胺酸溶液當負向空白對照組(NC)，充分混合後置入 37°C 的恆溫循環水浴箱(water bath)中 1 小時。
- b. 每個樣品取 100 $\mu$ l 加至 96 well ELISA reader plate，利用 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。
- c. 酪胺酸酶活性的抑制率：  
所測得的吸光值，利用下列公式計算其抑制率：  
1. Tyrosinase inhibition(%)=(PC-NC)-(S-NT)/(PC-NC)\*100%

三、體外抑制酪胺酸酵素之測試結果：

我們將 14 種不同數量及位置之羥基取代亞胺化合物，分別配置不同濃度之 DMSO 溶液中(最終測試濃度分別為 0.5、0.3、0.1、0.05 及 0.01 mg/ml) 作體外抑制酪胺酸酵素之測試，利用 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。並求出其之 IC<sub>50</sub>之濃度。其結果如下表所示：

0.1 mg/ml 抑制率(%)		IC <sub>50</sub> (mg/ml)	0.1 mg/ml 抑制率(%)		IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<b>1</b>	73.12	0.011	<b>9</b>	73.87	0.031
<b>2</b>	68.56	0.025	<b>10</b>	75.33	0.062
<b>3</b>	92.48	0.094	<b>11</b>	86.13	0.056
<b>4</b>	47.15	0.208	<b>12</b>	84.19	0.047
<b>5</b>	67.70	0.051	<b>13</b>	95.48	0.035
<b>6</b>	23.01	0.777	<b>14</b>	>98	0.022
<b>7</b>	59.00	0.096	<b>Vit.C</b>	44.23	0.151
<b>8</b>	76.45	0.025	<b>K.A.</b>	67.11	0.094

表(二)(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物體外抑制酪胺酸酵素能力：

註 1. 以 Vit.C(維生素 C)及麴酸(Kojic acid K.A.)為比較試品。

#### 四、結果與討論：

實驗結果發現(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物體外抑制酪胺酸酵素能力大部分比維生素 C 或麴酸效果佳，其抑制效果與化合物羥基取代之數量及位置有所關連，但尚未有完整之規律性，我們將進一步合成更多化合物進行比較且將進行黑色素細胞抑制測試，可進度探討其美白之功效並能進一步探討其細胞毒性，期待其能應用於美白產品上。

### 實驗部分

一、合成(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物一般步驟：取 10 mmol 的 Oxybenzaldehyde 於圓底瓶中，加入 10 mmol 的 aminophenol，以 20 ml 之 benzene 及 20 ml 之 ethyl alcohol 當溶劑，加熱迴流 1~2 天，反應完成後，減壓濃縮機抽去溶劑，分別利用  $^1\text{H}$  及  $^{13}\text{C}$  NMR 測試鑑定其結構。

**(2-羥基苯亞甲基)-(3'-羥基苯)胺 (2-Hydroxy-benzylidene)-(3'-hydroxyl-phenyl) amine 2**：橘色固體，mp.176~180 °C， $^1\text{H}$  NMR(200 MHz, DMSO) . H:6.78~6.87(3 H, m), 6.94~6.99(2H, m) 7.25(1H, t,  $J = 8\text{Hz}$ ), 7.42(1H, ddd,  $J = 8, 8, 1.5\text{Hz}$ ), 7.66(1H, dd,  $J = 8, 15\text{Hz}$ ) , 8.89(1H, s), 9.74(1H, brs, OH), 13.16(1H, brs, OH) ;  $^{13}\text{C}$  NMR(50 MHz, DMSO) . 108.18(d), 112.09(d), 114.14(d), 116.61(d), 119.13(d), 119.26(s), 130.23(d), 132.63(d), 133.26(d), 149.29(s), 158.39(s), 160.37(s), 163.25(d).

二、體外抑制酪胺酸酵素之測試：其詳細步驟如下：

材料：先配好下列材料濃度。

b. 酪胺酸緩衝溶液(Tyrosine Buffer Solution)：

以磷酸緩衝溶液(PBS)配製 0.5 %酪胺酸(L-Tyrosine)。

b. 酪胺酸酶溶液(Tyrosinase Solution):

將酪胺酸酶(Tyrosinase) 溶於磷酸緩衝溶液(15 units/ $\mu\text{l}$ )，分裝後儲存於 -20°C 冰箱。

方法：

a. 分別取不同濃度之待測樣品(S) 加入適量酪胺酸溶液及 5 $\mu\text{l}$  (75 unit) mushroom 酪胺酸酶 (最終體積為 1 ml 及最終濃度分別為 0.5、0.3、0.1、0.05 及 0.01 mg/ml) 及取相同濃度待測樣品(NT)但不加入酪胺酸溶液只加入 5 $\mu\text{l}$  (75 unit) mushroom 酪胺酸酶 (最終體積為 1 ml) 當扣色組，另外取 1ml 酪胺酸溶液同樣加入 5 $\mu\text{l}$  酪胺酸酶當作正向對照組(PC)以及 1ml 酪胺酸溶液當負向空白對照組(NC)，充分混合後置入 37°C 的恆溫循環水浴箱(water bath)中 1 小時。

b. 每個樣品取 100 $\mu\text{l}$  加至 96 well ELISA reader plate，利用 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。

c. 酪胺酸酶活性的抑制率：

所測得的吸光值，利用下列公式計算其抑制率：

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = (\text{PC-NC}) - (\text{S-NT}) / (\text{PC-NC}) * 100\%$$

## 謝誌

感謝嘉南藥理科技大學及教育部經費支持，另外感謝林清宮老師老師在抑制酪胺酸酵素實驗上之協助。

## 參考文獻

1. 郭俊賢、殷正華、蔣亞婷、林翠芊、郭光揮；”奈米生技化粧品專利地圖及分析”，行政院國家科學委員會科學技術資料中心。2004, 6月
2. N.-H. Shin; S. Y. Ryu; E. J. Choi; S.-H. Kang; I.-M. Chang; K. R. Min; Y. Kim. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* **1998**, 243, 801.
3. N. Baurin; E. Arnoult; T. Scior; Q.T. Do; P. Bernard; *J. Ethnopharmacology*, **2002**, 82, 155.
4. J. P. Ley; H. J. Bertram; *Bioorg. & Med. Chem.* **2001**, 9, 1897.
5. L. Startor; E. Pezzato; I. Dell; R. Caiato; *Biochem. Pharm.* **2002**, 64, 229.
6. I. Kubo; K.-I. Nihei; K. Tsujimoto; *Bioorg. & Med. Chem.* **2004**.12.5349.
7. I. Kubo; P. Xiao; K.-I. Fujita; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**.11.347.
8. S. H. Lee; S. Y. Chio; H. Kim. J. S. Hwang; B. G. Lee; *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 1045.
9. S. Rudra; A. V. Eliseev; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11543.
10. I. Kubo; P. Xiao; K.-I. Nihei; K.-I. Fujita; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3992.
11. S. Y. Choi; S. Kim; J. S. Hwang; B. G. Lee; H. Kim; S. Y. Kim; *Biochem. Pharm.* **2004**, 67, 707.
12. S. Y. Chio; S. Kim. H. Kim; K. Suk; J. S. Hwang; B. G. Lee; A.-J. Kim; S. Y. Kim; *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 450.



# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01

計畫名稱：利用生物技術法製造抗氧化酵素

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

<input checked="" type="checkbox"/> 整合型計畫	<input type="checkbox"/> 個別型計畫
計畫總主持人：陳榮秀	計畫主持人：
子計畫主持人：洪偉章	

中華民國 95 年 2 月 27 日

## 一、摘要：

游離自由基( free radicals)的產生是因為氧分子或氫氧化合物上有一些不成對的電子，例如  $\cdot O_2^-$  (superoxide anion radical) 和  $\cdot OH$  (hydroxyl radical) 等，皆會對細胞產生毒害；另尚有一些活化態氧化物 (ROS, reactive oxygen species) 也會影響細胞的代謝而造成其加速老化，如  $H_2O_2$ 。若能將一些抗氧化酶加入化粧品之產品中，如超氧歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、過氧化氫酶(Catalase)、抗壞血酸過氧化酶(APX, Ascorbate peroxidase) 等，將可有效防止自由基及過氧化物對細胞產生嚴重的傷害而導致其老化或死亡，目前已選殖出一段 1063 bps 長度之小球藻 SOD 基因，可轉譯出 203 個胺基酸的蛋白質，此 SOD 酵素的分子量約為 22.3 kDa，其 DNA 和胺基酸序列都與單胞藻有最高之相似度，分別有 73.5% 及 70.5% 之相似度。

關鍵字：游離自由基、活化態氧化物、超氧歧化酶、過氧化氫酶、  
抗壞血酸過氧化酶。

## 二、研究計畫內容：

### (一) 研究計畫之背景及目的

一般如果生物體內活性氧(activated oxygen)過多時，體內的

抗氧化系統與活性氧分子就無法維持平衡(oxidative balance)，因而產生氧化壓力(oxidative stress)，引起老化及其他病變。天然抗氧化劑，除了維生素C、維生素E、及類胡蘿蔔素(carotenoid)之外，還有類黃酮(flavonoid)與多酚類(polyphenol)等亦具有抗氧化的能力。

#### (a) 自由基定義

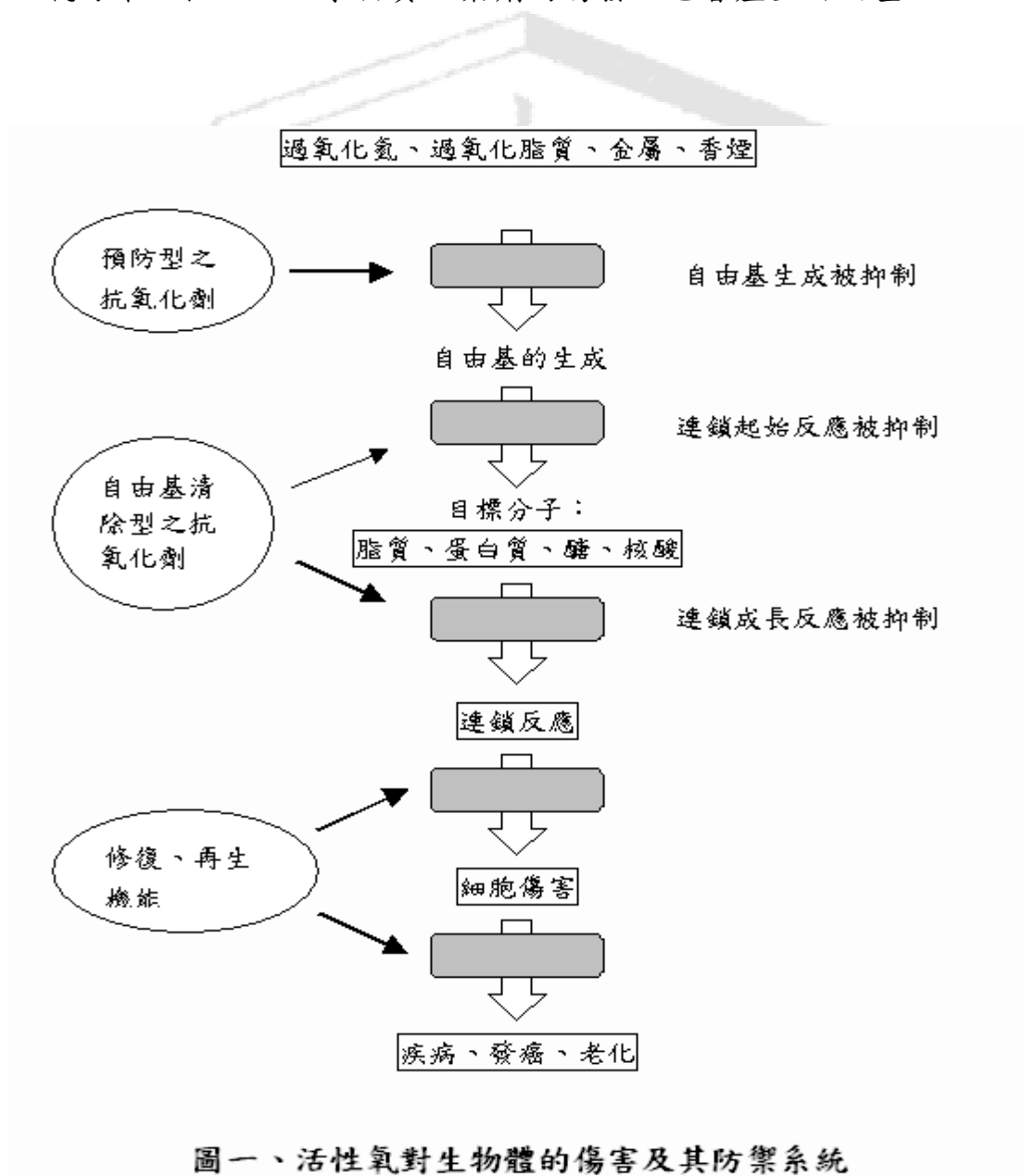
自由基(free radical)含有一個或多個不成對電子的原子、分子或離子(Halliwell and Gutteridge, 1989)，化性大部分處於極不穩定的狀態，反應性較其他分子高，會搶奪鄰近分子的電子形成電子對，使其達到穩定的狀態，被搶奪電子的分子則會變得不穩定，若又具有高度的活動性則會造成連鎖反應(chain reaction)，促使自由基的產生(Halliwell *et al.*, 1992)。

#### (b) 活性氧定義

氧(oxygen)以安定的三重態氧(triplet state oxygen,  $3O_2$ )存在於大氣中。氧可經由電子轉移及能量轉移活化成為反應性較強的含氧分子稱為活性氧(activated oxygen)。包括單重態氧(singlet oxygen,  $^1O_2$ )、超氧陰離子(superoxide anion,  $(\cdot O_2^-)$ )、氫氧自由基(hydroxyl radical,  $(\cdot OH)$ )、過氧化氫(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、烷氧自由基(alkoxyl,  $RO\cdot$ )等。

(c) 自由基與活性氧產生途徑

自由基的產生是因體內的抗氧化防禦系統未能達到平衡狀態而造成壓力，稱作氧化壓力(oxidative stress)(Sies, 1991)。在生物體中，抗氧化物減少、活性氧產生之增加及游離態過渡金屬的增加，都會造成氧化壓力(Chen *et al.*, 1998)。外在環境中的離子輻射、空氣污染、抽煙、化學物質及藥劑的誘發，也會產生自由基。



圖一、活性氧對生物體的傷害及其防禦系統

#### (d) 抗氧化酵素和抗氧化物

抗氧化防禦系統(包括抗氧化物或抗氧化酵素)可以減低活性氧及自由基的產生。抗氧化物有維生素E(vit E)、維生素C(vit C)、胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)、尿酸(uric acid)，植物體內的抗氧化物質，如類黃酮、多酚類等。類黃酮的解釋是植物性黃色素，不同的結構會產生不同的物性和化性，植物體中的類黃酮需要光線照射，種植於溫室的植物其類黃酮含量會降低。多酚類在植物體內的功能是防禦紫外線、抑制植物體過氧化作用。抗氧化酵素包括：超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，麩胱苷過氧化酶(glutathione peroxidase, GSH Pxs)以及過氧化氫酶(catalase)等。SOD會進行歧化反應(dismutation reaction)( $2\cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )，反應中所產生的 $H_2O_2$ 會被GSH Pxs 及catalase 代謝成 $H_2O$ 。SOD 是一種金屬酵素(metalloenzymes)，大致可分三類：銅/鋅型、鐵型及錳型SOD。GSH Pxs 在生物體內負責清除 $H_2O_2$ ，其將 $H_2O_2$ 或 $ROOH$  還原成 $H_2O$  或 $ROH$ ( $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$  或  $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH$ )。catalase 利用 $H_2O_2$ 做雙分子的歧化作用( $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ )。

本研究目的為選殖具有抗氧化功能的基因，進而利用生物技術方法，大量表現與製造其抗氧化活性蛋白質，且開發應用於化粧品產業中。

## (二) 研究方法、進行步驟

### 1. 訊息 RNA (mRNA) 之萃取：

將培養的綠藻細胞加入含有 4 M Guanidine isothiocyanate , 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA , 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 和 8 %  $\beta$ -mercaptoethanol 的裂解緩衝液 (lysis buffer) 中均質化 , 以 11,000x g 離心 15 分鐘 , 去除不溶的物質 , 總 RNA (total RNA) 以 4 M LiCl 在 4°C 下過夜沈澱下來 , 經過 3 M LiCl 清洗後 , 最後的 RNA 沈澱再以 RNA 可溶緩衝液 (0.1 % SDS , 10 mM Tris-HCl , pH 7.5 , 1 mM EDTA) 回溶 , 回溶的 RNA 以 phenol 和 chloroform 各萃取一次 , 最後用 isopropanol 沈澱 RNA 。接著將 poly (A)<sup>+</sup>RNA 以 oligo (dT) -cellulose 管柱 (Gibco BRL) 層析分離下來。

### 2. 反轉錄酶-聚合酶連鎖反應 ( RT-PCR) ：

將由上述步驟所獲得的訊息 RNA , 於混合試劑中含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 、 75 mM KCl 、 3 mM MgCl<sub>2</sub> 、 20 mM DTT 、 500  $\mu$ M dNTPs 、 0.1 g/ $\mu$ l BSA 、 100 ng/ $\mu$ l primer 、 1 U/ $\mu$ l RNase inhibitor 、 2.5 U/ $\mu$ l MMLV 逆轉錄酶 , 經由 MMLV 逆轉錄酶合成第一股 cDNA , 將合成之第一股 cDNA 直接當作模

版(templates)，進行聚合酶連鎖反應(PCR)快速複製目標基因之 DNA 片段，此聚合酶連鎖反應的混合試劑中含有 1X reaction buffer、合成之第一股 cDNA、5 mM 5' - & 3' -primers、200  $\mu$ M dNTPs、2.5 U Taq DNA polymerase；其反應的條件為 94°C 5 min, 1 cycle、94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2 min, 35 cycles、72°C 10min, 1 cycle，經 PCR 放大之 DNA 片段以 1.5% agarose gel 進行電泳分析並觀察實驗結果。

3. 快速複製 5' -cDNA 端系統 (5' -RACE) (*Rapid Amplification of cDNA Ends kit, GIBCO BRL*)

第一股 cDNA 合成是將 total RNA (1-5  $\mu$ g)、FeSOD 基因特定引子(2.5 pmoles, 5' -TCT TGC TCT CAA GGT TAC TG-3') and DEPC-處理水混合均勻後，在 70°C 反應 10 分鐘後放在冰上 1 分鐘，然後加入下列成分混合，在 42 °C 進行反應 1 分鐘：1 $\times$ PCR reaction buffer、25 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dNTP mix 和 0.1M DTT，再加 1 $\mu$ l (200U) SuperScript II reverse transcriptase 在 42°C 反應 50 分鐘。經純化管柱純化後再以 70% 酒精沉澱，最後加 50  $\mu$ l 在 65°C 預熱過的無菌水，以 13,000 $\times$ g 離心沖提 cDNA，取 10  $\mu$ l cDNA 以 2 mM dCTP、1 $\times$ tailing buffer 在 94°C 反

應 3 分鐘，放在冰上 1 分鐘 再加 1  $\mu$ l terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 在 37°C 反應 10 分鐘，所得 tailed cDNA 當作以後大量複製 DNA 反應之模板。

#### 4. 快速複製 3' -cDNA 端系統(3' -RACE system)

第一股 cDNA 合成完後，取 5  $\mu$ l 第一股 cDNA 與 3  $\mu$ l 之 2.5 mM dNTP、5  $\mu$ l 之 10 $\times$ PCR reaction buffer、2  $\mu$ l 之 10  $\mu$ M oligo-d(T)<sub>18</sub> primer、2 $\mu$ l 之 10  $\mu$ M FeSOD specific primer (5' -CTG GTG GAG GAG AGC AAG AC-3') 與 0.5  $\mu$ l of *Taq* DNA polymerase (TaKaRa)，加無菌水最後體積到達 50  $\mu$ l，PCR 反應的條件為變性溫度 94°C 反應 1 分鐘、粘合溫度 45°C 反應 1 分鐘、延伸溫度 72°C 反應 2 分鐘，共 35 個循環週期。

### 三、完成之成果

已選殖出一段 1063 bps 長度之小球藻 SOD 基因(見圖一)，可轉譯出 203 個胺基酸的蛋白質，此 SOD 酵素的分子量約為 22.3 kDa，其 DNA 和胺基酸序列都與單胞藻 Fe-SOD 有最高之相似度，分別有 73.5 % 及 70.5 % 之相似度(見圖二、三)，因此其屬於鐵型 SOD 形式。另外，在表一可觀察到此 SOD 基因與雙子葉植物，如阿拉伯芥和菸草亦



分別有 62.6 % 與 62 % 之相似度；與單子葉植物，如稻米有 57 % 之相似度；與細菌，如 *Cyanobacteria* 有 59 % 之相似度；與昆蟲，如 *Babesia bovis* 有 56.5 % 之相似度；與真菌類則有 53.5 % 之相似度。

此 SOD 基因與錳型 SOD 也有 55 % 之相似度，可見鐵型與錳型 SOD 基因有一半以上之序列相同存在，在生物之基因演化上有很高關連性。除此之外，從以往之研究得知其重要之酵素催化區即鐵離子結合區位於 His27、His79、Asp163 與 His167 等四個胺基酸上。

圖一、 The full length of cDNA sequence of FeSOD gene from *C. pyrenoidosa*.

Accession number is DQ183067.

The two codons in block represent the start and stop position of the open reading frame, respectively. The codons underlined are 5' and 3'-untranslated regions, and boldface of amino acid letters are the predictive positions for iron binding sites at the enzyme active center. ←, a specific primer of 5'-RACE system ; →, a specific primer of 3'-RACE system.

TCAAACGTCTGCATCGTACTTGTACAGGTGAAAGCTCCTTGGAACAGATCCTTGTAGACTCTTCCTTT  
 CTTCTTGCACCATG CCA TTC CAG CTG CCC CCT CTT CCG TAT GCT ATA AAT GCT TTG  
 M P F Q L P P L P Y A I N A L  
 GAG CCC CAC ATG TCT CAG AAG TCG CTG GAG TTT CAT TAT GGC AAG CAC CAT CAG  
 E P H M S Q K S L E F **H** Y G K H H Q  
 ACA TAC TTG GAT AAT ATG AAC AAG CGG ATT GCT GGC AGT AAC CTT GAG AGC AAG  
 T Y L D N M N K R I A G S N L E S K  
 ACC CTT GAG GAG GTT ATC AAG GAG AGT TGG AAC AAT GGC AGC CCT ACA GCA GTG  
 T L E E V I K E S W N N G S P T A V  
 TTC AAC AAT GCT GCT CAG GTC TGG AAC CAC ACA TTC TTT TGG GAG AGC ATG AAA  
 F N N A A Q V W N **H** T F F W E S M K  
 CCC AAT GGT GGT GGT GCA CCC AGC GGC AAA CTA GCA GAG GCC ATC AAT GCA GCT  
 P N G G G A P S G K L A E A I N A A

TCT GGC AGT CTG GAT GAC TTT AAG GCA CAG TTC AAG AAT GCA GGT GCT ACT CAG  
 S G S L D D F K A Q F K N A G A T Q  
 TTT GGC TCT GGC TGG GCA TGG CTT GTG ACT GAC AAG TCT GGC AAG TTG TCT ATT  
 F G S G W A W L V T D K S G K L S I  
 GAG AAG ACC CCC AAT GCC GTG ACA CCC CTG GTG GAG GAG AGC AAG ACA CCC ATT  
 E K T P N A V T P L V E E S K T P I  
 CTG ACG ATG GAT GTC TGG GAG CAT GCA TAC TAC CTG GAT GTG CAG AAC AGG AGG  
 L T M D V W E H A Y Y L D V Q N R R  
 CCT GAC TAC ATG ACG ACA TTT GTT GAC AGC CTC ATT GAC TGG GAC AAC GTG GGC  
 P D Y M T T F V D S L I D W D N V G  
 AAG CGC TAT GAG GCT GCA ACT GCC TGA GGCCTCAGGCAACCTAAGTTGCAACGGGGGCCTTG  
 K R Y E A A T A \*  
TCAAGCGCTGGTGTCTCAGTAGCTCGGCATGCTTGAAGCTGCTGAATATTCAGCATATTAATATGTTTCAT  
GATGCAGTTTTGGCACCATCAATCGGTAATGCGTCAAAGGAGACAATTGAGTATAATGTGCATGCATAT  
GGCCCCCTTGGTGGCATGTATGAGAAACATGTTTCTGTACTGCTGTCTCAGTACCATCATGGTCCGGACAGTT  
GCTGCTGTCTAGGCATGGACATTAATCTGCCAGTTGCAGAGCCTACAGCCCCATGCACAGCTGCGACGT  
ATGATGAATCTGAGACGCACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

圖二、A comparison of FeSOD cDNA sequences of *C. pyrenoidosa* (Cp-nt) with that of *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr-nt). 73.5% identity in 596 nt overlap.

	20	30	40	50	60	70
Cp-nt	AGCTGCCCCCTCTTCCGTATGCTATAAATGCTTTGGAGCCCCACATGTCTCAGAAGTCGC					
	:::::	:::	:::	:::	:::	:::
Cr-nt	AGCTGAAGTCTCCCCCTACGCTCTGGATGCTCTGGAGCCCCACATGAGCAAGCAGACCC					
	110	120	130	140	150	160
	80	90	100	110	120	130
Cp-nt	TGGAGTTTCATTATGGCAAGCACCATCAGACATACTTGGATAATATGAACAAGCGGATTG					
	:::::	:::	:::	:::	:::	:::
Cr-nt	TGGAGTTCCACTGGGGCAAGCACCACCGCCTACGTGGATAACATGAACAAGCAGGTGC					
	170	180	190	200	210	220
	140	150	160	170	180	190
Cp-nt	CTGGCAGTAACCTTGAGAGCAAGACCCTTGAGGAGGTTATCAAGGAGAGTTGGAACAATG					
	:::::	:::	:::	:::	:::	:::
Cr-nt	CTGGCACTCCCCCTGGACGGCAAGTCGCTGGAGGAGATCGTCCTGGCCAGCTGGAACAATG					

230 240 250 260 270 280

200 210 220 230 240 250

Cp-nt GCAGCCCTACAGCAGTGTTCACAACGCTGCTCAGGTCTGGAACCACACATTCTTTTGGG  
 :: :: :: : :::::::::::::: :: :::::::::::::: :::::::::: :::: ::::

Cr-nt GCCAGCCCACCCCGGTGTTCACAACGCCGCTCAGGTCTGGAACCACACTTTCTTCTGGG  
 290 300 310 320 330 340

260 270 280 290 300

Cp-nt AGAGCATGAAACCCAATGGTGGTGGTGCACCCAGCGGCAAAGTAGCAGAGGCCATCAAT-  
 :::::::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::

Cr-nt AGAGCATGAAGCCCAACGGTGGCGGTGCCCCACCGGCGCGCTGGCTGAGGCCATCACCC  
 350 360 370 380 390 400

310 320 330 340 350 360

Cp-nt GCAGCTTCTGGCAGTCTGGATGACTTTAAGGCACAGTTCAAGAATGCAGGTGCTACTCAG  
 :: ::::: ::::: ::::: : :: ::::: ::::::::::: : :: :: ::::

Cr-nt GCGACTTC-GGCAGCCTGGACAAGTTCAAGGAGGAGTTCAAGCAGGCTGGCATGACCCAG  
 410 420 430 440 450 460

370 380 390 400 410 420

Cp-nt TTTGGCTCTGGCTGGGCATGGCTTGTGACTGACAAGTCTGGCAAGTTGTCTATTGAGAAG  
 :: :::::::::::::: ::::: : ::::: : ::::: ::::: ::::: ::::: :::::

Cr-nt TTCGGCTCTGGCTGGGCCTGGCTGAACGCCGACAAGACCGGCAAGCTGTTCGATCAGCAAG  
 470 480 490 500 510 520

430 440 450 460 470 480

Cp-nt ACCCCCAATGCCGTGACACCCCTGGTGGAGGAGCAAGACACCCATTCTGACGATGGAT  
 : ::::: ::::: ::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::: ::::: : ::::

Cr-nt TCGCCCAACGCCGTGAACCCCGTGGTGGAGG---GCAAGACCCCATCCTGACTGTTCGAT  
 530 540 550 560 570 580

490 500 510 520 530 540

Cp-nt GTCTGGGAGCATGCATACTACCTGGATGTGCAGAACAGGAGGCCTGACTACATGACGACA  
 :: ::::::::::: :: ::::: : :: ::::::::::: : : :: ::::::::::: ::::

Cr-nt GTGTGGGAGCACGCCTACTACATTGACGTGCAGAACCGCCGCCCGACTACATCACCACC  
 590 600 610 620 630 640

	550	560	570	580	590	600
Cp-nt	TTTGTGGACAGCCTCATTGACTGGGACAACGTGGGCAAGCGCTATGAGGCTGCAAC					
	::	: ::	: ::	: ::	: ::	: ::
Cr-nt	TTCATGGAGAAGCTGATCAACTGGGACGCCGTTGCTCAGCGCTACGCCCGTGCCAC					
		650	660	670	680	690

圖三、A comparison of FeSOD amino acid sequences of *C. pyrenoidosa* (Cp-aa) with that of *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr-aa). 70.5% identity in 200 aa overlap.

	40	50	60	70	80	90
Cr-aa	LELKSPPYALDALEPHMSKQTLFHWGKHHRAYVDNMNKQVAGTPLDGKSLEEIVLASWN					
	...	X::	.....	.....	.....	.....
Cp-aa	FQLPPLPYAINALEPHMSQSLEFHYGKHHQTYLDNMNKRIAGSNLESKTLLEEVIKESWN					
	10	20	30	40	50	60
	100	110	120	130	140	150
Cr-aa	NGQPTPVFNAAQVWNHTFFWESMKPNGGAPTALAEAI TRDFGSLDKFKEEFKQAGMT					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cp-aa	NGSPTAVFNAAQVWNHTFFWESMKPNGGAPSGKLAEA INAASGSLDDFKAQFKNAGAT					
	70	80	90	100	110	120
	160	170	180	190	200	210
Cr-aa	QFGSGAWL NADKTGKLSISKSPNAVNPVV-EGKTPILTVDVWEHAYYIDVQNRDPDYIT					
	.....	.....	.....	v^.....	.....	.....
Cp-aa	QFGSGAWLVTDKSGKLSIEKTPNAVTPLVEESKTPILTM DVWEHAYYLDVQNRDPDYMT					
	130	140	150	160	170	180
	220	230				
Cr-aa	TFMEKLINWDAVAQRYARAT					
	.....	.....	::			
Cp-aa	TFVDSLIDWDNVGKRYEAAT					
	190	200				

表一、 A comparison of FeSOD sequence of *Chlorella pyrenoidosa* with those of other species.

Species	FeSOD cDNA length (bps)	Identity (%)	Accession No (NCBI)
<b>Chlorophyceae</b>			
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1063		DQ183067
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	705	73.5	U22416
<b>Dicotyledon</b>			
<i>Arabidopsis thaliana</i> (type I)	915	62.6	M55910
<i>Arabidopsis thaliana</i> (type III)	786	62.3	AF061852
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (curled-leaved tobacco )	1035	62	A09032
<i>Cinnamomum camphora</i> (camphor tree)	564	56.4	AF084831
<b>Bacteria</b>			
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	603	62.1	NP_682309
<i>Nostoc commune</i> (Cyanobacteria)	603	60.3	AF177945
<i>Legionella pneumophila</i>	579	60.1	BAA02306
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Cyanobacteria)	600	59	NC_000911
<i>Bacteroides fragilis</i>	834	56.4	M96560
<i>Propionibacterium shermanii</i>	567	54.3	Y09012
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	636	53	AAK40652
<b>Monocotyledon</b>			
<i>Oryza sativa</i>	1353	57	AB014056
<b>Insect</b>			
<i>Babesia bovis</i>	600	56.5	U70131
<i>Plasmodium ovale</i>	594	55.4	AF139526
<b>Fungi</b>			
<i>Rhodotorula glutinis</i>	732	53.5	AF434197

#### 四、參考文獻：

Chen, H. Y. and Yen, G. C. 1998. Free Radicals, Antioxidant Defenses and Human Health. *Nutrition Sciences Journal*. 23:105-121.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., and Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *The journal of laboratory and clinical Medicine*. 119: 598-620.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989. *Free Radicals in Biology and Medical*. Oxford University Press.

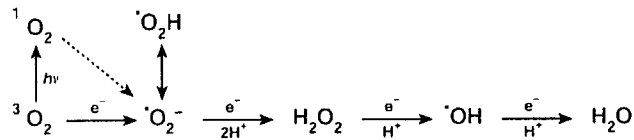
Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.

Sies, H. 1991. Natürliche und syntetische antioxidanten. *Atemw Lunngenkrkh* 17 Suppl 1: 16.

Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.

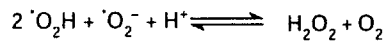
附錄圖一、(a) Interrelationships between molecular oxygen and ROS generated in reactions likely to occur in living plant cells and (b) chemical equations depicting major reactions determining the fate and possible interconversions of reactive oxygen species in plants. (Wojtaszek, 1997)

(a)



(b)

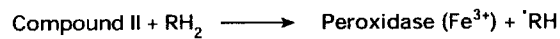
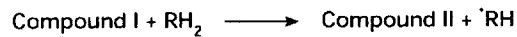
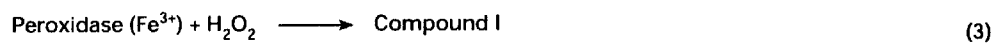
#### Superoxide disproportionation



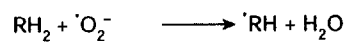
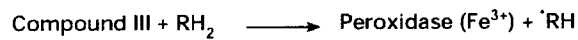
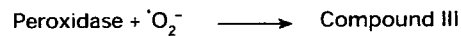
#### Catalase



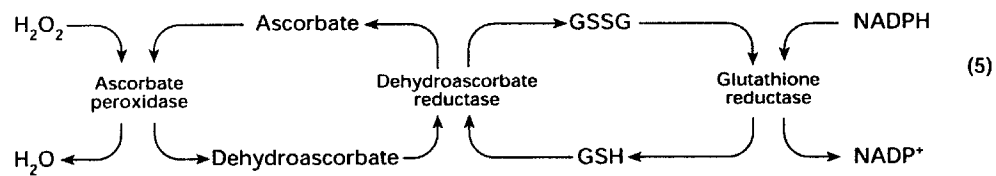
#### Peroxidase



#### Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



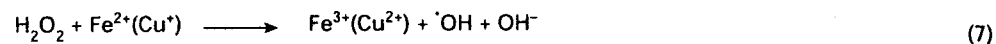
#### Halliwell-Asada pathway:



#### Haber-Weiss reaction:



#### Fenton reaction:



附錄圖二

表1. 植體內發生的活性氧化物(Reactive oxygen species: ROS)

產生機制	存在之胞器位置	ROS 種類
Photosynthesis : electron transport PS I or PS II	Chloroplast	$O_2^-$
Respiration : electron transport	Mitochondria	$O_2^-$
Glycolate oxidase	Peroxisome	$H_2O_2$
Excited chlorophyll	Chloroplast	$O_2^1$
NADPH oxidase	Plasma membrane	$O_2^-$
Fatty acid $\beta$ - oxidation	Peroxisome	$H_2O_2$
Oxalate oxidase	Apoplast	$H_2O_2$
Xanthine oxidase	Peroxisome	$O_2^-$
Peroxidase, $Mn^{2+}$ and NADH	Cell wall	$H_2O_2$
Amine oxidase	Apoplast	$H_2O_2$

資料來源：Mittler, R. 2002.

附錄圖三

表2. 植體內存在之抗氧化酵素及抗氧化物

酵素或抗氧化物	存在之胞器位置	作用之 ROS 種類
Superoxide dismutase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	$O_2^-$
Ascorbate peroxidase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	$H_2O_2$
Catalase	Peroxisome	$H_2O_2$
Glutathione peroxidase	Cytosol	$H_2O_2$ , ROOH
Peroxidase	Cell wall, Cytosol, Vacuole	$H_2O_2$
Thioredoxin peroxidase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria	$H_2O_2$
Ascorbic acid	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	$H_2O_2$
Glutathione	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	$H_2O_2$ , $O_2^-$
$\alpha$ -Tocopherol	Membrane	ROOH, $O_2^1$
Carotenoids	Chloroplast	$O_2^1$

資料來源：Mittler, R. 2002.



# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01

計畫名稱：子計畫 4：天然抗氧化化粧品原料的開發

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

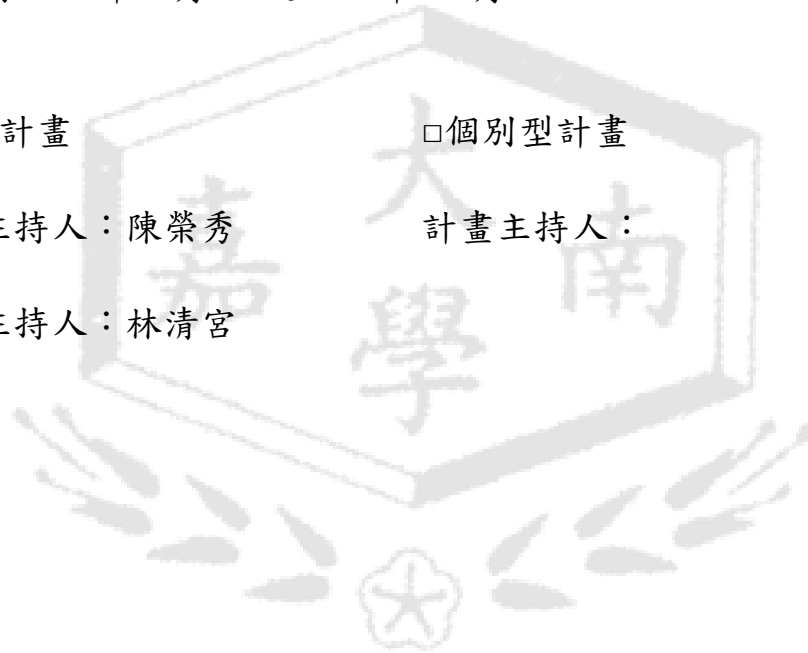
■整合型計畫

□個別型計畫

計畫總主持人：陳榮秀

計畫主持人：

子計畫主持人：林清宮



中華民國 95 年 02 月 27 日

## 一、摘要：

天然物中具有黃酮素或類黃酮的成分，這些成分具有很好之抗氧化能力，為了能將類似成分應用於抗老化化粧品，本計畫擬針對中草藥粗萃液進行各項抗氧化方法之評估，方法包含 DPPH、TEAC、NO 清除及 SOD 活性等。利用本計畫之研究不但能快速尋找有用的抗老化成分，同時期待能將中草藥應用在於抗老化化粧品之開發。

## 二、前言

近幾年，中草藥植物的開發與運用，已成為世界性的發展趨勢。主要為發展先進的萃取技術與分析技術，搭配科學性的評估與研究，探討中草藥植物的生物活性與藥理作用等。而世界各國在疾病的治療中，植物原料仍是很重要的資源。植物原料經由生藥學的研究，可以發展出新的治療藥劑。其中，中草藥溫和作用的特性常被運用在對抗微生物、抗濾過性病毒及抗氧化方面。不同臨床應用的報導顯示，中草藥中的成分如：chlorogenic acid、flavonoids、pentacyclic、triterpenes...等，有抗腫瘤和抗突變等作用。<sup>(12)</sup> 除此之外，植物的藥用功效還包括增加心臟血管的健康、微血管的承受力、組織的健全、美化皮膚的外觀與增強免疫系統機能、減少動脈硬化、癌症、關節炎和腸胃疾病等風險。當

然以研究的方向而言，涵蓋各領域，包括：自由基清除能力的探討、抗發炎作用的研究、抑制微生物的能力、抗腫瘤、癌症的治療、提升免疫能力、抗胃潰瘍作用、糖尿病的治療、抗憂鬱等各種身體出現的疾病。故，研究的結果常被應用在醫藥、食品、化妝品、保健維護等領域。而最終目的則在預防與處理各種疾病、提升生活品質。在 2004 年 Renu Khanna-Chopra 等人，提出由植物產生的抗氧化酵素與其代謝產物，運用在清除及防禦活性氧的傷害與改善氧化壓力方面，具有很好的發展空間。而在植物中蘊含三種型態的 SOD，依金屬輔因子的不同有所區別。其中在葉綠體、細胞質液、過氧化體與乙醛酸小體中可發現 Cu/Zn SOD；而 Fe SOD 主要發現在葉綠體中；Mn SOD 則發現存在粒線體與過氧化體中。同年 Y. Z. Zhu 等人，更具體提出中草藥萃取液，具有清除氧自由基的論點，清除作用類似 SOD，其中川芎〈*Rhizoma ligustici*〉具有類似 SOD 活性為每克 2000 units、益母草〈*Herba leonuri*〉類似 SOD 的活性則為每克 1800 units。因此，天然產物在提高生物體抗氧化作用及經由非酵素型中和活性氧途徑方面，扮演很重要的角色。

除此之外，根據文獻資料顯示，許多中草藥針對不同屬性的自由基，分別有不同強弱的清除能力。如：貫葉連翹〈*Hypericum*

*perforatum* L.〉萃取液可有效清除 DPPH 自由基與超氧陰離子，抑制小鼠肝臟微粒體的脂質過氧化。蓮花葉〈*Nelumbo nucifera* Gertn.〉甲醇萃取液可清除氫氧自由基及降低金屬離子鍵結的能力，進而達到保護細胞的作用。枸杞〈*Lycium barbarum*〉萃取液則對超氧陰離子有很強的清除作用，可預防脂質過氧化。黃芩〈*Scutellaria baicalensis*〉萃取液可直接清除過氧化氫、氫氧自由基及超氧陰離子。而用 80 % 的甲醇萃黃牛木〈*Cratoxylum cochinchinense*〉，經 TEAC 等試驗結果顯示，相對於 Trolox 其具有很強的抗氧化能力，且針對超氧陰離子也有清除的作用。白花蛇舌草〈*Hedyotis diffusa*〉與繖花龍吐珠〈*Hedyotis corymbosa*〉萃取液發現具有清除超氧陰離子的能力，而粟米草〈*Mollugo pentaphylla*〉則有清除氫氧自由基的作用，若針對抗脂質過氧化能力的評估，則白花蛇舌草>繖花龍吐珠>粟米草。欖仁樹〈*Terminalia catappa*〉萃取液在抗氧化方面試驗結果，顯示可預防老鼠肝臟脂質過氧化，並具有類似 SOD 的活性每克有  $2.57 \times 10^5$  unit。另外，台灣金線連〈*Anoectochilus formosanus*〉萃取液在體內、體外的試驗，顯示能清除超氧陰離子與氫氧自由基及抑制低密度脂蛋白的氧化作用。而運用甲醇為溶劑萃取大根老鸛草〈*Geranium macrorrhizum*〉及金露梅〈*Potentilla fruticosa*〉的萃取

液，在 DPPH 與 TEAC 的分析中，也顯示很強的清除 DPPH 自由基及 ABTS<sup>+</sup> 自由基的能力。其他種類の中草藥萃取液如：山楂〈*Crataegus pinnatifida*〉、兔絲子〈*Cuscuta chinensis*〉、鎖陽〈*Cynomorium songaricum*〉、箭葉淫羊藿〈*Epimedium sagittatum*〉，覆盆子〈*Rubus chingii*〉等，在抗氧化方面試驗，其抗氧化能力皆比 Vitamin E 強。植物組織中蘊含豐富不同具有抗氧化作用的成分，包括：多酚類成分〈flavonoids、phenolic acid〉、氮類成分〈alkaloids、chlorophyll derivatives、amino acids、amines〉、類胡蘿蔔素、木質素、松稀油等，根據文獻報告指出這些成分有抗氧化作用及抑制鏈鎖反應的開始或擴散。

### 三、方法

#### 一、中草藥萃取：

1. 將確認過之中草藥切細。
2. 分別稱100 克加入2000 ml 純乙醇或適當溶劑，浸泡3 小時
3. 加熱refluxing 萃取三次、過濾
4. 真空濃縮
5. 乾燥，稱重備用

#### 二、中草藥 extracts 抗氧化能力分析：

※DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 測定法：

取 375ul 之待測 sample 乙醇溶液，再加入已配製好之 20mg/l DPPH 乙醇溶液 750ul，反應 30 分鐘後測 517nm 吸光值。

※ABTS free radical 測定法：

取 1.5ml 去離子水，再分別加入 ABTS(1000uM) 0.25ml、 $H_2O_2$ (500uM)0.25ml、Peroxidase (44units/ml)0.25ml、置於暗室中反應 1 小時後加入測試樣品 0.25ml，反應 10 分鐘後測 734nm 吸光值。

※Liposome system 測定法：

加入 1cc 的 Liposome(10mg/1cc 的  $NaH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  緩衝液)、1cc 的  $FeCl_3$ (400uM)、1cc 的待測樣品、1cc 的 Ascorbic Acid(400uM) 均勻混合後反應 36 小時，再加入 0.1cc 的 TBHQ(10mg/1cc 甲醇)、2cc 的 TCA-TBA-HCL， $100^\circ C$  加熱 15 分鐘，2000rpm 離心 10 分鐘後測 535nm 吸光值。

#### 四、結果

中草藥萃取液抗氧化試驗結果 TCE 萃取液在抗氧化試驗方面有不錯的自由基清除反應，其清除 ABTS 陽離子自由基能力  $SC_{50}$  為 0.92 mg/ml、清除 DPPH 自由基的  $SC_{50}$  為 0.96 mg/ml、清除 Nitric oxide 自由基的  $SC_{50}$  為 0.78 mg/ml、清除氫氧自由基

的  $SC_{50}$  為 0.55 mg/ml。因此，進一步探討 TCE 萃取液清除超氧陰離子的能力，即為類似 SOD 的活性，經由實驗結果顯示，TCE 萃取液中含有類似 SOD 的活性為 5385.04 U/mg。另外，GCE 萃取液雖只在清除氫氧自由基的反應上有  $SC_{50}$  為 0.57 mg/ml 的能力，但是其在類似 SOD 的活性試驗方面卻高達 15885.42 U/mg 的活性含量(data not shown)。至於 PME 萃取液則是在清除 Nitric oxide 自由基與氫氧自由基的能力表現較突出，其  $SC_{50}$  分別為 0.60 mg/ml 與 0.69 mg/ml。而 CFE 萃取液則是在氫氧自由基方面有  $SC_{50}$  為 0.64 mg/ml 的清除能力。

Comparison of  $SC_{50}$  values. ( mg / mL )

Samples	Scavenging activity of assay methods			
	ABTS ( ABTS <sup>+</sup> )	DPPH ( DPPH <sup>·</sup> )	Nitric oxide ( NO )	Hydroxyl Radical ( HO <sup>·</sup> )
Sample1	1.07	1.09	0.60	0.69
Sample2	0.92	0.96	0.78	0.55
Sample3	1.84	1.20	1.65	0.64
Sample4	1.50	1.06	1.61	0.57
Trolox	1.24	ND	ND	ND
Vitamin E	ND	1.06	ND	ND
Vitamin C	ND	ND	ND	0.56

ND, not done

## 五、結論

近年來化粧品市場流行天然植物風潮，許多國際大廠紛紛推出以植物萃取為主的化粧品，消費者的反應也相當良好，因此若國內廠商能鎖定中草藥化粧品推出具地方或民族特色的化粧品，相信此特色能使國內廠商在國際舞台佔有一席之地。

以藥品開發研究而言，需投入很長的時間、大量的人力及龐大的資金，所以經濟部技術處中草藥推動辦公室提出，建議廠商在經營策略的規劃方向中，應將計畫分為短程及長程的考量。以短程研發成果，厚植長程實力。而短程方面以進入消費者市場、加速新產品開發、取得現金流量三項為目標。從中藥健康食品、中藥藥貼布、中藥化妝品、中藥藥酒等具潛力且易開發的產品切入市場，不失為一個可行的方向。其中，含中藥的化妝品將成為新一代天然化妝品配方的趨勢。因中草藥萃取液蘊含豐富的活性成分，有益皮膚的協調作用，而外用含有中草藥萃取液的化粧品，則可增加肌膚的保護作用，對抗內、外因性的傷害，如：人蔘萃取液據研究報告顯示可促進血液循環、激勵細胞再生，使皮膚的新陳代謝正常化、及增加皮膚的保水能力和柔軟度、減緩皺紋現象與提高膚色的白皙度等。而人蔘成份中的人蔘皂素更可清除自由基與抑制脂質的過氧化，進而達到抗老的功效。



## 六、參考文獻

1. W. L.Li , et al. "Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus" , Journal of Ethnopharmacology 92 , 1-21 , 2004.
2. Yeong-Deug Yi , et al. "An Overview of Traditional Chinese Herbal Formulae and a Proposal of a New Code System for Expressing the Formula Titles" , Advance Access Publication 4 , 125-132 , 2004.
3. Andrew P. Winterstein , et al. "Herbal Supplements : Considerations for the Athletic Trainer" , Journal of Athletic Training 36 (4) , 425-432 , 2001.
4. Nobutaka Suzuki , et al. "Complementary and Alternative Medicine : a Japanese Perspective" , Advance Access Publication 21 , 113-118 , 2004.
5. Talal Aburjai , et al. " Plants Used in Cosmetics" ,Phytotherapy research 17 , 987-1000 , 2003.
6. Hu Fenglin , et al. "Free radical scavenging activity of extract prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants" , Fitoterapia 75 , 14-23 , 2004.
7. Rachel W. Li , et al. "Anti-inflammatory activity of Chinese

medicinal vine plants” ,Journal of Ethnopharmacology 85 ,  
61-67 , 2003.

8. Pavel Dra sar , et al. “Recent advances in analysis of Chinese  
medical plants and traditional medicines ” ,Journal of  
Chromatography B 812 , 3-21 , 2004.



# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01(子計畫 5)

計畫名稱：探討不同化粧品基劑對果酸化粧品安定性的影響

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

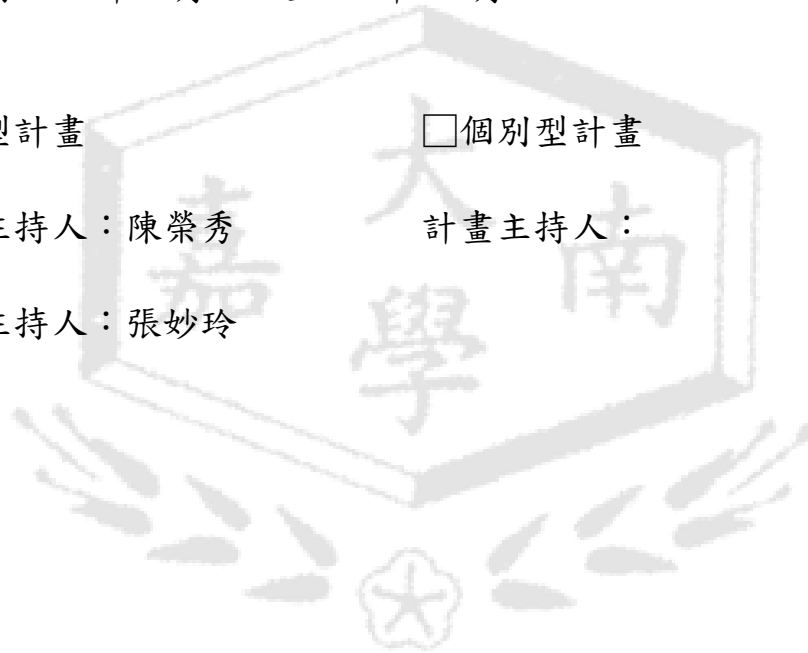
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：陳榮秀

計畫主持人：

子計畫主持人：張妙玲



## 一、中文摘要

本研究主要探討果酸 Alpha Hydroxy Acids(AHAs)乳化護膚產品中，其配方之組成成份的改變對果酸乳化產品的流變性(rheology)、黏度(viscosity)、酸鹼度值(pH)、導電度(electrical conductivity)、粒徑(particle size)等物性隨著時間變化的安定性影響。

經過實驗結果顯示，在 Steareth 2/Steareth 21, GMS/Amphisol K, Span/Tween 及 Covacream 的界面活性劑中，以 Steareth 2/Steareth 21 可以得到較佳穩定的果酸乳液，且在產品中最佳含量為 5%( Steareth 2/Steareth 21 的比例用量為 3/2)。攪拌速度則以 600rpm 較 300rpm 佳，而速度愈快，產品的粒徑愈小。另外，脂質的種類及含量也大大的影響產品的安定性，例如，Finsolv TN 添加到此界面活性劑系統時，都使產品的安定性大大的降低，然而 Stearic acid 及 Cetyl alcohol 的混合使用，則大大的提高安定性。而乳化時，組成成份的添加順序，則以油相成份先與界面活性劑混合均勻後，再慢慢添加進水相中的乳化程序，可以得到最穩定的結果。當果酸濃度增加時，產品的不穩定會提高。綜合以上結果，所得最佳果酸配方為：Steareth-72 3, Steareth-721 2, CCT 2 Stearic acid 1 Cetyl alcohol 1 Squalane 3 Mineral oil 5 Propylene Glycol 5 Veegum 0.3 Glycolic acid 5 Tricthanolamine 5 Germaben 0.8 Pure Water 66.9。

## 二、緣由與目的

果酸是化妝品常用的原料，許多不同的果酸(Alpha-hydroxy acids, 簡稱 AHA) 如甘醇酸(glycolic acid)，乳酸(lactic acid)，檸檬酸(citric acid)及酒石酸(tartaric acid)等[1]，由於它們具有角質剝除(desquamation)作用，降低皮膚的無感蒸泄(transdermal water loss, 簡稱 TEWL)與促進皮膚的美白作用[2-5]，所以常被用來處理角質問題與光老化傷害(photoaging)之皮膚[6-8]。這些問題皮膚所呈現的症狀包括角質粗糙(Rough)，皺紋(Wrinkles)，斑點 (Spots or freckles)，色素沈澱(pigmentation)[9~11]等。因而他們常被添加在不同的化妝品劑型配方中像乳液(lotion)，乳霜(cream)，凝膠(gel)和精華液(essense)[12]等，以因應臨床治療及市場的需求。然而果酸的酸鹼值常使產品產生不穩定的現象，而使產品降低經濟價值與有效性，因此如何產製高穩定性的果酸產品是重要。眾所皆知，化妝品的不穩定性包含沉澱、懸浮、變色、異味、粘稠度減稀或增加等現象 [13]，這些現象的產生可能源自於界面活性劑的選用不當、乳化球粒徑分佈、乳化條件不佳、有效成份的分解或乳化劑之間的基質效應之干擾等等 [14-16]。雖然已有一些特定系統之穩定的果酸製品被研發且發表 [17-18]。但其結果畢竟未能涵蓋或代表其他不同界面活性劑系統及化妝品基劑之諸多產品的穩定性，且從市售化妝品製品之分析中，我們發現粒徑的分佈及大小並不是惟一使乳化安定的條件。為進一步了解乳化粒徑如何影響化妝品產品的穩定性，本計劃將選定不同的界面活性劑並添加其各種基劑進行乳化，再將乳化製品以雷射粒徑分佈儀分析及配合加速老化的方法，有系統的建立一系列乳化粒分佈與乳化穩定性之相關性，以做為化

妝品配方設計之參考。

### 三. 結果與討論

#### 3-1 界面活性劑種類的選擇：

改變界面活性劑種類，以添加 5% Glycolic acid 果酸成份為基礎調製表 3-1 之果酸配方產品，結果發現以 Steareth-2/ Steareth-21 是最具安定性，故為最佳的界面活性劑。

表 3-1 界面活性劑的比較 Comparison of Surfactants

Materials(g/100g)	Formulation (systems, 600rpm)					
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
(A) 倒入(B+5%甘醇酸)後加(C)						
(A)油相						
Brij 72 (Steareth-2)	3g	3g	2g	-	-	-
Brij 721 (Steareth-21)	2g	2g	2g	-	-	-
GMS	-	-	1g	-	-	-
Amphisol k	-	-	0.5g	-	-	-
Tween 40	-	-	-	2.5g	-	-
Span 60	-	-	-	2.5g	-	-
Covacream(冷製)	-	-	-	-	-	5g
Arlamol E	-	-	-	-	-	2g
Dimethicon	-	-	-	-	-	5g
Caprylic/Capric Triglyceride	5g	2g	2g	5g	-	7g
Stearic acid	2g	1g	1g	0.5g	-	-
Cetyl alcohol	2g	1g	1g	0.5g	-	-
Squalane	7g	3g	3g	-	7g	8g
Mineral	6g	5g	5g	-	8g	2g
Germaben II	0.8g	0.8g	0.8g	0.8g	0.8g	0.8g
(B)水相(Water to 100g)						
Propylene Glycol (PG)	5g	5g	5g	5g	5g	5g
Veegum	0.3g	0.3g	0.3g	-	0.6g	-
Hydroxyethylcellulose (HEC)	-	-	-	0.6g	-	-
(C) 酸鹼度調節劑						
Triethanolamine (TEA)	5g	5g	5g	5g	5g	5g
※經 45°C 加速老化穩定天數	45 天	40 天	35 天	0 天	0 天	0 天

#### 3-2 油相成份與果酸濃度對產品穩定性之影響：

##### 3-2-1 Finsolv TN 與果酸濃度高低之影響：

L 由表 3-2-1 的結果可知，Finsolv TN 油脂存在此系統中時，引起產品

極大的不穩定，而隨著果酸濃度的增加，產品的不穩定也增加，以 5% 的果酸含量可得到較佳的安定。

表 3-2-1 選擇 Brij 其基劑 Finsolv TN 成分影響穩定天數的效應

配方	A	B	C	D
Steareth-2 (Brij72)	3g	3g	3g	3g
Steareth-21(Brij721)	2g	2g	2g	2g
<b>Finsolv TN</b>	0g	5g	5g	5g
Squalane	7g	7g	7g	7g
Mineral oil	8g	8g	8g	8g
Propylene Glycol	5g	5g	5g	5g
Veegum	0.6g	0.6g	0.6g	0.6g
<b>Glycolic Acid</b>	<b>5%</b>	<b>2%</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>
Triethanolamine (TEA)	5g	5g	5g	5g
穩定天數(加速老化 45°C)	45 天	1 天	1 天	1 天

### 3-2-2 Stearic acid 及 Cetyl alcohol 與果酸影響:

表 3-2-2 是 Stearic acid 及 Cetyl alcohol 成分對產品的影響，結果以 1% 及 2% 的可得較好的安定性，但由於 2% 添加的產品有較粘滯性的觸感，故選擇 1% 為產品之添加量。

表 3-2-2 Stearic acid 及 Cetyl alcohol 成分對產品穩定性之影響

配方	A	B	C	D	E
Steareth-2 (Brij72)	3g	3g	3g	3g	3g
Steareth-21(Brij721)	2g	2g	2g	2g	2g
C. C. T.	2g	2g	2g	2g	2g
Germaben II	0.8g	0.8g	0.8g	0.8g	0.8g
<b>Stearic acid</b>	0g	0.1g	0.5g	1g	2g
<b>Cetyl alcohol</b>	0g	0.1g	0.5g	1g	2g
Squalane	3g	3g	3g	3g	3g
Mineral oil	5g	5g	5g	5g	5g

Propylene Glycol	5g	5g	5g	5g	5g
Veegum	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g
Glycolic Acid	5%	5%	5%	5%	5%
Triethanolamine	5g	5g	5g	5g	5g
穩定天數(加速老化 45°C)	1 天	2 天	4 天	40 天	42 天

3-3 攪拌速度及油水相添加順序對產品穩定性之影響：

3-3-1 攪拌速度之影響：

表 3-3-1 是攪拌速度對產品之安定性影響，以 600rpm 以上的攪拌速度可得較小的粒徑及較佳的穩定天數。

表 3-3-1 乳化條件攪拌速度的影響

配方	A(5%AHA)		B(10%AHA)		C(15%AHA)							
Steareth-2 (Brij72)		2g		2g		2g						
Steareth-21(Brij721)		2g		2g		2g						
C. C. T.		2g		2g		2g						
Germaben II		0.8g		0.8g		0.8g						
Stearic acid		1g		1g		1g						
Cetyl alcohol		1g		1g		1g						
Squalane		3g		3g		3g						
Mineral oil		5g		5g		5g						
Propylene Glycol		5g		5g		5g						
Veegum		0.3g		0.3g		0.3g						
Glycolic Acid		2.5%		5%		7.5%						
Lactate		2.5%		5%		7.5%						
		↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘						
攪拌速度(rpm)		300		600		300		600		300		600
PH 值		3.62		3.62		3.59		3.62		3.58		3.59
粒徑(d0.5)室溫		18.225		15.413		16.75		10.639		15.688		7.45
穩定天數(加速老化 45°C)		20 天		25 天		7 天		10 天		5 天		7 天

### 3-3-2 油水相添加順序之影響:

圖 3-1 顯示當乳化之添加順序改變時，產品之穩定性差異，其中以(c)之乳化順序，即油相成份先與界面活性劑混合均勻後，再慢慢加進水相中的乳化程序，可以得到最穩定的結果。

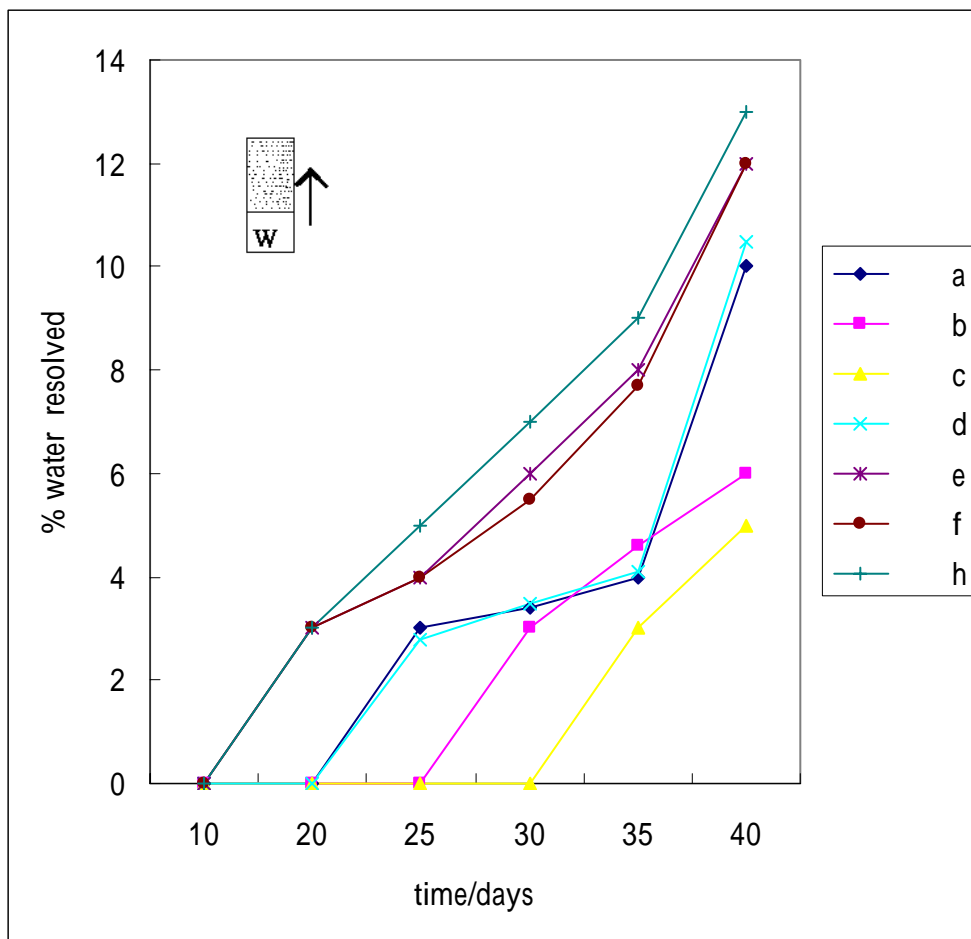


圖 3-1 利用相分離凝乳(creaming)來判定油水相添加順序不同經之影響

### 3-4 最佳穩定性的配方：

綜合以上結果，所得最佳果酸配方為：Steareth-72 3，Steareth-721 2，CCT 2 Stearic acid 1 Cetyl alcohol 1 Squalane 3 Mineral oil 5 Propylene Glycol 5 Veegum 0.3 Glycolic acid 5 Tricthanolamine 5 Germaben 0.8 Pure Water 66.9。此產品之酸鹼值及導電度與粒徑的變化均在很小，且在 45 C 加速老化的條件下，可穩定 40 天以上。

## 四. 參考文獻:

1. Shinomiya, Tatsuoh; Hikima, Toshio; Sakamaki, Taekishi. FRAGRANED JOURNAL(1997), 25(9), 49-55.



2. Barel, Andre O.; Paye, Marc; Maibach, Howard I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology* (2001), 311-315.
3. Fulton, James E., Jr. (Vivant Pharmaceuticals, USA). U.S. (2001), 6pp.
4. Koyama, Junichi; Nakanishi, Jotaro; Sato, Junko; Nomura, Junko; Suzuki, Yumiko; Masuda, Yoshiko; Nakayama, Yasuhisa. Life Science Center, Shiseido CO., Ltd., Japan.  
Nippon Keshohin Gijutsusha Kaishi (1999), 33(1), 16-26.
5. Boissic, Sylvie; Branchit-Gumila, Marie-Christine; Benslama, Lotfi; Li Charpentier, Yves; Amaud-Battandier, Janick. *EUROPEAN JOURNAL of DERMATOLOGY* (1997), 7(4), 271-273.
6. Griffiths, C.E.M., *SKIN PHARMACOLOGY* 10(1997), pp 1-11.
7. Kligman, L.H., Crosby, M.J., Kligman, A.M., *JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT* 10(1996), pp 37-45.
8. Appa, Y., *SKIN PHARMACOLOGY AND APPLY SKIN PHARMACOLOGY* 12(1999) pp 111-119.
9. Paihak, M.A., Wick, M., Sober, A.J., Farinelli, W.A., Fitzpatrick, T.B., Ciganek, E.R., *DERMATOLOGY* 63(1998), pp 156-161.
10. Onsun, N., Atilganoglu, U., Nisanci, P., Beycan, I., Uras, A.R., *JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT* 7(1996), pp 201-202.
11. Kligman, A.M., *CUTIS* 56(1995), pp 83-84.
12. Yazan, Yasemin. Eczacilik Fakultesi, Farnasotik Teknoloji Anabilim Dali, Kozmitoloji Bilim Dali, Anadolu Universitesi, Eskisehir, Turk. *FABAD Farmasotik Bilimler Dergisi* (1998), 23(1), 29-37.
13. De Luca, M., Grossiord, J.L., Medard, J. M., and Vaution, C., *COSMETICS&TOILETRIES* (1990), 105(11), 65-69
14. Christine Prybilski, C., Luca, M. de, and Grossiord, J. L., *COSMETICS&TOILETRIES* (1991), 106(11), 97-100.
15. C. Scrofani, C., Liporati, R., and Rigano, L., *COSMETICS&TOILETRIES* (1993), 108(7), 65-68.
16. Chandler, J. M., *COSMETICS&TOILETRIES* (1993), 108(11), 74-80.
17. Ertan, Gokhan; Ozer, Ozgen; Sarcin, Zeynep B. *ACTA Pharmaceutica turcica* (1999), 41(2), 86-92.
18. Williams, Lorraine. (Chesebrough-Ponds USA Co., USA). U.S. (1995), 5pp.

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01 子計畫 6

計畫名稱：中草藥化粧品原料之開發與應用 (I)

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

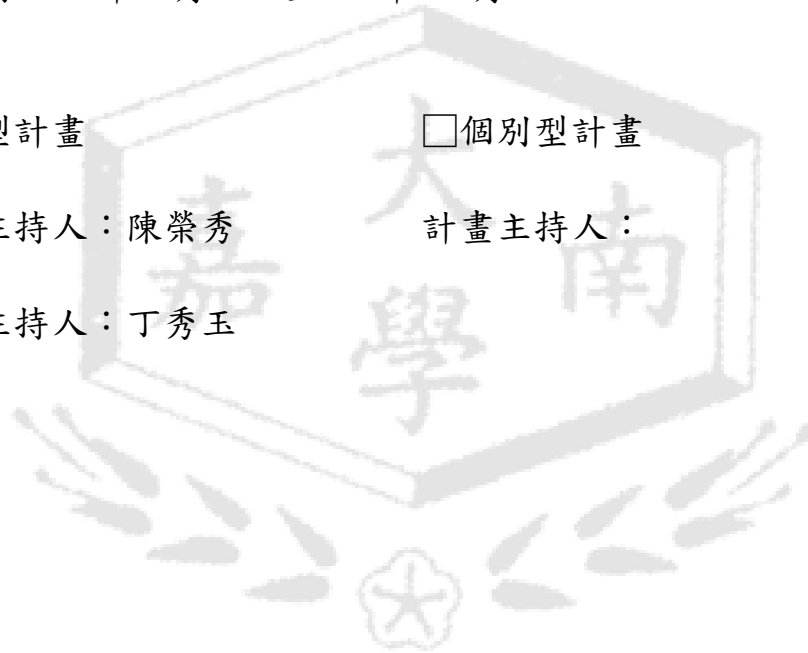
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：陳榮秀

計畫主持人：

子計畫主持人：丁秀玉



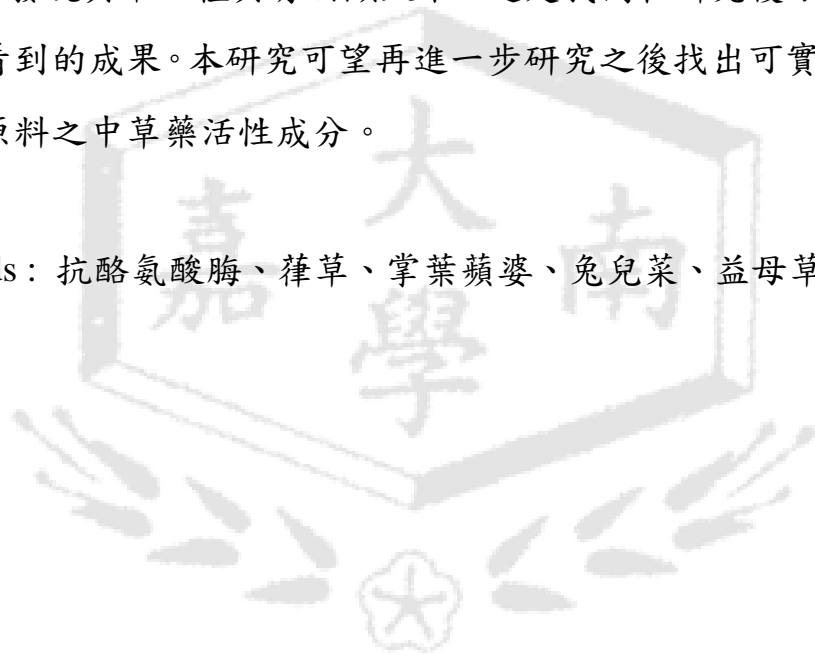
中華民國□□年□□月□□日

## 一、中文摘要

本年度研究計畫，已按照原先預定的目標持續進行研究中。在校方的支持下，本計畫篩選十五種常見藥用植物，並在本計畫中，是採用生物活性導引分離的方式進行活性篩選，以建立系統性萃取濃縮的方法。目前有一些很好的成果：

在美白活性篩選方面，目前發現在抗酪氨酸酶活性抑制篩選結果，發現了其中數種植物萃取物具有不錯之活性；且在抗發炎活性篩選方面，發現其中一種具有明顯效果，這是我們在研究複方的過程中最希望看到的成果。本研究可望再進一步研究之後找出可實際應用於化妝品原料之中草藥活性成分。

Keywords：抗酪氨酸酶、葎草、掌葉蘋婆、兔兒菜、益母草、散血草



## 二、緣由與目的

近年來，由於現代醫學科技之進步快速以及全球人口老化增加的趨勢，人類對防止老化、養生保健的需求日益提高；然而，基於西方藥物的使用限制，世人對於中（草）藥的仰賴與需求卻與日俱增與被受重視。此一趨勢，說明了中國傳統醫藥對於這些文明病治療上之優越性，可見未來隱藏著巨大的市場與經濟效益。

愛美是人類天性，傳統中草藥除了一些補氣活血、調整體質的溫補藥物中，亦有少許單、複方直接使用於女性美容、保養等用途，如皮膚美白，除痘。隨著生物技術的快速累積，開發傳統中草藥成為低劑量高效能之化粧品相關等生物科技產品，實是提升生物科技產業的一條捷徑。

在本研究計畫中，我們經由嚴謹的討論與選擇，進行十五種常見中草藥進行美白活性測試（見表一）；以及進一步將部份具有活性作用之中草藥萃取物分層處理，作為研究對象，並以美白、抗發炎與皮膚癌細胞毒殺作用等三大常見之皮膚功能為方向，探討這些萃取物之活性作用能力。

本計畫的目標是發展出一個能從上游最基礎的中草藥成分（或活性分劃）經藥理活性測試，以結合下游的劑型設計、甚至人體試驗，作為功能性化妝品的原料。因此本計劃的設計期望逐步建立常見中草藥的學理研究模式與依據，並提供國內廠商諮詢，如此除能擴大本國廠商未來在此一市場的競爭能力，亦將建立本校於中草藥應用與開發上之特色，使我校成為培育中草藥化粧品研發之重鎮。

表一：常見中草藥

1	葎草	<i>Humulus scandens</i> (Lour.) Merr.	桑科 Moraceae
2	糙葉耳藥花	<i>Otanthera scaberrima</i>	野牡丹科
3	角桐草	<i>Hemiboea bicornuta</i>	苦苣苔科 Gesneriaceae
4	猴歡喜	<i>Sloanea formosana</i> Li.	Elaeocarpaceae.
5	鳳梨	<i>Ananas comosus</i> MERR	鳳梨科 Bromeliaceae
6	印度紫檀	<i>Pterocarpus indicus</i> Willd.	豆科 Fabaceae
7	黃杞	<i>Engelhardtia roxburgiana</i> .	胡桃科 Juglandaceae
8	刺杜蜜	<i>Bridelia balansae</i> Tutcher	大戟科 Euphorbiaceae
9	臭辣樹	<i>Evodia meliaefolia</i> (Hance) Benth	芸香科 Rutaceae
10	掌葉蘋婆	<i>Sterculia foetida</i> L.	梧桐科 Sterculiaceae
11	桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	桔梗科 Campanulaceae
12	益母草	<i>Leonurus heterophyllus</i> Sweet	唇形科 Labiatae
13	兔兒菜	<i>Lxeris chinensis</i>	菊科 Compositae
14	台灣天胡荽	<i>Hydrocotyle batrachium</i> Hance	繖形科 Umbelliferae
15	散血草	<i>Ajuga bracteosa</i>	唇形科 Labiatae

葎草(*Humulus scandens* (Lour.) Merr.)，為桑科葎草屬，別名山苦瓜、苦瓜草、鐵五爪龍(台灣)、五爪龍、勒草、拉狗蛋、割人藤、穿腸草。植物形態為一年生或多年生纏繞草本，長達4m多。莖枝和葉柄密生倒鉤刺，莖淡綠色，有縱稜。單葉對生，有長柄，長5~20cm；葉近腎狀五角形，直徑7~10cm，掌狀5深裂，稀為3或7裂，裂片卵形或卵狀披針形，先端急尖或漸尖，基部心形，邊緣有粗鋸齒，葉兩面生粗糙剛毛，下面有黃色小油點。秋季開花，花小，單性異株(雌雄異株)，花序腋生，雄花排成長15~25cm的圓錐花序，花淡黃綠色；花被5，披針形，外側有毛茸及細腺點；雄蕊5，花絲絲狀，甚短；雌花10余朵集成近圓形的短穗狀花序，腋生，苞片葉狀小形，附有2托葉，每苞具2花，苞及托葉邊緣有睫毛，背面具透明的長剛毛及

腺點，托葉卵形，先端長尖，包被雌花，每個雌花有 1 鱗狀花被，緊包雌蕊；子房單一，上部突起，疏生細毛。果穗綠色，類似松球狀，瘦果球形微扁。中藥藥性分類為味甘、苦，性寒。主治功能為清熱解毒，利尿消腫。《全國中草藥彙編》。可用於肺結核潮熱，胃腸炎，痢疾，感冒發熱；小便不利，腎盂腎炎，急性腎炎，膀胱炎，泌尿系結石；外用治癰癤腫毒，濕疹，毒蛇咬傷。《全國中草藥彙編》。其全草煎服治淋病、瘧疾，去瘀血，利尿，健胃，治腫毒、梅毒及腳腫。《台灣植物藥材志》

糙葉耳藥花(*Otanthera scaberrima* (Hayata) Ohwi)，為台灣原生野牡丹科(Melastomataceae)耳藥花屬植物。植物型態為莖被硬伏毛。葉卵或披針形，基出 5 脈，長 2.2-5.5 cm，寬 1-2.2 cm，先端鈍，基部圓至銳尖，略鋸齒緣，兩面被硬伏毛；葉柄長約 2 mm。為特有種，分布於全島低至中海拔山坡地或路旁。

角桐草(*Hemiboea bicornuta*)，別名玲瓏草，花季春～夏，為台灣特產，花的型態呈筒狀，外側是白，內側是紫褐色斑點，在濕潤的環境中生長得特別茂盛，它的果實彎曲，尖尾，高約 1 公尺左右。

猴歡喜(*Sloanea sinensis*)，杜英科猴歡喜屬植物，為常綠喬木，高達 12m；枝、葉無毛，葉常聚生於小枝上部。葉紙質，倒卵狀橢圓形至橢圓狀長圓形，長 5-12cm，寬 2-5cm，頂端漸尖，少有短尖，基部闊楔形至近圓形，近全緣或中部以上疏細鋸齒緣。

黃杞(*Engelhardia roxburghiana* Wall)，野生的核桃科常青喬木，葉子自古以來作為清熱、解毒和減肥用的保健茶使用。黃杞具有抗氧化作用、抑制肥胖作用、抗過敏反應作用以及預防癌症的作用等多種生理活性作用。不僅對過敏反應性鼻炎、過敏性皮膚炎和支氣管炎等 I 型過敏反應症有治療效果，而且還對接觸性皮膚炎等 IV 型過敏反應

症有療效。

刺杜蜜(*Bridelia balansae*)，大戟科植物，為常綠小喬木。葉片橢圓形。花簇生，細小不引人注目。核果熟時呈暗紅色。是亞熱帶闊葉林內常見的樹種。分布於台灣全島山麓，八卦山區分布普遍。木材可用來製作農具及供作炭薪。其嫩芽為台灣琉璃小灰蝶的幼蟲食餌。

掌葉蘋婆(*Sterculia foetida* L.)，梧桐科(*Sterculiaceae*)的落葉大樹，樹高可達 25 公尺。掌狀複葉，簇生枝端，小葉質厚全緣，約 7~9 枚，橢圓形，先端尖。圓錐花序頂生，花小約一公分，花被五裂，具強烈異味。蒴果壓扁球形或木魚形，淺紅色。常種在庭院觀賞。落葉期為轉為黃色。果實木質，成熟時為紅色，開裂時會露出黑色的種子。

桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC.)，為桔梗科植物桔梗的根部，別名符菴、白藥、利如、梗草、盧如、房圖、薺芑、苦梗、苦桔梗、大藥、白桔梗，植物形態為多年生草本，有白色乳汁。莖上部稍分枝，微被白粉。莖中下部葉對生或輪生，上部葉互生，卵形或卵狀披針形，長 2.5~6cm，寬 1~2.5cm，邊緣具不整齊銳鋸齒，下面微被白粉。花大，花萼鐘狀，5 裂；花冠闊鐘狀，先端 5 裂，紫藍色或藍白色；雄蕊 5，花絲基部變寬，有短柔毛。蒴果倒卵形，成熟后頂端 5 瓣裂，具宿萼。花期 7~9 月，果期 8~10 月。生於山坡、草叢或溝旁。中藥藥性分類味苦、辛，性平。功用有化痰止咳、利咽開音、宣暢肺氣、排膿消癰的功能。用於外感痰多咳嗽、咳痰不爽、風熱咳嗽、痰多胸悶、咽喉腫痛、聲音嘶啞、氣滯胸悶、小便不利、大便秘結、肺癰、胸痛、咯吐黃痰、膿血等。還用於泄瀉、痢疾、大便失調。

益母草(*Leonurus heterophyllus* Sweet)，唇形科(*Labiatae*)植物，又

名茺蔚、紅花益母草、坤草、益母、益明，中藥藥性分類味辛、微苦，性微寒。功能為活血調經，行血散瘀，興奮子宮，收縮子宮，利尿，止血，為婦科要藥。主治產後出血，惡露，腹部脹痛，子宮收縮無力，痛經，腹部癥瘕，慢性附件炎，盆腔炎，腎炎浮腫，血尿，婦女氣血虛之不孕症，胎衣不下。

兔兒菜(*Lxeris chinensis*)，菊科植物，又名鵝仔菜、兔兒菜，植物形態為多年生草本植物，全株無毛，根粗大，全株含白色乳汁，折傷即流出來。莖多分枝成叢生狀。葉互生，膜質，根生葉發達，莖葉較小，均為披針形，銳頭、疏鋸齒或全緣，花朵黃色，疏生之聚繖狀圓錐花序，小花均為舌狀花，黑色花藥，柱頭二歧反卷呈黑色瘦果有長嘴，冠毛白色，春夏開花，全省平地、山地、高山均有它的蹤跡。全草有清熱、清炎、解毒、消腫、涼血、活血、生肌、止痛、調經之效。但具微麻醉性，多食有害。

台灣天胡荽(*Hydrocotyle batrachium* Hance)為繖形科(Umbelliferae)天胡荽屬植物，又名台灣蚶殼草，地光錢草，破銅錢，變地錦，台灣止血草，圓葉止血草，滴滴金，滿天星等。植物形態為多年生草本，莖匍匐地面，節處生根，光滑無毛。葉圓心臟形，互生，具長柄，葉緣深裂3-5。單一繖形花序，腋生，具花梗，花白綠色，果扁球形，褐色，種子扁平，半圓形。傳統用途采全草，除去老莖及老葉後洗淨，直接炒食或以開水燙熟後，再加各種調味料攪拌食用。或以鹽漬成小菜食用。其具有解熱、利尿、解毒及涼血的功效，能治喉痛、感冒及胎毒、腎結石、跌打等症，也能外敷癩瘡、纏身蛇等皮膚病症。

散血草(*Ajuga bracteose* wall)，為唇形科筋骨草屬植物，又名筋骨草、有苞筋骨草，為多年生草本，其功效具涼血解熱、消炎消腫、清



熱解毒止痛降壓之功用。主治感冒頭昏痛、肺炎肺病、肺腫、鎮咳、感冒、眼痛、高血壓、氣管炎、扁桃腺炎、咽喉痛、傳染性肝炎、腸炎、痢疾、淋病、吐血、癱毒及治中毒流鼻血、腹痛等。外治皮膚病、刀傷出血火燙傷等。葉搗爛敷跌打損傷、腫疔及毒蛇咬傷處。

印度紫檀(*Pterocarpus indicus* Willd.)，為蝶形花科落葉大喬木。其高 10 公尺以上，葉為羽狀複葉、互生，小葉三至五對，羽狀側脈極多對。總狀或圓錐花序，冠黃，花瓣五枚。春至夏季開花，色鮮黃，具芳香味。莢果扁圓，中央肥厚內藏種子，周圍扁薄似紙質。冬季落葉，夏季綠蔭蔽天，為造園綠蔭樹之上等樹種。木材紋理紫紅高雅，又稱青龍木，是世界最高貴木材之一。由於其高經濟價值，目前在屏東縣有相當數量之行道樹，栽植印度紫檀。一般認為紫檀屬藥用植物青龍木即為印度紫檀。

臭辣樹(*Evodia fargesii* Dode)，芸香科(Rutaceae)植物，植物形態落葉喬木，高達數米，枝暗紫色，幼時有柔毛。羽狀複葉；小葉 5-11，橢圓狀卵形或長橢圓狀披針形，長 6-11 厘米，寬 2—5 厘米，頂端漸尖或長漸尖，基部楔形，兩側常不等齊，表面深綠色近于無毛，背面灰白色，沿中脈疏生柔毛，基部及葉柄上較密，全緣或有不明顯的圓鋸齒。聚傘圓錐花序頂生；花白色或淡綠色，5 基數。蒴果分裂成 4-5 果瓣，成熟時紫紅色或淡紅色，背面布網紋和油點，側面有細毛，每一分果瓣有 1 種子。花期 7-8 月，果期 9-10 月。分布於山坡林中或溝邊。傳統用途果實供藥用，可散寒止咳。

### 三、研究步驟與方法

本研究計畫以傳統萃取方式對表依所列之中草藥進行有效成份研究，並進一步藉由活性引導分離法評估具有特殊生物活性之組份 (fractions)，釐清傳統中草藥之活性原理，提高傳統中草藥之產值。同時，我們試圖利用高效能液相層析儀建立中草藥基源資料庫 (指紋圖)，以進行藥材品質的管制。以及針對具有特殊活性之成份研究其分離的程序，以進行縮短時程 (新製程) 技術的開發。結合藥廠技術交流，建立新藥開發模式。

#### A. 材料收集：

為克服中藥成分受其來源與產地、天候等之影響，除至市面購得市售中草藥，並進一步至野外採集新鮮植物體，經高醫顏銘宏教授鑑定，以確定植物基原。此外，本計劃依據衛生署指定之溶媒(或未指定及以甲醇為溶媒)，以高效能液相層析儀建立其基源成份指紋圖，維持中藥材品質之穩定，以建立國內中藥品管之資料庫。

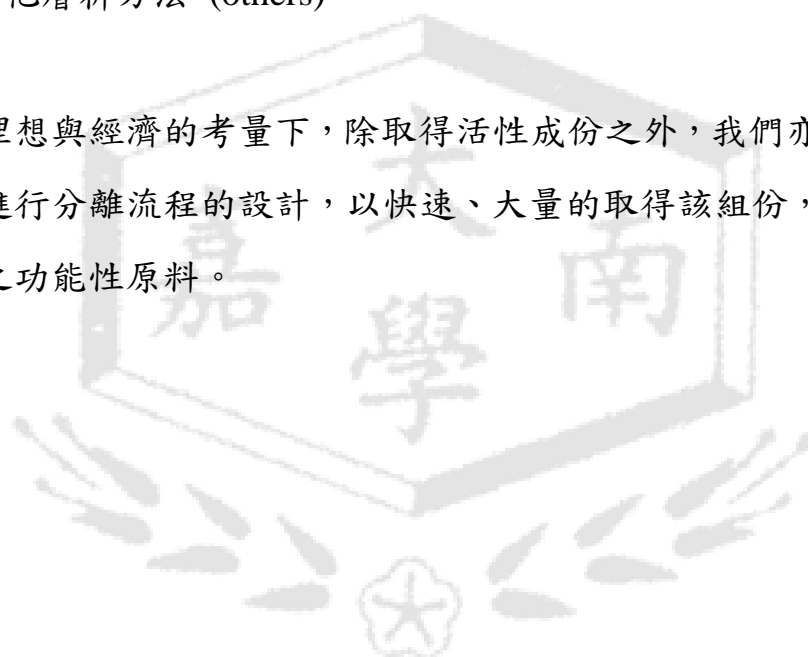
#### B. 藥材的成份抽取：

將前述所取得材料以適當溶媒所得之萃取物以正己烷 (n-hexane) 與水振盪分配之，得正己烷層，並將正己烷層減壓濃縮抽乾稱重。水層部分再以氯仿振盪分配之，得氯仿層，並將氯仿層減壓濃縮抽乾稱重。水層部分再以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 振盪分配之，得乙酸乙酯層，並將乙酸乙酯層減壓濃縮抽乾稱重。水層部分再以正丁醇 (n-butanol) 振盪分配之，得正丁醇層，並將正丁醇層減壓濃縮抽乾稱重。由以上之處理，可得到正己烷層、氯仿層、乙酸乙酯層、正丁醇層、水層，並分別進行生物活性試驗 (bioassay)，以作為研究導向指標，若上述各層進行篩選後，擇最有效之分層，建立其 HPLC 指紋圖。

於開發中草藥的活性成份為新藥物上，以活性導引分離法追蹤有效成份，利用色層分析技術至完成純物質的分離為止。預計應用的各種層析方法包括：

- 1.管柱層析 (gravity column chromatography)
- 2.中壓液相層析 (MPLC chromatography)
- 3.高壓液相層析 (HPLC chromatography)
- 4.製備型薄層層析 (preparative thin layer chromatography)
- 5.其他層析方法 (others)

在理想與經濟的考量下，除取得活性成份之外，我們亦可針對活性組份進行分離流程的設計，以快速、大量的取得該組份，提供作為化粧品之功能性原料。



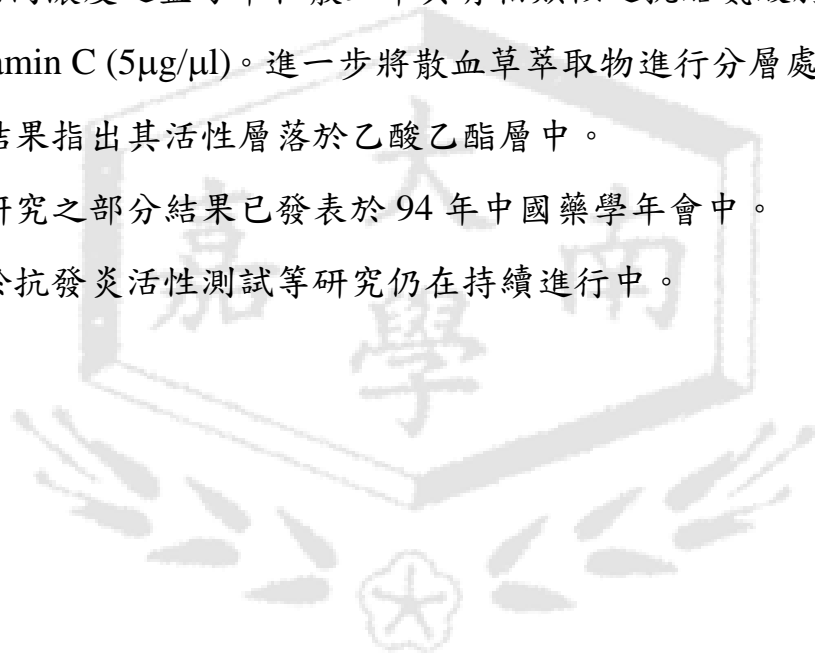
#### 四、研究成果

在本研究計畫中，是以建立系統性萃取濃縮的方法，採用生物活性導引分離的方式進行中草藥活性篩選。此次研究採取生物活性導引分離之方式。我們首先於市面上取得十五種藥材，進行美白、抗發炎與皮膚癌細胞毒殺作用等活性試驗，其結果如表二所示。

初步美白活性篩選結果顯示，葎草、掌葉蘋婆以及兔兒菜等三種植物在相同濃度下具有類似於 vitamin C ( $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 之抗酪氨酸酶活性能力；相同濃度之益母草和散血草具有相類似之抗酪氨酸酶活性，略遜於 vitamin C ( $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )。進一步將散血草萃取物進行分層處理與活性篩選，結果指出其活性層落於乙酸乙酯層中。

本研究之部分結果已發表於 94 年中國藥學年會中。

關於抗發炎活性測試等研究仍在持續進行中。



表二：中草藥萃取物之抗酪氨酸酶抑制作用測試結果

代號	百分比抑制濃度
VIT C	100
CCL-HSM	100
CCL-OS	39.03
CCL-HB	0
CCL-SF	0
CCL-PI-W	0
CCL-ER	0
CCL-BB	46.65
CCL-SSFL	100
CCL-SSFS	100
CCL-SSFST	7.85
CCL-SSFP	0
CCL-PG	0
CCL-LHS	81.29
CCL-LC	100
CCL-HBH	41.33
CCL-AB-III	14.3
CCL-AB-II	82.44
CCL-AB-I	100
CCL-AC-II	59.12
CCL-EF-I	0
CCL-EF-II	4.61

## 五、計畫成果自評

本研究計畫分別以傳統萃取方式對市售或野外採集獲得之中草藥進行美白、抗發炎等有效成份研究，藉由活性引導分離法評估快速、精確的獲得具有特殊生物活性之 fractions，並利用特殊的分離流程，獲得更具藥理意義之成份，釐清傳統中草藥之原理，提高傳統中藥之產值。



# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-01

計畫名稱：化粧品原料之研發與應用（一）

精油於改善頭皮屑化粧品之應用

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：陳榮秀 教授

計畫主持人：

子計畫主持人：蔡玫琳 助理教授

中華民國 95 年 02 月 28 日

## 一、摘要：

皮屑芽胞菌 (*Pityrosporum ovale*) 繁殖過多時，會引起頭皮屑、甚至皮膚炎等問題。本研究測試不同種類的精油對皮屑芽胞菌的抑制活性。結果顯示白千層葉與樟樹葉精油不具抑菌能力，而尤加利精油的抑菌效果優於檜木與茶樹精油。進一步分析不同來源之尤加利精油，發現其存在抑菌活性差異。因此，在研發抗頭皮屑化粧品時，須考慮精油之來源。

此外，亦測試無患子萃取物洗髮精對皮屑芽胞菌的抑菌能力，但結果並無效果。

## 二、前言：

頭部的表皮細胞也和身體其他的皮膚一樣，有一定的代謝過程，從基底層細胞分裂增生後，逐漸往外進展，最後會演變成無生命的角質層而脫落。正常的掉落過程是溫和、個別的變化，所以幾乎看不到什麼頭皮屑。但是當身體或頭髮出現某些問題，使得頭皮的表皮細胞代謝加速、細胞成熟過程不完全、角質過度增生、而呈現大塊片狀的剝落，頭皮屑因而產生。舉凡像脂漏性皮膚炎、細菌或黴菌感染、乾癬等問題，都會造成頭皮屑的大量出現。

1987 年世界皮膚科醫學會證實頭皮的成因之一，是由一種學名稱為皮屑芽胞菌 (*Pityrosporum ovale*) 的真菌過度增生所引致。皮屑芽胞菌是一種與人體共生的真菌，通常黏附於髮根等皮脂線分泌較多的部份，當其繁殖過多時，會令髮根周圍及毛囊受到感染，出現紅腫、頭痕及油份分泌過多等情況，而新陳代謝亦隨之加快，直接引起頭皮、頭痕、甚至皮膚炎等問題。

去頭皮洗髮水成份，如 ZPT、selenium sulphide 等，是透過調節新陳代謝的方式，改善頭皮狀況；水楊酸可打斷角質層中細胞之間的連結，使其不會緊黏在一起形成皮屑；抗黴菌成分(Ketoconazole)的洗髮精可抗發炎及抑制黴菌細胞壁之合成，進而抑制其增生。目前的研究顯示，以抗黴菌成分的洗髮精處理後，頭皮屑復發的比率是最低的。因此，本計畫將篩選具有抗皮屑芽胞菌能力之天然精油，作為研發抗頭皮屑化粧品之參考。

## 三、材料與方法：

### (一) 菌種培養：

皮屑芽胞菌 (*Pityrosporum ovale*, BCRC22243) 購自生物資源保存及研究中心(新竹)。培養基為 Malt extract, 60g/L, Ox-bile, 20g/L, Tween 40, 10g/L, Glycerol monooleate, 2.5g/L。培養溫度為 30°C。

### (二) 精油：

茶樹、檜木與尤加利精油 A、B、C 共五種樣品由廠商提供。白千層與樟樹精油則由實驗室萃取。將其葉子清洗後，置於陰涼處 15 天後，以水蒸氣蒸餾法萃取精油。另有廠商提供之無患子萃取物洗髮精作測試。



(三) 精油乳液製備：

吸取適量精油與 Tween 80 (1%) 混合均勻，再將其加入足量的蒸餾水內，以 vortex 混合均勻，製備成不同濃度的精油乳液。

(四) 圓盤擴散法：

抗菌試驗初步篩選。將測試菌株需活化後，以  $9 \times 10^5$ /mL 菌量進行平盤塗抹。之後，將濾紙盤（直徑 8mm）放入於已接種菌體之固體培養基內，再加入不同濃度的精油乳液，培養一定時間後，測定抑制環之大小，檢定其抗菌能力。

(五) 肉羹培養基稀釋法：

由圓盤擴散法篩選出抗菌效果強之精油進一步進行肉羹培養基稀釋法，測試抑菌濃度。先配製 5% 精油濃度之培養液，再將其稀釋成 1、0.5、0.25、0.1% 精油的培養，接種菌體 ( $9 \times 10^5$ /mL 菌量)，置於培養箱中培養至一定時間後，吸取菌液，進行平盤塗抹培養，觀察菌的生長狀況。

#### 四、結果

圓盤擴散法實驗，若抑菌圈大於 10mm，表示有抑菌活性。10mm 抑菌圈為輕度活性，11~15mm 為中度活性，16~20mm 為高度活性。由實驗結果得知，白千層葉與樟樹葉精油對皮屑芽胞菌不具抑制效果（表一和表二）。檜木及茶樹精油在高濃度時，具輕度抑制能力。尤加利精油 B 在 5% 時即具有抑菌活性，在 10% 時具有中度抑菌活性。此外，無患子萃取物洗髮精對皮屑芽胞菌不具抑菌作用（表六）。

由圓盤擴散法實驗初步篩選結果，得知尤加利精油 B 對皮屑芽胞菌的抑菌效果優於檜木及茶樹精油，而二者又優於白千層葉與樟樹葉精油。因此，選擇尤加利精油 B 進一步以肉羹培養基稀釋法探討其抑菌能力，並且增加不同來源的尤加利精油 A 與 C，分析抑菌效果差異。實驗結果顯示，不同來源之尤加利精油抑菌效果不同，尤加利精油 A 的菌活性最強，在 0.25% 精油濃度時仍具抑菌效果，而尤加利精油 B 與 C 在 0.25% 精油濃度時以無法抑制菌的生長（表七）。

表一 白千層葉精油對皮屑芽胞菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	9	9	9

表二 樟樹葉精油對皮屑芽胞菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	9	9	9

表三 檜木精油對皮屑芽胞菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	10	10	10

表四 茶樹精油對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	10	10	10

表五 尤加利精油 B 對皮屑芽胞菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	9	9	9
5%	10	10	10
10%	15	15	15

表六 無患子萃取物洗髮精對皮屑芽胞菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
80%	8	8	8
100%	8	8	8

表七 肉羹培養基稀釋法測定不同尤加利精油對皮屑芽胞菌的抑菌能力

Concentration	Day 3	Day 5	Day 7
尤加利精油 A			
1%	+	+	+
0.5%	+	+	+
0.25%	+	+	+
尤加利精油 B			

1%	+	+	+
0.5%	+	+	+
0.25%	—	—	—
尤加利精油 C			
1%	+	+	+
0.5%	+	+	+
0.25%	—	—	—

註：「+」：有抑菌效果；「—」：無抑菌效果

## 五、討論：

許多文獻指出精油具有抗菌作用。本實驗所測試之精油對皮屑芽胞菌的抑菌效果不一。白千層葉與樟樹葉精油不具抑制效果，尤加利精油的抑菌效果優於檜木及茶樹精油，但不同來源之尤加利精油抑菌能力存在差異。實驗所用的尤加利精油均來自廠商，因此無法判斷是否品種、產地差異，或是已被廠商稀釋了。但仍建議在研發抗頭皮屑化粧品時，須考慮精油之來源。

本草綱目記載無患子對皮膚病有明顯的治療效果。無患子萃取物含有皂素，為天然的界面活性劑，早期民間利用無患子來洗頭。但實驗結果顯示無患子萃取物洗髮精對皮屑芽胞菌並不具抑制能力。但因商品的無患子萃取物濃度無法確定，無法判斷是否高濃度的無患子萃取物或其他配方產品也有相同的結果。

## 六、參考文獻：

Gustafon, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G. and Warmington, J. R. 1992. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology. 26, 194.

Maccioni A. M.; Anchisi; Sanna A; Sardu C, and Dessi S. 2002. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. International Journal of Cosmetic Science, 24, 53.

Squiquera, L., Plotkin, L., Mathov, I., Galimberti, R., and Leoni, J. 1996. Analysis of the antifungal activity of ketoconazole, zinc pyrithione and ciclopirox olamine against *Pityrosporum ovale*. A diffusion assay for cultures in solid media. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 7, 26.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry,

91, 621.

United States Pharmacopeia XXIV<1227>, 1999, Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles,pp.2152.

Webster, G. F., Leyden, J. J., McGinley, K. J. and McArthur, W. P. 1982. Suppression of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factor production in *Propionibacterium acnes* by subminimal inhibitory concentrations of tetracycline, ampicillin, minocycline, and erythromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 21, 770.

