

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

主題：探討多酚化合物在化妝品乳化製品中
之安定性

計畫編號：CN9625

執行期限：96年01月01日至96年12月31日



主持人：張妙玲

執行機構及單位名稱：嘉南藥理科技大學化妝品系

一、摘要

本專題研究利用 HPLC-UV/Vis 同時測定化妝品中四種酚類化合物 Chlorogenic acid (以下簡稱:Ch)、**Caffeic acid** (以下簡稱:Ca)、Ellagic acid (以下簡稱:EA) and **Ferulic acid** (以下簡稱:FA) 之安定性。實驗所探討出的沖提液為移動相，能使這四種分析物在 11 分鐘以內分離並定量，沖提液條件為：Acetonitrile19%+MeOH10%+H₂O.pH=2.5。以此方法所得之分析物檢量線線性關係 r 值在 0.999 以上、再現性及穩定性之 RSD% 在 3% 以下且分離度在 2 以上，並利用 Methanol 萃取模擬樣品、實際樣品中的分析物，結果以 Ellagic acid 最為安定，其他的酚類成份濃度則隨著時間遞減，顯示相當的不安定。

二、前言

多酚類 (Polyphenol) 化合物廣泛存在於各種天然植物中，且多酚類化合物具有特殊的生物活性如抗氧化作用及清除自由基的能力^[3]。多種含烯類 (π 鍵) 的化合物，很容易受空氣中的氧攻擊，最初形成一個有機過氧化物 HOOR 後再分解成較小的裂片如：醛、酮、梭酸，易導致物質的腐敗；酚的苯環上的-OH 基呈不穩定的狀態，非常容易釋出一個質子氧化成 C=O。故可藉此脫去空氣氧化中間物過氧基 ROO· 變成 ROOH ($\text{ROO}\cdot + \text{ArOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{ArO}\cdot$)，因

ArO·可行共振作用所以較 ROO·安定^[4]，所以酚類化合物在化妝品中多用來做抗氧化劑使用，抗氧化劑的作用在於中和一系列的氧分子自由基，氧自由基是由紫外線所激發，也可能在無人所居住的大氣層中，自然的發生氧分子正常代謝現象而產生。抗氧化劑能中和在皮膚曝露於太陽光下產生的氧自由基，降低氧自由基對皮膚的破壞，並可以減少化妝品的敗壞率。

鞣花酸 (Ellagic acid)、咖啡酸 (Caffeic acid)、綠原酸 (Chlorogenic acid) 及阿魏酸 (Ferulic acid) 等酚類成分，堅即可以有效對抗威脅身體健康的自由基，又具有抗氧化^[5,6,7]或美白^[8](Ellagic acid, 於化妝品中限量 0.5%^[9]) 的效果。目前對此四種化合物個別進行分析的方法有 Electrophoresis^[10,11]、GC^[12]、HPTLC^[13]、及 HPLC^[14,15] 等。Electrophoresis 及 HPTLC 精確度較 HPLC 低；而四種分析物其揮發成氣體的溫度不同，所以無法使用 GC 同步分析這四種分析物，然 HPLC 靈敏度高、廣用性也高、操作上也較簡易，且大部分文獻資料中所採用的分析方法也多为 HPLC，因此我們選用 HPLC 方法來進行實驗。目前已有文獻資料顯示可從水果 (莓類) 中分析出此四種分析物，但仍無對此四種分析物於化妝品中同步進行分析的文獻資料，因此，本專題研究及針對此四種化合物進行分析以及對其添加於化妝品之後的萃取方法和回覆率與安定性進行探討。

三、實驗部份

(一) 實驗儀器設備

1. 高效能液相層析儀(HPLC)

HITACHI HPLC 系統 (輸送沖流液泵 A、B pump, L-7100 和 UV/Visble 吸收波長偵測器, L-7420; Hitachi, Ltd.Tokyo, Japan。 ECD 偵檢器: BAS LC-4C; HITACHI pump L-2130。數據的獲得及處理連線於個人電腦, 使用訊華數據處理軟體 (SISC 32 中文版 3.1, 列印層析圖使用 SISC 中文版 1.0)。層析管柱包含保護管柱 (3cm, 5 μ m) 及分析管柱 (30cm, 5 μ m, Mightysil RP-18GP, KANTO HEMICAL)。使用 25 μ L 平頭注射針 (RAT.NO.2933087, USA)。

2. 雙光束 UV-Visble spectrophotometer(CARY Win UV)。

3. 超音波振盪器, BRANSONIC 42。

(二) 藥品與試劑

1. Chlorogenic acid (綠原酸): $C_{16}H_{18}O_9$, MW=354.31, 廠牌為 ACROS。

2. Caffeic acid (3,4-Dihydroxycinnamic acid, predominantly trans isomer 99+%, 咖啡酸): $C_9H_8O_4$, MW=180.16, 廠牌為 ACROS。

3. Ellagic acid (鞣花酸): $C_{14}H_6O_8$, MW=302.20, 廠牌為 TCI。

4. Ferulic acid (3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid, 阿魏酸): $C_{10}H_{10}O_4$, MW=194.19, 廠牌為 ACROS。

5. 模擬樣品原料：CD pol；Finsol TN 1；Cetyl dinethine；CCT；
Cyclomethicone；Germahen II；1,3butyl glcoh；MAP；NaCl；Arlatone
2121；Cetyl alcohol；Steanine acid；Collagen；Glycenin；Liponate EG-7；
Rhodicare T；HEC；G115；Tween 20；PG。

6. Acetonitrile：CH₃CN，MW=41。

7. Methyl Alcohol(Methanol，甲醇)：CH₃OH，MW=32.04，

8. Water (純水)：H₂O，MW 18.02。

9. Phosphoric acid 85% (磷酸)：H₃PO₄，MW 98.00，HPLC Grade。

(三) 藥品及試劑之配製

Chlorogenic acid、Caffeic acid、Ellagic acid and Ferulic acid 對
Methanol 皆有好的溶解度，唯 Ellagic acid 在較高濃度(約 1000ppm)
需經振盪後才會溶解，故選擇 Methanol 當作四種分析物之溶劑。

1. HPLC-UV/Vis 部分：

(1) 1000 ppm Ch、Ca、EA 和 FA 標準溶液：

精秤 0.0100 g 標準品，分別以 MeOH 定量至 10mL，經超音波振盪器
加速溶解，將配製好的溶液裝入棕色瓶子保存，並以鋁箔紙包覆瓶
子，Ch 必須保存於 4°C 以下。

(2) 1000 ppm Ch+Ca+EA+FA 混合溶液：

精秤 0.0100 g 標準品(裝入同一定量瓶)，以 MeOH 定量至 10mL，

經超音波振盪器加速溶解，將配製好的溶液裝入棕色瓶子保存，並以鋁箔紙包覆瓶子。

(3) 100 ppmCh、Ca、EA、FA 標準溶液和 100 ppm Ch+Ca+EA+FA 混合溶液：取 1000 ppm 標準溶液（或 1000 ppm Ch+Ca+EA+FA 混合溶液）1mL，以 MeOH 稀釋定量至 10mL。其他濃度溶液亦是以 MeOH 為溶劑稀釋定量。

(4) 沖提液：

主要成分為 Acetonitrile、MeOH and H₂O，以 85% H₃PO₄ 調整酸性。

沖提液之條件比例為：Acetonitrile:MeOH:H₂O=1.9:1:97.1，pH=2.5

時為最佳。

四. 結果與討論

1. 各酚類化合物之 UV 最大吸收波長：

表 1 圖譜掃描各分析物最大吸收波長：

分析物	最大吸收波長 (nm)
Chlorogenic acid	329
Caffeic acid	322
Ellagic acid	255
Ferulic acid	317

四種分析物需同時測定，發現在波長 255nm 及 320nm 下分析物之吸收度仍不錯，故選擇此波長當作偵測條件。

2. 波長不同之 HPLC 分析圖譜的影響:

以波長 255nm 及 320nm 測定分析物，測試在這兩種不同的波長下分析物吸收峰的變化如圖 1 及 2。

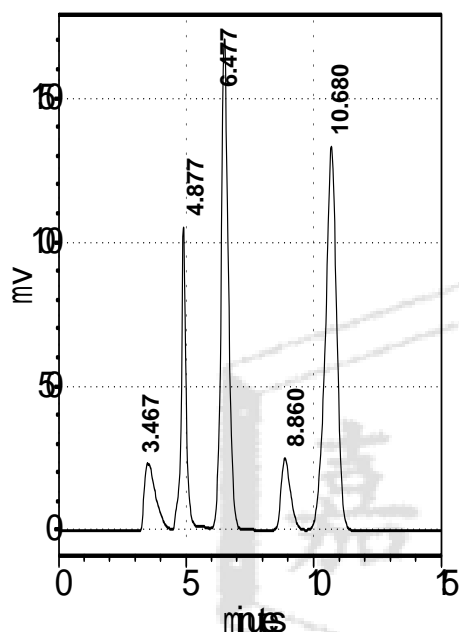


圖 1

320nm.0.8mL/s.
100ppmCh、Ca、EA 和 FA.
Acetonitrile19%+MeOH10%(pH:2.5).

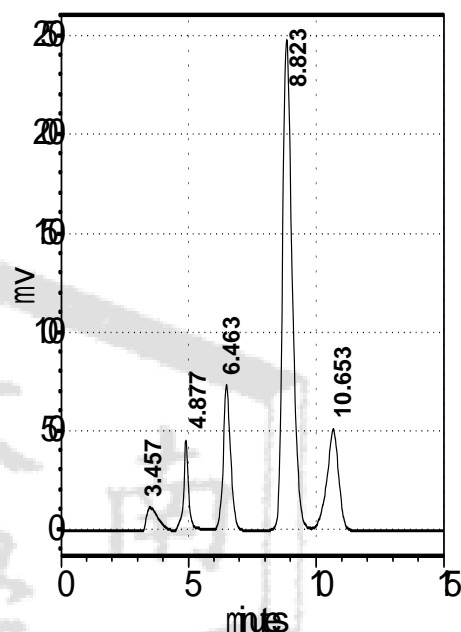


圖 2

255nm.0.8mL/s.
100ppmCh、Ca、EA 和 FA.
Acetonitrile19%+MeOH10%(pH:2.5).

波長的改變不會影響分析物的分離度，但會有不同的吸收峰面積及吸收峰高度，在波長為 320nm 下 Ch (4.877 分鐘)、Ca (6.477 分鐘) 和 FA (10.680 分鐘) 有較大的吸收峰，而在 255nm 下則是 EA (8.823 分鐘) 有較大之吸收峰，與分析物的 UV/Vis 圖譜比較可發現 Ch、Ca 和 FA 在波長 320nm 有較好的吸收而 EA 是在波長 255nm 下有較好的吸收，故得此結果。

3. 移動相的成分選擇及 pH 值的影響:

找尋一適當的沖提液使四種分析物能在最短的時間內完整的分離出來。而 pH 值及移動相成份組成是影響分離效率最重的因素，不適當 pH 值及移動相成份組成得到非常不好的分離如圖 3 及 4 所示。

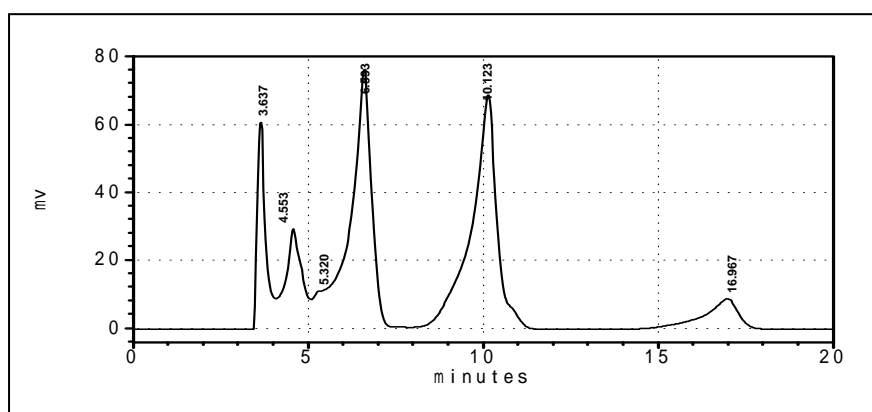


圖 3
MeOH/H₂O=40
/60.320nm.0.8
mL/min.100pp
mCh、Ca、EA
和 FA.

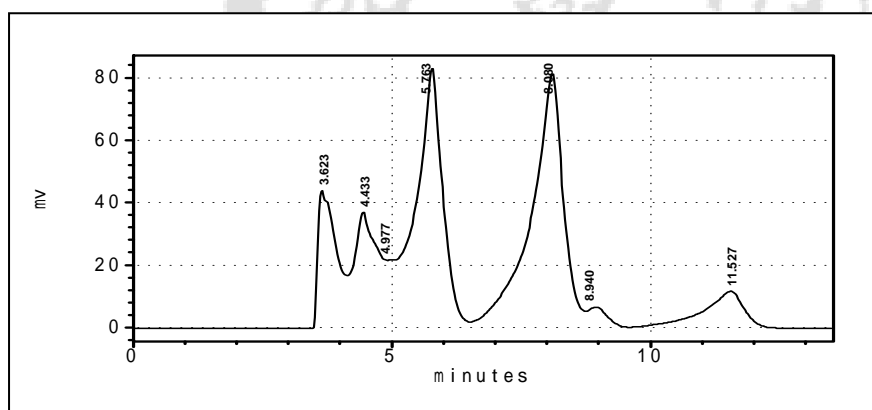


圖 4
MeOH/H₂O=45
/55.320nm.0.8
mL/min.100pp
m Ch、Ca、EA
和 FA.

沖提液成分為 MeOH/H₂O，pH~3 的條件下仍無好的分離，因此，我們添加 Acetonitrile 及降低 pH 值希望能分析物的分離度產生幫助，結果如圖 5 所示，

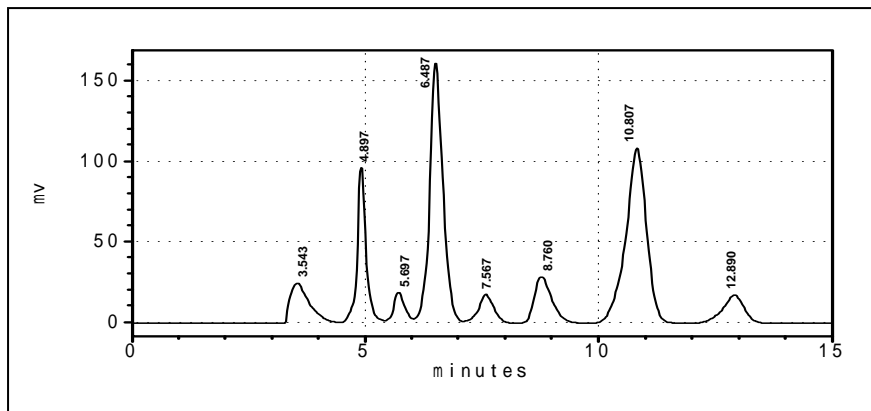


圖 5
Acetonitrile19
%+MeOH10
%+H₂O.pH=2
.5.320nm.0.8
mL/min.100p
pm Ch、Ca、
EA 和 FA.

發現在沖提液比例 Acetonitrile19%+MeOH10%+ H₂O.pH=2.5 的條件下，能在最短的分析時間內使四種分析物完全分離。因分析物種為有機物質，故須選擇有機溶劑為其沖提液成分可幫助分析物的溶解使其易與靜相分離，且須選擇較高極性之溶劑才不會與靜相產生反應。經實驗發現：高極性的有機溶劑 Acetonitrile 及 MeOH，在酸性條件下 (pH2.5)，能使四種分析物的滯留時間 (波寬) 在一分鐘左右，分離度皆在 2 以上，且四種分析物皆能在 11 分鐘以內，為一好的沖提液條件。

4.再現性:

同一天連續打入十次分析物，求其面積及高度之 RSD% 值。RSD% 必須小於 3% 才可論定為好的再現性，經過分析，四種分析物其吸收峰面積及高度之 RSD% 值都在 3% 以下，有良好的再現性，證明 HPLC-UV/Vis 方法可適用於測定此四種分析物。

5.各酚類化合物之穩定性測定：

從前幾個實驗層析圖中我們發現圖中除了分析物吸收峰之外還出現光解副產物的吸收峰，因此，我們將穩定性分為兩部分來探討：在光照下及無光照環境下，測試在這兩種不同環境下分析物有何變化及其穩定性之 RSD%，代表性列出 CA 之數據結果如表 8。

表 2 Chlorogenic 穩定性 光照下:

分析物		Chlorogenic acid(100ppm)				
波長(nm)		320				
項目	滯留時間 (min)	面積 (uv*sec)	面積比	高度	高度比	
時間	New	4.830	1576865	0	95.3712	0
	1hr	4.820	1473073	41.68	91.4743	54.42
		5.507	35346		1.6810	
	2hr	4.817	1421537	59.69	94.4336	78.04
		5.530	23814		1.2101	
	3hr	4.803	1498206	28.69	96.7208	41.69
		5.497	52218		2.3199	
	1day	4.770	1513533	19.81	100.3261	27.80
		5.460	76390		3.6088	
	2day	4.787	1479408	16.88	97.0417	24.75
		5.497	87645		3.9206	
	5day	4.813	1419452	12.56	95.6295	17.55
		5.523	113095		5.4495	
	7day	4.800	1448785	10.72	96.3580	14.90
5.520		135201	6.4656			
9day	4.837	1410965	8.71	94.3626	11.53	
	5.567	162075		8.1746		
12day	4.877	1414378	8.46	94.3573	10.93	
	5.633	167259		8.6302		
13day	4.933	1386239	8.09	87.8478	10.36	
	5.717	171346		8.4773		
21day	4.793	1329838	6.60	84.7151	7.21	

		5.477	201524		11.7471	
	28day	4.910	1204067	5.66	82.4192	6.24
		5.730	212673		12.0582	

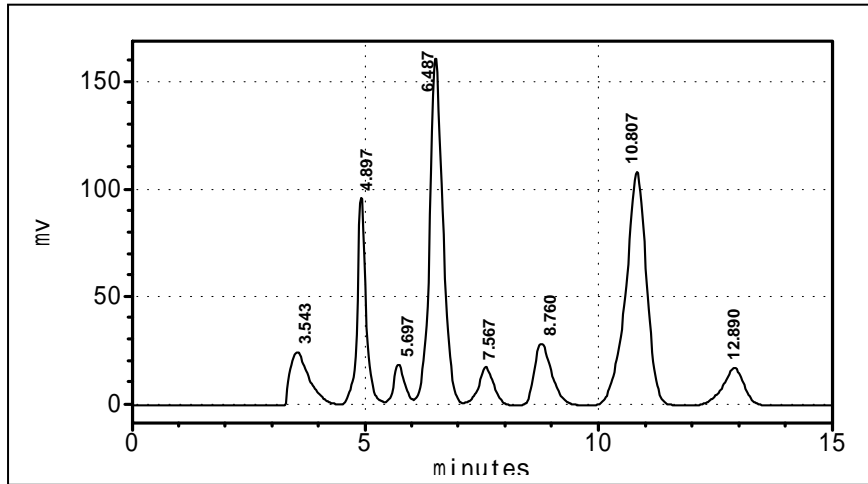


圖 6
光照下
320nm
0.8mL/min
100ppm Ch、
Ca、EA 和 FA.
Acetonitrile19
%+MeOH10%(
pH2.5)

*Ch : 4.837、5.697, Ca : 6.487、7.567,

EA : 8.760, Fe : 10.807、12.890

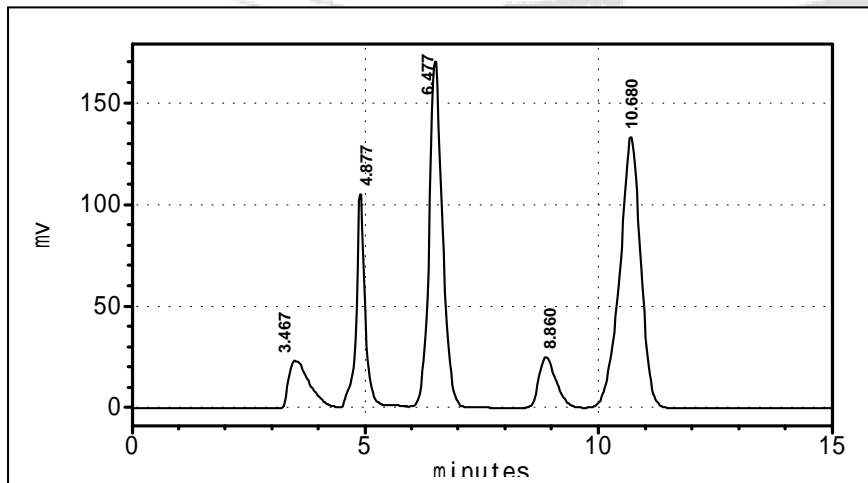


圖 7
無光照下
320nm.
0.8mL/min
100ppm Ch、
Ca、EA 和 FA.
Acetonitrile19
%+MeOH10%(
pH2.5).

在光照下我們發現：因日光催化分解，所以隨著時間的增加 Ch、Ca 和 FA^[19] 會有越來越大的另一個分解物吸收峰出現，兩吸收峰的大小比例（分析物/分析物之分解物）亦會隨著時間的增加而越來越趨近 1，而 EA 就不會有分解物的產生，RSD%也在 3%以下；在無光照的

條件下則四種分析物皆不會出現分解物，且 RSD% 也都在 3% 以下。

所以，在每次配完藥之後都必須把藥品保存在棕色樣品瓶內，並擺放

在無光照的環境下，避免氧化物生成以確保其穩定性。

6. 檢量線:

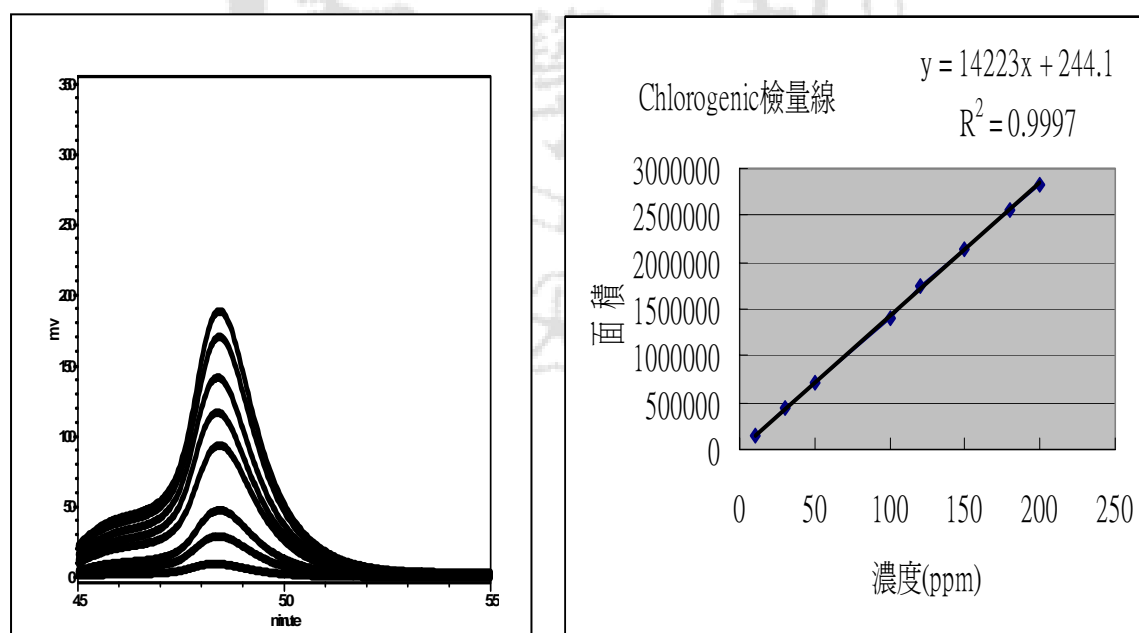
配製不同濃度之分析物標準溶液，測得這些分析物標準溶液的吸收

度，做一檢量線，看看是否成線性關係 (R 值)，並可在往後測定未

知濃度之樣品時使用，代表性列出 CA 之數據結果如下。

(1) Chlorogenic 10-200ppm 檢量線.

Acetonitrie19%+MeOH10%+H₂O(pH2.5).320nm.0.8mL/min.



7. 最佳萃取方式及回覆率:

進行四種分析物添加於模擬樣品中萃取率的探討，因模擬樣品的

成分是已知的，因而可以避免掉一些背景值的影響，故先就分析物在

模擬樣品中作萃取回覆率的探討，在將所討論出較佳的萃取液應用於

實驗結果發現分析物含量 1% 的樣品回覆率幾乎都是不好的，所以決定將樣品濃度提高至 5%，並發現 5% 樣品溶液在 10mL MeOH 下有不錯的再現性，但回覆率（分析物回覆率/blank 回覆率）約為 80% 左右，仍不算是好的回覆率（100+3%），因此必須再找尋其他溶劑萃取樣品或其他種萃取方法（ex：索式萃取法）以提高回覆率。

五、結論

本專題研究利用 HPLC 分離四種分析物—Chlorogenic、Caffeic、Ellagic 和 Ferulic。利用 UV/Vis 光譜儀掃描四種分析物之圖譜，測得四種分析物最大吸收波長為 255nm 及 320nm；HPLC-UV/Vis 移動相（沖提液）條件為：Acetonitrile 19%+MeOH 10%+ H₂O, pH=2.5，流速為：0.8mL/min 進行分析。在波長為 320nm 下，Ch 滯留時間為 4.877 分鐘，Ca 滯留時間為 6.477 分鐘，FA 滯留時間為 10.680 分鐘時有較大的吸收峰；而在 255nm 下，則是 EA 滯留時間為 8.823 分鐘時有較大之吸收峰。以此方法所得之分析物檢量線線性關係 r 值在 0.999 以上，再現性及穩定性之 RSD% 在 3% 以下，分離度在 2 以上，並利用 Methanol 萃取模擬樣品、實際樣品中的分析物，但回覆率並不理想，因此 Methanol 不適用於萃取實際樣品。另外，在安定性方面，EA 成份無論有無照光均不會發生分解，但其他三個酚性成份只在沒有照光

下才不會分解，因此是比較不安定的。

六、參考文獻

1. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Aug 16
2. Determination of antioxidants in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A.* 2005 May 13;1074(1-2):201-4.
3. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries - *J Appl Microbiol,* Vol 90, Issue 4, pp_ 494-507
4. 簡明 有機化學 編譯：方偉平、陳深池、顏重河 新竹黎明書店經銷
5. Ellagic acid-active pharmaceutical ingredient Shanghai Chunyuan Phytochemistry Co., Ltd Ellagic acidManufacturers-B2B Marketing-Taiwan,China,Global
6. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans -- Olthof et al_ 131 (1) 66 -- *Journal of Nutrition*
7. *Int J Cosmet Sci,* Vol 23, Issue 1, pp_ 35-48 Phenolic acid amides of phenolic benzylamines against UVA-induced oxidative stress in skin P
8. *Int J Cosmet Sci,* Vol 22, Issue 4, pp_ 291-303 In vitro and in vivo evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition
9. 行政院衛生署,含藥化妝品基準 (93.03.02)
10. Determination of active ingredients of *Ilex Purpurea Hassk* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Sep 12
11. Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2005 Aug 10;53(16):6484-90.
12. Development of a proxy for past surface UV-B irradiation: a thermally assisted hydrolysis and methylation py-GC/MS method for the analysis of pollen and spores. *Anal Chem.* 2005 Sep 15;77(18):6026-31.
13. A rapid densitometric method for simultaneous quantification of gallic acid and ellagic acid in herbal raw materials using HPTLC. *J Sep Sci.* 2005 Apr;28(6):581-4.
14. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatogr A.* 2000 Oct 27;896(1-2):87-93

15. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. J Pharm Biomed Anal. 2005 Aug 16
16. 化學化工大辭典 編譯者：黃天守 大學圖書出版社印行
17. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid - J Appl Microbiol, Vol 90, Issue 6, pp_ 873-881
18. SKOOG 第五版 儀器分析(下冊) 審譯：林敬二 美亞書版股份有限公司
19. (一) 反-阿魏酸及反-阿魏酸甲酯之光氧化 (二) 夫喃衍生物之光氧化.
中國文化大學 應用化學研究所 研究生：郭寶珠 指導教授：郭悅雄



