

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

牡丹皮在化粧品的應用

90-CS-01

執行期間：民國 90 年 01 月 01 日至 90 年 12 月 31 日

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

主持人：陳榮秀

總計畫主持人：

共同主持：林清宮 郭俊成

子計畫主持人：

協同研究：

協同研究：

中華民國 91 年 2 月 27 日

摘要

在本研究中我們以牡丹皮萃取液進行細胞毒性的檢測法建立一套皮膚刺激性，眼粘膜刺激性及光毒性的測試模式，並把目前各種化妝品有毒性，無毒性的建立數據庫，以利新化妝品安全性的檢測判定。

在過去化妝品安全評估主要以動物測試為主,在目前研究中已知用細胞毒性測試可有效:更快速的檢測化妝品毒性，方法中與皮膚刺激測試 (draize test) 有高度相關性的有用 fibroblast 纖維母細胞以 Neutral Red uptake, Alamar blue, MTT, LDH release, L-6 release 等方法去測細胞毒性。這些方法與動物試驗都有高度一致性，其中用 Neutral Red uptake (LC₅₀) 檢測結果與人類 patch test 有高度相關性。另外眼毒性測試也有數種方法可以取代如 SIRC 細胞用 Neutral Red 測，而另一種方法以 epithelial-fibroblast 用 MTT 去測，或 fibroblast 以 Predicate kit(Neutral Red)去測。光毒性測試中可用 Skin 2 Cell 用 MTT 測。藉由這些以建立細胞毒性的測試法，。在本研究中我們選用 fibroblast 纖維母細胞 (L929)，用 MTT, Neutral Red, 二種方法去檢測牡丹皮萃取物的細胞毒性。

介紹

在傳統化妝品安全性檢測上主要以動物及人體測試為主，然而

由於安全性評估過程所耗費的動物數目太多，在目前世界趨勢上，要以細胞層次來取代動物試驗(Amouroux 等，1999.Curren 等,1997 . Meloni 等,1995. Rivalland 等,1994.)。在本研究中我們建立化妝品細胞毒性測試以取代數項傳統動物測試項目，以期用細胞毒性法搭配傳統方法以建立一套完善快速的化妝品安全性檢測模式。目前國內化妝品衛生管理條例暨有關法規，所定化妝品安全性，是以已知一成份和含量去訂定安全標準並沒有檢驗方法，但此法之缺失如化妝品含數種成份，每種劑量依目前法規皆在安全值內，但其混合是否安全，則不得而知。所以有須要建立一套完善的化妝品安全性檢測模式，只需將化妝品直接用生物檢測即知。如有新成份則更須有檢測方法方可知其是否安全。

在目前研究中已知幾種細胞毒性測試可有效，快速的檢測化妝品毒性，方法中與動物皮膚刺激測試 (draize test) 有高度相關性的有用 fibroblast 纖維母細胞當測試細胞與化妝品混合培養後以 Neutral Red uptake (Lee 等，2000) ,Alamar blue (Lee 等，2000) , MTT (Shin 等，1996) , LDH release (Shin 等，1996) ,L-6 release (Angustin 等，1995) 等方法去檢測細胞毒性。結果顯示這些方法與動物試驗都有高度一致性，其中用 Neutral Red uptake (IC 50) 檢測結果與人類 patch test 有高

度相關性 $r=0.867$ (Lee 等, 2000)。另外兔子眼毒性測試也有數種細胞方法可以取代如 SIRC 細胞用 Neutral Red 測 (Vain 等, 1995), 而另一種方法以 epithelial-fibroblast 用 MTT (Osborne 等, 1995) 去測, 或 fibroblast 以 Predicate kit(Neutral Red)去測 (Garboard 等, 1994) 結果與用動物測試結果有一致性。光毒性測試中可用 Skin 2 Cell 用 MTT (Edwards 等, 1994) 測。在本研究中我們選用 fibroblast 纖維母細胞 (L929), 用 MTT, Neutral Red, 二種方法去檢測牡丹皮萃取物的細胞毒性。

實驗方法

一、細胞的製備

體外(IN VITRO)實驗

根據 Didier (1999)的方法, 使用 fibroblast 細胞株 L929, 培養在 10% fetal calf serum 的 DMEM. 每 3 天 subculture 處理.

二、細胞毒性測試

MTT 方法: 參考 Vianl 等人 (1995) 的方法, 利用活細胞 dehydrogenase 可將黃色的 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 還原成藍紫色的 formazan 的能力來測量細胞存活率。細胞經樣品處理後吸去上清液, 每個 well 加入 $90 \mu\text{l}$ 培養液及 $10 \mu\text{l}$ MTT(5mg/ml in PBS), 反應 1 小

時後，吸去上清液，加 150 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO) 到每個 well，劇烈振盪使 formazan 溶解，15 分鐘後，以 ELISA reader 在波長 570 nm 測量吸光值，計算 LC₅₀。

Neutral red 方法：參考 Vian 等人(1995)的方法活細胞可經由胞飲方式吸收 Neutral red 染料，方法為細胞經處理後種入 96 孔盤中(2500 cells/well)，培養三天後，更換 250 μ l 培養液(含待測樣品)。經 48 小時後吸去上清液，加入 250 μ l 含 neutral red (50 u/ml)培養液，3 小時後加入 250 μ l 固定液(1%甲醛，1%氯化鈣)，固定 2 分鐘後加入 100 μ l 溶液(1%glacial acetic acid, 50% ethanol)，20 分鐘後，以 ELISA reader 在波長 540 nm 測量吸光值，計算 NRU₅₀。

三、中藥牡丹皮分離與純化

研究材料係自臺北市乾元藥行購買牡丹皮(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 之根皮 45.0 公斤，將牡丹皮之根皮磨成粉末以利於乙醇進行抽提，用乙醇浸泡連續抽取數次，所得之抽取液經減壓濃縮後(6.8 公斤)，用 *n*-Hexane 和 95% MeOH (5% H₂O)進行分配萃取(1:1)，收集 *n*-Hexane 層經減壓濃縮得到 1.61 公斤，取 95% MeOH 層經減壓濃縮後(5.09 公斤)，再用 EtOAc 和 H₂O 進行分配萃取(1:1)，收集 EtOAc 層經減壓濃縮得到 0.178 公斤。其 H₂O 層再和 *n*-BuOH 進行分配萃取(1:1)，收集 *n*-BuOH 層經減壓濃縮得到 0.89 公斤。

將不同的萃取層再進行吸附性之矽膠管柱層析法(Silica gel, 70~230 mesh 或 230~400 mesh, Merck), 如為矽膠層析法進行分離, 則以不同比率增加極性溶媒來進行沖提, 如此反覆進行得到化合物 Paeonol (1, 810 g)及 Resacetophenone (3, 11 mg)。以上之矽膠層析沒辦法處理則再用分配性之逆相層析進行分離工作, 以製備式低壓碳-8 逆相層析法進行純化, 並利用碳-8 逆相薄層析用玻璃片(碳-8 TLC)檢測純化程度, 經確認碳-8 TLC 片上只剩一或二個點, 再以製備式高效液相層析法以製備式苯基型管柱進行純化分離, 如此反覆純化分離顯示在記錄儀上只有單一波峰為止, 再將純的收集液濃縮乾得到化合物 Benzoylpaconiflorin (4, 20.7 g)、Benzoyloxyaconiflorin (5, 6.6 g)、Paeoniflorin (6, 101.1 g)、Oxyaconiflorin (7, 61.2 g)及 Gallic acid (8, 385 mg)。其純化過程如所示。另外化合物 Acetovanilone (2)及 Resacetophenone (3)購買於 Aldrich Chemical Co.。

PST : EtOH extract ,PSH : *n*-Hexane layer ,PSE : EtOAc layer, PSB : *n*-BuOH layer,PSW : H₂O,PSC-K1 : Paeonol, PSC-K2 : Acetovanilone, PSC-K3 : Resacetophenone, PSB-K1 : Paeoniflorin, ,PSB-K2 : Oxyaconiflorin, PSB-K3 : Benzoylpaconiflorin , PSB-K4 : Benzoyloxyaconiflorin, PSB-K5 : Gallic Acid

結果

在圖一 A 中我們以 MTT 方法去測試 DMSO 毒性可見在大於 2.5% 時會造成吸光值明顯下降 ($p < 0.001$) 而圖一 B 中我們以 Neutral Red 方法去測試 DMSO 毒性可見在 1.25% 時已會造成吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。可見 Neutral Red 方法去測試 DMSO 毒性較敏感。我們同樣以 MTT, Neutral Red 方法去測試牡丹皮毒性。在表一以 MTT 方法去測試 PSH, 在濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSE 在濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSB 在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSW, LLT 在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值仍無明顯下降。在表二以 Neutral Red 方法去測試 PSH, 在濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSE 在濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。LLT 在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSW, PSB 在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值仍無明顯下降。在表三以 Neutral Red 方法去測試 PSC-K6, 在濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSC-K1, PSC-K3 在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值仍無明顯下降。在表四以 Neutral Red 方法去測試 PSB-K5, 在濃度 $80 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSB-K6, 在濃度 $200 \mu\text{g/ml}$ 吸光值明顯下降 ($p < 0.001$)。PSB-K1, PSB-K2, PSB-K3, PSB-K4 在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值仍無明顯下降。

討論

在圖一中我們以 MTT 方法, Neutral Red 方法去測試 DMSO 毒性。結果顯示 Neutral Red 方法可以在較低濃度的 DMSO 檢測出毒性。另外由表一, 表二中可見 Neutral Red 方法可使有毒性物質出現吸光值大幅下降, PSH, PSE 尤其是 LLT 粗萃取物裡包含有毒物質, 結果是以 Neutral Red 方法可檢測出其毒性, 而 MTT 方法在濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ 吸光值仍無毒性出現。牡丹萃取物經由本研究 MTT, Neutral Red 方法一致顯示 PSH, PSE, LLT 在在濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ 已出現毒性, 不過此毒性濃度以超過臨床使用濃度。另外 PSB, PSW 較無毒性。在表四中可見 PSB 之純化物質 PSB-K5, PSB-K6, 以 Neutral Red 方法可檢測出毒性不過此毒性濃度以超過臨床使用濃度甚多。PSB-K1, PSB-K2, PSB-K3, PSB-K4 毒性甚低。在表三中可見 PSC 之純化物質 PSC-K1, PSC-K3 毒性甚低。PSC-K6, 以 Neutral Red 方法可檢測出毒性且毒性是在濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 即出現。這在臨床上使用要注意使用濃。由上面討論我們知道牡丹皮毒性甚低可應用於化妝品使用上。

在目前研究中已知用細胞毒性測試可有效, 更快速的檢測化妝品毒性 (Benassi 等, 1999. Zhao 等, 1999. Beer 等, 1994. Gautheron

等，1992 .Alkofahi 等，1989. Bracher 等，1987.)，方法中與皮膚刺激測試(draize test)有高度相關性的有用 fibroblast 纖維母細胞以 Neutral Red uptake (Lee 等，2000) ,Alamar blue (Lee 等，2000)，MTT (Shin 等，1996)，LDH release (Shin 等，1996) ,L-6 release (Augustin 等，1995) 等方法去測細胞毒性。在本研究中我們選用 fibroblast 纖維母細胞 L929，用 MTT, Neutral Red 方法去建立皮膚刺激性，眼毒性，及光毒性的細胞檢測模式。以各種細胞毒性的檢測法建立一套皮膚刺激性，眼粘膜刺激性及光毒性的測試模式，並把目前各種化妝品有毒性，無毒性的建立數據庫，以利新化妝品安全性的檢測判定。

參考文獻

- Alkofahi AS. Abdelaziz AA. Mahmoud II. Cytotoxicity and mutagenicity of 'Al-Kohl', an eye cosmetic commonly used in Jordan. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*. 14(6):443-50, 1989
- Augustin C and Damour O. Pharmacotoxicological applications of an equivalent dermis: three measurements of cytotoxicity. *Cell Biology & Toxicology*. 11:167-171,1995
- Beer JZ. Olvey KM. Lee W. Zmudzka BZ. Reassessment of the differential effects of ultraviolet and ionizing radiation on HIV promoter: the use of cell survival as the basis for comparisons. *Photochemistry & Photobiology*. 59(6):643-9, 1994
- Benassi L. Bertazzoni G. Seidenari S. In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human

volunteers. *Contact Dermatitis*. 40(1):38-44, 1999

Bracher M. Faller C. Spengler J. Reinhardt CA. Comparison of in vitro cell toxicity with in vivo eye irritation. *Molecular Toxicology*. 1(4):561-70, 1987-88

Curren RD. Sina JF. Feder P. Kruszewski FH. Osborne R. Regnier JF. IRAG working group 5. Other assays. Interagency Regulatory Alternatives Group. *Food & Chemical Toxicology*. 35(1):127-58, 1997

Draize J H. Dermal toxicity. In: appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. Ed. Editorial Committee of the Association of Food and Drug Official of the United States, P.O. Box 3425, York, Penn. 17402. 1959.

Edwards S. M., Dounlly T. A., Savre R. M. and Liebseh M. Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, skin2.

Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine. 10:111-117, 1994.

Gautheron P. Dukic M. Alix D. Sina JF. Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy. *Fundamental & Applied Toxicology*. 18(3):442-9, 1992

Guyomard C. Bouffechoux J. and Chesne C. Evaluation of predisafe, a cell kit for predicting eye irritancy of cosmetic raw materials and formulations. *Cell Biology & Toxicology*. 10:375-379, 1994.

Hood D L. Practical and theoretical considerations in evaluating dermal safety. In: *Cutaneous Toxicity*, 15-30 Eds. V.A. Drill and P. Lazar. New York.

Lee J. k., Kim D. B., Kim J. I. and Kim P. Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxic in Vitro*. 14:345-349, 2000.

Magnusson. Allergic contact dermatitis in the guinea pig, identification of

contact allergens, Charles C Thomas Publisher. 1970.

Meloni M. Lavazza M. Fischi W. Zava S. Dolfini E. In vitro efficacy evaluation of cosmetic products: a pool of tests on cultured cells. *Bollettino Chimico Farmaceutico*. 134(9):509-17, 1995

Osborne R. Perkins M. A. and Roberts D. A. Development and intralaboratory evaluation of an in vitro human cell-based test to aid ocular irritancy assessments. *Fundamental & Applied Toxicology*. 28:139-153,1995.

Shin D. S., Kim D. B., Ryu S. R. and Kim P. Y. In vitro alternatives to skin-irritation tests *Cosmetics & Toiletries*. 111:361, 1996.

Vian L., Vincent J., Maurin J. and Cano J. P. Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. *Toxic. in Citro*. 9:185-190,1995.

Zhao JF. Zhang YJ. Kubilus J. Jin XH. Santella RM. Athar M. Wang ZY. Bickers DR. Reconstituted 3-dimensional human skin as a novel in vitro model for studies of carcinogenesis. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 254(1):49-53, 1999

張麗卿, 現代化妝品概論, 高立出版:1996。

劉宗榮, 基礎毒理學, 藝軒圖書出版社:1998。