

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 新防曬係數的應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2626-B-041-005-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：張慧柔

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
期中進度報告

## 新 防 曬 係 數 的 應 用

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC 91 - 2626 - B - 041 - 005 -

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：張慧柔

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告       完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢  
涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查  
詢

執行單位：嘉南藥理科技大學 化粧品應用與管理系

中 華 民 國 92 年 10 月 25 日

## 一、中文摘要

紫外線長期之照射會對皮膚有相當嚴重的傷害，在紫外線的三個波段(UVA, UVB, UVC)中，又以 UVB 的影響最為嚴重。為了避免紫外線的傷害，一般人都是以撐傘或戴帽子來防止，除了這兩種方法外，使用防曬劑來避免紫外線的照射是最好的方法了。目前市面上所販賣的防曬化粧品相當多，有的有標示防曬係數(SPF)，有的則沒有標示，並且都標榜其有實際的防曬功能。防曬化粧品是一種保護性的化粧品，絕對不同於一般的化粧品，所以如何來判定防曬化粧品的防曬功能就顯的相當的重要。對於防曬化粧品隔絕紫外線效果的評估方法中，目前在國內、外都是以防曬係數(SPF) 做為一個評估的準則，由於要排除以人做為測試對象的危險性，所以目前防曬係數的評估方法相當混亂，因此，為了重新評估防曬產品的防曬保護能力，在去年的研究，我們制定了一套探測防曬產品的防曬效果的方法，有別於 SPF 只做皮膚表面紅斑點的觀察。角質細胞被証實含有 NO-synthase，並且會產生 NO；UVB 照射人類皮膚，會刺激角質細胞的 NO-synthase 的作用，造成 NO 的產生，於是引起紅斑的產生和發炎反應。因此，我們直接經由評估角質細胞的 NO-synthase 的作用及 NO 的產生，是更直接評估皮膚受傷害的情形的方式。所以，經過去年的研究，我們已經研發出新防曬級數( sun protection grade; SPG)的判定。本研究目的，以新防曬級數的應用性，測試市售防曬產品的防曬功能，並重新製定防曬產品的防曬級數。

**關鍵詞：**紫外線，防曬化粧品， NO， NO-synthase

### Abstract

Chronic UV irradiation profoundly damages the skin of human and animal. These alterations were thought to be irreversible. UVB radiation (280-315 nm) can cause

erythema, skin cancer, and dermal connective tissue damage. For protecting the skin against sun exposure, it is necessary for everyone to use sunscreens. Hence, the ability of sunscreen to protect ultraviolet damage to the skin is very important for consumers. At present, the assessment of sun protection factor (SPF) is very confused. For assessing the ability of sunscreen to protect ultraviolet damage to the skin, we set up a new model of SPF last year. The keratinocytes contain NO-synthase and produce NO. UVB irradiated human skin to stimulate the response of NO-synthase and the production NO in keratinocytes. Consequently, the erythema and inflammation was occurred. For this reason, the production of NO and the action of NO-synthase in keratinocytes was estimated, it is a more direct way to assess the condition of damaged skin. The purpose of study is to use a new model of SPF (sun protection grade; SPG) to anew estimate the function of sunscreens and to formulate a new index to assess the function of sun protection of sunscreens.

**Keywords:** UVB, NO, NO-synthase, SPF

## 二、緣由與目的

陽光是一種含有多種波長電磁波的輻射線，包含有紫外線、可見光和紅外線，其中以紫外線對人體具有明顯的傷害。目前針對紫外線對人體作用的波段範圍分為 UVA (320 400 nm)，UVB (280 320 nm) 及 UVC (190 280 nm)，其中波長最短的 UVC，到達太空的大氣層就吸收掉，因此大部分都不能到達地面，中波長波段的 UVB 是最容易對生物造成傷害的紫外線，而波長最長的 UVA，雖到達地面的量最多，且會透過到達人體組織深部，但其毒性卻比 UVB 來得少。

由於 UVB 波段射程可深及皮膚，而且被壞能量大，因此防止 UVB 曬傷的產品早就在市面上廣為使用。為了使防曬產品真正對皮膚產生保護的效果，在早期，歐美

的研究人員針對防曬產品的防曬效果的評估，設定了一套評估方法，即 SPF (Sun protection factor; 防曬係數)的製定。SPF 製定原理，是以皮膚受 UVB 照射後造成皮膚產生紅斑點的 UVB 劑量來評估，方法原理很簡單，但是樣本(人)的取樣就有相當的困難度，因此就有一些非生物活細胞的測定方式(稀釋穿透率法；石英板薄膜法；剝離表皮穿透及 Solatex 法)，用來評估防曬產品的防曬效果，這些完全不是在活細胞上進行的方法，其對防曬化粧品防曬的效果評估，更是令人置疑。另外一種在活體上測試的天竺鼠法，是目前最接近防曬係數 SPF 之測定方法，但因天竺鼠必需經過剔毛，而且不易判斷紅斑點的出現，對於動物危害的避免，天竺鼠法也不是一個評估防曬產品防曬效果的好方法。目前雖然防曬產品之防曬效果的測定方法有好幾種，但是沒有一種能夠真正解釋及判定防曬產品對皮膚保護性的真正能力，因此，在去年的研究，我們利用生物技術方式，研製一套新防曬級數的判定法，希望能夠取代先前混亂的防曬評估方式。

NO (nitric oxide) 目前被研究指出是一種自由基也是一種訊號分子，它有許多重要的生理功能，包括調節局部血流，當一個神經傳遞物質(neurotransmitter)，抗微生物和抗腫瘤的活性 (Knowles and Moncada, 1994; Kroncke et al, 1995; Moncada et al., 1991)。

NO 的產生是經由 NO-synthase 對 arginine 的作用，但要經過需氧的反應(包括：NADPH, flavin mononucleotide, flavin adenine dinucleotide, calmodulin and tetrahydrobiopterin 的參與)。角質細胞被證實含有 NO-synthase 並且會產生 NO (Knowles and Moncada, 1994; Kroncke et al., 1995; ); 有研究更加指出，UVB 照射人類皮膚，會刺激角質細胞的 NO-synthase 的作用，於是造成紅斑的產生和發炎反應 (Deliconstantinos et al., 1996)。因此經由評估角質細胞的 NO-synthase 的作用及 NO 的產生，是更直接評估皮膚受傷害情形的方式。經過去年研究的進行，已初步的得到一個相當不錯的研究成果，我們針對角質細胞照射 UVB 的試驗，評估角質細胞的 NO-synthase 的作用及 NO 的產生，取得一

有規律的數值。因此本研究主要目的，利用新防曬級數( sun protection grade; SPG)的應用性，測試市售防曬產品的防曬功能並製定新的防曬級數。

### 三、研究方法和實驗設計

#### I、實驗設計

- I 傳統測定防曬係數方法(天竺鼠測定法)：
- 以天竺鼠做為比對的實驗對象：將市售註明有防曬係數(SPF)的防曬劑塗抹在天竺鼠身上，做 SPF 的測定(此法是最接近人類測定 SPF 的方法)。
- (1) 研究對象為天竺鼠(Hartley strain albino guinea pigs)，動物飼養在恆溫和恆濕之動物中心，以及研究進行之場所也在恆溫和恆濕下進行。將天竺鼠背部毛剔除，以除毛劑將剩餘之短毛去除，以清潔劑將此處清洗乾淨，以溫水沖洗，將背部擦乾及吹乾，16 小時後進行實驗。
  - (2) 16 小時後，將一已準備好之防曬布(挖了 4 個窗戶)綁在天竺鼠之背部，在天竺鼠之背部暴露出 4 個直徑為 2 公分的窗戶，準備塗上防曬劑用。

SPF(防曬係數)之定義：

$$\text{SPF} = \frac{\text{防曬劑塗抹部位的 MED}}{\text{未塗抹部位的 MED}}$$

MED (Minimal Erythema Dose)：誘發正常皮膚產生紅斑的最小 UVB 量。

UVB 劑量：是指每平方公尺 UVB 所照射之焦耳數( $\text{J}/\text{m}^2$ )，即以 UV detector (UVX digital radiomete, UVR-305/365-D detector, Tokyo Optical CO., LTD) 測得之數值 ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) 乘上所照射之時間 (秒)。

紅斑的計數(Erythema scoring): 皮膚經由紫外線照射後，產生了淡紅色有邊界之斑點。

在天竺鼠背部之直徑 2 公分的三個窗中，塗上三種不同待測之防曬劑(每一種防曬劑塗抹在不同之三隻天竺鼠之背部)，每一個窗塗上 2mg 不同之防曬劑，留下一個未塗任何物質之窗，15 分鐘後以 UVB(SVL, power 10W, France)照射，每次照射前以紫外線偵測儀(UVX digital radiomete, UVR-305/365-D detector, Tokyo Optical CO., LTD)檢測紫外線之強度。以 UVB 照

射動物，未塗任何物質之窗會首先出現紅斑點，記所使用之劑量，接著塗有防曬劑之窗，再陸續出現紅斑點，也都分別記下所使用之劑量。然後依照 SPF 之計算方式，算出每一種防曬劑之 SPF 值。每一種防曬劑至少測試三次(不同之三隻天竺鼠)，取其平均值。

## II、新研發的防曬係數之執行：

1. 培養人類角質細胞
2. 在人造薄膜上塗上防曬產品，置於培養的人類角質細胞上，照射不同的 UVB 劑量，在固定的時間內收集培養液測 NO，收集角質細胞測定 NO-synthase 蛋白質的量，及 NO-synthase 的基因表現。
3. 測得防曬產品的防曬級數。

## III、將兩種方法所測得之結果做比較分析

### II、研究方法

#### (一) 人類角質細胞之培養

正常皮膚得自臨床病人切割下來的包皮(與高雄醫學院合作)，並確定無皮膚感染性疾病或其他皮膚增生性疾病始得收集。把切下的包皮組織立即放入培養溶液並送至實驗室處理，首先在無菌操作下以磷酸緩衝液(PBS)清洗三次後，以消毒過的剪刀除去脂肪組織，將組織切成小塊(約  $5\text{ mm}^3$ )，再以 PBS 沖洗三次，之後浸泡在含有 0.25% trypsin 酵素的 PBS 中，然後靜置在 4 °C 冰箱內靜置隔夜。次日取出經酵素作用完成之小塊皮膚，以 PBS 溶液沖洗洗去酵素，再以消毒完全的鑷子將表皮層與真皮層分開，並且仔細地將細胞儘量刮下，置入裝有 PBS 的試管。以振盪器振盪五分鐘，小心地將角質細胞由角質層振下並將之打散，除去懸浮的大塊組織，經過離心(500g, 20 °C, 10min)後，集中細胞，倒去上清液，再加入 PBS，以 2ml 的吸管沖散後再離心，最後所得的細胞則加入 5 ml 的角質細胞培養液(KC-SFM medium)，其中添加有 25  $\mu\text{ l/ml}$  的牛腦下垂體萃取物(bovine pituitary extract, BPE)及 1-5ng/ml 的基因重組上皮細胞生長因子(recombinant

epidermal growth factor, rEGF)，將混合著培養液之細胞以吸管置入經過膠原蛋白(Collagen S)處理後的培養皿，置於 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中作第一代的培養。培養瓶中之培養液約 2-3 天更換一次，在倒立顯微鏡下觀察細胞之生長狀態及細胞密度，長滿培養瓶細胞即須進行繼代培養。

#### 繼代培養方法

將長滿培養皿的第一代角質細胞以 PBS 清洗三次後，加入 1ml 0.25% 的 trypsin，在 37 °C 下作用約 10 分鐘，當細胞自培養皿脫離時即加入 10 ml 的 PBS 稀釋酵素以便中止其對細胞的作用，而後將溶液放在 15 ml 離心管中以 400g, 20 °C 離心 10 分鐘，除去上層液後，加入適量培養細胞液，把  $1.0 \times 10^5$  個細胞接種在已塗覆 Collagen S 的培養皿完成繼代培養，置入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內，每隔三天更換培養液，待細胞長滿培養皿時依同樣方法分盤培養。

以第三代的角質細胞做高增殖作用和分化作用細胞培養。在做高增殖作用細胞培養皿中加入 0.05mM 鈣離子，在分化作用細胞培養皿中加入 1.2mM 鈣離子。培養細胞長到八分滿後做以下之實驗：

#### (二)、紫外線照射方法

將第三代培養的角質細胞以 PBS 清洗三次後再加入約 1 ml PBS 將細胞覆蓋，讓細胞在紫外線處理時不會乾燥。以中長波紫外線(UVB)照射培養角質細胞，所使用中長波紫外線照射燈之儀器為 1x15W—312 tube (SVL, power 30W, France)。每次照射前，先以手動式的偵測儀(UVX digital radiometer, UVR-305/365-D detector, Tokyo Optical CO., LTD)檢測紫外線之強度。(1 mW/cm<sup>2</sup> 於 15 cm 高度)。再以不同紫外線劑量照射，照射完後馬上吸去上清液並加入角質細胞培養液。

#### (三)、以 Colorimetric assay (XTT kit)方法

1. 將 actinomycin C1 (1  $\mu\text{ g/ml}$ )加入不同 UVB 劑量照射過後之角質細胞的培養皿內( $1 \times 10^6$  cells/ml)，在

- 培養箱內(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 放置 3 小時。
- 將角質細胞培養在 96 wells 的培養皿內(5×10<sup>4</sup> cells/well)加入 100 μl 的培養液 (含 actinomycin C1 1 μg/ml), 以不同劑量 UVB 照射後, 放置在培養箱內(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 24 小時。
  - 每一 well 加入 50 μl XTT, 然後放置在培養箱內(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 18 小時。
  - spectrophotometrical absorbance 測定
  - 在 2-8 °C 下, 離心 12,000×g, 15 分鐘。
  - 吸取上清液置入另一 96-well 板內。
  - 加入 0.5 ml isopropyl alcohol, 在 15-30 °C 下放置 10 分鐘。
  - 在 2-8 °C 下, 離心 12,000×g, 10 分鐘。
  - 丟棄上清液, 加入 ethanol (75%) washing, mixing。
  - 在 2-8 °C 下, 離心 7,500×g, 5 分鐘。
  - 丟棄上清液, 在 55 °C heater dryer, 加熱 10 分鐘使剩餘的 ethanol (75%) 蒸發。
  - 以 DEPC 水溶解。
  - 測 OD 值

(四) NO 的測定: 使用 Nitric oxide assay kit, Colorimetric (CALBIOCHEM<sup>R</sup>)

- 加 standards 到 well 內
- 決定要加入的 sample 數目
- 加 sample 到 wells 內, 每個 sample 做二個 wells, 加 5-80 μl 的 sample
- 加入足夠的 buffer 到 sample 的 well 內, 最後體積要達到 85 μl。
- 加入 5 μl 的 reconstituted nitrate reductase (0.01 unit) 到每一個 well 內。
- 加 10 μl 的 2mM NADH 到每一個 well 內, 然後在室溫下 shaking 20 分鐘。
- 加入 50 μl 的 kit 內的 Color Reagent #1, 簡單的 shaking。
- 加入 50 μl Color Reagent #2, 在室溫下溫和的 shaking 5 分鐘。
- 然後將 plate 置於 microtiter plate reader 內讀取 (absorbance: 540 nm)。
- 從 standard curve 計算出 sample 的濃度。

(五) 抽取角質細胞的 Total RNA

- 將 5-10 × 10<sup>6</sup> cells 加入 1ml TRIZOL<sup>R</sup> reagent。
- 在 15-30 °C 下 mixing 5 分鐘。
- 每 1 ml TRIZOL<sup>R</sup> reagent 加入 0.2 ml chloroform。
- shaking 15 秒, 在 15-30 °C 下放置 2-3 分鐘。

(六) RNA Reverse Transfer

- 取 1 μg RNA, 加 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 9.5 μl。
- 置於 heater dryer 70 °C, 10 mins。
- 置於冰上, 加入:
 

5×RT buffer	4 μl
10 mM dNTP	4 μl
NO-synthase primer 3'	1 μl
Rnasin	1 μl
AMV-Reverse Transferase	0.5 μl
- 置於 42 °C, 1 小時, 取出冰於 -20 °C, 以備 PCR 之用。

(七) NO-synthase 的 polymerase chain reaction (PCR)

autocleaveH <sub>2</sub> O	30.5 μl
Mg-free buffer	5 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl
dNTP	2 μl
NO-synthase 5' primer	1 μl
NO-synthase 3' primer	1 μl
Template (sample RT 後之 c-DNA)	4.5 μl
DMSO	2.5 μl
Taq (polymerase)	0.5 μl

50 μl

將已配好的 sample 放入 PCR machine, 設定好時間與 cycle 數。

(八) Run gel

- 泡好 2% gel (取 1g agarose 加入 50 ml 0.5×Tris-boric acid-EDTA), 倒入 gel plate 凝固

2. 取出凝固的 gel 放入電泳槽內，loading sample(已加 dye)。
3. 100V，30 分鐘
4. 取出置於 ethidium bromide 染色
5. 將已染色的 gel 置於 UV box 照相及定量。

#### (九)、Total protein 的收集

細胞溶解物(Cell lysates)之製備：將細胞培養皿內的培養液移除，以冰冷的 D-PBS 沖洗細胞三次，再將瓶內的殘餘液吸乾淨。接著加入適當的細胞溶解緩衝液 (cell lysis buffer) [20mM Tris-HCl (pH7.4), 2mM EGTA, 5mM EDTA, 500 μ M sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 μ g/ml aprotinin (Sigma), 10 μ g/ml leupeptin (Sigma), 1mM PMSF (Sigma)] 於冰上作用 20 分鐘後，用 rubber policeman 收集細胞。再將細胞溶解物取至新的離心管，然後在水浴下以超音波震碎細胞，每次 10-15 秒約六次，並在顯微鏡下觀察，確定細胞全被震碎後再於 4 離心 (12,000rpm，10 分鐘)。離心後，吸取上層液(勿觸及沈澱物)分裝至新的微量離心管。蛋白質的濃度測定則採用 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA)。此法是以 BSA 當標準品，利用分光光度儀於波長 595nm 測定其吸光值，並依此吸光值做出標準曲線，然後測檢體之蛋白質濃度。

#### (十)、硫酸十二酯鈉---聚丙烯醯凝膠電泳 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 進行前先將溶於 sample buffer [0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-ME (Merck), pH 6.8] 之檢體於 100 水浴中加熱五分鐘。首先把 Glass plate Sandwiches 裝置好，配製 10%(或 12%) separating gel 以及 4% stacking gel。再將適量之 10% separating gel [ 0.375M Tris-HCl (pH8.8), 0.1% SDS, 10% acrylamide/bis, 0.05% APS, 0.05% TEMED] 注入凹槽，然後輕輕覆上一層二次蒸餾水。待 separating gel 凝固後，移去上層水，再將梳齒(comb) 插在 separating gel 上方，然後注入適量 4% stacking gel [0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 4% acrylamide/bis, 0.05% APS, 0.1% TEMED]。當 stacking gel 凝結後，移

去梳齒，並將電泳設備裝好。倒入 running gel buffer (0.025M Tris, 0.192M glycine, 3.5mM SDS)後即可將檢體注入孔洞內。關於電泳之進行，起初跑 stacking gel 時電壓固定為 80 伏特；其後跑 separating gel 後固定在 120 伏特。直到檢體染料達末端上方半公分為止。

#### (十一)、西方墨點分析法

先將細胞溶解物所取得之上層液做蛋白質定量分析。接著取 20-30 μ l 檢體進行上述之 SDS-PAGE。然後將凝膠上的蛋白質藉由轉漬槽而轉漬 (electrotransfer) 在硝化木纖維紙 (NC paper) 上。在轉漬緩衝液 [25mM Tris, 192mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3] 中以固定電壓 (25V) 轉漬一個小時。轉漬之後可以 Commassie blue 染劑確認凝膠上大部份的蛋白質已轉漬過去。

接下來用 PBS-T (100 mM phosphate buffer, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH7.4) 緩衝液沖洗 NC paper 十分鐘後，再以 5% 低脂奶粉之 PBS-T 緩衝液進行覆蓋 (blocking) 反應，目的是將 NC paper 上之非特异性結合位置覆蓋住，此覆蓋步驟於 4 隔夜反應。

將覆蓋緩衝液倒掉，以 PBS-T 緩衝液清洗 NC paper 三次，每次十分鐘。繼之，加入用覆蓋緩衝液稀釋之初級抗體 (primary antibodies)。於室溫下搖動使其均勻作用一小時。初級抗體結告後，再以 PBS-T 緩衝液清洗 NC paper。繼續加入 HRP 所接含之二級抗體 (secondary antibodies)，並於室溫下反應 50 分鐘。然後又以 PBS-T 緩衝液沖洗五次，每次十分鐘。洗淨之 NC paper 最後加入 ECL 冷光成應試劑作用三分鐘後，以保鮮膜覆蓋並趕走氣泡，而使其平放在 X 光片卡匣中，並於暗房內壓一高感度底片，沖洗底片。底片以數位影像系統及密度分析軟體分析結果。

#### 四、研究結果

由去年的研究成果得知，由 UVB 不同劑量照射後，角質細胞所產生的 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，會隨著 UVB 劑量的增加而增加。因此我們就

將防曬劑的防曬能力分為四級(I、II、III、IV)，作為本研究探討的主要重點。

**第 I 級：**可以阻隔 UVB 劑量  $10 \text{ mJ cm}^{-2}$  照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的。

**第 II 級：**可以阻隔 UVB 劑量  $20 \text{ mJ cm}^{-2}$  照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的。

**第 III 級：**可以阻隔 UVB 劑量  $30 \text{ mJ cm}^{-2}$  照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的。

**第 IV 級：**可以阻隔 UVB 劑量  $40 \text{ mJ cm}^{-2}$  照射，即 NO 濃度、NO-synthase 量及 NO-synthase 基因表現，沒有明顯變化的。

在本研究去年初步研發成果之後，今年實際以防曬用品做為探討。我們以傳統的天竺鼠曝露方式來評估 SPF，另外以我們研發的新 SPF 方式來評估防曬用品的防曬能力。

我們採用六組市售防曬用品作為樣本：

防曬用品 A (產品標示 SPF 為 15)

防曬用品 B (產品標示 SPF 為 20)

防曬用品 C (產品標示 SPF 為 30)

防曬用品 D (產品標示 SPF 為 38)

防曬用品 E (產品標示 SPF 為 48)

防曬用品 F (產品標示 SPF 為 60)

以傳統的天竺鼠曝露方式，以及我們研發的新 SPF 方式來評估防曬用品的防曬能力。

以天竺鼠曝露方式結果顯示在表一。從結果顯示，一般市售防曬用品所標示的 SPF 值，與我們實際以動物天竺鼠曝露方式所測得之 SPF 有明顯的差距。

以我們研發的新 SPF 方式來評估防曬用品的防曬能力。結果顯示在表二，表三，表四，表五，表六，表七，圖一，圖二。從表二及圖一和圖二顯示防曬用品 A 屬於防曬能力第 I 級。從表三及圖一和圖二顯示防曬用品 B 屬於防曬能力第 I 級。從表四及圖一和圖二顯示防曬用品 C 屬於防曬能力第 I 級。從表五及圖一和圖二顯示防曬用品 D 屬於防曬能力第 I 級。從表六及圖一和圖二顯示防曬用品 E 屬於防曬能力第 I 級。從表七及圖一和圖二顯示防曬用品 F 屬於防曬能力第 II 級。

## 五、討論

一般市售防曬產品 SPF 的訂定一直都是引人爭議，隨著業者的自行標示，沒有標示其測試的方式，實在令人擔心，因為 SPF 的標示，很容易讓消費者相信誤以為有很好的防曬效果，於是消費者不知不覺會在紫外線強烈照射下曝露過久，於是造成更大的傷害。

在我們研究所得之結果中，以傳統的天竺鼠曝露方式來評估 SPF，發現市售之防曬化粧品大多具有防曬能力。但是實際所擁有之防曬能力，似乎與其標示之 SPF 值有一段差距，尤其是 SPF 值標示越大的，差距就越大。在本研究的天竺鼠曝露方式是採用活體(天竺鼠)做為研究對象，對於動物的選用(單一純種)，甚至每一隻動物都有一窗口作為控制組，動物之飼養(恆溫和恆濕)，以及研究進行之場所(恆溫和恆濕)，都相當嚴謹，以排除不必要之變因，尤其在研究進行之場所，不會讓動物異樣分泌皮脂及汗水，如此所得之 SPF 數據都和原本產商標示之 SPF 值有一段差距，那如果人類再經由嚴熱陽光照射下，釋出大量之汗水，造成防曬物質之流失或稀釋，那防曬化粧品所具有之防曬能力就更差了。

以我們研發的新 SPF 方式來評估防曬用品的防曬能力，發現一般防曬用品都有其防曬能力，但是級數都不是很高，畢竟防曬用品不管是屬於遮避型或是吸收型，都有其實在的效用極限，不過慶幸的是我們選用的這幾個樣本(防曬用品)，都有基本的 I 級以上的防曬能力，但我相信有一些市售防曬用品有可能是沒有任何防曬能力，未來我們試圖再取得更多的防曬用品做測試，以瞭解一般市售防曬用品是否真的都具備防曬功能。在所有防曬化粧品中，所測之 SPF 值，我們非常清楚之發現，標示 SPF 值高的防曬化粧品，其實際防曬效果，並沒有特別的高。我們非常好奇的想知道，廠商是否是將原本低 SPF 值之防曬化粧品之防曬成份加倍後，就認定此防曬化粧品之防曬能力就會增倍，或許是基於如此之考量，所以才會出現有如此之現象。皮膚受傷害的情形，我們相信並不是這麼單純的，它應該是有一個極限的，超



過那個極限後，即使多加倍數之防護，可能也達不到效果。所以我們認為只要商品在防曬化粧品中加有防曬成份，就必需做嚴密之防曬係數之檢定，這才是對消費者的一種負責態度。

雖然傳統的天竺鼠法，是目前最接近以人類測試防曬係數 SPF 之測定方法，但因天竺鼠必需經過剔毛，而且不易判斷紅斑點的出現，對於動物危害的避免，天竺鼠法也不是一個評估防曬產品防曬效果的好方法。所以在以傳統的天竺鼠曝露方式來評估 SPF 和以我們研發的新 SPF 方式來評估防曬用品的防曬能力之間尋求一處共通點，是一最好的防曬能力評估方式。初步，我們發現以天竺鼠曝露方式來評估 SPF 10 至 15 為第 I 級防曬能力，SPF 15 以上為第 II 級防曬能力，由於樣本數目的不足(因為經費不足)，所以並未發現可以擁有第 III 級及第四級的界限。在未來我們需要有更多的努力空間。

## 六、建議

防曬產品防曬效果的評估是非常重要的，防止皮膚受到 UVB 的傷害，是防曬產品的主要目的。防曬產品的出售是應該標示其防曬能力的評估標準所使用的方法，讓消費者參考，不可以只標示 SPF 數字，讓消費者誤以為 SPF 數字越高越有相對的防曬效果。防曬產品 SPF 數字的大小，我相信並不是重要的，重要的是其對活體皮膚是否真的有保護效果，所以我們相信我們所研發的新防曬級數的評估方式，比一般採用的 SPF 值，更可以評估防曬產品的防曬效果。

## 七、參考文獻

- Deliconstantinos G, Villiotou V, and Stravides JC. (1996). *Biochem Pharmacol* 51:1727-1738.
- Knowles RG, and Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298:249-258, 1994.
- Kroncke KD, Fehsel K, and Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem* 376:327-343,

- 1995  
Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA (1991). *Pharmacol Rev* 43:109-142.

表一:

以天竺鼠曝露方式結果顯示

防曬用品	A	B	C	D	E	F
SPF	11±2	15±3	13±3	15±5	14±4	24±4

表二:

角質細胞沒有塗抹防曬用品時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO 濃度

UVB 劑量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)	352±50	436±66	665±22	742±31	861±40

表三:

角質細胞塗抹 A 防曬用品時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO 濃度

UVB 劑量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)	322±45	360±67	625±52	702±61	761±80

表四:

角質細胞塗抹 B 防曬用品時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO 濃度

UVB 劑量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)	315±54	364±47	589±65	613±41	681±40

表五:

角質細胞塗抹 C 防曬用品時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO 濃度

UVB 劑量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)	389±61	421±74	627±32	701±57	742±52

表六:

角質細胞塗抹 D 防曬用品時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO 濃度

UVB 劑量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)	355±53	361±56	542±41	624±39	744±35

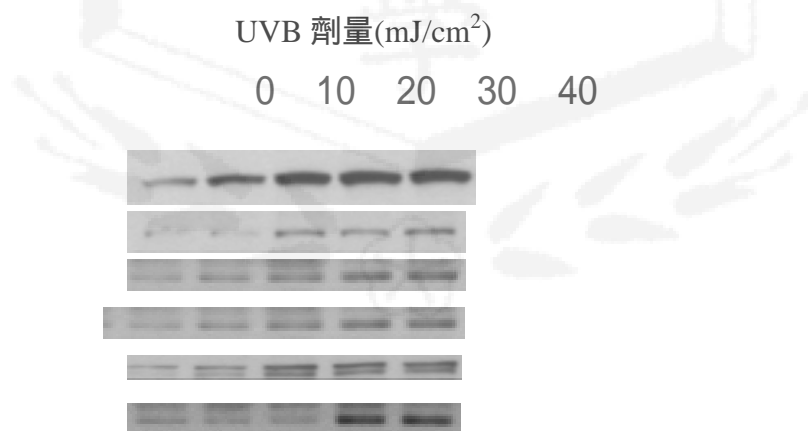
表七:

角質細胞塗抹 E 防曬用品時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO 濃度

UVB 劑量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	30	40
NO 濃度 (pmol/10 <sup>6</sup> cells)	311±36	325±47	342±52	544±51	688±45

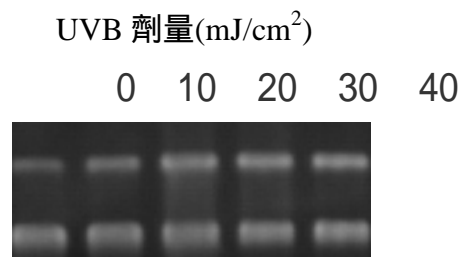
圖一：

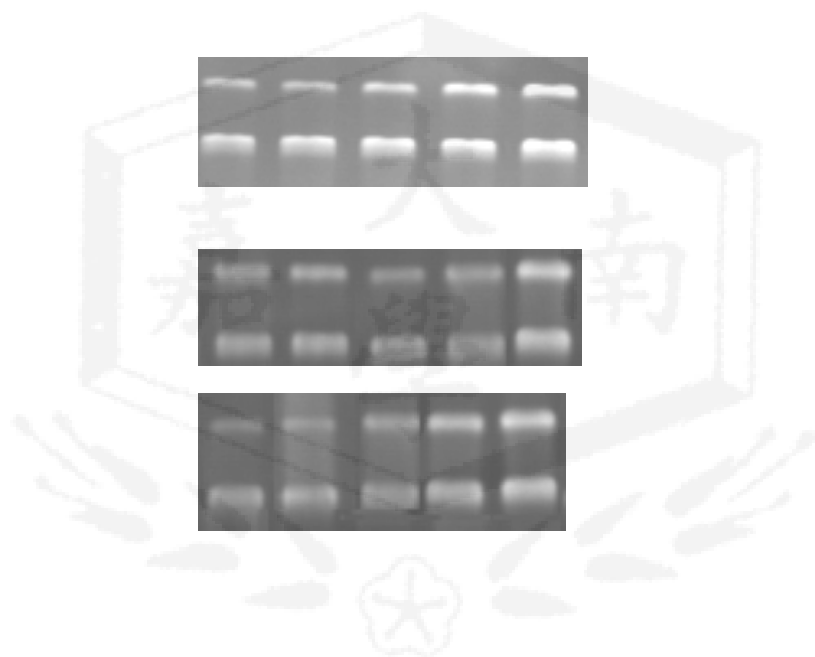
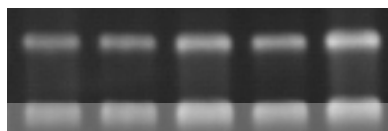
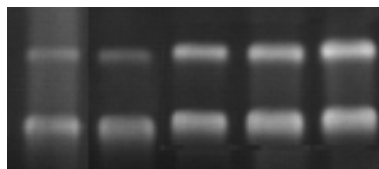
角質細胞塗抹防曬用品 A、B、C、D、E 及 F 時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO-synthase 量



圖二：

角質細胞塗抹防曬用品 A、B、C、D、E 及 F 時，經過不同 UVB 劑量照射下的 NO-synthase 的基因表現





## 可供推廣之研發成果資料表

可申請專利	可技術移轉	日期：__年__月__日
<b>國科會補助計畫</b>	計畫名稱： 計畫主持人： 計畫編號：	學門領域：
<b>技術/創作名稱</b>		
<b>發明人/創作人</b>		
<b>技術說明</b>	中文：  ( 100~500 字 )	
	英文：	
<b>可利用之產業 及 可開發之產品</b>		
<b>技術特點</b>		
<b>推廣及運用的價值</b>		

1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位

- 研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
  3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。

