

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

子計畫編號：CN981106

子計畫名稱：碳酸氫溫泉美白機制研究

執行期間：98年7月2日至98年11月30日

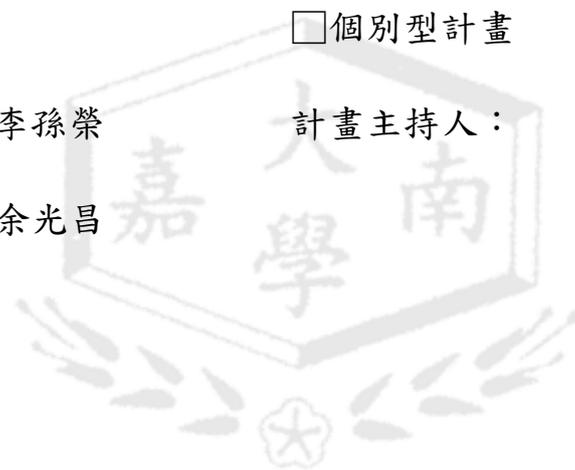
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：李孫榮

計畫主持人：

子計畫主持人：余光昌

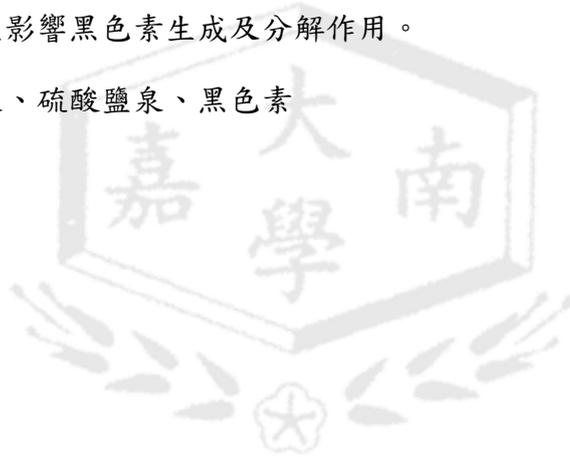


中華民國 99 年 02 月 22 日

摘要

碳酸氫鹽泉及硫酸鹽泉相傳浸泡後具有養顏及美白功效，但至今仍缺乏直接科學研究證據。先前我們研究證實碳酸氫鹽泉具有吸收氫氧自由基作用，而紫外線及自由基是導致皮膚黑色素生成的重要因素。本研究的目的是在於探討溫泉對於黑色素生成影響，並透過影響酪胺酸酶(Tyrosinase)之活性測試，作為本研究之重要評估依據。研究溫泉採用碳酸氫鹽泉及硫酸鹽泉，並以 PBS 溶液作為研究對照組。結果發現，相對於 PBS 溶液，碳酸氫鹽泉及硫酸鹽泉增加酪胺酸酶活化黑色素及抑制黑色素分解的雙重作用。本研究進一步以 EDTA(25 mg/L) 螯合移除溫泉水之兩價以上陽離子，結果能有效阻斷硫酸鹽泉之黑色素生成作用，但對碳酸氫鹽泉影響較小。最後，研究將溫泉以 CaCl_2 煮沸移除碳酸氫鹽成分，結果能有效阻斷碳酸氫鹽泉之黑色素生成作用，直接採用碳酸氫鈉溶液(1,000 mg/L)也具有類似碳酸氫鹽泉影響黑色素生成和分解的雙重作用。綜合本研究結果發現，本研究溫泉增加酪胺酸酶活化黑色素及維持黑色素分解的雙重作用，不同泉質的機制並不相同，硫酸鹽泉透過兩價以上陽離子，而碳酸氫鹽泉則透過碳酸氫鹽影響黑色素生成及分解作用。

關鍵字：碳酸氫鹽泉、硫酸鹽泉、黑色素



(一) 緒論

皮膚組織是人體重要的物理性保護屏障，但皮膚組織的保護性極易受到自由基的攻擊而損傷，其中又以紫外線 (ultraviolet radiation; UVR) 的直接刺激作用，所誘導人體皮膚細胞或培養的皮膚細胞產生氧系反應 (reactive oxygen species; ROS)，被認為是皮膚老化的主要原因 (Junqueira, et al., 2004)。皮膚的表皮的最裡層存在有麥拉寧色素細胞，會分泌一種叫酪胺酸酶 (tyrosinase) 的催化劑，可以讓皮膚細胞裡的酪胺酸 (tyrosine) 快速氧化，生成麥拉寧色素 (也稱黑色素)。皮膚長期暴露在紫外線的刺激，會經由酪胺酸路徑的氧化過程，藉由調控酪胺酸酶 mRNA 的濃度來生成黑色素 (Aberdam, Romero, & Ortonne, 1993; J. Fuchs, Mehlhorn, & Packer, 1989)。雖然，至今尚未有研究證據說明自由基與黑色素生成有直接關係，但黑色素具有吸收清除自由基的能力，被認為是皮膚組織對抗紫外線傷害的一種自我保護機制。此外，急性紫外線照射所引起的紅腫之發炎現象，主要也是透過皮膚細胞內自由基的產生機制有關。皮膚局部塗抹這些自由基清除劑，能有效減低及預防長期紫外線暴露所造成的皮膚老化和癌症的發生機率，而能減少或防止 dopa 的自動氧化 (auto-oxidation) 的抗氧化劑，例如維生素 C 已被證實具美白作用。

溫泉具有人體保健和疾病輔助治療效果，目前溫泉最常被應用於美容醫學領域和皮膚方面疾病 (dermatologic disorders) 的輔助治療，包括牛皮癬 (psoriasis) 及異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 的輔助治療，而其他各類型皮膚疾病的理療效果也得到良好的臨床證實。其次，溫泉也經常使用於心血管疾病 (cardiovascular diseases)，呼吸道問題 (pulmonary disorders)，或肌肉骨骼等方面疾病 (musculoskeletal disorders) 的輔助療法。自古以來碳酸氫鈉溫泉被譽為美人湯，具有養顏美容和美白的功效，但其詳細細胞作用機制仍有待相關科學研究證實。先前我們的體外研究證實，碳酸氫鈉溫泉具有中和清除氫氧自由基的作用 (林指宏 & 盧怡伶, 2005)。然而，碳酸氫鈉溫泉的美容保健效果是否與中和清除皮膚自由基的含量有關，值得研究進一步探討。本計畫將進一步探討碳酸氫根溫泉水抑制自由基的美容醫學作用制。研究設計期能透過探討碳酸氫根溫泉水是否經由中和自由基，並經由抗抑制酪胺酸酶活性，而達到抑制黑色素生成，表現皮膚美白作用。

1. 溫泉美容醫學研究

歐洲各國和日本已將溫泉視為具有保健和理療作用，並組織溫泉醫學相關部門負責溫泉保健理療的各項作用機制研究 (van Tubergen & van der Linden, 2002)。近年來，國際溫泉應用有傾向美容醫學領域的研發趨勢，其中以法國的溫泉美容醫學研究最為深入。歸納其研究結論，學者大致認為碳酸或碳酸氫溫泉能緩和各種刺激物 (irritants) 所引起的皮膚發炎現象，具有皮膚舒緩、消炎和抗過敏的效果 (Portales, et al., 2001)。其作用機轉包括抑制腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor; TNF) 生成和阻斷組織胺 (histamine) 及前列腺素 (prostaglandins) 的釋放減輕發炎作用之紅腫、癢、刺痛 (stinging) 和緊繃

(tightening) 的不適症狀，並可加速皮膚組織的傷口癒合 (wound healing) 速率。此外其內容物 Strontium、Selenium 等內容物，具有舒緩、抗過敏及抗氧化的功效，被認為能活化皮膚細胞抗氧化酶 (catalase)，具有減少紫外線對皮膚產生的自由基傷害(Ghersetich, Freedman, & Lotti, 2000)。

2. 自由基與皮膚病變的研究

氧化作用與抗氧化作用對人體的健康與疾病預防領域的影響，廣泛受到生物醫學研究的重視^{37,38}。自由基能氧化生物體內脂質、蛋白質或核苷酸，破壞生物體結構和干擾生物化學運作機能，導致各種疾病和老化問題³⁹，此種破壞生物體內機能的自由基，約有一半以上的經由氫氧自由基(hydroxyl radicals; $\cdot\text{OH}$)而產生，且 $\cdot\text{OH}$ 是目前被認為是最強的氧化劑^{40, 41}。

氧分子 (O_2) 在粒線體電子傳遞鏈 (mitochondrial electron transport chain) 上的不完全轉移過程，而形成的過氧化陰離子 (superoxide anion; $\cdot\text{O}_2^-$) 是體內 ROS 的主要來源 (Aust, Chignell, Bray, Kalyanaraman, & Mason, 1993)。常見的 ROS 有 superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), alkoxy radical ($\text{ROO}\cdot$) 等，是造成皮膚細胞 DNA 斷裂 (DNA mutation)、脂質過氧化 (lipid peroxidation)、蛋白質結構的破壞 (protein destroy) 的重要細胞反應機制(Gonzalez & Pathak, 1996)，也是促成皮膚組織老化 (photoageing)、發炎反應、異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 和皮膚癌 (skin cancer) 的重要因素(Berneburg, Plettenberg, & Krutmann, 2000; Ichihashi, et al., 2003; Matsumura & Ananthaswamy, 2004; Nishigori, Hattori, Arima, & Miyachi, 2003; Sander, Chang, Hamm, Elsner, & Thiele, 2004; Tanaka, Sato, Akimoto, Yano, & Ito, 2004)。正常狀態下這些氧化壓力因子 (oxidative stress factors) 能輕易被皮膚細胞內的抗氧化酵素 (enzymatic antioxidants)，例如 superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase, thioredoxin reductase 所分解(Moysan, Clement-Lacroix, Michel, Dubertret, & Morliere, 1996)，但紫外線也能消耗存在皮膚組織內的酵素型態和非酵素型態的抗氧化劑 (antioxidants) (Ichihashi, et al., 2003; Podda, Traber, Weber, Yan, & Packer, 1998)，包括維生素 C (vitamin C) 和維生素 E (vitamin E) 的含量。因此，皮膚組織長久暴露於紫外線的傷害下，極易造成損傷或病變(Darr & Fridovich, 1994)。維生素 C、維生素 E(Chen, et al., 2000; Jurkovic, Sentjunc, Gasperlin, Kristl, & Pecar, 2003; Kalka, Mukhtar, Turowski-Wanke, & Merk, 2000; McArdle, et al., 2002)和褪黑激素 (melatonin)(Lee, et al., 2003; Maharaj, et al., 2002; Ryoo, Suh, Mun, Kim, & Lee, 2001)都具有明顯的抗氧化作用，在生物體內則扮演著自由基的強效清除劑角色(free radicals scavengers)。皮膚局部塗抹這些自由基清除劑，能有效減低急性紫外線照射所引起的皮膚紅腫現象，及預防長期紫外線暴露所造成的皮膚老化和癌症的發生機率。然而，碳酸氫鈉溫泉的美容保健效果是否與清除皮膚自由基的含量有關，值得研究進一步探討。

3. 溫泉水清除氫氧自由基之研究

先前我們的研究發現，碳酸氫鈉溫泉具有清除氫氧自由基的作用(林指宏 & 盧怡伶, 2005)。研究是採位於台灣中央山脈衍生的碳酸氫鈉溫泉為研究素材，溫泉取樣處為高雄縣境內的七坑溫泉，研究採 Fenton 反應系統來衍生氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)，及配合氫氧自由基與水楊酸反應的生成產物 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的濃度來探討碳酸氫鈉溫泉吸收氫氧自由基的能力。結果顯示，溫泉原液相較 MQ 能有效抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成，平均值分別為 $91.3 \pm 0.59\%$ 及 $95.1 \pm 0.48\%$ ；1 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為 $89.2 \pm 1.35\%$ 及 $94.4 \pm 0.96\%$ ；10 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為 $83.6 \pm 1.24\%$ 及 $90.4 \pm 1.33\%$ ；100 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為 $68.3 \pm 2.17\%$ 及 $70.1 \pm 3.28\%$ ；1000 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為 $29.8 \pm 3.23\%$ 及 $32.1 \pm 4.37\%$ 。以 10 倍稀釋溫泉水調製成 10 mM 的褪黑激素溶液，原 10 倍稀釋溫泉對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果，平均值分別為 $83.6 \pm 1.24\%$ 及 $90.4 \pm 1.33\%$ ，混合液對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果，平均值分別為 $92.7 \pm 2.89\%$ 及 $91.8 \pm 1.54\%$ ，可見褪黑激素與溫泉混合後，其吸收氫氧自由基的能力有明顯相加成的作用。總結本研究結果顯示，七坑碳酸氫鈉溫泉明顯具有清除氫氧自由基的作用，原液效果優於 100 mM 維生素 C 和 100 mM 褪黑激素對氫氧自由基的清除作用，但其作用受維生素 C 所干擾而下降，與褪黑激素合用則有相加成的作用(林指宏 & 盧怡伶, 2005)。基於初步研究結果，本研究計畫期待能進一步透過完整的研究計畫，了解碳酸氫鈉溫泉抑制黑色素反應的美白生理機制。

4. 黑色素形成調節機制

近年來對於曝曬於陽光下所造成的光致癌性 (photocarcinogenic)、光老化 (photoaging) 及黑色素在光保護 (photoprotection) 的研究越來越清楚。皮膚的黑色素 (melanin) 可減少穿透表皮層的紫外線總量，及抑制因光誘導產生 DNA 損傷的活性氧自由基。許多皮膚的研究表示，罹患皮膚癌的機率在膚色較淡的人種要比深色皮膚的人種高(G, 2002)。

發炎反應 (inflammation) 是皮表不當刺激後所引起的一種免疫副作用，約佔臨床接觸性皮膚炎 (contact dermatitis) 的 70% 案例(Ortiz & Yiannias, 2004; Rietschel, 2004)。皮表發炎反應有紅、腫、熱、痛、癢、龜裂和剝離等臨床不適症狀(Clough, 1999; Wahlgren, 1999)。紫外線(UV light)、內毒素(endotoxins)和各種化學刺激物質(chemical irritants) 是常見皮膚發炎反應的主要誘發劑，這些刺激物質都具有 chemotaxis, differentiation 和 infiltration of inflammatory leukocytes 特性，因而造成局部反應生成大量 reaction oxygen species (ROS)(Nakamura, et al., 2003), histamine, bradykinin, serotonin, acetylcholine, Leukotrienes, prostaglandins, nitric oxide(Rawlingson, 2003), 及 cytokines (例如：IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α ...等)，並經由這些媒介物進一步引起生理之紅、腫、熱、痛之發炎反應。

臨床觀察發現，發炎後會造成皮膚高度黑色素沉著 (post-inflammatory

hyperpigmentation) 的現象，與免疫發炎介質相關。研究證實免疫發炎細胞動素 IL-1 α ，IL-1 β ，IL-6 與 TNF- α 對培養的人體黑色素細胞的影響(J Fuchs, Zollner, Kaufmann, & Podda, 2001)。皮膚黑色素的生成是透過一連串的細胞內生化反應過程，首先將酪胺酸氧化成 dihydroxyphenylalanine (即 dopa)。然後 dopa 轉變為 dopachrome，再形成 indoles，最後成黑色素。其中酪胺酸酶(tyrosinase)是催化 dopa 變成 dopachrome 的速率限制酶，一旦形成 dopachrome，在細胞內會經由自動氧化反應而轉變為黑色素(Blarzino, et al., 1999)。維生素 C 為一還原劑，具有抗氧化的能力，可將 Dopaquinone 還原成 Dopa 而抑制黑色素形成，或將深色的氧化型黑色素還原成淡色的還原型黑色素，化妝品中亦用來作為美白。故依目前所知，防止黑色素形成的方法，大致上可歸納為下列四種方法：

- (1) 降低 tyrosinase 的活性、抑制 tyrosinase 的合成，或使用 tyrosinase 的拮抗劑。
- (2) 降低黑色素細胞的功能，使用具有細胞毒性 (cytotoxic) 的物質，來減少黑色素細胞的增殖或使其不能產生黑色素。
- (3) 減少或防止 dopa 的自動氧化 (autooxidation)。
- (4) 抑制皮膚的發炎反應，如紫外光刺激後導致的紅腫。

基於先前初步研究結果顯示，碳酸氫鈉溫泉具有中和清除氫氧自由基的作用。然而，碳酸氫鈉溫泉的美容保健效果是否與中和清除皮膚自由基的含量有關，並藉由中和自由基而減少或防止 dopa 的自動氧化，達到美白效果，值得研究進一步探討。本研究計畫期待能進一步透過完整的研究計畫，了解碳酸氫鈉溫泉抑制黑色素反應的美白生理機制。

(二) 研究方法與材料

(1) 樣品與自由基製備

A 溫泉水樣本的採樣

本研究碳酸氫鹽泉採樣自苗栗縣泰安溫泉區和高雄縣寶來溫泉區；硫酸鹽泉採樣自花蓮縣安通溫泉區。其各自檢測成分為：

- a 苗栗縣泰安溫泉區碳酸鹽泉：主要溫泉井的水溫為 30.5°C、pH 值為 8.95 鹼性碳酸鹽泉，主要離子成分為「Cl⁻ 2.64 mg/L; SO₄²⁻ 43.71 mg/L; HCO₃²⁻ 1339.80 mg/L; Na⁺ 160.83 mg/L; K⁺ 1.88 mg/L; Mg²⁺ 0.37 mg/L; Ca²⁺ 0.61 mg/L; TDS 407.3 mg/L」。
- b 高雄縣寶來溫泉區碳酸氫鹽泉：主要露頭的水溫為 71°C、pH 值為 7.4±0.38 的中性碳酸氫鈉溫泉，主要離子成分為「Cl⁻ 6.8 mg/L; Br⁻ 0.44 mg/L; SO₄²⁻ 5.85 mg/L; HCO₃²⁻ 1140 mg/L; SiO₂ 44.6 mg/L; Na⁺ 385 mg/L; K⁺ 2.78 mg/L; Mg²⁺ 5.20 mg/L; Ca²⁺ 8.23 mg/L; TDS 1120 mg/L」。
- c 花蓮縣安通溫泉區硫酸鹽泉：主要露頭的水溫為 71±1.0°C、pH 值為 8.74 的鹼性硫酸鹽泉，主要離子成分為「Cl⁻ 529.24 mg/L; Br⁻ 0.44 mg/L; SO₄²⁻ 274.48 mg/L; HCO₃²⁻ 31.70 mg/L; Na⁺ 571.07 mg/L; K⁺ 5.66 mg/L; Mg²⁺ 0.05 mg/L; Ca²⁺ 48.75 mg/L; TDS 2161 mg/L」。

採樣方式是以 20 L 盛水桶直接至露頭或出水口取新鮮原泉，並立即以石臘薄膜密封後，再送回實驗室進行研究。

(2) 黑色素生成機制研究

本研究以體外之酪胺酸酶活化酪胺酸生成黑色素為研究探討方法。

進行試驗方法為：

A 溫泉對黑色素生成影響研究。

取溫泉水或 PBS 溶液 9.4 mL 於試管中，加 0.5mL 酪胺酸溶液(250 mg/L)，混合均勻後於 37°C 恆溫水浴培養 30 分鐘後再入 0.1mL 酪胺酸酶溶液(2700 units/mL) 混合均勻，並分別於 0, 3, 6, 12, 24, 36, 72, 96 小時取 0.5 mL 進行吸光值檢測(450 nm)，比較不同溫泉和 PBS 溶液對黑色素生成的影響。

B 碳酸氫鈉溶液對黑色素生成影響研究。

取碳酸氫鈉溶液(1000 mg/L)或 PBS 溶液 9.4 mL 於試管中，加 0.5mL 酪胺酸溶液(250 mg/L)，混合均勻後於 37°C 恆溫水浴培養 30 分鐘後再入 0.1mL 酪胺酸酶溶液(2700 units/mL) 混合均勻，並分別於 0, 3, 6, 12, 24, 36, 72, 96 小時取 0.5 mL 進行吸光值檢測(450 nm)，比較不同溫泉和 PBS 溶液對黑色素生成的影響。

C 螯合陽離子後對黑色素生成影響研究。

事先將溫泉水或 PBS 溶液採 100:1 方式混合 EDTA(250 mg/L)溶液，並透過微膜過濾去除殘餘雜質備用。取配製後溶液 9.4 mL 於試管中，加 0.5mL 酪胺酸溶液(250 mg/L)，混合均勻後於 37°C 恆溫水浴培養 30 分鐘後再入 0.1mL 酪胺酸酶溶液(2700 units/mL) 混合均勻，並分別於 0, 3, 6, 12, 24, 36, 72, 96 小時取 0.5 mL 進行吸光值檢測(450 nm)，比較不同溫泉和 PBS 溶液對黑色素生成的影響。

D 濾除碳酸鹽後對黑色素生成影響研究。

事先將溫泉水或 PBS 溶液採 100:1 方式混合 CaCl₂(250 mg/L)溶液，先經隔水煮沸 30 分鐘系冷卻，並透過微膜過濾去除殘餘雜質備用。取配製後溶液 9.4 mL 於試管中，加 0.5mL 酪胺酸溶液(250 mg/L)，混合均勻後於 37°C 恆溫水浴培養 30 分鐘後再入 0.1mL 酪胺酸酶溶液(2700 units/mL) 混合均勻，並分別於 0, 3, 6, 12, 24, 36, 72, 96 小時取 0.5 mL 進行吸光值檢測(450 nm)，比較不同溫泉和 PBS 溶液對黑色素生成的影響。

(3) 統計分析

資料收集後直接輸入 SPSS 10.0 for Windows 軟體進行統計分析，選擇以 Student 的 *t* 檢定方法或以 ANOVA 配合事後檢定方式，進行各組間統計來分析各組間的 *p* 值。

(三) 結果與討論

1. 溫泉對黑色素生成影響研究

本研究採泰安溫泉、寶來溫泉和安通溫泉，比較不同溫泉及 1000ppm 碳酸氫鈉溶液對黑色素生成影響，並採等體積 PBS 溶液為實驗對照組。研究結果顯示，在酪胺酸酶存在下，無論是泰安溫泉、寶來溫泉和安通溫泉皆能誘發黑色素生成，但相較於對照組 PBS 溶液，安通溫泉於 12 小時後對黑色素生成已無統計意義，但泰安溫泉、寶來溫泉和碳酸氫鈉溶液於反應 6 子時後明顯增加黑色素生成效果，於 12 小時後達到最高峰，並保持穩定水準(plateau)現象(圖 1)。研究進一步於反應 12 小時時間點以沸騰 30 分鐘方式中止酪胺酸酶活性，分析酪胺酸酶維持黑色素穩定水準是否會受中止酪胺酸酶活性而影響。結果顯示，中止酪胺酸酶活性會下降整體黑色素生成效率，但無法完全中止黑色素穩定水準現象(圖 2)，推測酪胺酸酶與黑色素初期生成的關係密切，但對黑色素生成後維持穩定水準現象之相關性不大。

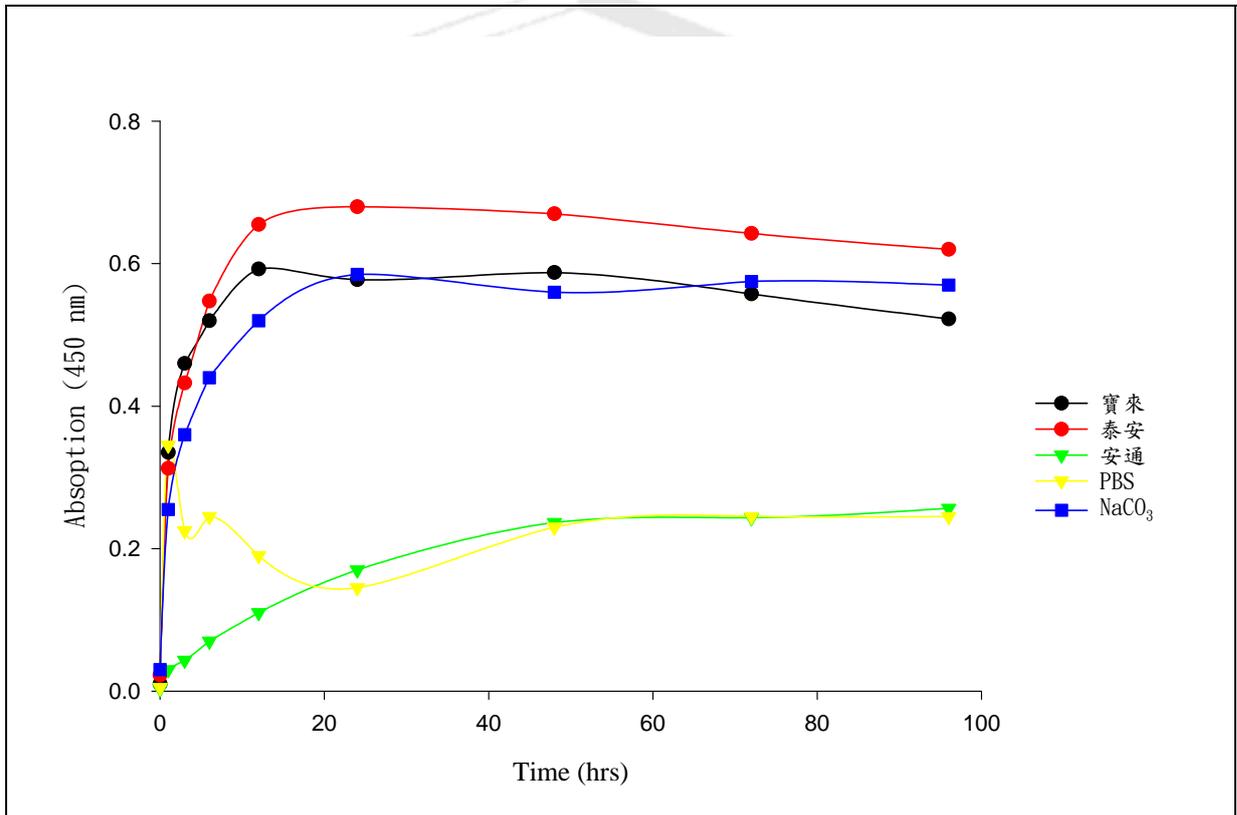


圖 1. 溫泉對黑色素生成影響研究。比較不同溫泉及 1000ppm 碳酸氫鈉溶液對黑色素生成影響，採等體積 PBS 溶液為實驗對照組。

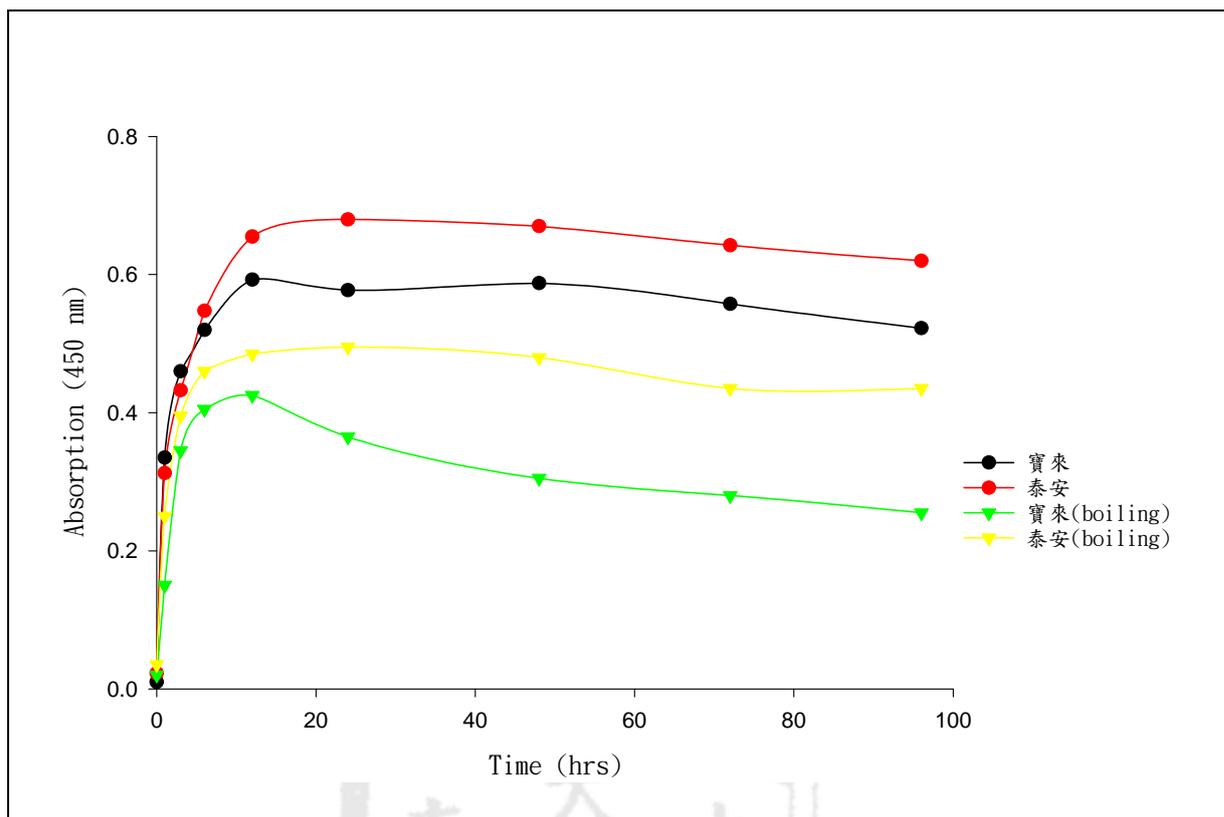


圖 2. 比較溫泉對生成後之黑色素維持及分解的影響。反應 12 小時後再以沸騰方法去除酪胺酸酶活性，比較溫泉對生成後黑色素的影響。

2. 螯合陽離子後對黑色素生成影響研究

為進一步分析溫泉增加黑色素生成的機制，事先將溫泉混合足量的 EDTA(25 mg/L)，並經微膜過濾後，取濾液進行研究分析。結果顯示，以 EDTA 去除溫泉內含陽離子後，與原泉比較，泰安溫泉和安通溫泉皆明顯達到減少黑色素生成的效果，其中安通溫泉之黑色素生成作用完全被中止(圖 3)，顯示泰安溫泉和安通溫泉促進黑色素生成的機制中，兩價之陽離子扮演一定角色。無論如何，以 EDTA 去除溫泉內含陽離子後的寶來溫泉和原泉比較，並無統計意義(圖 3)，顯示寶來溫泉促進黑色素生成的機制中和兩價之陽離子無關，研究結果推論，安通溫泉為硫酸鹽泉，在去除兩價之陽離子後即無黑色素生成作用，相較於 PBS 溶液，其去除兩價之陽離子後呈現完全中止黑色素生成的效果，可見硫酸鹽泉可能具有較佳的美白作用，而寶來溫泉促進黑色素生成的機制中除了碳酸鹽的作用外，尚有部份成分與泰安溫泉不同，兩者之間對促進黑色素生成的機制有何不同值得進一步探討。

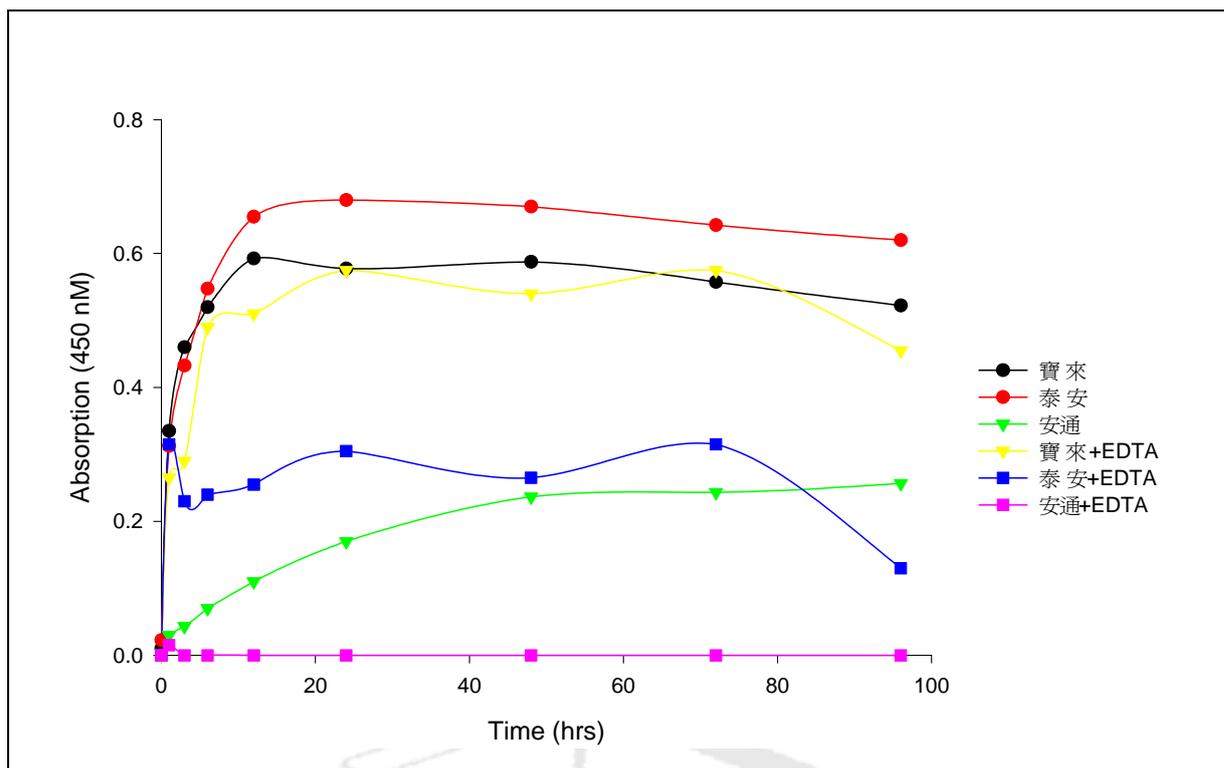


圖 3. 比較整合去除陽離子後對黑色素生成影響。以 EDTA 去除溫泉內含陽離子後，比較溫泉對黑色素生成的影響。

3. 濾除碳酸鹽後對黑色素生成影響研究

寶來溫泉促進黑色素生成的機制中除了碳酸鹽的作用外，和泰安溫泉兩者之間對促進黑色素生成的機制有何不同。為進一步兩者對增加黑色素生成的機制的差異性，事先將溫泉混合足量的 EDTA(25 mg/L)和足量的 CaCl_2 (1000 mg/L)，並經煮沸 30 分鐘，再經微膜過濾後，取濾液進行研究分析。結果顯示，以 EDTA 去除溫泉內含陽離子和碳酸鹽後，泰安溫泉之促進黑色素生成的作用，幾乎被完全中止，然而在去除溫泉內含陽離子和碳酸鹽後的寶來溫泉之促進黑色素生成的作用只被抑制約 50%(圖 4)。由此結果推論，本研究採用之寶來溫泉促進黑色素生成的作用不受內含陽離子影響，但約有 50%的作用是來自於碳酸鹽，另 50%的作用則仍待研究進一步分析。

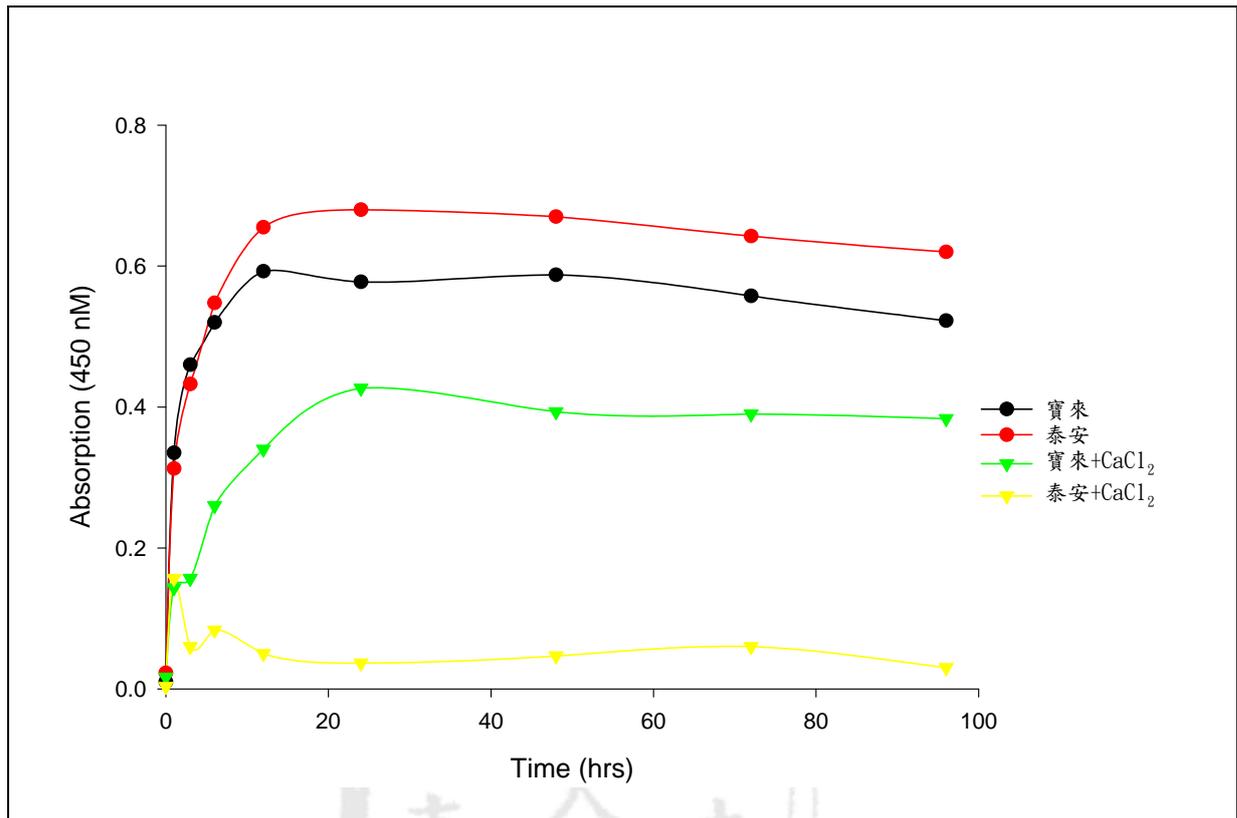


圖 4. 比較濾除碳酸鹽後對黑色素生成影響。以 CaCl₂ 混合並沸騰方式去除溫泉內含碳酸根陰離子後，比較溫泉對黑色素生成的影響。

(四) 結論

本研究採泰安溫泉、寶來溫泉和安通溫泉，比較不同溫泉及 1,000ppm 碳酸氫鈉溶液對黑色素生成影響，並採等體積 PBS 溶液為實驗對照組。研究結果顯示，泰安溫泉、寶來溫泉和安通溫泉有促進黑色素生成作用，於 12 小時後達到最高峰，並保持穩定水準現象，此一作用在中止酪胺酸酶活性會下降整體黑色素生成效率，但無法完全中止黑色素穩定水準現象。以 EDTA 去除溫泉內含陽離子後，與原泉比較，泰安溫泉和安通溫泉皆明顯達到減少黑色素生成的效果，其中安通溫泉之黑色素生成作用完全被中止，但寶來溫泉促進黑色素生成的機制中和兩價之陽離子無關。進一步以 EDTA 去除溫泉內含陽離子和碳酸鹽後，能有效抑制泰安溫泉之促進黑色素生成的作用，然而在去除溫泉內含陽離子和碳酸鹽後的寶來溫泉之促進黑色素生成的作用只被抑制約 50%。綜合結果顯示，以體外酪胺酸酶之黑色素生成反應為研究條件，溫泉有促進黑色素生成作用和保持穩定水準作用，並無相傳具有美白功效。探究機制包含陽離子和碳酸鹽皆具有促進黑色素生成作用。

(五) 參考文獻

- Aberdam, E., Romero, C., & Ortonne, J. P. (1993). Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. *J Cell Sci*, 106(Pt 4), 1015-1022.
- Aust, S. D., Chignell, C. F., Bray, T. M., Kalyanaraman, B., & Mason, R. P. (1993). Free radicals in toxicology. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 120(2), 168-178.
- Berneburg, M., Plettenberg, H., & Krutmann, J. (2000). Photoaging of human skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 16(6), 239-244.
- Blarzino, C., Mosca, L., Foppoli, C., Coccia, R., De Marco, C., & Rosei, M. A. (1999). Lipoxygenase/H₂O₂-catalyzed oxidation of dihydroxyindoles: synthesis of melanin pigments and study of their antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* 26(3-4), 446-453.
- Chen, K., Suh, J., Carr, A. C., Morrow, J. D., Zeind, J., & Frei, B. (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279, E1406-E1412.
- Clough, G. (1999). Experimental models of skin inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*, 29(Suppl 3), 105-108.
- Darr, D., & Fridovich, I. (1994). Free radicals in cutaneous biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(5), 671-675.
- Fuchs, J., Mehlhorn, R. J., & Packer, L. (1989). Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates. *J Invest Dermatol* 93, 633-640.
- Fuchs, J., Zollner, T. M., Kaufmann, R., & Podda, M. (2001). Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 30(4), 337-353.
- G., J. (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 802-810.
- Ghersetich, I., Freedman, D., & Lotti, T. (2000). Balneology today. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 14, 346-348.
- Gonzalez, S., & Pathak, M. A. (1996). Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by polypodium leucotomos. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 12(2), 45-56.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., et al. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1-2), 21-39.
- Junqueira, V. B., Barros, S. B., Chan, S. S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., Abud, R. L., et al. (2004). Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1-2), 5-16.
- Jurkovic, P., Sentjurc, M., Gasperlin, M., Kristl, J., & Pecar, S. (2003). Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 56(1), 59-66.
- Kalka, K., Mukhtar, H., Turowski-Wanke, A., & Merk, H. (2000). Biomelanin antioxidants in

- cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology*, 13(3-4), 143-149.
- Lee, K. S., Lee, W. S., Suh, S. I., Kim, S. P., Lee, S. R., Ryoo, Y. W., et al. (2003). Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture. *Experimental & Molecular Medicine*, 35(4), 263-268.
- Maharaj, D. S., Anoopkumar-Dukie, S., Glass, B. D., Antunes, E. M., Lack, B., Walker, R. B., et al. (2002). The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. *Journal of Pineal Research*, 32(4), 257-261.
- Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 195(3), 298-308.
- McArdle, F., Rhodes, L. E., Parslew, R., Jack, C. I. A., Friedmann, P. S., & Jackson, M. J. (2002). UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: Effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(10), 1355-1362.
- Moysan, A., Clement-Lacroix, P., Michel, L., Dubertret, L., & Morliere, P. (1996). Effects of ultraviolet A and antioxidant defense in cultured fibroblasts and keratinocytes. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 11(5-6), 192-197.
- Nakamura, Y., Kozuka, M., Naniwa, K., Takabayashi, S., Torikai, K., Hayashi, R., et al. (2003). Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(9), 997-1007.
- Nishigori, C., Hattori, Y., Arima, Y., & Miyachi, Y. (2003). Photoaging and oxidative stress. *Experimental Dermatology*, 12(Suppl 2), 18-21.
- Ortiz, K. J., & Yiannias, J. A. (2004). Contact dermatitis to cosmetics, fragrances, and botanicals. *Dermatologic Therapy*, 17(3), 264-271.
- Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L. J., & Packer, L. (1998). UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radical Biology & Medicine*, 24(1), 55-65.
- Portales, P., Aries, M. F., Licu, D., Pinton, J., Hernandez-Pion, C., Gall, Y., et al. (2001). Immunomodulation induced by Avene spring water on Th1- and Th2-dependent cytokine production in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology*, 14(4), 234-242.
- Rawlingson, A. (2003). Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns*, 29(7), 631-640.
- Rietschel, R. L. (2004). Clues to an accurate diagnosis of contact dermatitis. *Dermatologic Therapy*, 17(3), 224-230.
- Ryoo, Y. W., Suh, S. I., Mun, K. C., Kim, B. C., & Lee, K. S. (2001). The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 27, 162-169.
- Sander, C. S., Chang, H., Hamm, F., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2004). Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *International Journal of Dermatology*,

43(5), 326-335.

Tanaka, S., Sato, T., Akimoto, N., Yano, M., & Ito, A. (2004). Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 68(3), 433-439.

van Tubergen, A., & van der Linden, S. (2002). A brief history of spa therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(3), 273-275.

Wahlgren, C. F. (1999). Itch and atopic dermatitis: an overview. *Journal of Dermatology*, 26(11), 770-779.

林指宏, & 盧怡伶 (2005). 探討碳酸氫鈉溫泉清除氫氧自由基的作用. *嘉南學報*, 31(1), 264-279.

經濟部水利署 (2007). *溫泉資源效能應用提昇技術研究期末報告*. 台北.

