

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC9503

計畫名稱：子計畫3：抗氧化中草藥化粧品之開發

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

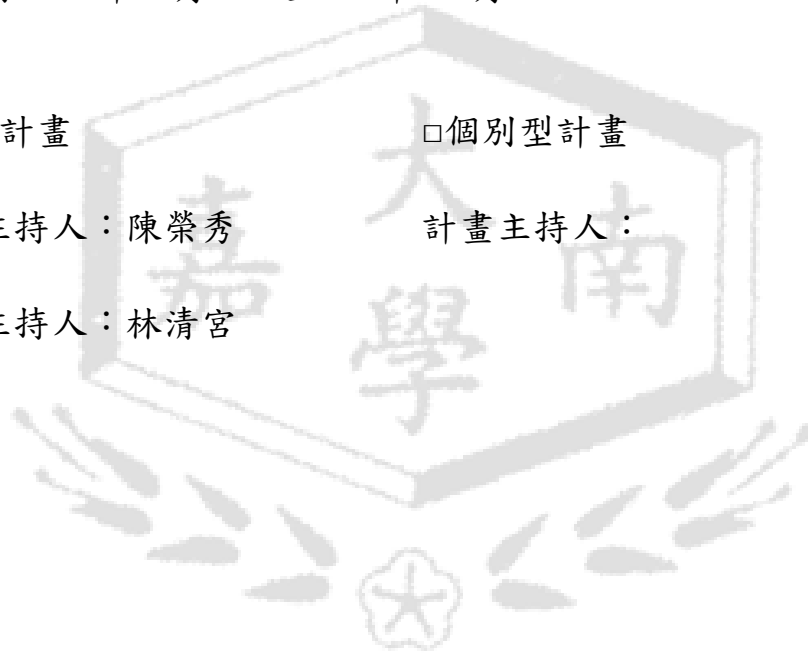
整合型計畫

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 96 年 02 月 27 日

一、摘要：

本研究擬以中草藥為材料，用微波萃取的方式來探討生物活性功能的相關性。本計畫擬採用微波萃取技術，理由主要是：(1)縮短萃取時間(2)減少溶劑的使用(3)增加萃取效率。因此本計畫擬建立一套較佳的萃取條件，同時，從實驗中了解微波萃取的最佳回收率與最佳作用活性，針對不同的中藥、不同的成分，採用適合的的萃取時間及溶劑，期能獲得比其他萃取技術有較佳的回收率與作用活性。

在抗氧化方面，本計畫擬採用 DPPH 自由基能力測試、TEAC 及 OH 清除率評估其應用於抗老化產品之可行性。

(二)研究動機與研究問題

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，本計畫主要先以抗氧化活性進行探討，希望能找到抗氧化活性較強之中草藥，開發成為抗老化產品。

(三)文獻回顧與探討

在這幾年，天然物在自由基及抗氧化的領域上已受到廣泛地研究。最近研究顯示，中草藥的成分中特別是酚類化合物，被認為是對人體健康有利的生物活性成分。酚類化合物普遍分布在天然物中，而且有廣泛的生物活性功能，包含抗氧化、抗老化、抗微生物、抗發炎及血管擴張作用。流行病學的調查指出，飲食型態在預防心臟疾病，癌症，肥胖、阿茲罕默症及帕金森氏症都有重要的相關性，這些疾病的起因都與自由基的反應有關。然而，研究也證實攝取富含酚類的天然物，能夠大大的降低罹患的機率。

中草藥的成分很多也很複雜，不但含有效成份也有無效成份，以及有毒成分。為了增加中草藥主要活性成分，在萃取方法就要講求一定的效率。然而，傳統的萃取方法有以下的缺點：有

效成分無法完整保留、萃取時間長、操作繁瑣、萃取率不高等。

近幾年在中草藥萃取技術方面，出現了很多新方法、新技術。利用微波技術可以使得萃取成份提高、時間耗時少、操作層面簡單不繁鎖等優點。

(四)研究方法與步驟

A. 中藥萃取成分之抗氧化活性評估：

1、捕捉 DPPH 自由基能力測試：

DPPH 溶於乙醇中呈藍紫色，本身是一種穩定的自由基，此實驗系統廣泛運用在抗氧化能力的測定，常使用 DPPH 來評估抗氧化物的供氫能力。當加入的樣品，若可以和 DPPH 自由基直接反應，則會阻止 DPPH 自由基進行連鎖反應，溶液顏色會轉成黃色，即表示加入的樣品具有捕捉 DPPH 自由基的能力，而呈現的顏色愈淡，則表示捕捉 DPPH 自由基的能力愈佳。將樣品先稀釋成各種不同濃度，利用分光光度劑(ELISA reader)測其 OD_{540 nm} 之吸光值，並與空白對照組的吸光值作比較，求出抑

制百分比，作圖畫線計算出 IC_{50} ，即可判斷出樣品捕捉自由基能力的強弱。

捕捉 DPPH 自由基能力(%) = $[1 - A_{540 \text{ nm, sample}} / A_{540 \text{ nm, blank}}] \times 100$

2、TEAC 總抗氧化能力測試：

此實驗系統是以 ABTS 經過氧化氫與過氧化酶產生作用，產生 $ABTS^{\cdot+}$ 陽離子自由基，待呈現穩定藍綠色，加入的待樣品，若有清除 $ABTS^{\cdot+}$ 陽離子自由基的能力，則顏色會變淺吸光值會降低，以評估總抗氧化能力，並使用 trolox 為正標準品，作標準曲線當對照，因此一般稱此實驗系統為 TEAC。總抗氧化能力的表示方式，可以用上述方式表示，或是以抗氧化力的方式呈現，本研究的表示方式是用抗氧化力方式表示。先將樣品稀釋成各種不同濃度，利用分光光度計，測其在 $OD_{734 \text{ nm}}$ 之吸光值，比較空白對照組之吸光值，計算抑制百分比，作圖畫線求出 IC_{50} 值，即可比較出樣品清除總自由基能力的強弱。

總抗氧化能力(%) = $[1 - (A_{734 \text{ nm, sample}} / A_{734 \text{ nm, blank}})] \times 100$

3、以超微弱冷光技術評估各樣品清除羥自由基之能力

試劑組成：試劑 I：羥自由基產生試劑

試劑 II：羥自由基偵測探針

試劑 III：羥自由基產生試劑

試劑 IV：羥自由基產生試劑

緩衝液

操作步驟：

- (a) 取 50 μ L 試劑 I，放入石英測量杯內
- (b) 取 1 mL 試劑 II，放入石英測量杯內
- (c) 取 1.6 mL 試劑 III，放入石英測量杯內
- (d) 取 100 μ L 試劑 IV，放入石英測量杯內
- (e) 搖晃測量杯數次，使量杯內溶液混合均勻
- (f) 放入機器測定冷光值
- (g) 待冷光數值達平衡後，將 10 μ L 樣品加入，測定冷光值的變化。
- (h) 等到冷光再達平衡後，加入另一劑量之樣品，觀察冷光值再度下降

數據計算：

將冷光變化值($\Delta A = A_{\text{initial}} - A_{\text{sample}}$)除以原始冷光值(A_{initial})，即可求出抑制百分比。

(五)結果與討論

本實驗經由多種科學中藥以 DPPH system 及 TEAC system 篩選出具有抗氧化效力之中藥。在 DPPH system 中，樣品經由多次的稀釋，最終在樣品濃度 0.088 $\mu\text{g/ml}$ 時，比較出具有抗氧化效果最好的前三者中藥為 CF、GR、RR，抑制率分別為 85.6 %、83.9%、51.6%。而在 TEAC system 中，樣品經由多次的稀釋，最終在樣品濃度 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 時，比較出具有抗氧化效果最好的前三者中藥為 GR、CF、TH，抑制率分別為 94.4 %、80.9%、76.0%(表 1)。

由於在 DPPH system 及 TEAC system 中共同被篩選出的中藥為 GR 及 CF，且本實驗室先前對過氧化氫自由基清除能力測定中，發現科學中藥 ME 對過氧化氫自由基的清除能力大於 GR 及 CF，所以本實驗將以此三種中藥材去做萃取、濃縮、乾燥取得 sample，再以此 sample

去做其他抗氧化特性之探討。而在中藥材的萃取條件，本實驗選擇以去離子水及乙醇進行萃取。

以已知具抗氧化能力之 Trolox、EGCG、Ascorbic acid 作為抗氧化對照樣品。

表 1. 初步篩選出具抗氧化力之中草藥

	樣品濃度	樣品名稱	抑制率
DPPH system	0.088 $\mu\text{g/ml}$	CF	85.6%
		GR	83.9%
		RR	51.6%
TEAC system	0.04 $\mu\text{g/ml}$	GR	94.4%
		CF	80.9%
		TH	76.0%

進一步將具抗氧化力之中草藥對自由基的清除能力比較，由表 2 可得知在 DPPH system 中，HGR 及 AGR 與 EGCG 的清除能力相當，ACF 與 Trolox 清除能力相當，而 HME 與 AME 的清除能力則表現較差。在 TEAC system 中也可看出類似的結果。綜觀來說，在已知的抗氧化物中，EGCG 的抗氧化力表現最好，而 HGR 及 AGR 有與 EGCG 相當的抗氧化能力。ACF 不論在 DPPH system

或 TEAC system 中，其抗氧化力表現比 HCF 來得好，能力與 Trolox 相當。

表 2. 各樣品在 DPPH system 及 TEAC system 的 IC₅₀(ppm)

	DPPH system	TEAC system
HGR	1.44	1.66
AGR	1.45	1.75
HCF	6.81	4.07
ACF	4.42	3.36
HME	16.03	6.67
AME	16.55	5.01
Trolox	4.89	4.33
EGCG	1.58	1.77
Ascorbic acid	8.67	3.89

在其他自由基清除試驗中，可得知 HGR 與 AGR 清除 OH·的能力與 EGCG、Ascorbic acid 能力相當，HCF 與 Trolox 清除 OH·能力相當。HME 與 AME 清除 OH·的能力較弱。在 O₂⁻ 方面因為 Trolox 無法溶解，所以數據做為參考用途。在 H₂O₂ 清除能力比較中，HGR 的表現最好。ACF 與 HME 能力相當，優於 HCF。AME 則因會影響自由基產生時的穩定，所以無法測得其抗氧化力。

(六)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.
13. Bernard, P. and Berthon, J. Y. 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *International journal of Cosmetic Science.* **22**, 219-226.
14. Boots the chemist Ltd. The guide to practical measurement of UVA/UVB ratios. The Boots Chemist, PLC, Nottingham, England.
15. 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.

16. Easton, A. Women have deadly desire for paler skin in the Philippines. *The Lancet* **352**, 555.
17. Fitzpatrick, T. B. 1995. Pathophysiology of hypermelanoses. *Clin. Drug. Invest.* **10** (suppl. 2)
18. Goihman-Yahr, M. 1996. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clinics in Dermatology.* **14**, 153-160.
19. 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.
20. 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.
21. Luckewicz, W. 1990. Determination of ascorbyl dipalmitate in cosmetic whitening powders by differential scanning calorimetry. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **41**, 359-367.
22. Maeda K. et al. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosm. Chem.* **42**, 361-368.
23. Masuda, M. et al. 1996. Skin lighteners. *Cosmet. Toil.* **111**, 65-75.
24. Melo, P. S., Duran, N., and Haun, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benzimidazole on V79 cells. 2000. *Toxicology letters* **116**, 237-242.
25. 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.
26. Motoyoshi, K., Ota, Y., Takuma, Y. and Takenouchi, M. 1998. Wrinkles from UVA exposure. **113**, 51-56.
27. Phillips, B. J. 1996. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro* **10**, 69-76.
28. Schallreuter, K. U. et al. 1994. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.
29. 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.
30. Shirota, S. et al. 1994. Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 266-269.
31. Smith, J. 1996. State of the industry: the Asia-Pacific cosmetics and toiletries sector, 1995. *DCI*. 24-34.
32. 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.

