

子計畫(2) 泥岩素材對動物發炎反應評估研究  
--探討碳酸氫鈉溫泉清除氫氧自由基的作用  
計畫主持人：林指宏

### 摘要

溫泉具有肌膚美容和保健的功效，但詳細的作用機制仍有待更多的科學研究證據來闡釋。本研究以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 Milli-Q 水能有效抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成，平均值分別為  $91.3\pm0.59\%$  及  $95.1\pm0.48\%$ ；1 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為  $89.2\pm1.35\%$  及  $94.4\pm0.96\%$ ；10 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為  $83.6\pm1.24\%$  及  $90.4\pm1.33\%$ ；100 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為  $68.3\pm2.17\%$  及  $70.1\pm3.28\%$ ；1,000 倍稀釋溫泉抑制效果，平均值分別為  $29.8\pm3.23\%$  及  $32.1\pm4.37\%$ 。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  $83.6\pm1.24\%$  及  $90.4\pm1.33\%$ ，混合液對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果，平均值分別為  $92.7\pm2.89\%$  及  $91.8\pm1.54\%$ ，可見褪黑激素與溫泉混合後，褪黑激素吸收氫氧自由基的能力有明顯被增強的作用。進一步抗氫氧自由基發炎反應評估研究初步結果顯示，本溫泉水具吸收氫氧自由基能力，亦呈現相對應性的抗氫氧自由基引起的發炎現象。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增強褪黑激素清除氫氧自由基的作用，結果可提供作為解釋碳酸氫鈉溫泉浸泡的人體保健功效。

關鍵詞：溫泉、氫氧自由基、碳酸氫鈉

備註：本研究因泥岩素材開發案暫緩，因此將研究目標轉向探討碳酸氫鈉溫泉清除氫氧自由基和抗發炎反應的評估研究

## **ABSTRACT**

### **Hydrogen Carbonate Hot Spring Water Plays the Role of Hydroxyl Radicals Scavenger**

**Jju-Home Lin, Yi-Ling Lu**

The unpollution of hydrogen carbonate spring waters (HCSW) taken from Chi-Keng (Kaohsiung, Taiwan) were analyzed for the scavenging effect of hydroxyl radical. These conditions are favorable for the generation via Fenton chemistry of the hydroxyl radical that was measured by HPLC using salicylic acid as a probe. The results indicate that the HCSW may play the role of hydroxyl radicals scavenger in different concentrations (0, 1, 10, 100, 1000 diluted spring water). Compared with milli-Q water groups, the different diluted spring water groups decreased 2,3-DHBA and 2,5-DHBA levels by  $91.3\pm0.59\%$  and  $95.1\pm0.48\%$  in the original spring water group, by  $89.2\pm1.35\%$  and  $94.4\pm0.96\%$  in 1:1 diluted spring water group, by  $83.6\pm1.24\%$  and  $90.4\pm1.33\%$  in 1:10 diluted spring water group, by  $68.3\pm2.17\%$  and  $70.1\pm3.28\%$  in 1:100 diluted spring water group, by  $29.8\pm3.23\%$  and  $32.1\pm4.37\%$  in 1:1000 diluted spring water group, respectively. Two antioxidants, vitamin C and melatonin were played a potent role of hydroxyl radical scavenger. The melatonin scavenging effect was increased by the HCSW in melatonin- spring water mixed solution. However, the low concentration of vitamin C ( $\leq 10$  mM) in vitamin C-spring water mixed solution was played a pro-oxidant effect that was against the effect of scavenging hydroxyl radicals produced by carbonated spring water. The results suggested that hydrogen carbonate hot spring water plays the role of hydroxyl radical scavenger.

**Keywords:** Hot Spring Water, Hydroxyl radical, Sodium Hydrogen Carbonate

## 一、緒言

國際 spa 協會(International Spa Association)統計在 1997 年，當年美國使用水療 spa 的人口成長速度高達 60 %以上。從 1999 年到 2001 年，溫泉 spa 產業獲利增加 114%，且水療 spa 產業的經營型態也隨之起了相當大的變化，在美國總數 9,632 水療 spa 產業中，有 685 家是以溫泉為經營核心的 spa 型俱樂部。然而，佔總數只有 7% 的溫泉 spa 俱樂部卻被列入 2001 年美國三大獲利產業之一<sup>1</sup>。由此可見，溫泉已成為 21 世紀經濟脈動的主流。

長久以來，溫泉被視為具有保健理療的作用，歐洲和日本更廣泛採用溫泉浸浴的方式來達到治療風濕關節炎和各種皮膚疾病<sup>2</sup>。然而，以溫泉治療來減輕疾病的詳細作用機制並未完全被闡明。一般推測溫泉保健理療的作用機制除了水的物理作用，包括水的浮力(Buoyancy)、靜水壓力(Hydrostatic Pressure)、水的阻力(Viscosity)和水的溫度效應(Temperature)<sup>3-5</sup>之外，其內含豐富的離子和礦物成分更可能是溫泉療效的主要原因<sup>2</sup>。雖然，溫泉含豐富的離子和礦物成分，甚至含有少量的放射元素及特殊的微生物，但近年來大多數的研究領域傾向將溫泉離子成分視為溫泉特性的分類用途，或著重於分離培養特殊溫泉微生物，鮮少有研究證據能說明這些離子成分和微生物是否參與溫泉保健理療的作用機制。

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<sup>6, 7</sup>。皮表發炎反應有紅(erythema)、腫(edema)、熱(dryness)、痛(pain)、癢(itching)、龜裂(fissures)和剝離(desquamation)等臨床不適症狀<sup>8, 9</sup>。近年來針對醫療美容用的碳酸氫鈉溫泉(Avène spring water)進行一系列的保健理療作用機制研究的結果指出，富含碳酸氫鹽成分的 Avène 溫泉水具有抗發炎反應的理療效果，能緩和各種刺激物(irritants)所引起的皮膚發炎現象<sup>10-12</sup>，作用機轉包括抑制腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor; TNF)<sup>11</sup> 生成和阻斷組織胺(histamine)<sup>13</sup> 及前列腺素(prostaglandins)<sup>12</sup>的釋放。Sulimovic 等人將 Avène 噴霧式溫泉水直接噴灑在臨床

雷射手術後的病患皮膚上，能有效減輕病患雷射手術後的紅腫、癢、刺痛(stinging)和緊繃(tightening)的不適症狀，和可加速皮膚組織的傷口癒合(wound healing)速率<sup>14</sup>。Portales 等人發現，Avène 溫泉水對異位性皮膚炎(atopic dermatitis)和牛皮癬(psoriasis)有治癒療效<sup>15</sup>，而 Cezanne 等人則認為 Avène 溫泉水能增加細胞膜的流動性，具有細胞生物學上的意義<sup>16</sup>。無論如何，皮膚組織的保護性極易受到自由基的攻擊而損傷，紫外線(ultraviolet radiation; UVR)的直接刺激作用，是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)的主要原因<sup>17, 18</sup>。氧分子(O<sub>2</sub>)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自由基(superoxide anion; 'O<sub>2</sub><sup>-</sup>)是體內 ROS 的主要來源<sup>19</sup>。常見的 ROS 有 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical ('OH), alkoxyl radical (ROO')等，是造成皮膚細胞 DNA 突變(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<sup>20</sup>，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<sup>21-26</sup>。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<sup>27</sup>，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)<sup>22, 28</sup>，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<sup>29</sup>。維生素 C、維生素 E<sup>17, 30-32</sup> 和褪黑激素(melatonin)<sup>18, 33, 34</sup>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，Avène 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。

台灣為全球溫泉密度最高的地方，三萬六千餘平方公里的土地上，已有 120

餘處自然湧出的溫泉被發現並命名。根據經濟部水利署委託工研院能資所繪製之台灣溫泉分佈圖，目前台灣自然湧現溫泉有 120 處以上，由工研院繪製圖標示點計有 95 處<sup>35</sup>，其中不乏純淨未受人為污染的碳酸氫鈉溫泉。本研究採用台灣本土純淨未受人為污染的七坑碳酸氫鈉溫泉( $\text{Cl}^-$  6.8 mg/L;  $\text{Br}^-$  0.44 mg/L;  $\text{SO}_4^{2-}$  5.85 mg/L;  $\text{HCO}_3^{2-}$  1140 mg/L;  $\text{SiO}_2$  44.6 mg/L;  $\text{Na}^+$  385 mg/L;  $\text{K}^+$  2.78 mg/L;  $\text{Mg}^{2+}$  5.20 mg/L;  $\text{Ca}^{2+}$  8.23 mg/L; TDS 1120 mg/L)，作為探討碳酸氫鈉溫泉清除氫氧自由基的作用，希望能進一步說明碳酸氫鈉溫泉人體保健的作用機制。

## 二、材料及方法

### (一) 溫泉水樣本 (hydrogen carbonate spring water; HCSW) 的採樣與實驗分組

七坑溫泉共計有九個溫泉露頭，主要露頭的水溫為  $71 \pm 1.0$  °C、pH 值為  $7.4 \pm 0.38$  的中性碳酸氫鈉溫泉，主要離子成分為「 $\text{Cl}^-$  : 6.8 mg/L;  $\text{Br}^-$  : 0.44 mg/L;  $\text{SO}_4^{2-}$  : 5.85 mg/L;  $\text{HCO}_3^{2-}$  : 1140 mg/L;  $\text{SiO}_2$  : 44.6 mg/L;  $\text{Na}^+$  : 385 mg/L;  $\text{K}^+$  : 2.78 mg/L;  $\text{Mg}^{2+}$  : 5.20 mg/L;  $\text{Ca}^{2+}$  : 8.23 mg/L; TDS : 1120 mg/L」。本研究採用七坑溫泉作為探討碳酸氫鈉溫泉清除氫氧自由基的研究素材，主要原因有：

- (1) 位於高雄縣境內的中央山脈群，屬未開發應用型態的自然湧現溫泉，無人為污染問題；
- (2) 水質經工研院檢驗分析，碳酸氫根離子 (1,140 ppm) 含量豐富，屬純淨的碳酸氫鈉溫泉；
- (3) 自然湧出溫泉水量，終年穩定不受季節影響。

採樣方式是以無菌密封的 25 mL 注射針筒直接深入液面下 5 cm 處吸取溫泉水樣本 (hydrogen carbonate spring water; HCSW)，並立即以石臘薄膜密封後置入採樣箱，再送回實驗室進行 HCSW 分析。本研究分別於 94 年 2 月和 94 年 8 月期間進行兩次採樣作業，單次在主要露頭處隨機採 20 個 HCSW，兩次共計採 40 個 HCSW 樣本數。進行水樣本研究分析前，事先將水樣本通過 0.22  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾後，再進行溫泉清除自由基能力的研究分析。

## (二) 氢氣自由基的檢測方法

### 1. 氢氣自由基的來源

本研究的氫氣自由基 (hydroxyl radicals;  $\cdot\text{OH}$ ) 來源是以雙氧水和金屬離子共同反應所產生 (Fenton reaction) ，本研究試驗所使用的藥品試劑皆購買自 Sigma 公司。實驗進行前，事先配製 2 倍濃度的試劑，冷藏備用，包括：

- (1) pH 7.4 Tris 酸鹼緩衝液；
- (2) 100 mM Fe-EDTA 試劑；
- (3) 1 M 雙氧水；
- (4) 100 mM 水楊酸液；
- (5) 溫泉水樣本稀釋溶液 (以 Tris 酸鹼緩衝液稀釋) ；
- (6) 維生素 C (vitamin C) 和褪黑激素 (melatonin) 溶液；
- (7) 層析液：成分為 75 mmol/L monochloroacetic acid, 0.7 mmol/L disodium EDTA, 1.5 mmol/L sodium 1-octanesulphonate and 45 mL/L acetonitrile，並調整層析液 pH 值為 3.0。

### 2. Fenton 反應試驗

本方法根據 Teismann 和 Ferger 於 2000 年所提出的方法再加法修訂使用<sup>36</sup>。首先，將 HCSW 原液和 Tris 酸鹼緩衝液以 0:1, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000 方式稀釋至總體積為 0.9 mL 以備用。 $\cdot\text{OH}$  產生反應步驟是分別取事先配製的 100 mM Fe-EDTA 試劑和 1M 雙氧水試劑，各 50  $\mu\text{L}$  加到預備稀釋好成 0.9 mL 的水樣本中，在室溫中靜置 1 分鐘後，立即加入 50  $\mu\text{L}$  的水楊酸液(100 mM)，在 37°C 下反應 15 分鐘，立即進行 2,3-DHBA(2,3-dihydroxybenzoic acid) 和 2,5-DHBA (2,5-dihydroxybenzoic acid) 的生成量檢測。以下為 Fenton 反應和 DHBA 生成的反應公式：

- (1)  $\text{Na}_2\text{EDTA} + \text{FeCl}_3 \rightarrow \text{Fe}^{2+}\text{-EDTA complex} + \text{NaCl}$  Fe-EDTA reagent
- (2)  $\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA complex} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-EDTA complex} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$

### Fenton reaction



### (三) 氢氧自由基檢測方法

氫氧自由基檢測方式主要是根據水楊酸納 (sodium salicylate) 受到 $\cdot\text{OH}$  水解化後形成的產物 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的原理，用以推算 Fenton 反應的 $\cdot\text{OH}$  產量或檢測 $\cdot\text{OH}$  被清除的總量。Fenton 反應後的水樣本經高效能液態層析儀 (high-performance liquid chromatography)和通過 C18 層析管(PHASE-II ODS 3UM 100 3.2 mm; BAS, St Louis, MO, USA)的層析後，以電化學偵測儀(electrochemical detector)來檢測 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 含量濃度。層析偵測記錄結果以 2,3-DHBA(9.15 min)和 2,5-DHBA(6.08 min)所出現的波峰面積經統計積分後，再與標準液濃度對照換算後表示之。

2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的濃度換算公式如下：

$$\frac{\text{MQ產生的2,3-DHBA或2,5-DHBA濃度} - \text{溫泉樣本產生的2,3-DHBA或2,5-DHBA濃度}}{\text{MQ產生的2,3-DHBA或2,5-DHBA濃度}} \times 100\%$$

### (四) 動物局部發炎反應評估研究

#### (1) 動物分組

本研究將實驗動物分成三小組進行研究工作(表 1)。包括：

1. 控制組(Control group) : Saline 和 Hydrogen carbonate spring water (HCSW)
2. 發炎誘導組(Irritant group) : Hydroxyl radical
3. 治療組(Treated group) : HCSW+ Hydroxyl radical

#### (2) 動物麻醉與手術

實驗期間動物全時以 urethane (1500 mg/kg, ip) 麻醉。單隻動物預計於 4 小時內完成急性發炎反應之實驗，實驗後動物以過量 urethane 安樂死後再進行結果採樣和分析實驗。

#### (3) 局部發炎反應評估

依上述方式將動物分組後，將實驗動物以 urethane (1500 mg/kg, ip) 麻醉後，

將背部毛髮剃除，並將背部區分成 6 區塊，再由股靜脈注入 potamine sky blue (50 mg/kg/0.3mL/rat)，5 分鐘後，將事先準備好的藥劑進行背部皮間(intra dermal injection)，以 1 Ml 注射針筒連接 27G 注射針頭，注入量固定為 0.1 mL，並於注入點以油性筆標記，單隻動物共計注射 6 點，兩種藥劑，全部注射時間控制在 6 分鐘內。注射後老鼠維持在恆溫室內( $30\pm2^{\circ}\text{C}$ ) 1 小時後，將過量的 urethane 注入心臟內安樂死，再進行背部皮膚分離工作，並於分離後以直 1.2 cm 的中空之圓形採樣刀，以注入點為中心採取直徑 1.2 cm 的皮膚發炎樣本，並先行稱重，以測定其發水情形。三個注射點其中以靠尾部最後一點作為 PGE2 分析用，其餘兩點先將之切碎後以 6 mL 的 0.5%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  清除多餘皮脂後，再以 14 mL 的 Acetone 浸泡 3.5 小時，將滲入皮膚組織內的 PSB 色素溶出。低速離心後取上層液在以分光光度儀(HITACHI)，在 OD590 檢測其吸光度，記錄後進行資料統計分析。。

#### (四) 資料統計分析

層析偵測記錄結果以 2,3-DHBA (9.15 min) 和 2,5-DHBA(6.08 min)所出現的波峰面積經軟體統計積分後，再與標準液濃度對照換算後表示之，並使用 *t* 檢定 (Student's *t* test)進行資料統計分析，以  $p<0.05$  表示具統計意義。

### 三、結果分析

#### (一) 溫泉水樣本吸收氫氧自由基能力檢測

以 10 mM 雙氧水經 Fenton 反應誘導氫氧自由基( $\cdot\text{OH}$ )，並藉由水楊酸與  $\cdot\text{OH}$  反應，生成 2,3-DHBA (9.15 min)和 2,5-DHBA (6.08 min)的穩定產物，用以檢測不同稀釋倍數(0, 1, 10, 100, 1000)的碳酸氫鈉溫泉水樣本(hydrogen carbonate spring water; HCSW)清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用(圖 1)。圖 2 顯示，以同等體積的微膜過濾水(Milli-Q water; MQ)作為 Fenton 反應的對照組，並分別採同批檢測水樣本中的 MQ 水樣本所產生的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 濃度，換算溫泉水樣本抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的濃度，進一步推算不同稀釋倍數的 HCSW 吸收

$\cdot\text{OH}$  的能力。結果顯示，HCSW 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  $91.3\pm0.59\%$  及  $95.1\pm0.48\%$ ；1 倍稀釋 HCSW 抑制效果，平均值分別為  $89.2\pm1.35\%$  及  $94.4\pm0.96\%$ ；10 倍稀釋 HCSW 抑制效果，平均值分別為  $83.6\pm1.24\%$  及  $90.4\pm1.33\%$ ；100 倍稀釋 HCSW 抑制效果，平均值分別為  $68.3\pm2.17\%$  及  $70.1\pm3.28\%$ ；1000 倍稀釋 HCSW 抑制效果，平均值分別為 29.8% 及 32.1% (圖 2)。不同時間採樣的 HCSW (2 月和 8 月) 經研究檢測結果發現，不同月份採樣的 HCSW 在清除  $\cdot\text{OH}$  的作用結果並無統計意義 (data not shown)。因此，本研究分析資料僅採用 2 月採樣 HCSW 來進行結果分析。

## (二) 比較 HCSW 與維生素 C 對 $\cdot\text{OH}$ 的吸收能力

採不同濃度的維生素 C 液 (1 mM, 10 mM, 100 mM) 參與 Fenton 反應後，檢測所生成 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的產物，並以同等體積 MQ 相較來表示其吸收  $\cdot\text{OH}$  的能力。檢測不同濃度的維生素 C 溶液 1 mM, 10 mM, 100 mM 對抑制 Fenton 反應所生成的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 能力，1 mM 維生素 C 抑制效果平均值為分別  $3.5\pm4.83\%$  及  $22.7\pm6.64\%$ ；10 mM 維生素 C 抑制效果平均值為分別  $3.39\pm6.78\%$  及  $62.8\pm4.93\%$ ；100 mM 維生素 C 抑制效果平均值為分別  $58.6\pm2.74\%$  及  $67.9\pm3.27\%$  (圖 3)。圖 4 顯示，比較以 10 倍稀釋 HCSW 調製成 10 mM 的維生素混合液及 10 倍稀釋 HCSW 對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果。結果顯示，10 倍稀釋 HCSW 平均抑制效果分別為  $83.6\pm1.24\%$  及  $90.4\pm1.33\%$ ，但維生素混合液對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果，平均值分別為  $-8.4\pm8.43\%$  及  $48.9\pm5.67\%$ ，可見維生素 C 與 HCSW 混合後，阻斷 HCSW 吸收  $\cdot\text{OH}$  的能力 (圖 5)。

## (三) 比較 HCSW 與褪黑激素 (Melatonin) 對 $\cdot\text{OH}$ 吸收能力

採不同濃度的褪黑激素 (1 mM, 10 mM, 100 mM) 參與 Fenton 反應後，檢測所生成 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的產物，並以同等體積 MQ 相較來表示其吸收  $\cdot\text{OH}$  的能力。檢測不同濃度的褪黑激素溶液 1 mM, 10 mM, 100 mM，對抑制

Fenton 反應所生成的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 能力，1 mM 褪黑激素抑制效果平均值為分別  $3.0\pm2.83\%$  及  $11.5\pm6.44\%$ ；10 mM 褪黑激素抑制效果平均值為分別  $63.2\pm4.36\%$  及  $76.3\pm2.39\%$ ；100 mM 褪黑激素抑制效果平均值為分別  $94.9\pm3.45\%$  及  $93.6\pm1.77\%$  (圖 4)。圖 5 顯示，比較以 10 倍稀釋 HCSW 調製成 10 mM 褪黑激素混合液及 10 倍稀釋 HCSW 對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果，結果顯示，10 倍稀釋 HCSW 平均抑制效果分別為  $83.6\pm1.24\%$  及  $90.4\pm1.33\%$ ，褪黑激素混合液對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的抑制效果，平均值分別為  $92.7\pm2.89\%$  及  $91.8\pm1.54\%$ ，可見褪黑激素與 HCSW 混合後，褪黑激素吸收 $\cdot\text{OH}$ 的能力有明顯被增強作用(圖 5)。

#### (四) HCSW 對抗 $\cdot\text{OH}$ 誘導膚發炎反應能力

本研究初步結果顯示，不同濃度 Fenton reactive solution( $\cdot\text{OH}$  solution)呈現不同程度的動物皮發炎情形，相對於 $\cdot\text{OH}$  solution，相同體積(0.1 mL)之 saline 和 HCSW 只有引起相當輕微的發炎現象。近一步比較 saline+ $\cdot\text{OH}$  和 HCSW+ $\cdot\text{OH}$  之混合液引起的動物皮膚發炎反應結果顯示， $\cdot\text{OH} + \text{HCSW}$  表現出強效的抗 $\cdot\text{OH}$  發炎現象，除了背皮膚評估有效外，對於足部而耳部的抗發炎反應仍呈現一致性，由此可見，本溫泉水具吸收氫氧自由基能力，亦呈現相對應性的抗氫氧自由基引起的發炎現象(圖 6)。

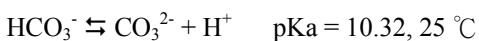
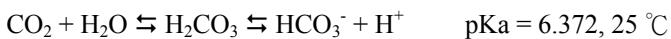
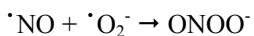
## 四、討論

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<sup>37, 38</sup>。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<sup>39</sup>，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<sup>40, 41</sup>。氧分子( $\text{O}_2$ )在粒線體電子傳遞鏈(mitochondrial electron transport chain)上不完全轉移而形成的過氧化陰離子(supraoxide anion;  $\cdot\text{O}_2^-$ )是生物體內 $\cdot\text{OH}$  的主要來源<sup>19</sup>。而 Fenton 反應誘發的 $\cdot\text{OH}$

則是體外研究常用的模式，藉由 Fenton 反應產生的 $\cdot\text{OH}$  可進一步與水楊酸反應，並形成 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的穩定型態產物。2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 可使用高效能液態層析儀配合電化學偵測儀在實驗室準確檢測生成濃度，以推算 Fenton 反應所生成的 $\cdot\text{OH}$ <sup>36, 40</sup>。因此，本研究選用體外 Fenton 反應系統，檢測碳酸氫鈉溫泉水樣本(hydrogen carbonate spring water; HCSW)清除 $\cdot\text{OH}$  的作用。

本研究首次提出 HCSW 具有清除 $\cdot\text{OH}$  的作用，研究採用未受污染的七坑碳酸氫鈉溫泉，進行清除 Fenton 反應衍生的 $\cdot\text{OH}$  能力檢測。不同稀釋倍數的 HCSW 具明顯清除 $\cdot\text{OH}$  能力，且原液效果優於 100 mM 維生素 C 和 100 mM 褪黑激素對 $\cdot\text{OH}$  的清除作用。HCSW 清除 $\cdot\text{OH}$  的作用受維生素 C 所干擾而下降，但與褪黑激素合用則有增強褪黑激素清除氫氧自由基的作用。

Jensen 和 Csizmadia 最近提出碳酸氫根離子( $\text{HCO}_3^-$ )化學結構上具有轉移 $\cdot\text{OH}$  的能力，可吸收 $\cdot\text{OH}$  形成 $[\text{HCO}_3^-, \text{HO}]$  的過渡化合物形態，有效阻斷 $\cdot\text{OH}$  造成的細胞破壞作用，減少氧化壓力(oxidative stress)所造成的生物體傷害<sup>42</sup>。本研究推測 HCSW 吸收 $\cdot\text{OH}$  的作用機轉可能來自其豐富的碳酸氫根離子( $\text{HCO}_3^-$ )。透過  $\text{HCO}_3^-$  與 $\cdot\text{OH}$  反應，而間接消耗 $\cdot\text{OH}$  的含量。雖然  $\text{HCO}_3^-$  在光照、強酸溶液<sup>43</sup>、一氧化氮自由基( $\cdot\text{NO}$ )或 $\cdot\text{OH}$  共存的情形下，結果也可能產生碳酸根自由基( $\cdot\text{CO}_3^-$ )。雖然 $\cdot\text{CO}_3^-$  對細胞仍存在有毒性作用，但在體液環境或鹼性的水溶液中，大部份  $\text{HCO}_3^-$  會和  $\text{H}_2\text{CO}_3$  相互平衡，形成緩衝液形態，而不是形成 $\cdot\text{CO}_3^-$ <sup>44</sup>，此種碳酸緩衝液在生物體內可扮演良好的 $\cdot\text{NO}$  和 $\cdot\text{OH}$  的緩衝效果，並有效分解 $\cdot\text{NO}$  和 $\cdot\text{OH}$  形成無毒性的  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ，降低這些毒性更高的自由基直接對細胞的傷害作用<sup>45</sup>。 $\text{HCO}_3^-$  在各種不同條件下的反應公式，詳列於下：



水溶性維生素 C 具多重臨床保健療效，不僅具有抗氧化作用，在生物體內也證實具有阻抗自由基的能力，降低細胞脂質和蛋白質被自由基氧化的情形<sup>17, 31, 32, 46</sup>。無論如何，近年來研究對維生素 C 的抗氧化作用出現不同的論調，在不同濃度和金屬離子共存的條件下，維生素 C 可能扮演著抗氧化物(antioxidant)或氧化先驅物(pro-oxidant)的雙重角色，當  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  濃度太高或維生素 C 太低時，維生素 C 扮演氧化先驅物角色<sup>47, 48</sup>。反之，當金屬離子濃度過低，而維生素 C 濃度提升時，此時維生素 C 具有抗氧化作用，能有效清除各種氧系自由基<sup>49</sup>。本研究結果顯示，維生素 C 對 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的形成有不同的結果，對 2,5-DHBA 呈現劑量依賴性(dose-dependent)的抑制生成作用，但對 2,3-DHBA 的生成則需高達 100 mM 才有明顯的抑制效果(圖 3)。進一步研究發現，以 10 倍 HCSW 所製備的 10 mM 維生素 C 溶液，能阻抗 10 倍稀釋 HCSW 本身對·OH 的吸收作用(圖 5)。Jansson 等人在研究含銅成分的自來水時也發現，維生素 C 能催化增加自來水的·OH 生成量，若在自來水中額外加入  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (100 mg/L)，能誘發·OH 的生成量提高 3 倍以上，作者認為  $\text{H}_2\text{CO}_3$  能促使維生素 C 由抗氧化型態轉變成氧化先驅物型態，反有效提升了 Fenton 的反應速率<sup>50</sup>。本研究發現 HCSW 與維生素 C 混合液阻斷 HCSW 吸收·OH 的能力，符合 Jansson 等人的結論。根據 Jansson 等人的結論，本研究推論 HCSW 能將維生素 C 由抗氧化型態轉變成氧化先驅物型態，加速 Fenton 反應，而降低 HCSW 吸收·OH 的能力。最近 Jansson 等人發現，pH 值也會影響·OH 的生成速率，若將 pH 值提升到 7.5 以上，則·OH 的生成量會受到抑制，此種中性或鹼性碳酸緩衝液在生物體內可扮演良好的·NO 和·OH 的緩衝效果，並有效分解·NO 和·OH 形成無毒性的是  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ，降低這些毒性更高的自由基直接對細胞的傷害作用<sup>42, 44, 51</sup>。無論如何，Suh 等人研究維生素 C 在體外 Fenton 反應系統扮演角色的結論指出，在體外 Fenton 反應系統中的維生素 C 的確扮演氧化先驅物的角色，但體內血清試驗結果，仍支持體內的維生素 C 扮演重要的抗氧化作用，能有效降低·OH 對脂質和蛋白質的傷害<sup>52</sup>。

褪黑激素在生物體內扮演有許多生理功能，最近研究更發現褪黑激素具有明顯對抗氧化壓力<sup>53</sup>和清除自由基的特性，能有效降低體內和體外的·NO 和·OH 含量<sup>54-56</sup>。Ryoo 等人指出，褪黑激素能有效抑制紫外線對皮膚細胞膜的過氧化作用和防止紫外線誘導細胞從 G<sub>0</sub> 進入 G<sub>1</sub> 之細胞分裂週期 (cell cycle pre-G1 arrest)，預防紫外線的直接傷害作用<sup>18</sup>。褪黑激素抗氧化壓力的主要作用機制可能來自褪黑激素特定的化學結構<sup>57</sup>，使其成為強效的自由基清除者，特別對於·OH 的清除能力<sup>58-60</sup>。圖 4 顯示，褪黑激素的確能有效清除 Fenton 反應生成的·OH，並且和 HCSW 混合後清除·OH 的能力有被增強的作用，相同濃度的褪黑激素吸收·OH 的能力明顯優於維生素 C，即使和含 NaHCO<sub>3</sub> 量豐富的七坑溫泉混合，仍呈現強效清除氫氧自由基的作用，可見褪黑激素是強力的抗氧化物 (antioxidant)，但不會出現維生素 C 的氧化先驅物(pro-oxidant)副作用。

總結本研究結果顯示，HCSW 明顯具有清除·OH 的作用，且效果優於 100 mM 維生素 C 和 100 mM 褪黑激素對·OH 的清除作用，但其清除·OH 的作用會受維生素 C 所干擾而下降，但與褪黑激素合用則有增強褪黑激素清除氫氧自由基的作用，結果能提供作為解釋碳酸氫鈉溫泉浸泡的人體保健功效。近一步抗氫氧自由基發炎反應評估研究初步結果顯示，本溫泉水具吸收氫氧自由基能力，亦呈現相對應性的抗氫氧自由基引起的發炎現象。

## 五、謝辭

本研究感謝嘉南藥理科技大學提供研究經費與資源協助(CNEE94-01)，並感謝奇美醫院林茂村教授提供實驗室和研究設備的協助，讓本研究得以順利進行，謹此謝忱。

## 六、参考文献

1. Etling J., "Getting down to spa-cifics", Club Management, 81, pp.54-77, 2002.
2. van Tubergen A. and S. van der Linden, "A brief history of spa therapy", Annals of the Rheumatic Diseases, 61, pp.273-275, 2002.
3. Tei C., Y. Horikiri, J. C. Park, J. W. Jeong, K. S. Chang, Y. Toyama and N. Tanaka, "Acute hemodynamic improvement by thermal vasodilation in congestive heart failure", Circulation, 91, pp.2582-2590, 1995.
4. Kurabayashi H., K. Tamura, J. Tamura and K. Kubota, "The effects of hydraulic pressure on atrial natriuretic peptide during rehabilitative head-out water immersion", Life Sciences, 69, pp.017-021, 2001.
5. Konlian C., "Aquatic therapy: making a wave in the treatment of low back injuries", Orthopaedic Nursing, 18, pp.11-18, 1999.
6. Ortiz K. J. and J. A. Yiannias, "Contact dermatitis to cosmetics, fragrances, and botanicals", Dermatologic Therapy, 17, pp.264-271, 2004.
7. Rietschel R. L., "Clues to an accurate diagnosis of contact dermatitis", Dermatologic Therapy, 17, pp.224-230, 2004.
8. Clough G., "Experimental models of skin inflammation", Clinical & Experimental Allergy, 29, pp.105-108, 1999.
9. Wahlgren C. F., "Itch and atopic dermatitis: an overview", Journal of Dermatology, 26, pp.770-779, 1999.
10. Alirezai M., K. Vie, P. Humbert, P. Valensi, L. Cambon and P. Dupuy, "A low-salt medical water reduces irritancy of retinoic acid in facial acne", European Journal of Dermatology, 10, pp.370-372, 2000.
11. Boisnic S., M. C. Branchet-Gumila and C. Segard, "Inhibitory effect of Avene spring water on vasoactive intestinal peptide-induced inflammation in surviving human skin", International Journal of Tissue Reactions, 23, pp.89-95, 2001.
12. Joly F., M. Charveron, M. F. Aries, J. Bidault, L. Kahhak, F. Beauvais and Y. Gall, "Effect of Avene spring water on the activation of rat mast cell by substance P or antigen", Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology, 11, pp.111-116, 1998.
13. Joly F., L. Galoppin, P. Bordat, H. Cousse and E. Neuzil, "Calcium and bicarbonate ions mediate the inhibition of mast cell histamine release by Avene spa water", Fundamental & Clinical Pharmacology, 14, pp.611-613, 2000.
14. Sulimovic L., D. Licu, E. Ledo, J. M. Naeyaert, P. Pigatto, C. Tzermias, J. Vasquez Doval and P. Dupuy, "Efficacy and safety of a topically applied Avene spring water spray in the healing of facial skin after laser resurfacing", Dermatologic Surgery, 28, pp.415-418, 2002.

15. Portales P., M. F. Aries, D. Licu, J. Pinton, C. Hernandez-Pion, Y. Gall, P. Dupuy, M. Charveron and J. Clot, "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, pp.234-242, 2001.
16. Cezanne L., F. Gaboriau, M. Charveron, P. Morliere, J. F. Tocanne and L. Dubertret, "Effects of the Avene spring water on the dynamics of lipids in the membranes of cultured fibroblasts", *Skin Pharmacology*, 6, pp.231-240, 1993.
17. McArdle F., L. E. Rhodes, R. Parslew, C. I. A. Jack, P. S. Friedmann and M. J. Jackson, "UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: Effects of oral vitamin C supplementation", *Free Radical Biology & Medicine*, 33, pp.1355-1362, 2002.
18. Ryoo Y. W., S. I. Suh, K. C. Mun, B. C. Kim and K. S. Lee, "The effects of melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts", *Journal of Dermatological Science*, 27, pp.162-169, 2001.
19. Aust S. D., C. F. Chignell, T. M. Bray, B. Kalyanaraman and R. P. Mason, "Free radicals in toxicology", *Toxicology & Applied Pharmacology*, 120, pp.168-178, 1993.
20. Gonzalez S. and M. A. Pathak, "Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by polypodium leucotomos", *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 12, pp.45-56, 1996.
21. Tanaka S., T. Sato, N. Akimoto, M. Yano and A. Ito, "Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro", *Biochemical Pharmacology*, 68, pp.433-439, 2004.
22. Ichihashi M., M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru and T. Horikawa, "UV-induced skin damage", *Toxicology*, 189, pp.21-39, 2003.
23. Berneburg M., H. Plettenberg and J. Krutmann, "Photoaging of human skin", *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 16, pp.239-244, 2000.
24. Sander C. S., H. Chang, F. Hamm, P. Elsner and J. J. Thiele, "Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis", *International Journal of Dermatology*, 43, pp.326-335, 2004.
25. Nishigori C., Y. Hattori, Y. Arima and Y. Miyachi, "Photoaging and oxidative stress", *Experimental Dermatology*, 12, pp.18-21, 2003.
26. Matsumura Y. and H. N. Ananthaswamy, "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin", *Toxicology & Applied Pharmacology*, 195, pp.298-308, 2004.
27. Moysan A., P. Clement-Lacroix, L. Michel, L. Dubertret and P. Morliere,

- "Effects of ultraviolet A and antioxidant defense in cultured fibroblasts and keratinocytes", Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 11, pp.192-197, 1996.
28. Podda M., M. G. Traber, C. Weber, L. J. Yan and L. Packer, "UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin", Free Radical Biology & Medicine, 24, pp.55-65, 1998.
  29. Darr D. and I. Fridovich, "Free radicals in cutaneous biology", Journal of Investigative Dermatology, 102, pp.671-675, 1994.
  30. Kalka K., H. Mukhtar, A. Turowski-Wanke and H. Merk, "Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation", Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology, 13, pp.143-149, 2000.
  31. Chen K., J. Suh, A. C. Carr, J. D. Morrow, J. Zeind and B. Frei, "Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload", American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism, 279, pp.E1406-E1412, 2000.
  32. Jurkovic P., M. Sentjurc, M. Gasperlin, J. Kristl and S. Pecar, "Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions", European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 56, pp.59-66, 2003.
  33. Lee K. S., W. S. Lee, S. I. Suh, S. P. Kim, S. R. Lee, Y. W. Ryoo and B. C. Kim, "Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture", Experimental & Molecular Medicine, 35, pp.263-268, 2003.
  34. Maharaj D. S., S. Anoopkumar-Dukie, B. D. Glass, E. M. Antunes, B. Lack, R. B. Walker and S. Daya, "The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals." Journal of Pineal Research, 32, pp.257-261, 2002.
  35. 經濟部，溫泉資源保育與產業發展整體計畫，台灣，經濟部水利署, 2004.
  36. Teismann P. and B. Ferger, "The salicylate hydroxylation assay to measure hydroxyl free radicals induced by local application of glutamate in vivo or induced by the Fenton reaction in vitro", Brain Research Protocols, 5, pp.204-210, 2000.
  37. Alexeyev M. F., S. P. Ledoux and G. L. Wilson, "Mitochondrial DNA and aging", Clinical Science, 107, pp.355-364, 2004.
  38. Junqueira V. B., S. B. Barros, S. S. Chan, L. Rodrigues, L. Giavarotti, R. L. Abud and G. P. Deucher, "Aging and oxidative stress", Molecular Aspects of Medicine, 25, pp.5-16, 2004.
  39. Stadtman E. R., "Importance of individuality in oxidative stress and aging", Free

- Radical Biology & Medicine, 33, pp.597-604, 2002.
- 40. Kehrer J. P., "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity", Toxicology, 149, pp.43-50, 2000.
  - 41. Fridovich I., "Oxygen toxicity: a radical explanation", Journal of Experimental Biology, 201, pp.1203-1209, 1998.
  - 42. Jensen S. J. K. and I. G. Csizmadia, "Hydroxyl radical piggybacking on hydrogen carbonate", Chemical Physics Letters, 341, pp.633-637, 2001.
  - 43. Czapski G., S. V. Lymar and H. A. Schwarz, "Acidity of the carbonate radical", The Journal of Physical Chemistry A, 103, pp.3447-3450, 1999.
  - 44. Augusto O., M. G. Bonini, A. M. Amanso, E. Linares, C. Santos and S. L. De Menezes, "Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology", Free Radical Biology & Medicine, 32, pp.841-859, 2002.
  - 45. Pryor W., J. N. Lemercier, H. Zhang, R. M. Uppu and G. L. Squadrito, "The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxynitrite", Free Radical Biology & Medicine, 23, pp.331-338, 1997.
  - 46. Drake I. M., M. J. Davies, N. P. Mapstone, M. F. Dixon, C. J. Schorah, K. L. White, D. M. Chalmers and A. T. Axon, "Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals", Carcinogenesis, 17, pp.559-562, 1996.
  - 47. Carr A. and B. Frei, "Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological condition?" FASEB Journal, 13, pp.1007-1024, 1999.
  - 48. Collis C. S., M. Yang, A. T. Diplock, T. Hallinan and C. A. Rice-Evans, "Effects of co-supplementation of iron with ascorbic acid on antioxidant-pro-oxidant balance in the guinea pig", Free Radical Research, 27, pp.113-121, 1997.
  - 49. Nappi A. J. and E. Vass, "Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols", Biochmica et Biophysica Atca, 1336, pp.295-301, 1997.
  - 50. Jansson P. J., K. U. M. Asplund, J. C. Makela, C. Lindgvist and T. Nordstrom, "Vitamin C (Ascorbic Acid) Induced Hydroxyl Radical Formation in Copper Contaminated Household Drinking Water: Role of Bicarbonate Concentration", Free Radical Research, 37, pp.901-905, 2003.
  - 51. Liao C. H., S. F. Kang and F. A. Wu, "Hydroxyl radical scavenging role of chloride and bicarbonate ions in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process", Chemosphere, 44, pp.1193-1200, 2001.
  - 52. Suh J., B. Z. Zhu and B. Frei, "Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide." Free Radical Biology & Medicine, 34, pp.1306-1314, 2003.

53. Reiter R. J., D. X. Tan, C. Osuna and E. Gitto, "Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress", *Journal of Biomedical Science*, 7, pp.444-458, 2000.
54. Tan D. X., L. D. Chen, B. Poeggeler, L. C. Manchester and R. J. Reiter, "Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger", *Endocrine Journal*, 1, pp.57-60, 1993.
55. Roberts J. E., D. N. Hu and J. F. Wishart, "Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin", *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 42, pp.125-132, 1997.
56. Stasica P., P. Ulansku and J. M. Rosiak, "Melatonin as a hydroxyl radical scavenger", *Journal of Pineal Research*, 25, pp.65-66, 1998.
57. Horstman J. A., M. Z. Wrona and G. Dryhurst, "Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical", *Bioorganic Chemistry*, 30, pp.371-382, 2002.
58. Hardeland R., R. J. Reiter, B. Poeggeler and D. X. Tan, "The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances", *Neuroscience Biobehavior Review*, 17, pp.347-357, 1993.
59. Stasica P., P. Paneth and J. M. Rosiak, " Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: A computational study", *Journal of Pineal Research*, 2, pp.125-127, 2000.
60. Tan D. X., L. C. Manchester, R. J. Reiter, B. F. Plummer, L. J. Hardies, S. T. Weintraub, X. X. Vijayalaxmi and A. A. M. Shepherd, "A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of in vivo hydroxyl radical generation", *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 253, pp.614-620, 1998.

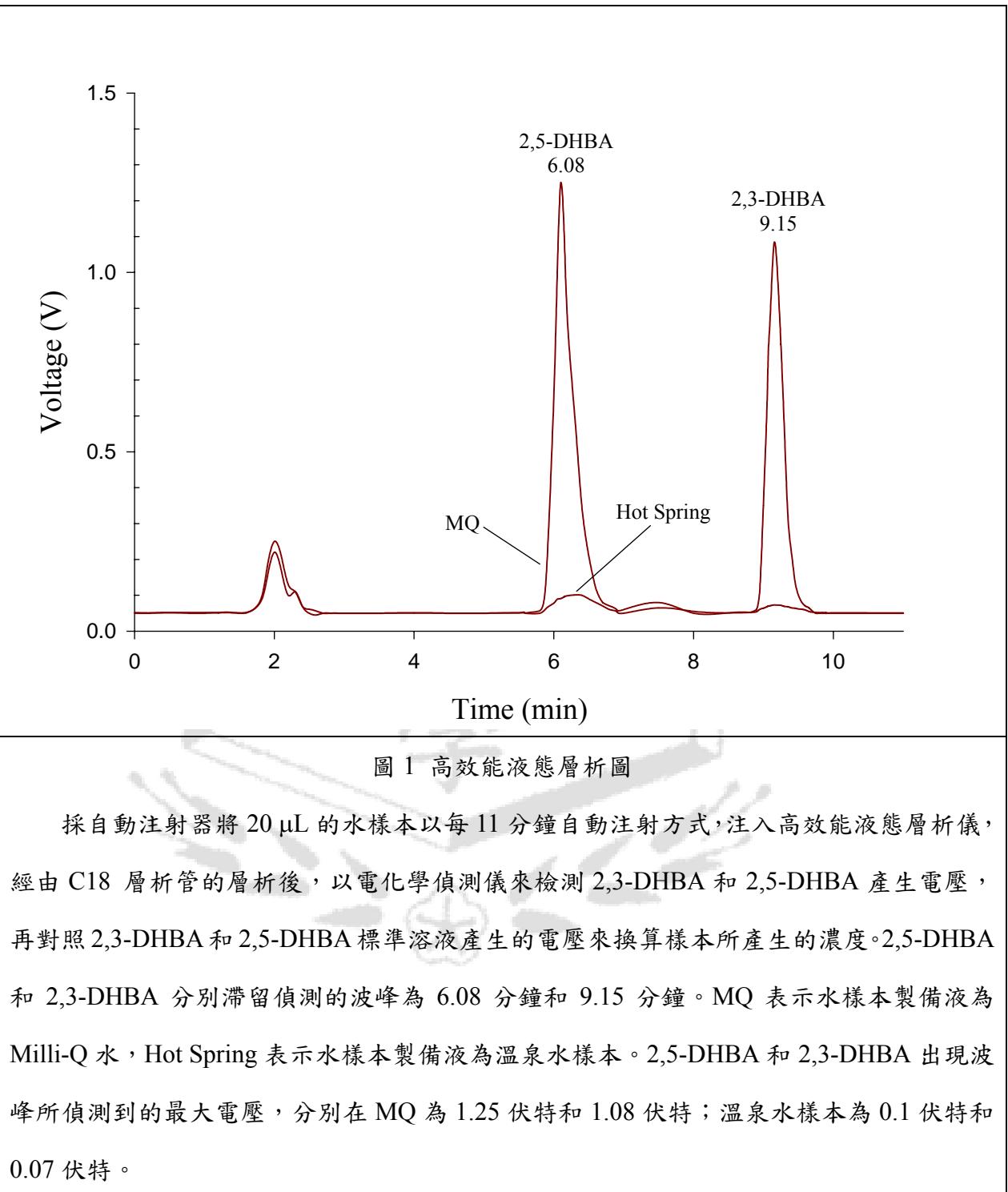


圖 1 高效能液態層析圖

採自動注射器將  $20\text{ }\mu\text{L}$  的水樣本以每 11 分鐘自動注射方式，注入高效能液態層析儀，經由 C18 層析管的層析後，以電化學偵測儀來檢測 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 產生電壓，再對照 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 標準溶液產生的電壓來換算樣本所產生的濃度。2,5-DHBA 和 2,3-DHBA 分別滯留偵測的波峰為 6.08 分鐘和 9.15 分鐘。MQ 表示水樣本製備液為 Milli-Q 水，Hot Spring 表示水樣本製備液為溫泉水樣本。2,5-DHBA 和 2,3-DHBA 出現波峰所偵測到的最大電壓，分別在 MQ 為 1.25 伏特和 1.08 伏特；溫泉水樣本為 0.1 伏特和 0.07 伏特。

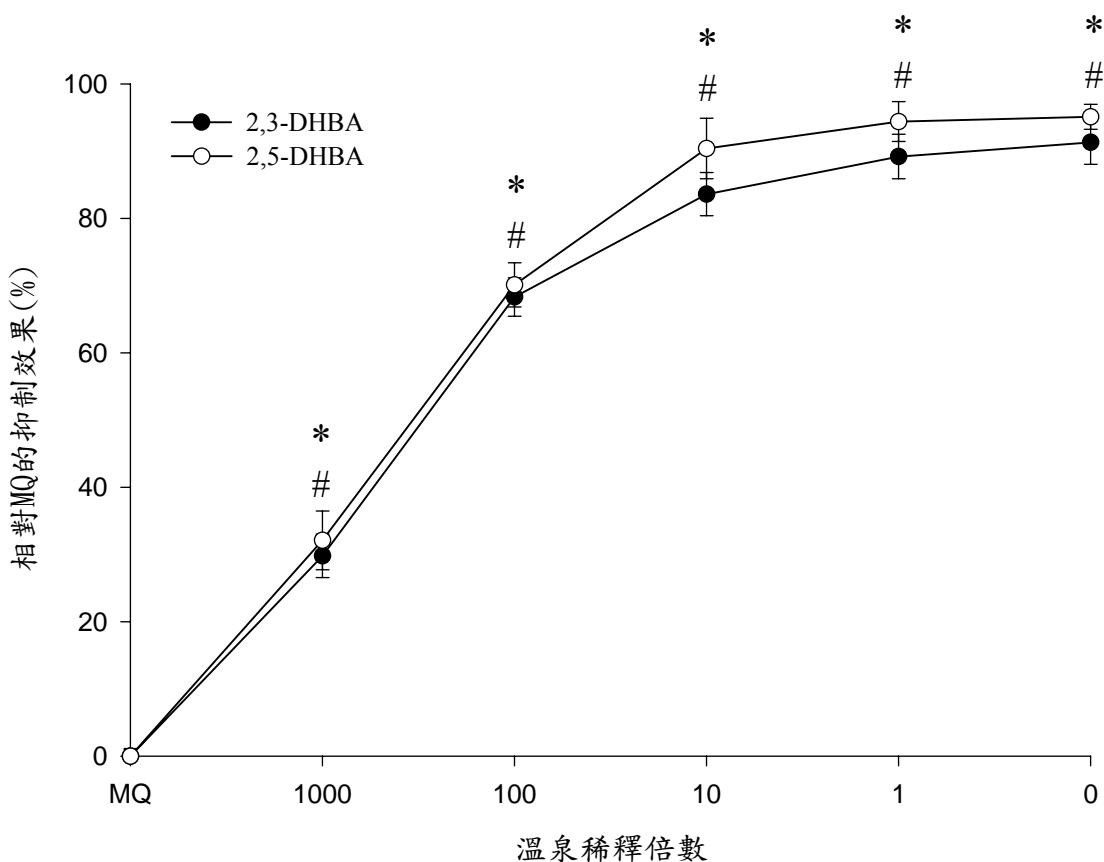


圖 2 不同稀釋倍數的溫泉水樣本對吸收氫氧自由基的作用

研究結果分別採同批檢測水樣本中的 MQ 水樣本所產生的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 濃度，換算同批溫泉水樣本抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的濃度，進一步來推算不同稀釋倍數的溫泉水樣吸收氫氧自由基的能力。圖縱座標以相對 MQ 的抑制百分比來表示溫泉水樣本對氫氧自由基的吸收能力，橫座標表示不同稀釋倍數的溫泉水樣本。資料統計則採原始資料進行 *t* 檢定。以  $p < 0.05$  表示具統計意義，2,5-DHBA 及 2,3-DHBA 分別以「\*」和「#」來表示。各濃度的水樣本數分別為 20 ( $n = 20$ )

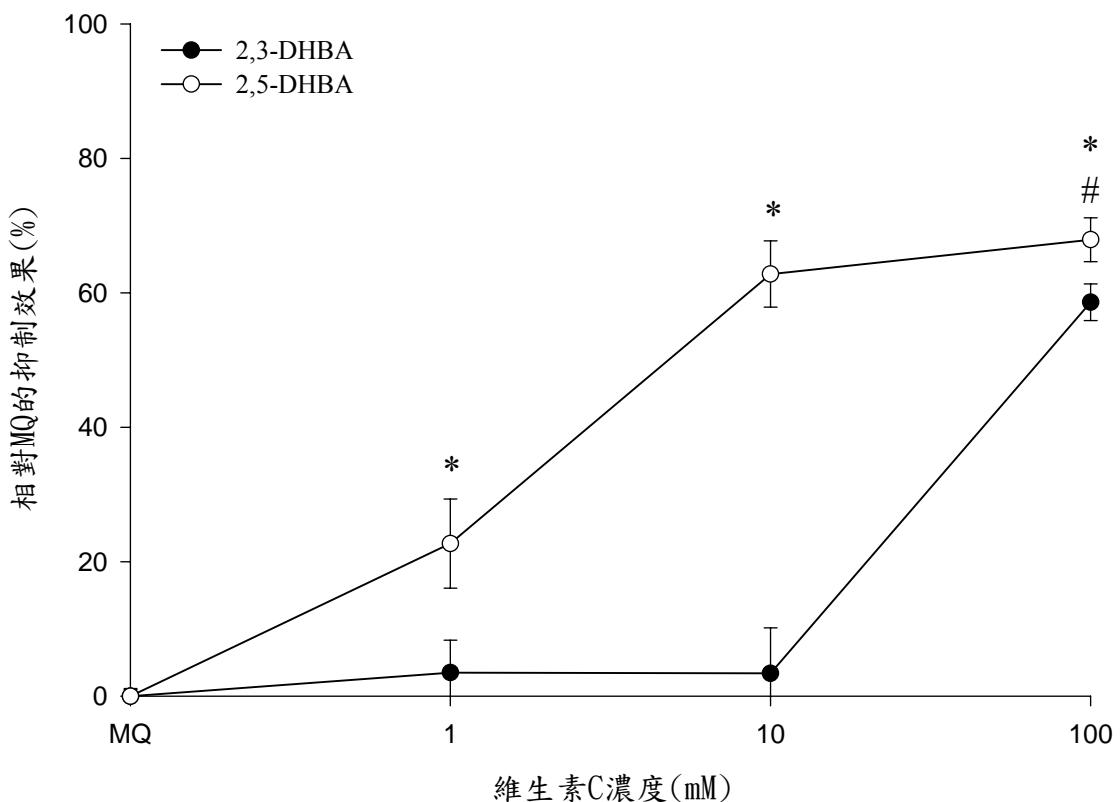


圖 3 不同濃度的維生素 C 溶液對吸收氫氧自由基的作用

研究結果分別採同批檢測水樣本中的 MQ 水樣本所產生的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 濃度，換算同批維生素 C 溶液抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的濃度，進一步來推算不同濃度的維生素 C 溶液對吸收氫氧自由基的能力。圖縱座標以相對 MQ 的抑制百分比來表示溫泉水樣本對氫氧自由基的吸收能力，橫座標表示不同濃度的維生素 C 溶液。資料統計則採原始資料進行 *t* 檢定。以  $p < 0.05$  表示具統計意義，2,5-DHBA 及 2,3-DHBA 分別以「\*」和「#」來表示。各濃度的水樣本數分別為 20 ( $n = 20$ )

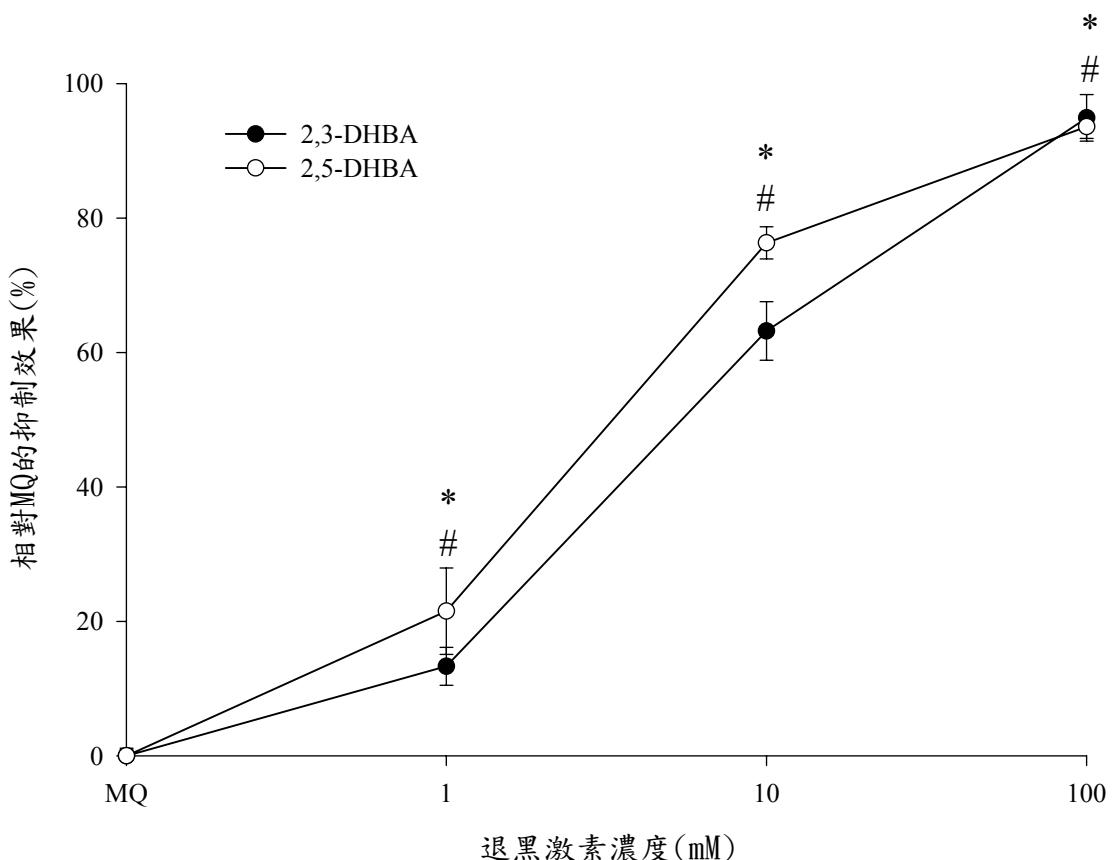


圖 4 不同濃度的褪黑激素溶液對吸收氫氧自由基的作用

研究結果分別採同批檢測水樣本中的 MQ 水樣本所產生的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 濃度，換算同批褪黑激素溶液抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的濃度，進一步來推算不同濃度的褪黑激素溶液對吸收氫氧自由基的能力。圖縱座標以相對 MQ 的抑制百分比來表示溫泉水樣本對氫氧自由基的吸收能力，橫座標表示不同濃度的褪黑激素溶液。資料統計則採原始資料進行 *t* 檢定。以  $p < 0.05$  表示具統計意義，2,5-DHBA 及 2,3-DHBA 分別以「\*」和「#」來表示。各濃度的水樣本數分別為 20 ( $n = 20$ )

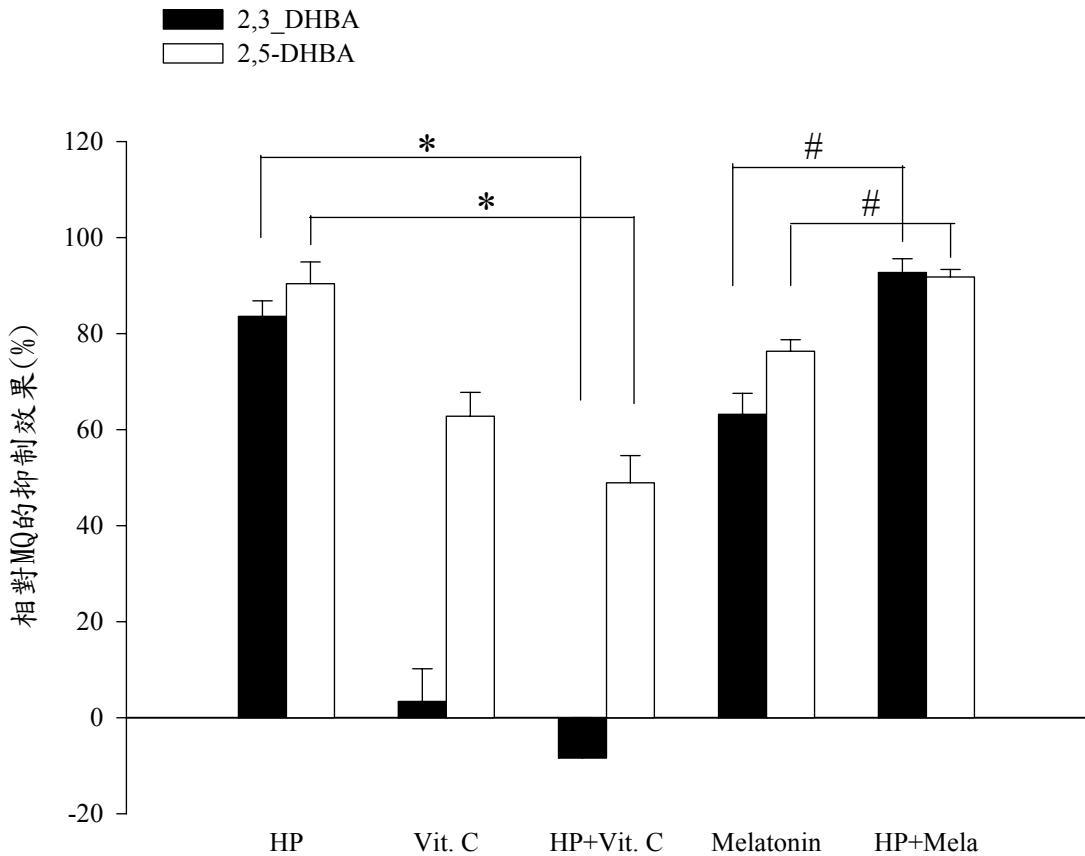


圖 5 比較溫泉與溫泉混合液對吸收氫氧自由基的作用

研究結果分別採同批檢測水樣本中的 MQ 水樣本所產生的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 濃度，換算同批水樣本抑制 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 生成的濃度，進一步來推算水樣本對吸收氫氧自由基的能力。圖縱座標以相對 MQ 的抑制百分比來表示溫泉水樣本對氫氧自由基的吸收能力，橫座標表示不同濃度的褪黑激素溶液。資料統計採換算百分比後的資料進行 *t* 檢定。以  $p < 0.05$  表示具統計意義，「HP 與 HP+Vit. C」和「Melatonin 與 HP+Mela」分別以「\*」和「#」來表示。各濃度的水樣本數分別為 20 ( $n = 20$ )

HP:10 倍稀釋溫泉水樣本

Vit. C: 10 mM 維生素 C 溶液

HP+Vit. C: 以 10 倍稀釋溫泉水樣本配製成 10 mM 維生素 C 溶液

Melatonin: 10 mM 褪黑激素溶液

HP+Mela: 以 10 倍稀釋溫泉水樣本配製成 10 mM 褪黑激素溶液

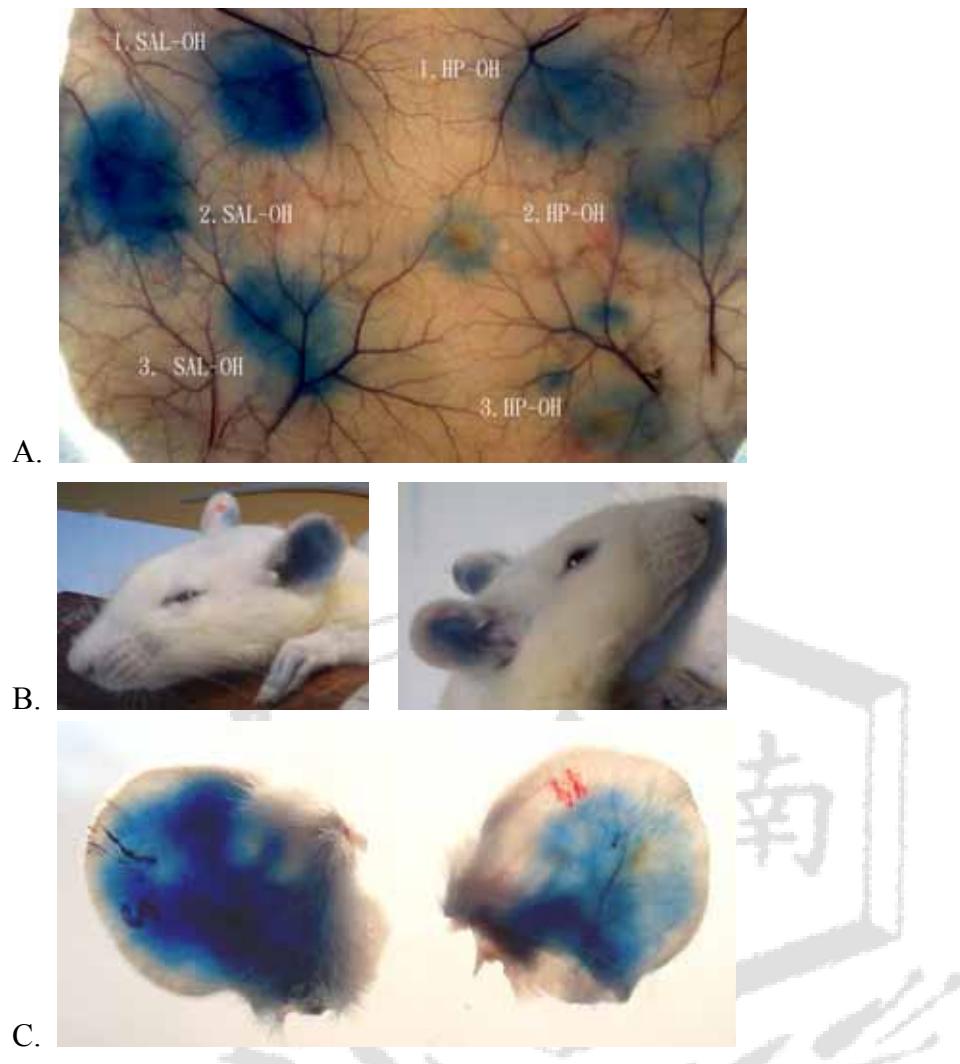


圖 6 溫泉抗氫氧自由基發炎反應評估

- A. 比較 SAL 和 HP 對氫氧自由基誘發發炎反應的抑制作用：SAL-OH 表示 Saline-hydroxyl radical mixed solution，HP-OH 表示 Hot spring -hydroxyl radical mixed solution，1-3 表示注射順序；
- B. 鼠耳發炎反應評估：左圖為 SAL-OH 注射耳朵，右圖為 HP-OH 注射耳朵；
- C. 犺牲後鼠耳發炎反應比較：S 表示 SAL-OH 注射耳朵；H 表示 HP-OH 注射耳朵。