

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(1)—類黃酮素之活性評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：陳榮秀

共同主持人：林清宮

計畫參與人員：

執行單位：化粧品科技研究所

中華民國 94 年 02 月 20 日

一、摘要：

在文獻及往年研究發現天然物中含有豐富之類黃酮素、異黃酮素，此類其藥理作用部分已確認，但在化粧品之應用仍不足，故本計畫以類黃酮素及相關衍生物檢測其抗氧化活性，希望能將此類成分開發在化粧品之應用上。

本計畫使用之黃酮素或類黃酮的成分，包括 Catechin、EGCG、Quercetin、Myricetin 等，分別進行各項抗氧化效果之評估，方法包含 DPPH、NO 清除等。結果顯示其濃度在 $100 \mu\text{M}$ 時，清除 DPPH 能力均大於 80 %；而一氧化氮清除能力則以 Myricetin 效果最好，同時也具有酪胺酸酶抑制能力，因此未來開發化粧品時可考慮此類成分。

二、前言：

基於實驗環境分析設備的利用性以及研發者的興趣，有很多很複雜的方法來評估自由基活性。在缺乏任何自由基活性測定的黃金標準，三種主要的方法已被運用：(1) 內源性抗氧化劑濃物的測定、(2) 氧化性聚分子產物的測定、(3) 自由基的直接偵測。為了分析內源性抗氧化劑能力，大部分的研究已經在血漿及細胞測定抗氧化劑濃度(例如：vitamin E、C、carotenoids、folate、GSH 和 zinc)以及細胞的抗氧化酵素的活性(例如 glutathion reductase、SOD、catalase 和 glutathione peroxidase)。因為 GSH 可由自由基和其他活性氧快速地氧化成 GSSG，而且 GSSG 會從細胞被釋出，所以，細胞內 $[\text{GSSG}]:[\text{GSH}]$ 的比例可以提供氧化壓力一項參考指標。

脂質過氧化的評估包含分析脂質過氧化、isoprostanes、diene conjugates 以及脂質裂解的產物(例如 malonaldehyde、ethane、pentane 和 4-hydroxynonenal)。在這些產物中，malonaldehyde 是時常被用來當作脂質過氧化可靠的標的物。為了測定活性氧所誘發的蛋白質氧化，大部分研究者已經測定醣蛋白產生中蛋白質內游離硫基團的喪失，以及蛋白質鍵結酪胺酸殘基的硝酸反應。事實上蛋白質硝基酪氨酸已被廣泛當作穩定標地物，用於活性氮中心氧化劑的產生(例如一氧化氮及過氧化亞硝鹽)。特殊的 DNA 鹼基氧化的產物，例如：

8-hydroxydeoxyquanosine、5-OH cytosine、8-OH adenine、8-OH quinine 以及 thymine glycol 已經被測定出時常用來評估 DNA 鹼基的氧化反應。重要的是，尿液中 8-hydroxydeoxyguanosine 成分在人體和動物上，可以提供有用的非侵犯性的來評估整體的 DNA 鹼基氧化反應。另一方面自由基直接的偵測已經可以利用電子自旋技術及電子捕捉儀而呈現，但此技術是適於偵測自由基在溶液化學上，對於生物組織的應用上仍有限制。總之，雖然測抗氧化的方法很多，不過以簡便性而言，仍以 DPPH 及 NO 清除率最為簡易。

三、材料與方法：

1. 一氧化氮濃度的測定

I、試劑的配置

SNP 儲存溶液(Stock solution):

精稱適量 SNP 粉末溶於 ddH₂O 至最終濃度為 100mM，分裝後儲存於-20
冰箱，實驗中置於冰上慢慢解凍以維持其活性。

II、測定方法

a. 備好不同濃度之樣品於 1.5ml eppendorf 中，每個均加入 5mM SNP 溶液 (Sample solution)，另外取一個空 eppendorf 加入 5mMSNP 溶液(Positive control)，置於室溫，在 2.5 小時於各自不同濃度的 eppendorf 取樣定量一氧化氮之濃度。

b. 每個樣品取 50μl 加入 96 well ELISA reader plate 中，再加入 50μl Griess reagent，然後置於室溫 10 分鐘。

c. 利用 ELISA reader 波長 540nm 偵測吸光值此方法主要測定 NO₂-(NO 會變成穩定的 NO₂⁻)，共作三次。

d. 一氧化氮產生的清除率：

由實驗結果所測得的值，可利用下列公式計算其抑制率：

Nitric Oxide Scavenging Percentage(%)

$$=((\text{Positive control Abs}-\text{Sample solution Abs})/\text{Positive control Abs})*100\%$$

2. 清除 1,1-二苯基-2-苦味氫基團(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH)自由基能力測定：

I、試劑的配置(stock solution preparation)

DPPH 乙醇溶液：

精秤適量 DPPH 粉末溶於乙醇溶液至最終濃度為 20mg/l，冷暗藏保存。

II、測定方法：

a.取 375 μ L 之不同濃度之乙醇溶液，分別加入配製好之 20mg/ml DPPH 乙醇溶液 750 μ L，呈深紫藍色，混合均勻，反應 0-30 分鐘。

b.以分光光度計，在 517nm 波長下，測定其吸光值。（DPPH 自由基清除能力 %=[（控制組在 517nm 下吸光值—試樣在 517nm 下吸光值）/控制組在 517nm 下吸光值] x 100）

3. 酪胺酸酶活性抑制的測定 (Assay of Tyrosinase Inhibitory Activity)

I、試劑的配置(stock solution preparation)

a. 酪胺酸緩衝溶液(Tyrosine Buffer Solution)：

精稱 0.5 克酪胺酸(L-Tyrosine)，加入磷酸緩衝溶液(PBS)定量至 100 毫升，混合後靜置 30 分鐘，取上清液。

b. 酪胺酸酶水溶液(Tyrosinase Solution):

將酪胺酸酶(Tyrosinase, 3216 unit/mg) 溶於緩衝液至最終濃度為 2mg/ml，分裝後儲存於-20 度冰箱，要用時置於冰上慢慢解凍以維持其活性。

II、測定方法

a. 取 100 μ l 待測濃度加入 900 μ l 酪胺酸溶液(B)及 5 μ l 酪胺酸酶(E)，另外取 1000 μ l 酪胺酸溶液(B)同樣加入 5 μ l 酪胺酸酶(E)當負向空白對照組以及 1000 μ l 酪胺酸溶液(B)當正向空白對照組，充分混合十分鐘後置入 37 度的恆溫循環水浴箱(water bath)中 1 小時。

b.每個樣品取 100 μ l 加至 96 well ELISA reader plate，利用 ELISA reader 波

長 450nm 偵測吸光值，共作三次。

c. 酪胺酸酶活性的抑制率：

由實驗結果所測得 B，B+E，S+B+E，S+B 的 Abs 值，可利用下列公式計

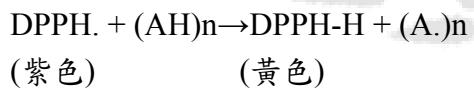
算其抑制率：

$$\text{Tyrosinase inhibition}(\%) = ((\text{BE}-\text{B})-(\text{SBE}-\text{SB})/(\text{BE}-\text{B})) * 100\%$$

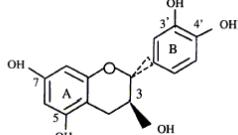
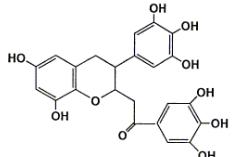
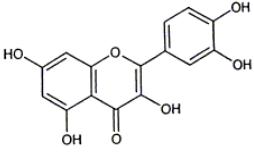
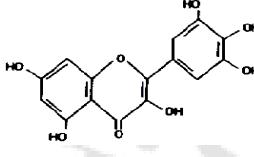
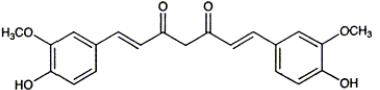
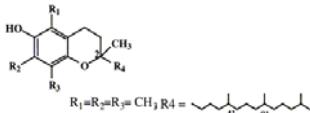
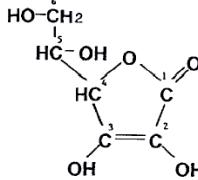
四、結果與討論：

我們利用 Griess reaction 來探討一氧化氮清除能力，一氧化氮(nitric oxide)的產生，是從 SNP 與氧反應形成亞硝酸(nitrite)的累積。在表中明顯顯示一氧化氮清除效果 myricetin>quercetin, EGCG>Catechin。myricetin 具有較佳的一氧化氮作用，推測其結構中，氫氧基團(OH)具有還原一氧化氮自由基能力，使自由基變成非自由基而達到清除的目的。由此可見含有氫氧基團對於自由基的清除作用具有很大的影響力，至於詳細的機制就更待進一步的研究了。

為了評估一氧化氮的抑制是否與自由基的清除有相關性，於是利用 DPPH 自由基清除試驗來評估其功能。研究指出 DPPH 的機轉可由下列方程式表示：



研究顯示減少 DPPH 的吸光值，是由於酚類化合物的結構中，提供了氫原子給 DPPH 自由基，因此酚類化合物中的氫氧基團扮演清除的重要角色。尤其是黃酮類化合物 A 環中 3,5-氫氧基團、B 環中若含有 catechol 基團(o-dihydroxyl)及 C 環的 2,3-雙鍵與 4-oxo 構型時，會增加 DPPH 自由基的清除。本實驗較佳的 DPPH 清除劑中，大多含有四到八個不等的氫氧基團，是具備清除活性的原因。總結，myricetin 在抑制酪胺酸酶、DPPH、NO 清除方面，均有不錯的效果。顯示氫氧基團之數目及位置均扮演重要角色。

Compounds (100 μ M)	Scavenging effect of DPPH free radical production	Scavenging effect of nitric oxide	Inhibitory effect of tyrosinase activity
Flavanol compounds			
Catechin		97.99±0.23	29.53±1.29
EGCG		93.86±3.66	33.57±4.93
Flavonol compounds			
Quercetin		96.44±0.00	18.57±1.83
Myricetin		85.13±5.94	37.92±4.78
Other compounds			
Curcumin		87.55±3.43	17.68±1.88
-Tocopherol		95.96±2.06	4.37±0
Ascorbic acid		82.22±18.29	12.46±1.56
N, no effect up to a concentration of 100 μ M.			

*The value ± SE obtained from three separate experiments are shown.

五、參考文獻：

1. April CS, Jackson IJ, and Kidson SH. Molecular cloning and sequence analysis of a chicken cDNA encoding tyrosinase-related protein-2/DOPAchrome tautomerase. *Gene* 219: 45-53, 1998.
2. Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437, 1996.
3. Evans P and Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 Suppl 2: S67-74, 2001.
4. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann NY Acad Sci* 893: 13-18, 1999.
5. Fuchs J, Mehlhorn RJ, and Packer L. Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates. *J Invest Dermatol* 93: 633-640, 1989.
6. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, and Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 591-593, 1997.
7. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, and Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47: 357-362, 2001.
8. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, and Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 879-886, 1999.
9. Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc* 58: 1001-1006, 1999.
10. Johnson MK and Loo G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 459: 211-218, 2000.
11. Kahkonen MP, Hopia AI, and Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49: 4076-4082, 2001.
12. Kahraman S and Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg* 84: 1127-1129, 1997.
13. Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, and Hirobe M. Real time measurement of nitric oxide produced ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. *J Biol Chem* 268: 23106-23110, 1993.
14. Lass A, Suessenbacher A, Wolkart G, Mayer B, and Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol Pharmacol* 61: 1081-1088, 2002.
15. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, and Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 47-52, 2002.
16. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108: 652-659, 2000.
17. Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, and Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1425: 189-203, 1998.

18. No JK, Soungh DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, and Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci* 65: PL241-246, 1999.
19. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, and Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med* 25: 1057-1065, 1998.
20. Olivares C, Garcia-Borron JC, and Solano F. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 41: 679-686, 2002.
21. Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brightenti F, and Pietta P. Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *J Agric Food Chem* 48: 732-735, 2000.
22. Perez-Gilabert M and Garcia Carmona F. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 48: 695-700, 2000.
23. Pfeiffer S, Schrammel A, Koesling D, Schmidt K, and Mayer B. Molecular actions of a Mn(III)Porphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger: reaction with nitric oxide and direct inhibition of NO synthase and soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53: 795-800, 1998.
24. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, and Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 103: 1547-1560, 1999.
25. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiss C, Strauer BE, Feelisch M, and Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest* 109: 1241-1248, 2002.
26. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, and Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 801-803, 1998.
27. Squadrito GL and Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 25: 392-403, 1998.
28. Sreejayan and Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49: 105-107, 1997.
29. Sun JS, Hang YS, Huang IH, and Lu FJ. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Radic Biol Med* 20: 107-112, 1996.
30. Szabo A, Hake P, Salzman AL, and Szabo C. Beneficial effects of mercaptoethylguanidine, an inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase and a scavenger of peroxynitrite, in a porcine model of delayed hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 27: 1343-1350, 1999.
31. Timmins GS, dos Santos RE, Whitwood AC, Catalani LH, Di Mascio P, Gilbert BC, and Bechara EJ. Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxy radicals to dioxetane radical intermediates. *Chem Res Toxicol* 10: 1090-1096, 1997.
32. Velazquez E, Tournier HA, Mordujovich de Buschiazzo P, Saavedra G, and Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74: 91-97, 2003.

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(二)-微生物產物之活性評估及配方研發

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：陳榮秀

共同主持人：張德生

計畫參與人員：張德生、邱靖芳

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日

一、摘要：

我們選用土壤中的放線菌所生產的抗生素作為標的物，用以判別微陣列盤是否適合用於篩選出微生物二次代謝產物的培養容器。我們將土讓樣品中所分離的 96 株放線菌，分別在 250 ml 玻璃搖瓶(含有 25 ml 培養基)、15 ml 離心管(含有 1.5 ml 培養基)、每孔容量 2.2 ml 之 96 孔微陣列盤(含有 0.22 ml 培養基)及每孔容量 4.8 ml 之 48 孔微陣列盤(含有 0.48 ml 培養基)中以 200 rpm 轉速室溫震盪培養五天，接著以格蘭氏陽性枯草桿菌測量每管發酵液中是否含有抗生素。結果我們在利用 250 ml 玻璃搖瓶作為發酵培養的實驗組中，篩到七株土壤放線菌其發酵液中具有抗格蘭氏陽性枯草桿菌生長的能力，其中五株同時在 15 ml 離心管及 48 孔微陣列盤亦被篩選出來。另一方面，在利用 96 孔微陣列盤作為發酵培養的實驗組中則僅篩到其中的二株菌。此結果顯示以 48 孔微陣列盤作為篩選培養容器，可同時達到快速且準確的結果。

二、前言：

微生物是地球上生物多樣性中，種類最多的一個族群。伴隨其生長所生產的代謝產物種類更是多采多姿，其中又以許多的微生物二次代謝產物為最複雜且豐富的一群天然化學分子[1]。在眾多的微生物二次代謝產物中，已有許多特殊分子被發現具有特殊的應用價值[2-3]。因此，至今仍有許多科學家專注於篩選最新且有用的微生物二次代謝產物[4]。

然而，針對許多微生物二次代謝產物篩選的工作而言，篩選效率是能夠篩到所需要特殊功能微生物的最重要因素之一。大部分的微生物二次代謝產物篩選的工作都是將由樣品所分離出來的微生物在玻璃搖瓶中進行發酵，接著再從玻璃搖瓶中取出發酵液進行所欲篩選的生物活性分析。對於上述的篩選流程，雖然篩選的準確性高，但是最大的缺點是其篩選效率不高。在產業界中，或許可由大量設備(整層搖瓶培養室)及人力(操作員)加以克服，但是對於學術研究中，以增加大量的設備及人力來增加篩選效率卻是很困難並不切實際的方法。

針對上述問題，我們嘗試利用微陣列盤加以改善。若將由樣品所分離出來的微生物在微陣列盤中進行發酵，接著再從微陣列盤中進行生物活性分析，則整個篩選程序的效率可以增加。然而，將培養容器由玻璃搖瓶改成微陣列盤，由於培養容器不同，造成環境如溶氧值(DO value)、混合時間(Mixing time)、磨差壓力(Shearing stress)等因素改變，進而影響所篩選培養的微生物生產其二次代謝產物的能力[5]。因此，本研究選用土壤中的放線菌所生產的抗生素作為標的物，將土讓樣品中所分離的 96 株放線菌，分別在玻璃搖瓶、離心管、96 孔微陣列盤及 48 孔微陣列盤中進行培養，並且比較彼此篩選的正確性。結果我們發現以 48 孔微陣列盤作為篩選培養容器，可同時達到快速且準確的結果。

三、材料與方法：

3.1 材料

儀器：震盪器、白金環棒、酒精燈、震盪培養箱、八爪與單爪吸取器。

材料：1.5 ml 離心管、藥杓、牙籤、L型玻棒、每孔容量 2.2 ml 之 96 孔微陣列盤、每孔容量 4.8 ml 之 48 孔微陣列盤、微量吸管、乙醇、石蠟膜、1.5 ml 無菌離心管。

溶液備製：6%酵母萃取液及 0.05%SDS、無菌水、酒精、AI plate (per liter:
Sodium caseinate 2.0g/ Sodium propionate 4.0g/ Asparagine
0.1g/ K₂HPO₄ 0.5g/ MgSO₄ 0.1g/ FeSO₄ 1mg/ Nalidixic acid 20mg
/ Cycloheximide 50mg/ Agar 15g/ pH7.2)、GYM medium (per liter:
Glucose 4.0g/ Yeast extract 4.0g/ Malt extract 10.0g/ pH7.2)。

3.2 土壤菌株分離

樣品收集方法是以藥杓將欲採集土壤表面下方 2-3 公分之土壤，裝入無菌 1.5 ml 離心管中，帶回實驗室中進行下一步驟菌株分離。土壤樣品來自於北二高各處休息站之土壤，包括有新化、東山、古坑、南投、清水及西湖等 6 處，共 6 種樣品，採集日期為 93 年 4 月 17 日。

採回的樣品接著進行樣品前處理步驟：將土壤樣品懸濁於 1.0 ml 的 6% 酵母萃取液及 0.05% 的 SDS 中，置於恆溫 40°C 震盪器攪拌使其均勻懸浮二小時。將前處理完成之樣品，靜置數分鐘使大顆粒沉降底部後，取上清液以無菌水做一系列稀釋後(10^{-2} , 10^{-4})，分別取原液及稀釋液 100 ul 塗佈於分離培養基(AI plate)中，置於室溫五天，等待菌落形成。

3.3 分離菌株發酵培養

利用滅過菌的牙籤將 2.2 步驟所得到的 96 個單一菌落分別挑至含有 2.0 ml GYM 發酵培養基的 15 ml 離心管中，置於室溫震盪培養箱培養 2 天。

接著將初培養完成的 96 株分離菌株分別以十分之一的接菌量接種至含有 25 ml GYM 發酵培養基的 250 ml 玻璃搖瓶、含有 1.5 ml GYM 發酵培養基的 15 ml 離心管、含有 0.22 ml GYM 發酵培養基的 96 孔微陣列盤及含有 0.48 ml GYM 發酵培養基的 48 孔微陣列盤中，以 200 rpm 轉速於室溫震盪培養五天，接著進行抗生素生產測試。

3.4 抗生素生產測試

將過夜培養完成的格蘭氏陽性枯草桿菌與等倍體基滅過菌置於恆溫 45°C 的種層洋菜膠(0.75% agar)快速混合均勻後，倒入預先準備好含有底層洋菜膠(1.5% agar)的培養皿中，置於無菌台上 30 分鐘待其凝固，進行下一步驟。

將 2.3 步驟中所得到的分離菌株之發酵液以滅過菌之牙籤沾濕後插入上述所置備之含有格蘭氏陽性枯草桿菌的測試培養皿中，如此將所有分離菌株在不同容器培養所得之發酵液按不同組別以編號次序依序插上測試培養皿中，最後將所有牙籤拔除，並將測試培養皿置於 37°C 過夜培養後觀察培養皿中是否有透明圈。

(clear zoom)形成，並紀錄各組中有形成透明圈的分離菌株編號。同時觀察其所形成透明圈的大小。此步驟實驗需重複三次。

四、 結果

4.1 土壤菌株分離

為了有效自土壤中分離出放線菌，我們使用放線菌專用的分離培養基(actinomycete isolation agar, AI agar) [6]。在所取樣的每個土壤樣品中，最少可以分離出 100 株菌株，最多可以分離出超過 1000 株菌株。其中可以發現自古坑及南投休息站所取得的土壤為富含有機質的黑土，可以分離出最多的放線菌。此外，雖然使用放線菌專用的分離培養基作為菌株分離之用，但是仍有少數的黴菌生長。但不致影響往後的實驗，因為本實驗總共須 96 株放線菌。為了分散篩選樣本，我們分別自每個土壤樣品中挑選 16 株共 96 株菌株作為往後實驗用。

表一：各種培養容器所篩選出具有抗格蘭氏陽性枯草桿菌生長的分離放線菌菌株編號

培養容器 菌株編號	250 ml 玻 璃搖瓶	15 ml 離 心管	96 孔微陣 列盤	48 孔微陣 列盤
No. 2	+	+	-	-
No. 14	+++	+	-	+
No. 28	+++	+	+	+
No. 29	+++	+	+	+
No. 31	+	-	-	-
No. 73	+	+	-	+
No. 90	+	-	-	+

+++：平均透明圈半徑大於 1 mm。

+：平均透明圈半徑小於 1 mm。

-：肉眼無法辨識具有形成之透明圈。

4.2 分離菌株發酵培養及抗生素生產測試

將所分離之 96 株土壤放線菌於不同的容器進行發酵培養，並進行二次代謝物抗生素生產的篩選實驗，結果如表一所示。在利用 250 ml 玻璃搖瓶作為發酵培養的實驗組中，我們篩到七株土壤放線菌其發酵液中具有抗格蘭氏陽性枯草桿菌生長的能力，其中有三株分離菌株之發酵液具有較強的抗菌能力。另外，利用 15 ml 離心管及 48 孔微陣列盤亦分別自該七株菌中篩出五株。另一方面，在利用 96 孔微陣列盤作為發酵培養的實驗組中則僅篩到其中的二株菌。

若將上述各組所篩選到的菌株數目以 250 ml 玻璃搖瓶該組作為基準，可以算出各種培養容器之相對篩選正確率，如表二所示。其中，以 15 ml 離心管及 48 孔微陣列盤作為發酵篩選的培養容器，其相對篩選正確率均可達到 70 %以上。然而使用 96 孔微陣列盤作為發酵篩選的培養容器，其相對篩選正確率則僅剩下不到三成。

表二：各種培養容器之相對篩選正確率^a

	250 ml 玻璃搖瓶	15 ml 離心管	96 孔微陣列盤	48 孔微陣列盤
相對正確率	100.0 %	71.4 %	28.5 %	71.4 %

a：相對篩選正確率計算以該組所篩出的菌株數目除以 250 ml 玻璃搖瓶該組所篩的菌株數目，並換算為百分比。

由上述結果可以推測，以 250 ml 玻璃搖瓶作為發酵培養，其所提供的環境因子如溶氧值、混合時間等因素比較適合微生物生產二次代謝產物。特別是菌株編號 14、28 及 29 等三株篩選菌，僅在以 250 ml 玻璃搖瓶作為發酵培養的條件下可以表現出高抗菌效果的結果。此外，由於大部分的放線菌為非常耗氧的細菌，因此 250 ml 玻璃搖瓶應該可以提供較大的氧氣質傳速率(kLa value)，也因此其中的放線菌生長較好，進而增加往後的二次代謝產物生成。然而，將培養容器由玻璃搖瓶改成 96 孔微陣列盤，由於培養容器不同，造成環境改變，進而影響所篩選培養的微生物生產其二次代謝產物的能力。

五、討論：

本研究結果顯示以 48 孔微陣列盤作為篩選培養容器，可同時兼顧快速且準確的菌株篩選需求。若針對所欲篩選分析的生物活性，可以利用呈色法或測量濁度法而在微陣列盤適用的分光光度計如 elisa reader 或 micro plate reader 下進行操作，則整套大量快速篩選之操作程序可以依序在不同的微陣列盤下完成：先利用 48 孔微陣列盤進行初級與生產發酵培養，再利用 96 孔免疫螢光盤進行生物活性測試。我們認為此大量快速之篩選平台有助於提高學術界在篩選菌株時之篩選效率。

六、參考文獻：

1. Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc Natl Acad Sci USA 98:12215-12220
2. Thompson CJ, Fink D, Nguyen LD (2002) Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. Genome Biol 3:1-4
3. Doekel S, Marahiel A (2001) Biosynthesis of natural products on modular peptide synthetases. Metabol Engineer 3:64-77
4. Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, Gonzalez A,

- Genilloud O (2003) Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. J Appl Microbiol 95:814-823
5. Challis GL, Hopwood DA (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proc Natl Acad Sci USA 100:14555-61
 6. Difco laboratories: Bacto-actinomycete isolation agar. Code 0957 (1962) In Difco Supplementary Literature. Difco Lab., Detroit USA.



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化粧品中抗氧化能力之有效性評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC-01 子計畫(3)

執行期間：93 年 1 月 1 日至 933 年 12 月 31 日

總計畫主持人：陳榮秀

子計畫主持人：楊朝成

計畫參與人員：楊朝成、林小菁、羅苓瑜

執行單位：化粧品科技研究所

中華民國 94 年 02 月 28 日

摘要

本研究主要篩選黃耆、枸杞、何首烏及杜仲等四種知名中草藥，利用不同有機溶劑萃取後，藉由 TEAC 與 DPPH 抗自由基測試法評估其抗氧化能力評估。實驗結果顯示何首烏之乙醇溶液部分抗氧化能力最強($IC_{50} = 4.60 \text{ ppm}$)(與 Trolox 效果相似)，另外，黃耆之乙醇溶液部分、何首烏之丁醇溶液部分、杜仲之乙醇溶液部分、枸杞 LCE 之乙醇溶液部分也有不錯的抗氧化效果。

前言

永保年輕、美麗是每一個女人共通的夢想，永遠青春、活力也是所有男人同樣的願望。可是隨著年齡增長，不管是男人或是女人，都會隨著年齡而在身體內外留下歲月痕跡，逐漸老化。這是多麼令人傷心失望的現實。老化的確是不能避免的必然過程，但為何有些人老得快，還不到六十歲，卻像七十幾歲一般；而有些人卻老得慢，明明是已快八十了，卻還常常被誤認為六十幾歲，可見老化的速度是因人而異的。這些因素某部分雖有其遺傳關係，但這其中最大差異性與其日常生活、飲食等習慣有密切關連。

目前還不是十分瞭解老化的確切機轉，但已知道和過氧化物有重要的關係。人體活動中，會不斷地吸入氧氣、代謝養分，以產生人體生活所需之能量，然而在吸入氧氣代謝養分過程中也會不斷產生過氧化物，這過氧化物具有強烈氧化其他物質能力，因此可被用來消滅入侵的病毒或細菌，也可對抗體內正常細胞突變後所產生之癌症細胞；可是過多的過氧化物也會破壞身體組織，如破壞皮膚的膠原纖維，皮膚喪失膠原纖維的功能後，便會失去彈性和保水能力，皺紋也因而產生。過氧化物也會氧化血液中之低密度膽固醇，而氧化後之低密度膽固醇很容易蓄積在動脈血管壁內，造成動脈硬化。

現在許多文獻報導指出，過氧化物所產生之體內自由基(Free radical)就是身體老化的最主要原因。然而身體中抗氧化酵素可以中和掉這些多餘有害的自由基，但是隨著年齡增加，人體內自身抗氧化酵素的活性也會愈來愈差，因此，隨著年齡增長，從自然界攝取抗氧化成分以提昇抗氧化能力，減緩老化發生，是所有健康美化產生所致力追求的目標。

抗老化化妝品為當今化妝產品之主流，由於許多化學合成添加物常會有副作用發生，因此，現在含天然中草藥抗老化天然產品已蔚為時尚主流產品。為了尋求有效抗自由基能力之中草藥，我們本計畫先選黃耆(Astragali Radix)、枸杞(Lycium Chinese Mill)、何首烏(Polygoni Multiflori Radix)、杜仲(Eucommiae Cortex)等四種知名中草藥，利用有機溶劑萃取法，萃取其混合成分，再利用 TEAC 法及 DPPH 法之抗氧化測試其溶在不同溶劑的成分，探討其抗氧化能力。

結果與討論

一、中草藥有效成分之萃取：

首先我們將黃耆(AM)、枸杞(LC)、何首烏(PM)及杜仲(EU)等四種知名中草藥曬乾後，分別取 1 公斤利用乙醇(Ethanol)加熱迴流萃取，濃縮後再分別用正己烷(Hexane)、乙醇(Ethanol)、丁醇(Butanol)及水(Water)等四種不同極性溶劑再次分別溶解，濃縮後依其溶在不同溶液分別標為 AMH、AME、AMB、AMW、LCH、LCE、LCB、LCW、PMH、PME、PMB、PMW、EUH、EUE、EUB 及 EUW 等十六部分成分。

二、抗氧化能力測試：

1. TEAC 法之抗氧化試驗：主要作用原理為利用 Azino-bis (3-ethylbenzthiaoline)-6-sulfonic acid (簡稱 ABTS) 在水溶液中經雙氧水及過氧化酵素 (Peroxidase) 於暗室中反應一小時，呈現穩定之藍綠色 (ABTS 自由基顏色)，加入抗氧化中草藥萃取成分，反應十分鐘後，測 OD 734 nm 吸光值，並與 Trolox (水溶性維生素 E 衍生物) 作抗氧化能力之比較。
2. DPPH 法抗氧化試驗：DPPH 為一種最簡易之抗自由基方法測試，主要利用 2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl 化合物在乙醇溶液中能自行產生穩定之自由基，並呈現紫色反應，加入抗自由基成分後，利用 ELISA 判讀 OD 540 nm 其吸光值，測試其抗氧化能力。

三、抗氧化測試結果：

我們將四種中草藥不同溶劑萃取成分，分別配置不同濃度之 DMSO 溶液中，分別利用 TEAC 法及 DPPH 法測試其抗氧化能力，並求出 TEAC 法之 IC₅₀ 之濃度。其結果如下表所示：

表(一) 黃耆(AM)、枸杞(LC)、何首烏(PM)及杜仲(EU)之抗氧化能力：

Sample	TEAC 100ppm	TEAC 50ppm	TEAC IC50	DPPH 100ppm	DPPH 50ppm
EUH	6.34 %	-	-	5.07 %	2.91 %
EUE	94.77 %	88.64 %	27.04 ppm	46.35 %	30.55 %
EUB	60.09 %	59.07 %	67.63 ppm	19.22 %	7.82 %
EUW	12.91 %	-	-	2.31 %	5.29 %
LCH	X	-	-	X	X
LCE	87.57 %	81.78 %	32.30 ppm	28.61 %	14.31 %
LCB	69.26 %	61.04 %	75.9 ppm	22.28 %	17.73 %
LCW	26.56 %	-	-	4.99 %	3.65 %
PMH	5.34 %	-	-	4.62 %	1.64 %
PME	98.95 %	99.90 %	4.60 ppm	89.72 % IC50:11.20ppm Trolox IC50:8.0 ppm	87.33 %
PMB	99.57 %	99.16 %	25.07 ppm	55.37 %	33.61 %
PMW	55.43 %	56.29 %	-	21.83 %	11.92 %
AMH	1.23 %	-	-	2.16 %	5.73 %
AME	96.53 %	95.52 %	20.62 ppm	34.13 %	24.88 %
AMB	58.04 %	52.76 %	-	8.79 %	2.16 %
AMW	14.50 %	-	-	6.48 %	X
Trolox*	10 ppm 61~69%	5 ppm 51~54%	5.56 ppm	10 ppm 73.97%	5 ppm 46.35%

註 1. “-“表為測試。

2. “X”表測試值為負值。

四、 討論：

實驗中，以 DPPH 方式，其中以 PME(何首烏的乙醇溶解成分)最為有效(IC 50 = 11.20 ppm)，與水溶性維生素 E(Trolox)(IC50 = 8.0ppm)差不多；其餘效果並不佳。而 TEAC 法結果顯示：同樣以 PME 效果最佳(IC 50 = 4.60 ppm, Trolox IC 50 = 5.56 ppm)，另外，AME、PMB、EUE、LCE 也有不錯的效果；可以進一步進行單離分析工作，套探討其確實有抗氧化能力之主成分結構。從結果得知 TEAC 法與 DPPH 法所測抗氧化能力並不一致，原因可能是自由基的型態不同所致，由於自由基可能為超氧自由基、氫氧自由基、一氧化氮自由基、碳自由基、、、等不同型態，因此，自然界各抗氧化成分所扮演消除自由基的方式不同，而呈現不同成果。許多文獻報導抗氧化能力評估往往需要測試不同測試方法，以便提供各種有效抗氧化能力之結果；因此，我們實驗室中現在極力在探討 Liposome 系

統、一氧化氮、超微弱發光儀(BJL)等抗氧化能力評估測試法，可以提供更有效抗氧化能力評估篩選方式。

實驗部分

一、中草藥成分萃取：

委由丁秀玉老師幫忙篩選與萃取工作四種中草藥，分別為黃耆、枸杞、何首烏及杜仲，先作基源鑑定後，曬乾，分別取一公斤溶於 10 公升乙醇浸泡加熱迴流 2 天，過濾濃縮，再分別利用正己烷、丁醇、水作分層萃取，收集溶於不同溶液成分之混合濃縮物。

二、抗氧化能力測試：

1. TEAC 法：

- (1). 取 2, 2-azinobis(3-ethylbenz-thiazoline)-6-sulfonic acid(簡寫 ABTS)0.0054 克加入 10 毫升之蒸餾水，配置為 1000 μM 濃度。
- (2). 配置 H_2O_2 500 μM 濃度 10 ml。(30 % H_2O_2 0.06 ml + 9.94 mL H_2O \rightarrow 50 mM；再取 0.1 ml 之 H_2O_2 50 mM + 9.9 ml H_2O \rightarrow 500 μM)。
- (3). Peroxidase 44 unit/ml (sigma P-6782, 1310 unit/ml)：取 0.0025g + 12.4 ml 蒸餾水 配置成 264 unit/ml \rightarrow 再取 2 ml 之 264 unit/ml + 10 ml 蒸餾水 \rightarrow 44 unit/ml。
- (4). 取 250 μl 之 ABTS(1000 μM) + 1.5 ml H_2O + 250 μl 之 H_2O_2 (500 μm) + 250 μl 之 Peroxidase(44 unit/ml)，混合後在暗室反應 1 小時(反應後呈現穩定之藍綠色)。
- (5). 加入不同濃度之待測物 250 μl (DMSO 溶液)，反應 10 分鐘，以分光光度計測 OD 734 nm 之吸光值，並以 Trolox 作標準曲線，求其 IC 50 之抗氧化物之濃度。

2. DPPH 法：

- (1). 配置 20 mg/l 濃度之 DPPH 乙醇溶液，冷藏保存。
- (2). 取不同濃度之待測物 375 μl 之 DMSO 溶液，分別加入於製好之 20 mg/l DPPH 乙醇溶液 750 μl ，混合均勻，靜置 30 分鐘後，以分光光度計測 OD 517 nm 之吸光值，並以 Trolox 作標準曲線，求其 IC 50 之抗氧化物之濃度。

謝誌

感謝嘉南藥理科技大學及教育部經費支持，另外感謝丁秀玉老師的中草藥樣品提供。

參考文獻

1. P. D. Duh, G. C. Yen, W. J. Yen, L. W. Chang, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1455.
2. G. C. Yen, P. D. Duh, H. L. Tsai, S. L. Huang, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, 67, 1215.
3. W. J. Yen, L. W. Chang, C. P. Lee, P. D. Duh, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2002**, 79,

4. B. Fauconneau, P. Waffo-Teguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit, J. M. Merillon, *Life Sci.*, **1997**, *61*, 2103.
5. H. J. Lee, J. W. Seo, B. H. Lee, K. H. Chung, D. Y. Chi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 463.
6. L. Marcocci, J. J. aguire, M. T. Droy-Lefaix, L. Packer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 748.
7. T. L. Wadsworth, D. R. Koop, *Chemico-Biological Interactions*, **2001**, *137*, 43.
8. L. W. Chang, W. J. Ten, S. C. Huang, P.D. Duh, *Food Chem.* **2002**, *78*, 347.



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品之研發—植酸應用於化妝品之研究

計畫類別：個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：

執行期間：93 年 01 月 01 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：楊朝成

共同主持人：呂敏勇

計畫參與人員：賴怡甄

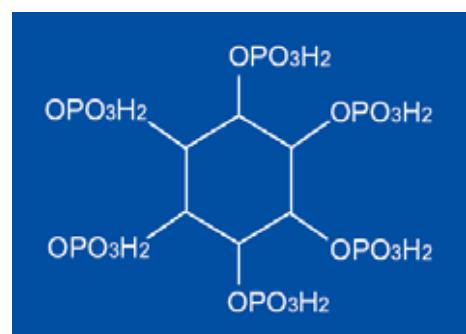
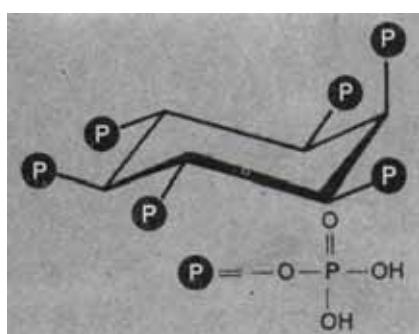
執行單位：化妝品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 28 日

一、前言

皮膚的老化過程主要由兩種原因所造成，一種為自然老化或稱內在老化(intrinsic senescence)，此現象是與生俱來的，由基因所控管；另一種老化為外在老化(extrinsic senescence)，由外在環境因子所造成，例如陽光中紫外線；內在老化無法或很難被人為改變，但外在老化卻可被人為所避免。皮膚老化的過程主要因為表皮層角質細胞(epidermal keratinocytes)及真皮層纖維母細胞(dermal fibroblasts)的增生減緩，造成皮膚內真皮層(dermis)細胞外基質的大分子成份(macromolecular components of the extracellular matrix) [包括膠原蛋白(collagens)、彈性素(elastins)、蛋白多糖(proteoglycans)、葡萄糖胺醣(glycosaminoglycans; hyaluronan 屬於此類)及結構性醣蛋白(structural glycoproteins)]的改變，進而導致皮膚的皺縮、厚度變薄、暗沉、彈性降低及保濕性降低等種種的老化現象(1, 2, 3, 4, 5, 6)。膠原蛋白是人類皮膚真皮層細胞外間質(extracellular matrix)的主要大分子成份(約佔 70%)，其主要的功能是維持真皮層的穩固及對抗外來的壓力，其中 type I (85%)、type III (15%)與 type V (5%)膠原蛋白則是真皮層細胞外基質內主要的膠原蛋白(6)；但隨著年齡的增加或外在環境因子(例如：UV irradiation 與抽煙)的影響，真皮層細胞外基質內的基質金屬螯合蛋白酶(matrix metalloproteinases；MMP)的活性也隨著增加，這些種類眾多的基質金屬蛋白酶的活性增加將造成真皮層細胞外基質內大分子成份被分解，進而引起皺縮、厚度變薄等皮膚的老化現象(1, 2, 3, 4, 5, 7, 8)。其中基質金屬蛋白酶-1 [matrix metalloproteinase-1

(MMP-1)，是一種鋅離子依賴性的內切性勝肽酶(Zn^{2+} -dependent endopeptidase)；也是一種間質性的膠原蛋白酶(interstitial collagenase)，可以導致皮膚真皮層細胞外基質內的膠原蛋白被初步分解成高分子量的膠原蛋白片段(high molecular weight collagen fragments)，而後基質金屬蛋白酶-2 [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)]，是一種明膠酶 A (gelatinase A)]以及基質金屬蛋白酶-9 [matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)]，是一種明膠酶 B (gelatinase B)]，這兩種基質金屬蛋白酶再將上述的高分子量的膠原蛋白片段進一步破壞而瓦解(9, 10, 11)；另一方面，這些由膠原蛋白被基質金屬蛋白酶-1 初步分解而形成的高分子量的膠原蛋白片段存在於真皮層細胞外基質會抑制新膠原蛋白的合成，也會引起真皮層細胞外間質內膠原蛋白的補充不足(12)。所以在真皮層細胞外基質內，基質金屬蛋白酶-1 的蛋白質及活性表現量是一種皮膚老化現象的指標；當然，type I、type II 與 type III 膠原蛋白在真皮層細胞外基質內的含量與合成也是另一個說明皮膚真皮是否老化的因子；因此，與原膠原蛋白(procollagen)新合成相關的 heat shock protein 47 (Hsp47) (13, 14, 15)，它所對應 mRNA 的表現量及蛋白質量，亦是與皮膚老化有關且值得深入探討的重要因素。



在另一方面，六磷酸肌醇(myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate, inositol hexaphosphate, IP₆)，又稱為植酸(phytic acid)，其結構式如上圖所示，它是一種二價金屬離子(例如： Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} 等)的螯合劑(chelator)，容易與金屬離子形成不溶性的化合物(16, 17)；目前已知六磷酸肌醇大量存在於各類穀類種子、豆莢、可榨油的果實(例如：花生)、堅果、孢子及花粉之內，約佔重量之 1~5%，並證實具有抗氧化(antioxidant)及抗腫瘤(antineoplastic)的能力(18)。它擁有獨特的抗氧化能力，可以阻斷自由基(free radical)的形成，並且抑制脂質的過氧化(lipid peroxidation)以及 DNA 的損傷，而可預防心血管疾病罹患危險(19, 20)。近來醫學研究發現植酸本身或在體內代謝而導致去磷酸化(dephosphorylation)，展現其對癌症的抑制與治療效果，諸如大腸癌、結腸癌、直腸癌等(21, 22, 23, 24, 36)。它亦可以藉由降低惡性細胞的增生(malignant cell proliferation)並予消滅，以抑制乳腺癌細胞(mammary carcinoma cells)(25, 26)。另外，如採用高植酸配方膳食時，應注意其可能罹患礦物質缺乏症的危險。因植酸通常與營養上重要的礦物質，諸如，鈣，鎂，銅，鐵，鋅，鈷，錳等，結合(即螯合)而成為植酸鹽(phytate)而妨礙人體吸收金屬離子，以致會降低膳食礦物質(dietary minerals)的生物可利用率(bioavailability)(27, 28)，而且當攝取高植酸含量的食品，易引起鐵質缺乏貧血症(iron deficiency anemia)(29)；目前已有研究人員藉由基因轉殖技術培養出含有植酸酶(phytase)的基因轉殖穀類植物，利用植酸酶分解植酸以製造出低植酸含量的食品，來改善並提升膳食礦物質的生物可利用率(30,31)。

因此植酸是屬於一種抗營養的物質，卻具有如上述擁有強烈的抗氧化作用以及抑制癌症的能力，可以保護人體的健康。

植酸除了上述的抗氧化和抑制癌症的功用以外，植酸亦有其他的生理機能。如植酸可處置自發性的尿鈣過多症(hypercalciuria)，以避免產生腎臟結石(kidney stones) (32)；同時它擁有降低血膽固醇的效應(hypocholesterolemic effect)，可供血脂過多症(hyperlipidemia)的治療應用(33, 34)。植酸經在體內代謝而完全脫磷酸化後，則產生肌醇(inositol)，肌醇本身亦擁有抗癌的效應，對於植酸的抗癌效果具有合作增效的作用(synergistic effect) (35)。

有文獻發現經植酸處理過的 breast cancer cells，可能藉由植酸降低 43% 的基質金屬蛋白酶-9 (MMP-9) 活性來達到抑制這種癌細胞的黏附(adhesion)與轉移(migration)作用(40)。關於上述的金屬性酵素的活性抑制研究，作者或已證實、或推測均與植酸對於金屬離子的螯合作用有關。而與皮膚老化相關的基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 (MMP-2 and MMP-9)，亦是一種鋅離子依賴性的內切性勝肽酶(Zn^{2+} -dependent endopeptidase)，它們參與皮膚真皮層細胞外基質內的膠原蛋白的破壞而導致皮膚老化，因此本研究計劃將利用植酸(六磷酸肌醇)來處理纖維母細胞，以探討植酸對於基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 的活性表現，並分析這些纖維母細胞的生長情況，我們預期六磷酸肌醇藉由其螯合的能力可以抑制基質金屬蛋白酶的活性，進而使膠原蛋白的分解與破壞降低，並可作為

抗老化化妝品的有效成份。

二、材料與方法

1. 纖維母細胞的培養與處理：

人類皮膚纖維母細胞(human skin fibroblast)培養於含 10% 胎牛血清(fetal calf serum, Hyclone)及 2.5% 小牛血清(bovine calf serum, Hyclone)之 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培養基並加入 3.7% (w/v) 的碳酸氫鈉, 0.03% (w/v) 的麴氨酸(L-glutamine)，每毫升含 100 單位的 penicillin 及 100 毫克 streptomycin 等抗生素，在 37°C，10% CO₂ 培養箱培養，一般接種 1×10^6 cells 於 75 cm² 之培養皿，每三至四天進行繼代培養並換以新鮮培養基。取約第十代細胞進行不同濃度的六磷酸肌醇(pH 7.4)之處理實驗。

2. 基質金屬蛋白酶-2 與 -9 (MMP-2 and -9) 的 zymography 分析：

收集有處理或無處理(控制組)六磷酸肌醇(pH 7.4)之纖維母細胞的胞外培養基，收集的胞外培養基經 Centricon 10 (Millipore) 的濃縮(約 100 倍濃縮)，其蛋白質濃度以 Bio-Rad protein determination assay kit 測量，取約相同量(10 μg)的蛋白質，於 10% 的 Tris-Glycine gels (with 0.1% 膠原蛋白) 進行 non-denaturing 的蛋白質電泳分析，電泳完成後，於室溫、緩和搖擺振盪的情形下，電泳膠片以 2.5% 的 Triton X-100 處理 30 分鐘以恢復蛋白質的活性，電泳膠片再與 developing buffer (Bio-Rad) 於室溫下先反應 30 分鐘，然後於 37°C 下再反應至少 24 小時，反應完成後，電泳膠片以 0.1% 的 Coomassie blue (in 9.2% acetic acid and 45.4% methanol) 於室溫下染色 20 分鐘，然後以 9.2% acetic acid 與 45.4% methanol 清洗 10 分鐘，重複 2 次，最後以 10% acetic acid 與 10% methanol 清洗至基質金屬蛋白酶-2 與 -9 的蛋白質 bands 出現，即完成分析步驟。

3. 纖維母細胞生長的分析：

細胞培養於含 10% 胎牛血清及 2.5% 小牛血清 DMEM 培養基，取約 5000 cells/well 分別加入於 96-well microtiter plate，再以不同濃度的六磷酸肌醇(pH 7.4) 處理細胞，於 37 培養 4 天，再加入 0.2% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 50 l/well)，於 37 再培養 4 天，產生 formazan，formazan 的製造量可作為細胞生存能力的指標，再利用 dimethyl sulfoxide 將 formazan 溶出，以 microplate reader 於 570 nm 的波長下讀出吸光值，代表細胞增生的情形。

三、結果與討論

在不危害纖維母細胞的情況下，根據 MTT 的細胞毒性分析(作用 72 小時，如圖一所示)，植酸對於纖維母細胞的作用濃度為 1.75 mM。所以本研究植酸應用於纖維母細胞的處理濃度均設定為 1.75 mM。

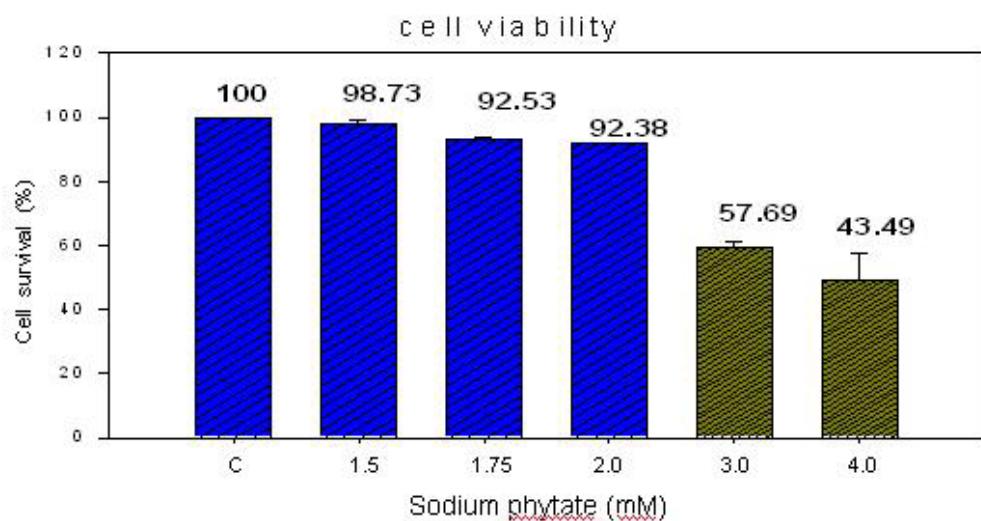


Fig.1 Effect of sodium phytate on 3T3 fibroblasts for 72 h by MTT assay

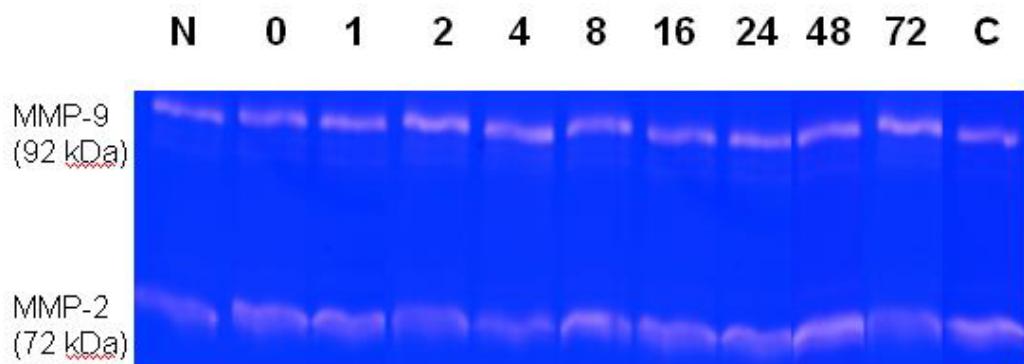


Fig. 2 Effects of sodium phytate (1.75 mM) on the activities of MMP-2 and MMP-9 in culture medium of 3T3 cells for 0~72 h by gelatin-based zymography. Lane (C) as control; N: without treatment.

另外，根據基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 (MMP-2 and MMP-9)的 zymography 分析之實驗資料(如圖二所示)，我們無法證明 sodium phytate(本實驗所利用的植酸試劑)可以對基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 有抑制的作用，也就是本研究實驗中 sodium phytate 無法利用其螯合的特性將基質金屬蛋白酶的 Zn^{2+} 融合住，使得纖維母細胞所分泌的基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 失去活性，即使是在 sodium phytate 作用 72 小時之後。因此本研究進行至目前，無法獲得預期的結果—六磷酸肌醇藉由其螯合的能力可以抑制基質金屬蛋白酶的活性，進而使膠原蛋白的分解與破壞降低。可能必須修正本研究實驗所利用的植酸試劑，例如：calcium phytate, copper phytate, or barium phytate，因有研究文獻報導，植酸與 2 價銅離子的複合物可應用於抑制或降低金屬性酵素 (metalloenzymes)的活性，例如：phytate-Cu(II) complexes 與 carboxypeptidase A (一種 Zn^{2+} -containing metalloenzyme)於 pH 7.2 與 25 °C 的條件下進行反應，可導

致 carboxypeptidase A 的活性減少 95%以上(37, 38, 39)。所以本研究將繼續應用其他的植酸相關試劑，例如：calcium phytate, copper phytate, or barium phytate，處理纖維母細胞，再利用基質金屬蛋白酶-2 與基質金屬蛋白酶-9 的 zymography 分析方法，研究探討是否 2 價離子與植酸的複合物可與基質金屬蛋白酶進行相互間的離子交換，藉由離子交換將基質金屬蛋白酶的 Zn^{2+} 置換成 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、或 Ba^{2+} ，以達到抑制基質金屬蛋白酶活性的目的。

四、參考文獻

1. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 138 (11): 1462-1470.
2. Jenkins G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. Mech Ageing Dev. 123 (7): 801-810.
3. Trautinger F. 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. Clin Exp Dermatol. 26 (7): 573-577.
4. Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol B. 63 (1-3): 41-51.

5. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 35 (3): 307-316.
6. Robert L. 2001. Extracellular matrix and aging: a review of mechanisms and interventions. *Cosmetics & Toiletries.* 116 (1): 61-70.
7. Kennedy C, Bastiaens MT, Bajdik CD, Willemze R, Westendorp RG, Bouwes Bavinck JN. 2003. Effect of smoking and sun on the aging skin. *J Invest Dermatol.* 120 (4): 548-554.
8. Yin L, Morita A, Tsuji T. 2001. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermat Photoimmunol Photomed.* 17 (4): 178-183.
9. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 6: 199-213.
10. Woessner JF Jr. 1998. The matrix metalloproteinase family, in *Matrix Metalloproteinases*, WC Parks and RP Mecham, eds, San Diego, California: Academic Press. pp 1-14.
11. Thibodeau A. 2000. Metalloproteinase inhibitors. *Cosmetics & Toiletries.* 115

(11): 75-82.

12. Varani J, Perone P, Fligel SE, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2002. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J Invest Dermatol.* 119 (1): 122-129.

13. Kuroda K, Tsukifaji R, Shinkai H. 1998. Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 111 (6): 1023-1028.

14. Ohba S, Wang ZL, Baba TT, Nemoto TK, Inokuchi T. 2003. Antisense oligonucleotide against 47-kDa heat shock protein (Hsp47) inhibits wound-induced enhancement of collagen production. *Arch Oral Biol.* 48 (9): 627-633.

15. Wang JF, Olson ME, Winkfein RJ, Kulyk WM, Wright JB, Hart DA. 2002. Molecular and cell biology of porcine HSP47 during wound healing: complete cDNA sequence and regulation of gene expression. *Wound Repair Regen.* 10 (4): 230-240.

16. Lee DY, Schroeder J 3rd, Gordon DT. 1988. Enhancement of Cu bioavailability in the rat by phytic acid. *J Nutr.* 118 (6): 712-717.

17. Martin CJ, Evans WJ. 1986. Phytic acid-metal ion interactions. II. The effect of pH on Ca(II) binding. *J Inorg Biochem.* 27 (1): 17-30.
18. Raboy V. 2003. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry.* 64 (6): 1033-1043.
19. Graf E, Eaton JW. 1990. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med.* 8 (1): 61-69.
20. Graf E, Empson KL, Eaton JW. 1987. Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem.* 262 (24): 11647-11650.
21. Fox CH, Eberl M. 2002. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. *Complement Ther Med.* 10 (4): 229-234.
22. Zhou JR, Erdman JW Jr. 1995. Phytic acid in health and disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 35 (6): 495-508.
23. Graf E, Eaton JW. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer.* 19 (1): 11-19.
24. Nielsen BK, Thompson LU, Bird RP. 1987. Effect of phytic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Cancer Lett.* 37 (3): 317-325.

25. Shamsuddin AM, Yang GY, Vucenik I. 1996. Novel anti-cancer functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro. Anticancer Res. 16 (6A): 3287-3292.
26. Shamsuddin AM, Vucenik I. 1999. Mammary tumor inhibition by IP6: a review. Anticancer Res. 19 (5A): 3671-3674.
27. Hurrell RF. 2002. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. Complement Ther Med. 10 (4): 229-234.
28. Sandberg AS. 2002. Bioavailability of minerals in legumes. Br J Nutr. 88 Suppl 3: S281-S285.
29. Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. 2002. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. J Am Coll Nutr. 21 (3 Suppl): 184S-190S.
30. Holm PB, Kristiansen KN, Pedersen HB. 2002. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. J Nutr. 132 (3): 514S-516S.
31. Davidsson L. 2003. Approaches to improve iron bioavailability from complementary foods. J Nutr. 133 (5 Suppl 1): 1560S-1562S.

32. Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y, Yasukawa S. 1984. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J Urol.* 132 (6): 1140-1145.
33. Jariwalla RJ. 1999. Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res.* 19 (5A): 3699-3702.
34. Potter SM. 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr.* 125 (3 Suppl): 606S-611S.
35. Vucenik I, Shamsuddin AM. 2003. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr.* 133 (11 Suppl 1): 3778S-3784S.
36. Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE. 1997. IP6: a novel anti-cancer agent. *Life Sci.* 61 (4): 343-354.
37. Martin CJ, Evans WJ. 1989. Phytic acid-enhanced metal ion exchange reactions: the effect on carboxypeptidase A. *J Inorg Biochem.* 35 (4): 267-288.
38. Friedman M, Grosjean OK, Zahnley JC. 1986. Inactivation of metalloenzymes by food constituents. *Food Chem Toxicol.* 24 (9): 897-902.

39. Friedman M, Grosjean OK, Zahnley JC. 1986. Inactivation of metalloenzymes by lysinoalanine, phenylethylaminoalanine, alkali-treated food proteins, and sulfur amino acids. *Adv Exp Med Biol.* 199: 531-560.
40. Tantivejkul K, Vucenik I, Shamsuddin AM. 2003. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: I. In vitro studies of adhesion, migration and invasion of MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 23 (5A): 3671-3679.



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(5)－乳化劑型之建立

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：洪偉章

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日



一、摘要：

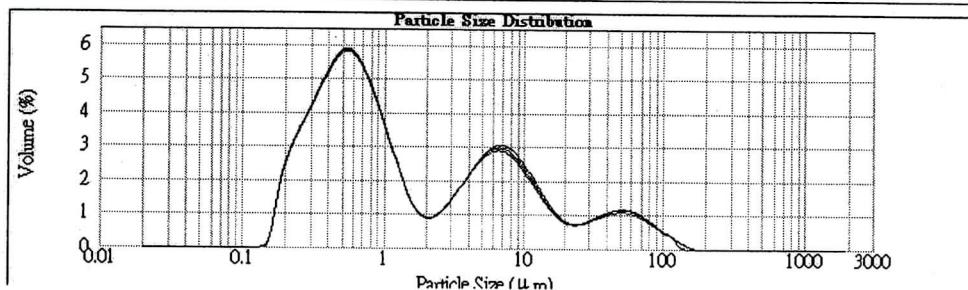
本計畫主要在尋求合適添加中草藥成分的乳化劑型，在本次的研究中，共選擇三種乳化劑(Steareth-5; Polyglyceryl-3 methylglucose; Bis-PEG/PEG-16/16PEG/PEG16/16 dimethicone)依不同比例(3%, 5%及 7%)做篩選，然後加入中草藥成分，由雷射粒徑來判斷粒徑，求得較佳乳劑型。



二、結果與討論：

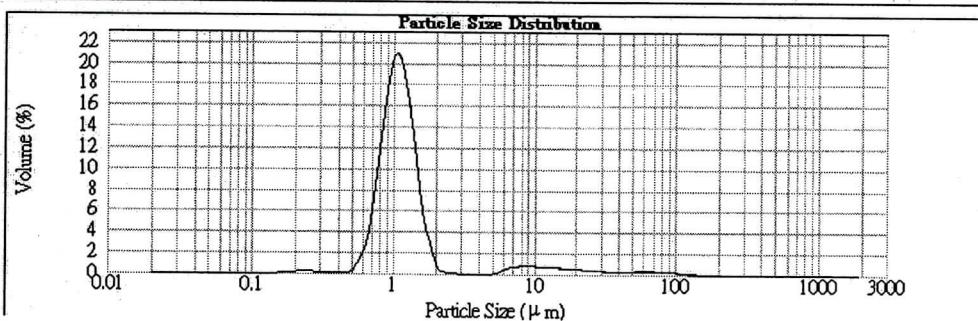
Steareth-5;

d(0.1): 0.284 um d(0.5): 0.925 um d(0.9): 21.484 um



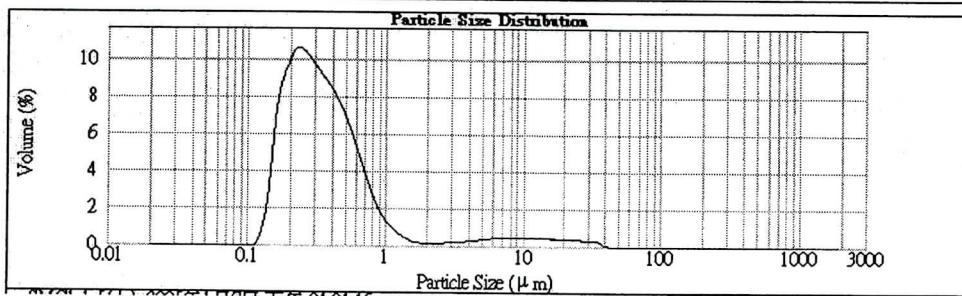
Polyglyceryl-3 methylglucose

d(0.1): 0.773 um d(0.5): 1.103 um d(0.9): 1.836 um



Bis-PEG/PEG-16/16PEG/PEG16/16 dimethicone

d(0.1): 0.177 um d(0.5): 0.326 um d(0.9): 0.884 um



由三種乳化劑 Steareth-5; Polyglyceryl-3 methylglucose;
Bis-PEG/PEG-16/16PEG/PEG16/16 dimethicone 之雷射粒徑來判斷粒
徑結果顯示，以分布較佳 Polyglyceryl-3 methylglucose; 而
Bis-PEG/PEG-16/16PEG/PEG16/16 dimethicone 粒徑較細；唯
Steareth-5 之乳化效果不好，往後可以上結果使用混合乳化系統，
求得更佳乳化劑型系統。



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(6)－功能性評估系統之建立

計畫類別：個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：洪偉章

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日



一、摘要：

本計畫主要由子計畫(5)所尋求合適添加中草藥成分的乳化劑型，在本次的研究中，選擇合適乳化劑添加中草藥成分，然後建立一合適功能性評估系統。



二、結果與討論：

檢測儀器：

1. 皮膚膚色(Chroma Meter MM-500, Minolta, Japan)
2. 皮膚保濕有效性 (Cornemeter CM825, C+K, Germany)
3. 皮膚脂質變化量 (Sebumeter SM810, C+K, Germany)
4. 皮膚酸鹼值 (Skin pH meter pH900, C+K, Germany)
5. 皮膚彈性、緊實度(Cutometer SEM575 , C+K, Germany)
6. 皮膚表面構形(Skin Visiometer SV 600, C+K, Germany)
7. 紅斑刺激指數(Dermaspectrometer, Cortex, Hedsund

篩選中草藥:(默克公司)

1. 人參
2. 山藥
3. 何首烏



中草藥對皮膚功能性評估表

產品 功能性	人參	山藥	何首烏
膚色(美白)	0	0	0
脂質	0	+	0
保濕	+	+	+
pH 值	0	0	0
彈力	+	+	+
緊實	+	0	0

註：評估使用後 (1) 有正面改善或調節為 “ + ”

(2) 無改變為 “ 0 ” (3) 有負面效果為 “ - ”

由以上結果顯示，將中草藥加入合適乳化配方，然後使用非傷性皮膚檢測儀，可測皮膚膚色(美白)、 脂質、保濕、pH 值、彈力及緊實之改善情形而建立一套化粧品功能性評估系統。



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(7)—含多氫氧基二苯乙烯與含雙 Cu(I) 類
核酪胺酶之作用機轉探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：王詠騰

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

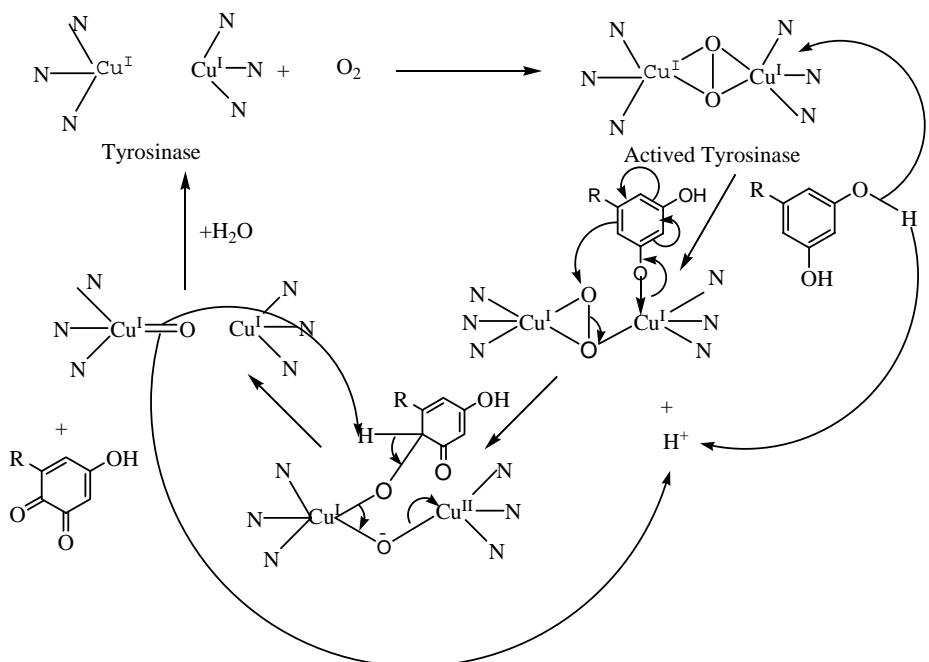
Abstract

The TPA Cobalt metal ion complex was synthesized latterly. Besides It is currently

my interesting that the complex can be using to enhance the sensitivity of platinum electrodes. The complex is used to be instead of which the enzymes such as Tyrosinase to study the mechanisms of the catalysis of some of whiting active compounds with Tyrosinase like catalyst also is my target. Here we report that the complex which has been synthesized. And it was already determined with X-ray diffraction, Elemental Analysis, and cyclovoltammetry methods. Among the results, the X-ray data shows that the structure of the TPA Cobalt metal ion complex is packing in space group $P2_{1/c}$ and it possess a good leaving group on Cobalt atom. It meant that when the whiting active compounds would be a chance binding on Cobalt atom. And besides According to the cyclovoltammetry data this complex is very easily to reduce due to it has low energy (it could be reduced at -510mv) to be reduced with reducers such as the whiting active compounds. Even thought the reactions of whiting compounds with TPA Cobalt metal ion complex not performed yet. We are already proposing that it is must to reach any way. So we shell be test it in the future.

Introduction:

Reactions of the whiting effect compounds such as Vitamine C, catachol, cysteine, and stilbene derivatives with Tyrosinase are well-known in the literatures recently. They are reducer on Chemistry. According to the literatures, Tyrosnase bind molecular oxygen and active for catalysis whiting compounds that they are mentioned. And the mechanism had been discussed which is showed in the Figure 1. This process has been found in the basis epidermal layer it is called Melanogenesis. However the skin whiting effect compounds that we mentioned can inhibit Melanogenesis because



of the hitting their ~~.....~~ popular chemicals. Usually you could found them in the mushrooms. By the literatures study,

we found that some research groups focused their attention on the cancers therapy, and some of them focused on the whiting effect on the Cosmetics area. Because of the sensitivity also have attracted many research groups. That's why we paid attention and researched it in this project. Every one who used the electrochemical equipments to perform the experiments must knew that on the surface of some metal that they are to be electrodes. Something must bather them. The naked surface of the metal electrode has been cumulated with the electrochemical oxidation products of whiting compounds. It cause that the signals still decay whatever linear scan or differential pulse method.. Therefore most of research groups had been using modified surface electrodes to measure the concentration of the whiting compounds solution. They had been modified with TiO₂ particles, metal ion complexes, or something that it could conduct electricity, especially dicopper ions complexes are more popular to currently use. However they had been synthesized to spent a lot of money and besides they are too difficult to buy. So in order to avoiding the cumulation phenomenon this project, a simple complex that TPA (HClO₄)₃ reacted with CoCl₂ to obtain TPACo (ClO₄⁻) were synthesized. The complex was further determined with X-ray, Elemental Analysis, and Cyclovoltammetry. The mechanisms of reaction of complex with polyhydroxy stilbene derivatives would be further to perform in the next period of time.

Results and Discussion

According to the X-ray report, metal ion is chelated with TPA ligand and a Cl anion in a distortion triangle di-pyramid structure is also bounded on Co atom. The Co atom has keeping formal charge 1+ which is obviously known with one accompanied perchlorate counter anion. The crystal is packing in P2_{1/c} group space. The X-ray data is showed below (see Figue2 and Table 1, and 2)

The Elemental analysis report show that it's consist with the X-ray data. Even thought there are a little residue mixing together.(Table 3)

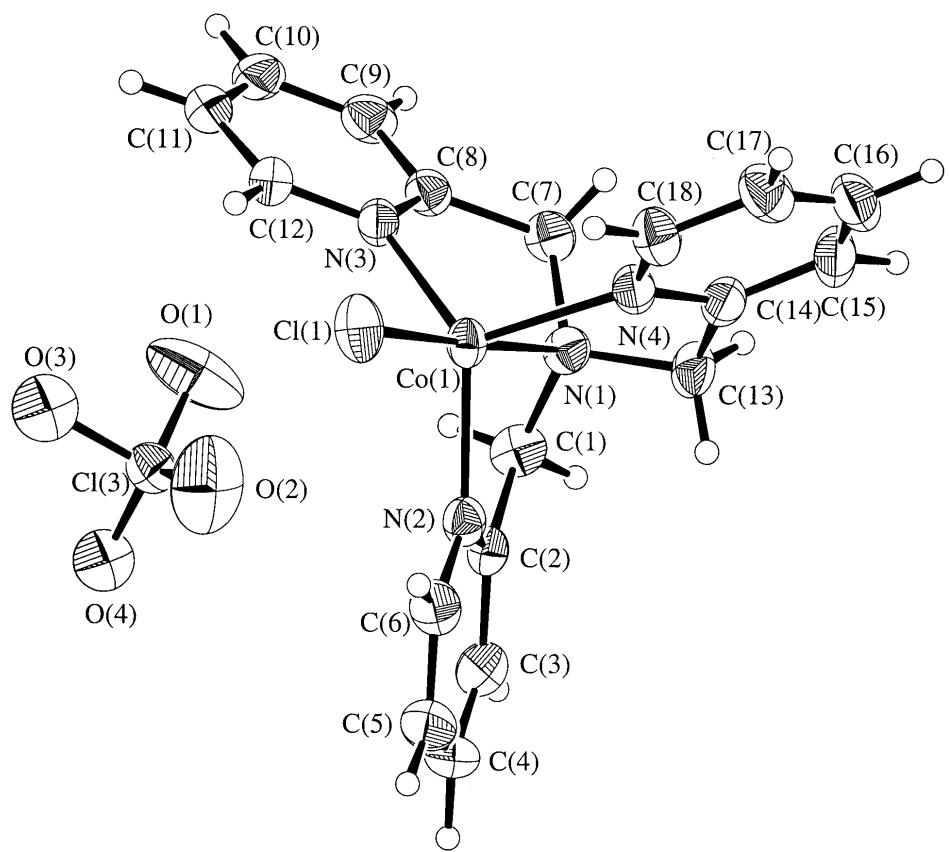
Cyclovoltammetry was also performed. By the results, it has a reduction signal at -510mv in aqueous solution. It meant that it's a very easily to reduce compound. In my opinion, it must be easy combined with the whiting compounds. So we shell be further to apply it enhancing the sensitivity of the platinum electrodes surface.

The experimental section

The materials :

All the chemicals were purchased in commercials and has been dewater and keeping in a closed container to store.

The synthesis of TPA :



The measurement of X-ray

The X-ray data was collected by the Expensive equipments center of NSYSU which is showing in Figue 2 and Table 1, and 2.

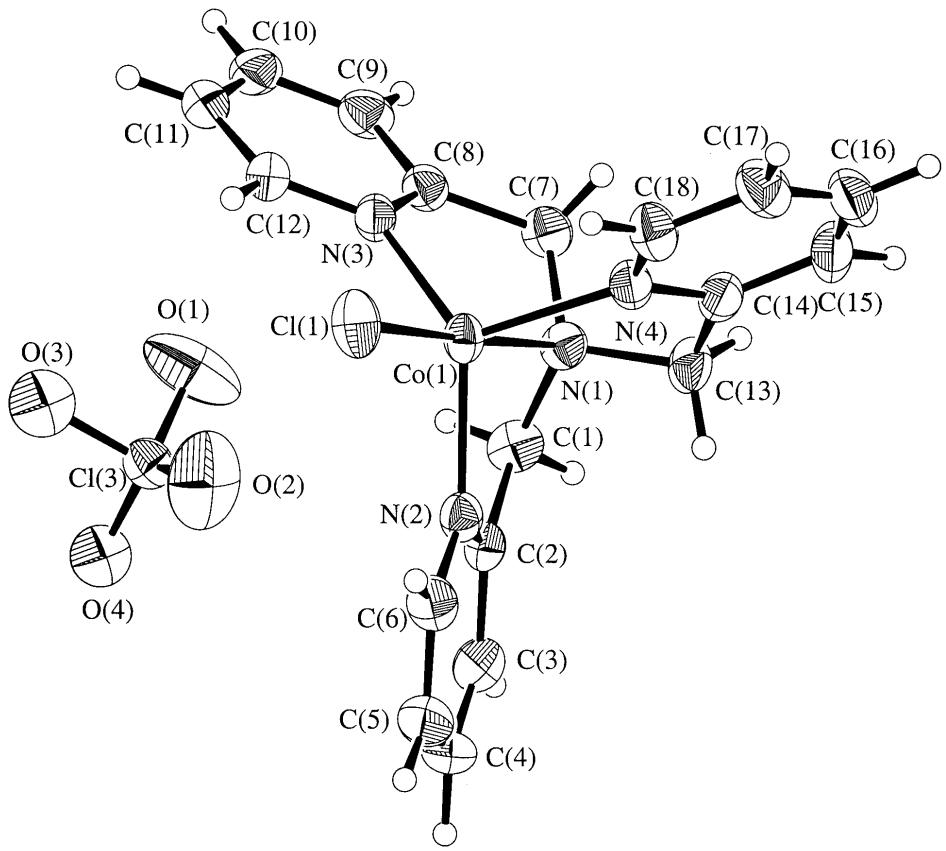


Figure 1

The experiment of cyclovoltammetry

The three electrodes system was used to measured the cyclovoltammetry of TPA Cobalt complex with BAS100 potential stat in KCl aqueous solution. The reduction signal was obtained at -510mv.

Table 1 The crystal datas of TPACo

Empirical Formula	C ₁₈ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₄
Formula Weight	484.20
Crystal Color, Habit	green plate
Crystal Dimensions	0.2×0.38×0.6mm
Cell Determinations (2θ range)	25(15.2-24.4)
Omega Scan Peak Width	

At Half-height	0.26°
Lattice Parameter	a = 14.685(5) Å b = 9.410(2) Å c = 29.794(4) Å β = 90.64(2) ° V = 4117(1) Å ³
Space group	p2 _{1/c}
Z value	8
F ₀₀₀	1976.00
μ(MoKα)	11.26 cm ⁻¹
Residuals	0.044; 0.052

Table 2 Bond Angle (°) and Bond length(Å)

Cl	Co	N(2)	104.5(2) °
Cl	Co	N(4)	102.5(2) °
N(1)	Co	N(3)	77.6(2) °
N(2)	Co	N(3)	120.4(2) °
N(3)	Co	N(4)	114.9(2) °
Co		N(1)	2.192(5) Å
Co		N(2)	2.055(5) Å
Co		N(3)	2.066(5) Å
Co		Cl	2.282(2) Å

Table 3 The Elemental Analysis Data

	N%	C%	H%
Experimental Data	10.94	43.79	4.32
Calculated Data	9.46	43.98	3.66

References

- 1.R. E. Norman,; R. A. Leising,; S. Yan,; L. Que, Jr. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 273, 393-396.
2. Q. Li,; Y. Wang,; G. Luo *Materi. Scien. And Engin.C* **2000**, 11, 71-74.
- 3.Z. Duraun,; G. Nisli *Talanta* **2004**, 63, 873-878.
- 4.K. Ikehata,; J. A. Nicell *Biores. Tech.* **2000**, 74, 191-199.
- 5.L. G. Fenoll,; J. N. Rodriguez-López,; F. Garcia-Molinz *Int. J. Biochem. & Cell Bio.* **2002**, 34, 332-336.
- 6.L. Bubacco,; J. Salgado,; A. W.J.W. Tepper,; E. Vijgenboom **1999**, 442, 215-220.

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(8)—樹葉部精油開發與抗菌評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：林維炤

共同主持人：

計畫參與人員：林基銘，蔡玫琳，王翠霜

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日

一、摘要：

本研究以水蒸氣蒸餾法萃取白千層與樟樹樹葉的精油。並且評估精油的抗菌效果。研究結果顯示，陰乾時間會影響精油的產率，時間越久，精油萃出率越高。對於五種常見菌的抗菌評估來說，樟樹精油的抗菌性優於白千層，而對於白色念珠菌的效果最佳。

二、前言：

將草本成分應用於化妝品中已經有數百年的歷史了。近幾年來，由於工業的過度發展，使得人類生存的環境品質日趨下降。因此，提倡回歸自然的風氣愈來愈盛。這股風潮也表現在化妝品上(1)。愈來愈多的產品以添加天然的成分為訴求。而精油系列的化妝品也如雨後春筍般的上市。許多國際知名的大公司也推出含精油的產品。如 Nu Skin 推出含薰衣草，金盞花精油的產品。Singh Also 則推出含迷迭香，鼠尾草精油的產品。Also Merzer 則是將茶樹，尤佳利樹，薄荷油等精油應用於產品上。D'Acry's 則是在產品中添加尤佳利與薄荷來治療粉刺與抗發炎。這些產品的主要訴求都在清潔，抗菌與抗發炎等，部分產品則有保濕與抗紫外線的功能(2)。而許多的研究的焦點也放在這些產品的應用效果上。如 Santosh 等人以綠茶抽出物添加於化妝品中，可以抗紫外線照射所引起的發炎，而達到光保護的目的(3)。在這麼多的精油產品中，以茶樹精油的相關抗菌效果研究最多(4-7)。研究結果也顯示茶樹精油產品在抗菌與抗發炎的優異性。

本研究的主要目的即在尋找本土所常栽種的植物中，有哪些也具有抗菌的效果。在本年度的計畫中，先選定白千層與樟樹兩種植物。選定白千層的原因是由於它和茶樹屬於同一屬的植物。預料在精油中會有類似成分。而選定樟樹的原因在於台灣早年樟樹的發展十分蓬勃，大部分的生產都是取樹木部位，以水蒸氣法萃取出樟腦油與樟腦。而且許多地方的行道樹都是樟樹，發展樟樹精油可以落實本土化產業。

在精油的萃取上，則是取樹葉部位進行水蒸氣法萃取，由於樹葉再生容易，因此取此部位進行水蒸氣法萃取最具經濟與環保效益。

在精油評估上，以精油的抗菌效果評估為主，採用小抑制濃度 MIC (Minimum Inhibition Concentration)方法測試。與 Triclosan 比較。所供試驗微生物均為 ATCC 標準菌株：有金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 6538)，為革蘭氏陽性菌代表；大腸桿菌(*Escherichia coli* 8739)與綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa* 9027)，為革蘭氏陰性菌代表；白色念珠菌(*Candida albicans* 10231)與黑黴菌(*Aspergillus niger* 16404)，則分別為酵母菌與絲狀真菌代表菌株。以上這些菌是化妝品製造廠常用菌；也是造成皮膚生理伺機性感染菌類。

三、材料與方法：

(1) 水蒸氣蒸餾法 (Method of Steam Distillation)

在做蒸餾之前，我們會把樟樹做前處理，就是把枝、葉分開，再把新鮮的葉子分為兩部分，一部分拿去做陰乾處理，另一部分保鮮，而在條件一樣下，進行萃取。

在進行精油萃取之前，先取樣品測其重量，以水蒸氣蒸餾法進行萃取。將蒸餾瓶裝滿 2/3 的水，控溫加熱器的溫度設定 100°C，使產生的水蒸氣直接通過樣品，萃取時間訂為 2 小時，水蒸氣會將精油抽出，經過冷凝管精油會沿著管壁流下至收集瓶，最後收集瓶內上層的精油拿去秤重，計算精油回收率。研究中，針對陰乾時間作評估，評估不同陰乾時間對於精油產率的影響。精油的裝置如圖[1] 所示。

(2) 細菌評估

1. 精油之調製：將水蒸氣蒸餾法與超臨界二氣化碳所萃取的樟樹與白千層精油在分別以含 0.5% 甘油或 0.5% Tween 80 之培養液，分別調配稀釋成 50%、25%、10% 及 Tricosan 2% 各濃度之溶液，另以未添加任何精油之培養液為空白對照組，作為測試抑菌之用。

2. 細菌培養：將裝有菌種之培養液培養至一段時間(6~8hr)，每次取 20ul 注入預先做好固態培養基（白色念珠菌的固態培養基是 YM BROTH+Agar，而金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、綠濃桿菌的固態培養基是 TAB+Agar）之培養皿中，並且均勻塗抹後放入 30°C 之培養箱 1hr，以除去多餘水份。

3. 濾紙測試：將圓型濾紙（直徑 0.8cm）置於培養皿，並將各種不同稀釋的精油滴其圓型濾紙上，且再放回 30°C 之培養箱，經放置一夜，於次日進行觀察抑菌圈之大小，連續觀察 1-2 天。

四、結果

(1) 不同陰乾時間對於產率的影響

不同陰乾時間對於產率的影響如如圖【2】所示，而產出的精油外觀無色，且白千層精油帶有辛辣的新涼味、樟樹精油則有青草的芳香味，經葉子所產的精油比樹枝來得多，而陰乾的葉子產量比保鮮的葉子產量多，且其產率，隨著陰乾的天數成正比。這可能是因為陰乾後，葉子表面的水分蒸發。使得內部的精油容易被萃取出來。

(2) 抑菌效果評估

1. 以效果顯著差異較大的 50% 各精油對單一菌種做比較，結果發現樟樹 + Twee80 這組的抑菌圈比較好。圖【3】所示。

2. 由上一個結果，故再針對樟樹 + Twee80 這組對各菌種做抑菌圈的比較，結果明顯地 2 天後，發現樟樹 + Twee80 對白色念珠菌的抑菌效果較大。圖【4】所示。

3. 白千層精油雖然沒有像樟樹精油對大腸桿菌效果一樣，但白千層精油其它菌種的效果也是相當平均。表【1】所示。

經由抑菌試驗的結果，發現到同一種精油只是換不同的溶劑，抑菌圈的結果卻不相同，是因為不管是白千層或樟樹的精油（油相）與培養基（水相）

的溶解，可靠 tween 80 來均勻的互溶，原因在於 tween 80 是一個好的界面活性劑，同時具有親水端，另一邊是親油端，讓油、水互溶的非常好。而甘油是非界面活性劑，無法讓精油均勻的擴散分佈，以致於影響到抑菌圈的大小不一。

五、討論：

由實驗結果可知陰乾的時間與產率有相當的關係，這可能是因為精油藏於植物組織內部而外部的水份形成保護膜的效果。因此陰乾的時間越長，表面的水分揮發越多，因此效果越佳。

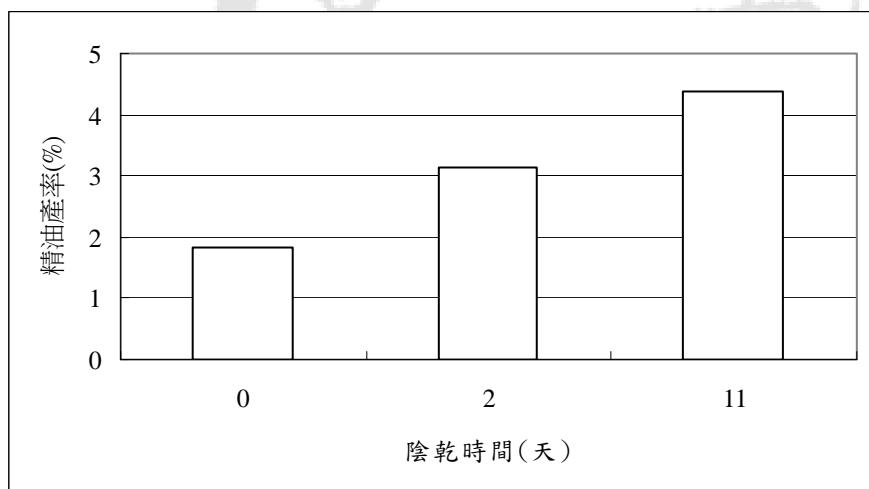
就精油的抗菌效果部分，許多的研究發現，單萜烯扮演了重要的角色。因此進一步的研究，需要對於兩種精油的成分鑑定。以瞭解成分與抗菌效果的關係。





圖 1：實驗中所使用的水蒸氣蒸餾裝置。

(a) 樟樹



(2) 白千層

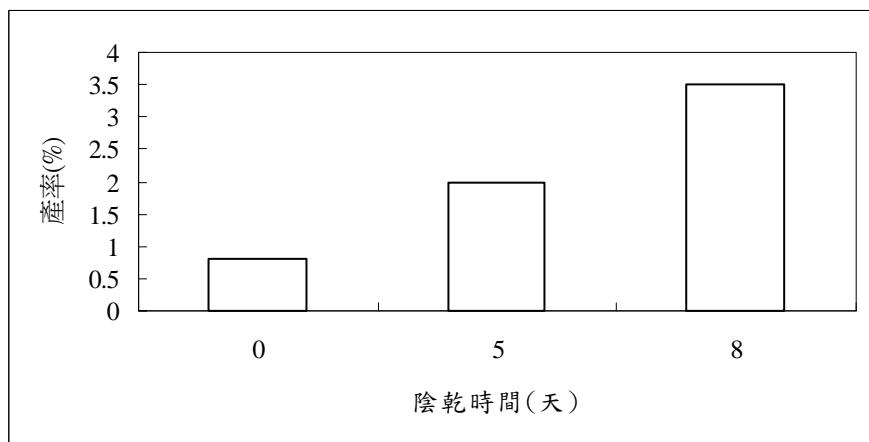


圖 2：不同陰乾時間對於回收率的影響

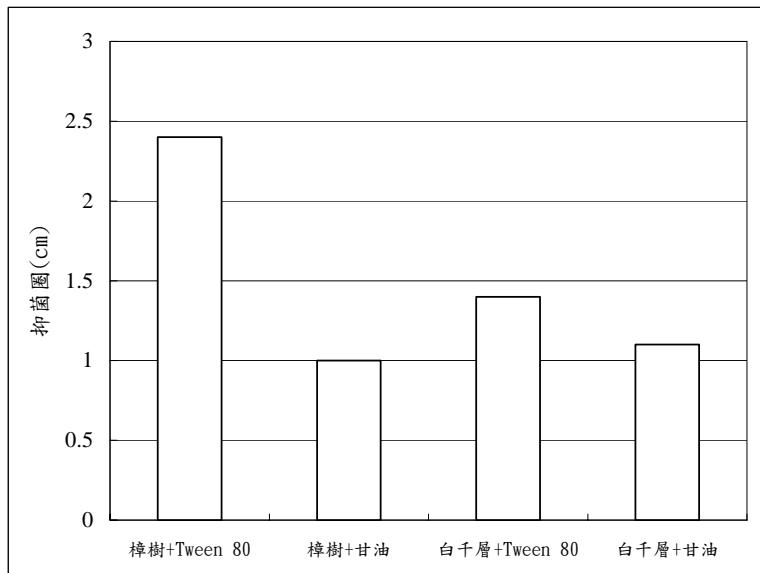


圖 3：不同精油在 50% 濃度時對大腸桿菌的抑制圈

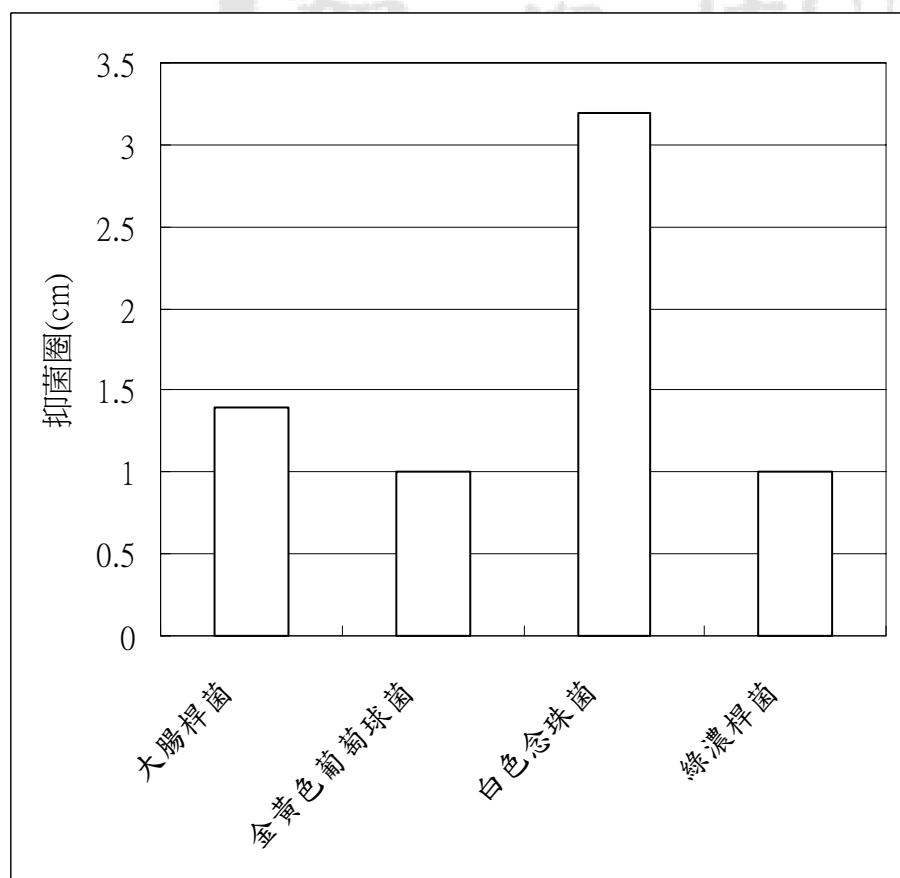


圖 4 50% 檀樹精油對不同菌的抑制圈大小

表【1】各組精油對各菌類的影響程度

抑菌 圈(cm) 精油濃 度(50 %)	大腸桿菌		金黃色葡萄球 菌		白色念珠菌		綠濃桿菌	
	第一 天	第二 天	第一 天	第二天	第一 天	第二天	第一 天	第二 天
樟樹 +Tween 80	2.4± 0.4	1.4± 0.2	1.0± 0.1	1	太大 無法 測量	3.2±0.1	1.2± 0.1	1
樟樹+ 甘油	1.0± 0.1	1	1.2± 0.3	1.2±0.2	1.2± 0.1	1.2±0.1	1	0
白千層 +Tween 80	1.4± 0.6	1.2± 0.4	1.0± 0.1	1	1.4± 0.2	1	1	0
白千層 +甘油	1.1± 0.1	1	1.1± 0.1	1.0±0.1	1.4± 0.0	1	1	1

六、參考文獻：

- (1) Robert J, Soap, Perfume & Cosmetics, 36, 2002.
- (2) Anita S., Soap & Cosmetics, 34, 75, 1999.
- (3) Santosh K, Cosmetics& Toiletries magazine, 69, 116, 2001
- (4) Mantle D; Gok A; Lennard T.W., Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews, 89, 20, 2001
- (5) Satchell A.C.; Saurajen A; Bell C, The Australasian Journal of Dermatology, 175, 43, 2002
- (6) Carson C.F.; Riley T.V.; Cookson B.D., The Journal of Hospital Infection, 175, 40, 1999.
- (7) Nenoff P; Haustein U.F.; Brandt W., Skin Pharmacology: the Offical Journal of the Skin Pharmacology. 388, 9, 1996.

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(9)—

大豆異黃酮在抗禿頭保養品之開發與評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：林維炤

共同主持人：

計畫參與人員：余兆松，張力元，王涵穎

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日

一、摘要：

本研究評估大豆異黃酮萃取物對於 5 α -還原酶的抑制作用。實驗中以 PCR 方法對兩種 pCMV7-5aR 質體進行複製並轉移到 HEK 293 細胞。分別添加經水解與未經水解的大豆異黃酮萃取液。結果顯示兩者對於 5 α -還原酶均有抑制作用。所得數據，可以提供以後做為抗落髮保養品基礎。

二、前言：

雄性禿是最常見男性掉髮,40% 年屆 40 歲以上男性受影響,有些甚至在 20 多歲便出現。雄性禿受兩個因素影響,一是多基因遺傳,二是雄性荷爾蒙。雄性荷爾蒙(睪固酮)隨血液循環到頭髮的毛囊細胞,毛囊細胞質中有 5a-reductase,把睪固酮轉化成二氫睪固酮(DHT),DHT 會進入毛囊細胞核中,對於代謝系統產生抑制作用,使毛囊無法進行蛋白的合成,成為休止期毛髮,約三個月就會脫髮萎縮。5a-reductase 有二種 isoenzyme,type1 主要分佈在皮脂腺,type2 分佈在毛囊與攝護腺。

柔沛(finasteride)主要作用是抑制 type 2 5a-reductase,使 DHT 的濃度降低,阻止毛囊細小化作用,使禿頭部位毛囊回復原來生長週期。柔沛是經肝臟代謝,且須長期服用,如有肝功能異常須小心使用,1% 會出現可逆性性功能障礙。

有一部分異黃酮素(isoflavones) or 類黃酮素(flavonoids)對 type 2 5a-reductase 具有抑制能力,理論上可以運用在改善雄性禿,因此我們篩選自然界中具有抑制 type2 5a-reductase 的異黃酮素或類黃酮素,製成各種劑型讓產品有效地經皮吸收,並應用在人體上改善雄性禿頭皮的狀態(包括皮脂腺分泌)

三、材料與方法：

(A) 複製穩定表現 5 α -還原酶的 HEK293

(I) 材料:

- (1) 兩種 pCMV7-5aR 質體,含有全段人類 cDNAs 包含兩種 5 α -還原酶編碼。
- (2) PCR 引子能接上EcoRI 端(5') 與 XbaI 端 (3'). 引子的序列為
LCHP-4 (5'-CTA CCA GTA TCG AAT TCG ATG CAG GTT CAG TGC CAG CAG AGC-3') LCHP-6 (5'-CTA CCA GTA GCT CTA GAT TAA AAG ATG AAT GGA ATA AGG GC-3').

- (3) CMV 促進劑
- (4) p3_- FLAG-CMV-10 (Sigma Chemical, USA).
- (4) HEK293 細胞
- (5) lipofectamine plus (Life Technologies, USA)
- (6) G418 sulfate (400 mg/ml)
- (7) anti-FLAG Tag (Sigma Chemical, USA)
- (8) anti-5areductase type 2 (Biogenesis Ltd, UK) antibodies.

(II) 實驗流程

- (1) 以 pCMV7-5aR2 質體與引子進行聚合酶鏈鎖(PCR)反應。 PCR 產物為單股0.82 kb .
- (2) 將 PCR 產物接到表現p3_- FLAG-CMV-10 的CMV 促進劑。得到 p3_- FLAGCMV-5aR2; 7.2 kb 。
- (3) 將p3_- FLAGCMV-5aR2; 7.2 kb 到 HEK293 細胞。
- (4) 以西方點墨法確認。

(B) 5 α-還原酶的抑制效果評估

(I)材料

- (1) [¹⁴C]testosterone

(II) 流程

- (1) 將細胞在 37°C, 5% CO₂ 下, 加入 0.05 μCi 進行一天培養。
- (2) 比較有加入萃取液與沒有加入大豆異黃酮萃取液的testosterone 轉換至 dihydrotestosterone 的轉換率。將添加後的樣品培養 6 小時後進行評估。將樣品以乙醚萃取後，以 TLC 將 testosterone 與 dihydrotestosterone 分離後，以同位素法測定C¹⁴- testosterone 與 C¹⁴- dihydrotestosterone 的比例。

四、結果與討論：

(1) HEK 細胞的 5 α-還原酶表現

在實驗中所選擇的 HEK293 細胞以西方點墨法確認。在西方點墨法中，可以看到單股 30 kDa 的 DNA。以免疫細胞法則可以確定在細胞核中有 5 α-還原酶。

(2) 5 α-還原酶抑制效果:

大豆中所含有的異黃酮如圖一所示，主要有 daidzein(黃豆素), genistein(金雀異黃酮素)，而在天然的大豆中，常常會接上醣基而成為 daidzin, genistin。實驗中所使用的大豆異黃酮萃取物由德榮公司提供，分

別為經水解與未經水解的大豆異黃酮萃取物，有效成分如表一所示。前者含有較多的 daidzin, genistin, 而後者則是 daidzein(黃豆素), genistein(金雀異黃酮素)。實驗中分別以這兩種大豆異黃酮萃取物進行評估，並且以柔沛(finasteride) 進行對照組。

所得的結果如表二所示。柔沛的 IC₅₀ 最小(0.37 um)，而兩種大豆異黃酮萃取物的 IC₅₀ 均十分的小，顯示對 5 α-還原酶均有抑制作用。其中水解後的大豆異黃酮效果比未水解的效果好，顯示 daidzein(黃豆素), genistein(金雀異黃酮素)比 daidzin, genistin 有較好的作用。



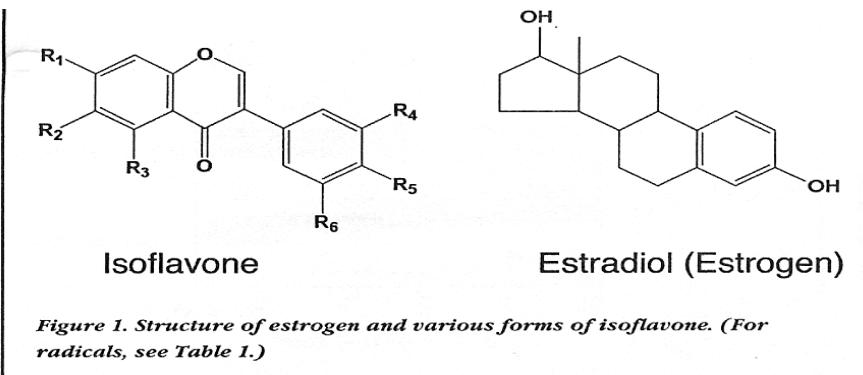


Table 1. Isoflavones of soybean extract, with radicals for Figure 1

Isoflavone	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Daidzein	H	H	H	H	OH	H
Daidzin	O-Glu	H	H	H	OH	H
Genistin	O-Glu	H	OH	H	OH	H
Glycitein	H	CH ₃ O	H	H	OH	H
Glycitin	O-Glu	CH ₃ O	H	H	OH	H

圖一 大豆異黃酮萃取物的有效成分

表一，實驗中所使用兩種大豆異黃酮萃取物的主要成分

	Genistin	Genistein	Daidzin	Daidzein
Type I	35.78%	0.46 %	13.76%	0.34%
Type II	-	15.38%	-	5.02%

表二 IC₅₀ 值

樣品	IC ₅₀ 值
Type I	12.4 um
Type II	3.52 um
Finasteride	0.37 um

參考資料

- (1) Park W.S., Lee C.H., Lee B.G. and Chang I.S.; J. of Dermatol. Sci. (2003)31, 91-98
- (2) Richard A. H., Zhang H.Z., Dai W., Dai Q. and Liao ST; Biochem. Pharma. (2002)63, 1165-1176.
- (3) Matias J.R., Malloy V. and Orentreich N.; Arch Dermatol. Res.;(1989)281, 247-253.



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(11)—化妝品安全評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：郭俊成

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日



一、摘要：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。

二、前言：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 (Osbome 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。

三、材料與方法：

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-2y1)-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 $90\mu l$ 培養液及 $10\mu l$ MTT(5mg/ml in PBS)，反應 1 小時後，吸去上清液，加 $150\mu l$ 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 LC_{50} 。

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 $250\mu l$ 培養液(含待測樣品)。經 48 小時後吸去上清液，加入 $250\mu l$ 含 neutral red (50 u/ml)培養液，3 小時後加入 $250\mu l$ 固定液(1% 甲醛, 1% 氯化鈣)，固定 2 分鐘後加入 $100\mu l$ 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 NRU_{50} 。

四、結果我們以 MTT, Neutral Red 方法去建立含藥化妝品的檢測

模式。我們選定測試含藥化妝品中常加入的牡丹皮其毒性在表一以 MTT 方法去測試不同極性抽取物 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:Oxypaeoniflorin, PSB-K3:Benzoylpaeoniflorin , PSB-K4 : Benzoyloxypaeoniflorin, PSB-K5 : Gallic Acid.

PSH 在濃度 $50\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSE 在濃度 $50\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSB 在濃度 $500\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSW, LLT 在濃度 $500\mu g/ml$ 吸光值仍無明顯下降。在表二以 Neutral Red 方法去測試 PSH，在濃度 $50\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSE 在濃度 $50\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。LLT 在濃度 $500\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSW, PSB 在濃度 $500\mu g/ml$ 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 $20\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSC-K1, PSC-K3 在濃度 $500\mu g/ml$ 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 $80\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSB-K6，在濃度 $200\mu g/ml$ 吸光值明顯下降 ($p<0.001$) 。PSB-K1, PSB-K2, PSB-K3, PSB-K4 在濃度 $500\mu g/ml$ 吸光值仍無明顯下降。



Table1

Cytotoxic effect of various compounds on the cultured L929 cells. Survival of L929 cells were determined by MTT assay after incubation with compounds at 37°C for 24 hrs.

Blockers		Concentration(μ g/ml)	% control
Control			100 \pm 6.8
PSH	5		95.3 \pm 9.7
	50		74.4 \pm 11.5 ^a
	500		59.0 \pm 13.7 ^a
PSE	5		97.0 \pm 6.9
	50		78.6 \pm 9.4 ^a
	500		48.1 \pm 7.6 ^a
PSB	5		96.0 \pm 7.3
	50		97.6 \pm 5.4
	500		83.1 \pm 12.6 ^a
PSW	5		102.0 \pm 11.3
	50		95.2 \pm 5.4
	500		96.1 \pm 4.6
LLT	5		102.0 \pm 11.3
	50		98.6 \pm 7.4
	500		91.1 \pm 11.6

Data are presented as the mean \pm S.E.M. ; n=6 ;

^a p<0.01 compared with control.



Table 2

Cytotoxic effect of various compounds on the cultured L929 cells. Survival of L929 cells were determined by Neutral Red assay after incubation with compounds at 37°C for 24 hrs.

Blockers		Concentration(μ g/ml)	% control
Control			100 \pm 3.6
PSH	5		96.3 \pm 7.5
	50		54.6 \pm 1.5 ^a
	500		39.0 \pm 3.7 ^a
PSE	5		97.0 \pm 9.3
	50		68.6 \pm 5.4 ^a
	500		40.1 \pm 2.6 ^a
PSB	5		103.0 \pm 9.3
	50		97.6 \pm 5.4
	500		105.1 \pm 11.6
PSW	5		106.0 \pm 13.3
	50		97.2 \pm 5.4
	500		96.1 \pm 4.6
LLT	5		98.0 \pm 6.3
	50		97.6 \pm 2.4
	500		85.1 \pm 7.6 ^a

Data are presented as the mean \pm S.E.M. ; n=6 ;

^a p<0.01 compared with control.



Table3

Cytotoxic effect of various compounds on the cultured L929 cells. Survival of L929 cells were determined by Neutral Red assay after incubation with compounds at 37°C for 24 hrs.

Blockers	Concentration(μ g/ml)	% control
Control		100 \pm 3.6
PSC-K1	5	91.3 \pm 8.5
	50	88.6 \pm 11.5
	500	85.0 \pm 9.7
PSC-K3	5	95.4 \pm 5.3
	50	98.6 \pm 4.4
	500	91.1 \pm 6.6
PSC-K6	5	101.0 \pm 9.3
	10	91.3 \pm 8.5
	20	82.6 \pm 5.5 ^a
	40	79.0 \pm 6.7 ^a
	50	80.6 \pm 5.4 ^a
	500	60.1 \pm 10.6 ^a

Data are presented as the mean \pm S.E.M. ; n=6 ;

^a p<0.01 compared with control.



Table 4

Cytotoxic effect of various compounds on the cultured L929 cells. Survival of L929 cells were determined by Neutral Red assay after incubation with compounds at 37°C for 24 hrs.

Blockers	Concentration(μ g/ml)	% control
Control		100 \pm 3.6
PSB-K1	50	94.3 \pm 5.5
	500	95.6 \pm 8.7
PSB-K2	50	94.0 \pm 3.5
	500	101.4 \pm 5.3
PSB-K3	50	98.6 \pm 5.4
	500	92.1 \pm 6.6
PSB-K4	50	101.0 \pm 9.3
	500	92.3 \pm 8.5
PSB-K5	50	86.6 \pm 5.5
	80	80.0 \pm 7.7 ^a
	160	70.6 \pm 5.4 ^a
	500	56.1 \pm 10.6 ^a
PSB-K6	50	98.0 \pm 6.3
	100	93.6 \pm 4.4
	200	82.1 \pm 7.6 ^a
	500	68.1 \pm 6.6 ^a

Data are presented as the mean \pm S.E.M. ; n=6 ;

^a p<0.01 compared with control.



五、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。這在臨牀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(Angustin 等, 1995)等方法去測細胞毒性。在本研究中我們選用 RAW, 3T3, 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。我們的目標是要訂出一套標準將要上市的化妝品依其使用時間分成四大類依其種類作細胞毒性測試只要其毒性超過我門所訂定濃度標準則表示可能有毒性需做進一步動物測試若其細胞毒性測試毒性不超過我門所訂定標準則表示可準其上市因細胞毒性是一最敏感測試方法如此便可作為快速及大量檢定用

六、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,15-30Eds.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。



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化粧品研發

子計畫(十)化妝品成分與生產容器之界面性質分析

計畫類別：個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：李淵博

共同主持人：

計畫參與人員：李淵博、吳振源

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日

一、摘要：

本研究選擇了六種常見的化粧品成分，以化粧品工廠最常見的304不鏽鋼為底材，初步測定了其接觸角，實驗結果發現，其接觸角大小的範圍於10~60度之間。此方法對於後續建立化粧品成份與生產容器間的界面反應模式會有莫大的助益。

二、前言：

化粧品的生產除了適當的配方設計之外，生產容器的材質與設計往往也是影響產品品質的重要因素之一，由於化粧品成分的多樣性，因此化粧品成份與生產容器間的界面反應也就同時具有多樣的變異性質。以化粧品成份吸附於生產容器表面的現象為例，其一是可能造成化粧品配方的改變，嚴重時可能影響產品的穩定性或有效性。其二是改變生產產品時，生產容器的清洗問題；由於化粧品成份與生產容器間的作用不盡相同，目前工廠中對於生產容器的清洗流程幾乎如出一轍，生產容器清洗後是否仍有物質殘留或是早已清洗乾淨只徒然增加成本與時間；這些問題在化粧品的生產與工廠設計或許都應事先詳盡的考慮，而這些問題的解決則有賴於了解化粧品成份與生產容器間的界面性質。

要了解化粧品成份與生產容器間的界面性質，首要之務就是了解化粧品成份與生產容器間界面張力，而測定的方法即可利用接觸角的測定來加以計算。

三、材料與方法：

3.1 實驗用品

儀器： 滴量管、水平控制台、數位相機、攝影棚裝置(含背景螢幕、遮罩與光源)。

材料： 304不鏽鋼片。

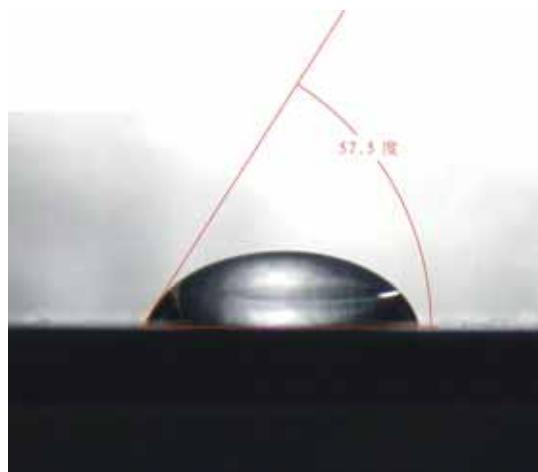
藥品： 水、丙二醇、*Glycolic Acid*、*Tween 60*、*2EHP*與*Jojoba Oil*。

3.2 接觸角之測量：

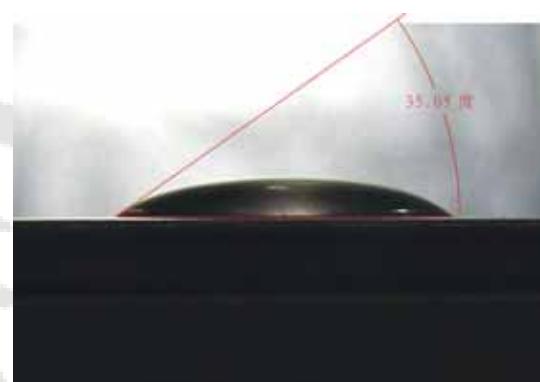
將測試溶劑之液滴滴於試片表面上，靜置待其平衡後，以數位相機拍下液滴與試片間的接觸狀況，再以軟體求出液滴與試片間的接觸角。

四、結果

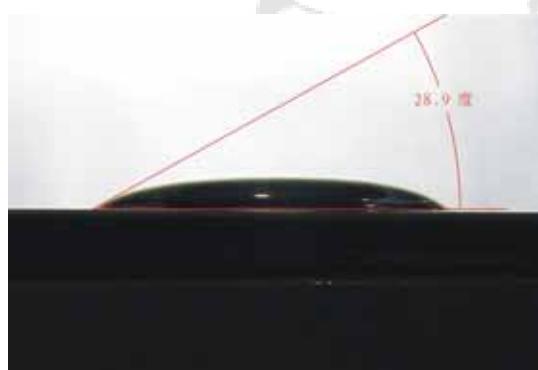
接觸角測定



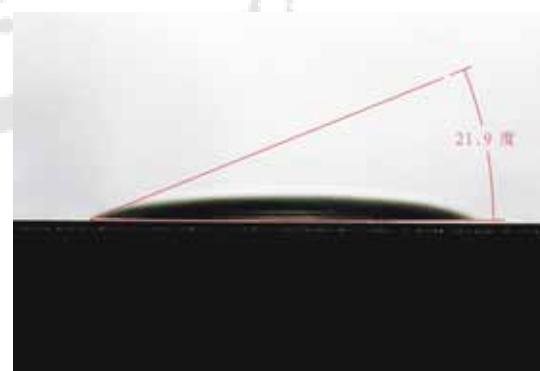
圖一：水與 304 不鏽鋼的接觸角



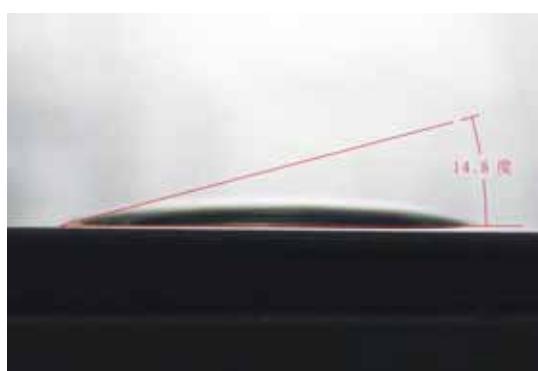
圖二：丙二醇與 304 不鏽鋼的接觸角



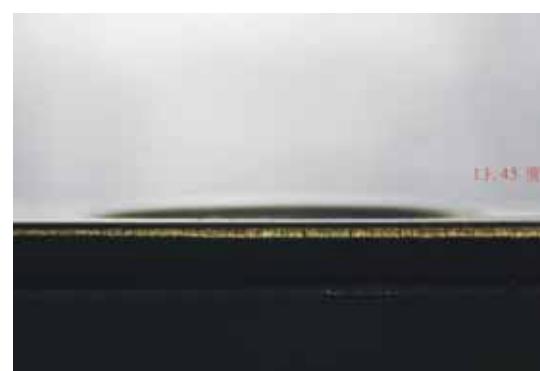
圖三：Glycolic Acid 與 304 不鏽鋼的接觸角



圖四：Tween 60 與 304 不鏽鋼的接觸角



圖五：2EHP 與 304 不鏽鋼的接觸角



圖六：Jojoba Oil 與 304 不鏽鋼的接觸角

五、討論：

本研究結果顯示水、丙二醇、Glycolic Acid、Tween 60、2-EHP 及 Jojoba Oil 與不鏽鋼之間的接觸角均不盡相同。若針對化粧品成份的性質或結構進行分類再與所測定的接觸角進行分析整理，則可提供工廠作為化粧品的生產與工廠設計時的重要參考。此研究的結果也可進一步應用於化粧品的生產條件研究及生產容器的材質選擇與設計上。

六、參考文獻：

1. YONG-JAE YU, JUNG-GU KIM, and JIN-HYO BOO, *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE LETTERS* **21**, 2002, 951– 953
2. V. Thoreau, L. Boulange and J.-C. Joud, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, In Press, Corrected Proof, Available online 5 February 2005.
3. V. Roucoules, F. Gaillard, T. G. Mathia and P. Lanteri, *Advances in Colloid and Interface Science*, 97 (1-3), 177-201, 2002.

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(12)—中草藥在化妝品防腐效果之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：林清宮

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 21 日

一、摘要：

化妝品中防腐劑的使用極為重要，本計畫擬針對具有殺菌抑菌效果之中草藥探討其作為化粧品防腐之可能性進行評估，評估方法包含葡萄球菌、大腸桿菌、黴菌等之抑菌圈及抑菌最低濃度之測定。利用本計畫之研究不但建立化妝品防腐之評估平台，同時期待能將中草藥應用在化妝品之防腐劑用途。

二、前言：

化妝品經常使用 paraben 系列之防腐劑，目的是防止化妝品在保存期限內，受到微生物污染，因而產生劑型之不安定及成分之變質，甚至產生異味與色澤改變。雖然，此類防腐劑效果良好，但是有些人膚質較為敏感，可能會對防腐劑產生過敏反應，因此防腐劑的種類需要有所改變。

部分中草藥在過去文獻中被證實具有抗菌作用，因此本計畫擬篩選具有抗菌作用之中草藥，期能作為未來開發成為化妝品有用之防腐劑。

三、材料與方法：

設備：Laminar flow 無菌操作台, incubator

材料：A. microorganisms(葡萄球菌、大腸桿菌、黴菌)

B. 細菌培養基/黴菌培養基

C. 中藥材：以篩選出之藥材

中藥材之抑菌能力測試：

先培養細菌於試管中，在 37 °C 24 小時後均勻塗抹在洋菜瓊

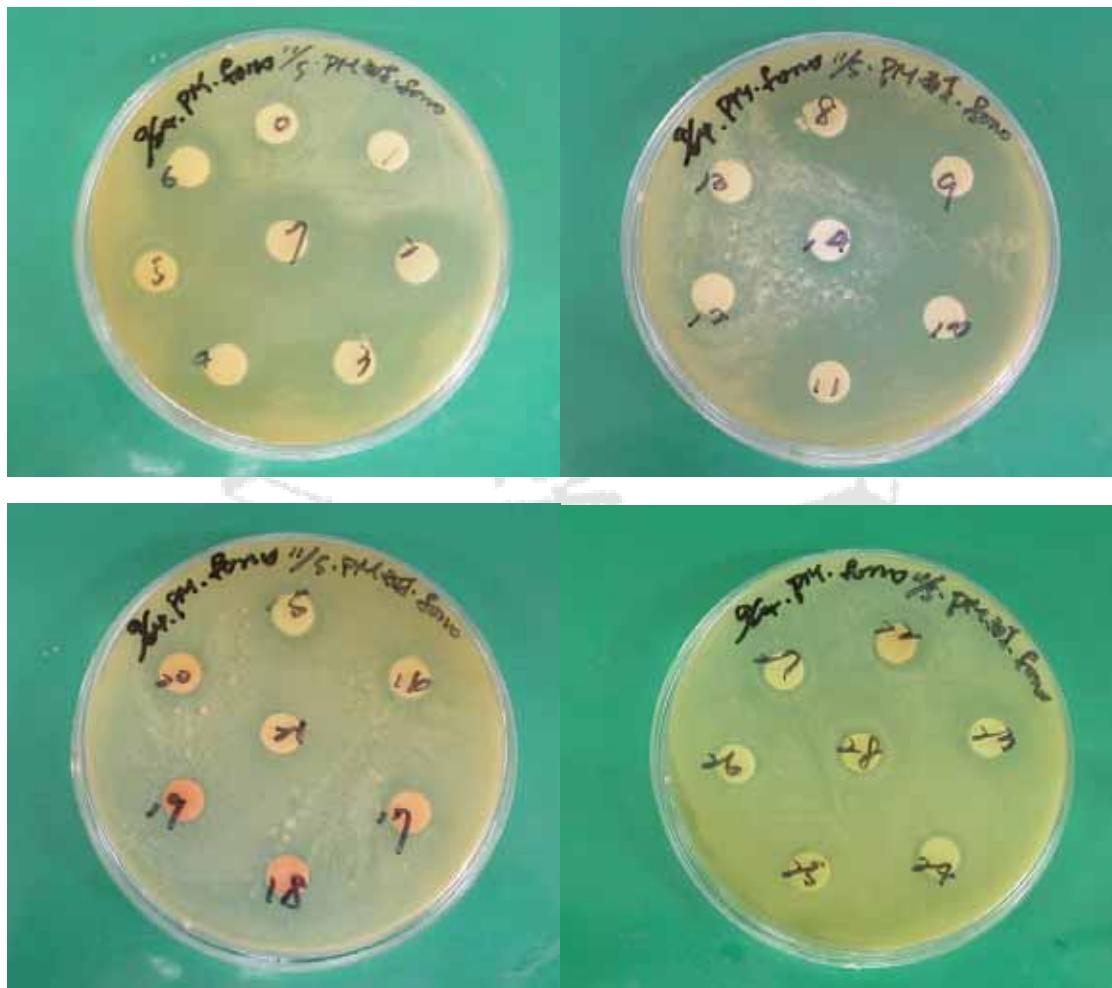
脂上，貼上含中草藥之測試小紙片，繼續培養 16 hr，計算抑
制圈的大小，由此數據得知中草藥之抗菌能力。

四、結果：

編 號	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
抑制圈 -1 (cm)	0.3	0.3	0.5	0.8	1.0	0.5	0.8	1.0	0.5	0.5	0.5
抑制圈 -2 (cm)	0.1	0.0	0.3	0.5	0.5	0.2	0.2	0.3	0.8	0.6	0.7
抑制圈 -3 (cm)	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.1	0.3	0.5	1.0	0.8	0.8
抑制圈 -4 (cm)	0.0	0.0	0.4	0.5	0.6	0.1	0.3	0.5	0.8	0.5	0.5

編 號	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
抑制圈 -1 (cm)	0.5	0.5	0.8	1.0	1.0	0.5	0.7	1.0	0.8	1.0	0.9
抑制圈 -2 (cm)	0.7	0.0	0.0	0.5	0.5	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3

抑制圈 -3 (cm)	0.7	0.4	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
抑制圈 -4 (cm)	0.7	0.0	0.0	0.0	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3



部分中草藥具有不錯的抑菌能力，未來可搭配其他抗菌成分，以便發展更好之抗菌及防腐劑。

五、參考文獻：

- A. Tülin Güleç, Müge Demirbilek, Deniz Seçkin, Füsün Can, Yasemin Saray, Evren Sarifakioğlu and Mehmet Haberal, Superficial fungal infections in 102 renal transplant recipients: a case-control study *Journal of the American Academy of Dermatology, Volume 49, Issue 2, August 2003, Pages 187-192*
- Andrew C. Satchell, Anne Saurajen, Craig Bell and Ross StC. Barnetson Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo *Journal of the American Academy of Dermatology, Volume 47, Issue 6, December 2002, Pages 852-855*
- Luis Squiquera, Lilian Plotkin, Irina Mathov, Ricardo Galimberti and Juliana Leoni , Analysis of the antifungal activity of ketoconazole, zinc pyrithione, and ciclopirox olamine against *Pityrosporum ovale*. A diffusion assay for cultures in solid media *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, Volume 7, Issue 1, July 1996, Pages 26-29*
- Jan Faergemann, *Pityrosporum ovale (malassezia furfur)*: as the causative agent of seborrhoeic dermatitis; new treatment options *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, Volume 5, October 1995, Pages S187-S188*

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(13)—膠原蛋白增生效果平台建立與評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：林清宮

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 21 日

一、摘要：

化妝品經常標榜具有膠原蛋白刺激能力，然而卻缺乏評估篩選平台，本計畫針對中草藥以新建立之評估系統篩選有效部分，建立方法是以細胞模式建立膠原蛋白增生效果平台。利用本計畫之研究不但建立膠原蛋白增生效果平台，同時期待能將中草藥應用在化妝品之膠原蛋白增生效果。

二、前言：

皮膚皺紋減少是女性普遍的需求，市面上所謂的抗老化化粧品是否有效仍然存疑，有些產品可能潛藏有害化學物質，消費者在不知情情況下，若是長期使用，將會對健康造成很大傷害，藉由本計畫期能開發安全又有效之抗老化化粧品，不但能提升化粧品技術，亦能帶動我國相關產業之發展。

本計畫目標包括：

1. Establishment of the *in vitro* collagen stimulation assay system
2. Find out some herbs with potent collagen stimulation activity

三、材料與方法：

分光光度計 Spectrophotometer U-3200(Hitachi), Eliza reader,

Laminar flow, CO₂ incubator, inverted microscope

進行步驟：

1. Establishment of the in vitro culture system
2. Measurement of collagen synthesis
3. Maximum induction of collagen
4. Screening of herbal extracts

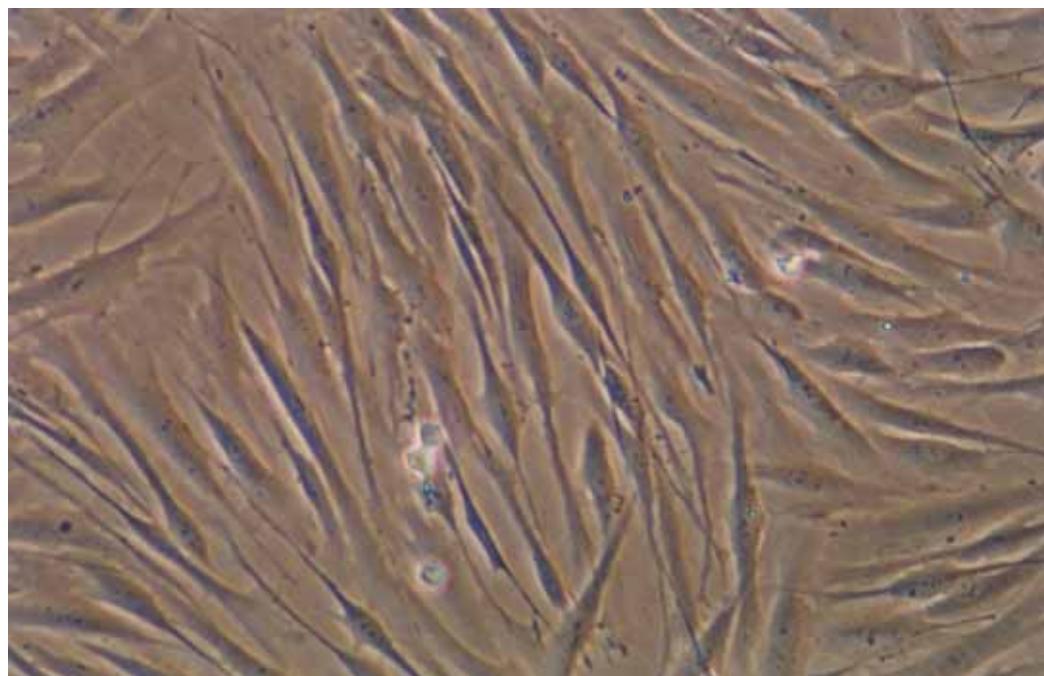
四、結果與討論：

A. 細胞模式的建立：Human foreskin fibroblast cell culture system

細胞模式採用人類正常細胞株(HS68, *Homo sapiens*; skin; foreskin; fibroblast; newborn male ;adherent)進行，細胞自冷凍狀態下，先經過解凍程序，培養於 37°C, 5 % CO₂ 環境下，培養基條件為：

90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum

細胞培養照片



B. 膠原蛋白偵測系統的建立：

免疫染色：

1. Antibodies:

mouse anti-human collagen type I monoclonal antibody
goat anti-mouse secondary antibody(conjugated with AP)

2. Substrates for alkaline phosphatase

C. 中草藥的篩選

中草藥篩選以粗萃取液為主，萃取方式為微波水萃法，經過冷凍乾燥後備用。測試濃度以 1 mg/ml 為基準，測試前先評估其細胞毒性，評估方法如下：

MTT 方法：利用活細胞 dehydrogenase 可將黃色的 MTT[3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 還原成藍紫色的 formazan，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 μ l 培養液及 10 μ 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。

Trypan blue 方法：利用活細胞可將藍色 Trypan blue 排出的原理，直接以一般光學顯微鏡觀察，測量細胞存活率。

Neutral red 方法：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 NRU_{50} 。

TUNEL 方法： TUNEL(TdT-mediated dUTP-florescein nick end labeling)，細胞經樣品處理後，以 paraformaldehyde 固定 30 分鐘，再以 0.1 % Triton X-100 將細胞膜打洞，然後以 Terminal deoxynucleotidyl transferase 將含有螢光物質之 dUTP 接在有 DNA 斷裂位置，使死亡細胞發出螢光，另外也再利用 alkaline phosphatase conjugated anti-florescein 抗體反應後，以 alkaline phosphatase 受質進行呈色反應，直接以顯微鏡觀察，計算 LC_{50}

在確認細胞毒性後，再以免疫染色法評估其產生膠原蛋白能力，最後以人體試驗驗證其實際效果，有關人體(*in vivo*)皮膚抗老化有效性試驗方法如下：

1. 選定 35 歲以上受試者。
2. 塗抹樣品前先以 Cutometer 測定彈性，然後每天塗抹兩次樣品。
3. 每週以 Cutometer 測定塗抹抗老化乳液及塗抹對照乳液部位之皮膚的彈性值。
4. 連續測定 8 週，然後比較彈性值的差異。

五、參考文獻：

- Bernard, P. and Berthon, J. Y. 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. International journal of Cosmetic Science. **22**, 219-226.
- Boots the chemist Ltd. The guide to practical measurement of UVA/UVB ratios. The Boots Chemist, PLC, Nottingham, England.
- 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.
- Cosmetics & toiletries 1996. Natural and Botanical products formulary. Vol **111**, 81-94.
- Easton, A. Women have deadly desire for paler skin in the Philippines. *The Lancet* **352**, 555.
- Fitzpatrick, T. B. 1995. Pathophysiology of hypermelanoses. *Clin. Drug. Invest.* **10** (suppl. 2)
- Gohman-Yahr, M. 1996. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clinics in Dermatology*. **14**, 153-160.
- 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.
- 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.
- Melo, P. S., Duran, N., and Haun, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. 2000. *Toxicology letters* **116**, 237-242.
- 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.
- Motoyoshi, K., Ota, Y., Takuma, Y. and Takenouchi, M. 1998. Wrinkles from UVA exposure. **113**, 51-56.
- Phillips, B. J. 1996. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro* **10**, 69-76.
- Schallreuter, K. U. et al. 1994. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.
- Shin, N. H. et al. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochememical And Biophysical Research Communications*. **243**, 801-803.
- Shirota, S. et al. 1994. Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 266-269.
- Smith, J. 1996. State of the industry: the Asia-Pacific cosmetics and toiletries sector, 1995. *DCI*. 24-34.
- 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.



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(14)—篩選具改善座瘡之中草藥

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：蔡玲玲

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日

一、摘要：

痤瘡桿菌 *Propionibacterium acne* 為引起青春痘的原因之一。以水蒸氣蒸餾法萃取植物精油，將其配成不同濃度包括 1、5、10% 的精油乳液，評估對痤瘡桿菌的抑菌效果。結果顯示以檜木精油抑菌效果較其他精油好，尤加利、白千層、樟樹、薰衣草對痤瘡桿菌無任何顯著的抑菌效果。將不同的精油混合，以 5% 濃度的精油乳液測試，亦不具抑菌作用。此外，無患子萃取物洗髮精對痤瘡桿菌也無抑菌活性。

二、前言：

痤瘡俗稱青春痘或面皰，好發於年輕人。如果處理不當，易使其惡化，甚至囊腫、發炎，於治癒後會留下疤痕或造成色素沉澱，影響美觀。青春痘的發生起源於毛孔出口的角質增厚因而變狹窄，若有過量的皮脂分泌，會與角質混在一起形成角栓。毛孔內的細菌會將油脂分解釋出脂肪酸。脂肪酸會使毛孔角化阻塞，有些則會刺激毛孔周圍的真皮組織，造成發炎。若被化膿菌感染，會形成膿庖。青春痘形成的因素有荷爾蒙分泌失調、細菌的感染、使用化粧品後未清潔乾淨、月經週期、情緒、便秘、遺傳、飲食、氣候、藥物等。所以要預防青春痘的發生與惡化，必須針對上述原因做妥善的處理。另可使用角質剝離溶解劑、皮脂抑制劑、殺菌劑等以治療青春痘。

中草藥含有許多天然的殺菌劑或抗發炎成分，若能由中草藥萃出這些有效成分，製成各式保養品，將有助於預防及改善青春痘。本計畫主要針對細菌—痤瘡桿菌感染所引發之青春痘，以水蒸氣蒸餾法萃取植物精油，加入不同濃度至圓盤濾紙上，觀察抑菌圈的大小。另要比較不同精油萃出物對於抑菌效果是否有加成的作用。

三、材料與方法：

菌種培養：痤瘡桿菌 (*Propionibacterium acne* ATCC6919) 購自生物資源保存及研究中心（新竹）。培養基為 reinforced clostridial agar，培養溫度為 37°C，此外尚需使用厭氧產氣包，於厭氧罐中生長。

中草藥：檜木、尤加利精油由廠商提供。白千層與樟樹葉子以及薰衣草放於陰涼處 15 天後，以水蒸氣蒸餾法萃取精油。另有廠商提供之無患子萃取物洗髮精作測試。

精油乳液製備：吸取適量精油與 Tween 80 (1%) 混合均勻，再將其加入足量的蒸餾水內，以 vortex 混合均勻，製備成不同濃度的精油乳液。

圓盤擴散法：測試菌株需活化 3 天後，再進行平盤塗抹。之後，以一個濾紙盤（直徑 8mm），加入不同濃度的精油乳液，將其放入於已接種被檢菌體之固體培養基內，培養一定時間後，測定抑制環之大小，檢定其對被檢菌之抗菌能力。

四、結果

實驗中所測試之精油，以檜木精油的抑菌圈較大，但抑菌效果不佳（表一）。其他精油包括尤加利、白千層、樟樹、薰衣草對痤瘡桿菌無任何顯著的抑菌效果（表二至表五）。5% 混合精油亦不具抑菌效果（表六）。此外，無患子萃取物洗髮精對痤瘡桿菌不具抑菌作用（表七）。

表一 檜木精油對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	10	10	10

表二 尤加利精油對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	9	9	9

表三 白千層葉精油對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	9	9	9

表四 樟樹葉精油對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	9	9	9

表五 薰衣草精油對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
1%	8	8	8
5%	8	8	8
10%	8	8	8

表六 5% 混合精油乳液對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

	Day 3	Day 4	Day 5
2.5% H + 2.5% E	8	8	8
2.5% H + 2.5% M	8	8	8
2.5% H + 2.5% C	8	8	8

*H：檜木；E：尤加利；M：白千層；C：樟樹

表七 無患子萃取物洗髮精對痤瘡桿菌的抑菌圈大小

Concentration	Day 3	Day 4	Day 5
80%	8	8	8
100%	8	8	8

五、討論：

許多文獻指出精油具有抗菌作用，且對不同的菌株效果不一。本實驗所測試之精油均對痤瘡桿菌無任何顯著的抑菌效果。混合精油亦不具抑菌作用。實驗所用的檜木和尤加利精油均來自廠商，精油的植物來源以及純度無法確定；其次，精油乳液的組成份會影響精油的抑菌效果。又痤瘡桿菌需培養多天才可看出顯著生長，精油含揮發性成分，可能有些成分已揮發而失去抑菌作用，因此，測試結果只針對本實驗所測試的樣品。

無患子萃取物含有皂素，為天然的界面活性劑，早期民間利用無患子來洗頭。無患子萃取物若可抑制痤瘡桿菌生長，可將其製成洗面乳，改善青春痘。但實驗結果顯示無患子萃取物洗髮精並不具抑菌效果。但因商品的無患子萃取物濃度無法確定，無法判斷是否高濃度的無患子萃取物或其他配方產品也有相同的結果。

六、參考文獻：

- Gustafon, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G. and Warmington, J. R. 1992. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology. 26, 194.
- Maccioni A. M.; Anchisi; Sanna A; Sardu C, and Dessi S. 2002. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. International Journal of Cosmetic Science, 24, 53.
- Squicciarini, L., Plotkin, L., Mathov, I., Galimberti, R., and Leoni, J. 1996. Analysis of the antifungal activity of ketoconazole, zinc pyrithione and ciclopirox olamine against *Pityrosporum ovale*. A diffusion assay for cultures in solid media. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 7, 26.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry, 91, 621.

United States Pharmacopeia XXIV<1227>, 1999, Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles,pp.2152.

Webster, G. F., Leyden, J. J., McGinley, K. J. and McArthur, W. P. 1982. Suppression of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factor production in Propionibacterium acnes by subminimal inhibitory concentrations of tetracycline, ampicillin, minocycline, and erythromycin. Antimicrobial agents and chemotherapy, 21, 770.



嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(15)—化妝品有效成分之奈米包覆

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：陳榮秀

子計畫主持人：李佳芬 教授

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：化粧品應用與管理系

中華民國 94 年 02 月 24 日

一、摘要：

本研究主要為合成具溫度感應性之乳膠顆粒，以作為化妝品有效成分之載體，此載體具有溫度感應性，其在某一溫度以上會收縮將內部之化妝品有效成分釋放出來，而在某一溫度以下則不會有收縮的現象而可將化妝品有效成分儲存在其內部，在此研究中我們主要是以氮-異丙基丙烯醯胺(*N*-isopropylacrylamide)-幾丁聚醣(Chitosan)交連共聚物為核層，甲基丙醯酸甲酯(methyl methacrylate)-甲基丙醯酸(methacrylic acid)共聚物為殼層，來製造出化妝品有效成分之載體，並對其合成、性質及應用做一探討。

二、前言：

藥物控制釋放(drug controlled-release)技術從西元1960年開始受到重視，其目的在於使藥物在使用時，能夠依所需的速率施用於目標物(target)。由於藥物控制釋放系統可控制藥物進入人體內的釋放速率，因此可減少投藥的頻率、避免夜間投藥，且可減少藥物在血液中濃度的變動程度，使藥效更均勻。此外，由於藥物可針對目標物發揮療效，故可減少藥物的使用過量或浪費，同時避免對腸胃道的刺激。且對於一些毒性較強的藥物而言(例如：惡性腫瘤的化療藥物)，有其局部投藥的必要性，以減少身體其他部位受到傷害。

有些材料的結構、性質會隨外在化學或物理性刺激(例如：PH、

light、temperature...) 而改變，這類材料稱為智慧型材料 (intelligent materials)，在近年來被廣泛應用於藥物控制上。在本研究中我們預計將其應用於作為化妝品有效成分之載體。

三、材料與方法：

2.1 藥品

氮-異丙基丙烯醯胺(*N*-isopropylacrylamide, NIPAAM)、幾丁聚醣(Chitosan)、甲基丙醯酸甲酯(methyl methacrylate, MMA)、甲基丙醯酸(methacrylic acid, MAA)、交聯劑*N,N'*-methylenebisacrylamide(MBA)、起始劑ammonium persulfate(APS)、醋酸(acetic acid)、咖啡因(Caffeine)。

2.2 合成核殼型共聚乳膠顆粒

於反應瓶中依比例加入去離子水、醋酸、Chitosan、NIPAAM單體、MBA 交聯劑，在室溫下攪拌。待攪拌溶解均勻後，升溫至 50°C，轉速 300rpm，通氮氣，加入起始劑，反應 2 小時。再依比例加入 MAA、MMA 繼續反應 1 小時。將反應後之乳液樣品以透析袋進行透析(約一個禮拜)，以進行後續之測試分析。本研究所列之樣品代號，例如：2/10-3%-1/5 表示核層組成 chitosan/NIPAAM 重量比為 2/10, 交連劑濃度為 3%，殼層組成重量比為 1/5。

2.3 藥物釋放測試

首先，測定各種不同濃度之 Caffeine solution 在波長 272nm 之 UV 吸收值，建立 Caffeine 之 Calibration curve。

取 0.15g 乳膠顆粒，將其置於 caffeine 之磷酸鹽緩衝溶液中 (0.012g Caffeine 溶於 5g 磷酸鹽緩衝溶液)，並以超音波震盪 10 分鐘，再置於 4°C 環境下進行膨潤 3 小時。之後將之冷凍乾燥成包覆 Caffeine 的乳膠顆粒粉末。

取約 0.05g 凍乾後的粉末以模具及壓片機壓成直徑約 1 公分的圓片，並將之置於 100g 37°C 的 PH7.4 之磷酸鹽緩衝溶液中進行 Caffeine 的釋放實驗，於不同時間取樣以 UV 分光光度計量測緩衝溶液中 Caffeine 濃度。

四、 結果與討論：

3.1 合成核殼型共聚乳膠顆粒

在核殼型複合乳膠顆粒的合成中，我們改變 Chitosan / NIPAAM 重量比例、交聯劑濃度、MAA/MMA 重量比例，探討這些變因對於核層的轉化率及其總轉化率的影響。

由表 1. 可看出，隨著 Chitosan / NIPAAM 重量比例增加，核層反應速率有增加的趨勢。而當交聯劑濃度愈高，核層反應速率愈慢。原因是當 Chitosan 愈多，界面保護的效果愈好，形成的顆粒愈小、愈多，

因此反應速率較快。而當交聯劑存在時，會限制單體的擴散作用，而使得反應速率變慢。

然而由總體轉化率的部分發現不論隨著 Chitosan / NIPAAM 重量比例增加或交聯劑濃度愈高，總體轉化率皆呈上升的趨勢，因此我們推斷在殼層的成分中應有 Chitosan 及 polyNIPAAm 存在，而且其在殼層中所佔比例應隨 Chitosan / NIPAAM 重量比例的增加或交聯劑濃度的增加而增加。

此外，我們亦發現增加殼層單體的進料比例亦會使總體的轉化率增加。

表 1. 不同組成比例與轉化率的關係

核層 Chitosan/NIPAAM 重量比例	核層 交聯劑 濃度	殼層 MAA/MMA 重量比例	核層轉化率 (%)	總體轉化率 (%)
2/10	3%	1/5	82.02	85.63
3/10			82.98	87.38
5/10			85.91	88.59
2/10	3%	1/5	82.02	85.63
	5%		81.25	86.84
	10%		81.02	88.42
2/10	3%	1/5	82.02	85.63

		2/5		86.79
		3/5		88.34
2/10	3%	0.5/2.5	82.02	84.93
		1/5		85.63
		2/10		90.95

3.2 藥物釋放測試

我們以 caffeine 為模型藥物進行藥物釋放測試，並對照單純將 caffeine 與乳膠顆粒混摻的樣品，圖 25~28.為其結果。

由圖中可發現，前 30 分鐘約 70% 藥物釋放量的圖形與混摻的樣品相近，因而推斷此部分的 caffeine 應為未被包覆或吸附在顆粒表面的 caffeine。所以由實驗證實經由乳膠顆粒膨潤作用後，藥物可進入乳膠顆粒內部，且在 37°C PBS 中有部分藥物可以有效的被保護住而不釋放出來。

此外可發現當 Chitosan/NIPAAM 重量比例越高、交聯劑濃度越大、MAA/MMA 重量比例越高、殼層越薄時，所保存的 caffeine 越少。由膨潤性質的測試結果亦發現，這些較不易保存 caffeine 的樣品於 pH7.4 的磷酸鹽緩衝溶液中，不論在 20°C 及 37°C 均較為膨潤。因此推論這些樣品雖然於包覆藥物時因膨潤性較好而能包覆較多藥物，但在藥物釋放時亦因膨潤性較好而不易將藥物留在顆粒中。在 2/10-3%-3/5 及 2/10-3%-0.5/2.5 的樣品中，前 30 分鐘的釋放曲線與混

摻樣品明顯不同，這是因為 2/10-3%-3/5 的殼層中含有較多的 MAA，因此在 pH7.4 的環境中，殼層較軟化，使得 caffeine 較容易 swelling 進入乳膠顆粒中，因而釋放時皆需由乳膠顆粒的內部釋放出來，因此，前 30 分鐘的釋放曲線與混摻樣品明顯不同是因為所釋放出來的 caffeine 是包覆在乳膠顆粒內部的 caffeine，而不是吸附在顆粒表面的 caffeine。2/10-3%-0.5/2.5 的樣品由於殼層很薄，使得 caffeine 較易被包覆在乳膠顆粒的內部，因而釋放時皆由乳膠顆粒的內部釋放出來，使得釋放曲線與混摻樣品明顯不同。

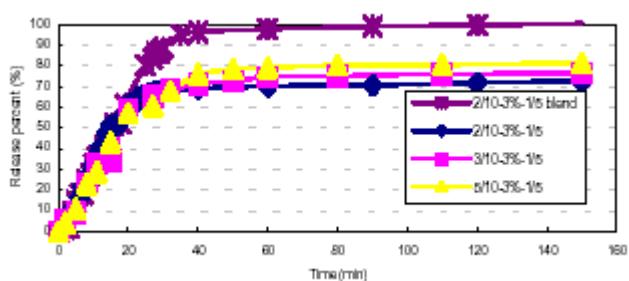
4、結論

本研究以陰離子型起始劑 APS 合成以 Chitosan 及 polyNIPAAM 為核層，以 PMAA 及 PMMA 為殼層的共聚乳膠顆粒。發現加入 PMAA 及 PMMA 的殼層後，顆粒在 pH 大於 7 的緩衝溶液中，均能維持很好的穩定性。而在吸水性測試方面，因 polyNIPAAM 受到殼層的限制，使得在 pH4 時的吸水性主要由 Chitosan 控制，在 pH9 時的吸水性主要由 PMAA 控制，而當殼層較薄時，polyNIPAAM 對吸水性的影響才會增加。並且由轉化率、吸水性、表面電位的實驗結果歸納得知，當 Chitosan/NIPAAM 重量比例增加或交聯劑濃度增加，不只會使殼層反應較完全，亦會使殼層的 Chitosan 及 polyNIPAAM 的量增

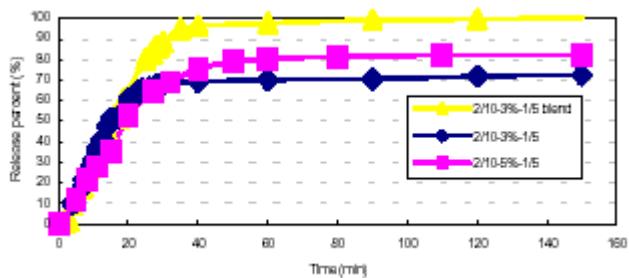
加。

在藥物的包覆及釋放上，證實經由乳膠顆粒膨潤作用後，藥物可確實進入乳膠顆粒內部，且在 37°C PBS 中有部分藥物可以有效的被保護住而不釋放出來。並且膨潤性越好的樣品雖然因膨潤性較好而能包覆較多藥物，但在藥物釋放時亦因膨潤性較好而不易將藥物留在顆粒中。

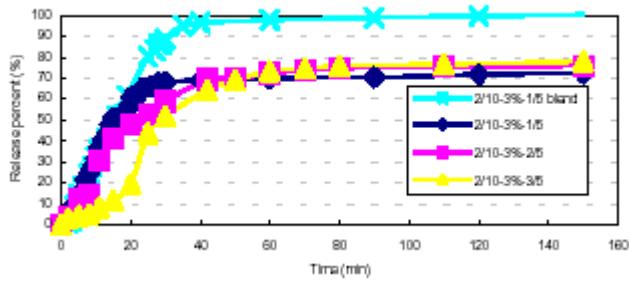
在蛋白質的接枝實驗方面，當表面 PMAA 所佔比例較多時或因反應溫度較低時，都會使得有較多的蛋白質接在乳膠顆粒上，所以推斷蛋白質的鍵結不但與乳膠顆粒表面的官能基數量有關，亦受到乳膠顆粒的膨潤程度影響。



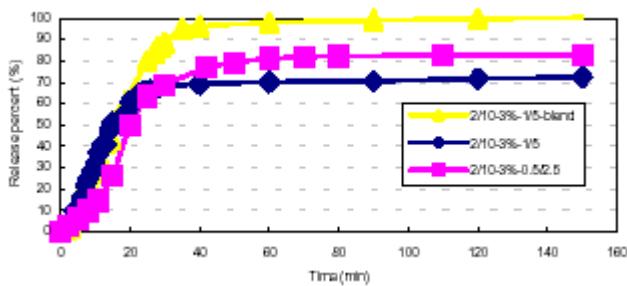
圖一.不同 chitosan/NIPAAm 重量比率對藥物釋放的影響



圖二.不同交連劑濃度對藥物釋放的影響



圖三.不同 MAA/MMA 重量比率對藥物釋放的影響



圖四.不同殼層厚度對藥物釋放的影響

五、參考文獻：

1. T.L. Lowe, H. Tenhu, H. Tylli, J. Appl. Polym. Sci. 73 (1999) 1031-1039.
2. W.F. Lee, Y.J. Chen, J. Appl. Polym. Sci. 82 (2001) 2487-2496.
3. K. Kono, A. Henmi, H. Yamashita, H. Hayashi, T. Takagishi, J. Control. Rel. 59 (1999) 63-75.
4. S.Y. Kim, S.M. Cho, Y.M. Lee, S.J. Kim, J. Appl. Polym. Sci. 78 (2000) 1381-1391.
5. T. Kidchob, S. Kimura, Y. Imanishi, J. Control. Rel. 50 (1998) 205-214.
6. J.E. Chung, M. Yokoyama, M. Yamato, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, J. Control. Rel. 62 (1999) 115-127.
7. B.R. Saunders, B. Vincent, Adv. Colloid Interface Sci. 80 (1999) 1-25.

8. C. Ganorkar, F. Liu, M. Baudys, S.W. Kim, Polymer Preprints-Papers
Presented of the Meeting 38 (1997) 560-561.

9. 國科會專題計畫 NSC 89-2216-E-041-004

