

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 93 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 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，但已知道和活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。

抗老化化粧品為當今化粧品產品之主流，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-ethylbenzthiazoline)-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 %	87.33 % IC50:11.20ppm Trolox IC50:8.0 ppm
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、等等不同型態，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,

329.

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. Aguirre, 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.

