

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

化粧品清除自由基能力之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNCS92-05

執行期間：92年1月1日至92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 93 年 02 月 11 日

一、 背景：

化粧品含自由基清除能力，近年來已逐漸成為市售產品主要訴求之一，而天然物在自由基及抗氧化的領域上已受到廣泛地研究。最近研究顯示，中草藥的成分中特別是酚類化合物，被認為是對人體健康有利的生物活性成分。酚類化合物普遍分布在天然物中，而且有廣泛的生物活性功能，包含抗氧化、抗老化、抗微生物、抗發炎及血管擴張作用。

自由基定義為一分子含有未成對電子在外層軌域，這些一般都是不穩定而且非常活躍的。例如：氧屬自由基(ROS)的有超氧自由基($O_2\cdot^-$)、氫氧自由基($OH\cdot$)、有機過氧基($RO_2\cdot$)、氧有機自由基($RO\cdot$)、氫過氧基($HO_2\cdot$)，而一氧化氮(NO)和二氧化氮($\cdot NO_2$)屬於氮屬自由基(RNS)。氧和氮屬自由基(RNS)可以形成其他非自由基的活躍族群，例如：過氧化氫(H_2O_2)、次氯酸($HOCl$)、次溴酸($HOBr$)以及過氧亞硝鹽($ONOO^-$)。此外，這些活性氮屬自由基(RNS)和活性氧屬自由基(ROS)，產生在人或動物的病理和生理的環境中是扮演重要的角色。

為了形成活性氧、活性氮、活性氯，氧是必須的分子。在圖A 可以看到人體內氧及氮自由基的形成，一氧化氮從精胺酸藉由一氧化氮合成酶而來，而一氧化氮合成酶可分為三種異構

物:nNOS 神經型一氧化氮合成酶(是源於神經組織，也稱為 NOS-1 或 NOS-I)，誘發型一氧化氮合成酶(源於巨噬細胞的活化，也稱為 NOS-II 或 NOS-2)以及內皮性一氧化氮合成酶(源於血管內皮細胞，又稱為 NOS-III 或 NOS-3)。所有的一氧化氮合成酶異構物的催化作用，皆須氧、tetrahydrobiopterin、NADPH、calmodulin、FAD、FMN 以及 heme 來參與反應。此外，Ca²⁺ 是 nNOS 及 eNOS 作用所必須的。相反的，超氧自由基的產生是從氧利用很多的途徑形成：

- (1) NADPH 氧化酶進行 NADPH 氧化反應；
- (2) Xanthine 氧化酶進行 xanthine 及 hypoxanthine 的氧化反應；
- (3) 藉由粒腺體電子傳遞系統降低價數的氧化反應(例如：NAD，NADH，NADPH，FADH₂，FAD)；
- (4) monoamine，flavins，hemoglobin 的自動氧化反應；
- (5) 氧由 cytochrome p450 還原一個電子；
- (6) 當精胺酸或 tetrahydrobiopterin 不足時，氧從 nNOS 或 eNOS 會還原一個電子

超氧歧化酶(SOD)可以將超氧自由基轉變成過氧化氫，過氧化氫藉由 cytochrome P-450、D-amino acid 氧化酶、乙醯輔酶 A 氧化

酶或尿酸氧化酶可以使氧的二個電子還原。另外，sarcosine 的氧化在甘胺酸代謝的路徑中，產生 H_2O_2 的形成。在水和氧的存在下，離子的激發造成超氧自由基、 H_2O_2 、氫氧自由基的產生。然而，氫氧自由基是主要不好的活性氧自由基，一氧化氮可以與超氧自由基或過氧化氫形成過氧亞硝鹽，這個氧化劑的強度是比超氧自由基或過氧化氫還要強。另一個很強的氧化劑 $HOCl$ ，是從 H_2O_2 和 Cl^- 藉由 myeloperoxidase(一種 heme 酵素)產生。

當自由基及其他活性族群(例如：氫氧自由基、氫過氧基、過氧亞硝鹽)從不飽和脂肪鏈(例如： ω -6 多元不飽和脂肪酸[簡稱 PUFA])得到一個氫原子時，會產生以碳為中心的脂肪自由基($L\cdot$)。脂肪過氧自由基的形成，是由脂肪自由基外加氧而形成。脂質過氧化基進一步從鄰近的不飽和脂肪酸得到一個氫原子，進行過氧化基鏈鎖的反應。脂質過氧化的結果，可以從很容易地分解而形成脂質烷化自由基($LO\cdot$)。這一系列的活性氧自由基所誘發的脂質過氧化反應，和脂質過氧化自由基與烷氧自由基總稱為 chain propagation。

二、方法：

- a. 取 $375\ \mu L$ 之待測濃度萃取液(或純化合物)之乙醇溶液，分別加入配製好之 20mg/ml DPPH 乙醇溶液 $750\ \mu L$ (呈深紫色)，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）

三、結果與討論

為了證明化粧品含抗氧化作用，我們以 DPPH(一種穩定的自由基) 在乙醇溶液下產生紫色反應，在有抗氧化劑的存在下會產生無色(吸光值下降)。藉此吸光值的變化，來評估中化粧品的抗氧化能力。實驗結果顯示，DPPH(控制組)隨著時間的增加而呈現穩定的吸光值(0-30 分)。DPPH 在 20mg/l 的濃度下，其 517nm 吸光值為 0.310；而在具抗氧化化粧品，吸光值即隨著時間的增加而明顯下降。於是我們選擇了 600 秒、1200 秒、1800 秒來觀察化粧品的清除能力，結果發現其抗氧化能力且呈現時間相關方式。顯示 DPPH 可作為化粧品抗氧化能力之簡易評估模式。