

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以毛細管電泳分析化粧品中的美白成分

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-041-004-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學化粧品應用與管理系

計畫主持人：林維炤

共同主持人：王翠霜

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 93 年 11 月 1 日

中文摘要

本研究以毛細管電泳分析化妝品中常見的五種果酸分別為乳酸 (Lactic acid)、甘醇酸 (Glycolic acid)、檸檬酸 (Citric acid)、酒石酸 (Tartaric acid)、蘋果酸 (dl-Malic acid)。目的為將他們有效分離,並觀察他們移動的情形,我們研究中對(1)離子強度(2)CTAB 濃度(3) 甲醇比例做改變。在不改變 pH 下,研究顯示增高離子強度,會使滯留時間縮短,但是增高到一定程度時,影響也就不大了。而 CTAB 濃度逐漸增高,滯留時間越短,但在大於 1mM 之後則無明顯變化。添加甲醇可以增加分離效果,可是同時也將滯留時間拉長,經過多次實驗,發現當 Na_2HPO_4 與 NaH_2PO_4 濃度為 200 mM、CTAB 濃度 1 mM、甲醇比例 25 % 時,分離效果較佳。

關鍵詞: 果酸, 毛細管電泳, 陽離子界面活性劑

Abstract

Five common used α -hydroxy acids (AHAs) in cosmetics were separated by capillary electrophoresis. These AHAs are lactic acid, glycolic acid, citric acid, tartaric acid and dl-malic acid. A cationic surfactant, Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), was added in buffer to modify the wall of capillary tubing. Several factors were evaluated for separation efficiency. The result showed: (a) The retention time is getting shorter when the ionic strength is increasing. (b) The retention time is also getting shorter when the concentration of CTAB increased until 1 mM. (c) the addition of methanol can increase the retention time. The optimum condition was found at 200 mM Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 , 1 mM CTAB and 25% methanol.

Key words: α -hydroxy acids, capillary electrophoresis, cationic surfactant.

(一) 前言:

果酸的化學結構都在 alpha 位置上具有氫氧基(OH)，英文名稱為 alpha hydroxyl acid，簡寫為 AHA (以下簡稱)。市面上果酸產品，有時並不精確地標示出是哪一種成分，只是以 AHA 來涵蓋。果酸被應用在美容上的歷史，最早可以追溯到西元前，埃及豔后利用牛奶沐浴，而古代法國人也用葡萄渣來洗臉，保持皮膚光滑細緻；牛奶中的「乳酸」就屬於果酸之一；之所以慣用「果酸」稱呼，是因為大部份的有機酸，都是從水果當中萃取出來的。例如：來自甘蔗的甘醇酸 (Glycolic Acid)，來自酸牛奶、番茄汁的乳酸 (Lactic Acid)，來自葡萄的酒石酸 (Tartaric Acid)，來自柳樹皮的水楊酸 (Salicylic Acid)

來自蘋果的蘋果酸 (Malic Acid)，來自檸檬、柳橙以及鳳梨中的檸檬酸 (Citric Acid) 等。自 1970 年代，Dr. Van Scott 與 Dr. Yu 兩位醫師發表了傳統型 AHA 果酸的美容應用以來，全世界似乎都因而陷入對 AHA 果酸的狂熱追求之中。

果酸在現今發展上應用的方面很廣，果酸不僅改變了整個化妝品的風貌，為沉寂一段時間的化妝品界，注入新的活力，也將化妝品帶入「功能性」的領域。國內果酸的風行，不僅在化妝品界，在皮膚科學界也同樣形成風潮，造成化學換膚 (果酸換膚) 的普及。藉此，我們將應用毛細管電泳的分離能力，將一些目前市場上主流的果酸作一個分析及探討，研究它們的作用方式、在電場下的移動速率及改變不同的變因來達到分離的效果。

(二) 實驗方法:

2 - 1 藥品配置與儀器

本實驗以分析甘醇酸 (Glycolic Acid)、乳酸 (Lactic Acid)、蘋果酸 (Malic Acid)、酒石酸 (Tartaric Acid) 及檸檬酸 (Citric Acid) 五種果酸。利用改變 (1) 緩衝溶液的離子強度 (2) 陽離子介面活性劑的濃度 (3) 有機溶劑---甲醇添加的比例，來探討五種果酸在電泳下的分離效果及移動速率。

2 - 1 - 1 實驗藥品與儀器

儀器是使用 BECKMAN P/ACE SYSTEM 2100，毛細管柱，內徑為 50 μ m，長度為 67cm。

2 - 1 - 2 緩衝溶液的配置

實驗所用的緩衝溶液是選用 Na_2HPO_4 與 NaH_2PO_4 。 Na_2HPO_4 購自於 Riedel - de Haen，其純度為 99%。 NaH_2PO_4 購自 J.T BAKER，其純度為 99.6%。兩者比例 1:1 的方式，配置成 500mM, 100ml 之緩衝溶液，再依不同的條件選擇不同的配置方式，依實驗的需要，再將其稀釋成不同的濃度。本實驗需利用介面活性劑 Hexadecyl-trimethylammonium bromid，CTAB 購自於 Fluka 純度為 98%。甲醇購自於 Mallinckrodt。

2 - 1 - 3 樣品的配置

本實驗的五種果酸皆購自於 CHEM SERVICE，純度皆大於 98.8% 以上。將五種樣品分別以純水配置成 10000ppm (μ g/ml)，2ml 的標準品溶液，依實驗需要，再將其添加 1ml 甲醇並以緩衝溶液稀釋至所要濃度。

2 - 2 實驗方法

2 - 2 - 1 管柱前處理

在第一次使用新管柱前，先以 0.1N 的 NaOH 清洗 15 分鐘，再以純水清洗 15 分鐘，最後換上實驗所配置的緩衝溶液清洗 15 分鐘，於 25 $^{\circ}$ C 下。為了維持毛細管柱實驗的在現性，每次實驗間皆以 0.1N 的 NaOH 清洗 5 分鐘，純水清洗 5 分鐘，緩衝溶液清洗 5 分鐘，在 25 $^{\circ}$ C 下，清洗完再進行下

一次實驗 當換不同的緩衝溶液時,仍以 0.1N 的 NaOH 清洗 8 分鐘,純水清洗 8 分鐘,緩衝溶液清洗 8 分鐘,在 25 °C 下。實驗完畢後,及每天要實驗前皆以 0.1N 的 NaOH 清洗 10 分鐘,純水清洗 10 分鐘,在 25 °C 下。

3 - 2 - 2 實驗條件

實驗採用壓差注射法,以氮氣施加 0.5psi 的壓力於毛細管進口 10sec。分離電壓為 15kv,分離溫度為 25 °C,選擇的波長為 200nm。

分別改變 Na₂HPO₄ 與 NaH₂PO₄ 濃度,甲醇比例及 CTAB 濃度。

2 - 2 - 3 數據處理

電泳圖譜皆採用 Beckman 之 Gold 軟體紀錄,並積分。

(三) 結果與討論

一開始我們使用 CEZ 模式實驗,而分析物在電場下形成帶負電荷的離子,可是卻只能看見 Lactic acid、Glycolic acid 及 Citric acid,當時我們電極方向從注射口端至偵測端為正極到負極,所以分析物的移動速度為 EOF 速度加上分析物本身移動速度的總和,然而因為負電荷的離子會往正極方向跑,所以無法在實驗時間內出現,因此我們決定添加陽離子界面活性劑,因這五種果酸因含有羧基,在電場下會解離成帶負電的離子,當電極方向從注射口端至偵測端為負極到正極時,五種果酸皆往負極方向跑,添加了陽離子界面活性劑就把管壁中帶的負電荷中和掉,此時 EOF 變得十分的小,因此淨速度就等於分析物本身之移動速度。

3 - 1 離子強度的探討

一般來說 Na₂HPO₄ 與 NaH₂PO₄ 的濃度【圖 3 - 1】,會直接影響分析物的移動情形。在實驗中當緩衝溶液的濃度為 100mM【圖 3 - 4】時,Lactic acid 波形並不夠好看,而且 Glycolic acid 及 Citric acid 分離的情況不是很好,但是仍然可以很明顯的看見兩種。然而,Tartaric acid 及 dl-Malic acid 兩者分的不怎麼開,分離效果可以再更好,所以我們選擇再往上做,看看其變化情形。

在濃度為 150mM 時,情況稍有改善, Lactic acid 波形變的比較漂亮,這是因為離子強度的增強,會對溶液之 pH 值造成影響,如果溶液中之 pH 值大於分析物之 pka 值,就會修飾 peak 使 peak 變漂亮。但是 Glycolic acid 及 Citric acid 和 Tartaric acid 及 dl-Malic acid 依然沒有完全分離,因情況比 100mM 時較佳,所以我們依然選擇繼續往高濃度作。

當濃度改變為 200mM 時,一件有趣的現象發生了, Lactic acid 波形變的很漂亮,而 Tartaric acid 及 dl-Malic acid 也完全的分開,但是 Glycolic acid 及 Citric acid 不但分開了,而且 Glycolic acid 竟然超越了 Citric acid,因為果酸分子結構中,皆有羧基在電場中會解離成帶負電荷,在我們實驗條件下帶的負電荷越多,移動速度越快,而且分子量越小質量就越小,相對的移動也越快,出現的順序依序為:

dl-Malic acid - > Tartaric acid - > Citric acid - > Glycolic acid - > Lactic acid

但是,在濃度 200mM 下, Glycolic acid 移動的速度竟然超越了 Citric acid,所以我們繼續嘗試濃度加高,觀察其變化情形。

濃度加高至 250mM 時,所有的果酸都分離完成,而且波形漂亮。值得注意的是, Glycolic acid 的位置仍然在 Citric acid 之前。濃度調升至 300mM,發現 Lactic acid 竟然和 Citric acid 連在一起,而其他的果酸也分的比較開,可是波形卻變差了,所以我們做到這個範圍,也在此找出當 Na₂HPO₄ 與 NaH₂PO₄ 的濃度為 200mM 時,其分離效果為最好的選擇。

3 - 2 CTAB 濃度探討

在我們設計的濃度中,CTAB 濃度變化,影響不是那麼明顯,一系列的濃度中皆可以將所有 peak 分開,移動速度由低濃度往高濃度進行時,速度會變快,在 0.5~1.5mM【圖 3 - 5】之間移動速度都是持續的往前移,推論陽離子界面活性劑與管壁中負電荷結合,但是管壁中的負電荷位子是有限的,超過 1.5mM 這個濃度後,不論再加高 CTAB 的濃度,也沒有辦法將移動時間往前,但是在 2mM 後,移動速度反而變慢了,爾後當濃度改變為 3mM 速度又變快了,繼續增高到 5mM 後又變慢了,並沒有一定的移動速度,而 CTAB 的臨界微胞濃度為 1.3mM,由【圖 3 - 2】可以發現在 2mM 的時候速度變慢了,因為實驗條件中有加高量的甲醇,會將其臨界微胞濃度改變,假設 1.5mM 為改變後的臨界微胞濃度,超過此濃度後,所有分析物皆形成微胞,所以溶液中已無離子狀態的分析物,因此 2mM 時速度就明顯變慢了。爾後,速度卻又忽快忽慢,推測可能與微胞聚集有關聯,微胞聚集的數目在移動過程中可能改變,影響微胞之移動速度所造成的結果。但是唯一需質疑的一點是,前方的 unknow peak 在一連串濃度變化下卻有了不一樣的改變,在 1mM 濃度下 peak 皆是往上的,但是在 1mM 濃度之上 peak 卻是往下,CTAB 的臨界微胞濃度為 1.3,但是我們實驗條件加了高比例的甲醇,因此其臨界微胞濃度會改變,我們假設此 unknow peak 是否跟其臨界微胞濃度有關,目前尚未有確切的證據可以解釋,值得我們再思考。

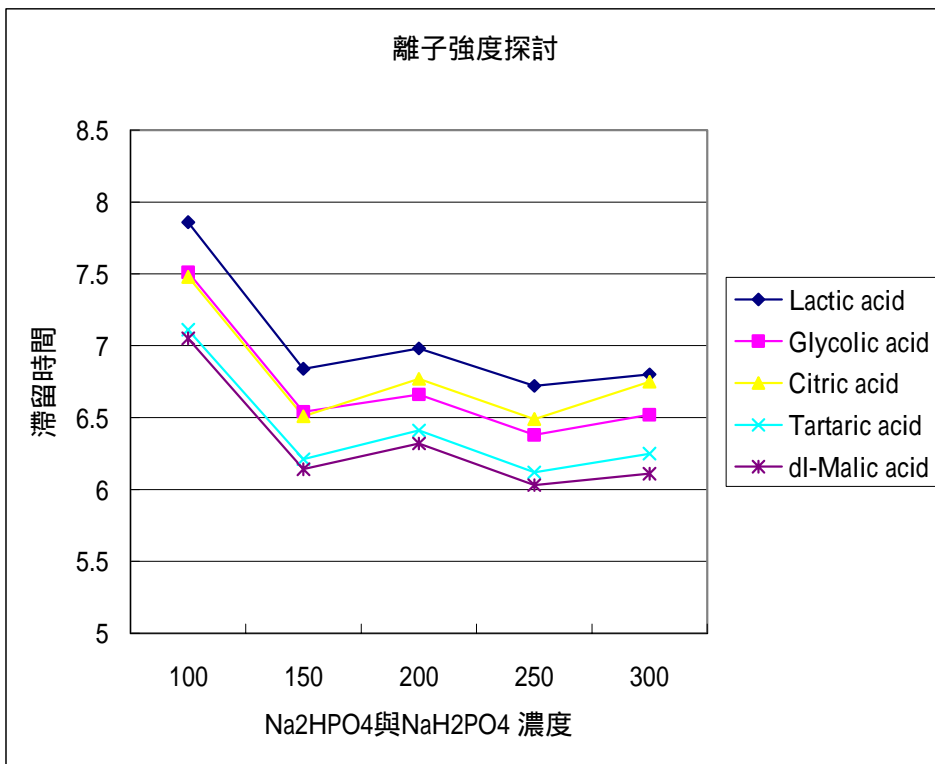
3 - 3 甲醇比例探討

在甲醇比例的這個部分,我們先從 10 %【圖 3 - 6】的甲醇著手,發現 Tartaric acid 及 dl-Malic acid 尚未分開,而且 Lactic acid 的波形還不夠漂亮,而 Glycolic acid 的位置在 Citric acid,並沒有調換。

加高甲醇比例到 15 % 後,發現 Tartaric acid 及 dl-Malic acid 有漸漸分開的跡象,而 Glycolic acid、Lactic acid 出現時間都有明顯的往前移,20 % 的甲醇效果更佳,此時 Glycolic acid 卻與 Citric acid 連在一起了,為了繼續觀察其發展狀況,我們嘗試將甲醇比例再調高至 25 %,情況又改變了 Tartaric acid 及 dl-Malic acid 完全分離,而 Lactic acid peak 變的很漂亮,但是 Glycolic acid 的位子又調換了,超越了 Citric acid。再加高甲醇濃度為 30 % 時,跟「離子強度探討」很相似,僅有 Lactic acid 和 Citric acid 連在一起了。

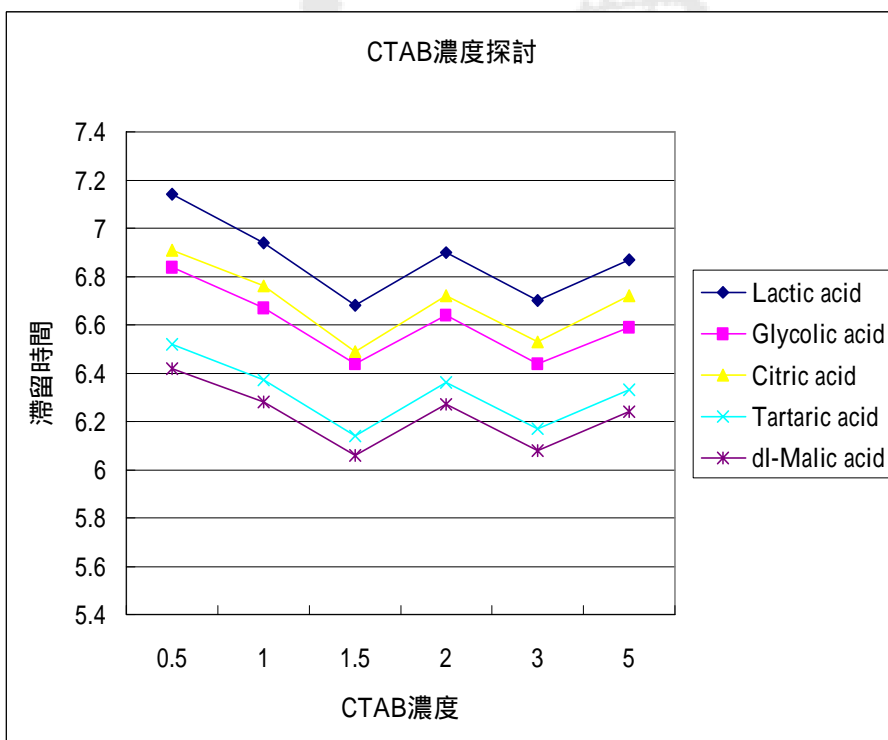
我們假設離子強度增加時,會使 dl-Malic acid Glycolic acid 及 Lactic acid 移動速度明顯增加,而且可以知道的是 dl-Malic acid、Glycolic acid 及 Lactic acid 三種果酸的移動速度明顯的比 Tartaric acid 及 Citric acid 快很多,尤其 Glycolic acid 效果更是明顯。整體來看,增高離子強度時間會變快,且甲醇比例的增高,整個移動速度會往後延遲,原因在於甲醇會減低離子強度,修飾電荷造成時間的延遲,但是在整個過程中 dl-Malic acid、Glycolic acid 及 Lactic acid 移動速度依然比 Tartaric acid 及 Citric acid 快,才會造成 peak 的分離及置換。

未來我們會嘗試製作檢量線及作真實樣品分析,讓整個實驗有一個完整的架構,繼續探討果酸在電泳下的變化情形,並且作一個分析的依據。



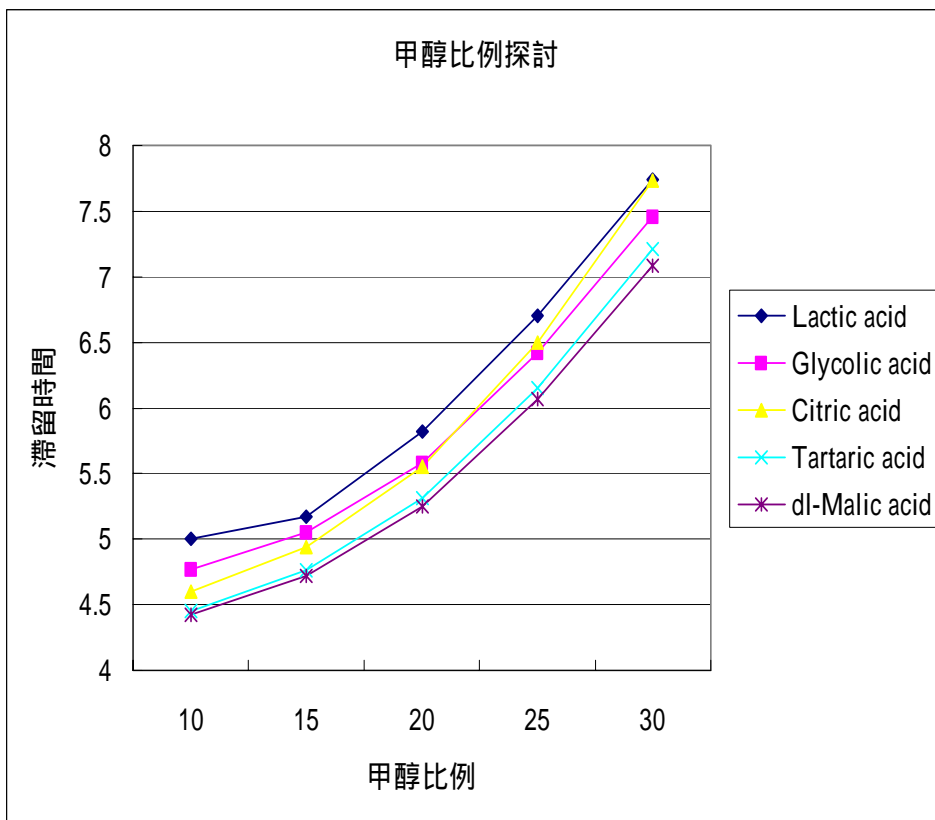
實驗條件：(a) Na₂HPO₄ 與 NaH₂PO₄ 濃度：100mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM
 (b) CTAB 濃度：1mM (c) 甲醇比例：25 %，注射時間：10sec，電壓：15kv，波長：200nm

圖 3 - 1 離子強度探討圖



實驗條件：(a)Na₂HPO₄ 與 NaH₂PO₄ 濃度：200 mM (b)CTAB 濃度：0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、3 mM、5 mM (c) 甲醇比例：25 %，注射時間：10sec，電壓：15kv，波長：200nm

圖 3 - 2 CTAB 濃度探討



實驗條件：(a) Na_2HPO_4 與 NaH_2PO_4 濃度：200 mM (b) CTAB 濃度：1 mM、(c) 甲醇比例：10%、15%、20%、25%、30%。注射時間：10sec, 電壓：15kv, 波長：200nm

圖 3 - 3 甲醇比例探討圖

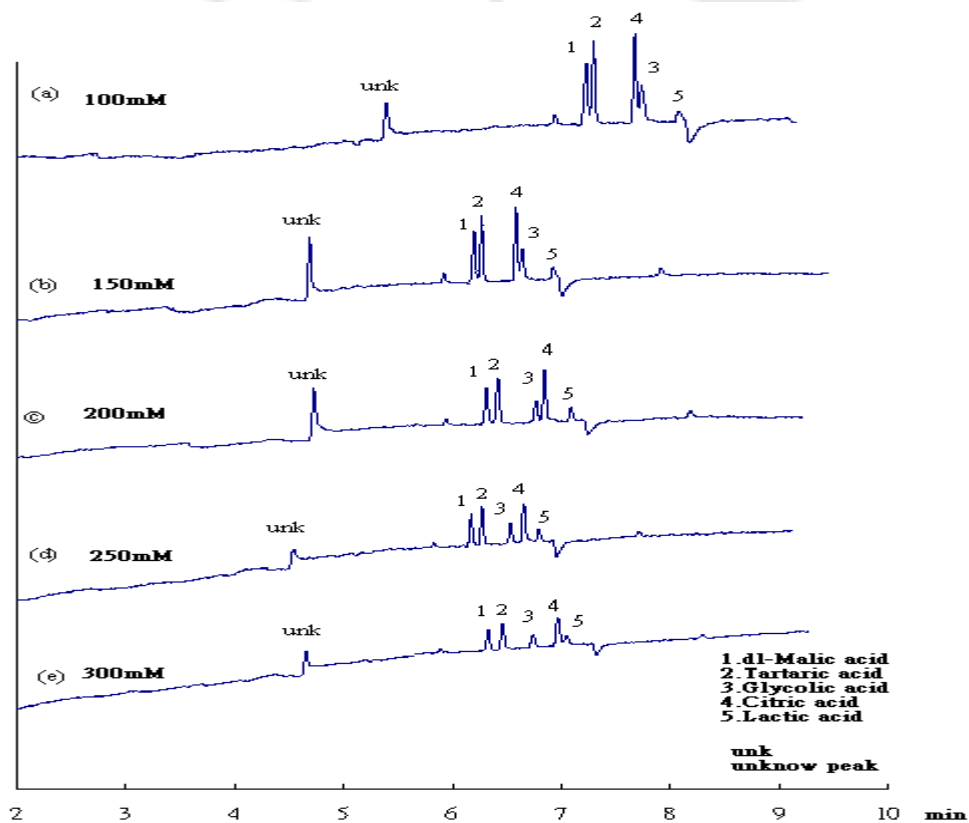


圖 3 - 4 離子強度探討層析圖

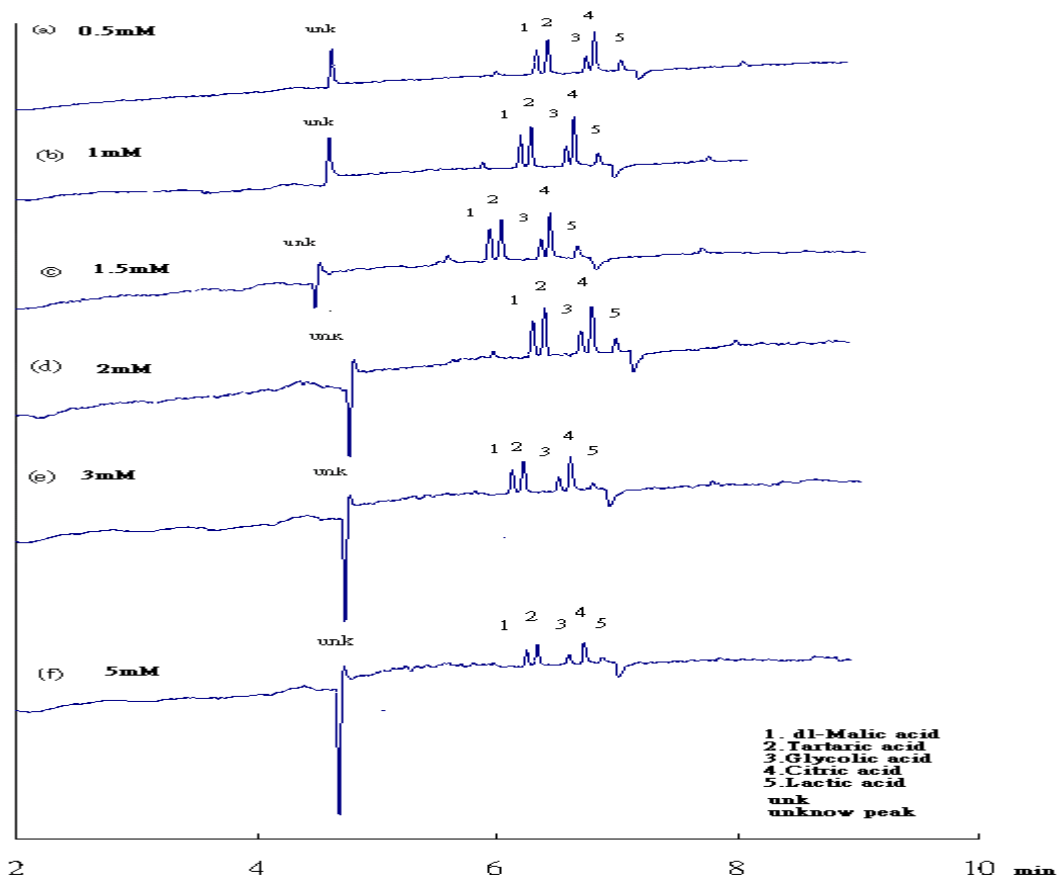


圖 3 - 5 CTAB 濃度探討層析圖

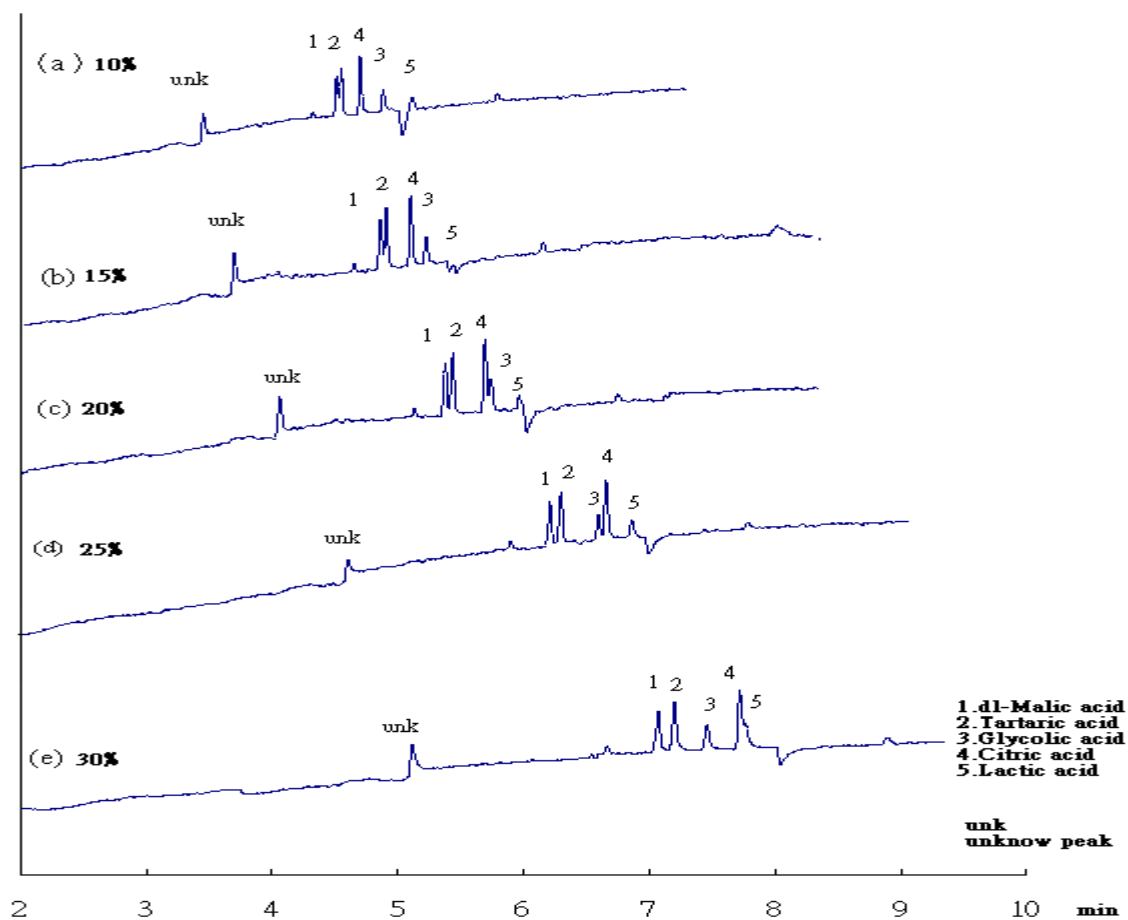


圖 4 - 6 甲醇比例探討層析圖

參考文獻

1. 趙承琛博士 編著 界面活性劑化學 復文書局 民國 73 (初版) P11~15
2. 趙承琛博士 編著 界面科學特論 復文書局 民國 74 年 (初版) P109~111
3. 北原文雄 玉井康勝 早野茂夫 原 一郎編 界面活性劑應用實務 復漢出版社印行 民國 77 年 (再版) P1~2
4. Ching-Erh Lin, Yu-Tai Chen Journal of Chromatography A, 871 (2000) 357 - 366 ,
5. Suwana Voraratt, Chantana Aromdee, and Yodporn Podokmat Analytical Sciences august 2002, VOL.18 The Japan Society for Analytical Chemistry ,
6. A.Castineira, R. M. Pena, C. Herrero, and S. Garcia-Martin , Journal of Food Composition and Analysis (2002) 15, 319 - 331
7. 黃悉雅, 碩士論文, 應用毛細管電泳分析中藥與化妝品中特定成分之研究, 民國 87 年
8. 劉育錚, 碩士論文, 利用溶膠—凝膠法製作毛細管駐即在毛細管電層析之應用研究, 民國 92 年
9. 洪偉章 , 李金枝 , 陳榮秀 著 化妝品原料及功能 藝軒圖書出版 民國 91 年 p113
10. 胡若穎, 碩士論文, 利用毛細管電泳法則測定環糊精逐步結合常數之研究, 民國 88 年
11. Li, S. F. Y. Capillary Electrophoresis : principles, practice and applications, Elsevier Science : Amsterdam, . 1993.
12. Heiger, D. N. High Performance Capillary Electrophoresis : an introduction, 2nd ed., Hewlett-Packard Co. : France, 1993
13. Hjerten, S. Chromatogr. Rev. 1976 , 9 , 122.
14. Virtanen, R. Acta Polytech. Scand. 1974 , 123, 1.
15. Mikkers, F. E. P. ; Everaerts, F. M. ; Verheggen, T. P. E. M. J. Chromatogr. 1979 , 169 , 11.
16. Tearbe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Anal. Chem. 1984, 56, 111.
17. Hjerten, S. J. Chromatogr. 1983, 270, 1.
18. Cohen, A., Karger, B. L. J. Chromatogr. 1987, 397, 409.