

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

生技化粧品開發與評估系統的建立：抗老化化粧品

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2745-B-041-001-

執行期間：93年05月01日至94年04月30日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：陳榮秀

共同主持人：楊朝成，郭俊成，張德生，洪偉章，林維炤，林清宮，李佳芬，
呂敏勇，王東亮，丁秀玉

計畫參與人員：陳榮秀，楊朝成，郭俊成，張德生，洪偉章，林維炤，林
清宮，李佳芬，呂敏勇，王東亮，丁秀玉

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 7 月 29 日

國科會南科園區路竹基地整合型計畫成果報告

生技化粧品開發與評估系統的建立

- 抗老化化粧品

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC93-2745-B-041-001

執行期間：93年5月1日至94年4月30日

計畫總主持人：陳榮秀 教授兼副校長

共同主持人：丁秀玉、王詠騰、郭俊成、張德生、林清宮、李佳芬、
呂敏勇、林維炤、楊朝成、洪偉章

執行單位：嘉南藥理科技大學

化粧品應用與管理系、化粧品科技研究所

中華民國 94 年 07 月 29 日

生技化粧品開發與評估系統的建立-抗老化化粧品

摘要：

本計畫從傳統中藥補氣藥黃耆(AM)、補血藥何首烏(PM)、補陽藥杜仲(EU)及補陰藥枸杞子(LC)等天然原料中提取出抗皮膚老化之有效部分，進行皮膚抗老化有效成分分析之研究。我們利用抗彈性纖維分解酵素、抗玻尿酸分解酵素、抗酪氨酸酵素及抗自由基等四種生化活性分析當作抗老化有效成分分析的指標。經過生化活性分析檢測後，我們發現，何首烏水萃取層(PMW)具有抗酪氨酸分解酵素，枸杞子乙酸乙酯萃取層(LCE)具有抗玻尿酸分解酵素的活性，杜仲乙酸乙酯萃取層(EUE)、枸杞子乙酸乙酯萃取層(LCE)、枸杞子水萃取層(LCW)、何首烏乙酸乙酯萃取層(PME)、何首烏正丁醇層(PMB)、何首烏水萃取層(PMW)、黃耆乙酸乙酯萃取層(AME)具有抗自由基的活性。再更進一步的分段分析中，我們更發現 PME、PMB、PMW、EUE、LCE 及 AME 層經管柱層析分段部分中 PME-2、PME-3、PME-4、PME-5、PMB-4、PMW-1、PMW-2、EUE-23、EUE-210、EUE-212、EUE-214、LCE-及 AME-7 分段部分均具有很強的抗自由基的活性。

另外，直接採用黃耆(AM)、何首烏(PM)、杜仲(EU)及枸杞子(LC)之粗提取物調製成抗老化系列保養品對皮膚功能性之評估，發現上述四種中藥對皮膚的水份及脂質有良好之調節作用。

為合成具溫度感應性之乳膠顆粒，我們以氮-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，並對其藥物釋放之性質做一探討。在合成方面，使用陰離子型起始劑APS(ammonium persulfate)，以無乳化劑乳化聚合的方法合成polyNIPAAm-Chitosan 的交聯共聚物，而後加入MMA及MAA單體繼續反應形成核殼型複合乳膠顆粒。而後將本整合型計畫中之子計畫所萃取之化粧品有效成分含浸到核殼型複合乳膠顆粒中，並改變各種變因包括：Chitosan / NIPAAm 重量比例、交聯劑濃度、MAA/MMA 重量比例等，探討這些變因所合成之乳膠顆粒對於化粧品有效成分之包覆及釋放之影響情形。

壹、前言

行政院經濟部委託國外科技顧問評估，在『西元 2000 年台灣地區最具發展潛力之工業』報告中化粧品工業列名第四，目前化粧品之年消費額約為新台幣 200 億元，未來十年將達 400 億元以上之市場規模，因此經濟部將化粧品保養品產業列為挑戰 2008 重點發展產業之一，雖然目前多為歐美日進口品所佔有，然而化粧品之選購首須考慮氣候、人種以及個人體質之差異，是故日本花王公司在台

設立化粧品研究中心，積極開發適合熱帶、亞熱帶黃種人之化粧品，以掌握東南亞及中國大陸之市場，更可造就更多就業機會，近年來化粧品產業逐漸受到重視，多家大型公民營企業如台鹽、台糖及台塑紛紛投入此產業，加上藥業及生技產業也有轉型進入化粧品產業的趨勢，使得化粧品專業技術的提升與專業人才的需求更加迫切。

嘉南地區地廣資源豐富，化粧品公司近陸佰家，包含化粧品代工廠、包裝廠及彩粧保養品重鎮，加上化粧品人才培育集中在南部的優勢，南部科學園區如能發展化粧品產業，而且著重在生技化粧品，既可結合南科之生技產業，也能發展產業特色，本計畫希望由抗老化生技產品研發為主，不但可提高本土產業的技術水平，同時也培養化粧品專業研發人才(本校化粧品科技研究所為全國唯一之化粧品研究所)。

本校地處高雄縣與台南縣交界，距南部科學園區僅 10 分鐘，且為全國首先設立的化粧品專門科系，成立至今已愈十年，更於 92 年度獲准設立全國第一所化粧品科技研究所。累積了 10 多年的化粧品研發經驗，在化粧品的製造流程中，從上游到下游各個領域，我們具都有相當厚實的研究基礎與研究經驗，有鑒於化粧品工業日益蓬勃發展，以及台灣業界的積極投入，希望能夠以我們具有十年化粧品研發經驗的研發團隊，積極的從事化粧品新技術的開發研究，以期能夠以研發所得的技術成果輔助台灣的化粧品廠商，促使台灣本土品牌的化粧品能夠在世界上佔有一席之地。

貳、計畫總目標

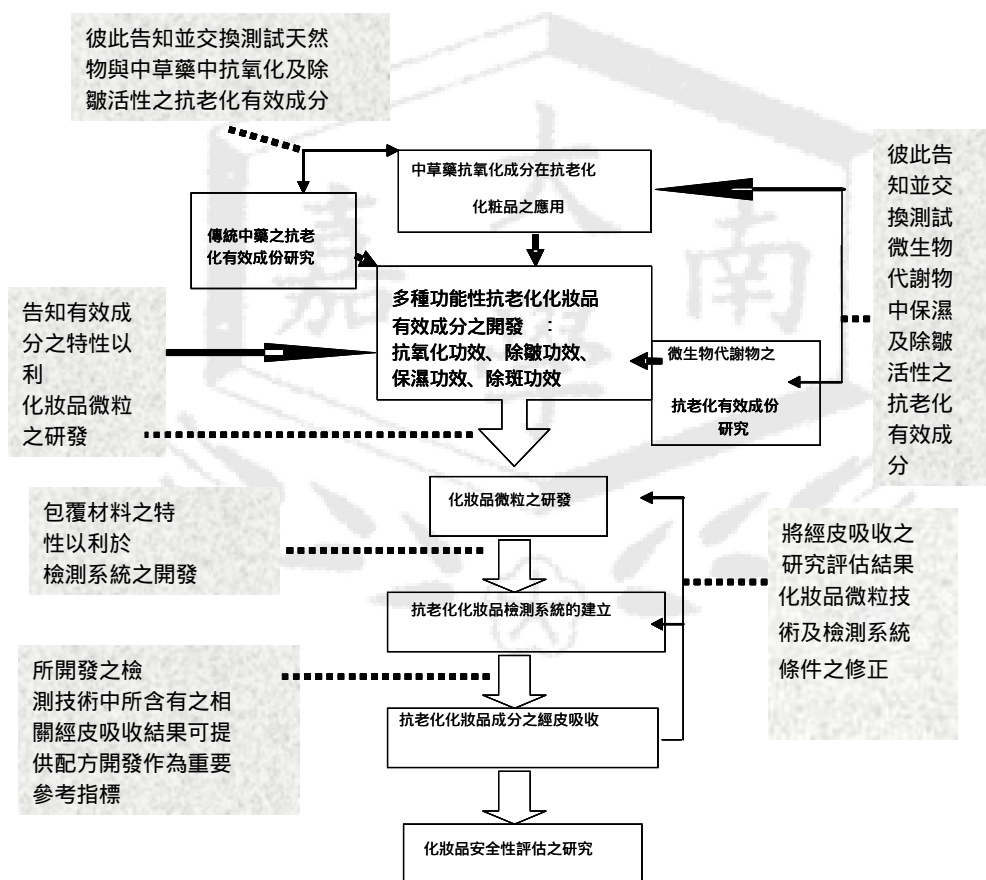
當今化粧品市場中，佔有最龐大的商機莫過於抗老化化粧品。皮膚抗老化可由多方面來進行研究，包括抗氧化、防皺、去斑、保濕等方面。因此，抗老化化粧品的研發十分需要以整合型計畫方式進行群體性研究。此外，要完整開發一項成功的化粧品產品，除了從最上游的化粧品有效成份的開發之外，接著將有效成分調製成化粧品的技術開發與評估系統之建立，以及最後產品有效成分之經皮吸收效果之研究，這些都是十分重要的整體因素。

因此，在本整合型計畫中，為使研究成果更具實用性，我們從最上游的抗老化化粧品有效成分的研發開始到化粧品成品的完成，作一完整性的研究與開發模式的建立，以開發出新穎的抗老化化粧品，並且在開發抗老化化粧品的過程中，一併開發從上游到下游一系列的新技術，此一系列新技術只需稍加修改，即可適用於另一新產品的開發，如此即可以此新技術輔助廠商進行化粧品產品的開發。

參、整體分工合作架構

抗老化化粧品的研發，從最上游的抗老化化粧品有效成份的開發，接著將有效成分調製成產品，以及最後將產品進行有效成分之經皮吸收評估，我們將這些領域規劃成九個子計畫，雖然領域不同，但是在研發產品的過程中卻環環相扣，每一個子計畫研究所得的結果都必須提供給其他子計畫作為參考，並且互相研究討論，不斷的修改研發中的技術條件，如此才能成功的研發出一項具高附加價值的新穎化粧品，並且在研發新產品的過程中，開發出能夠輔助化粧品產業發展的新技術。

各子計畫間之相關性如下圖所示：



為了對上圖作更詳細的說明，以下就各子計畫間之相關性與整合程度作更詳細的說明：

a. 抗老化化粧品有效成分開發

針對抗老化化粧品有效成分進行研發，研發而得的有效成分再交給子計畫六進行奈米包覆，並進行控制釋放之研究。以溫度感應性智慧型材料將其他子計畫所研發而得的有效成分包覆成粒徑為奈米等級的智慧型有效成分奈米顆粒，以利於有效成分輸送進入皮膚中，並探討奈米顆粒之控制釋放機制，以製造出具高效能之奈米輸送材料，開發出具高附加價值之智慧型奈米化粧品。

b. 抗老化化粧品微粒技術開發

進行化粧品成品之經皮吸收研究與評估系統建立，以製造出新穎之奈米化粧品產品。此外，本系擁有一套小型模擬生產線，我們預計將實驗室所研發出的調製技術模式加以修改，以開發出一套符合實際生產線所需之調製技術模式，使得本研究計畫所得之成果更能符合業界之實際需要，而實際應用於製造化粧品成品。

c. 抗老化化粧品經皮吸收

我們探討皮膚對於奈米化粧品其有效成分之吸收情況，以利於其抗老化化粧品微粒技術與評估系統技術之修正。以期發展出更好的技術，並開發出新穎且高品質的產品。

d. 抗老化化粧品安全性評估

進行化粧品安全性之研究與評估，探討成品中有效成分在皮膚中的使用安全情況，以利在各個天然物領域中尋找更有效之抗老化成分。

肆、材料與方法：

1. 中藥萃取：

皮膚老化與人體氣血陰陽之不足有關。故以傳統中藥補虛藥黃耆(補氣)、何首烏(補血)、杜仲(補陽)、麥門冬(補陰)來改善皮膚老化現象。首先以酒精溶媒抽取四種中藥取得其粗提取物，再以不同極性溶劑進一步溶離有效成分。

2. 抗彈性纖維分解酵素活性測試

將欲分析的樣品利用緩衝溶液稀釋至適當倍數後，加入彈性纖維分解酵素(每個反應 1 活性單位)及其反應基質色素標定(p-nitrophenol)彈性纖維(最終濃度 1 mM)，於室溫進行樣品萃取液彈性纖維分解酵素抑制活性測試。於室溫中

反應 30 分鐘後，加入 2 N 硫酸終止反應。最後利用酵素免疫辨讀機 ELISA reader 測定 96 孔 micro plate 中 OD₄₀₅ 之吸光值。由於彈性纖維分解酵素會將其基質色素標定(p-nitrophenol)彈性纖維反應形成 p-nitrophenol 分子(在 405 nm 具有吸光波峰)，故可以 ELISA reader 偵測彈性纖維分解酵素活性。若待測樣品中含有彈性纖維分解酵素抑制劑，會降低彈性纖維分解酵素之活性，進而導致 OD₄₀₅ 之吸光值之降低。因此我們可以根據彈性纖維分解酵素活性降低的程度來判別樣品中所含有抑制劑的相對濃度高低。在越高抑制劑濃度下會測定到越低的彈性纖維分解酵素活性(即越低的 OD₄₀₅ 之數值)，反之亦然。

3. 抗玻尿酸分解酵素活性分析

將欲分析的樣品利用緩衝溶液稀釋至適當倍數後，加入玻尿酸分解酵素(每個反應 100 活性單位)及其反應基質玻尿酸(最終濃度 2.5mM)，於室溫進行樣品萃取液玻尿酸分解酵素抑制活性測試。於室溫中反應 16 小時後，加入 2 N 硫酸終止反應。最後加入玻尿酸染劑(最終濃度 0.1mM)，利用酵素免疫辨讀機 ELISA reader 測定 96 孔 micro plate 中 OD₆₄₀ 之吸光值。由於玻尿酸會與玻尿酸染劑反應形成錯合物(在 640nm 具有吸光波峰)，故可以 ELISA reader 偵測玻尿酸分解酵素活性。若待測樣品中含有玻尿酸分解酵素抑制劑，會降低玻尿酸分解酵素之活性，進而導致 OD₆₄₀ 之吸光值保持不變或緩緩下降。因此我們可以根據尿酸分解酵素活性降低的程度來判別樣品中所含有抑制劑的相對濃度高低。在越高抑制劑濃度下會測定到越低的玻尿酸分解酵素活性(即越高的 OD₆₄₀ 之數值)，反之亦然。

4. 酪氨酸酵素活性測試

將欲分析的樣品利用緩衝溶液稀釋至適當倍數後，加入酪氨酸酵素(每個反應 10 活性單位)及其反應基質酪氨酸(最終濃度 50 mM)，於室溫進行發酵樣品萃取液酪氨酸酵素抑制活性測試。於室溫中反應 30 分鐘後，加入 2 N 硫酸終止反應。最後利用酵素免疫辨讀機 ELISA reader 測定 96 孔 micro plate 中 OD₄₉₂ 之吸光值。由於酪氨酸酵素會將其基質酪氨酸反應形成 DOPA 分子(在 492 nm 具有吸光波峰)，故可以 ELISA reader 偵測酪氨酸酵素活性。若待測樣品中含有酪氨酸酵素活性抑制劑，會降低酪氨酸酵素之活性，進而導致 OD₄₉₂ 之吸光值之降低。因此我們可以根據酪氨酸酵素活性降低的程度來判別樣品中所含有抑制劑的相對濃度高低。在越高抑制劑濃度下會測定到越低的酪氨酸酵素活性(即越低的 OD₄₉₂ 之數值)，反之亦然。

5. 自由基活性測試

將欲分析的樣品利用緩衝溶液稀釋至適當倍數後，加入 DPPH(最終濃度 50 mM)，於室溫進行樣品萃取液抗自由基活性測試。於室溫中反應 30 分鐘。最

後利用酵素免疫辨讀機 ELISA reader 測定 96 孔 micro plate 中 OD₅₁₇ 之吸光值。由於 DPPH 自由基在 517 nm 具有吸光波峰，故可以 ELISA reader 偵測 DPPH 自由基活性。若待測樣品中含有抗自由基活性，會降低 DPPH 自由基之活性，進而導致 OD₅₁₇ 之吸光值之降低。因此我們可以根據 DPPH 自由基活性降低的程度來判別樣品中所含有抗自由基的相對濃度高低。在越高抗自由基濃度下會測定到越低的 DPPH 自由基活性(即越低的 OD₅₁₇ 之數值)，反之亦然。

6. 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℃，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 MAA/MMA 重量比為 1/5。

7. 藥物釋放測試

首先，測定各種不同濃度之化粧品有效成分之 UV 吸收值，建立化粧品有效成分之 Calibration curve。取 0.15g 乳膠顆粒，將其置於化粧品有效成分之磷酸鹽緩衝溶液中(0.012g 化粧品有效成分溶於 5g 磷酸鹽緩衝溶液)，並以超音波震盪 10 分鐘，再置於 4℃ 環境下進行膨潤 3 小時。之後將之冷凍乾燥成包覆化粧品有效成分的乳膠顆粒粉末。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℃ 的 PH7.4 之磷酸鹽緩衝溶液中進行化粧品有效成分的釋放實驗，於不同時間取樣以 UV 分光光度計量測緩衝溶液中化粧品有效成分的濃度。

8. 細胞的製備

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。

9. 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-2yl)-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 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。

伍、結果：

一、 抗老化原料的篩選：

本研究結果顯示以中藥粗萃液進行皮膚抗老化有效成分分析時，其中 PMW 具有抗酪胺酸分解酵素，LCE 具有抗玻尿酸分解酵素的活性，EUE、LCE、LCW、PME、PMB、PMW、AME 具有抗自由基的活性。進一步的分段分析 PME、PMB、PMW、EUE、LCE 及 AME 層經管柱層析分段部分中得到 PME-2、PME-3、PME-4、PME-5、PMB-4、PMW-1、PMW-2、EUE-23、EUE-210、EUE-212、EUE-214、LCE- 及 AME-7 均具有很強的抗自由基的活性。

直接採用 AM、PM、EU 及 LC 之粗抽取物調製成抗老化系列保養品對皮膚功能性之評估，發現上述四種中藥對皮膚的水份及脂質有良好之調節作用。

表 1. 中草藥各種粗萃取物中皮膚抗老化活性分析一

Sample (10mg/ml)	Anti-elastase Activity (%)	Anti-hyaluronidase Activity (%)	Anti-tyrosinase Activity (%)	Anti-free radical Activity (%)
LCH	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
LCE	< 5%	62 %	< 5%	81 %
LCB	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
LCW	< 5%	< 5%	< 5%	36 %
AMH	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
AME	< 5%	< 5%	< 5%	95 %
AMB	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
AMW	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
PMH	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
PME	< 5%	< 5%	< 5%	99 %
PMB	< 5%	< 5%	< 5%	99 %
PMW	< 5%	< 5%	58%	84%
EUH	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
EUE	< 5%	< 5%	< 5%	87 %
EUB	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%

EUV	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
-----	------	------	------	------

表 2. 中草藥各種萃取物中皮膚抗老化活性分析二

Sample (10mg/ml)	Anti-elastase Activity (%)	Anti-hyaluronidase Activity (%)	Anti-tyrosinase Activity (%)	Anti-free radical Activity (%)
LCE-1	-	< 5%	-	17 %
LCE-2	-	< 5%	-	12 %
LCE-4	-	< 5%	-	74%
LCE-32	-	< 5%	-	6 %
LCW-1	-	-	-	< 5%
LCW-2	-	-	-	< 5%
LCW-3	-	-	-	< 5%
PME-1	-	-	-	
PME-2	-	-	-	84 %
PME-3	-	-	-	84 %
PME-4	-	-	-	80 %
PME-5	-	-	-	81 %
PMB-1	-	-	-	46 %
PMB-2	-	-	-	34 %
PMB-3	-	-	-	21 %
PMB-4	-	-	-	81 %
PMW-1	-	-	< 5%	84 %
PMW-2	-	-	< 5%	90 %
PMW-3	-	-	< 5%	< 5%
EUE-0	-	-	-	< 5%
EUE-1	-	-	-	10 %
EUE-21	-	-	-	12 %
EUE-22	-	-	-	99 %
EUE-23	-	-	-	98 %
EUE-25	-	-	-	38 %
EUE-26	-	-	-	67 %
EUE-29	-	-	-	56 %
EUE-210	-	-	-	86 %
EUE-212	-	-	-	56 %

EUE-214	-	-	-	92 %
EUE-216	-	-	-	18 %
AME-0	-	-	-	< 5%
AME-1	-	-	-	25 %
AME-3	-	-	-	12 %
AME-5	-	-	-	14 %
AME-7	-	-	-	96 %
AME-9	-	-	-	< 5%

二、 包覆系統之建立

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3. 不同組成比例與轉化率的關係

核層 Chitosan/NIPAAm 重量比率	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
	3%	1/5	82.02	85.63

	3%		82.02	85.63
	10%		81.02	86.82
2/10	3%	1/5	82.02	85.63
2/10		2/5		86.79
		3/5		88.34
2/10		0.5/2.5		84.93
		1/5		85.63
		2/10		90.95

2 顆粒型態及粒徑觀察

由圖1. (a) (b)可以發現在沒有殼層的乳膠顆粒因沒有殼層的束縛，所以造成顆粒較膨潤，同時對照圖2. (a) (b)，當加入PMAA/PMMA 殼層後，乳膠顆粒的成粒性明顯增加。隨著Chitosan / NIPAAM 重量比例增加(圖2. (b) (c))，因Chitosan愈多，界面保護的效果愈好，形成的顆粒愈小。先前在Chitosan/NIPAAM 共聚乳膠顆粒的研究中指出當交聯劑濃度愈高時，因成核數的增加會造成顆粒愈小，然而在圖2. (b) (d)中並未發現這種現象，其原因可能是當交聯劑濃度愈高時，第二階段的殼層反應越多，因而造成粒徑的增加，使得最終在圖2. (b) (d)中所見的粒徑相近。而在圖2. (e) (f)中發現，不論增加殼層的MAA 比例或殼層的厚度均會使得顆粒的粒徑增加並且其成粒性越佳。

3 藥物釋放測試

我們以乳膠顆粒包覆化粧品有效成分，並於不同溫度下進行藥物釋放測試，圖3~10為其結果。由圖中可發現，在25 時四種被包覆在乳膠顆粒內部的化粧品有效成分皆可被有效的包覆在內部而不釋放出來。在37 時四種被包覆在乳膠顆粒內部的化粧品有效成分皆可有效的被釋放出來。

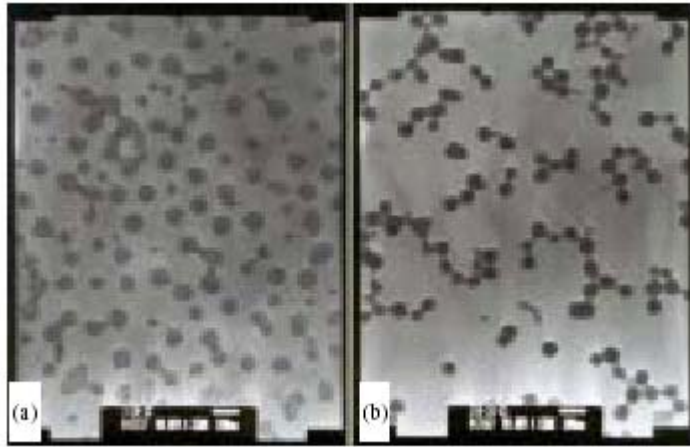


圖 1. TEM (a)3/10-3% (b)3/10-3%-1/5

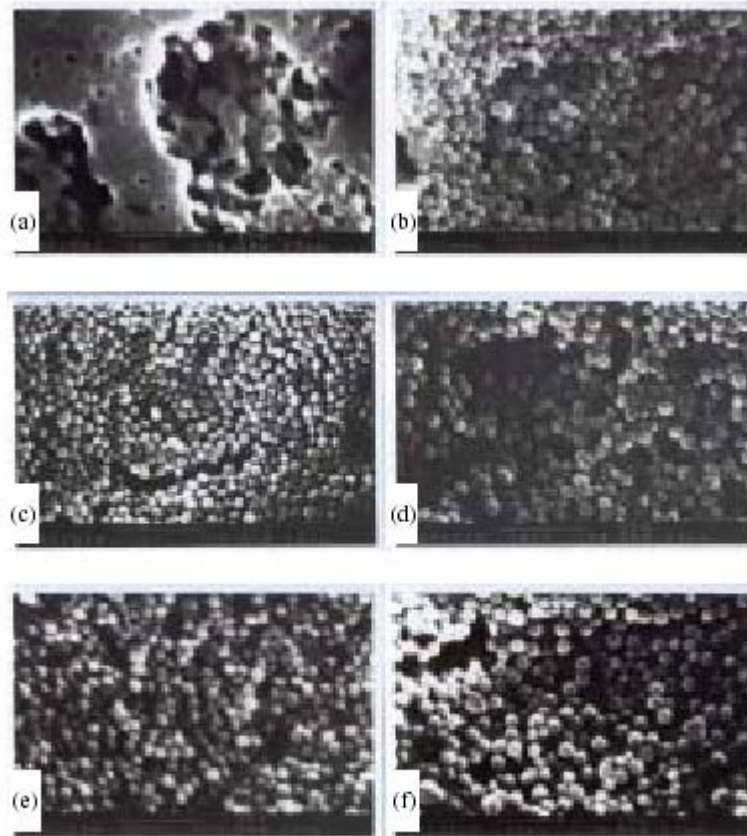


圖 2. SEM (a)2/10-3% (b)2/10-3%-1/5 (c)5/10-3%-1/5
(d)2/10-5%-1/5 (e)2/10-3%-3/5 (f)2/10-3%-2/10

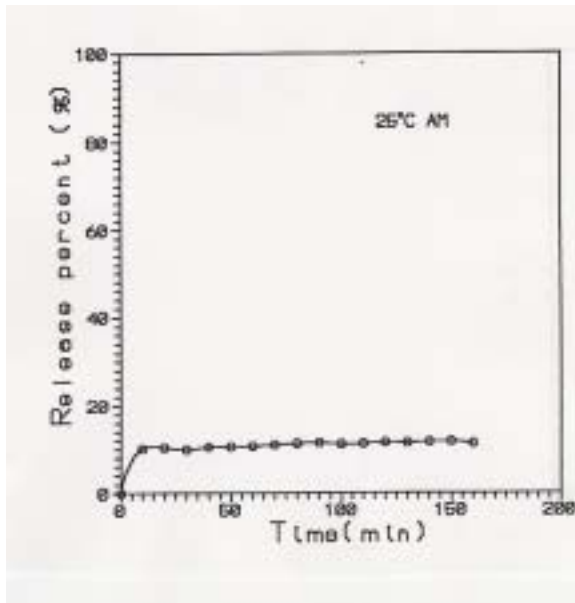


圖3. 乳膠顆粒在25 對於化粧品有效成分

AE之釋放控制

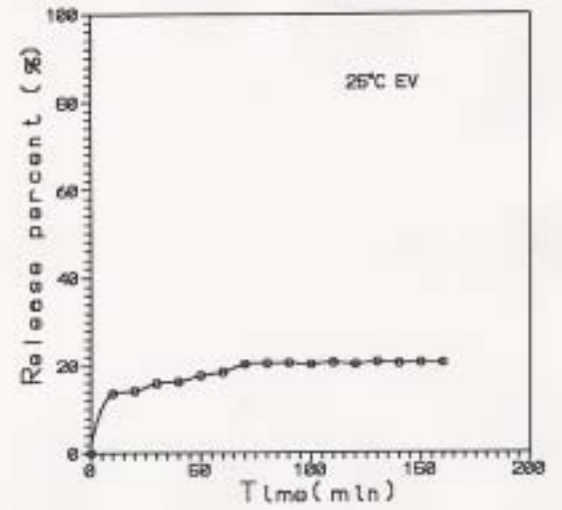


圖4. 乳膠顆粒在25 對於化

粧品有效成分EV之釋
放控制

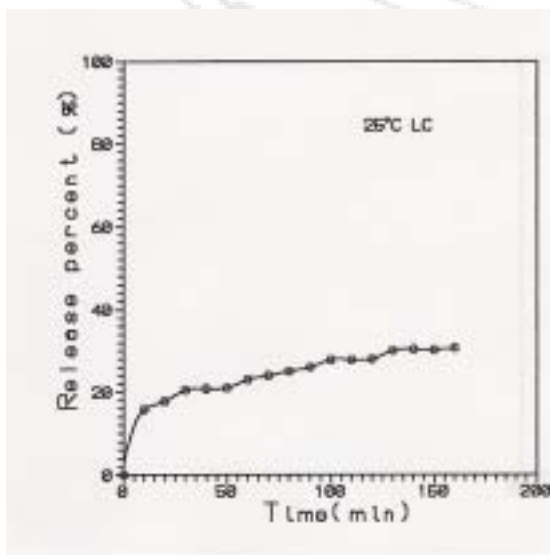


圖5. 乳膠顆粒在25 對於化粧品有效成分

LC之釋放控制

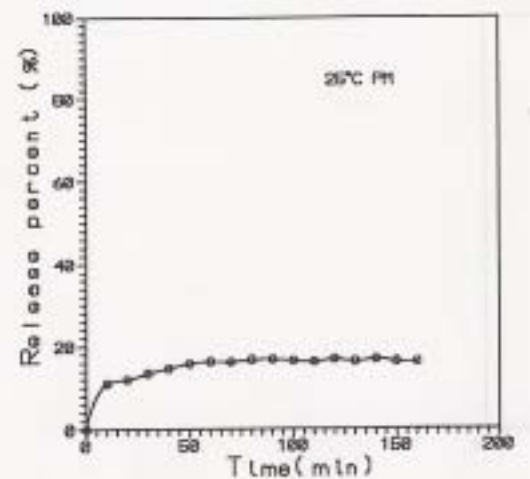


圖6. 乳膠顆粒在25 對於化

粧品有效成
份PM之釋放控制

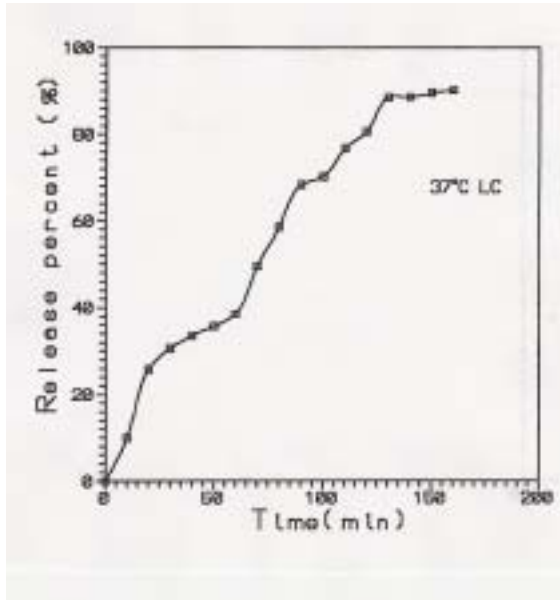


圖7. 乳膠顆粒在37°C 對於化粧品有效成分

圖8. 乳膠顆粒在37°C 對於化

粧品有效成

份PM之釋放控制

LC之釋放控制

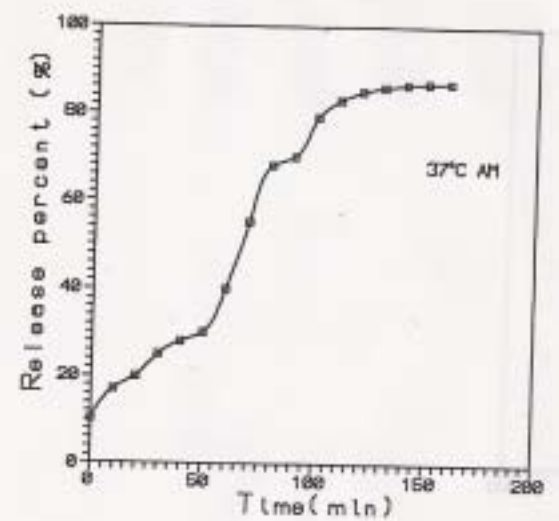
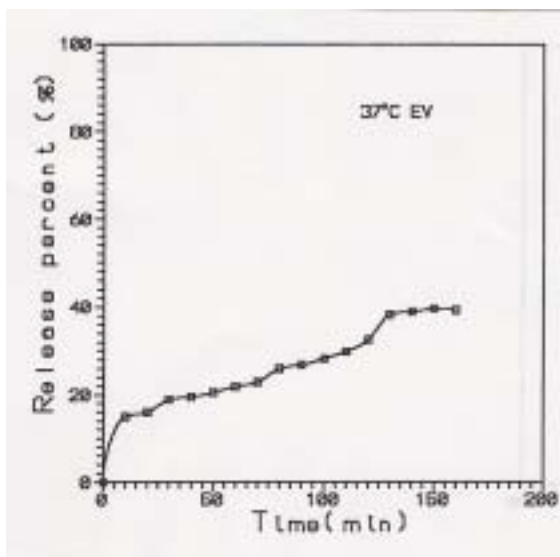
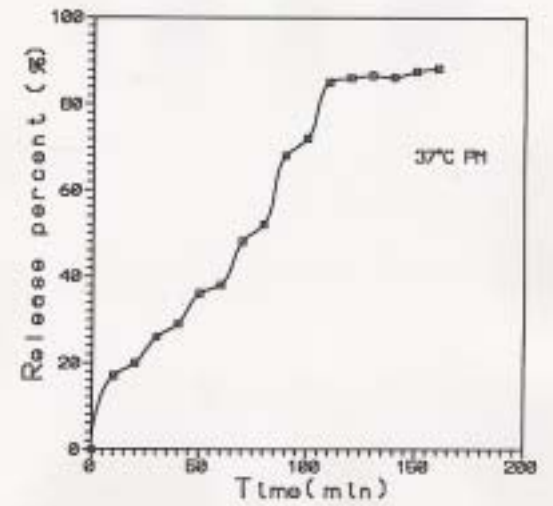


圖9. 乳膠顆粒在37 °C 對於化粧品有效成分 AM 之釋放控制

圖10. 乳膠顆粒在37 °C 對於化粧品有效成分 AM 之釋放控制

EV之釋放控制

三、安全評估系統之建立

在目前研究中已知用細胞毒性測試可有效，更快速的檢測化粧品毒性 (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。

我們選定測試中藥, 其毒性在表 4. 以 MTT 方法去測試不同極性抽取物 LCH, LCE, LCB, LCW, AMW, AME, AMB, AMH, EUH, EUE, EUB, EUW, PME, PMB, PMW, PMH, PSH 在濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ 吸光值仍無明顯下降。萃取物經由本研究 MTT 方法一致顯示在濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ 毒性甚低。可見本研究使用的中藥毒性甚低可應用於化粧品使用上。

表 4. 中草藥萃取物以 MTT 法測試對 L929 細胞之毒性

Control	Concentration($\mu\text{g/ml}$)	% conrol(100 ± 1.97)
LCH	500	100.72 \pm 1.35
	50	105.24 \pm 2.26
	5	99.47 \pm 2.32
LCE	500	105.41 \pm 2.53
	50	102.43 \pm 0.63
	5	98.49 \pm 0.75
LCB	500	102.17 \pm 1.29
	50	97.69 \pm 1.17

	5	105.94± 1.21
LCW	500	98.97± 0.74
	50	100.61± 0.94
	5	100.65± 1.34
AMW	500	102.91± 1.77
	50	99.80± 2.99
	5	96.59± 2.74
AME	500	99.33± 2.99
	50	98.97± 1.88
	5	102.67± 1.25
AMB	500	97.89± 0.73
	50	100.36± 1.47
	5	97.49± 0.29
AMW	500	99.62± 1.60
	50	100.85± 0.75
	5	100.13± 1.09
PMH	500	103.94± 2.90
	50	99.15± 0.74
	5	100.37± 1.30
EUH	500	99.44± 1.27
	50	100.58± 1.18
	5	99.48± 1.23
EUE	500	101.43± 1.09
	50	101.99± 0.76
	5	99.94± 0.77
EUB	500	99.74± 0.95
	50	97.70± 0.29
	5	99.78± 1.45
PME	500	97.66± 1.73
	50	98.61± 0.37
	5	99.21± 0.96
PMB	500	99.35± 1.25
	50	97.72± 1.33
	5	98.29± 1.72

PMW	500	98.06± 0.89
	50	97.35 ± 0.97
	5	98.25± 1.20
AMW	500	98.05±2.34
	50	97.58±3.75
	5	96.72±2.37
AMB	500	99.22±2.52
	50	96.85±3.26
	5	95.56±3.20
AME	500	96.85±6.06
	50	95.08±2.34
	5	99.31±2.20
AMH	500	97.71±3.58
	50	96.85±3.26
	5	98.38±2.62
PMH	500	95.94±4.26
	50	101.05±1.90
	5	97.87±1.87
PME	500	100.37±2.00
	50	96.32±2.53
	5	95.68±4.00
PMW	500	97.05±3.49
	50	97.49±4.00
	5	97.35±5.29
PMB	500	96.85±3.26
	50	98.22±5.36
	5	96.87±2.47
LCH	500	97.39±2.03
	50	98.87±2.72
	5	97.05±3.33
LCW	500	100.37±2.0
	50	96.98±4.51
	5	93.51±2.76
	500	94.59±6.44

LCB	50	95.68±4.00
	5	93.79±2.45
EUE	500	96.60±5.92
	50	101.04±1.73
	5	102.35±1.58
EUW	500	99.52±3.94
	50	95.20±3.09
	5	96.245±5.02
EUH	500	95.07±5.26
	50	100.868±4.26
	5	97.09±5.12
LCE	500	104.47±2.11
	50	105.29±6.77
	5	95.51±3.89
EUB	1000	98.96±5.50

Data are presented as the mean±S.E.:n=6

p<0.01 as compared with control

陸、結論與討論：

本研究結果顯示以中藥粗萃液進行皮膚抗老化有效成分分析時，其中PMW具有抗酪胺酸分解酵素，LCE具有抗玻尿酸分解酵素的活性，EUE、LCE、LCW、PME、PMB、PMW、AME具有抗自由基的活性。進一步的分段分析PME、PMB、PMW、EUE、LCE及AME層經管柱層析分段部分中得到PME-2、PME-3、PME-4、PME-5、PMB-4、PMW-1、PMW-2、EUE-23、EUE-210、EUE-212、EUE-214、LCE-及AME-7均具有很強的抗自由基的活性。直接採用AM、PM、EU及LC之粗提取物調製成抗老化系列保養品對皮膚功能性之評估，發現上述四種中藥對皮膚的水份及脂質有良好之調節作用。在安全性方面，也由細胞毒性試驗證實抗老化原料的安全性。

包覆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。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25 時有部分的化粧品有效成分可以有效的被保護住而不釋放出來，而在37 時大部分的化粧品有效成分皆可被釋放出來。

柒、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
- B.R. Saunders, B. Vincent, *Adv. Colloid Interface Sci.* 80(1999) 1-25.
- 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
- C. Ganorkar, F. Liu, M. Baudys, S.W. Kim, *Polymer Preprints-Papers Presented of the Meeting 38 (1997) 560-561.*
- 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*, 15-30 Eds. V.A. Drill and P. Lazar. New York.
- J.E. Chung, M. Yokoyama, M. Yamato, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, J. Control. Rel. 62 (1999) 115-127.
- K. Kono, A. Henmi, H. Yamashita, H. Hayashi, T. Takagishi, J. Control. Rel. 59 (1999) 63-75.
- 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.
- S.Y. Kim, S.M. Cho, Y.M. Lee, S.J. Kim, J. Appl. Polym. Sci. 78 (2000) 1381-1391.
- 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.
- T. Kidchob, S. Kimura, Y. Imanishi, J. Control. Rel. 50(1998) 205-214.
- T.L. Lowe, H. Tenhu, H. Tylli, J. Appl. Polym. Sci. 73 (1999) 1031-1039.

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.

W.F. Lee, Y.J. Chen, *J. Appl. Polym. Sci.* 82 (2001)2487-2496.

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

國科會專題計畫NSC 89-2216-E-041-004

張麗卿,現代化粧品概論,高立出版:1996。

劉宗榮,基礎毒理學,藝軒圖書出版社:1998。

衛生署研究計劃研究報告

