

嘉南藥理大學 107 年度教師研究補助計畫結案報告

計畫類型	<input type="checkbox"/> 與業界廠商合作研究 <input checked="" type="checkbox"/> 重點研究 <input type="checkbox"/> 一般個人型研究				
本（子）計畫主持人	李佳芬	單位	化粧品系	職級	教授
聯絡電話	分機：2413		E-mail	D766@ms8.hinet.net	
本（子）計畫名稱	具抗菌及抗發炎之生技藥粧產品開發				
重點研究總計畫名稱	以中草藥植物工廠應用於生技藥粧產品之開發				
總計畫主持人	李冠漢	單位	藥學系	職級	教授
「與業界廠商合作研究計畫」填寫	廠商名稱	無廠商參與			
	廠商出資金額	無出資之廠商			
執行期限 (核定公告日由研發處填寫)	自核定公告日：民國 年 月 日起至民國 107 年 12 月 31 日止				

子計畫四：具抗菌及抗發炎之生技藥粧產品開發

摘要

本子計畫五預計篩選出最有功效之中草藥「山香」抗菌萃取液為功效性原料，開發出一系列之清潔類化妝品。其中以具有抗「痤瘡桿菌」之天然植物萃取液為有效性原料，調製出「抗痘洗面乳」，以具有抗「金黃色葡萄球菌」「大腸桿菌」「綠膿桿菌」之天然植物原料，調製出「一般型保濕美白洗面乳」，以具有抗「金黃色葡萄球菌」之天然植物原料，調製出「抗菌沐浴乳」及「抗菌洗手乳」。

研究動機與

近年來強調天然的產品在市場急速擴展，在護膚保養的化粧品市場上已經有許多產品都添加了天然的護膚成分，然一瓶化粧品的成分很多，除了有效成分之外，還有抗菌劑(防腐劑)、油脂、保濕劑……等多項種成分。目前市場上都著重在使用天然成分作為護膚有效成分，而其他的成分卻都還是屬於化學合成的原料，其中化粧品所使用的防腐劑至目前都還是以化學合成的防腐劑為主。化學防腐劑經常會造成使用者皮膚過敏的現象，因此若能夠從天然的植物中，開發出天然的防腐劑，則將可以提升化粧品的品質，也可以增加化粧品的附加價值。

本子計畫預計以中草藥「山香」之萃取物為天然抗菌原料，研發出一系列的天然清潔產品，預計藉由天然中草藥抗菌劑來做為清潔劑中的殺菌劑以及防腐劑，開發出添加純天然防腐劑的清潔類化粧品

實驗方法

1. 天然抗菌成分之萃取

1.1 高溫水萃法 (樣品代號 WS)

將具有抗菌功效的中藥「山香」10克，置於150克純水中熬煮1個小時，將熬煮好的萃取液以冷凍乾燥方式進行乾燥，並將乾燥所得到的粉末置

於乾燥箱中保存以備使用。

1.2 酒精萃取法 (樣品代號 ES)

將中藥「山香」浸泡於乙醇中15天，進行乙醇萃取，將萃取液濃縮之後，以純水置換酒精，並以冷凍乾燥方式進行乾燥，並將乾燥所得到的粉末置於乾燥箱中保存以備使用。

2. 天然抗菌沐浴乳之製造

將天然物萃取之抗菌原料添加到沐浴乳配方中，調製出含有天然抗菌成份之沐浴乳，沐浴乳之配方如下表1、表2、表3. 所示。

表 1. 沐浴乳 A

編號	原料	100%
A1	SS	12
A2	DW	To 100
B	BN	8
C	PS	0.8
D	Glycerin	10
E1	EDTA · 2Na	0.05
E2	DW	10
F	SL	4
G	NaCl	0.2
H	C Ac	0.1
I	Germaben II	0.2
J	DW(預留)	4

表 2. 沐浴乳 B

編號	原料	100%
A1	SS	16
A2	DW	To 100
B	BN	9
C	PS	1.2
D	Glycerin	8
E1	EDTA · 2Na	0.03
E2	DW	12
F	SL	3
G	NaCl	0.1
H	C Ac	0.2
I	Germaben II	0.3
J	DW(預留)	6

表 3. 沐浴乳 C

編號	原料	100%
A1	SS	13
A2	DW	To 100
B	BN	10
C	PS	0.9
D	Glycerin	12
E1	EDTA · 2Na	0.06
E2	DW	15
F	SL	6
G	NaCl	0.3
H	C Ac	0.2
I	Germaben II	0.3
J	DW(預留)	3

2. 天然抗菌洗面乳之製造

將天然物萃取之抗菌原料添加到洗面乳配方中，調製出含有天然抗菌成份之洗面乳，洗面乳之配方如表 4、表 5、表 6。

表 4. 洗面乳 A

編號	原料	100%
A1	LA	12
A2	MB	10
A3	PC	10
A4	SA	6
B1	KOH	6.5
B2	DW	To 100
C	1-3BG	3
D	GL	6
E	BN	12
F	CA	10
G1	EDTA-2Na	0.06
G2	DW	6
H	DW(預留)	3

表 5. 洗面乳 B

編號	原料	100%
A1	LA	15
A2	MB	6
A3	PC	6
A4	SA	6
B1	KOH	8
B2	DW	To 100
C	1-3BG	5
D	GL	7
E	BN	10
F	CA	8
G1	EDTA-2Na	0.03
G2	DW	8
H	DW(預留)	6

表 6. 洗面乳 C

編號	原料	100%
A1	LA	20
A2	MB	3
A3	PC	5
A4	SA	6
B1	KOH	5
B2	DW	To 100
C	1-3BG	6
D	GL	8
E	BN	12
F	CA	10
G1	EDTA-2Na	0.06
G2	DW	10
H	DW(預留)	3

3. 抗菌實驗

3.1 微生物菌株的培養與保存

3.1.1 實驗菌株的保存

實驗中所使用之微生物菌種皆來自於新竹食品工業研究院的生物資訊保存中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，實驗菌株及編號如表 7.:

表 7. 實驗菌株及編號

菌株學名	中文名稱	BCRC	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	金黃色葡萄球菌	11045	6538p
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	綠膿桿菌	11633	9027
<i>Escherichia coli</i>	大腸桿菌	11634	8739

標準程序將購買來冷凍管開封，依各菌種之活化條件，將其活化於特定的液體培養中，並培養於適當的培養溫度。

3.1.2 實驗菌株活化

將菌株從-20°C 的冷凍櫃取出，進行活化並進行培養。

3.1.3 實驗菌株定量

將培養第三代到第十四繼代之菌種中取單一菌落至 5mL 培養液中，進行隔夜培養，經活化後放大培養至 1.0×10^8 CFU/mL。

3.1.4 紙錠擴散試驗

瓊脂擴散試驗(Disc diffusion method)，又稱為紙片抗生素測試、KB 測試或紙片擴散藥敏試驗是一般醫院用來判斷某致病菌對某一種抗菌劑感受性的方法。

紙錠含有抗菌劑會在培養基中擴散開來，若該細菌能夠被紙錠上的抗菌劑抑制生長，則會在紙錠周圍就會形成清澈的，可明顯看出在圈內無細菌的生長；若細胞無法被紙錠上的抗菌劑抑制生長，就不會出現一個抑菌環。

可根據抑菌環的大小來量測距離，可得知其抑菌效果，還有所使用抗菌劑的種類及濃度，皆可知道其殺菌力。

三角玻棒先用 95%酒精浸漬再用酒精燈燒過等冷卻，以微量吸管吸 100 μ L 的菌液(1.0×10^8 CFU/mL)與 200 μ L 的 PBS 混合均勻在固態培養基上，用三角玻棒推勻至半乾。將鑷子過火後夾取已滅菌的紙錠放置於塗好固態培養中，用微量吸管吸取 50 μ L 的樣品和 BAC 至紙錠圓片，放入培養箱培養。培養完後，用尺量測抑菌圈大小(mm)即可

3.2 最小抑菌濃度試驗

最小抑菌濃度 (英文: minimum inhibitory concentration: MIC) 是指經過一夜的培養後，能使細菌的發育受到阻滯並被觀察到的抗細菌藥的最小濃度。MIC 在實驗室是用於抗細菌藥對細菌抵抗力的一個重要的指標。同時，MIC 對驗證新的抗細菌藥的效果也是十分重要的依據^[12]。因此 MIC 被普遍認為是一個對抗菌劑的效用最基本的測量指標^[13]。

MIC 是抗菌藥、抗病毒藥物藥效的指標。MIC 在測量對細菌的抗菌效用的時候，需要培養超過 18 個小時。以通過肉眼觀察判讀培養液中是否澄清再進行稀釋。如果溶液仍然渾濁則未達到 MIC 標準。

以微量吸管將不同濃度的樣品加入 1.5mL 的

Mircrotube，再加入液態培養基以及將定量好的菌液吸取 100 μ L 放入 Mircrotube 中，放置於培養箱培養。培養 24 小時後，進行連續稀釋，在拿三角玻棒先用 95%酒精浸漬再用酒精燈燒過等冷卻，以微量吸管吸 100 μ L 的樣品混和均勻後，塗盤再放置於培養，隔天算菌落數。

料總重量，所得值即為微膠囊之產率。

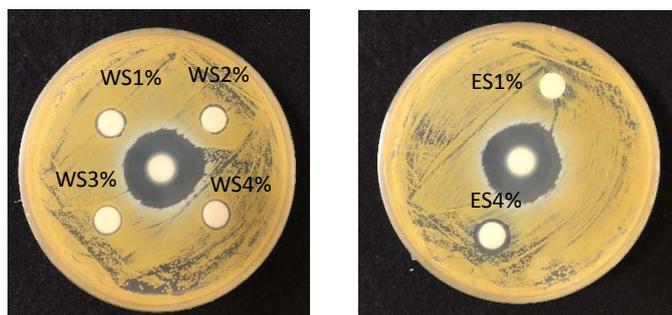
結果與討論

1. 紙錠擴散試驗結果

1.1 金黃色葡萄球菌之抑菌功效

紙錠擴散試驗為測定菌株對各種藥物之抗藥性的方法，此方法簡單也好操作且經過 24 小時培養，可以得知其抗菌活性。因此本研究以紙錠擴散試驗對於金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、綠膿桿菌之抗菌活性探討。

研究數據顯示，對於金黃色葡萄球菌以乙醇萃取的萃取物效果最好，其抑菌圈之值為 $11.33\pm 1.15\text{mm}$ ；正控制組 BAC 則為 $25.33\pm 1.37\text{mm}$ ，如圖 1 所示。



(a) 水萃法

(b) 乙醇萃取

圖 1. (a)水萃「山香」萃取液(b)乙醇「山香」萃取液對 *S.aureus* 之紙錠試驗(樣品濃度分別為 1%、2%、3%、4%，每一紙錠添加量為 50 μ L)

將金黃色葡萄球菌試驗結果作圖後，可發現乙醇萃取物濃度 4%，具有較佳的抑制能力，如圖 2 所示。

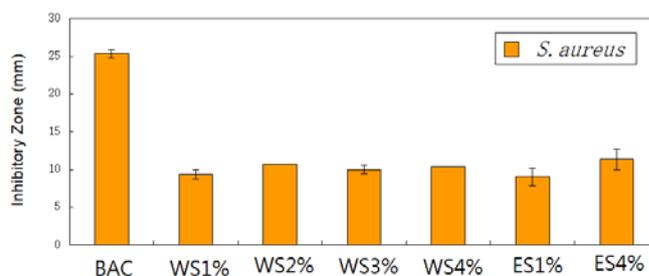
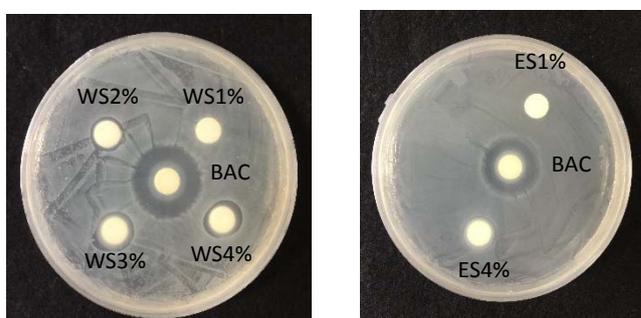


圖 2. *S.aureus* 之紙錠試驗結果

1.2 大腸桿菌之抑菌功效

乙醇「山香」萃取液 4%對於大腸桿菌具有最好的抗菌功效，其抑菌圈之值為 $13.0\pm 1.00\text{mm}$ ，正控制組 BAC 則為 $20.5\pm 0.55\text{mm}$ ，如圖 3 所示。



(a) 水萃法

(b) 乙醇萃取

圖 3. (a)水萃「山香」萃取液(b)乙醇「山香」萃取液對 *E.coli* 之紙錠試驗(樣品濃度分別為 1%、2%、3%、4%，每一紙錠添加量為 50 μ L)

將大腸桿菌試驗結果作圖後，可發現「山香」萃取物的濃度越高，具有越好的抑菌功效性，其中以乙醇「山香」萃取物 4%的樣品對於大腸桿菌具有較佳的抑制能力，如圖 4 所示。

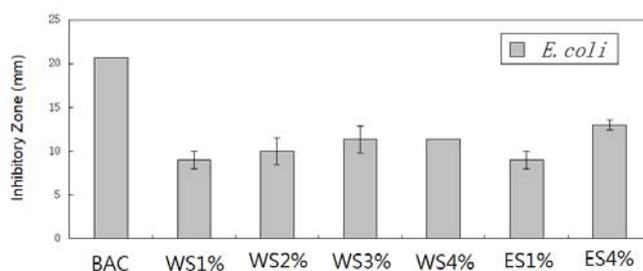
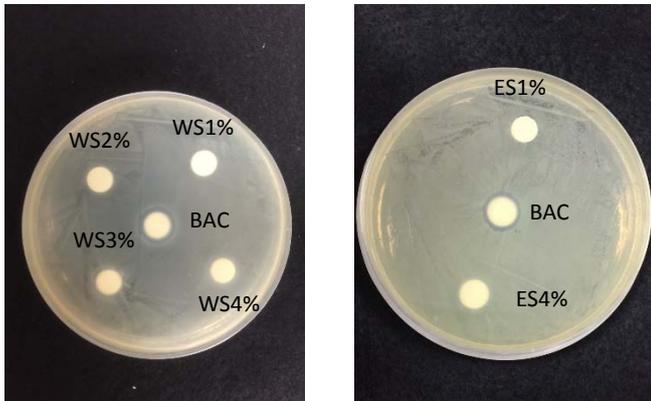


圖 4. *E.coli* 之紙錠試驗結果

1.3 綠膿桿菌之抑菌功效

高溫水萃取之「山香」萃取物 4%，對於綠膿桿菌具有最好的抑菌效果，其抑菌圈之值為 $9.33 \pm 1.15\text{mm}$ ；正控制組 BAC 則為 11.00mm ，如圖 5 所示。



(a) 水萃法 (b) 乙醇萃取

圖 5. (a) 水萃「山香」萃取液 (b) 乙醇「山香」萃取液對 *P.aeruginosa* 之紙錠試驗 (樣品濃度分別為 1%、2%、3%、4%，每一紙錠添加量為 $50\mu\text{L}$)

將綠膿桿菌試驗結果作圖後，可發現高溫水萃取之「山香」萃取物 4%，具有略佳的抑制能力，如圖 6 所示。

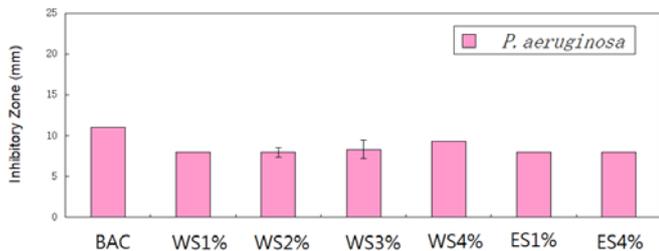


圖 6. *P.aeruginosa* 之紙錠試驗結果

將三種菌株之紙錠試驗結果作圖比較高溫水萃法和乙醇萃取法所萃取之「山香」萃取物之抗菌性，對於 *S.aureu*、*E.coli*、*P.aeruginosa* 三種菌株之抑菌圈檢測結果如圖 7 所示。

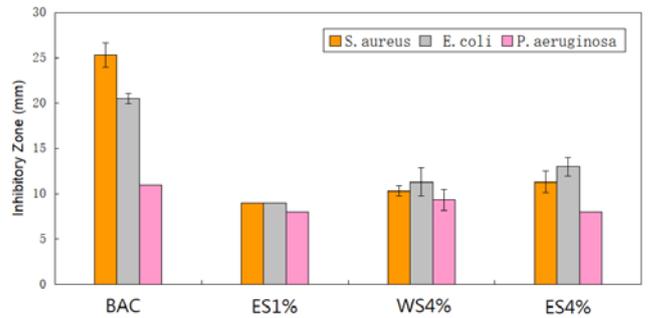


圖 7. 高溫水萃法和乙醇萃取法所萃取之「山香」萃取物之抗菌功效比較

2. 最小抑菌濃度試驗結果

於紙錠擴散試驗中，並無法準確得知樣品其有效抑制與能有效殺死微生物的最小濃度。因此本研究利用 MIC 進一步對高溫水萃法和乙醇萃取法所製得之「山香」萃取物進行抑菌功效檢測，觀察不同萃取法之抑菌效果。檢測濃度為 200ppm、400ppm、600ppm、800ppm。

實驗結果顯示，高溫水萃法 4% 和乙醇萃取法 4% 對於金黃色葡萄球菌、大腸桿菌皆有良好的抑菌效果，但是對於綠膿桿菌其抑菌效果不佳，而無法完全抑制菌生長。

乙醇萃取法 4% 在 600ppm 對金黃色葡萄球菌的抑制率為 100%，而乙醇萃取法 4% 以 200ppm 對於大腸桿菌的抑制率為 100%；乙醇萃取法 4% 在 800ppm 對綠膿桿菌的抑制率為 0%。

乙醇萃取法 4% 600ppm 對大腸桿菌的抑菌率為 $99.99 \pm 0.01\%$ ，而高溫水萃法 4% 以 600ppm 對金黃色葡萄球菌的抑菌率則為 0%；而高溫水萃法 4% 以 800ppm 對綠膿桿菌的抑菌率為 0%。

表 8. 高溫水萃法和乙醇萃取法「山香」萃取物之抑菌最低濃度 (MIC 檢測法)

	高溫水萃法 4%		乙醇萃取法 4%	
	MIC (ppm)	抑菌率 (%)	MIC (ppm)	抑菌率 (%)
<i>S.aureus</i>	600	0%	600	100%
<i>E.coli</i>	600	99.99%	200	100%
<i>P.aeruginosa</i>	800	0%	800	0%