

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號： 2

計畫名稱：台灣海域軟珊瑚 *Sinularia notanda* 所含天然成分於化粧品之開發研究

執行期間：97年1月1日至97年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人： 王 貴 弘

子計畫主持人：

中華民國九十八年二月二十日

緒論

珊瑚是海洋重要之資產，生長於地球已有數億年之久，在中國悠久的歷史中也曾經對珊瑚的藥用性質有過紀錄，明朝李時珍所著「本草綱目」中就有記載珊瑚甘平無毒，去目中翳，消宿血；為末吹鼻，止鼻血；明目鎮心，指驚癇；點眼，去飛絲與“金漿，玉髓，久服長生不老”的記載。

以人類目前的天文知識，地球是吾等唯一知道含有大量液體水的星球，海洋對人類而言總帶著一分神秘面紗，也許是這一份神秘引起人類探索海洋的興趣。迄今、人類的科技突飛猛進，在海洋物理、海洋生物、海洋化學、海洋生物技術與海洋漁業等等海洋知識，比起二、三十年前，可說進步不少並有許多創新之壯舉。可是、當人類在面對海洋時，還是顯的那麼無知與渺小，因此探索海洋新世界與瞭解海洋無盡的知識，將是未來人類科技發展的重要方向。

珊瑚礁所占的面積和世界可耕種的面積差不多，最早發現山湖所蘊藏的重要生理活性物質為的前列腺素的發現，因此極大地推動了珊瑚天然產物研究的發展。從分類學的角度上講，珊瑚屬於腔腸動物門珊瑚蟲綱。珊瑚蟲綱是腔腸動物門最大的一個綱，約有 7000 多種，主要分為八放珊瑚和六放珊瑚兩個亞綱。海洋天然物研究的兩個重點即是八放珊瑚亞綱下的軟珊瑚和柳珊瑚屬，這是因為許多結構新穎、

有強烈生物活性的化合物均是從這兩屬海洋無脊椎動物中所發現。軟珊瑚作為珊瑚家族的主要成員，每年從中分離出的新化合物和有生物活性的化合物的數目是相當可觀的。

臺灣海域的珊瑚礁生產力高，蘊育著豐富的生物，其中最重要的一種底棲生物即是珊瑚。而臺灣周邊海域正位於世界珊瑚生長最發達且種類最多的熱帶西太平洋海域，據調查，台灣地區海域目前所發現共有約 280 種的珊瑚。

珊瑚在分類學上是腔腸動物門、珊瑚蟲綱。以骨骼質地可分為兩大類：石珊瑚與軟珊瑚，目前研究海洋天然物的學者大多由軟珊瑚著手，因為石珊瑚的外骨骼含豐富的碳酸鈣；在物理性防禦上能較軟珊瑚有效的防禦外來的侵害，故軟珊瑚較有可能演化出具有化學防禦能力的天然化合物。因此對於海洋天然物在化妝保養品的應用上，軟珊瑚所含具活性之天然化合物是非常具有潛力的研究。

在本研究主要針對台灣海域軟珊瑚 *Sinularia notanda* 所含具有生理活性的天然物分子應用於化妝品開發的研究，目前本計畫的研究成果，我們發現本生物體於乙酸乙酯層之粗萃物顯示有不錯之抑制酪氨酸酶活性，顯示軟珊瑚具有開發成為美白化妝品的研究標的。

實驗方法與程序

材料採集與鑑定

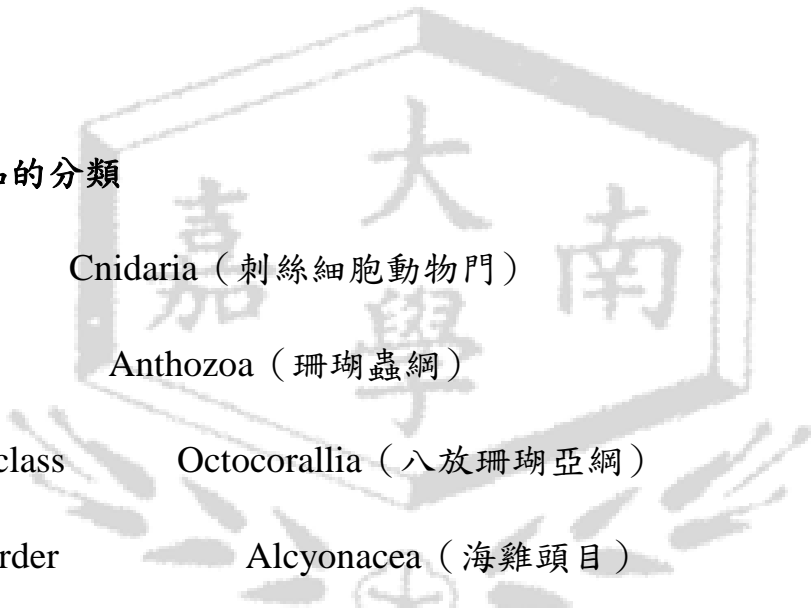
Sinularia notanda 樣品採集時間與地點：

採集時間：95 年 11 月 25 日

採集地點：台灣小琉球海域

鑑定：委請台灣大學海洋研究所戴昌鳳教授鑑定

生物樣品的分類



Phylum	Cnidaria (刺絲細胞動物門)
Class	Anthozoa (珊瑚蟲綱)
Subclass	Octocorallia (八放珊瑚亞綱)
Order	Alcyonacea (海雞頭目)
Family	Alcyoniidae (海雞頭科)
Genus	<i>Sinularia</i> (肉質軟珊瑚屬)
Species	<i>notanda</i>

S. notanda 之萃取分離與純化步驟

萃取

將解凍的軟珊瑚樣品 (wet weight) 切碎後，以乙醇 (Ethanol) 重覆多次浸泡取出萃取液，過濾後再減壓濃縮。將萃取物進行配比分離(partition)，加入水和乙酸乙酯(1:1)，重複以上動作 3 次，得到有機層與水層。

將水層和乙酸乙酯層濃縮抽乾，可得乾燥之粗萃取物，取出萃取物裝進樣品瓶內，以 Parafilm 封蓋，並儲放於 -20°C 冰箱之中備用。

Sinularia variabilis 之成分分離純化

利用常見之層析分離方法如：法薄膜層析法(TLC)、管柱層析法 (Column chromatography)、高效率液相層析法 (HPLC)等分離乙酸乙酯層粗萃物。

細胞毒殺活性評估(cytotoxicity)

本活性之時驗委託本系 梁家華博士協助進行測試。

其實驗方法如下：

四錯鹽分析法是利用 metabolically active cells 的脫氫酵素 (dehydrogenase)可將 MTS 還原產生強烈鮮紅色螢光的 formazan。此螢光物質 formazan 在吸收波長 490 nm 有最大吸光值，由此藉以測定

活細胞數目。其步驟如下：將定量的細胞(1×10^4 /well)培養在 96-well multiplates (Nunclon, Denmark)，並在 37°C 、5% CO_2 培養箱中至少生長 16 小時以上。細胞於特定時間以藥物處理後，更換培養液，於每個 well 加入 20 μl 的 MTS/PMS 溶液反應 3 小時後，使用酵素免疫分析儀(ELISA reader 312e, Bio-TEK)於波長 490 nm 下測定其 optical density。

化粧品功能性之評估

1. 美白能力試驗-抑制酪氨酸酶評估

取 40 μl 之 L-tyrosine solution (溶於 pH 6.8, 0.667 μM 之 potassium phosphate buffer) 於 96 孔盤中，加入 40 μl 濃度為 50 mg/ml 之待測物 (溶於 5% DMSO)，再加入 80 μl ，0.667 μM 之 potassium phosphate buffer，於測試前再加入 40 μl 濃度為 134 unit/ml tyrosinase solution，均勻混合後，於 37°C 下反應 30 分鐘，於波長 475nm 中進行反應前及反應後之吸光值測定。

2. 抗氧化活性試驗

(1) DPPH 自由基清除效應

取 1000 μL DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 乙醇溶液 (0.1 mM)、450 μL Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 7.4) 以及 50 μL 不同濃

度之試驗樣品，均勻混合後避光靜置30 min，續以紫外光/可見光光譜儀測量517 nm吸光值。當DPPH 自由基被清除愈多時，其吸光值會下降的愈多，利用相對於對照組的吸光值減少百分比，可得知各試驗樣品清除DPPH 自由基能力之強弱。此DPPH 自由基抑制率之強弱，即可代表該試驗樣品提供氫 (Hydrogen donor) 給予自由基能力之強弱。

(2) 清除超氧陰離子(SOD-like)試驗

以0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)配製240 μM 之PMS、1872 μM 之NADH、及600 μM 之NBT等溶液。然後取稀釋一定倍數樣品1 ml依序與PMS、NADH及NBT溶液各1 ml 均勻混合。

在室溫下靜置5分鐘後立即以分光光度計測其560 nm的吸光值。吸光值愈低表示清除能力愈強。

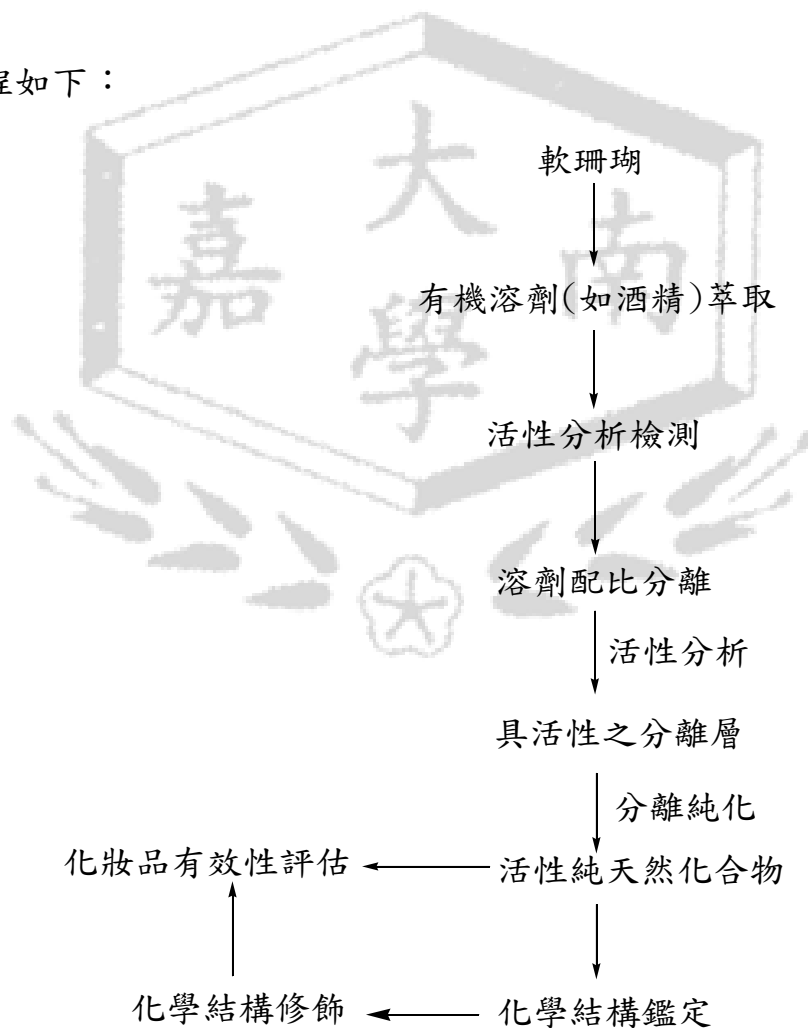
(3) 螯合亞鐵離子評估

先取200 μL 不同濃度之試驗樣品、740 μL 甲醇及20 μL 2 mM Fe_2Cl_2 ，均勻混合 30 s，然後再加入 40 μL 5 mM Ferrozine反應10 min後，利用紫外光/可見光光譜儀測量562 nm吸光值。 Fe^{2+} 和Ferozine形成之複合物在562 nm有強烈吸光值，試驗樣品之吸光值愈低代表其金屬螯合效果愈強。本試驗為3 次重複。

(4) 總抗氧化能力活性測試(TEAC)

取5 mL peroxidase、0.5 mL ABTS溶液以及 3.5 mL H₂O₂混合均勻，待產生安定藍綠色之ABTS⁺ 陽離子自由基後(5分鐘)，加入不同濃度的trolox樣品，以分光光度計734 nm，做成 trolox之檢量線，樣品的檢測如上述，比對檢量線後，換算其相當濃度。

研究流程如下：



研究成果

本軟珊瑚已大致完成分離純化的工作，經由HPLC之分離純化從 *S. notanda* 已經純化出4個純天然化合物**1-4** (Fig. 1)，天然物**1-4**別測試 A431 (Human epithelial carcinoma cell)、SCC25 (Human oral squamous cell carcinoma cell)、A549 (Human Caucasian lung carcinoma)、DU145 (Human prostate carcinoma cell)與HaCaT (Human skin keratinocytes)等 多種之癌細胞株之毒殺活性值，發現化合物**3**的細胞毒殺活性相當顯著；化合物**1**對DU145具有特別的選擇性(Table 1)。因此本計畫將化合物**3**進一步進行皮膚癌細胞之細胞凋亡試驗。其它化合物**1、2、4**則進美白活性(酪氨酸酶抑制活性)與抗氧化活性(DPPH自由基清除率評估、螯合亞鐵離子能力評估、清除超氧陰離子評估、總抗氧化能力活性測試(TEAC))之評估試驗(Table 2)。

Figure 1. 本計劃已經純化之天然物 1-4

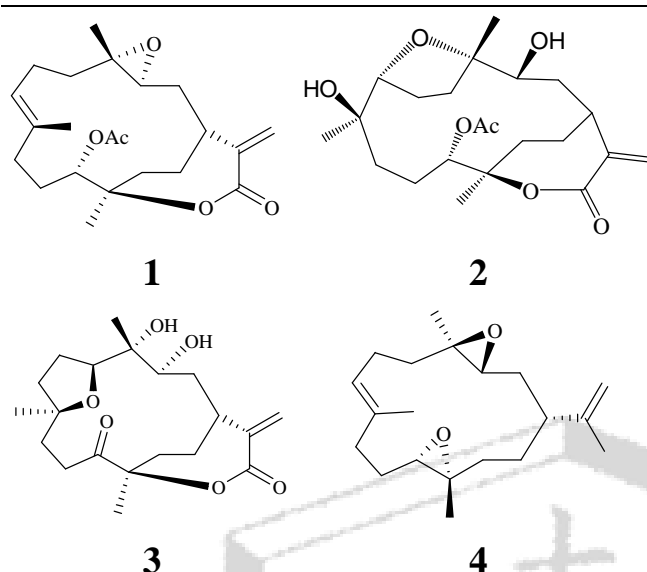


Table 1. Cytotoxicity of products 1-4

Compound	Cell lines IC ₅₀ (μM)				
	A431	DPPH	A549	DU145	HaCaT
1	14.5 ± 1.2	76.5 ± 3.3	195.5 ± 1.7	24.7 ± 2.7	219.6 ± 1.9
2	141.7 ± 2.1	224.8 ± 1.9	243.9 ± 1.8	243.9 ± 3.8	243.9 ± 1.4
3	1.7 ± 1.8	11.7 ± 1.8	40.6 ± 2.1	7.7 ± 1.6	82.3 ± 2.8
4	122.2 ± 3.6	285.3 ± 2.5	328.9 ± 2.6	98.1 ± 1.8	255.7 ± 2.1

Table 2. 天然物 1、2、4 抑制酪氨酸酶與四種抗氧化活性測試

Compound	EC ₅₀ (μg/mL)				
	Tyrosinase	DPPH	SOD-like	Fe ₂ ⁺	TEAC
1	120.3	65.3	58.2	852	180
2	78.5	38.2	25.8	780	320
4	88.5	> 100	>100	3200	500
Vit. C	98.6	15.3	nt	nt	nt
Trolox	nt	nt	nt	nt	290

本計畫所完成之成果分述如下：

1. 完成這軟珊瑚 *S. notanda* 有機層粗萃物與多醣成分的萃取；
2. 完成 *S. notanda* 之細部分離純化工作；
3. 了解各種萃取與分離技術以獲得純化之天然物；
4. 建立台灣產軟珊瑚 *S. notanda* 所含四種天然物之結構譜資料；
5. 所獲得的天然物 2 不論在酪氨酸酶的抑制與四種抗氧化的能力評估上，均有不錯的效果；
6. 此次所採集之物種，經文獻搜尋，發現相關之研究相當少，在化妝品的開發研究上則完全闕如，因此很值得吾等進一步研究；
7. 培育本系研究生與新進人員成為成熟的天然物研究人員，具備分離純化與光譜分析鑑定化學分子結構的能力，並具備獨立思考解決研究過程中之困難的能力，能構想研究中之創意與嘗試利用新技術，提昇研究之敏銳度與品質，進而成為天然物研究領域與海洋化妝品開發的新血。
8. 有鑑於海洋軟珊瑚開發應用於皮膚功能性的研究報導完全闕如，因此我們的研究為軟珊瑚所含天然物應用於開發成為化妝品的第一步。