

美和學校財團法人美和科技大學

104 年度教師產學合作計畫 結案報告

計畫名稱：奇異果萃取物美白活性之檢測與評估

計畫編號： 104-FI-DON-IAC-R-004

計畫期間： 104 年 11 月 01 日起至 106 年 7 月 31 日

計畫主持人：王正隆

共同主持人：鄭智交

經費總額：100,000 元

經費來源：統其企業有限公司

中英文摘要：

中文摘要。(五百字以內)

本計畫之目的乃藉由細胞外與細胞內美白活性評估系統進行市售奇異果萃取物其美白功效之檢測與評估。

人類的膚色主要由表皮層的黑色素、真皮層的胡蘿蔔素及血液中的血紅素所決定。其中又以表皮層的黑色素含量影響最大。而黑色素主要由黑色素細胞所合成，其合成過程受到嚴密的調控。綜觀整個黑色素生合成過程，酪胺酸酶扮演一關鍵性角色，不但參與三個步驟的催化反應，更是生合成第一步驟的關鍵酵素。因此，利用細胞外酪胺酸酶活性評估系統，便可快速評估奇異果萃取物抑制酪胺酸酶活性之程度及其皮膚美白之潛力。

實驗結果顯示：市售的奇異果萃取物能有效抑制酪胺酸酶活性，當奇異果萃取液濃度達 15%時，抑制酪胺酸酶的活性可達 40%，而檢測其對細胞毒性的影響，並不明顯(data not show)。因此，奇異果萃取液調製為美白化粧品的成份具有市場的潛力。

關鍵詞：奇異果(Kiwifruit)、黑色素 (melanin)、酪胺酸酶 (tyrosinase)

英文摘要。(五百字以內)

Abstract:

The purpose of this project is to detect and evaluate the whitening effect of commercially available Kiwifruit extracts by extracellular and intracellular whitening activity evaluation systems.

Human skin color mainly by the epidermis of melanin, dermal carotene and blood hemoglobin determined. Which in turn to the skin layer of melanin content of the greatest impact. And melanin mainly by the melanoma cells synthesized, the synthesis process is tightly controlled. Looking at the whole process of synthesis of melanin, tyrosinase plays a key role, not only in the three steps of the catalytic reaction, but also the first step in the synthesis of the key enzyme. Therefore, the use of extracellular tyrosinase activity assessment system, can quickly assess the kiwi extract inhibition of tyrosinase activity and the extent of its skin whitening potential.

The results showed that the commercially available kiwifruit extract was effective in inhibiting tyrosinase activity. When the concentration of kiwi extract was 15%, the inhibition was up to 40%, and its effect on cytotoxicity was not obvious

(data not show), therefore, kiwi extract preparation for whitening cosmetics with market potential.

Keywords: 奇異果(Kiwifruit)、黑色素 (*melanin*)、酪胺酸酶 (*tyrosinase*)

一、前言

愛美是人的天性，對於美的追求，人們總是不遺餘力。加以我國的生活水平已擠身開發國家之列，經濟富裕。因此之故，美容相關產業蓬勃發展，美容化粧品更是大行其道，其中美白化粧品之銷售量更是名列前茅，國人重視皮膚美白之程度、由此可見。

人類的膚色主要由表皮層的黑色素 (melanin)、真皮層的胡蘿蔔素及血液中的血紅素所決定。其中又以表皮層的黑色素含量影響最大。而黑色素主要由黑色素細胞 (melanocytes) 所合成，其合成過程受到嚴密的調控 (Hearing et al., 1991; Abdel-Malek et al., 1999)。一般而言，黑色素細胞未受刺激時其黑色素產量頗低，但受刺激後其產量會大大的增加甚至高達 100 倍左右 (Pawelek, 1985)。促黑激素 (α -MSH) 及促腎上腺皮質激素 (ACTH) 是人體內主要影響黑色素細胞活性的賀爾蒙，經由接受器 MCR (melanocortin receptor) 的作用，可導致黑色素細胞內 cAMP 的增加、黑色素細胞的增生及黑色素大量的合成 (Suzuki et al., 1996)。此外，由角質細胞 (位於黑色素細胞周圍) 所分泌的細胞激素 (cytokines)，如：生長因子 (growth factors)、prostaglandins、interleukines 及 interferons 等也都影響黑色素細胞的活性 (Gordon et al., 1989)。而環境因子的刺激例如：皮膚外傷、紫外線照射等等，則可能藉由細胞激素等的分泌，進而促進黑色素細胞的活性，最後造成黑色素大量的形成 (Bolognia et al., 1989)。

在黑色素的生合成過程中，酪胺酸 (tyrosine) 首先被酪胺酸酶 (tyrosinase) 氧化成 DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine)，再進一步被酪胺酸酶氧化成多巴醌 (DOPA-quinone)，接著被氧化成多巴色素 (DOPA-chrome)，再氧化成 5,6-二羥基吲哚 (5,6-dihydroxyindole, DHI)，接著再被酪胺酸酶氧化成吲哚醌 (indole-quinone)，最後聚合成黑色素 (melanin) (Hearing et al., 1991; Sanchez-Ferrer et al., 1995)。綜觀整個生合成過程，酪胺酸酶扮演一關鍵性角色，不但參與三個步驟的催化反應，更是生合成第一步驟的關鍵酵素，因此，酪胺酸酶活性的大小，對黑色素的合成影響甚鉅 (Hearing et al., 1989)。然而，目前美白化粧品的有效成分，例如麴酸(kojic acid)、熊果素(arbutin)及維生素 C 衍生物等，其主要的的作用機轉，便是抑制酪胺酸酶活性而達到美白之功效 (Mishima et al., 1988; Maeda et al., 1996; Takashima et al., 1971)。最近的研究顯示，許多中草藥萃取物中都含有抑制酪胺酸酶活性的化合物，其中大部分皆屬於酚類化合物 (phenolic compounds) (Kubo. et al., 1994; Kubo. et al., 1995; Lida. et al., 1995; Shin

et al., 1998; Shimogaki.et.al., 2000)。

奇異果 (Actinidia deliciosa, Kiwifruit) 富含營養，享有「水果之王」的美譽，奇異果含有豐富的維他命 C 與膳食纖維，体外實驗證實奇異果水萃取物與 70%酒精萃取物具有良好的抗氧化活性 (Jung et al., 2005)。本計畫將針對市售奇異果的萃取物評估其抑制酪胺酸酶活性之程度，並經由黑色素細胞檢測平台，檢測其細胞內美白活性，以評估奇異果萃取物調製為美白化粧品之市場潛力。

本計畫之目的乃藉由細胞外與細胞內美白活性評估系統進行市售奇異果的萃取物其美白功效之檢測與評估，並同時檢測奇異果萃取物之總酚含量 (total phenols)，分析其總酚含量是否與美白活性成正相關，期能建立奇異果萃取物的美白活性標示之標準化，期望能像銀杏萃取物或蜂膠之商品一樣都有標示其類黃酮 (Flavonoids) 含量以代表其生物活性。如此，可促進美白產品之研究與發展，並且有助於美白產品之有效性標示的標準化，以及提升美白化粧品產業國際競爭力。此外，也方便消費者作為選購的參考。

二、研究方法、步驟

本計畫第一階段：

將針對售奇異果的萃取物，檢測其抑制酪胺酸酶 (tyrosinase) 活性之程度。我們利用由洋菇分離而得的酪胺酸酶建立活性試驗系統。因酪胺酸酶可將 L-酪胺酸 (L-tyrosine) 或 L-多巴 (L-dopa) 氧化並生成穩定的多巴色素 (dopa-chrome) 產物，而多巴色素在 475nm 有特別的光譜吸收峰。因此，紀錄 OD₄₇₅ 即可顯示多巴色素的生成量及酪胺酸酶活性的大小 (Bernard et al., 2000)。詳述如下：

取 0.5 mM L-dopa 25 μL, 10 mM L-tyrosine 25 μL, 50 mM phosphate buffer(pH 6.5) 875 μL, 及 Sample solution 25 μL 混合均勻後，再加入 [1600U/ml] mushroom-tyrosinase 50 μL 之後每隔 30 秒，測一次 OD₄₇₅ 的讀值，追蹤記錄 10 分鐘。計算反應 10 分鐘後抑制百分比 (% inhibition)：

$$\% \text{inhibition} = \frac{A-B}{A} * 100 \%$$

A: 標準組 OD₄₇₅ 讀值 ; B: 實驗組(含萃取液)OD₄₇₅ 讀值。

本計畫第二階段：

利用黑色素細胞來檢測奇異果萃取物的細胞美白活性(whitening activity)，是否可以有效的抑制α-MSH 等引起的黑色素生成現象(melanogenesis) (Hunt et al., 1994; Suzuki et al., 1996; Shimogaki et al., 2000)。

測定細胞內黑色素含量之步驟如下：

將萃取液 10~100 μL 加入細胞培養液中 (1000 μL)，培養 24~48 hr，再將細胞以 PBS (phosphate- buffered saline) 清洗兩次，加入乙醚風乾。再加入 1N NaOH 溶解液 [內含 10% (w/v) 二甲基亞砜 (dimethylsulfoxide, DMSO)] 將細胞溶解，測 405 nm 的吸光值。再以黑色素 (melanin, from Sigma) 求得吸光值標準曲線，即可求得細胞內黑色素含量。

本計畫第三階段：

分析市售美白萃取液其總酚含量(total phenols)，是否與其美白活性正相關。實驗方法乃參考童鈺棠等人(2005)之 Folin-Ciocalteu 法測定並以五倍子酸(Gallic

acid) 為標準品進行檢測 (Kujala, 2000)。

詳細步驟如下:

1. 取萃取液 10 μL 及 790 μL 之蒸餾水。
2. 加入 50 μL Folin-Ciocalteu 試劑。
3. 混合後於室溫下靜置 5 分鐘。
4. 加入 150 μL 20% Na_2CO_3 混合均勻後於室溫下靜置 120 分鐘。
5. 以分光光度計於 730 nm 測定吸光值。以上步驟進行三個重複。
6. 以五倍子酸為標準品，求出五倍子酸的含量與 $A_{730\text{nm}}$ 吸光值之標準曲線，再計算出樣品中之總酚含量。

三、研究結果與討論

1. 探討奇異果萃取液之美白活性評估：

本研究所使用的材料是奇異果萃取物，在每一組實驗中，奇異果樣品的量為 0 μ L, 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L，分別放入(96 孔洞)培養皿中，再於每個孔洞加入 0.5 mM L-dopa 25 μ L, 10 mM L-tyrosine 25 μ L, 以及 50 mM (pH 6.5) phosphate buffer < PBS > 875 μ L, 混合均勻後，再加入 [1600U/ml] mushroom-tyrosinase 50 μ L, 之後每隔 30 秒，以 ELISA reader 測其在 475nm 的波長下之基礎吸光值，即可由吸光值的變化量得知抑制酪胺酸酶的活性大小 (Ishikawa et al.2007)。追蹤記錄 10 分鐘，計算反應 10 分鐘後之抑制百分比 (% inhibition)：

$$\text{inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} * 100 \%$$

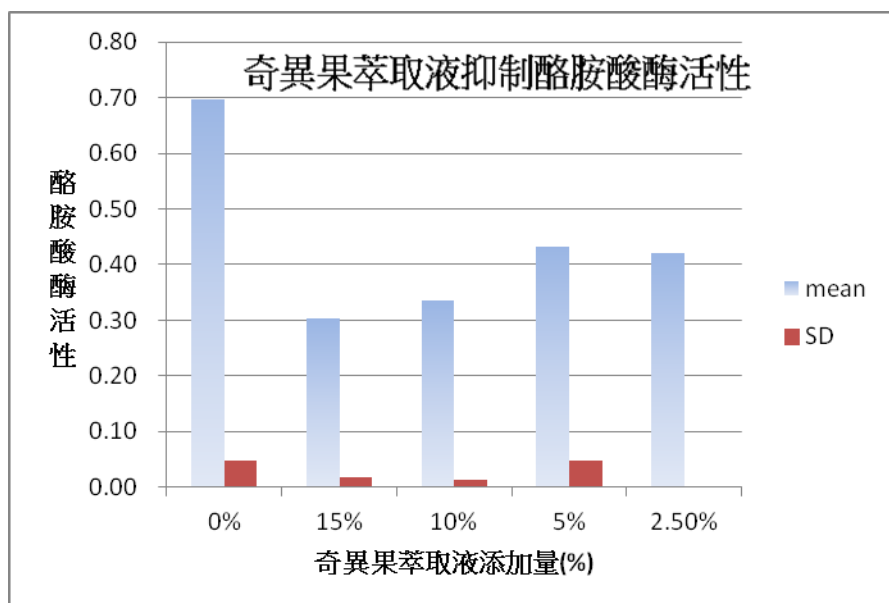
$$\text{酪胺酸酶活性(\%)} = \frac{B}{A} * 100 \%$$

A: 標準組 OD₄₇₅ 讀值 ; B: 實驗組(含萃取液)OD₄₇₅ 讀值。

(1) 第一組實驗數據

每種濃度各測三次，再取平均值(mean)並計算其標準偏差(SD)，同時計算酪胺酸酶的相對活性。實驗數據和統計圖表如下：

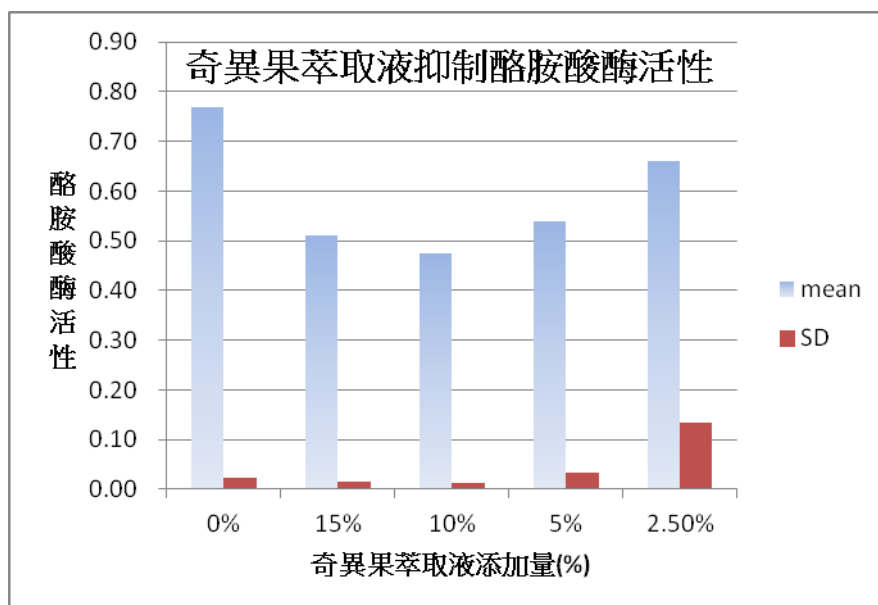
Kiwi(%)	0%	15%	10%	5%	2.5%
kiwi(ul)	0	30	20	10	5
1st	0.742	0.322	0.329	0.452	0.423
2nd	0.698	0.3	0.35	0.378	0.42
3rd	0.05	0.285	0.325	0.468	0.42
Mean(平均值)	0.70	0.30	0.33	0.43	0.42
SD(標準偏差)	0.05	0.02	0.01	0.05	0.00
酶相對活性	1	0.43	0.48	0.62	0.60



(2) 第二組實驗數據

每種濃度各測三次，再取平均值(mean)並計算其標準偏差(SD)，同時計算酪胺酸酶的相對活性。實驗數據和統計圖表如下：

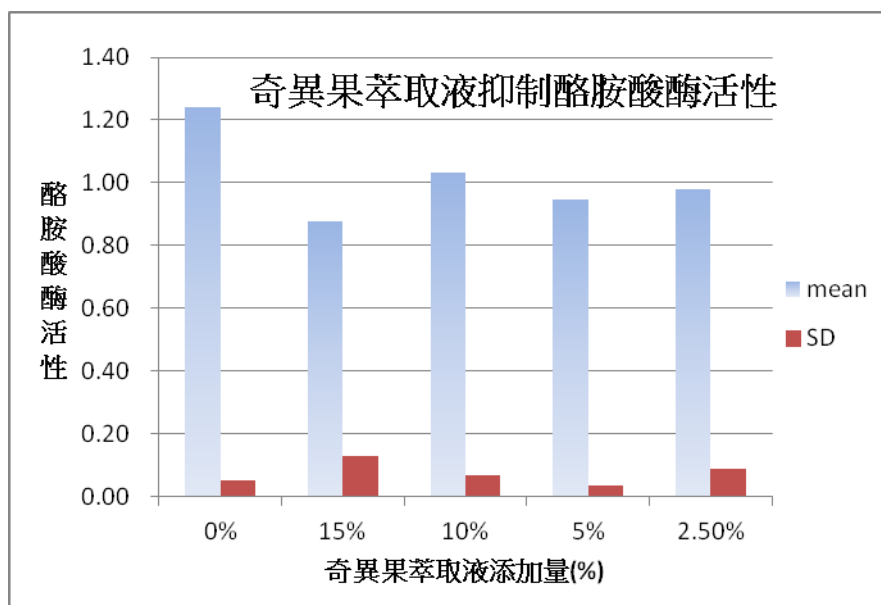
Kiwi(%)	0%	15%	10%	5%	2.5%
kiwi(ul)	0	30	20	10	5
1st	0.793	0.494	0.463	0.51	0.628
2nd	0.759	0.523	0.473	0.578	0.546
3rd	0.752	0.518	0.487	0.533	0.809
Mean(平均值)	0.77	0.51	0.47	0.54	0.66
SD(標準偏差)	0.02	0.02	0.01	0.03	0.13
酶相對活性	1	0.67	0.62	0.70	0.86



(3) 第三組實驗數據

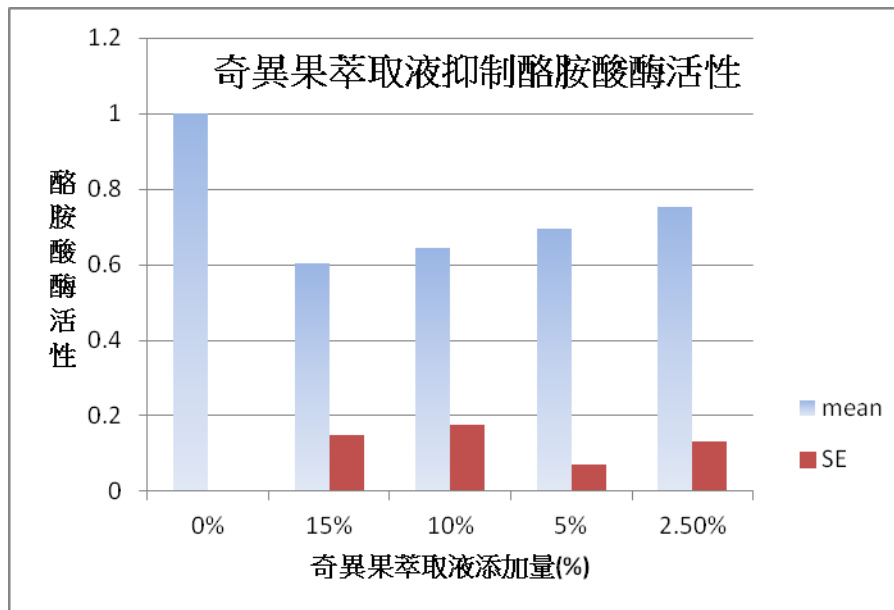
每種濃度各測三次，再取平均值(mean)並計算其標準偏差(SD)，同時計算酪胺酸酶的相對活性。實驗數據和統計圖表如下：

Kiwi(%)	0%	15%	10%	5%	2.5%
kiwi(ul)	0	30	20	10	5
1st	1.286	1.025	1.074	0.903	0.886
2nd	1.185	0.775	1.066	0.966	1.059
3rd	1.249	0.834	0.954	0.965	0.99
Mean(平均值)	1.24	0.88	1.03	0.94	0.98
SD(標準偏差)	0.05	0.13	0.07	0.04	0.09
酶相對活性	1	0.71	0.83	0.76	0.79



(4)三組實驗數據(酶相對活性)的平均值，並計算其標準誤差(SE)。實驗數據和統計圖表如下：

Kiwi(%)	0%	15%	10%	5%	2.5%
kiwi(ul)	0	30	20	10	5
第一組	1	0.43	0.48	0.62	0.60
第二組	1	0.67	0.62	0.70	0.86
第三組	1	0.71	0.83	0.76	0.79
Mean(平均值)	1	0.60	0.64	0.70	0.75
SE(標準誤差)	0	0.15	0.18	0.07	0.13



2.實驗結果顯示：市售的奇異果萃取物能有效抑制酪胺酸酶活性，當奇異果萃取液濃度達 15%時，抑制酪胺酸酶的活性可達 40%，而檢測其對細胞毒性的影響，並不明顯(data not show)。因此，奇異果萃取液調製為美白化粧品的成份具有市場的潛力。

四、結論

由本實驗的初步試驗結果顯示，奇異果萃取液具有抗氧化(data not shown)及美白之活性，其作用機轉需進一步探討，以做為實務應用之理論基礎。利用美白活性及抑制 NO 產生之抗發炎活性篩檢模式，可篩選出具有潛力的蔬果天然活性成分，繼以開發為新的抗老化化粧品有效成分，可逐步建立本系之蔬果美容生技的研發平台。

五、中英文參考文獻

- Aruoma, O.I., Halliwell, B. and Dizdaroglu, M. (1989) Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**: 13024-13028.
- Aruoma, O.I., Wasil, M. and Halliwell. (1987) The scavenging of oxidants by sulphasalazine and its metabolites. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 3739-3742.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A. and Thomas, C.E. (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **1**: 3.
- Benencia, F., Courreques, MC. (1999) Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex viruses-1 and -2. *Phytomedicine* **6(2)**: 119-23
- Byers, T. and Perry, J. (1992) Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **12**: 139-159.
- Chen, C.C. and Wang, J.K. (1999) p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol.* **55**: 481-488.
- Duprat, F. (1995) Susceptibility of cloned K⁺ channels to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** : 11796.
- Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* **50** : 1321-1332.
- Fridovich, I. (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **245** : 4053-4057.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrite, nitrate, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
- Grootveld, M., Halliwell, B. and Mocineuse, C.P. (1987) Action of uric acid, allopurinol, and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. *Free Radic. Res. Commun.* **4** : 69-76.
- Hall, E.D. and Braughler, J.M. (1989) Central nervous system trauma and stroke. *Free Radic. Biol. Med.* **6** : 303-313.

- Halliwell, B. (1997) Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* **55** :S44-S52.
- Harman, D. (2003) The free radical theory of aging. *Antioxidant Redox Signal* **5** : 557-561.
- Helfrich, Y.R., .et al (2008) Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology Nursing* **20(3)** : 177-183.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M. and Hollman, P.C.H. (1993) Dietary antioxidant flavanoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342** : 1007-1011.
- Ishikawa, M., Kawase, I., Ishi, F. (2007) Combination of amino acids reduces pigmentation in B16F0 melanoma. *Cells Biol. Pharm. Bull.*, **30** :677-681.
- Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* **367** : 147-163.
- Kilbourn, R. (1997) Nitric oxide and shock. *Dis. Mon.* **43** :281-348.
- Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298** :249-258.
- Kramer, K. (1986) Influence of lipid peroxidation on β -adrenoceptors. *FEBS Lett.* **198**: 80.
- Lander, H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* **11** : 118-124.
- Lee, C.M. (1997) Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic. Biol. Med.* **22**: 1259.
- Ma, X.L., Weyrich, A.S., Lefer, D.J. and Lefer, A.M. (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ. Res.* **72** : 403-412.
- Maxwell, S.R.J. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* **49**: 345-361.
- McCall, M.R. and Frei, B. (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce

oxidative damage in humans ? *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1034-1053.

McCord, J.M. (1985) Oxygen-derived free radicals in post-ischaemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* **312** : 159-163.

Mellors, A. and Tappel, A.L. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **241** : 4353-4356.

Modell, B., Letsky, E.A. and Flynn, D.M. (1982) Survival and desferrioxamine in thalassaemia major. *B.M.J.* **284** : 1081-1084.

Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43** : 109-142.

Morris, S.M. and Billiar, T.R. (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.* **266** : E829-E839.

Packer, J.E., Slater, T.F. and Wilson, R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278** : 737.

Sevenian, A. and Hochstein, P. (1985) Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **5** : 365-375.

Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**: 291-295.

Stadtman, E.R. and Berlett, B.S. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabol. Rev.* **30**: 225-243.

Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B. and Willett, W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.* **328** : 1444-1449.

Stocker, R. and Frei, B. (1991) Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In Sies H, editor. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *London: Academic Press*, pp.213-243.

Szabo, A. (1995) Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* **3**: 2-32.

Takahashi, K., Newberger, P.E. and Cohen, H.J. (1986) Glutathione peroxidase protein: absence in selenium-deficiency states and correlation with enzymatic activity. *J. Clin. Invest.* **77** :1402.

Wei, X.-Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.-J., Huang, F.-P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. and Liew, F.Y. (1995) Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375** : 408-411.