

美和學校財團法人美和科技大學

106 年度教師產學合作計畫

結案報告書

計畫名稱：「紅藜殼分析與試驗計畫」

委託案計畫編號：106-FI-DBT-IAC-R-007

計畫期間：2017/06/01~2017/11/30

計畫主持人：吳裕仁

共同主持人：

研究助理：

經費總額：300,000 元

經費來源：財團法人工業技術研究院

一、紅藜殼分析與試驗：(含實驗方法、過程、抗疲勞功能評估試驗結果、分析與佐證資料數據等內容)

- 1) 紅藜殼萃取物
- 2) 抑菌試驗
- 3) 紅藜色素指標成分分析
- 4) 品質分析：總酚含量測定、總類黃酮含量測定、甜菜色素之分析、DPPH 清除力分析、總游離胺基酸
- 5) 功能分析：測量食品氧自由基的吸收能力(ORAC)、皮膚敏感性試驗、皮膚彈性測定、皮膚含水率測試(保濕測試)、數據整理及統計分析
- 6) 紅藜殼萃取物之抑菌、抗氧化物質萃取參數資料一份
- 7) 紅藜殼萃取物總酚及類黃酮檢測報告一份
- 8) 紅藜殼萃取物其 2 種主成份定量分析資料
- 9) 抗氧化銀寶膠囊產品功能測試報告一份
- 10) 活肌精華液產品的皮膚敏感性報告一份。
- 11) 活肌面膜皮膚測試(皮膚彈性、保濕)報告一份。
- 12) 活肌精華液皮膚彈性評估試驗報告一份。

二、紅藜殼原料製備及萃取成分、化性分析與產品原料功效驗證

(1) 紅藜殼萃取物之抑菌、抗氧化物質的萃取參數

1-1. 紅藜殼萃取物之製備

◎萃取方法：

選用紅藜殼為材料，萃取步驟：依據料液比例原則，取 25 克紅藜殼加入料液比 1：10 的蒸餾水，超音波(低溫)震盪 30 分鐘，經離心過濾獲得萃取液，剩餘原料加入料液比 1：5 的蒸餾水，繼續第二次超音波(低溫)震盪 30 分鐘，經離心過濾獲得萃取液，將前後二次萃取液混合，再經過冷凍乾燥後備存。相同萃取步驟，使用 50%乙醇時，前後二次萃取溶劑之料液比分別為 1：9 和 1：5，而 95%乙醇的前後二次萃取溶劑之料液比分別為 1：8 和 1：4。

本次實驗取 100 克紅藜殼原料，分別以 95%乙醇、50%乙醇以及蒸餾水進行萃取，分別獲得 95%乙醇萃取物 1.82 克，其萃取率為 1.82%；50%乙醇萃取物 23.01，其萃取率為 23.01%克；水草物 19.37 克，其萃取率為 19.37%，如表 1 所示。

三種方式之萃取率，50%乙醇較優，其次是水草，最低是 95%乙醇，但若考量人力設備成本及回收乙醇之程序，水草方式應是值得考量的方式。

表 1. 紅藜殼萃取物之萃取率分析

萃取溶劑	萃取物總重(g)	萃取率(%)
95%乙醇	1.82	1.82
50%乙醇	23.01	23.01
蒸餾水	19.37	19.37

1-2. 萃取物之抑菌分析

將紅藜殼萃取物濃度定量為 50mg/mL，各取 20 μ L 加入抑菌環內，最終濃度為 1mg，經過萃取物之擴散，培養觀察抑菌環周圍的抑菌圈的呈現。本實驗選用三種菌株，分別是革蘭氏陰性菌(-)大腸桿菌(*E.coli*)、革蘭氏陽性菌(+)金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草桿菌(*Bacillus cereus*)。實驗結果發現水草對於革蘭氏陰性菌大腸桿菌呈現較為清楚的抑菌圈。如圖 1 所示。

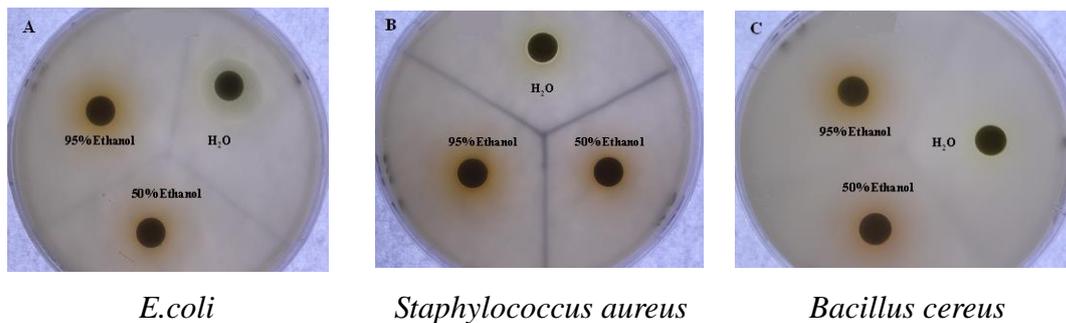


圖 1. 紅藜殼萃取物之抑菌分析

1-3. 萃取物之自由基清除率分析

◎材料與方法

1. 取 2.5mL 的樣品，加入 1.0mL 新鮮配製的 DPPH(0.6mM)的反應液，均勻混合靜置避光 30min。
2. 檢測波長 517nm 吸光值。
3. 自由基清除率 = (Blank 吸光值 - 樣品吸光值) ÷ Blank 吸光值 × 100%

◎結果

選用 DPPH 作為自由基提供者，測試三種紅藜殼萃取物之清除自由基能力，以相同濃度 125 μ g/mL 進行比較，結果如表 2 所示，50%乙醇較優，其次是水草，最低是 95%乙醇。

從自由基清除能力之判斷，50%乙醇和水草之差異並不大，以水草方式仍能達到如同 50%乙醇萃取之效果。

表 2. 紅藜殼萃取物之自由基清除能力

萃取溶劑	125 μ g/mL 萃取物自由基清除率(%)
95%乙醇	46.42 %
50%乙醇	59.59 %
蒸餾水	56.16 %

(2) 紅藜殼萃取物之總酚及類黃酮的檢測

2-1. 總酚之檢測分析

◎方法：

1. 取不同濃度(100、150、200、300、400mg/L)的 40 μ L Gallic acid (mg/L)加入離心管，再加入 400 μ L 的 50% 酚類指示劑，置於 35 $^{\circ}$ C 恆溫箱，反應 10 分鐘。
2. 加入 320 μ L 的 0.3M Na₂CO₃(w/w)，置於 35 $^{\circ}$ C 恆溫箱，避光反應 15 分鐘。
3. 使用波長 750nm 測吸光值，製作檢量線，如圖 2。
4. 樣品濃度的換算，以 Gallic acid 當作標準品，所得之樣品的濃度再乘上稀釋倍數或樣品萃取體積，最後得到樣品濃度。

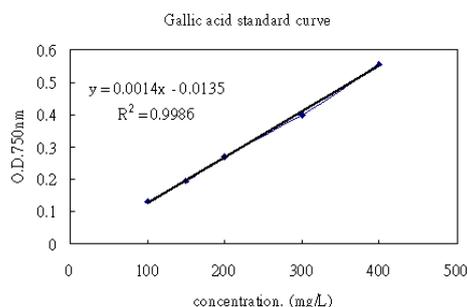


圖 2. Gallic acid 之標準曲線

◎結果

每克紅藜殼萃取物的總酚含量，95%乙醇萃取物的總酚含量約 14714.29 mg/L，50%乙醇萃取物的總酚含量約 53845.23mg/L，水萃取物的總酚含量約 66457.79mg/L，如表 3 所示。水萃較優，其次是 50%乙醇，最低是 95%乙醇。

表 3. 紅藜殼萃取物之總酚含量

萃取溶劑	每克萃取物總酚含量(mg/L)
95%乙醇	14714.29
50%乙醇	53845.23
蒸餾水	66457.79

2-2. 類黃酮之檢測分析

◎方法

取 0.25mL Quercetin 不同濃度(50、100、150、200mg/L)溶液作為樣品，加入 0.75mL 的 75% 乙醇、1.4mL 去離子水、0.05mL 的 1M CH₃COOK，最後再加入 0.05mL 的 10% 的 AlCl₃，於 35°C 的暗室靜置反應 30 分鐘。待測物須經離心後，再取上清液測波長 415nm，製作標準曲線，如圖 3。

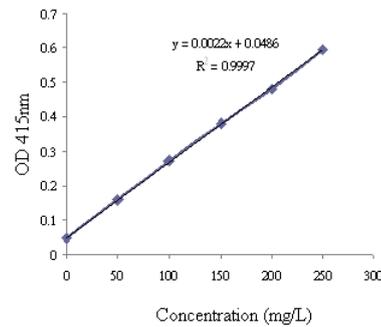


圖 3. Quercetin 之標準曲線

◎結果：

每克紅藜殼萃取物的類黃酮含量，95%乙醇萃取物的類黃酮含量約 6522 mg/L，50%乙醇萃取物的類黃酮含量約 9493 mg/L，水萃取物的類黃酮含量約 1760 mg/L。如表 4 所示。95%乙醇較優，其次是 50%乙醇，最低是水萃。

由於大部分類黃酮性質屬於非極性類之脂溶性，三種萃取物相較之下，乙醇的萃取物之類黃酮含量一定會多於水萃物之類黃酮含量。

表 4. 紅藜殼萃取物之類黃酮含量

萃取溶劑	每克萃取物中總類黃酮含量(mg/L)
95%乙醇	6522
50%乙醇	9493
蒸餾水	1760

(3) 紅藜殼萃取物其 2 種主成分定量分析

3-1. 甜菜色素分析

甜菜色素(Betainin)作為標準品(mg/L)，利用波長吸光值(530nm)，完成檢量線製作，如圖 4。

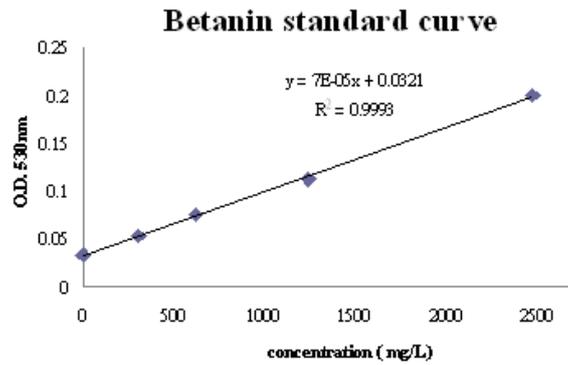


圖 4. 甜菜色素之標準曲線

隨後，檢測三種紅藜殼萃取物的甜菜色素，每克 95%乙醇萃取物的甜菜色素含量約 7.41×10^5 mg/L，每克 50%乙醇萃取物的甜菜色素含量約 4.74×10^6 mg/L，每克水萃取物的甜菜色素含量約 3.65×10^6 mg/L。如表 5 所示。50%乙醇較優，其次是水草，最低是 95%乙醇。

表 5. 紅藜殼萃取物之甜菜色素含量

萃取溶劑	每克萃取物中甜菜色素含量(mg/L)
95%乙醇	7.41×10^5
50%乙醇	4.74×10^6
蒸餾水	3.65×10^6

3-2. 總游離胺基酸分析

◎方法

取 0.5mL 的 glutamic acid 不同濃度(1600、2400、3200、4000mg/L)加入 15mL 離心管中，加入新鮮配製 0.25mL 的 25mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer，加入 0.25mL 的 0.5% Ninhydrin 反應液混合均勻，於沸水中加熱 15 分鐘，靜置冷卻後，加入 11mL 的 RO 水定量，最後使用 570nm 波長測吸光，製作標準曲線，如圖 5 所示。

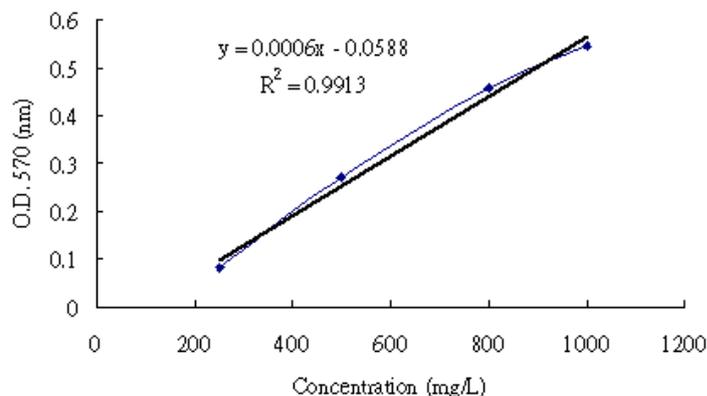


圖 5. glutamic acid 之標準曲線

◎結果

每克紅藜殼萃取物的總游離胺基酸含量，95%乙醇萃取物的總游離胺基酸含量約 5.06×10^4 mg/L，50%乙醇萃取物的總游離胺基酸含量約 6.39×10^4 mg/L，水萃取物的總游離胺基酸含量約 5.29×10^4 mg/L。如表 6 所示。50%乙醇較優，其次是水萃，最低是 95%乙醇。

表 6. 紅藜殼萃取物之總游離胺基酸含量

萃取溶劑	每克萃取物中總游離胺基酸含量(mg/L)
95%乙醇	5.06×10^4
50%乙醇	6.39×10^4
蒸餾水	5.29×10^4

(4). 抗氧化銀寶膠囊產品的功能測試

4-1. 銀寶膠囊產品之抗氧化分析

◎萃取方法：

取 1g 紅藜膠囊內裝樣品分別使用蒸餾水和 95%乙醇萃取(料液比 1:9)，並於超音波震盪(低溫)提取 1 小時，經取上清液分析抗氧化活性，採用 FRAP 方法測定。

◎抗氧化分析方法：採用新鮮配製 FRAP 溶液

A 液：取 0.31 克醋酸鈉與 1.6mL 醋酸溶液，最後用 H₂O 定量至 100mL。

B 液：10mM TPTZ 溶於 40mM HCl 溶液。

C 液：20mM 氯化鐵溶於 H₂O。最後以 A : B : C = 10 : 1 : 1 配製 FRAP 混合反應溶液

標準品：10mM 硫酸鐵(FeSO₄)溶於 H₂O。

檢測過程：取 0.05mL FeSO₄ 不同濃度溶液，加入 1.5mL FRAP 混合反應溶液，再加入 0.15mL H₂O，混合均勻後於 37°C 靜置反應 30 分，最後可稍微離心後，測波長 593nm 吸光，製作標準曲線，如圖 6 所示。

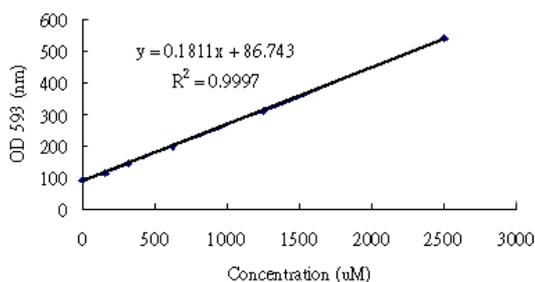


圖 6. FeSO₄ 之標準曲線

◎結果

95%乙醇萃取之每克紅藜銀寶膠囊的抗氧化活性約 $9.74 \times 10^5 \mu\text{M}$ ，水萃取之每克紅藜銀寶膠囊的抗氧化活性約 $1.25 \times 10^6 \mu\text{M}$ 。如表 7 所示。銀寶膠囊水萃物的抗氧化活性優於 95%乙醇萃取物之抗氧化活性。

表 7. 銀寶膠囊之抗氧化活性

萃取溶劑	每 g 產品抗氧化活性(μM)	
	銀寶膠囊	紅藜麥
95%乙醇	9.74×10^5	4.06×10^5
蒸餾水	1.25×10^6	5.39×10^5

4-2. 銀寶膠囊與市售紅藜麥之抗氧化活性比較

◎萃取方法

萃取步驟採用相同 4-1 之萃取方法。

◎結果

選用市售來自南美洲秘魯產地之紅藜麥，和銀寶膠囊進行抗氧化活性之比較，參考表 7，無論是 95%乙醇或水萃，銀寶膠囊的抗氧化活性大於紅藜麥約 2.3 倍。

4-3. 紅藜產品總游離胺基酸含量之比較

◎萃取方法

萃取步驟採用相同 1-1 之萃取方法。

◎結果

選用三種紅藜相關產品，如紅藜殼、脫殼紅藜和南美洲紅藜麥，進行總游離胺基酸含量之比較，如表 8 所示。觀察比較三種萃取方式的結果，臺灣本土的脫殼紅藜之總游離胺基酸含量優於來自南美秘魯之紅藜麥，雖然紅藜殼相較於前二者其總游離胺基酸含量低，但事實上，對於紅藜殼而言，仍保有相當多的營養素，確實可善加再利用。

表 8. 總游離胺基酸含量之比較

萃取溶劑	每克萃取物中總游離胺基酸含量(mg/L)		
	紅藜殼	脫殼紅藜	紅藜麥
95%乙醇	5.06×10^4	1.6×10^5	1.1×10^5
50%乙醇	6.39×10^4	1.9×10^5	1.4×10^5
蒸餾水	5.29×10^4	1.3×10^5	9.5×10^4

三、產品功效驗證(敏感性、皮膚彈性、保濕之皮膚測試)及功能測試：

皮膚為人體最大器官，主要構造分為表皮層、真皮層及皮下組織三層，其生理功能有保護作用、調節體溫、感覺及免疫反應。最外層的角質層提供了屏障功能，主要保護體內水分流失及抗病菌、隔絕外來物質侵入，也可以有效的隔絕紫外線、壓力等多種傷害。本計劃目的以含紅藜抽出物的保養品測試其對皮膚的保濕能力及皮膚彈性的功效，透過臨床皮膚科學之研究數據，建立紅藜相關保養品的活性測試，以提供未來在銷售端之研究佐證資料。實驗方法將以紅藜面膜和精華液等敷劑進行臨床皮膚安全性測試及其產品功效驗證，如敏感性、皮膚彈性、保濕之皮膚測試及功能測試。以透過以影像系統每星期分析其皮膚狀況，並做評估分析其功效。

本研究所使用之保養品面膜成分為Pure water、Glycerine、Chenopodium Formosanum Grain Extract、Butylene Glycol、Propanediol、Caprylyl Glycol、Licorice Extract、Carbomer、Polysorbate 20、Silkpeptide、Ubiquinone、Triethanolamine、Palmitoyl Tripeptide、Phenoxyethanol、Hyaluronic Acid、Allantoin、Collagen、Lecithin、Iodopropynyl butylcarbamate、L-ascorbic acid。而精華液成分為紅藜萃取液、蘆薈、綠茶萃取液、多元醇保濕劑、高分子聚合物、抗氧化劑、荷荷芭油、乳油木果油。

面膜功能測試程序：期程一個月，面膜每三天使用一次，使用方法於臉部清潔後，取一片面膜敷於臉上，並配合眼鼻位置調整切口，敷用15-20分鐘後取下，無須沖洗，施以指腹輕輕按摩至精華液完全吸收後即可。每週檢測一次。

精華液功能測試程序：期程一個月，精華液1-2天使用一次，取適量精華液於潔淨的臉部，輕拍至完全吸收後即可。每週檢測一次。

(5). 活肌精華液產品的皮膚敏感性

受測者經四週期程的使用，每週檢測一次，觀察保養品對皮膚紅斑的反應，確定是否有過敏性反應，四週測試結果，與使用前比較，並無顯著的差異，如圖7所示。即便精華液對正常皮膚並無敏感性，對於過敏性皮膚或異位性皮膚炎消費者，建議仍避免接觸使用。

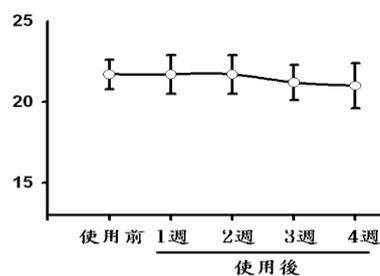


圖7. 活肌精華液對皮膚紅斑過敏反應

(6). 活肌面膜皮膚測試(皮膚彈性、保濕)

受測者經四週期程的使用，每三天使用一次，每週檢測一次。本次受測者使用面膜並非集體於短時間內使用，因此並無測試皮膚短期(及時)保濕功效，而

是採用長時間使用後對整體皮膚的變化，觀察保養品對皮膚紋理、光澤、紅斑、螢光和類固醇反應。

受測者使用面膜四週後，如圖 8a 所示，四週測試結果，與使用前比較，受測者臉部皮膚紋理的有顯著的變化，從類似山谷高高低低的紋理慢慢變的平順細緻。一般紋理容易卡著含毒的 PM2.5 的粒子，持續刺激肌膚發炎，造成角質代謝異常、紋理絮亂，而間隙較深的橫向紋理，更容易堆積髒污。因此，整個紋理平順細緻後，臉部較不容易藏汗納垢，自然臉部顯示出光澤度，如圖 8b 所示，臉部光澤度比使用前較高，亦即隨著紋理逐漸的平順，光澤度隨之升高。此外，受測者對面膜並無紅斑過敏反應，顯示對正常皮膚而言，面膜成份是相對安全，但對於過敏性皮膚或異位性皮膚炎消費者，建議仍避免接觸使用。面膜成份無螢光和類固醇反應。

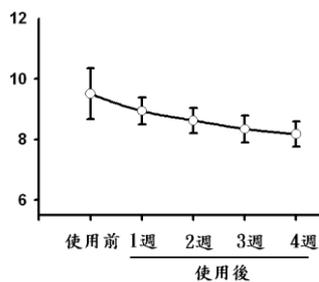


圖 8a. 面膜對皮膚紋理反應

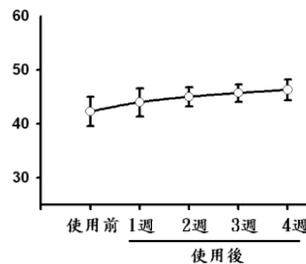


圖 8b. 面膜對皮膚光澤反應

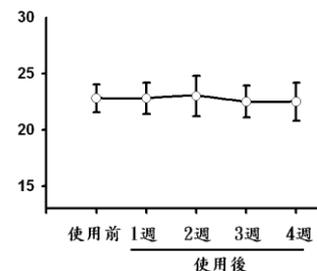


圖 8c. 面膜對皮膚紅斑過敏反應

(7). 活肌精華液皮膚彈性評估試驗

上述(5)說明精華液對受測者皮膚無紅斑過敏反應。在本次研究皮膚真皮層彈力測試中，可能是測試的時間尚不夠長久，產品對皮膚長期的彈性能力並沒有顯著的改善作用，因此尚無法完全排除其對皮膚彈性的功效。不過，在受測者使用精華液後，觀察精華液對皮膚紋理、光澤、毛孔、深層斑、螢光和類固醇反應。圖9a和圖9b的反應，皮膚的紋理和光澤度都有改善，研判一般非含藥的保養品成份，因內含天然保濕因子，塗抹後對皮膚都會有幫助。而在毛孔和深層斑測試方面，精華液對毛孔收斂和深層斑的淡化卻有顯著效果，如圖9c和圖9d。精華液成份無螢光和類固醇反應。

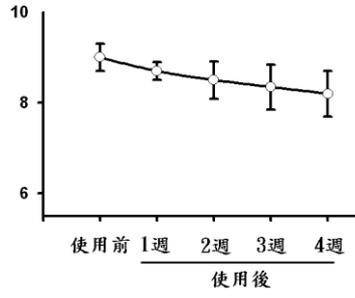


圖 9a. 活肌精華液對皮膚紋理反應

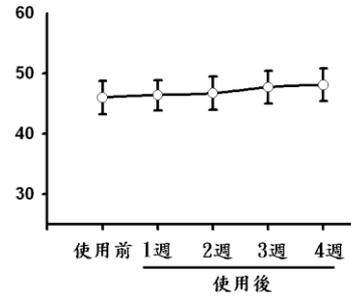


圖 9b. 活肌精華液對皮膚光澤反應

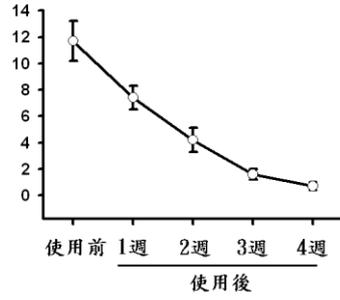


圖 9c. 活肌精華液對皮膚毛孔反應

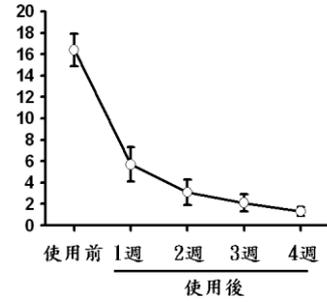


圖 9d. 活肌精華液對皮膚深層斑反應

三、結論

- 1.紅藜殼萃取物之萃取率分別是 50% 乙醇(23.01%)>水萃(19.37%)>95% 乙醇(1.82%)。
- 2.抑菌實驗，三種萃取物僅水萃物對於革蘭氏陰性菌大腸桿菌呈現較為清楚的抑菌圈，其餘二種萃取物對革蘭氏陰性菌和陽性菌皆無反應。
- 3.三種萃取物之自由基清除率分析，當濃度在 125 μ g/mL 時，自由基清除能力 50% 乙醇>水萃>95% 乙醇。
- 4.每公克紅藜殼萃取物的總酚含量，95% 乙醇萃取物的總酚含量約 14714.29 mg/L，50% 乙醇萃取物的總酚含量約 53845.23mg/L，水萃取物的總酚含量約 66457.79mg/L，水萃>50% 乙醇>95% 乙醇。
- 5.每公克紅藜殼萃取物的類黃酮含量，95% 乙醇萃取物的類黃酮含量約 6522 mg/L，50% 乙醇萃取物的類黃酮含量約 9493 mg/L，水萃取物的類黃酮含量約 1760 mg/L，50% 乙醇>水萃>95% 乙醇。
- 6.每公克 95% 乙醇萃取物的甜菜色素含量約 7.41×10^5 mg/L，50% 乙醇萃取物的甜菜色素含量約 4.74×10^6 mg/L，水萃取物的甜菜色素含量約 3.65×10^6 mg/L，50% 乙醇>水萃>95% 乙醇。
- 7.每公克紅藜殼萃取物的總游離胺基酸含量，95%乙醇萃取物的含量約 5.06×10^4 mg/L，50%乙醇萃取物的含量約 6.39×10^4 mg/L，水萃取物的含量約 5.29×10^4 mg/L，50% 乙醇>水萃>95% 乙醇。
- 8.紅藜產品總游離胺基酸含量之比較：脫殼紅藜>紅藜麥>紅藜殼。
- 9.活肌面膜皮膚測試：紋理和光澤有反應，無敏感性反應。
- 10.活肌精華液皮膚測試：毛孔和深層斑有反應，紋理和光澤無差異性，無敏感性反應。