

紅藜種子萃取物之抗氧化體外(*in vitro*)及體內(*in vivo*)

試驗評估

鄭智交, 王淨婷, 蔡豐仁*

美和科技大學美容系

摘要

紅藜屬台灣本土原生種植物, 吳(2007)研究紅藜籽實(種子)萃取液以 FRAP(鐵離子還原/抗氧化力分析法)還原力及整合亞鐵能力及 DPPH 清除能力測試顯示有相當程度的抗氧化力, 經分析顯示紅藜種子中酚類化合物以芸香苷(Rutin)為主, 甜菜色素含量亦高達 10% 乾重。本研究係利用紅藜種子的萃取物(包括水相萃取物及 95% 酒精萃取物)來進行抗氧化體外(*in vitro*)及體內(*in vivo*)試驗評估。體外試驗係利用 DPPH 自由基清除試驗, 體內試驗係利用偵測蛋白質羰基(carbonyl groups)暴露的免疫呈色方法, 因為蛋白質的氧化是皮膚光老化與氧化壓力重要的生化指標之一。DPPH 自由基清除率的結果顯示紅藜種子水溶液萃取物(1.5mg/mL)及酒精(95%)萃取物(1.5mg/mL)的分別為 $14.7 \pm 0.02\%$ 及 $9.5 \pm 0.02\%$, 水溶液萃取物的清除能力則略高於酒精萃取物。而體內試驗結果顯示含 0.5%(w/w) 冷凍乾燥水相萃取物或含 0.5%(w/w) 經減壓濃縮及冷凍乾燥之酒精(95%)萃取物之試驗配方皆沒有顯著的臨床抗氧化效力。上述二項結果顯示紅藜種子的萃取物之臨床抗氧化效果並不佳。

關鍵詞：抗氧化、紅藜、羰基

一、前言

紅藜屬本土原生種植物，根據「台灣植物誌」登錄其學名為台灣藜 (*Chenopodium formosanum* Koidz.)，紅藜種子係南台灣原住民排灣族及魯凱族釀製傳統小米酒必備的酒麴原料，通常是每年年初播種，栽植 4~5 個月即可收成。根據吳(2007)針對台灣紅藜籽實(種子)之研究，顯示紅藜種子萃取液即含有抗氧化成分。以 FRAP(鐵離子還原/抗氧化力分析法)還原力及螯合亞鐵能力及 DPPH 清除能力測試皆有相當程度的抗氧化力。而紅藜種子中酚類化合物以芸香苷(Rutin)為主，甜菜色素含量亦高達 10% 乾重。本研究將進行體外(*in vitro*)測試比較紅藜種子的水相萃取液及 95% 酒精萃取液的 DPPH 清除能力，另外也將進一步進行體內(*in vivo*)測試評估臨牀的抗氧化能力。我們所使用的體內測試的方法是偵測角質層蛋白質羰基(carbonyl groups)暴露的免疫呈色方法，主要是因為蛋白質的氧化皮膚光老化與氧化壓力重要的生化指標(Sander et al, 2002)。該方法係根據有學者利用免疫轉印呈色方式偵測羰基數量來表示蛋白質被氧化的程度(Levine et al, 1994; Smith et al, 1996)，因為蛋白質羰基可藉由蛋白質的氧化斷裂(oxidative cleavage)或是直接氧化離胺酸(lysine)、精胺酸(arginine)、脯胺酸(proline)、組胺酸(histidine)、色胺酸(tryptophan)及蘇胺酸(threonine)殘基而產生，也有學者利用此方法發現在皮膚較外層的角質層(stratum corneum)內的 keratin 10 被氧化的程度比較內層的角質細胞(keratinocyte)高，甚至使用化學性氧化劑及 UV 處理所得到的結果與上述相同(Thiele et al, 1999a)。因此，我們將利用此偵測蛋白質氧化的方法，透過簡便的免疫分析操作流程，以評估紅藜種子萃取物臨牀的抗氧化效力，體內測試平台的建立及詳細的試驗步驟已發表(Wang et al, 2010)。我們以實際塗抹於皮膚的臨牀試驗方式並以貼布剝屑收集角質層蛋白質，利用偵測角質層蛋白質羰基(carbonyl group)暴露數量為原理之免疫分析法，來評估紅藜種子抗氧化成份的臨牀抗氧化效果。蛋白質羰基暴露的數量已普遍當作氧化壓力的生物指標，利用這套方法所得到的結果不但具有鑑別度，且屬於證據力相當高的體內(*in vivo*)測試。本研究可協助化妝品業者開發以本土植物紅藜為主要特色的抗氧化化妝保養品以提昇產品的競爭力，我們利用上述之方法測試紅藜種子水相萃取液及 95% 酒精萃取液之臨牀抗氧化效力，以便作為開發紅藜抗氧化化妝品的重要參考依據。

二、研究方法

2.1 紅藜種子萃取液之製備

取 10g 紅藜種子粉末加入 30g 去離子水於 4°C 靜置 12 小時後以 vortex 振盪 30 分鐘，經離心(10000 rpm)30 分鐘後取上清液即為水相萃取液；而取 10g 紅藜種子粉末加入 30g 酒精(95%)於 4°C 靜置 12 小時後以 vortex 振盪 30 分鐘，經離心(10000 rpm)30 分鐘後取上清液即為酒精萃取液。上述二種萃取液分別進行 DPPH 自由基清除能力試驗。而上述水相萃取液再經冷凍乾燥處理；酒精萃取液經減壓濃縮及冷凍乾燥處理所得之萃取物則使用於體內(*in vivo*)測試。

2.2 DPPH (1,2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl)抗氧化能力評估試驗:

我們依據鄭(2000)描述的方法加以修飾而來，將 DPPH 以乙醇配製成 240 μ M 的反應液，等其完全溶解後，放置於冰中 30 分鐘，並以鋁薄紙包覆避光，助其穩定。當測試成份具有自由機清除能力時，與 DPPH 反應液混合 30 分鐘後，吸光值會明顯的下降。而評估測試成分清除自由基能力的指標是 30 分鐘內使 550nm 吸光值降低之百分比為其清除率。我們樣本 5 μ L 與 240 μ M 的 DPPH 反應液 1000 μ L 混合，靜待 30 分鐘後，取反應液 200 μ L 至 96-well 中以 ELISA reader 測其 550nm 吸光值，吸光值降低之百分比則為其清除率。

2.3 受測對象之選擇及前額皮膚的貼布剝屑處理

本方法係根據 Wang 等人(2010)描述加以修飾，選擇無任何皮膚病史及無使用化妝保養品習慣之三位年齡介於 20-50 歲之男性，實驗施行之季節為春季(平均溫度為 25 \pm 5 $^{\circ}$ C)，實驗期間為期 4 週，我們將以常暴露外在環境的前額皮膚角質層為測試標的，先將前額皮膚以鼻樑為中線劃分為兩邊，每日早、晚以實驗組及空白組之乳霜狀數劑各塗抹於前額兩邊，塗抹劑量約 0.5mL 且兩邊須一致。為了取樣時避免被皮脂所污染，每一邊的前額皮膚先以酒精擦拭清潔且第一層貼布樣本丟棄，取第 2-3 層的貼布樣本並收集於離心管中。為了儘量避免取樣誤差，前額皮膚靠近鼻樑中線區域寬約 2 公分不採集樣本。

2.4 實驗組及空白組數劑之製備

我們以 Glycerol stearate、Stearic acid 及 stearyl alcohol 為油相的主基劑及乳化助劑；低刺激性的 Tween-20 為乳化劑；Xanthan gum 為增稠劑；EDTA 為金屬螯合劑；Dimethicone 及 Cyclomethicone 為助滑劑；而 Phenva 為抑菌劑；另加入保濕劑成份；實驗組則分別加入 0.5%(w/w)冷凍乾燥紅藜種子水相萃取物及含 0.5%(w/w)經減壓濃縮及冷凍乾燥之紅藜種子酒精萃取物配方。pH 值標定為 6.5 (以 triethanolamine, NaOH 標定)。詳細的配方如表一。

表一：體內(in vivo)試驗之實驗組及空白組的試驗配方

| | | | |
|----------------------------------|--------|----------------------------|-------------|
| (A)油相： | | (B)水相： | |
| 1. Glycerol stearate | 1.2 % | 9. Deionized water (80.05) | 79.55 % |
| 2. Stearyl alcohol | 0.8 % | 10. Propylene glycol | 2.0 % |
| 3. Stearic acid | 0.4 % | 11. Glycerol | 2.0 % |
| 4. PEG-40 Hydrogenate castor oil | 0.5 % | 12. Sodium PCA | 1.0 % |
| 5. Capric triglycerides | 1.6 % | 13. Xanthan gum | 0.4 % |
| 6. Tween 20 | 0.5 % | 14. EDTA | 0.1 % |
| 7. Dimethicone | 0.5 % | (C)抑菌劑： | |
| 8. Cyclomethicone | 0.75 % | 15. ethanol(95%) | 8.0 % |
| | | 16. Phenova | 0.2 % |
| | | (D)萃取液： | |
| | | 17.紅藜種子水相或酒精萃取濃縮物 | (0.0) 0.5 % |

註：表中()係指空白組所添加之比例。單位：% (w/w)

分別將油相及水相加熱至 80 $^{\circ}$ C，混合後快速攪拌 (6000rpm)，自然降

溫至 45°C 並標定 pH 值為 6.5；降溫至 42°C 調更慢速 (4000rpm) 並加入抑菌劑，混合均勻後靜置至室溫，再加入萃取物。最後以離心機調速 5000 rpm 離心 10 分鐘將氣泡去除即為成品。

2.5 皮膚角質層蛋白質的分離

依據 Wang 等人(2010)所建構的方法，我們將其若干步驟及材料加以修飾及替換，我們使用一般透明膠帶，取適當寬度及長度平整緊貼於前額特定位置的皮膚上並進行連續剝屑二層，取下貼布時須施以適當的力道及相同的磨擦力，取下的貼布置於離心管中，收集足量後以溶離緩衝液(2 % SDS/0.5 mM Tris, pH7.0/ 10 % glycerol/ 5 % β -mercaptoethanol)覆蓋在貼布上，靜置 12 小時，經離心(3000 rpm)後收集上清液，隨後進行蛋白質定量，並冰凍於-80°C 以備用。

2.6 蛋白質羰基的偵測

蛋白質羰基可視為蛋白質氧化的指標，亦可被偵測係依據 Levine 等人(1994)及 Shacter 等人(1994)所描述的方法，即前述經 6M 尿素樣本溶液回溶之蛋白質樣本取 10 μ L 體積先與 5 μ L 含有 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)的溶液(6 % SDS/ 5 mM DNPH/ 5 % trifluoroacetic acid)於室溫下混合反應 15 分鐘，預計可將蛋白質羰基衍生成 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone)。隨後將反應溶液加入 15 μ L 之中和液(2 M Tris base/ 30 % glycerol)，隨後將中和的反應溶液進行 12.5 % 的 SDS-PAGE 蛋白質迷你電泳，將相同條件的電泳膠片之其中一片進行 CBR(Coomassie Brilliant Blue R-250)蛋白質染色，另一片進行西方點墨法(western blotting)免疫分析(參考 Thiele 等人(1999a)作法)，其步驟如下：將 12.5 % 的 SDS-PAGE 電泳膠片之蛋白質轉印至 PVDF(polyvinylidene difluoride)上，經明膠溶液(0.25 % gelatin/0.15M NaCl/5mM EDTA/0.05 % Tween20/50mM Tris base, pH8.0)覆蓋，隨後使用 mouse 的 anti-DNP 的一次抗體(稀釋比例為 1 : 300)結合抗原，再利用 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)的二次抗體(稀釋比例為 1 : 5000)結合一次抗體，最後進行冷光呈色反應(使用 PIERCE SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate)，並利用分子顯像儀 (機型:BIO-RAD ChemiDoc XRS)進行色帶的定量分析。

三、結果與討論

由體外試驗的 DPPH 清除率的結果顯示紅藜種子水溶液萃取物(1.5mg/mL)及酒精(95%)萃取物(1.5mg/mL)的分別為 14.7 \pm 0.02 % 及 9.5 \pm 0.02 %，水溶液萃取物的清除能力則略高於酒精萃取物，然而兩者皆遠不如 Vit C (10 μ g/mL)的 70.8 \pm 0.02% DPPH 清除率(圖 1)。

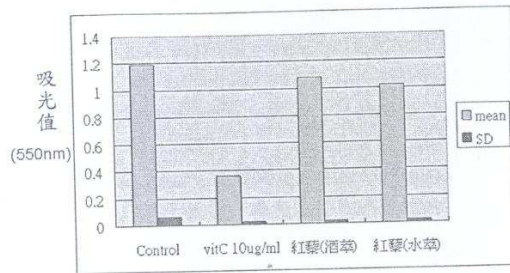


圖 1：紅藜種子水溶液萃取物(1.5mg/mL)及酒精(95%)萃取物(1.5mg/mL)與 Vit C (10 μ g/mL)的 DPPH 自由基清除率之比較

而已完成測定紅藜種子水相萃取液及酒精(95%)萃取液之臨床抗氧化效力。結果顯示不論是含 0.5% 冷凍乾燥紅藜種子水溶液萃取物或含 0.5% 經減壓濃縮及冷凍乾燥之紅藜種子酒精萃取物之試驗配方皆沒有顯著的臨床抗氧化效力(圖 2A、2B 及圖 3A、3B)。本實驗萃取步驟中酒精萃取物先經減壓濃縮去除酒精，其處理的時間較長約 10 小時，該步驟可能對於氧化安定性較差的酚類物質失去生物活性，我們認為該步驟會大幅度減損酚類物質的生物活性。而水相萃取液因直接進行冷凍乾燥比較沒有活性減損的問題。然而由上述二項結果顯示紅藜種子的萃取物之臨床抗氧化效果並不佳，故我們認為紅藜種子的萃取物中具有臨床抗氧化效果的成份含量並不多。

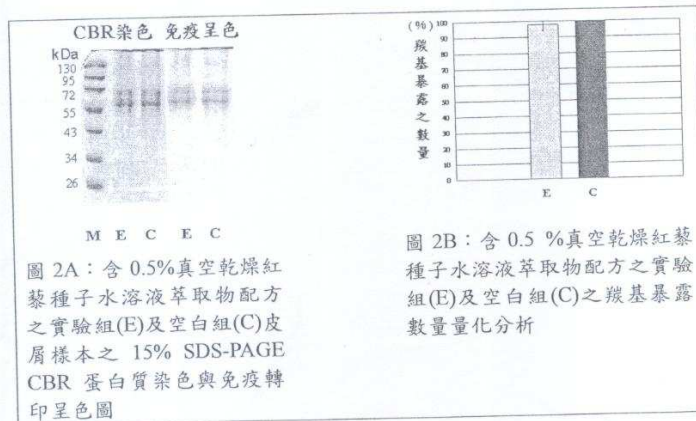
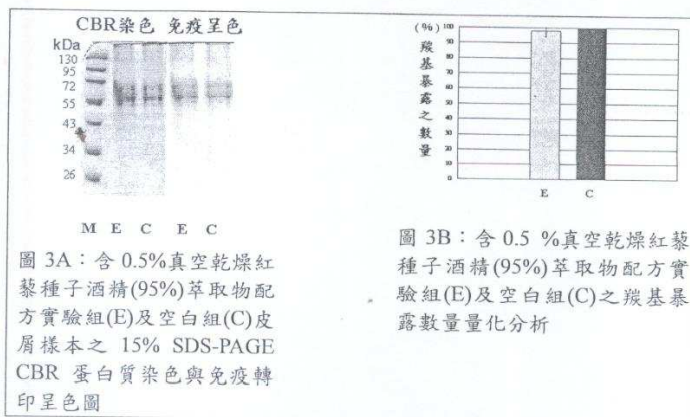


圖 2A：含 0.5% 真空乾燥紅藜種子水溶液萃取物配方之實驗組(E)及空白組(C)皮屑樣本之 15% SDS-PAGE CBR 蛋白質染色與免疫轉印呈色圖

圖 2B：含 0.5 % 真空乾燥紅藜種子水溶液萃取物配方之實驗組(E)及空白組(C)之羰基暴露數量量化分析



四、參考文獻

1. 吳佩禕(2007)。不同品種及生長季節之紅藜抗氧化活性的探討。碩士論文，屏東科技大學食品科學研究所，屏東縣。
2. 鄭智交(2000)。植物黃酮類成分之抗氧化活性探討及 Broussonchalcone A 成分抑制巨噬細胞一氧化氮生成作用之研究。博士論文，國立臺灣大學藥理學研究所，台北市。
3. Levine R L, Williams J A, Stadtman E A, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346-357
4. Sander CS, Chang H, Salzman S, Muller CSL, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118:618-625
5. Smith M A, Perry G, Richey P L, Sayre L M, Anderson V E, Beal M F, Kowall N (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382:120-121
6. Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, Sies H (1999a) Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J Invest Dermatol* 113:335-339
7. Wang Y D, Chen C C, Cheng Z J, Wu Y J, Tsai F J (2010) Construct an *in vivo* Anti-oxidation Testing Platform by an Immunoassay Technique. *The Journal of International Esthetic science.* 7(1):61-70