

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用遠紅外線開發促進美白產品吸收之面膜

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2622-B-039-001-CC3

執行期間：94年05月01日至95年04月30日

執行單位：中國醫藥大學生物科技學系

計畫主持人：吳介信

共同主持人：黃太鴻，陳語謙

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫為提升產業技術及人才培育研究計畫，不提供公開查詢

中 華 民 國 95 年 7 月 7 日

行政院國家科學委員會
補助提升產業技術及人才培育研究計畫
成果報告

計畫題目：利用遠紅外線開發促進美白產品吸收之
面膜

計畫執行單位：中國醫藥大學生物科技學系

計畫主持人：吳介信

合作廠商：臺灣新日化股份有限公司

計畫執行期間：94年5月1日起至95年4月30日

P. S. 本實驗數據為研究計畫之成果報告，僅提供公司內部及學術參考，
不做為任何商業廣告之用途。

前言

皮膚是構成身體的外圍屏障，在進化的過程中，皮膚逐漸發展出對生物各種保護功能。像角質層分隔身體內外的環境差異；保持體內的水分，防禦外來異物入侵。黑色素阻絕紫外線對身體的傷害 (1)。汗液與皮脂可以調節體溫，中和外界刺激因子。幫助皮膚維持本來具有的調節恆定作用，使皮膚持續提供正常保護功能。

皮膚的膚色與表皮黑色素相關 (1)。偏黑的皮膚，活性的黑色素量佔比較多。Tyrosinase 經氧化酵素的作用後，即形成黑色素 (2)。也就是當肌膚受到紫外線照射時，Melanin 黑色素細胞防衛肌膚，但同時使肌膚變黑或形成斑點。通常 Melanin 會隨著角質細胞角化的過程，逐漸上推至皮膚表面，隨著角質層的剝落而代謝，若 Melanin 產生過多(如紫外線的照射、生理失調……)或代謝速率太慢，就會在角質層堆積，形成斑點 (3)。

紫外線依照波長可分為 UVA、UVB、UVC 三種，隨著皮膚科學的進步，人們逐漸了解紫外線中主要有兩種波長—UVB、UVA 會落在皮膚上，其中 UVB 的波長比較短，所以會落在表皮上，經陽光照射後皮膚會出現曬紅、灼熱、水泡等的曬傷狀況，UVA 的波長較長，其會穿過表皮直接作用在真皮部分，破壞皮下真皮組織，使肌膚容易鬆弛並產生皺紋，使皮膚出現曬黑、斑點、皺紋。維生素 C 是熱門的抗氧化劑，能促進膠原蛋白合成，預防老化，減少細紋、淡化黑色素，但必須先轉換成左旋維他命 C (L-Ascorbic Acid)，才能為皮膚所運用。而左旋 C 不耐熱、光，容易接觸空氣而氧化失去效力。

將 L-Ascorbic acid 經特殊之 Liposome 處理 (Liposome 磷脂囊微脂粒：是採數層分子膜所形成之多重微脂粒)，採用最先進之技術合成 D、B、A、A 即雙球微脂囊全效左旋 C，由 Phospholipid 構成雙層中空球形結構，利用微波振盪方式將 L-Ascorbic 包覆至內球，再運用微生物學將奶蛋白酵素包覆於中間夾層。此作用機轉為，先由夾層中奶蛋白酵素瞬間將角質細胞軟化，再將脂質包覆的 L-Ascorbic acid 傳輸入表皮組織，經由實驗測試，可將 80% 的 L-Ascorbic acid 成功送達，且因脂質

包覆，左旋 C 活性高達 90%，使 L-Ascorbic acid 的功能完全的發揮 (7)。L-Ascorbic acid 經由磷脂囊微脂粒的特殊包埋，更能發揮強大的捕捉自由基功能，其對抗皮膚衰老，賦活肌膚功效倍增。未經 Liposome 處理之 L-Ascorbic 受光熱潮溼等原因易轉變成 D-Ascorbic acid，反而是製造自由基的來源。

長期暴露於以下會增加黑色素體內之 Tyrosinase (酪胺酸酶) 活化，導致黑色素的形成增加，此時 L-Ascorbic acid 會適時發揮以下功能 (8, 9)：a、阻斷酪胺酸酶的催化形成黑色素途徑，使氧化過程得以中止。b、制黑色素細胞分泌黑色素及減少黑色素形成。c、淡化已形成之黑色素 (將氧化型黑色素還原成淡色的還原型黑色素)。雖然在上述的說明中已知左旋 C 在美白的作用上具有一定的功能，但一般而言其在皮膚上的吸收效果卻有一定的限制，故在醫學美容的應用上，最有效的左旋 C 處理主要是藉超音波的導入來增加其吸收。由於遠紅外線具有促進皮下血液的循環及加強藥物的經皮吸收，所以本計畫擬探討利用遠紅外線的作用是否能增加左旋 C 的皮下吸收，藉此研究期能開發出具有遠紅外線的左旋 C 面膜，利用動物研究的數據來確認這一產品具有美白效果。

研究方法

一、遠紅外線面膜之製備：

遠紅外線之粉體是由台灣桃園華懋科技股份有限公司提供，以氧化矽氧化鋁等混合物加以 1200°C 之高溫鍛燒使其分子晶格改變，成為具有遠紅外線之粉體，其紅外線之強度約為 0.5 Watt/°K/cm²，未經鍛燒之粉體則做為不具遠紅外線之對照組。此粉體將混入不織布之纖維中再製成具遠紅外線或不具遠紅外線之面膜。

二、製作包覆左旋 C 之奈米微脂粒

以乙醇/己烷(v/v 為 1:9) 以及甲醇/氯仿的混合溶劑配製濃度 1 g/ml 的

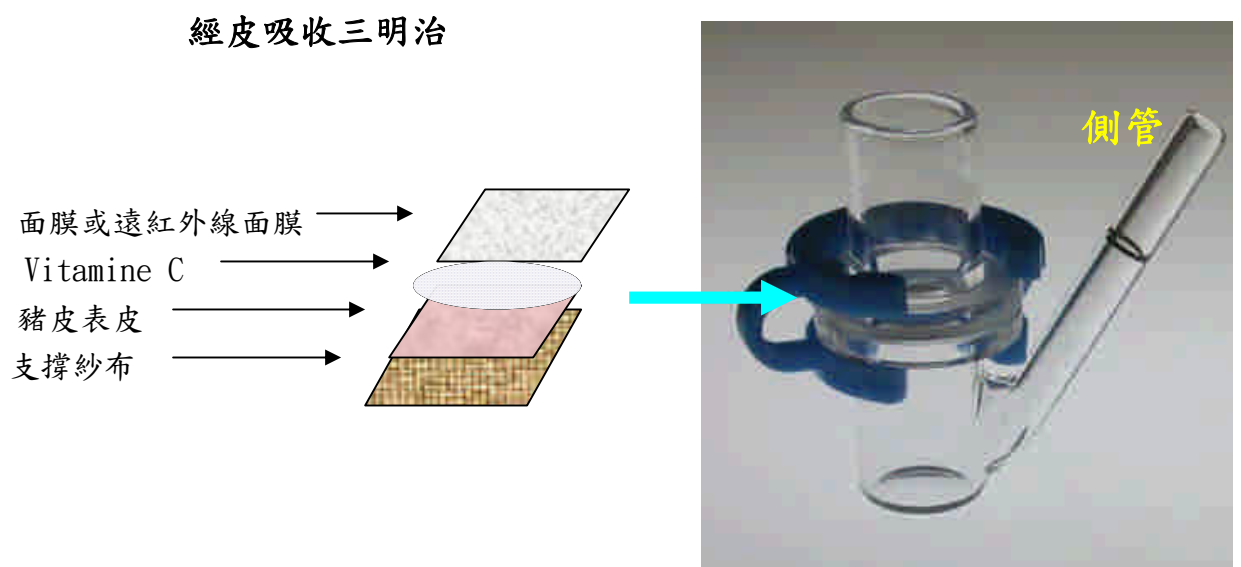
DPPC/DSPC-PEG2000、DPPC/DSPC 或 DPPC/膽固醇各組成的混合溶液，並且保存於 4°C 的環境中。實驗所使用的水均是經過 Millipore 純水製造裝置(Milli-Q plus, U. S. A.)純化的純水(比阻抗值(resistivity) 18.2 M-cm)。實驗前，先以純水清洗實驗所需的各種器具，再於超音波震盪器中震盪清洗半小時以上，然後以乙醇/己烷(v/v 為 1:9)的混合溶劑加以清洗，最後再以純水清洗，倒置晾乾。Langmuir 槽(model minitrough, KSV, Finland)先以 10%的甲醇或乙醇溶液浸漬半小時以上，再以純水清洗，然後於槽中加滿純水。實驗前先以恆溫槽控制溫度，待其達到熱平衡後，以電腦控制鐵氟龍阻隔棒(barrier)來回壓縮擴張氣液界面數次，以觀察表面壓的變化。若表面壓一直維持在零左右，則表示水面很乾淨，否則以連接抽氣幫浦的吸管吸取鐵氟龍槽水面的水，直至水面乾淨為止。將 DPPC/ DSPC-PEG2000 的混合溶液，以微量注射器散佈於鐵氟龍槽水面上不同地點，以確保溶液於水面上能完全散佈形成單分子層，然後靜置十分鐘，使溶劑得以完全揮發。藉由電腦控制阻隔棒的移動速度為 1 2/molecule/min，便可得到各組成的混合單分子層於不同分子佔據面積下的表面壓。依同樣的方法，可測得 DPPC/DSPC 或 DPPC/膽固醇混合單分子層的 p-A 等溫線。單分子層鬆弛曲線的量測，是將各組成的混合溶液散佈於鐵氟龍槽水面，待形成單分子層後，根據先前量測的 -A 等溫線的崩潰面積，先壓縮此單分子層至崩潰面積時，再固定單分子層的佔據面積，然後記錄表面壓隨時間的變化，即可得到在崩潰點時的鬆弛曲線。

關於 LB 膜的製備，是先將玻璃基板(載玻片)以清潔劑水溶液、三氯乙烯、甲醇清洗後，再以 0.09 N 氫氧化鈉溶液浸泡 15 小時，各清洗步驟後皆以純水用超音波震盪清洗乾淨，最後放置於乾淨處晾乾。隨後以動態接觸角分析儀 (model DCA-312)量測水在清洗後的玻璃基板上的動態接觸角，若所測得的動態接觸角在 50 以內，表示玻璃基板非常乾淨。在三種不同溫度下，分別製備崩潰後五分鐘、一個小時及二個小時的混合單分子層 LB 膜，並以螢光顯微鏡(model Axioskop, Carl Zeiss, Germany)觀察。螢光劑則採用 NBD-PE，並以相對於混合單分子層 0.5 mol%的量添加至混合單分子層中。

將 DPPC 與不同比例的混合物，以氯仿/甲醚=1:4 混合液融化後，放置於有細小玻璃珠的圓底瓶中，以旋轉蒸發儀緩慢蒸發抽取溶劑，可以得到 DPPC 與長碳鍊醇類的不同比例的薄膜在玻璃珠表面上，然後再以二次蒸餾純水加入圓底瓶，置入超音波震盪器，震盪一小時，取出後冷凍高速離心機離心分離出大約 50~30nm 的奈米微粒。製備完成之奈米微粒再與不同濃度之左旋 C 混合後以超音波震盪將其包覆在內。

三、評估奈米微脂粒包覆左旋 C 經皮吸收模型之建立

將新鮮之豬皮取下後，以冷凍切片機進行 60um 厚度之切片處理。以具遠紅線之面膜放於塗敷奈米微脂粒包覆左旋 C 之豬表皮切片之上，再置於紗布之支撐膜上(如圖一)，將此一三明治組合放置於 FRANZ Cell 中，FRNAZ Cell 下層之容器裝滿 PBS 溶液並有攪拌石將透析過豬皮之左旋 C 予以均質攪拌，再從側管中於不同時間點抽取定量之溶液，以 HPLC 測定左旋 C 之含量，對照組豬皮貼附不具遠紅線但含奈米微脂粒包覆左旋 C 之面膜，以同樣方法測其穿透皮膚左旋 C 之含量，以此比較遠紅外線是否能加強左旋 C 之吸收作用。



圖一、左旋 C 經皮吸收之評估模型

四、以角質細胞評估遠紅外線對左旋 C 穿透效率

人類角質細胞取自幼童之包皮，以無血清培養液(Gibco BRL life Technologies)培養於 37⁰C、5% CO²之培養箱。待長滿後加入分化液 14 天，即進行實驗。先將面膜裁成 2.5 cm 直徑大小，以測試液沾濕，置入含上皮細胞膜之 6-well insert，well 內加入 2 mL，並放入小攪拌子攪拌，反應時間分別為 0, 0.5, 1, 3, 5, 18, 24 小時，反應終了，吸取 well 之培養液，取出面膜後，以 DPBS 清洗上表皮膜 1 次，再以 2 mL 溶解液(50 mM Hepes, 250 mM sucrose, 5 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.4)溶解，離心，收取上清液分析。

五、左旋 C 之分析條件

層析時使用 Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μ m)(Cica Kanto Chemical Co. INC.) 層析管柱，以 60 mM H₃PO₄ 水溶液及氬甲烷(99.5 : 0.5) 為移動相，以等梯度沖提，注入量為 10 μ L，流速設定為 1.3 mL/min，層析 25 分鐘，利用 254 nm 紫外光檢測。由檢測所得層析峰之積分面積值來計算 ascorbic acid 含量。

六、實驗數據統計分析

採用 SAS 電腦統計套裝軟體進行變異數分析(analysis of variance，ANOVA)，並以 t- test 來測試不同處理數據間顯著差異效果 (P<0.05)。

結果與討論

本計畫的主要目標在於探討具有遠紅外線作用的面膜是否能促進左旋 C 的吸收效果，以期能以科學化的數據支持此一產品的市場開發性。計畫初期以大鼠之背部皮膚為測試標的，剃毛後以 3 平方公分之遠紅外線面膜覆蓋 10%左旋 C 的 PBS 溶液，在 30 分鐘、1 小時及 2 小時後取其表皮進行均質粹取左旋 C。然而皮內左旋 C 濃度相當低，且實驗數據相當不穩定，這可能老鼠皮膚與人類皮膚有所差異，故實驗動物改採與人類皮膚較近的豬做為動物模型來評估遠紅外線對左旋 C 的促吸收作用。本實驗同樣以 3 平方公分之遠紅外線面膜覆蓋 10%左旋 C 的 PBS 溶液，在 30 分鐘、1 小時及 2 小時後取其表皮進行均質粹取左旋 C，然而實驗結果依舊顯示左旋 C 濃度相當低，所以藉由動物活體模型進行左旋 C 的促吸收作用評估可能不是非常妥當，於是本計畫再次修正實驗設計，同樣以豬皮為研究材料，但以冷凍切片的方式將豬皮之表皮層切出厚約 60 微米的薄膜，放置於 Franz cell 的裝置中(如圖一所示)，上層放置遠紅外線面膜覆蓋之 10%左旋 C 的 PBS 溶液，在一定的時間取下層液體的標本進行 HPLC 的分析以確定穿透豬皮的左旋 C 的含量。實驗結果顯示左旋 C 可輕易通過這層表皮薄膜，所以可利用這一體外實驗的模型測試遠紅外線對左旋 C 經皮的促吸收作用。

Fig 1、2、3 表示具有遠紅外線面膜與不具遠紅外線面膜促進左旋 C 吸收比較的三次獨立實驗數據，實驗結果顯示有遠紅外線作用的左旋 C 穿透表皮層的效果在 60 分鐘及 120 分鐘均遠高於不具遠紅外線作用的對照組。Fig 4 彙集此三次實驗之結果，將有遠紅外線作用的左旋 C 穿透量比上無遠紅外線作用的左旋 C 穿透量再進行差異分

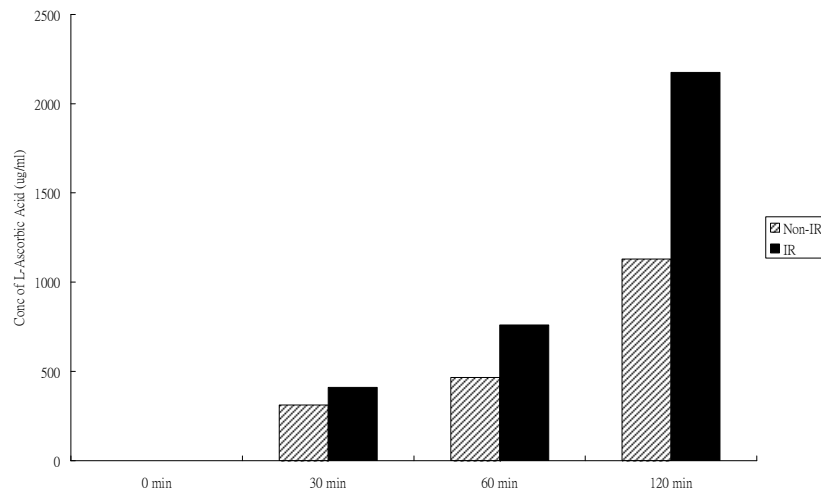
析，這些差異經三次實驗的統計分析後發現遠紅外線作用 60 分鐘及 120 分鐘後對促進左旋 C 穿透吸收方面有統計學上的意義。

本計畫亦探討有微脂粒包覆的左旋 C 在遠紅外線的作用下是否會有所影響。實驗的設計是以微脂粒包覆 10% 的左旋 C，再以具有遠紅外線面膜與不具遠紅外線面膜作用後來評估其促進左旋 C 穿透吸收的作用。Fig 5、6、7 表示具有遠紅外線面膜與不具遠紅外線面膜促進有微脂粒包覆的左旋 C 吸收比較的三次獨立實驗數據，實驗結果顯示有遠紅外線作用的左旋 C 穿透表皮層的效果雖然在 30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘均高於不具遠紅外線作用的對照組，但以 30 分鐘時的遠紅外線作用最為明顯。Fig 8 彙集此三次實驗之結果，將有遠紅外線作用的左旋 C 穿透量比上無遠紅外線作用的左旋 C 穿透量再進行差異分析，這些差異經三次實驗的統計分析後發現遠紅外線作用 30 分鐘後對促進左旋 C 穿透吸收方面有統計學上的意義。基於這些數據的分析與整理後，發現左旋 C 的吸收確實能受到遠紅外線的作用而增加，但當加上微脂粒的包覆後，左旋 C 的吸收時間可以從原本的 60 分鐘縮短為 30 分鐘，綜合實驗的結果顯示，微脂粒的包覆加上遠紅外線的輔助，確實可以促進左旋 C 的經皮穿透吸收。此外，本計畫另外以人類幼童之包皮角質細胞培養來評估遠紅外線對於左旋 C 的促吸收作用，Fig 9 顯示有微脂粒包覆的左旋 C 在遠紅外線的作用下，30 分鐘開始其角質細胞穿透作用即高於無遠紅外線作用的對照組，於 1 小時作用下達最高效率。這一實驗結果與豬皮穿透實驗相互支持，亦即遠紅外線對於微脂粒包覆的左旋 C 的促吸收作用高於無遠紅外線或微脂粒包覆的左旋 C 吸收作用。

結論

本計畫的成果報告就遠紅外線對於左旋 C 的吸收作用進行評估，經由豬皮與角質細胞的穿透實驗顯示，遠紅外線配合微脂粒包覆的左旋 C 的所產生的促進吸收作用，不僅在時間上的縮短或是吸收效率的提升，均優於無遠紅外線或無微脂粒包覆的左旋 C 吸收作用。

A



B

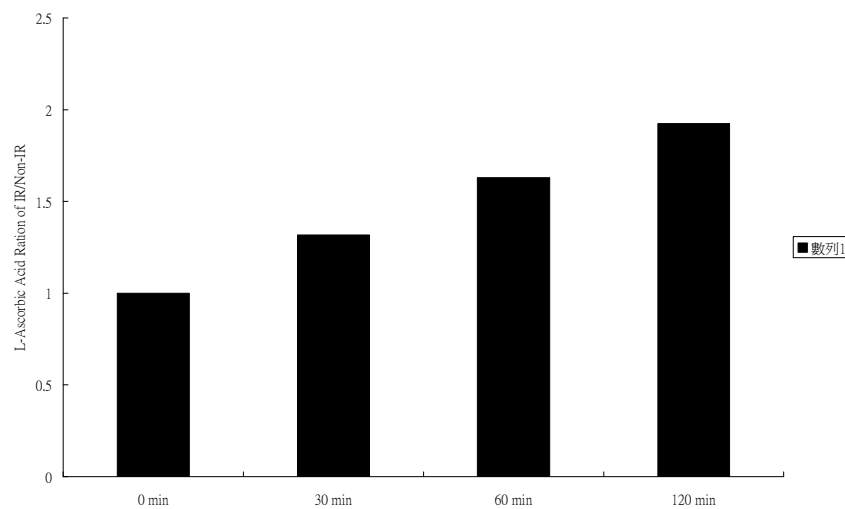
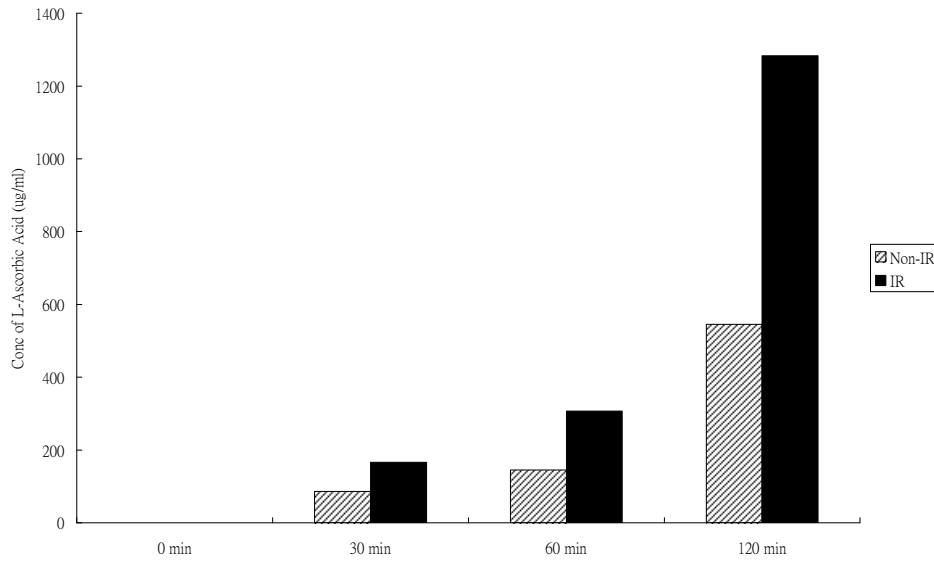


Fig 1、Raw data of the 1st experiment testing the enhancing effects of far infrared on L-ascorbic acid absorption. **Panel A:** The stimulatory effects of far infrared (IR) on L-ascorbic acid absorption at various time points as compared to the control group without far infrared (Non-IR). **Panel B:** The ratio of L-ascorbic acid absorption between IR and Non-IR at various time points.

A



B

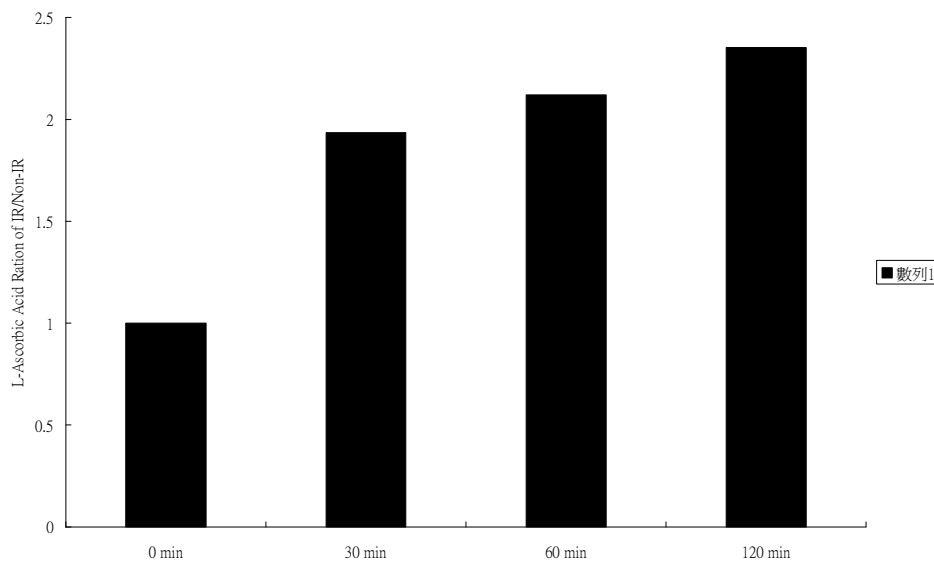
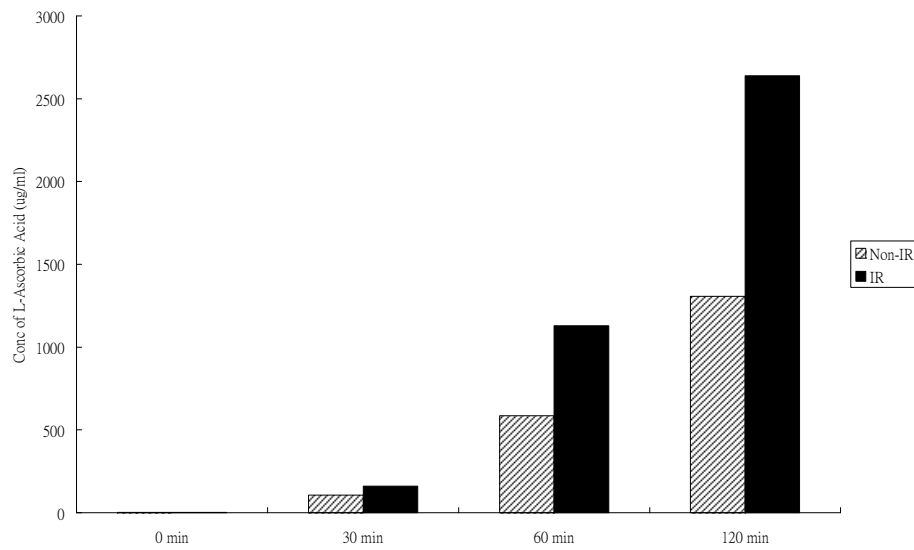


Fig 2 、 Raw data of the 2nd experiment testing the enhancing effects of far infrared on L-ascorbic acid absorption. Panel A: The stimulatory effects of far infrared (IR) on L-ascorbic acid absorption at various time points as compared to the control group without far infrared (Non-IR). Panel B: The ratio of L-ascorbic acid absorption between IR and Non-IR at various time points.

A



B

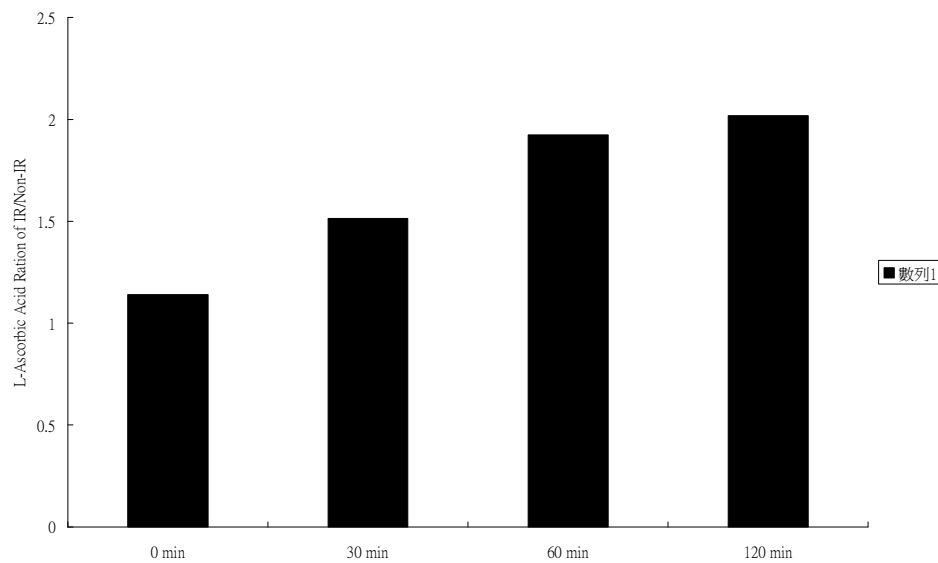


Fig 3 、 Raw data of the 3rd experiment testing the enhancing effects of far infrared on L-ascorbic acid absorption. Panel A: The stimulatory effects of far infrared (IR) on L-ascorbic acid absorption at various time points as compared to the control group without far infrared (Non-IR). Panel B: The ratio of L-ascorbic acid absorption between IR and Non-IR at various time points.

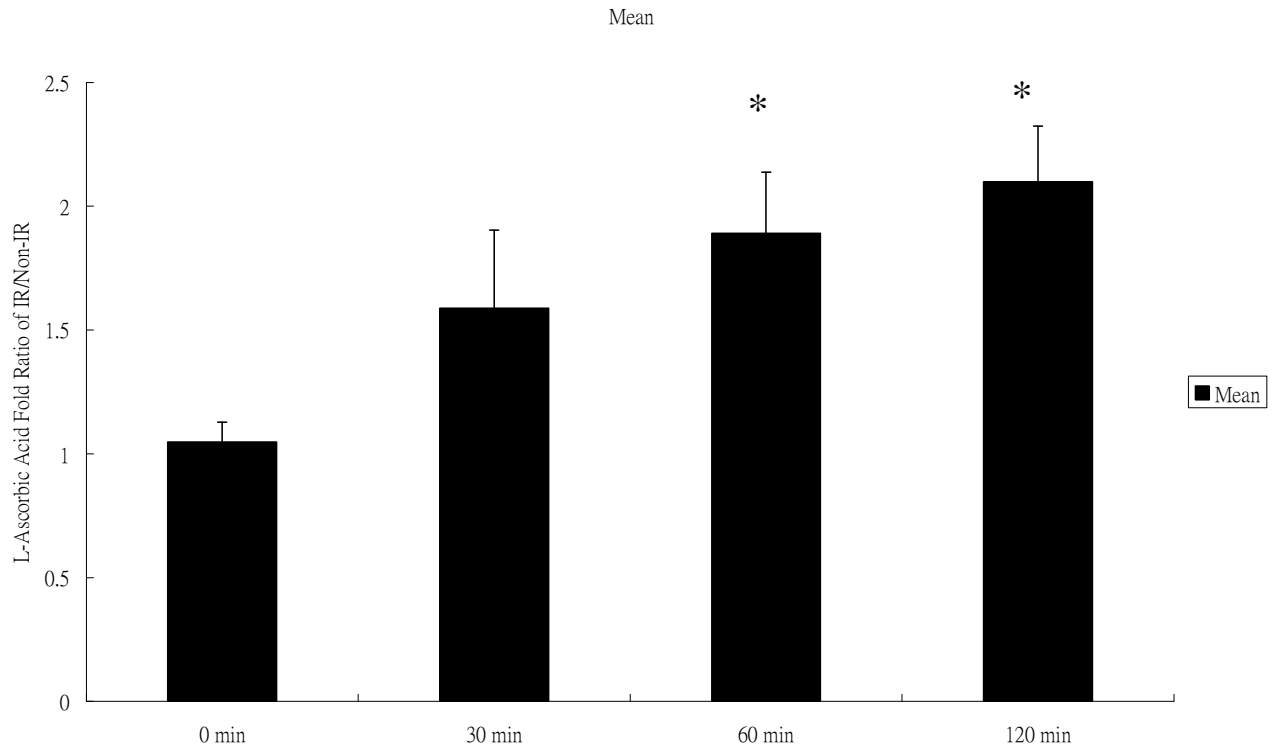
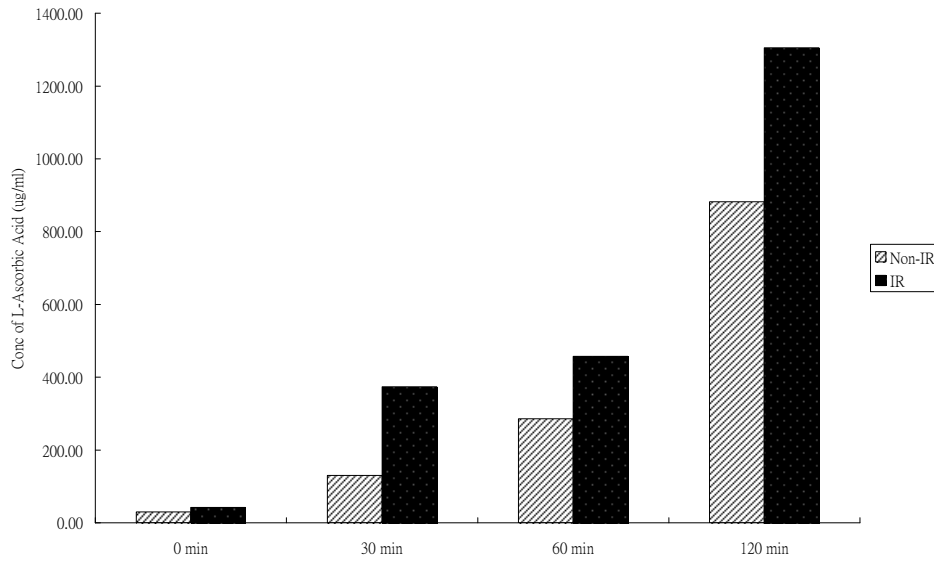


Fig 4 、 The mean value of three individual experiments in testing the fold ratio of L-ascorbic acid absorption with (IR) or without (Non-IR) the aid of far infrared. * indicates the P value < 0.05 as compared to the control group at 0 minute.

A.



B

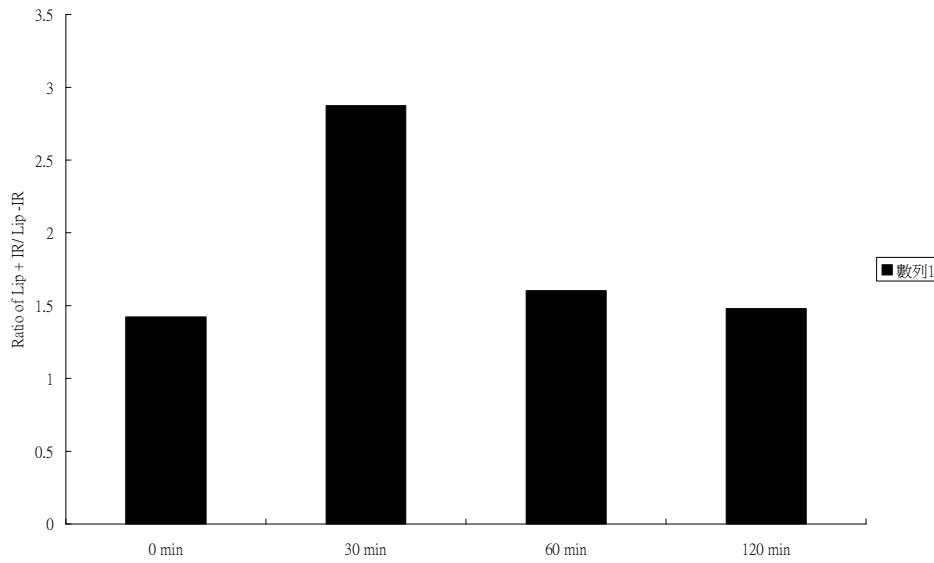
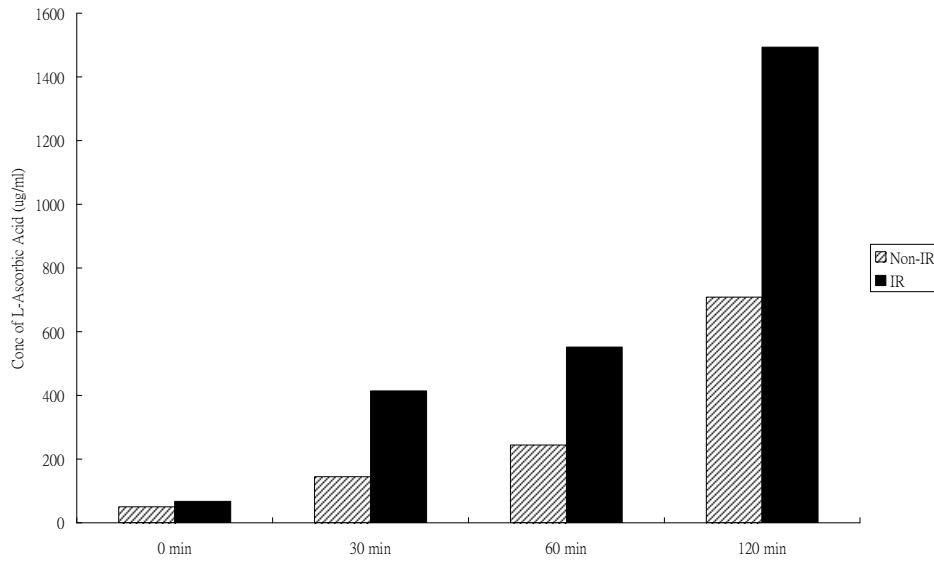


Fig 5 、 Raw data of the 1st experiment testing the enhancing effects of far infrared on liposome-mediated L-ascorbic acid absorption. Panel A: The stimulatory effects of far infrared (IR) on liposome-mediated L-ascorbic acid absorption at various time points as compared to the control group without far infrared (Non-IR). Panel B: The ratio of L-ascorbic acid absorption between IR and Non-IR at various time points.

A



B

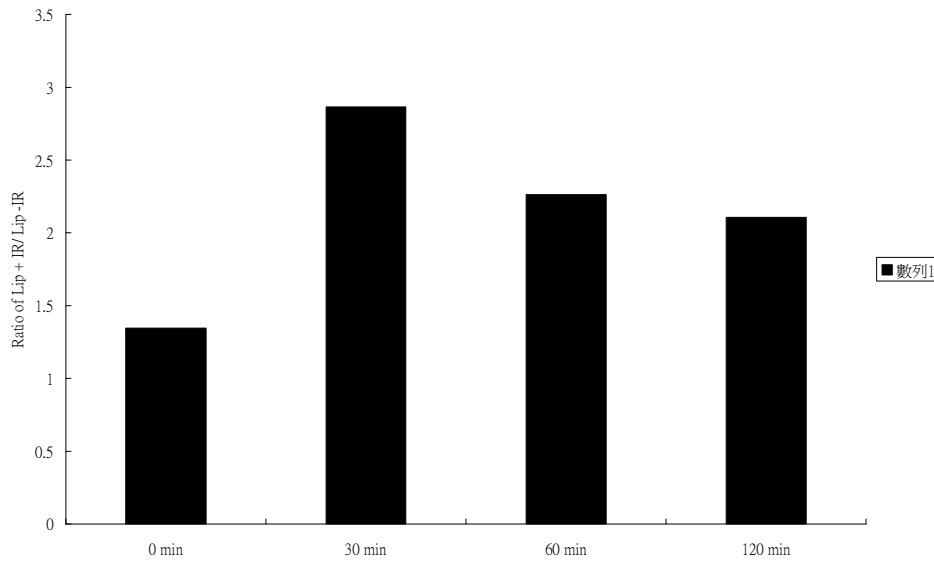
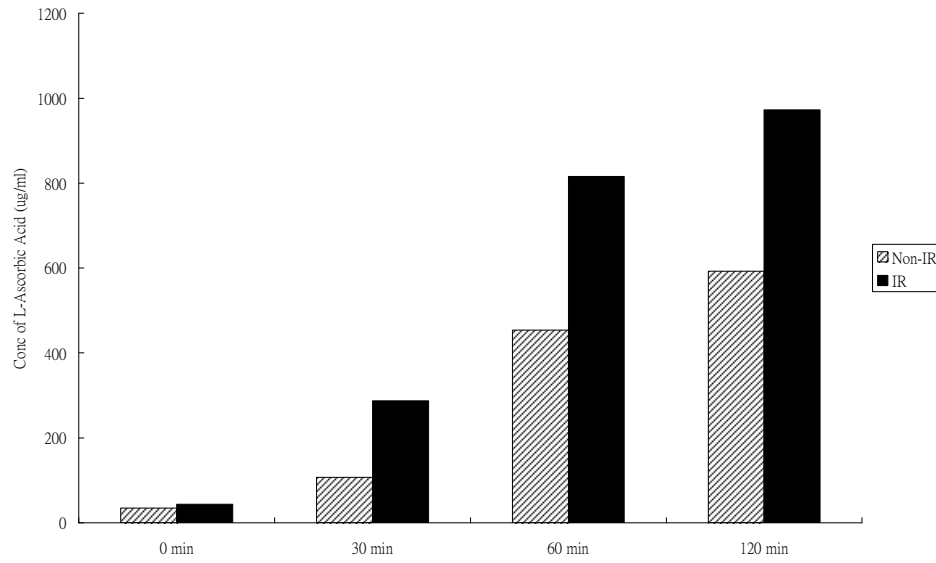


Fig 6、Raw data of the 2nd experiment testing the enhancing effects of far infrared on liposome-mediated L-ascorbic acid absorption. **Panel A:** The stimulatory effects of far infrared (IR) on liposome-mediated L-ascorbic acid absorption at various time points as compared to the control group without far infrared (Non-IR). **Panel B:** The ratio of L-ascorbic acid absorption between IR and Non-IR at various time points.

A



B

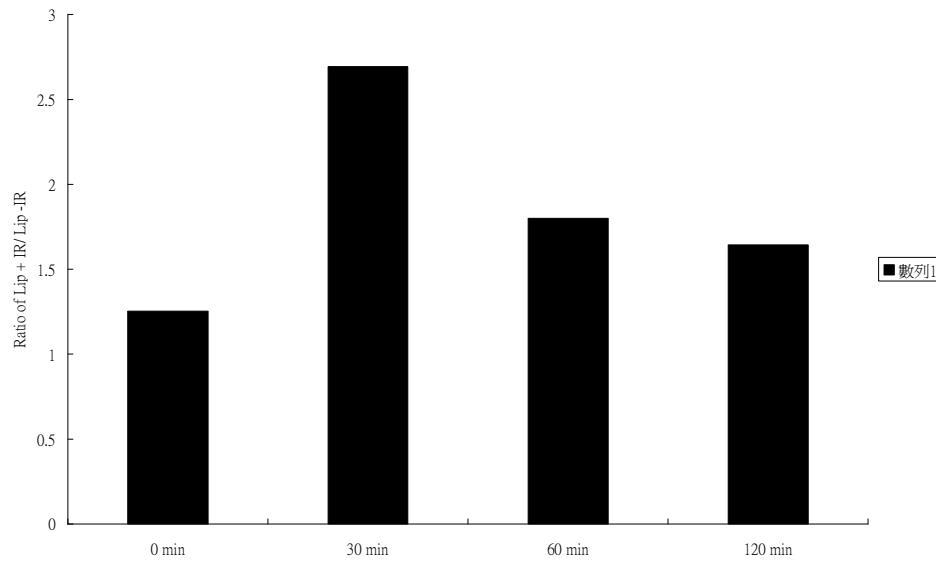


Fig 7、Raw data of the 3rd experiment testing the enhancing effects of far infrared on liposome-mediated L-ascorbic acid absorption. **Panel A:** The stimulatory effects of far infrared (IR) on liposome-mediated L-ascorbic acid absorption at various time points as compared to the control group without far infrared (Non-IR). **Panel B:** The ratio of L-ascorbic acid absorption between IR and Non-IR at various time points.

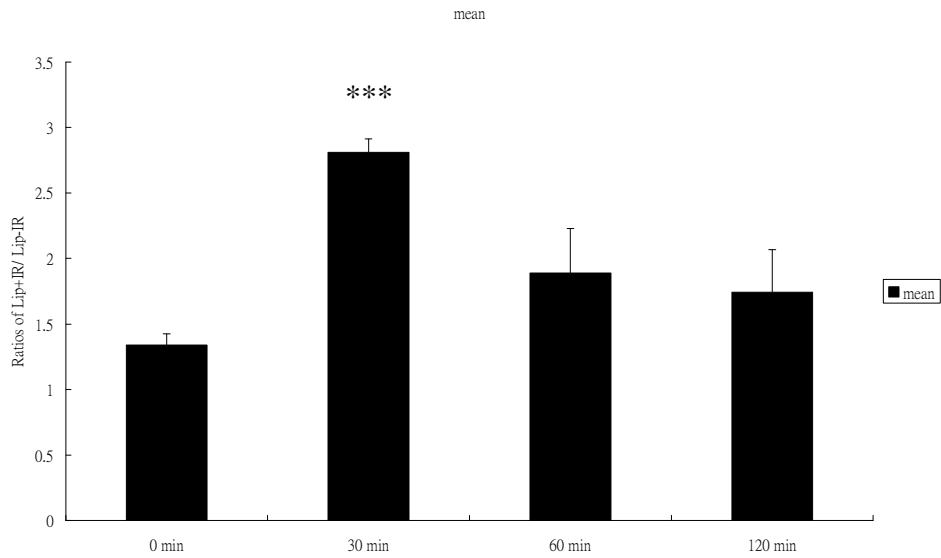


Fig 8、 The mean value of three individual experiments in testing the fold ratio of liposome-mediated L-ascorbic acid absorption with (IR) or without (Non-IR) the aid of far infrared. *** indicates the P value < 0.001 as compared to the control group at 0 minute.

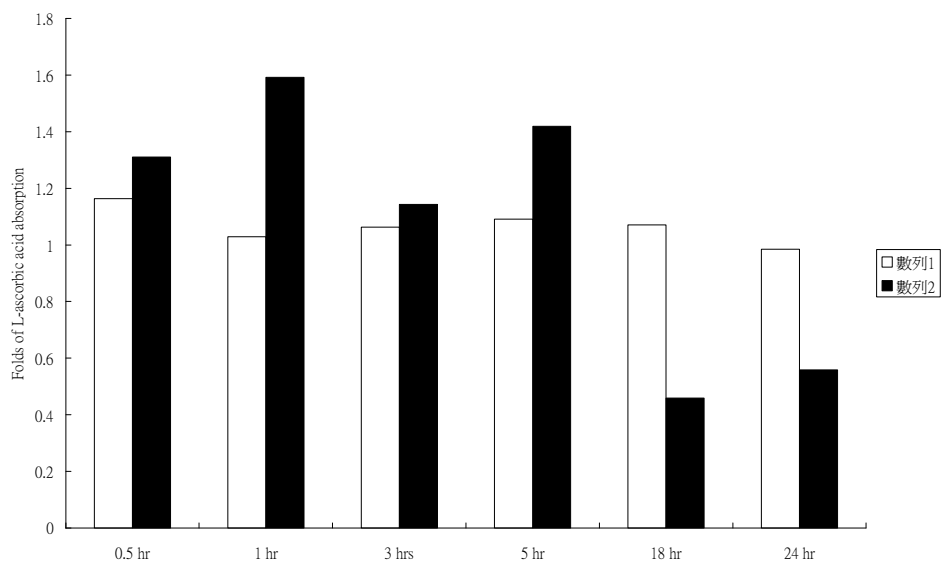


Fig 9、 The folds induction L-ascorbic acid absorption affected by far infrared and liposome. The open bar represents the folds induction of L-ascorbic acid absorption affected by far infrared as compared to the control group without far infrared emission. The closed bar represents the folds induction of liposome-mediated L-ascorbic acid absorption affected by far infrared as compared to the control group without far infrared emission.

References:

1. van Nieuwpoort F. Smit NP. Kolb R. van der Meulen H. Koerten H. Pavel S. Tyrosine-induced melanogenesis shows differences in morphologic and melanogenic preferences of melanosomes from light and dark skin types. *Journal of Investigative Dermatology*. 122(5):1251-5, 2004.
2. Ha T. Javedan H. Waterston K. Naysmith L. Rees JL. The relationship between constitutive pigmentation and sensitivity to ultraviolet radiation induced erythema is dose-dependent. [Journal Article] *Pigment Cell Research*. 16(5):477-9, 2003.
3. Wulf HC. Sandby-Moller J. Kobayasi T. Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. Review. Review, Tutorial] *Micron*. 35(3):185-91, 2004.
7. Sturm RA. Box NF. Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays*. 20(9):712-21, 1998
8. Park HY. Gilchrest BA. Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cellular & Molecular Biology*. 45(7):919-30, 1999
9. Curto EV. Kwong C. Hermersdorfer H. Glatt H. Santis C. Virador V. Hearing VJ Jr. Dooley TP. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. [Journal Article] *Biochemical Pharmacology*. 57(6):663-72, 1999.
10. Lamberg L. "Treatment" cosmetics: hype or help?. *JAMA*. 279(20):1595-6, 1998
11. Lupo MP. Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clinics in Dermatology*. 19(4):467-73, 2001.
13. Vitamins and oral contraceptive use. *Lancet*. 1(7906):561-4, 1975.
14. The effects of vitamine C on lipid metabolism. *South African Medical Journal*. 49(40):1651-4, 1975.
15. PAK2 is cleaved and activated during hyperosmotic shock-induced apoptosis via a caspase-dependent mechanism: evidence for the involvement of oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*. 178(3):397-408, 1999.

16. Udagawa Y. Nagasawa H. (2000) "Effects of far-infrared ray on reproduction, growth, behaviour and some physiological parameters in mice." *In Vivo*. 14(2):321-6.
17. Toyokawa H. Matsui Y. Uhara J. Tsuchiya H. Teshima S. Nakanishi H. Kwon AH. Azuma Y. Nagaoka T. Ogawa T. Kamiyama Y. (2003) "Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats." *Experimental Biology & Medicine*. 228(6):724-9.
18. Imamura M. Biro S. Kihara T. Yoshifuku S. Takasaki K. Otsuji Y. Minagoe S. Toyama Y. Tei C. (2001) "Repeated thermal therapy improves impaired vascular endothelial function in patients with coronary risk factors." *J. Amer. Coll. Cardiol*. 38(4):1083-8.
19. Ikeda Y. Biro S. Kamogawa Y. Yoshifuku S. Eto H. Orihara K. Kihara T. Tei C. (2001) "Repeated thermal therapy upregulates arterial endothelial nitric oxide synthase expression in Syrian golden hamsters." *Jap. Circul. J.* 65(5):434-8
20. Nagasawa H. Udagawa Y. Kiyokawa S. (1999) "Evidence that irradiation of far-infrared rays inhibits mammary tumour growth in SHN mice." *Anticancer Research*. 19(3A):1797-800.