

產學合作案結案報告書

華生技 104 產學字 001 號

化妝品原料肉桂酸的合成技術

甲方：德兆科技有限公司

乙方：中華學校財團法人中華科技大學

生物科技系

計劃主持人：饒文娟

化妝品原料肉桂酸的合成技術

饒文娟

中華科技大學生物科技系

摘要

肉桂酸(Cinnamic acid)是一種羧酸類香料，可以應用於日用化妝品中，因為具有抑制酪氨酸酶的作用，可以應用於高級防曬霜中，有效地阻礙紫外線和使色斑變淡；肉桂酸顯著的抗氧化功效對於減慢皺紋的出現有很好的療效。本研究利用肉桂醛為原料，在催化劑和氫氧化鈉鹼性條件下合成最終產物肉桂酸。肉桂酸其抗氧化活性以DPPH 自由基清除率能力評估，美白能力以抑制酪氨酸酶活性之能力評估。並以L929 纖維母細胞來評估此肉桂酸之細胞毒性。綜合以上結果，肉桂酸用於應用於日用化妝品上，極具有發展潛力。

關鍵詞：肉桂酸、抗氧化活性、美白能力、細胞毒性

前言與文獻回顧

肉桂酸(Cinnamic acid)化學名 3-苯基-2-丙烯酸，又名桂皮酸，是一種天然提取物，安全無毒，呈白色單斜結晶，微有桂皮氣味微溶於水。易溶於苯、丙酮、冰醋酸、溶於乙醇、甲醇和氯仿中。通常作為配香原料，可使主香料的香氣更加清香逸發。

肉桂酸在食品、化妝品及醫藥製品中等行業中應用時，一般認為是安全的。但觸及皮膚時，皮膚有輕微的過敏反應。肉桂酸毒性不大，在國外有人用大鼠和兔子做過毒性測試，實驗設計如下：大鼠和兔子攝入一定的量，經過一段時間的觀察，均無中毒現象。由此可以得出結論：肉桂酸毒性不大。

肉桂酸是一種羧酸類香料，可以應用於日用化妝品中，因為具有抑制酪氨酸酶的作用，可以應用於高級防曬霜中，有效地阻礙紫外線和使色斑變淡；肉桂

酸顯著的抗氧化功效對於減慢皺紋的出現有很好的療效。其衍生物在精細化工產品中有著很大的作用，如肉桂酸正丙酯具有桃杏和酒樣的香味，在食品、煙草、化妝品、肥皂等的調香劑中長久以來得到了廣泛的應用，是一種很有市場價值而且需要進一步開發的香料；龍涎香的主要原料便是肉桂酸苜酯；肉桂酸異丁酯主要用於食物香精的配置中(Karboune et al., 2005；Martin et al., 2005)。

肉桂酸之所以具有防腐功能是因為一些殺菌物質存在于天然植物中，這些殺菌物質一般為疏水物質，能使細胞膜功能紊亂甚至使細胞膜破裂，最終導致微生物死亡，所以常用於糧食、蔬菜、水果的保鮮和防腐。肉桂酸本身具有很強的興奮作用，經研究可直接添加於一切食品添加劑中(Sun et al., 2007；Shi et al., 2005；Constantin et al., 2003)。

本實驗利用肉桂醛(Cinnamaldehyde)為原料在催化劑及氫氧化鈉的鹼性條件下合成肉桂酸。探討肉桂酸其抗氧化化活性以DPPH 自由基清除率之能力評估，美白能力以抑制酪胺酸酶活性之能力評估。並以評估其細胞毒性。利用實驗結果設計出肉桂酸用於應用於日用化妝品上。

材料及方法

1. 實驗設備

- 可見光/UV 分光光度計(Ultraviolet spectrometer, Genesys 10, Thermo Electron Corp., USA)。
- 精密天秤(BL-210S)Sartorius，Sweden。
- 超純水製造機，Smart Simplicity Millipore，USA。
- 倒立式顯微鏡(CK30)，Olympus，Tokyo Japan。
- 二氧化碳培養箱 (NV-5500)，Nuair。
- 高溫高壓滅菌釜(TM-321D，Tomin)。
- 酵素免疫分析儀 (ELISA Reader16039400)，Tecan Sunrise。

2. 實驗材料

- 肉桂醛(Cinnamaldehyde)，Sigma USA。
- 乙醇(ethanol)，Acros USA。
- 甲醇 (methanol)，Acros USA。

- 冰醋酸(acetic Acid)，島田化學研究所。
- 2,2-二苯基-1-苦肼基(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)，Sigma USA。
- 酪胺酸酶(mushroomtyrosinase)，Sigma USA。
- L-dopa，Sigma USA。
- 纖維母細胞培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, DMEM)，Gibco USA。
- 細胞脫附劑(Trypsin-EDTA)，Gibco。
- 細胞染色劑(Trypan Blue)，BioWest。
- L929 小鼠纖維母細胞(L929 mouse fibroblasts)，食品工業研究所。
- 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)，Terom USA。
- 胰蛋白酶(Trypsin blue tetrazolium bromide)，Sigma USA。
- 二甲基亞砜(Dimethylsulfoxide, DMSO, $\geq 99.5\%$)，Sigma USA。
- 細胞染色劑錐蟲藍(Trypan blue)，Sigma USA。
- 噻唑藍 [3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) Sigma USA。
- 五倍子酸(Gallic acid)，Sigma USA。
- 磷鉬酸化複合物(Folin-Ciocalteu's 試劑)，Sigma USA。
- 碳酸鈉(Sodium carbonate)，Acros USA。

3. 實驗方法

(1) 肉桂酸的製取方法

1. 催化劑的製取實驗方法稱量3 g的硝酸銀固體，加入27 g的蒸餾水，攪拌配成10 % 的硝酸銀溶液 30 g。取15 g 10 %的硝酸銀溶液於500 mL的大燒杯中，在攪拌下慢慢加入活性炭 5 g，水250 mL，甲醛 (37 % - 40%) 13 g，室溫下(25°C)攪拌下加入50 %的氫氧化鈉 20 g。滴加入完畢下繼續攪拌3 小時，然後趁熱過濾可以得到銀灰色粉末，濾液用鹽酸滴定，若無混濁現象出現，可以確定濾液中無銀離子存在。粉末經清洗，乾燥後得到Ag/C催化劑。
2. 肉桂酸的合成在250 mL的三角燒瓶中加入250 mL的蒸餾水，攪拌條件下，加入Ag/C催化劑，然後慢慢滴加50 %的氫氧化鈉 15 g。溶液立刻變為黑色，在40 °C下通入氧氣，慢慢滴加肉桂醛，控制好溫度，

滴加完畢後，繼續反應一段時間，到最後燒瓶裡的顏色變為紅棕色。然後趁熱過濾，將濾餅催化劑煮沸，直到催化劑全部漂上來，過濾即可恢復催化劑的活性。然後將濾液用乙酸乙酯萃取，取其澄清液用鹽酸調節PH值為1.2，放置一段時間，析出晶體。洗滌乾燥產物，測定肉桂酸熔點為133°C-135°C。

(2) DPPH 自由基清除能力測定:

2,2-二苯基-1-苦肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)是一種較穩定的自由基，DPPH自由基清除能力測試是在測試一個樣品是否具有抗氧化性的一種簡單篩選試驗。DPPH當其加入於甲醇或乙醇當中會呈現藍紫色，所以加入的成分樣品可以和DPPH自由基直接反應，會阻斷DPPH自由基的連鎖反應，此時DPPH溶液顏色會由藍紫色轉變成澄清的黃色，這個時候就表示加入的成分樣品具有捕捉DPPH自由基的能力，而所顯示出的藍紫色越淡，表示清除自由基的能力越強。

DPPH的甲醇溶液在 517 nm下會有最強吸收值，但被抗氧化劑或自由基(R•)還原時，則吸收值會降低或是消失，故可以使用可見光/UV分光光度計，藉由測定517 nm的吸光值來判斷樣品抗氧化能力之強弱(Blois, 1958)。吸光值越大表示越少的DPPH與自由基結合。

秤取0.001g肉桂酸加入 2 mL甲醇，再加入1 mL 的100 μM DPPH甲醇溶液混合均勻後避光靜置半小時，再將此溶液以可見光/UV分光光度計以波長517 nm為標準測定其吸光值。

$$\text{DPPH 自由基抑制率(\%)} = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100\%$$

B: 含有待測物之樣品於517 nm 吸光值。

A: 不含待測物之對照組於517 nm 吸光值。

(2) 酪胺酸酶活性測試:

參考Tomita等人的方法(Tomita et al., 1990)並經過修飾調整為：以67 mM potassium buffer (pH 6.8) 緩衝溶液配置5 mM L-dopa 溶液，將0.001g肉桂酸溶於 2 mL蒸餾水加入50 μL之 200 U/mL mushroom tyrosinase 溶液再加入150 μL L-dopa 溶液。上述肉桂酸試樣混和溶液，在25°C下放置30分鐘，使用分光光度計於490 nm下測吸光值。並依以下公式計算肉桂酸對tyrosinase

的抑制百分率：

$$\text{酪胺酸酶抑活性制率(\%)} = \left(\frac{B - A}{A} \right) \times 100\%$$

B：測試組試劑於490 nm 吸光值。

A：控制組試劑於490 nm 吸光值。

(4) 細胞毒性測試

在細胞毒性實驗上，使用ISO10993-5的方式來評估材料的毒性。這是一種利用材料的萃取液來培養細胞，觀察細胞的型態、增生以判斷材料是否具有毒性的方法。各秤取 0.001 g 肉桂酸加入 2 mL 纖維母細胞培養液 (DMEM) 中，先以UV光照射滅菌24小時後，放入培養箱中於37°C下，培養24小時。試劑對照組：直接利用已配好之纖維母細胞培養基放在六孔盤中進行細胞培養，以DMEM + 10% FBS + 5% DMSO (Dimethylsulfoxide)當作陽性對照組、DMEM + 10% FBS 培養液作為陰性對照組，以及肉桂酸為試驗組。將100 µL 細胞懸浮液（濃度為 8×10^4 cells/mL）的角膜纖維母細胞懸浮液，加到六孔盤中，再加入 900 µL 纖維母細胞培養基補足1 mL，放到培養箱中於 37°C、5% CO₂ 下培養24小時，使細胞成長為單層的細胞層。吸去培養基，每孔滴入各組萃取物 500 µL，於 37°C、5% CO₂ 下培養3天。觀察紀錄細胞型態及生長情形，並以試劑組作為依據，評分等級。

結果與討論

1. 自由基清除能力測定

DPPH 是一種較穩定的自由基，而 DPPH 自由基的甲醇溶液在波長 517nm 下有最強吸收值，當 DPPH 自由基與抗氧化物質作用後，抗氧化物質提供氫質子而清除自由基之能力，因而自由基就會失去本身藍紫色的特性而造成吸光值的下降，反應機制為



因此藉由測定 517 nm 的吸光值可判斷樣品抗氧化能力之強弱(Blois *et al.*,1958)。表 1 顯示肉桂酸其 DPPH 清除率。由表 1 肉桂酸具有 60.1% 的 DPPH 自由基清除能力，此結果和 Suresh Kumar 等研究結果相似(Suresh Kumar *et al.*, 2013)。

表2 肉桂酸之DPPH自由基清除率

樣品	DPPH 清除率(%)
肉桂酸	60.1±5.5

2. 酪胺酸酶活性測試:

酪胺酸酶(tyrosinase)在黑色素形成過程中之速率限制步驟擔任催化作用，是黑色素形成最關鍵的一種酵素，所以如果可有效抑制酪胺酸酶活性，將可減少黑色素的生成，達到美白作用的目的。以往進行美白功效之試驗時，最常使用蕈菇類之酪胺酸酶(mushroom tyrosinase)進行酵素活性評估，以酪胺酸(tyrosine)或左旋多巴(L-Dopa)作為酵素之受質，當酵素催化受質形成產物生成量減少時，可以初步判定測試樣品可能具備美白活性。

因此藉由測定 490 nm 下測吸光值，可判斷肉桂酸對酪胺酸酶的抑制百分率 (Tomita et al., 1990)。表 2 顯示肉桂酸其酪胺酸酶抑活性制率。由表 2 肉桂酸具有 88.9%的酪胺酸酶抑活性制率。

表2 肉桂酸之酪胺酸酶抑活性制率

樣品	酪胺酸酶抑活性制率 (%)
肉桂酸	88.9 ± 7.2

3. 細胞毒性測試

化妝品因為人體長期使用與接觸，必須確保不會有毒性及變異的反應，所以，製造廠通常是以細胞毒性測試來證實安全無虞，然後才進入人體臨床實驗。在台灣，法令上把化妝品分為二種：一為含有醫療或毒劇藥品化妝品（簡稱含藥化妝品），否則列為一般化妝品。含藥化妝品與一般化妝品之區別在於：一般化妝品包括香水及修飾用化妝品；或不含有醫療或毒劇藥品之化妝品。含藥化妝品則包括：染髮劑、燙髮劑、及含有衛生署公告之「化妝品含有醫療或毒劇藥品基準」之成分，其含量以不超過該基準者為範圍（含量超出基準者則以藥品管理）。肉桂酸其細胞毒性測試，是利用 ISO10993-5 的方式來鑑定萃取物之毒性，以觀

察細胞的型態、增生來加以鑑定萃取物是否具有毒性。圖 1 分別以 DMSO(Dimethylsulfoxide)當作陽性對照組、DMEM 作為陰性對照組及肉桂酸，培養時間為三天。所製備的肉桂酸不論在細胞數量或型態上，皆與試劑對照組差距甚小。由其圖 1 可以明顯看出細胞型態成類紡錘狀、細胞偽足變得更細長及細胞的密度密集，所以可以判定肉桂酸其細胞毒性等級介於 0 級（無毒性）與 1 級（輕微毒性）之間，而此結果在 ISO 10993-5 的標準上面是可以視為合格的。

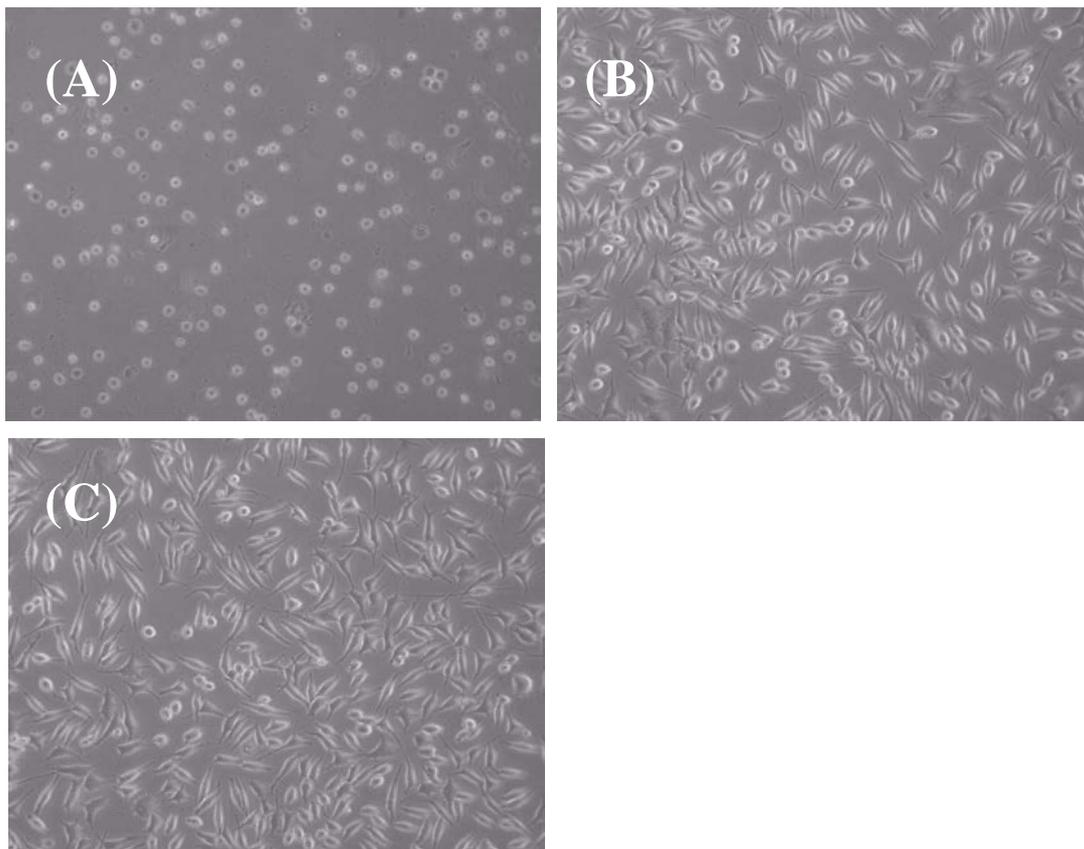


圖 1 肉桂酸之細胞毒性測試:(A)陽性對照組、(B) 陰性對照組、(C) 肉桂酸

結論

本研究利用肉桂醛為原料，在催化劑和氫氧化鈉鹼性條件下合成最終產物肉桂酸。肉桂酸氧化活性及美白能力，並評估其細胞毒性。在實驗過程中，分析並歸納出下列結論：

- ✧ 肉桂酸具有 60.1%的 DPPH 自由基清除能力。
- ✧ 肉桂酸具有 88.9%的 酪胺酸酶抑活性制率。

- ◇ 肉桂酸其細胞毒性等級介於 0 級（無毒性）與 1 級（輕微毒性）之間，而此結果在 ISO 10993-5 的標準上面是可以視為合格的。

綜合上述之結論，肉桂酸用於應用於日用化妝品上，極具有發展潛力。

參考文獻

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199-1200.
- Constantin, I. C. Fulga, T. Marioara, O. 2003. A new direct synthesis of cinnamic acids from aromatic aldehydes and aliphatic carboxylic acids in the presence of sodium borohydride. *Tetrahedron Letters*, 44:3579-3580.
- Karboune, S. Safari, M. Lue, B. M. Yeboah, F. K. & Kermasha, S. 2005. Lipasecatalyzed biosynthesis of cinnamoylated lipids in a selected organic solvent medium. *Journal of Biotechnology*, 119, 281-290.
- Martin, A. B., Graebin, N. G., Lorenzon, A. S. G., Fernandez-Lafuente, R., Ayub, M. A. Z., & Rodrigues, R. C. (2011). Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry*, 46, 2311-2316.
- Tomita, K. Oda, N. Ohbayashi, M. Kamei, H. Miyaki, T. Oki, T. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 43:1601-1605.
- Shi, Y. Chen, Q. X. Wang, Q. Song, K. K. Qiu, L. 2005. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chemistry*, 92: 707- 712.
- Sun, W. He, Q. Luo, Y. 2007. Synthesis and properties of cinnamic acid series organic UV ray absorbents-interleaved layered double hydroxides. *Materials Letters*. 61:1881-1884.
- Suresh Kumar, G.S. Seethalakshmi, P.G. Bhuvanesh, N. Kumaresan, S. 2013. Studies on the syntheses, structural characterization, antimicrobial-, and DPPH radical scavenging activity of the cocrystals caffeine:cinnamic acid and caffeine:eosin dehydrate. *Journal of Molecular Structure*, 1050:88-96.