

臺北醫學大學生藥學研究所

碩士論文

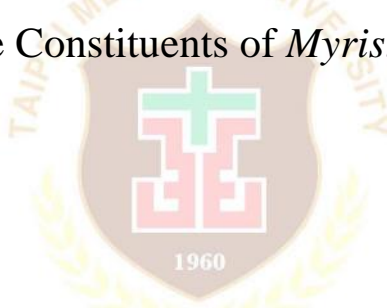
Graduate Institute of Pharmacognosy

Taipei Medical University

Master Thesis

肉豆蔻抗痤瘡之活性成分研究

Anti-acne Principle Constituents of *Myristica fragrans* Houtt.



研究生：黃俊瑋 Chun-Wei Huang

指導教授：王靜瓊 博士 Ching-Chiung Wang, Ph. D

中華民國一百年七月

July, 2011

臺北醫學大學碩士學位考試委員審定書

肉豆蔻抗痤瘡之活性成分研究

Anti-acne Principle Constituents of *Myristica fragrans* Houtt.

本論文係 黃俊瑋 君 (學號 M303098002) 於臺北醫學大學 藥學院 生藥學研究所完成之碩士學位論文，承下列委員審查通過及口試及格，特此證明。

論文考試委員：

呂彥禮

(本論文召集人)

(呂彥禮 副教授，長庚大學中醫學系天然藥物研究所副教授)

鄭幼文

(鄭幼文 副教授，臺北醫學大學藥學系副教授)

王靜瓊

(指導教授)

(王靜瓊 教授，臺北醫學大學藥學系教授)

中華民國 一 百 年 七 月 二十 日

臺北醫學大學電子暨紙本學位論文書目同意公開申請書

申請人姓名	黃俊瑋	畢業年月	民國 100 年 7 月
學號	M303098002	系所名稱	生藥學研究所
聯絡電話	(02) 2736-1661 #6161	學位	<input checked="" type="checkbox"/> 碩士班 <input type="checkbox"/> 博士班
電子郵件	weiwei19851124@hotmail.com		
論文題目	肉豆蔻抗痤瘡之活性成分研究		
同意項目			
<input checked="" type="checkbox"/> 立即公開	※若選擇立即公開，相關研究成果即將喪失申請專利權利		
<input type="checkbox"/> 延後公開 含紙本論文及電子 論文書目資料(包 含書目、目次、摘 要、引用文獻)	延後公開原因：		
	公開日期： 中華民國 年 月 日起(年限最長為 5 年)		
	備註 1：紙本論文(平裝本)連同本申請書正本提供教務處；另提供紙本論文予圖書館(精裝本)及系所(平裝本)，各保管單位應盡保密責任。 備註 2：電子論文全文延後公開，請於系統提交論文時務必於系統上勾選延後公開及設定時間。		

申請人簽名： 黃俊瑋

指導教授簽名： 王靜輝

研究所所長簽名： 侯文禮

申請日期：中華民國 100 年 7 月 31 日

臺北醫學大學學位考試保密同意書暨簽到表

學位考試基本資料：

論文題目	肉豆蔻抗痤瘡之活性成分研究		
	Anti-acne Principle Constituents of <i>Myristica fragrans</i> Houtt.		
指導教授	王靜瓊	職稱	教授
學生姓名	黃俊瑋	系所	生藥學研究所
		學號	M303098002
考試時間	中華民國 100 年 7 月 20 日 上午 10 時		
考試地點	臺北醫學大學 教研大樓 七樓大會議室		

本論文考試涉及揭露方所告知或交付之研發成果或技術秘密等重要智慧財產權，該機密資訊為揭露方所擁有之法定權利或期待利益，**僅限以下特定人士參與**，所有與會者了解並同意對參與本考試所接觸到之機密內容保守秘密，不得自行利用或以任何方式使第三人利用「機密資訊」或取得任何權利，直到本論文開放閱覽或完成專利申請為止。

考試委員簽署：

姓名	服務單位	職稱	簽名
呂彥禮	長庚大學中醫學系天然藥物研究所	副教授	呂彥禮
鄭幼文	臺北醫學大學藥學系	副教授	鄭幼文
王靜瓊	臺北醫學大學藥學系	教授	王靜瓊

誌謝

感覺就像是得了獎一樣，要用短短的篇幅感謝幫助我完成這本論文的所有人；首先一定要感謝王靜瓊老師接納我進入這個溫馨的大家庭並細心教導以及分享生活中的大小事物，也感謝口試委員呂彥禮及鄭幼文老師給予論文的指導以及建議，使這我兩年研究成果在老師們的見證下更趨完善。

很幸運能夠認識王家的諸位大德，大家一起努力、分享很多很多事情。感謝小鳳姐照顧實驗及生活上的許多事，使我不孤苦無依、挨餓受凍；感謝坤哥 always 精闢中肯的見解，如同當頭棒喝時時猶言在耳；感謝佩琪學姊苦海明燈指引迷失的方向；感謝易哥成為我精神上的領袖，讓我學到「歹路嘸通行」的道理；感謝小路當木樁讓我練詠春拳，使我在兩年求學生涯成為文武雙全的人；感謝湘吟學姊即時的關心以及提供手工點心和飲料撫慰我受傷的心靈、胃和十二指腸...等；感謝雪吟、小強、昀諮、筱婷、智宇、國瑄、三郎這些超強助理群協助實驗室大小事，讓實驗室正常運作都沒事；感謝建勳、詩瑜以及大臉這些一起打拼衝鋒陷陣的好夥伴相互扶持相互支援；感謝李醫師、曾姊常在 meeting 的時候使孤陋寡聞的大家 level up；感謝暉凡總是給大家一個清空的水槽和櫃子；感謝于涵願意相信我這裡是一個沒有暴力溫馨的地方；感謝緊急應援團：碧玉學姊、雅植、丫彪、怡慈、景鴻、舒服、蔚宏、宗儒、香香、家瑋、詠筑、孟倫...挺我並給我幫忙跟關懷。這一切發生在這裡僅屬於實驗室夥伴們的回憶，都是在這裡得到特別的感情跟寶物。

爸！媽！感謝你們讓我能在這裡安心的求學，謝謝！阿霖！謝謝你在我不在的時候照顧家裡！謝謝阿嬤鼓勵我多讀書成為一個有出息的人！謝謝 Fanny 陪我度過很多生活中的好事跟壞事！謝謝你們大家默默的支持我，我才能夠完成碩士學業，我也會繼續努力成為能使你們安心依靠的後盾。

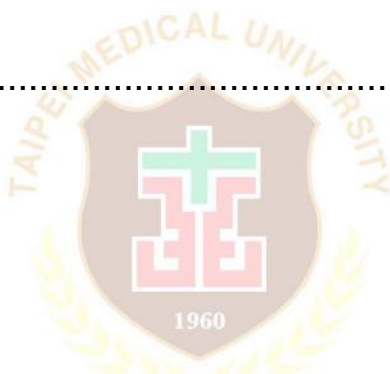
俊瑋 謹誌於拇山 民國 100 年

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	VI
縮寫表.....	VII
摘要.....	1
Abstract.....	3
壹、 緒論.....	5
一、 瘰癧概論.....	5
(一) 瘰癧病因.....	6
(二) 瘰癧症狀與分級.....	9
(三) 西方醫學治療瘰癧之方法.....	12
(四) 傳統醫學治療瘰癧之方法.....	16
二、 肉豆蔻文獻回顧.....	17
(一) 肉豆蔻基原.....	17
(二) 植物性狀.....	18
(三) 藥材性狀.....	20
(四) 肉豆蔻典籍考察.....	21
(五) 肉豆蔻藥理.....	28
三、 實驗方法介紹.....	31
(一) 抗菌實驗模式.....	31

(二)	抗發炎實驗模式	31
四、	研究目的	32
五、	研究流程	33
貳、	實驗材料與方法	34
一、	實驗材料	34
二、	實驗方法	38
(一)	肉豆蔻成分含量分析及分離純化	38
(二)	肉豆蔻抑制痤瘡致病菌生長之評估	42
(三)	肉豆蔻抑制發炎活性評估	46
(四)	肉豆蔻單一劑量皮膚毒性試驗	53
參、	實驗結果	55
一、	27 種中草藥萃取物抗菌試驗	55
二、	肉豆蔻成分分離純化	56
(一)	抗菌活性追蹤分離肉豆蔻及結構解析	56
三、	肉豆蔻之天然物抗痤瘡之活性	65
(一)	肉豆蔻之天然物抗痤瘡致病菌活性	65
(二)	LPS 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應及 MTT 試驗	67
(三)	熱處理 <i>P. acnes</i> 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應	70
四、	肉豆蔻萃取物中 myristicin 及 safrole 之含量	73
(一)	Myristicin 及 Safrole 檢量線	73
(二)	分析方法之確效性	73

(三) Essential oil 及 MFE-M 成分含量	74
五、 肉豆蔻單一劑量皮膚毒性試驗	76
肆、 討論	77
伍、 結論	82
陸、 參考文獻	83
附錄一	90
附錄二	92
附錄三	95
附錄四	98



圖目錄

圖一、 造成瘰癧發生之病因	7
圖二、 瘰癧分級藥物治療流程	15
圖三、 肉豆蔻植物形態寫生圖	19
圖四、 肉豆蔻藥材外觀鑑別	20
圖五、 肉豆蔻歷代本草系統圖	27
圖六、 清朝吳其濬《植物名實圖考》肉豆蔻	28
圖七、 肉豆蔻抗瘰癧實驗流程圖	33
圖八、 肉豆蔻成分分離流程圖	41
圖九、 Griess Reaction 反應圖	47
圖十、 MTT 被活細胞粒線體內的去氫酶間接還原成 Formazan 之原理 ..	52
圖十一、 肉豆蔻萃取物抑制金黃色葡萄球菌生長作用	57
圖十二、 肉豆蔻萃取物抑制瘰癧桿菌效果生長作用	57
圖十三、 MFE-E 經矽膠管柱分離所得之 10 個劃分部抑制金黃色葡萄球菌 生長作用	58
圖十四、 MFE-E 經矽膠管柱分離所得之 10 個劃分部抑制瘰癧桿菌 生長作用	59
圖十五、 Myristicin 化學結構式	60
圖十六、 (+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 化學結構式	61
圖十七、 (+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan 化學結構式	62
圖十八、 Erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'- neolignan 化學結構式	63

圖十九、肉豆蔻之天然物抑制金黃色葡萄球菌生長作用	65
圖二十、肉豆蔻之天然物抑制痤瘡桿菌生長作用	66
圖二十一、肉豆蔻萃取物對於抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用	67
圖二十二、肉豆蔻萃取物 MFE-E 對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 PGE ₂ 抑制作用	68
圖二十三、肉豆蔻天然物(2)-(4)對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用	69
圖二十四、(+)-Erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',5'$ -trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用	69
圖二十五、(+)-Erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',5'$ -trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用	70
圖二十六、(+)-Erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',5'$ -trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 PGE ₂ 抑制效果	71
圖二十七、(+)-Erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',5'$ -trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 iNOS、COX-2 蛋白質 表現在 24 及 8 小時之抑制作用	72
圖二十八、MFE-M 及 essential oil 之 HPLC 成分分析圖	74
圖二十九、Essential oil 之 GC-MS 成分分析圖	75
圖三十、肉豆蔻精油及有效抗痤瘡萃取物動物單一劑量毒性評估	76
圖三十一、天然物(2)、(3)及(4)之結構比較	80

表目錄

表一、 The Global Acne Grading System (GAGS) 評定痤瘡分級量表	11
表二、 Pillsbury 痤瘡四級分級法	11
表三、 痤瘡分級藥物治療常用藥物簡介	14
表四、 現代藥理考察文獻回顧整理表	30
表五、 Draize-FHSA scoring System 皮膚紅腫評分表	54
表六、 27 種常見中草藥抗金黃色葡萄球菌之抑菌圈直徑	55
表七、 肉豆蔻萃取物及精油抗痤瘡致病菌之最小抑菌濃度	56
表八、 肉豆蔻分離得之(2)、(3)、(4)天然物之 ^1H 及 ^{13}C 化學位移比較表	64
表九、 肉豆蔻之天然物對痤瘡致病菌之最小抑菌濃度	66
表十、 Safrole、myristicin 分析方法之同日內差異及異日內差異	73
表十一、 Essential oil 及 MFE-M 之產率以及 safrole、myristicin 含量 ...	74
表十二、 Myristicin、safrole 及主要成分 GC-MS 滯留時間及含量	74

縮寫表

APS : Ammonium persulfate

BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate *p*-toluidine salt

BSA : Bovine serum albumin

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FBS : Fetal bovine serum

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

MS: Mass spectrophotometer

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

COSY : Correlation Spectroscopy

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

HPLC : High performance liquid chromatograph

IC₅₀ : The concentration of 50% inhibition

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide

NBT : Nitroblue tetrazolium chloride

O.D. : Optical density

P/S : Penicillin-Streptomycin

RIPA: Radioimmunoprecipitation

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TEMED : *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine

UV : Ultraviolet spectrum

PA : Heat killed-*P. acnes*

LPS : Lipopolysaccharide

摘要

痤瘡又稱為青春痘，是一種在青春期常見的皮膚病症並在皮膚上留下疤痕，往往引起自尊心下降以及憂鬱等不好的影響，且目前尚無較安全及有效的治療方法，因此本研究以抗痤瘡菌為主要活性追蹤，篩選 27 種中草藥，繼而分離純化其活性成分，結果顯示肉豆蔻 50% 甲醇萃取物抑制作用較其他中草藥顯著，對金黃色葡萄球菌在 10 mg/紙錠下，其抑菌圈直徑為 13.5 mm。

肉豆蔻種仁富含揮發油，其中黃樟素及肉豆蔻醚是主要有毒成分，因此利用水蒸氣蒸餾法，得到精油後 (essential oils)，藥渣再以 50% 甲醇溶液萃取 (MFE-M)，兩種萃取物進行抗菌試驗，結果顯示：精油對金黃色葡萄球菌以及痤瘡桿菌的最小抑菌濃度分別為 80 % (v/v) 和 20 % (v/v)；而 MFE-M 萃取物對兩株菌最小抑菌濃度 (MIC) 皆為 0.64 mg/紙錠下。利用抗菌活性追蹤分離具活性之劃分部，以矽膠管柱分離到無抗菌活性的 myristicin (**1**) 及 3 個有效新木質素類天然物，分別為 (+)-erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',5'$ -trimethoxy -8-O-4'-neolignan (**2**), (+)-erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',4,5'$ -tetramethoxy -8-O-4'-neolignan (**3**) 和 erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy -8-O-4'- neolignan (**4**)。結果顯示: (**2**) 抑菌活性最強，且對金黃色葡萄球菌及痤瘡桿菌 MIC 分別為 3.12 $\mu\text{g/ml}$ 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 。進而利用 LPS 以及熱處理的 *P. acnes* (PA) 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應，評估 (**2**)-(**4**) 抑制 NO、PGE₂ 產生及 COX-2、iNOS 蛋白表現之作用，結果發現: (**2**) 具有最強的抑制 NO 生成作用，其 IC₅₀ 分別為 11.07 $\mu\text{g/ml}$ (誘導劑: LPS) 以及 11.53 $\mu\text{g/ml}$ (誘導劑: PA,)。

據結果，MFE-M 萃取物具有抗痤瘡之作用，且含有抗痤瘡致病菌及抗發炎活性成分 (**2**)，因而分析其內有毒成分黃樟素以及肉豆蔻醚以評估其毒性。結果 MFE-M 萃取物中肉豆蔻醚為 2.47 %、黃樟素 0.01 %，而精油中則為 2.62 %

及 4.46 %，表示去精油後之肉豆蔻萃取物，其黃樟素明顯降低。繼而將兩萃取物再進行皮膚單一劑量毒性檢測，將其塗抹於大鼠皮膚，24 及 48 小時後觀察，幾乎不會引起刺激反應。因此，我們發現 MFE-M 其內黃樟素含量顯著下降、含有抗瘰癧致病菌、抗發炎之活性成分**(2)**，且不具皮膚刺激性，因而推測此萃取物適合開發為抗瘰癧之醫藥用品。



Abstract

Acne is a common skin condition in adolescence and usually results in scarring. It also leads to severe psychological side effects, such as self-esteem reduction and depression. So far, there are not safty and effective drugs for acne therapy. Therefore, 27 kinds of herbs were screened by anti-acne bacterial assay. Among them, 50% methanol extract of *Myristica fragrans* Houtt. (MF) most inhibited acne bacteria and in the dose of 10mg/disc, the inhibition zone diameter was 13.5 mm. Then we explored the anti-acne bacterial components in MF. The major toxic components of MF were safrole and myristicin. The essential oils of MF were extracted by hydrodistillation and the dregs were extracted by 50% methanol (MFE-M), again. And then the essential oil and MFE-M were evaluated the anti-bacterial activity. Results showed the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil against *S. aureus* and *P. acnes* were 80 % (v/v) and 20 % (v/v), respectively ; and the MIC of MFE-M against both *S. aureus* and *P. acnes* was 0.64mg/disc. The active fractions (MFE-M) were isolated with silica gel column and combined with anti-microbial assay. Four compounds were obtained from MFE-M, myristicin **(1)** which was non-active and 3 effective neolignans: (+)-erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan **(2)** 、 (+)-erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan **(3)** and erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan **(4)**. However, **(2)** was the strongest anti-microbial activities than the others, the MICs against *S. aureus* and *P. acnes* were 3.12 μ g/ml and 6.25 μ g/ml, respectively. Moreover, **(2)** could inhibited NO, PGE₂ production and COX-2, iNOS eapression in LPS or heat killed-*P. acnes* induced RAW 264.7 cells and the 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were 11.07 μ g/ml (by LPS

inducer) and 11.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (by heat killed- *P. acnes* inducer).

The toxic components of MFE-M and essential oil were analyzed by HPLC system. Results showed that MFE-M was in 2.47% myristicin and 0.01% safrole and essential oil was 2.62% and 4.46%. And then, the MFE-M and essential oil were smeared on rats for 24 and 48 h, the skin of rats was not caused irritation. According to the above results, MFE-M showed anti-acne effect which contained anti-microbial and anti-inflammatory compound, **(2)**. However, MFE-M contained a few safrole and myristicin and did not cause skin irritation. Therefore, we suggested this extract has the potential to develop to anti-acne drugs and supplements of cosmetic.



壹、緒論

一、痤瘡概論^[1]

「痤瘡」(acne vulgaris) 在西方醫學上也稱之為「尋常性痤瘡」；在傳統中醫於秦漢時稱痤瘡為「面瘡」、「嗣面」，明清時則稱「肺風粉刺」、「粉疵」、「酒刺」、「穀嘴瘡」等，其他中醫古籍也有「面皰」、「皰瘡」、「壯疙瘡」、「青春粒」、「痘瘡」等之記載。痤瘡的發生率相當高，主要發生的年齡層集中在青春期的，患者年齡從 10 至 20 多歲為多，為青少年最常發生之皮膚病，故一般常用通俗用法又稱之為「青春痘」。

痤瘡主要於青春期的時發生，一般而言以 11~12 歲開始進入青春期的發育，伴隨第二性徵的出現，同時面部皮膚油脂增加，呈現油性皮膚。開始形成白頭粉刺或黑頭粉刺，少數情況下有少量炎性丘疹，於 24~25 歲前情況較為嚴重，其後痤瘡病情會隨年齡增加而減輕。其症狀常好發於皮脂分泌旺盛之部位，如臉部的、頭皮、前胸、後背、頸項等，其中又最常發生於臉部的。

往往會對患者除了生理上的傷害外，亦造成心理上及社交上不良的影響；不僅會影響外貌美觀，許多研究顯示，痤瘡也可能對一個人造成自尊心下降、人際關係困難，甚至產生焦慮、憂鬱等並造成嚴重之社交障礙^[2]、就業困擾甚至導致自殺的行為^[3]。

(一) 痤瘡病因^{[1][4][5]}

經由多項研究表示，痤瘡的產生是「多因子」相互影響造成的結果。其主要造成痤瘡的原因^[6]有四項如下（圖一）：

1. 毛囊的角化異常：

痤瘡最基本的原因是毛囊口的角化異常。正常情況下，毛囊口的角質呈疏鬆排列，隨著皮膚新陳代謝不斷更新，不會使毛孔產生阻塞的情形。反觀痤瘡的形成，毛囊皮脂腺早期的改變是毛囊開口的過度角質化，使其毛囊口的角質排列較為緊密而阻塞，此與毛囊口細胞增生及角質細胞層脫屑作用降低兩者有關。結果毛囊皮脂漏斗部角質細胞黏連性增加，使得皮脂及角質蛋白在毛囊通道形成了過度角質化的微粉刺（微面皰），微粉刺除了為白頭粉刺和黑頭粉刺的起因，亦為痤瘡發生的發病根源。

2. 皮脂分泌旺盛：

皮脂分泌的多寡直接與痤瘡的發生有關。身體各區域的皮脂腺分布密度及分泌活性並不相同，若皮脂腺處於極度活化的狀態，將造成大量皮脂的分泌，而皮脂中的某些成分，如：鯊烯 (Squalene)，即具有導致粉刺的特性。

皮脂腺上有雄性素接受體，對雄性素有過度敏感反應，因此於男女青春期或女性生理期及懷孕時，體內性腺激素荷爾蒙容易產生異常分泌的情況，皮脂腺經由雄性素的刺激使得皮脂分泌增加，產生痤瘡的機率也因此而增加。

皮脂腺變大伴隨腎上腺雄性素增加及皮脂產生增加，而豐富的皮脂提供了皮膚—痤瘡桿菌（厭氧性類白喉桿菌屬正常菌叢）生長所需之介質。細微粉刺造成的毛孔阻塞，亦提供了厭氧且富脂質之環境，而致痤瘡桿菌生長旺盛並將三酸甘油酯水解產生游離脂肪酸及甘油，當作營養的來源。

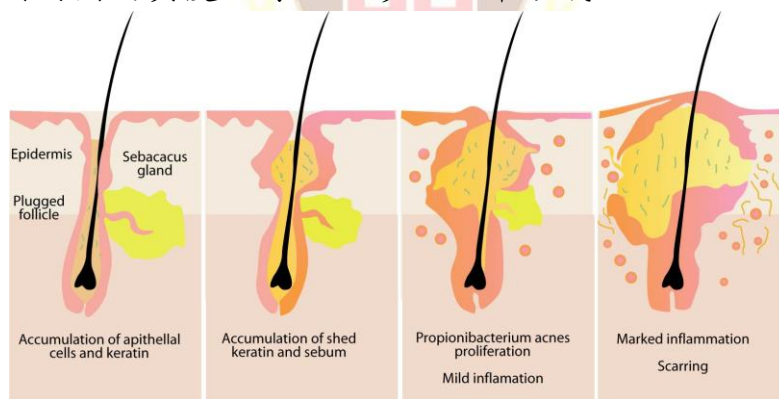
3. 毛囊內細菌增生：

痤瘡患者毛囊內的致病菌主要是痤瘡桿菌 (*Propionibacterium acnes* 以下簡稱 *P. acnes*)以及金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 以下簡稱 *S. aureus*)兩種。此外，痤瘡的產生也可能與其他種類的細菌或黴菌有關，如：表皮葡萄球菌及皮屑芽孢菌等。

4. 發炎反應^[7]：

由於阻塞的角質層、過度分泌之油脂，加上細菌的過度增生，很容易在皮膚上引起發炎反應，過多的發炎物質會造成皮膚的進一步刺激與傷害。

痤瘡桿菌增生的發炎結果，組織釋出趨化因子吸引嗜中性白血球，藉由三酸甘油酯水解產生之游離脂肪酸，以及毛囊上皮細胞破裂後之嗜中性白血球溶酶體酵素釋出，兩者皆會引發刺激反應。促發炎脂質及角質蛋白然後擠壓到周圍的真皮，導致丘疹及結節形成。



圖一、造成痤瘡發生之病因

日常生活若飲食起居正常，痤瘡的發生率低；若不正常的生活^[8]，如下列將易誘導痤瘡的發生：

1. 油脂類食物不正常攝取：

食物與痤瘡的相關性因人體質而異，但在臨床上油炸食物、巧克力或

花生等食物會使得部分患者之痤瘡的產生或是病情的惡化。

2. 非生理性毛囊孔阻塞：

除了前述毛囊的角化異常以及皮脂分泌旺盛會使得毛囊口阻塞外，一些環境因素如化妝品使用、衣著過緊或是長期暴露於高溫、油汙環境下等，亦會造成毛囊口的不暢通而形成痤瘡。

3. 精神壓力：

由於生活作息不規律、失眠、睡眠不足、焦慮、情緒壓力等因素均會使得體內新陳代謝以及內分泌異常，造成皮脂腺不正常過度分泌。

4. 藥物副作用：

有些藥物會影響體內內分泌變化，有些則是有直接性致痤瘡的副作用，如皮質類固醇、避孕藥、抗結核病藥、含鹵素（如碘、溴...等）藥物、抗甲狀腺藥或部分精神科用藥等都有可能誘發痤瘡的產生。



(二) 痤瘡症狀與分級

痤瘡症狀以炎性丘疹為代表，隨著炎性丘疹的演變會引起一系列相關的症狀，因此痤瘡是呈現多形性皮炎的皮膚病，常見為以下各症狀^{[1] [4]}：

1. 微粉刺 (Microcomedo)：

在毛囊漏斗部角質細胞黏連性增加，角質細胞堆積成微小的粉刺。

2. 白頭粉刺 (Whitehead)：

毛囊漏斗部被角質細胞堵塞，角質化和皮脂充塞其中，而頂部由表皮覆蓋與外界不相通，成為封閉式粉刺，外觀為稍稍高起之白頭。

3. 黑頭粉刺 (Microcomedo)：

在毛囊漏斗部完全被堵塞，毛囊皮脂腺內均為角質化和皮脂，而開口處與外界相通，形成開放式粉刺，外觀為開大的毛囊口內有黑色角化栓。

4. 丘疹 (Papule)：

在毛囊漏斗部閉塞的情況下，形成毛囊皮脂腺內缺氧的環境。厭氧性細菌痤瘡桿菌大量繁殖，分解皮脂，產生致發炎因子而引起炎性丘疹，故痤瘡性丘疹屬於發炎性痤瘡傷害。

5. 膿疱 (Pustule)：

炎性丘疹更進一步惡化，毛囊皮脂腺內大量白血球聚集，吞噬痤瘡桿菌而發生發炎反應，引起大量發膿細胞及物質堆積即成膿疱。

6. 結節 (Nodule)：

在發生膿疱之後，大量角質物、皮脂、以及發膿細胞及物質堆積，使毛囊皮脂腺結構被破壞形成高出皮膚表面因血管通透之紅色結節。

7. 囊腫 (Cyst)：

在結節之後，毛囊皮脂腺大量發膿細胞聚集，內含發膿組織液、細菌及細胞殘體、皮脂及角化物加上發炎反應發生。毛囊皮脂腺結構被破壞但

不形成囊壁。

8. 粉瘤 (Keratin cyst):

發生囊腫之後，毛囊皮脂腺內之內容物逐漸乾燥，發炎症狀減輕，行程油膩性豆渣樣物質。當囊內壓力過大時會於表面形成小孔，可使豆渣樣物質排出。

9. 癩管 (Fistula):

結節、囊腫位於較深之部位，其囊腔裡內容物逐漸向皮膚表面移動，最後穿破皮膚，排出內容物。其排出物所通過的通道形成纖維化管道稱之為癩管。

10. 疤痕 (Scar):

因真皮組織遭到破壞，癒後結締組織修補而形成疤痕。雖然痤瘡的相當容易被發覺，但是由於個體的差異以及患處容易變動，使得要訂定一個通用的評估方法相當困難，但是為了易於痤瘡診斷發現後的治療，許多醫師及研究人員依照需要訂定了很多種的評量方法^[9]。其中，以 1997 年 Doshi、Zaheer 以及 Stiller 設計出的全球痤瘡分級系統 (Global Acne Grading System, GAGS)^[10] 較其他種方法廣用性高，具有準確、一致性強、快速及總體評價效果好等優點，根據毛囊皮脂單位密度、分布及面積，將好發部位前額部、左頰部、右頰部、鼻部、下頰部、胸部以及背部分為六個區域，並定義各區域的因素分值 (Factor)；並將各種好發之損傷程度以及症狀嚴重度定義其等級分數 (Grade)，並計算其區域分值 (Local score) 總和，如下表 (表一) 所示：

表一、The Global Acne Grading System (GAGS) 評定痤瘡分級量表

The Global Acne Grading System, GAGS				
Location	Factor	x	Severity	Grade
Forehead	2		No lesion	0
Right cheek	2		Comedone	1
Left cheek	2		Papule	2
Nose	1		Pustule	3
Chin	1		Nodule	4
Chest and upper back	3			

Local Score = Factor x Grade

Mild : 1-18, Moderate : 19-30, Severe : 31-38, Very severe : ≥ 39

在臨床上皮膚科醫生診斷則以 Pillsbury 的四級分級法^[1]最為常用，如表

二所示：

表二、 Pillsbury 痤瘡四級分級法

輕度	I	粉刺總數不超過 30 個，可有少量丘疹及膿疱
中度	II	病損數為 31~59 個，可有中等數量的丘疹和膿疱
	III	大量丘疹和膿疱，病損數在 51~100 之間，偶爾有大的炎症損害，結節在 3 個以內
重度	IV	病損數在 100 以上，結節和囊腫在 3 個以上，主要為結節、膿腫和聚合性痤瘡

(三) 西方醫學治療痤瘡之方法^{[1][4][11]}

根據痤瘡的病因，臨床治療痤瘡有以下四項原則：

1. 直接使異常角質化之毛囊皮脂腺細胞趨向正常分化過程。
2. 降低皮脂腺活性，減少油脂分泌。
3. 抑殺毛囊中致病菌。
4. 減緩發炎反應。

臨床治療痤瘡上以藥物治療為主（表三^[1]、圖二^[4]）其次為果酸換膚、雷射磨皮等。藥物治療又可分為以下三類方法：

1. 局部外用藥劑：

主要針對輕至中度痤瘡患者。目前臨床上常用局部外用藥劑包括：維他命 A 酸（vitamin A acid, Tretinoin）、水楊酸（salicylic acid）、杜鵑花酸（azelaic acid）、過氧化苯甲醯（benzoyl peroxide）及抗生素類局部外用藥（topical antibiotics）如 clindamycin、erythromycin 和 tetracycline 等最為常用。

2. 物理性治療：

於痤瘡病灶內注射類固醇藥物或是將患部切開排膿抑制致發炎物質活化引起之發炎反應。

3. 全身性藥物治療：

全身性治療包括口服抗生素^[12]如 tetracycline、doxycycline、minocycline、co-trimoxazole 以及 erythromycin 等最為常用，其他還有口服維他命 A 酸^[13]以及荷爾蒙治療^[14]。因為經口服吸收，藥物更容易分布到毛囊皮脂腺中，因此較局部外用藥有效，但是相對副作用易較大且明顯，故適用在中等至嚴重程度之痤瘡患者。

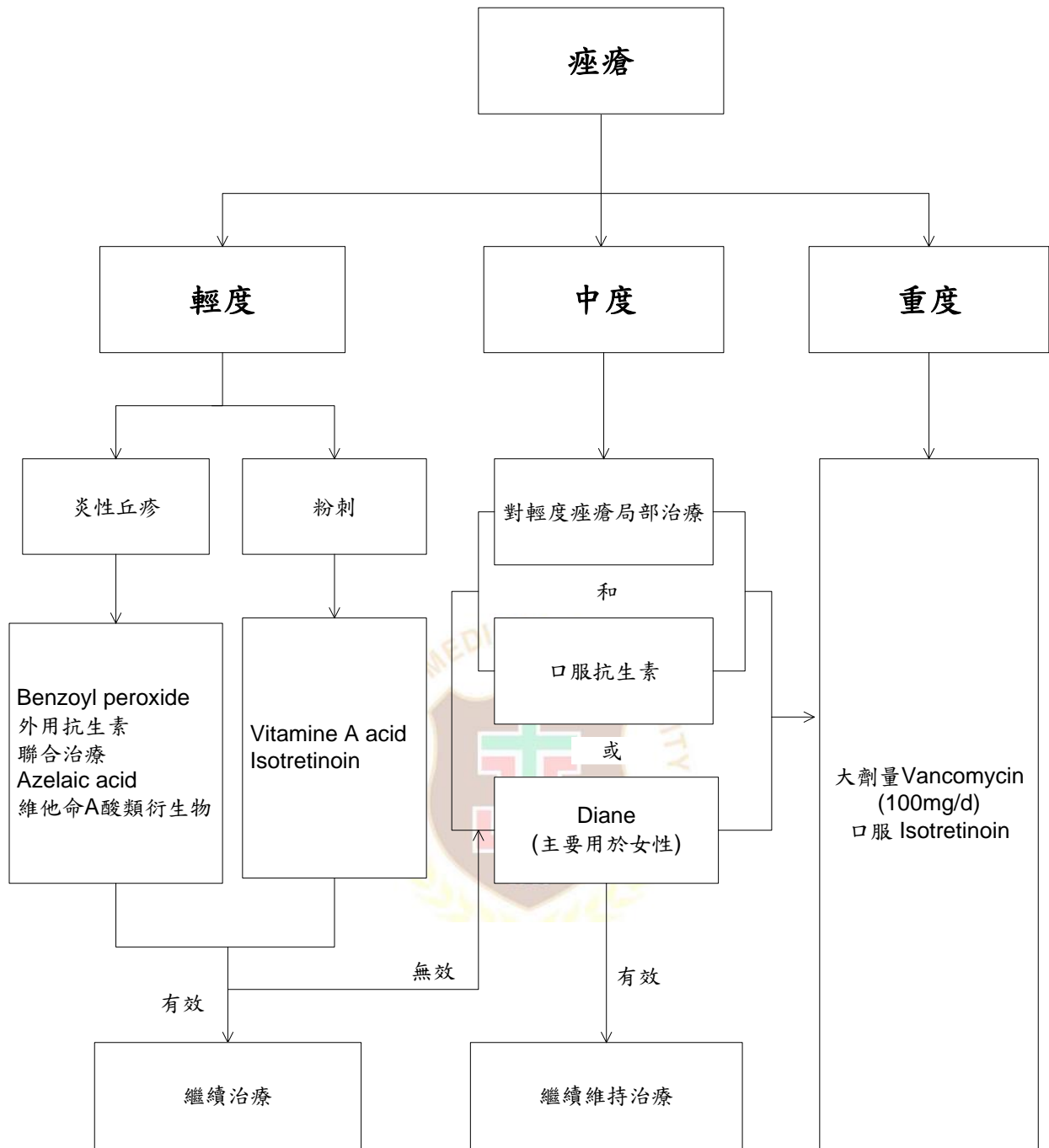
臨床上除了利用藥物治療，現今時下風行的還有果酸(α -hydroxy acids ; AHAS)換膚，利用天然蔬果中萃取之果酸如蘋果酸、甘醇酸、葡萄酸、乳酸等。其中又以甘醇酸(glycolic acid)為所有果酸分子中分子量最小，對皮膚親合力最佳。果酸可降低角質細胞聚合能力改善許多過度角質化的皮膚問題，如去除角質、通暢毛孔、排除粉刺、去除受損外層皮膚上之皺紋、表皮色素、疤痕，但使用上仍有刺激性故使用高劑量時仍須評估其安全性。

除果酸換膚外，雷射磨皮也相當盛行，痤瘡一旦症狀嚴重，發炎部位若位於較深層皮膚組織容易造成疤痕，利用高能量的激光雷射，直接破壞皮膚上特定部位以達到治療效果，但可能造成由於熱傷害造成皮膚色素沉著的問題，術後對其恢復狀況需多加注意。



表三、 痤瘡分級藥物治療常用藥物簡介^[1]

	藥物	作用機轉	使用方式	副作用
粉刺： 局部外用藥	維他命 A 酸 (Vitamine A acid)	角質正常分化	每日睡前使用	光刺激性、皮膚紅、乾燥、脫皮、刺痛
	Adapalene	角質正常分化	每日睡前使用	皮膚泛紅、乾燥、脫皮
	杜鵑花酸 (Azelaic acid)	角質正常分化、殺菌	一日 2 次	刺痛感
	水楊酸 (Salicylic acid)	溶解角質	一日 2 次	皮膚泛紅、脫皮、刺痛
輕度發炎痤瘡： 局部外用藥	過氧化苯甲醯(Benzoyl peroxide)	殺菌、溶解角質	一日 2 次	皮膚泛紅、乾燥、脫皮、刺痛
	局部抗生素 (Topical antibiotics)	殺菌、消炎	一日 2 次	細菌抗藥性、皮膚乾燥
	維他命 A 酸(Vitamine A acid)	角質正常分化	每日睡前使用	光刺激性、皮膚紅、乾燥、脫皮、刺痛
	Adapalene	角質正常分化	每日睡前使用	皮膚泛紅、乾燥、脫皮
	杜鵑花酸 (Azelaic acid)	角質正常分化、殺菌	一日 2 次	刺痛感
中度發炎痤瘡： 口服全身性治療	四環黴素 (Tetracycline)	殺菌、消炎	250 至 500mg，一日 2 次，空腹使用	嘔吐、腹痛、腹瀉、念珠菌感染、細菌抗藥性
	Doxycycline	殺菌、消炎	50 至 100mg，一日 2 次	光敏感性、腹痛、腹瀉、嘔吐
	Minocycline	殺菌、消炎	50 至 100mg，一日 2 次	頭昏、暈眩、色素沉著、過敏、肝炎
	紅黴素 (Erythromycin)	殺菌、消炎	500mg，一日 2 次	細菌抗藥性、腹痛、腹瀉、嘔吐
	荷爾蒙治療 (Hormone therapy)	抑制雄性素、減少油脂分泌		頭痛、噁心、體重增加、乳房脹痛（不可用於治療男性患者）
嚴重發炎痤瘡	口服維他命 A 酸(Isotretinoin)	角質分化正常，減少油脂分泌，消炎殺菌	0.5 至 1.5mg/kg，一日 2 次	致畸胎、皮膚黏膜刺激、乾燥、肌肉骨骼痠痛、僵硬、高血脂
	痤瘡病灶內注射類固醇 (Intralesional glucocorticoids)	消炎		疤痕(暫時性)、痛



註：輕度：主要為白頭粉刺、黑頭粉刺、少數炎性丘疹，損害數在30以下。
 中度：主要為白頭粉刺、黑頭粉刺、多數炎性丘疹，膿疱和結節，損害數在100以下。
 重度：主要為白頭粉刺、黑頭粉刺、炎性丘疹，膿疱和結節以及囊腫和疤痕，損害數在100以上。

圖二、 痤瘡分級藥物治療流程^[4]

(四) 傳統醫學治療痤瘡之方法

隋，《諸病源候論·面疱候》：「面疱者，謂面上有風熱氣生疱。」，立論本病病機為風熱蘊結於面。《醫宗金鑒·肺風粉刺》：「此症由肺經血熱而成。」，立論本病病機為肺經血熱蘊結於面。

當代臨床對此病機之認識，除風熱、血熱、肺經血熱蘊結於面之外，對於痤瘡之病機尚有血瘀、濕盛、痰核、腸胃實熱上蒸於面以及熱毒蘊結於面等看法。

在中醫理論上對於痤瘡的治療方法^[1]以中藥療法為最常使用，對於中藥療法主要依照辯證治療簡單分為三類：

1. 適合實證型者：

常用於體力充沛之人，且具有便秘、腹脹、胸悶、肥胖、面部脹紅等症狀，且痤瘡患部尖端有些許發炎紅腫或化膿者，常用大柴胡湯、防風通聖散、清上防風湯、荊芥連翹湯、桂枝茯苓丸以及桃核承氣湯等方。

2. 適合虛證型者：

體力較為虛弱，則得運用中醫理論之「補法」。虛證體質以女性居多，常有貧血、畏寒、腰膝痠軟、臉色蒼白、失眠、手腳冰冷、暈眩、憂鬱等症狀，痤瘡患部常以慢性、乾燥、發癢或尖端圓平略帶紫色患者適用，常用加味逍遙散以及當歸芍藥散等方。

3. 適合介於實證與虛證型者：

體力適中，血壓稍高、臉部易赤燙、痤瘡發癢患者常用溫清飲；皮膚乾燥、易疲倦、頭痛、頭暈、臉部赤燙且常打寒顫者則使用加味逍遙散合四物湯；體力適中，嘴巴易苦澀口渴且肩膀痠痛、易倦患者則適用小柴胡湯；由飲食習慣不適當以致引起發炎現象且化膿者則服用十味敗毒散。

中醫治療痤瘡有一項相當特別的治療方法—針灸療法，針灸有雙向調

節作用，能避免皮脂分泌過多所致的皮膚油膩，又能防止皮脂分泌過少的皮膚乾燥，並可消除青春痘所致的紅、腫、熱、痛等發炎現象。但須避免面部有痤瘡時使用局部針刺，應以遠部取穴法或循病變部位經絡取穴。而在外用治療方面，則常用白芷、白芨、辛夷及黃芩及柏連散、生蘆薈等。

在本篇論文中，選用 27 種中草藥萃取物對 *S. aureus* 進行紙錠擴散法抗菌試驗，在 10 mg 劑量下，其中錢幣草、三葉五加、馬約蘭、荔枝草、肉豆蔻、小葉黃鱧藤以及南嶺蕘花抑菌圈大小在 11 到 15 mm 具有中等抗菌活性，而肉豆蔻在其中具有最強抗菌效果（表六），抑菌圈直徑為 13.5 mm，故選用肉豆蔻為本篇研究之題材。

二、肉豆蔻文獻回顧

（一）肉豆蔻基原^{[15] [16]}

1. 藥材名：肉豆蔻
2. 科名：Myristicaceae 肉豆蔻科
3. 學名：*Myristica fragrans* Houtt.
4. 科學分類：

界	Plantae	植物界
門	Plantae	被子植物門
綱	Magnoliopsida	雙子葉植物綱
亞綱	Magnoliidae	木蘭亞綱
目	Magnoliales	木蘭目
科	Myristicaceae	肉豆蔻科
屬	Myristica	肉豆蔻屬

5. 英文名：Nutmeg

6. 別名：玉果、肉果

7. 藥材用部：種仁

(二) 植物性狀^[16]

常綠喬木，高可達 20 米。葉互生；橢圓狀披針形或長圓狀披針形，長 5~15 厘米，革質，先端尾狀，基部急尖，全緣，上面淡黃棕色，下面色較深，並有紅棕色的葉脈；葉柄長 6~12 公厘。花雌雄異株；雄花的總狀花序長 2.5~5 厘米；小苞片鱗片狀；花疏生，黃白色，橢圓形或壺形，長 6 公厘，下垂；花藥 9~12 個，連合成圓柱狀有柄的柱。果實梨形或近於圓球形，下垂，長 3.5~6 厘米，淡紅色或黃色，成熟後縱裂成 2 瓣，顯出緋紅色假種皮，種子長球形，種皮紅褐色，木質。是一種堅果類植物。(圖三)

生長於熱帶地區的常綠植物，常見於東南亞、澳洲及加勒比海地區，尤以印度尼西亞和格瑞那達產量最大^[17]。

對生長環境條件的要求適宜的生長溫度為 25-30 度，畏寒冷。幼齡樹受強光直射時，會乾枯甚至植株死亡，成齡樹喜光，充足的光照下植株生長壯，分枝多，開花結果也多。

果實在 7 月與 12 月採收，肉豆蔻果實是可制兩種常見香料：豆蔻核仁 (Nutmeg) 和肉豆蔻皮 (Mace)，其果仁可製作香精油。葉與樹皮皆可以提煉肉豆蔻精油，除可用來做為飲料以及食品加工罐頭的添加物，亦可增加風味於家庭用噴霧劑中做為除臭劑，也是高級香水中略具辣味的來源，在東南亞也做為藥用。



圖三、肉豆蔻植物形態寫生圖

(三) 藥材性狀

本品卵圓或橢圓形，長2~3.5厘米，徑1.5~2.5厘米。外表灰棕或棕色，粗糙，具不規則網狀溝紋，種臍有環形隆起，到種脊間有明顯縱溝，另一端為合點部位，呈暗色圓形凹陷，質堅硬，橫切面油質樣，有大理石狀花紋，為暗棕色之外胚乳與淺黃橙色之內胚乳交錯而成。縱切面近種臍處之小空隙，內藏胚芽。氣芳香，味辛辣而微苦。除去皮殼後乾燥。煨制去油用。

鑑別重點可以下列所示：

1. 官能檢查：

以粒大，體重，堅實，光滑，香濃為佳。

2. 組織鑑別：

種子橫切面鏡檢，外胚乳，外層細胞，多切線延長排列，內含棕色內容物（圖四），偶含角柱或盤形之酒石酸鉀結晶。內層柔組織由不整齊多角形柔細胞而成，散生小形維管束與大形分泌細胞。此柔組織一部分伸入內胚乳形成錯入組織，而成特異紋理。內胚乳，為多角形柔細胞，與外胚乳相接處，有一層表皮細胞，其中含多數之羽毛狀脂肪結晶、糊粉粒、少數鞣質細胞及棕色內容物。



圖四、肉豆蔻藥材外觀鑑別

(四) 肉豆蔻典籍考察

肉豆蔻的使用始於中國唐朝年間記載於《本草拾遺》，於宋朝正式收載於官修《開寶本草》沿用至今，年代本草考察如圖五，其文獻摘錄如下：

1. 《藥性論》：

君，味苦，辛。能主小兒吐逆，不下乳，腹痛，治宿食不消痰飲。

2. 《海藥本草》：

味辛，溫，無毒。主心腹蟲痛，脾胃虛冷氣，并冷熱虛泄，赤白痢等。凡痢以白粥飲服，佳。霍亂氣并以生薑湯服，良。

3. 《日華子本草》：

調中下氣，止瀉痢，開胃，消食。皮外胥下氣，解酒毒，治霍亂。味珍，力更殊。

4. 《開寶本草》：

味辛，溫，無毒。主鬼氣，溫中，治積冷，心腹脹痛，霍亂中惡，冷症，嘔沫冷氣，消食止泄，小兒乳霍。

5. 《本草衍義》：

亦善下氣，多服則泄氣，得中則和來其氣。

6. 《湯液本草》：

氣溫，味辛，無毒。入手陽明經。《本草》云：主鬼氣，溫中，治積冷心腹脹痛，霍亂中惡，冷症嘔沫，冷氣，消食止泄，小兒傷乳霍亂。

7. 《本草衍義補遺》：

屬金與屬土。溫中補脾為丸。《日華子》稱其下氣，以其脾得補而善運化，氣自下也。非若陳皮，香附之泄。《衍義》不詳其實，謾亦因之，遂以為不可多服。云多服則泄氣，得中則和平其氣。

8. 《本草綱目》：

土愛暖而喜芳香，故肉蔻之辛溫，理脾胃而止吐利。暖脾胃，固大腸。

9. 《本草經疏》：

肉豆蔻稟火土金之氣，故味辛氣溫而無毒。入足太陰、陽明經，亦入手陽明大腸。辛味能散能消，溫氣能和中通暢。其氣芬芳，香氣先入脾，脾主消化，溫和而辛香，故開胃，胃喜暖故也。故為理脾開胃，消宿食，止泄瀉之要藥。香能辟惡除不祥，又中氣不虛則邪惡之氣不能入，故主鬼氣及溫中。脾主中焦，胃為後天生氣之本，脾胃之陽氣旺，則積冷心腹脹滿，霍亂，中惡，冷症，嘔沫冷氣，食不消，泄不止，小兒乳霍，諸證自除矣。

簡誤：大腸素有火熱，及中暑熱泄暴注，腸風下血，胃火齒痛，及濕熱積算盛，摻初起，皆不能。

10. 《本草蒙筌》：

味苦、辛，氣溫。無毒。所入經絡，惟手陽明。療心腹脹疼，卒成霍亂者可止；理脾胃虛冷，不消宿食者能溫。男婦傷暑血痢有功。小兒傷乳吐瀉立效。痢疾助之白粥飲，吐瀉佐以生薑湯。

11. 《本草乘雅》：

樂音曰肉。肉器曰豆。物盛曰蔻。蓋府器之存登穀者胃，其受盛者體，轉輸者用也。設具體無用，則穀食不消，心腹脹痛，霍亂飧泄，嘔沫乳霍矣。此以寒中積冷，中惡鬼氣之所致。肉豆蔻秉剛燴氣味，鼓發中黃，寇之使出，所謂開發上焦，宣五穀味而為養，宣五畜味而為充，充則肌肥而美滿，養則膚潤而媚好，命名肉豆蔻者以此。

以受為體，以輸為用，具體無用，則能受不輸，中消洞泄之類，可

比量推度矣。

12. 《藥性解》：

味苦辛澀，性溫，無毒，入肺、胃二經。療心腹脹痛、卒成霍亂、脾胃寒弱、宿食不消、虛冷瀉痢，小兒傷乳吐瀉，尤為要藥。忌見鐵器。

按：肉豆蔻即肉果，辛溫之性，宜入脾胃。有未去之積者，不可先以此澀之。

13. 《藥鑒》：

氣熱，味大辛，屬金與土，入手足太陰經藥也。惟其氣溫，故能溫中補脾。又言下氣者，蓋以脾得補而善運化，其氣自下，非若香附、陳皮之快泄也。惟其味辛，故能散肺中滯氣，除隔上吐逆，消穀食，開腹脹。合氣與味，又能止泄。大都溫能補脾，辛能散滯。脾得溫以補之，則運化之令司，而漏下之患除。肺得辛以散之，則清化之源司，而淡滲之令強，何泄之有？

14. 《景岳全書》：

味苦辛而澀，性溫。理脾胃虛冷，穀食不消；治大腸虛冷，滑泄不止。以其氣香而辛，故能行綜痛，和腹脹，治霍亂，調中下氣，開胃進食，解酒毒，化痰飲，溫胃逐蟲，辟諸惡氣，療小兒胃寒傷乳吐瀉。以其能固大腸，腸既固則元氣不走，脾氣自健，故曰理脾胃虛冷，而實非能補虛也。麵包煨熟用，或銼如豆大，以乾麵拌炒熟，去麵用之尤妙，蓋但欲去其油而用其熟耳。

15. 《本草備要》：

肉豆蔻一名肉果，燥脾澀腸。

辛溫氣香。理脾暖胃，下氣調中，逐冷祛痰，消食解酒。治積冷心腹脹痛，挾痰挾食者并宜之。中惡吐沫，小兒吐逆，乳食不下。又能澀

大腸，止虛瀉冷痢。初起忌用。忌鐵。

16. 《本經逢原》：

肉豆蔻辛香，入手足陽明，溫中補脾，寬膨脹，固大腸，為小兒傷乳、吐逆泄瀉之要藥。二神丸合補骨脂治腎瀉，蓋取補脾以治腎邪也。按：脾土性喜芳香，故肉果與脾胃最為相宜。以其能下氣者，脾胃得補則健運，非若厚朴、枳實之峻削也。熱鬱暴注禁用，以其辛溫性榜。

17. 《本草求真》：

〔批〕燥脾、溫胃、澀腸。

肉豆蔻專入脾胃，兼入大腸。辛溫氣香，兼苦而澀。功專燥脾、溫胃、澀腸，時珍曰：土愛暖而喜芳香，故肉豆蔻之辛溫，理脾胃而治吐利。行滯治膨消脹。凡脾胃虛寒挾痰食，而見心腹冷痛、泄瀉不止，服此氣溫，既能除冷消脹，復能澀腸止痢；若合補骨脂同用，則能止腎虛泄也。至書所云能補脾氣，以其脾胃虛寒，服此則溫而脾自健，非真具有甘補之意也。氣逆而服即下，以其脾胃既舒而氣即下，非若厚朴、枳實之下為最峻也。但此止屬溫胃澀腸之品，若鬱熱暴注者禁用。

18. 《得配本草》：

辛，溫。入手足陽明經。理脾暖胃，溫中下氣。化痰飲，消宿食，解酒毒，辟惡氣。治積冷。除心腹脹痛，澀大腸，止瀉痢、滑泄及小兒胃寒，傷乳吐瀉。

配木香，下氣消脹；脾健運，氣自下。配補骨脂，使戊癸化火以運穀氣。

摻初起，及暴注火瀉者，禁用。

肉果補土中之火，制土之濕也，亦所以潤土之燥。蓋脾本濕，虛則燥，然其燥有二，如夏火灼乾之燥，如秋涼清肅之燥。火盛以致燥者，

當用水潤之，生熟地、麥冬之類是也。用寒用熱，治毋混施。

19. 《本草新編》：

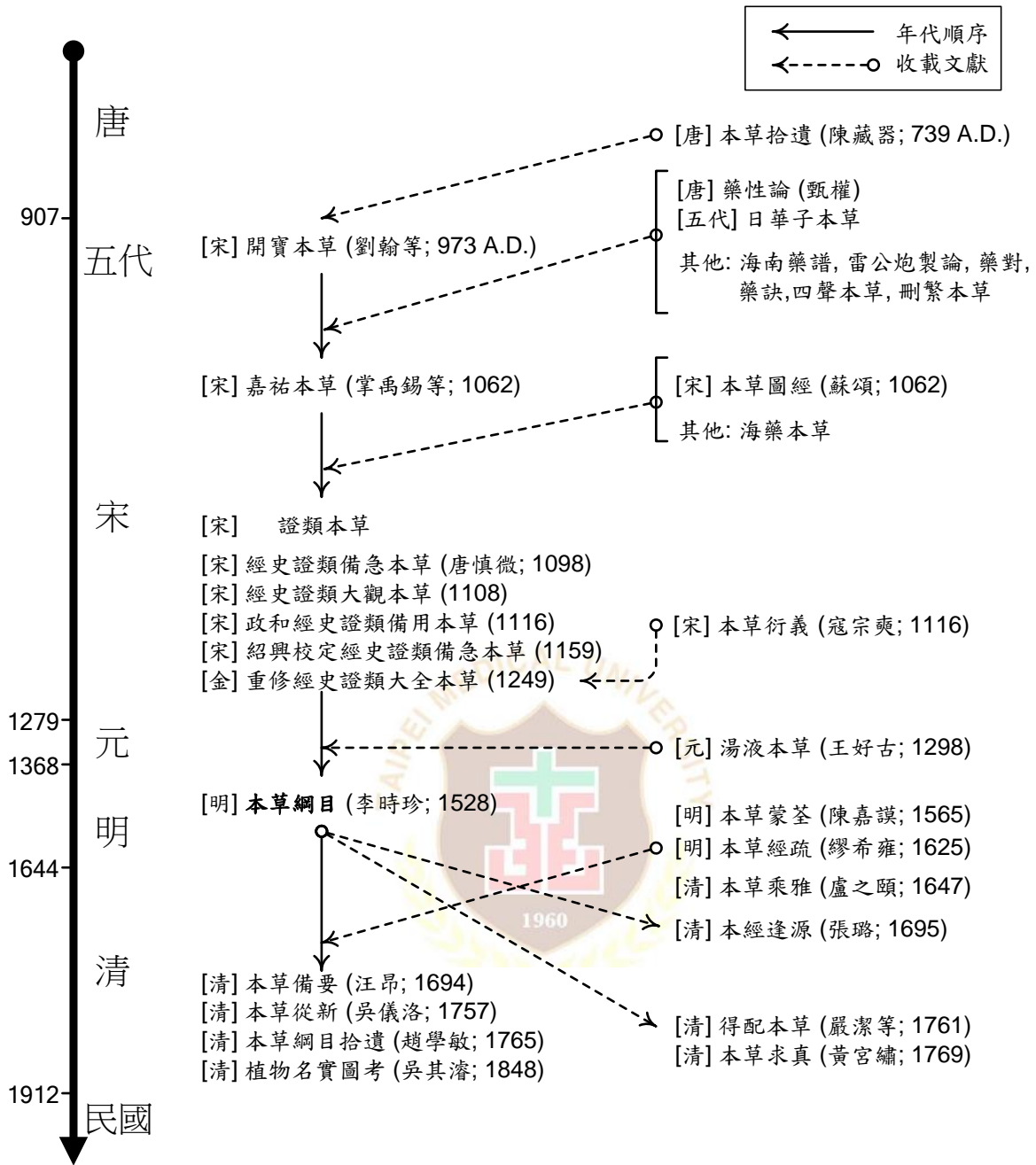
味苦、辛，氣溫，無毒。一名肉果。入心、脾、大腸經。療心腹脹疼，止霍亂，理脾胃虛寒，能消宿食，專溫補心包之火，故又入膻中與胃經也。但能止下寒之瀉，而不能止下熱之痢，從前《本草》，多信治血痢有功，而不言其止瀉痢。夫瀉不同，五更時痛瀉五六次，到日間反不瀉，名大瘕瀉也。大瘕瀉者，腎瀉也。腎瀉，乃命門無火以生脾土，至五更亥子之時，正腎氣正令之會，腎火衰微，何能生土，所以作瀉。故大瘕病，必須補命門之火，火旺而土自堅矣。肉豆蔻，非補命門之藥也，然命門之火上通，心包之火不旺，而命門愈衰，故欲補命門，必須上補心包也。膻中，即心包，一物而兩名之。肉豆蔻補心包火，補心包，正所以補命門也。況理脾胃寒虛，原其長肢，命門旺，而脾胃又去其虛寒。脾胃得腎氣，自足以分清濁而去水濕，又何至五更之再瀉哉。

或問肉豆蔻開胃消食，子舍而不談，反言其能止大瘕之瀉，亦何舍近而言遠乎？曰：大瘕之瀉，正所以表肉豆蔻之開胃而消食也。凡人命門之火不旺，則不焦陰寒何能蒸腐水穀。下不能消，所以瀉也。瀉久則亡陰，陰亡則腎不能交於心包，而心包亦寒。心包寒，則火不能生胃，而胃又寒。胃寒，則胃氣蕭索，又何能消食耶。肉豆蔻，溫補命門而通胞，兩火相生於上下，水瀉止，而脾胃之氣自開，不求其消食而自化。言止腎瀉，而開胃消食即在其中，又何必再言哉。

或問肉豆蔻暖胃而健脾，溫腎而止瀉，故入之四神丸中，以治脾腎寒虛之作瀉，然而有效、有不效者，何故？蓋腎虛作瀉，又有不是命門之寒，故服四神丸，而反多後重之症矣。夫腎虛未有不寒者，寒則瀉。不寒則何以瀉。乃飲酒過多，又加色慾，使酒濕入於腎之中，故作瀉也。

倘亦以肉豆蔻治之，安能治腎寒者速效哉。

肉豆蔻為傳統常用中藥及香料來源，根據中國古代本草考察最早記載於唐朝《藥性論》：「君，味苦，辛。能主小兒吐逆，不下乳，腹痛，治宿食不消痰飲。」，並於宋朝正式收載在官修本草《開寶本草》中：「味辛，溫，無毒。主鬼氣，溫中，治積冷，心腹脹痛，霍亂中惡，冷症，嘔沫冷氣，消食止泄，小兒乳霍。」，由此可見在中國古代主要用於消化不良、細菌性痢疾、腹瀉、腹痛等消化道疾病。而至明朝《本草經疏》則記載肉豆蔻：「香能辟惡除不祥，又中氣不虛則邪惡之氣不能入，故主鬼氣及溫中。」對於肉豆蔻富含的芳香氣味具有抵抗外來致病菌的功用有了初步的描述；到了清朝《本草乘雅》則描述：「肉豆蔻秉剛燭氣味，鼓發中黃，寇之使出，所謂開發上焦，宣五穀味而為養，宣五畜味而為充，充則肌肥而美滿，養則膚潤而媚好，命名肉豆蔻者以此。」，發現肉豆蔻對於皮膚具有修復容貌、滋潤等效果，根據以上對於中國古代本草典籍考查的結果，對於肉豆蔻用於抗菌、止痛以及皮膚的使用上得到了一些開發可能性的驗證。



圖五、肉豆蔻歷代本草系統圖^[18]

(五) 肉豆蔻藥理

1. 性味歸經：

辛，溫。歸脾、胃、大腸經。

2. 功效：

潤腸止瀉，溫中行氣。

3. 主治：

圖六、清朝吳其濬《植物名實圖考》肉豆蔻

用於脾腎虛寒久瀉。肉豆蔻辛溫而潤，既能潤腸止瀉，又能溫中暖脾。治脾胃虛寒，久瀉不止者，常與肉桂、黨參、白朮、訶子等同用，以溫中健脾，潤腸止瀉；治脾胃陽虛，五更泄瀉者，可與補骨脂、五味子、吳茱萸同用，如四神丸。

另用於胃寒脹痛，食少嘔吐。本品辛香溫燥，溫中、行氣、止痛作用。可用於胃寒氣滯、脘腹脹痛、食少嘔吐等證。常與木香、乾薑、半夏等同用。

4. 用法用量：

煎服，8~9克；入丸散服，每次0.5~1克。內服須煨熟去油用。

5. 注意禁忌：

濕熱瀉痢者忌用。

6. 肉豆蔻現代藥理作用^[15]

根據文獻回顧，肉豆蔻具有止瀉、鎮靜、抗發炎、抗菌、抗腫瘤以及保肝等作用，臨床上還用於治療頭痛、視力減退、瘧疾、霍亂、陽萎、齧齒等病。

7. 化學成分

肉豆蔻種仁主要含有揮發油類之成分如 myristicin、safrole、 α -pinene、 β -pinene、sabinene、 γ -terpinene、terpiene-4-ol、elemicin、limonene、



肉豆蔻

α -phellandrene、 β -phellandrene、 α -terpineol、 α -terpinolene、 δ -cubebene、 p -cymene、 o -cymene、2-carenes、3-carenes、4-carenes、 β -myrcene、 α -thujene、isoeugenol 等，以及木質素類成分如 macelignan、(+)-myrisfragransin、licarin A、licarin B、erythro-(3,4-methylenedioxy-7-hydroxy-1'-allyl-3',5'-dimethoxy)-8.0.4'-neolignan、erythro-(3,4-methylenedioxy-7-hydroxy-1'-allyl-3',5'-dimethoxy)-8.0.4'-neolignan acetate、3,4:3',4'-bis(methylenedioxy)lignan、meso-dihydroguaiaretic acid、otobaphenol 等，其他尚有間苯二酚類化合物如 malabaricones B 及 malabaricones C，其文獻回顧之藥理活性與成分整理如表四。但組成中黃樟素(safrole)，是一種無色或微黃色的油狀液體，屬於天然的殺蟲劑。經動物實驗，確定在生物的代謝過程中，會有致癌的風險^[19]。黃樟素被美國政府認定為弱致癌物質^[19]。現今被美國禁止使用於食品添加物、肥皂、香水，於中華人民共和國境內仍可合法使用，但在台灣仍未訂定其使用規範。另一成分肉豆蔻醚 (myristicin) 為有毒成分，有迷幻作用，過量食用時，將可能產生興奮及致幻作用甚至昏迷現象^[20]。肉豆蔻使用上常因這兩項成分而使得在應用上受限，這兩項成分為低極性物質常存在於肉豆蔻精油中，因此在本研究中企圖先對肉豆蔻原藥材進行水蒸氣蒸餾法，藉由萃取精油的同時去除 safrole 以及 myristicin 兩種成分，再對藥材殘渣進行管柱層析法進行活性成分分離。

表四、現代藥理考察文獻回顧整理表

藥理活性	成分
鎮靜	Trimyristin ^[21]
抗菌活性	Lignans : macelignan ^[22] ^[23] , meso-dihydroguaiaretic acid ^[23] , nectandrin B ^[23] Essential oils ^[24] : α -pinene, β -pinene, sabinene, γ -terpinene, terpiene-4-ol, elemicin, limonene, α -phellandrene, β -phellandrene, α -terpineol, α -terpinolene, δ -cubebene, <i>p</i> -cymene, <i>o</i> -cymene, 2-carenes, 3-carenes, 4-carenes, β -myrcene, α -thujene Malabaricones C ^[25] , myristic acid ^[26]
抗發炎、止痛	Macelignan ^[27] ^[28]
抑制黑色素生成	Macelignan ^[29]
抗腫瘤	Meso-dihydroguaiaretic acid ^[30]
保肝	Myristicin ^[31]
抗氧化	Essential oils ^[32] , eugenol, macelignan, (7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-4,5-dihydroxy-3,3-dimethoxy-7,7-epoxylignan ^[33] , (+)-erythro-(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-8-4,7-dihydroxy-3,3,5-trimethoxy-8- <i>O</i> -4-neolignan-8-ene ^[33] , (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2-propanediol ^[33]
抗血小板凝集	Essential oils ^[34] ^[35] : eugenol ^[34] ^[35] , isoeugenol ^[34] ^[35]
致幻	Myristicin ^[16]
神經保護	Meso-dihydroguaiaretic acid
促進成骨細胞分化	Machilin A ^[36]
減肥	Tetrahydrofuroguaiacin B ^[37] , nectandrin B ^[37] , nectandrin A ^[37]
增加腸道通透性	Neolignans ^[38] : Dehydrodiisoeugenol, 5-methoxydehydrodiisoeugenol, licarin B, 2,3-dihydro-7-methoxy-3-methyl-2-[3,4-(methylenedioxy)-5-methoxyphenyl]-5-propenylbenzofuran, erythro-2-(4-allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propane, erythro-2-(4-allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-ol acetate, erythro-2-(4-allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-ol, erythro-2-(4-allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propane, myristicin, threo-2-(4-allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) propane-1-ol
抑制肝臟代謝	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-Acetoxy-2-(4-allyl-2,6-dimethoxyphenoxy)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)propane ^[39]
抑制運動功能	Myristicin ^[40] , 4-terpineol ^[40] , safrole ^[40]

三、實驗方法介紹

本研究將利用抑制痤瘡生長及抗發炎作用，做為評估中草藥及天然物之抗痤瘡之功效，其方法介紹如下：

(一) 抗菌實驗模式

痤瘡桿菌(*Propionibacterium acnes*)，它又名丙酸桿菌或初油酸桿菌，是一種厭氧革蘭氏陽性菌。平時即存在於人體毛囊中，是與肌膚共存的常在菌落。正常情況下並不危害人體。但研究指出，痤瘡患者每平方公分的皮膚含有數十萬隻的痤瘡桿菌，遠遠高於正常的皮膚，當毛孔阻塞、皮脂堆積於毛囊中時，將提供厭氧環境，使痤瘡桿菌過度繁殖。且在脂酶(lipase)作用下，將三酸甘油酯代謝成游離脂肪酸造成強烈皮膚刺激，釋放許多致發炎趨化因子，使得毛囊及毛囊周邊皮膚紅腫發炎而發生炎性丘疹、膿疱，形成臨床上膿皰性或囊腫性痤瘡並造成皮膚發炎反應。

金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的感染常引起肺炎、腦膜炎導致菌血症和敗血症等，嚴重則會危急生命安全。在皮膚感染中則引起毛囊炎以及造成蜂窩組織炎，在痤瘡的形成中，也會感染人體皮膚組織會造成壞死形成囊腫。

此兩株菌在痤瘡發生時會最主要且最為常見，因此利用此兩種細菌進行本論文之抗菌活性，評估對於細菌生長之抑制效果。

(二) 抗發炎實驗模式

當生物組織受到某種刺激如外傷、感染等發炎反應，一些特定的細胞因子就會活化自身的環氧酶(cyclooxygenase; COX)，其中包括COX-1及COX-2兩大類。COX會使花生四烯酸大量轉變為PGE₂和PGF_{2α}等前列腺素。而經由細胞介質訊息傳遞，細胞核會刺激iNOS mRNA增加促使iNOS蛋白質

大量表現，促進nitric oxide (NO)產生，使得血管內壁通透性上升進而使血球及免疫細胞大量進入抵禦外部的刺激或傷害並同時修補受傷之組織

根據文獻指出，脂多糖 (Lipopolysaccharide ; LPS) 是革蘭氏陰性細菌外膜的主要組成部分，為一種內毒素，可引起強烈免疫反應，促進免疫細胞分泌多種細胞因子產生。

另有文獻表示，痤瘡桿菌會分泌脂化酵素分解毛囊中皮脂變成游離脂肪酸，產生刺激性，使皮膚紅腫發炎，導致角質細胞產生IL-1 α 、TNF- α 和GM-CSF等發炎因子；且痤瘡桿菌細胞壁的Peptidoglycan通過上皮擴散至周圍組織，刺激巨噬細胞與免疫細胞產生IL-8、IL-1 β 以及TNF- α 。

故在本研究中選擇小鼠巨噬細胞RAW 264.7細胞，此免疫細胞經文獻報導可利用LPS^[41]及熱處理之痤瘡菌殘渣^[42]誘導其發生發炎反應，藉此模式來評估肉豆蔻對於抑制NO、PGE₂生成以及COX-2、iNOS蛋白表現量之效果，並探討其抗發炎效果機轉。

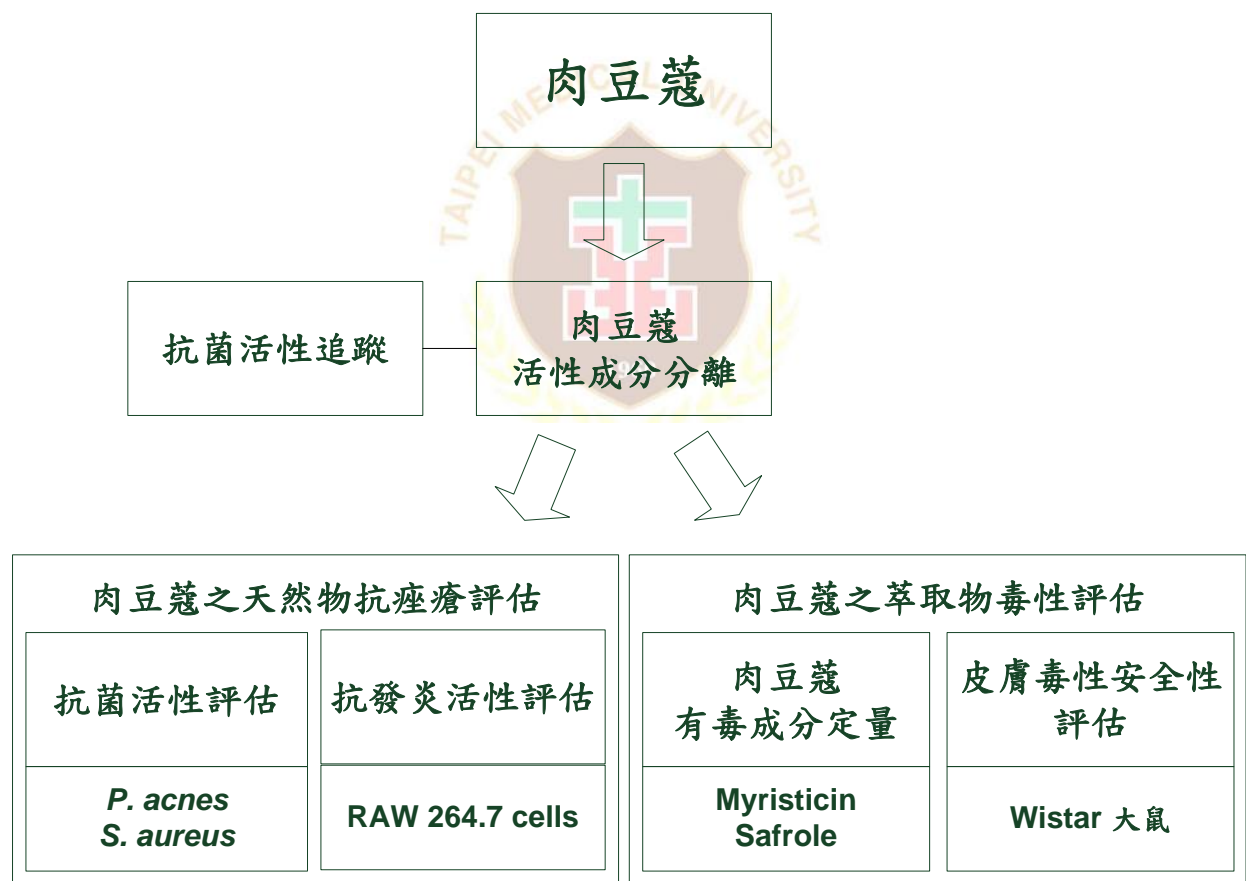
四、研究目的

在目前痤瘡的治療上，最後一線用藥為口服A酸及抗生素，但這些種類藥物通常有極大的副作用，因此開發天然且無副作用中草藥做為抗痤瘡之標的為一相當重要之課題。在本研究篩選27種中草藥萃取物後發現肉豆蔻相較其他中草藥具有強效之抗菌活性，且肉豆蔻於諸多古籍中均被描述有抗菌、潤膚等效果；而在現代藥理研究中肉豆蔻及其成分亦具有抑制大腸桿菌、綠膿桿菌生長及抗氧化之活性，但現代研究指出肉豆蔻含有肝毒性之 safrole 以及迷幻毒性之 myristicin，這兩項有毒成分限制了肉豆蔻的應用性。

Safrole 及 myristicin 在物性上屬於低極性物質，常出現在肉豆蔻之精油中，因此本研究嘗試先除去精油期望減少在萃取物中有毒成分含量，以達到減少毒性而擴大肉豆蔻之應用性，使肉豆蔻成為一安全且有效之開發題材。

五、研究流程

本研究實驗流程首先利用紙錠擴散法以及瓊脂井化擴散法追蹤抗菌活性進行肉豆蔻管柱層析成分分離得到有效劃分部及成分並評估肉豆蔻天然物抗瘡瘡之活性，用稀釋液稀釋法評估對 *S. aureus* 及 *P. acnes* 兩株致病菌的抑制生長效果並同時針對 LPS 以及熱處理 *P. acnes* 誘導 RAW 264.7 細胞發炎檢測 NO、PGE₂ 含量、COX-2 以及 iNOS 蛋白的表現量；接著探討肉豆蔻萃取物之毒性，利用高壓液相析以及氣相層析質譜儀分析肉豆蔻萃取物及精油中被文獻報導出之可能有毒成分 myristicin 以及 safrole 含量，並以大鼠皮膚進行單一劑量毒性評估，藉以評估其安全可用性。(圖七)



圖七、肉豆蔻抗瘡瘡實驗流程圖

貳、實驗材料與方法

一、實驗材料

1. 中藥材料：肉豆蔻 (*Myristica fragrans* Houtt.) 購自臺北市中藥行。

2. 實驗菌株

(1) 金黃色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (BCRC 10781、ATCC 25923)，購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心

(2) 痤瘡桿菌 *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919)，購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心

3. 實驗細胞株：

RAW 264.7 細胞 (BCRC 10781、ATCC 25923)，購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心

4. 實驗動物

由國科會實驗動物中心購入，6-8 週齡雌性 Wistar 大鼠（實驗動物照護使用委員會審核編號：LAC-97-0171）

5. 試劑

(1) Methanol (Merck, Germany)

(2) Ethyl acetate (Merck, Germany)

(3) Acetonitrile (HPLC grade, Merck, Germany)

(4) Ether (analytic reagent, Merck, Germany)

(5) Tetrahydrofuran (HPLC grade, Lab-Scan, Ireland)

- (6) Trifluoroacetic acid (HPLC grade, J.T. Baker, USA)
- (7) Acetone (Merck, Germany)
- (8) Ethanol (Merck, Germany)
- (9) *n*-Hexane (Merck, Germany)
- (10) Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany)
- (11) Isopropanol (Merck, Germany)
- (12) Lipopolysaccharide (Sigma, USA)
- (13) Sodium Bicarbonate (Merck, Germany)

6. 試藥、分離管柱及管柱添充劑

- (1) Glass column (40mm i.d. × 700mm)
- (2) RP-18 (40~63 μ m) (Merck, Germany)
- (3) LiChrospher 100 RP-18e, 125 × 4mm i.d., 5 μ m (Merck, Germany)
- (4) Isopropanol (Merck, Germany)
- (5) Tryptic soy broth (TSB) (Difco, Sparks, MD, USA)
- (6) Tryptic soy agar (TSA) (Difco, Sparks, MD, USA)
- (7) Jojoba oil (Sigma, USA)
- (8) Trypan blue (Sigma, USA)
- (9) Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA)
- (10) L-Glutamine (Gibco, USA)
- (11) Fetal Bovine Serum (Gibco, USA)
- (12) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, UK)
- (13) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide
(MTT, Sigma, USA)
- (14) Acrylamide (Electran, UK)
- (15) Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Sigma, USA)
- (16) Ammonium persulfate (Sigma, USA)
- (17) *N,N,N',N'*-tetraethylethylenediamine (Sigma, USA)

- (18) Tween 20 (Sigma, USA)
- (19) Nitroblue tetrazolium chloride (Gibco BRL, Switzerland)
- (20) Silica cartridge (40mm i.d. x 150mm, VersaPak, USA)
- (21) Glass column (9 cm i.d.x45 cm)

7. 儀器設備

- (1) 細胞培養皿 (Cell culture dish, Falcon, USA)
- (2) 細胞培養盤 (Cell culture plate, Falcon, USA)
- (3) 均質機 (Ystral, D-7801, Germany)
- (4) 萃取槽
- (5) 水蒸氣產生器
- (6) 冷凝管
- (7) 錐形瓶集液器
- (8) 硬殼加熱包 (Glascol 及 Fargo)。
- (9) 純水製造機 (Millipore, Milli-RO 10, Milli-QRG, USA)
- (10) 減壓濃縮機 (Eyela, MF-10A, Japan)
- (11) 水浴鍋 (Eyela, SB-450, Japan)
- (12) Aspirator (Eyela, A-3S, Japan)
- (13) 冷凍乾燥機 (Eyela, FD-1, FD-5, Japan)
- (14) Gas-Chromatography Mass Spectrometer (Shimazu, Japan)
- (15) 加熱板 (Corning, USA)
- (16) High-Performance Liquid Chromatography system (Shimazu, Japan)
- (17) 超音波震盪機 (D200H, DELTA, Taiwan)
- (18) Clevenger-type 精油萃取裝置 (SIBATA scientific, Japan)
- (19) 真空幫浦 (VP-class, Panchum, Taiwan)

- (20) 離心機 (Eppendorf, 5415C, Germany)
- (21) 離心機 (Centrifuge tube, Kubota 5700, Japan)
- (22) Column oven (Shimadzu CTO-6A, Japan)
- (23) Spectrophotometric detector (Shimadzu, SPD-6AV, SPD-10A, Japan)
- (24) Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Avance DRX500, Germany)
- (23) MultiDoc-It Digital Imaging System
- (26) 培養箱 (Incubator, Espec BNA-211, Japan)
- (27) 無菌操作台 (Laminar flow, TsaoHsin, Taiwan)
- (28) 顯微鏡 (Microscope, Olympus Ut50A, Japan)
- (29) 分光光度計 (Micro-ELISA-spectrophotometer, Dyn-EX MRX, USA)



二、實驗方法

(一) 肉豆蔻成分含量分析及分離純化

1. 高效液相層析分析肉豆蔻精油及萃提取物中 myristicin 及 safrole 之含量

1.1. HPLC 分析系統

(1) Pump system : LC-10ATvp liquid chromatographic pump system

(2) Injection : SIL-9A auto-injector

(3) Detection : SPD-10A UV-VIS detector

(4) Recorder : C-R8A Chromatopac recorder

(5) Oven : CTO-10A column oven

1.2. 固定相

Purospher[®] STAR RP-18e reversed-phase column (5 μ m, 4 mm i.d. x 250 mm, Merck, Germany)

1.3 移動相 : CH₃CN-H₂O (60: 40, v/v)

1.4 偵測波長 : 220 nm

1.5 管柱溫度 : 40°C

1.6 標準檢量線製備

以 LC 級甲醇溶解 myristicin 及 safrole 後，等倍稀釋成 0.78 μ g/ml 至 1000 μ g/ml 共 8 個濃度。以標準品濃度為 X 軸，利用 HPLC 分析得到之積分面積值為 Y 軸計算出線性迴歸方程式。

1.7 分析方法之確效

1.7.1 同日內分析

將肉豆蔻萃取樣品，利用 HPLC 於同日內重複分析 3 次，統計出 3 次結果之平均值及標準差，並計算其變異係數。

1.7.2 異日差分析

將肉豆蔻萃取樣品，利用 HPLC 於同日內重複分析 3 次，統計出 3 次結果之平均值及標準差，並計算其變異係數。

2. 氣相層析質譜儀分析肉豆蔻精油含量

2.1 氣相層析質譜儀條件

Gas chromatograph : GC-2010 gas chromatograph system

Mass spectrometer : GCMS-QP2010 system

2.2. 固定相 : DB-5MS column (0.25 mm i.d. × 30 m × 0.25 μm film)

2.3. 移動相 : Helium

2.4. 注射溫度 : 150°C

2.5. 離子化溫度 : 200°C

2.6. GC oven 時間梯度

起始溫度為 50°C，維持 5 分鐘後，溫度以 20°C/min 之速率上升 10 分鐘，最後維持在 250°C。

2.7. Mass 掃描範圍 : 40 ~ 800 amu

2.8. 比對之資料庫 : NIST/EPA/NIH database

2.9. 檢品配製

由水蒸氣蒸餾法萃取得之精油，取樣品 2 μl 溶於 998 μl 的甲醇中，以 1:100 分流方式注入 1 μl 樣品溶液於 GC-MS 中。

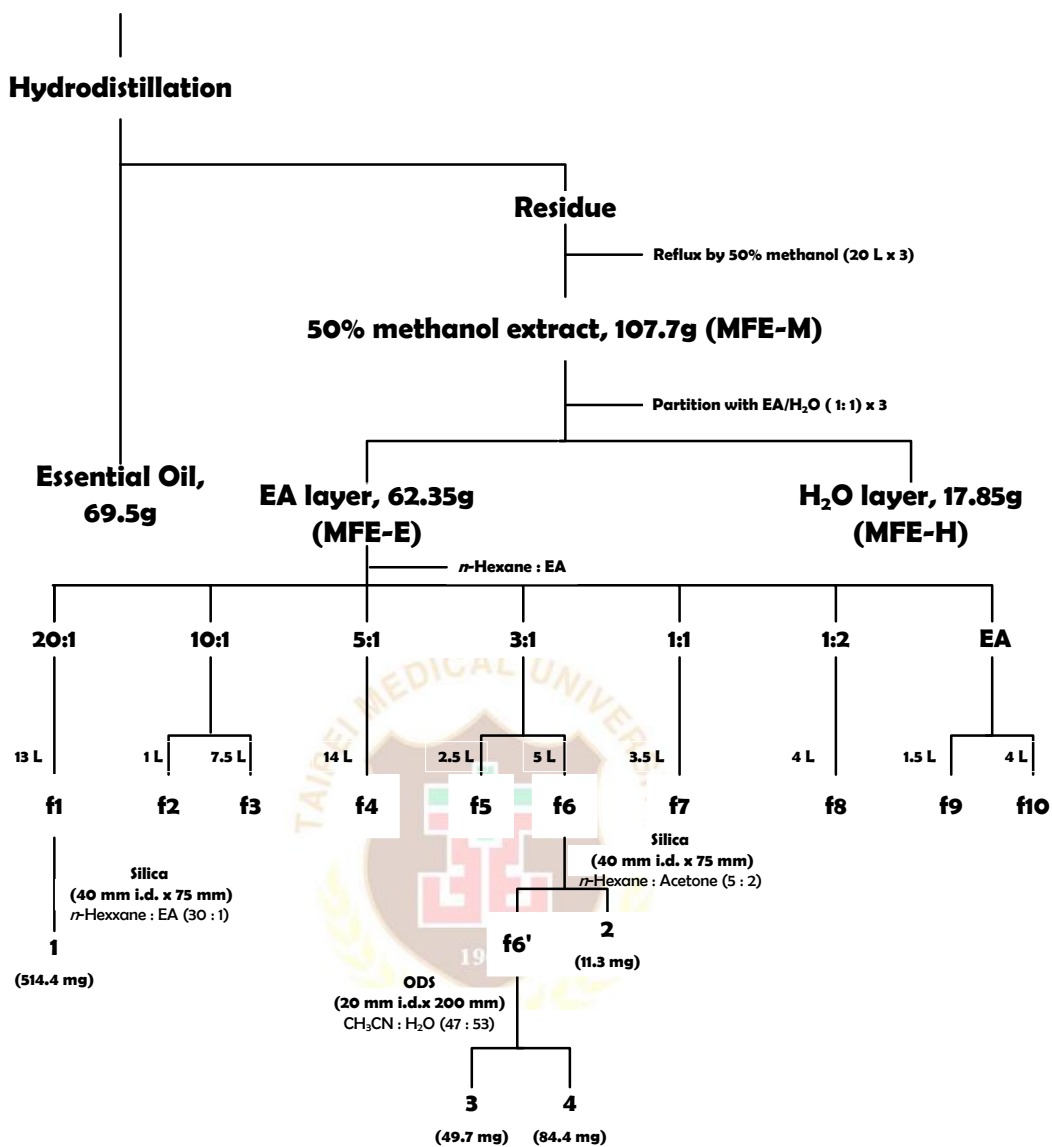
3. 肉豆蔻分離純化

本研究將肉豆蔻藥材 2 公斤用均質機絞碎後，置入不鏽鋼圓形萃取槽中，由水蒸氣產生器將蒸氣導入萃取槽中，經冷凝管冷卻後，由矽膠管導入集液器中，蒸氣蒸餾 2 小時後收集精油，隨後靜置 1 小時取油層。依照上述實驗方法獲得之肉豆蔻精油(萃自種仁用部之肉豆蔻精油以下簡稱 essential oil)。剩餘肉豆蔻殘渣以 20 公升 50% 甲醇萃取三次。合併濾液且並於 40 °C 下減壓濃縮，濃縮液即肉豆蔻之粗萃液，經冷凍乾燥後取得萃取物(以下簡稱 MFE-M)。

MFE-M 以等量乙酸乙酯及二次蒸餾水溶解後液相分配萃取，取得乙酸乙酯層(以下簡稱 MFE-E)及水層萃取液(以下簡稱 MFE-H)，經濃縮後分別冷凍乾燥。經抗菌活性追蹤取 MFE-E 以矽膠管柱(9 cm i.d.x45 cm)進行粗分，將 *n*-hexane 從 100% 梯度換至 EA 100% 進行沖提，其中 *n*-hexane : EA = 20:1 收取 13L 沖提物濃縮後，經由矽膠管柱進行純化(40 mm i.d.x75 mm silica cartridge, VersaPak™; *n*-hexane : EA = 30 : 1)，得到**(1)**。

再取 *n*-hexane : EA = 3:1 收取 5L 濃縮後，沖提物經由矽膠管柱進行純化(40 mm i.d.x75 mm silica cartridge, VersaPak™; *n*-hexane : acetone = 5 : 2)後，得到 **(2)**，再經由 ODS 管柱進行純化(40 mm i.d.x200 mm ; acetonitrile : H₂O = 47 : 53) 得到**(3)**和**(4)**，分離流程如圖八所示。

Dried seeds of *Myristica fragrans*, 2 kg



圖八、肉豆蔻成分分離流程圖

(二) 肉豆蔻抑制痤瘡致病菌生長之評估

1. 菌株培養

1.1. 試液配製

1.1.1. 液態培養液配置

將 30 克 tryptic soy broth (以下簡稱 TSB) 溶於 1 公升之二次去離子水後攪拌均勻，經加熱攪拌至完全溶解後，置於高壓滅菌鍋中以溫度 121°C，壓力 1.2 kg/cm² 下滅菌 30 分鐘，冷卻至室溫後儲藏於 4°C 冰箱備用。

1.1.2. 固體培養基配置

將 40 克 tryptic soy agar (以下簡稱 TSA) 溶於 1 公升之二次去離子水後攪拌均勻，經高壓蒸氣滅菌後，將其 10 ml 分裝於 10 公分培養皿中使其凝固，儲藏於 4°C 冰箱備用。

1.2. 培養方法

1.2.1. 細菌之解凍

1.2.1.1. *S. aureus*

將冷凍之菌株由 -80°C 冰箱中取出，於 37°C 水浴下解凍，取出含細菌液之膠球於固體培養基上利用四區畫線法接種，於 37°C 培養箱中培養 2 天。經活化成功後取純化乾淨之菌落接種於滅菌後之 10 毫升含蓋試管利用液體培養液中於 37°C 培養箱中培養。

1.2.1.2. *P. acnes*

將冷凍之菌株由 -80°C 冰箱中取出，於 37°C 水浴下解凍，取出含細菌液之膠球於固體培養基上利用四區畫線法接種，將培養皿及厭氧包置於厭氧箱中緊密關閉，於 37°C 培養箱中培養。

1.2.2. 繼代培養

1.2.2.1. *S. aureus*

先將火燒滅菌之接種環沾取試管中的菌液後，接種於另一含 10 ml 培養液之含蓋試管中，放回培養箱在 37°C 中培養。

1.2.2.2. *P. acnes*

先將火燒滅菌之接種環挑取純化之菌落於含 10 ml 培養液之含蓋試管中混合均勻後，再由火燒滅菌之接種環沾取試管中之菌液，於另一含培養基之培養皿中畫盤接種，放回培養箱在 37°C 中培養。

2. 抑制細菌生長之評估方法

2.1. 瓊脂井化擴散法 (Agar Well Diffusion Method)

2.1.1. 分析原理

本實驗因肉豆蔻精油易揮發之特性，故將原本需製成紙錠之精油，改良方法為製作平板培養基時，預先以滅菌完成直徑 8 mm 之不銹鋼圓環井化之，再將欲試驗之精油 50 μ L 滴入預鑄完成之凹槽內。

最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration 以下簡稱 MBC) 及最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration 以下簡稱 MIC) 是將抑菌環直徑內之透明區域，以用接種環將菌液植入培養皿中，於 37°C 恆溫培養 24 小時。培養皿未有細菌生長所加入的最小的試藥或化合物濃度為 MBC，反之則為 MIC。

2.1.2. 含菌培養基配製方法：

將 40 克 TSA 溶於 1 公升之二次去離子水後攪拌均勻，經加熱攪拌至完全溶解後，置於高壓滅菌鍋中以溫度 121°C，壓力 1.2 kg/cm² 下滅菌 30 分鐘，再以 1:9 比率加入濃度為 McFarland 0.5 濁度標準 (1.5x10⁸ CFU/ml) 之 *S. aureus* 培養液或 4 濁度標準 (12x10⁸ CFU/ml)

之 *P. acnes* 培養液，於尚未凝固時將上述混合液每 10 ml 分裝於培養皿中，於 37°C 恆溫培養 24 小時。

2.2. 紙錠擴散法 (Filter-paper Disc Agar Well Diffusion Method)

2.2.1. 分析原理

本實驗將預測肉豆蔻萃取物，用溶媒充分溶解後，換算其劑量將其低於紙錠上烘乾，再將其貼在含菌之培養基上。

最小殺菌及最小抑菌濃度是將抑菌環直徑內之透明區域，以用接種環將菌液植入培養皿中，於 37°C 恆溫培養 24 小時。培養皿未有細菌生長所加入的最小的試藥或化合物濃度為 MBC，反之則為 MIC。

2.2.2. 培養基配製方法

將 40 克 TSA 溶於 1 公升之二次去離子水後攪拌均勻，經加熱攪拌至完全溶解後，置於高壓滅菌鍋中以溫度 121°C，壓力 1.2 kg/cm² 下滅菌 30 分鐘，再以 1:9 比率加入濃度為 McFarland 0.5 濁度標準 (1.5×10^8 CFU/ml) 之 *S. aureus* 培養液或 4 濁度標準 (12×10^8 CFU/ml) 之 *P. acnes* 培養液，於尚未凝固時將上述混合液每 10 ml 分裝於培養皿中，於 37°C 恆溫培養 24 小時。

2.3. 培養液稀釋法 (Broth Dilution Method) [43] [44] [45]

2.3.1. 分析原理

本實驗將分離得化合物分別溶於 100% DMSO，濃度 10 mg/ml 作為儲備溶液。化合物以 TSB 做等倍稀釋，加入 96 孔盤培養，將不同濃度之化合物取 20 μ l 依序加入充滿 180 μ l 菌液之培養盤中，充分混合，作三重覆取其平均。本實驗之正對照組為 1% Triton X-100，負對照組為菌液，溶媒對照組為 1% DMSO。

MIC 是將培養盤於 37°C 培養箱中培養 (*S. aureus* 為 18 小時；

P. acnes 為 36 小時) 後以吸光值 600 nm 測試。

2.3.2. 96 孔盤菌液配製方法：

將 30 克 TSB 溶於 1 公升之二次水後攪拌均勻，經加熱攪拌至完全溶解後，置於高壓滅菌鍋中以溫度 121°C，壓力 1.2 kg/cm² 下滅菌 30 分鐘；再以稀釋 10³ 倍加入濃度為 McFarland 4 濁度標準 (12 × 10⁸ CFU/ml) 之 *S. aureus* 或 *P. acnes* 培養液。

製備完菌液後，加 180 μl 於 96 孔盤中，之後再將配置好不同濃度之化合物樣品取 20 μl 依序加入培養盤中，對照組一樣取 20 μl 加入 180 μl 菌液中，每格總體積為 200 μl；空白組則為 200 μl TSB。於 37°C 培養箱中培養(*S. aureus* 為 18 小時，*P. acnes* 培養時間為 36 小時) 後以吸光值 600 nm 測試。

2.3.3. 抑制百分比：

$$IC\% = \left[1 - \left(\frac{\frac{\text{實驗組 O.D. 值} - \text{空白組 O.D. 值}}{\text{負對照組 O.D. 值} - \text{空白組 O.D. 值}}}{\frac{\text{正對照組 O.D. 值} - \text{空白組 O.D. 值}}{\text{負對照組 O.D. 值} - \text{空白組 O.D. 值}}} \right) \right] \times 100\%$$

(三) 肉豆蔻抑制發炎活性評估

1. RAW 264.7 細胞培養

1.1. 試液配製

1.1.1. 培養液配製

將 DMEM 及 3.7 g NaHCO_3 溶於 1 升之滅菌水後攪拌均勻，將 pH 值調至 7.4，以 0.22 μm 之濾膜過濾，再加入 10 % Fetal bovine serum，1 % L-Glutamine 及 1 % Penicillin-Streptomycin。

1.1.2. Phosphate buffer solution (PBS)之配製：

KCl	0.20 g
NaCl	8.00 g
Na_2HPO_4	1.14 g
KH_2PO_4	0.20 g

用蒸餾水配製成 1 公升的 PBS 儲存溶液，使用前以蒸餾水稀釋 10 倍再經高壓滅菌後使用。

1.2. 培養方法

1.2.1. 細胞之解凍

將冷凍之細胞由 -80°C 冰箱中取出，於 37°C 水浴下解凍，取出細胞液混合 5 ml 之培養液於 15 ml 離心管中，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，吸去上清液，加 10 ml 培養液，將細胞移至 10 公分培養皿中，於 37°C ，含 5% CO_2 的培養箱中培養。

1.2.2. 繼代培養

先將培養皿中的舊培養液吸出，用 PBS 清洗一至兩遍，吸出 PBS，加入培養液調整細胞至適當濃度，分配至 10 公分培養皿中，再放回

培養箱在 37°C，5% CO₂ 中培養。

1.2.3. 細胞數目的計算

用 RAW 264.7 細胞懸浮液後，取出 0.5 ml 加入 2 ml 的培養液置於微量離心管中。混合均勻後，取出 15 μl 與等量的 trypan blue 混合均勻，再吸出 15 μl 放入血球計數器上。用血球計數器記錄井字之四角各 25 小格之活細胞數。反覆三次，求平均值。

1.2.4. 總細胞數

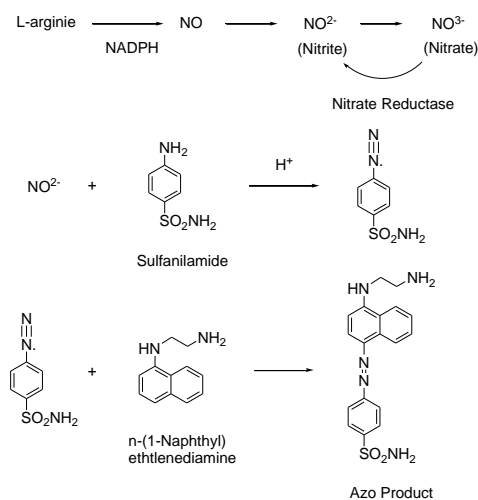
$$\text{總細胞數} = \frac{\text{平均值}}{4} \times 2 \times 5 \times 10^4 \text{ 個/ml}$$

2. LPS 或 *P. acnes* 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應之作用評估

2.1. Griess Reaction 之 Nitric oxide 測定

2.1.1. 分析原理：

以LPS或經熱處理之*P. acnes*誘導 RAW 264.7 細胞產生nitric oxide (以下簡稱NO)，NO在酸性條件下遇到sulfanilamide 及 naphthylethylene- diamine-dihydrochloride產生紅色的Azo Product，用ELISA波長530 nm測定。



圖九、 Griess Reaction 反應圖

2.1.2. Griess reagent 配製方法

Sulfanilamide	5.00 g
NaphthylEthylene	0.50 g
Diaminedihydrochloride	
85% H_3PO_4	30.0 ml
H_2O	470 ml

混合最終濃度為 1% Sulfanilamide，0.1% naphthyl-ethylene diamine-dihydrochloride，5% H_3PO_4 。

2.1.3. 熱處理 *P. acnes*

將 *P. acnes* 培養後挑出菌落於 TSB 中調整為 4 濁度標準，用 PBS 清洗兩次去除 TSB，在溫度 80°C 水浴鍋加熱 30 分鐘殺死細菌。細菌之殘渣以冷凍乾燥處理後備用。

2.1.4. 分析步驟

RAW 264.7 細胞數目 4.0×10^5 /ml 200 μ l 植入 96 孔盤中，24 小時後加入檢測品及 LPS 1 μ g/ml 或熱處理 *P. acnes* 100 μ g/ml 培養 18 小時，取出上清液 100 μ l 並加入 Griess reagent 100 μ l 測試，利用 $NaNO_2$ 製作檢量線，以 ELISA reader 530 nm 為 NO 之吸光值測試。

2.1.5. 抑制百分比 (Concentration of Inhibition IC %)

$$IC\% = \left[1 - \left(\frac{\text{實驗組 O.D. 值}}{\text{對照組 O.D. 值}} \right) \right] \times 100 \%$$

2.2. PGE₂ 測定

配置 PGE₂ 標準品濃度 2.5-320 pg/ml，加入 50 µl 之標準品及樣品至 96-well kit，加入 50 µl 之抗體及 50 µl conjugate 後，加蓋於室溫下振搖 1 小時以 wash buffer 清洗 4 次，加入 150 µl substrate 在室溫下振搖 30 分鐘，在加入中止試劑 100 µl 至每個 well 中以 450nm 波長測試。

2.3. 西方點墨法分析 iNOS、COX-2 蛋白表現

2.3.1. 分析原理

SDS 是介面活性劑，可使蛋白質變性，並在分子表面均勻佈上一層負電荷。因此在 SDS-PAGE 系統中，樣本分子的泳動率，僅取決於其分子量，而與原來分子所帶的電荷無關，故 SDS-PAGE 可用來測定變性狀態(denatured)蛋白質之分子量，與原態(native)分子量可能不一樣。梯度電泳系統梯度電泳使用由稀到濃的梯度膠體，膠體中的孔徑由上到下逐漸變小，樣本中分子量越小的分子，就可跑得越下面，因此是依分子量大小來分離。但需注意許多 pI 大於 8.3 的蛋白質，在電泳 pH 條件下所帶的淨電荷為正，在膠體中根本不會移動。

2.3.2 試劑製備

(1) 懸浮緩衝液(Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, RIPA)

50mM Tris-HCl, pH 7.4、1 % NP-40、0.25 % Sodium deoxycholate、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM PMSF、1 µg/ml Aprotinin、1 µg/ml Leupeptin、1 µg/ml Pepstatin、1 mM Na₃VO₄、1 mM NaF。

(2) Running buffer

0.25 M Tris-base、0.192 M Glycin、0.1 % SDS。

(3) Transfer Solution (pH 8.3)

0.25 M Tris-base、0.192 M Glycin、20 % MeOH。

(4) Blocking Solution

1 % Bovine Serum Albumin、0.1 % Tween 20、0.1 % NaN_3 in PBS。

(5) AP buffer

100 mM NaCl、5 mM MgCl_2 、100 mM Tris base, pH 9.5。

(6) NBT/BCIP 之呈色劑

將 NBT/BCIP 1 : 1 加入 AP buffer。

2.3.3. SDS-PAGE 之製作

(1) 10 % Tris-glycine SDS-polyacrylamide gel

H ₂ O	1.9 ml
30 % acrylamide	1.7 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	1.3 ml
10 % SDS	0.05 ml
10 % ammonium persulfate	0.05 ml
TEMED	0.002 ml
<hr/>	
	5.000 ml

(2) 5 % Stacking gel

H ₂ O	1.4 ml
30 % acrylamide	0.33 ml
1 M Tris (pH6.8)	0.25 ml
10 % SDS	0.02 ml
10 % ammonium persulfate	0.02 ml
TEMED	0.02 ml
<hr/>	
	2.0 ml

2.3.4. 分析步驟

收集已處理過的細胞，加入 50 μl 之 RIPA，冰浴 30 分鐘將細胞溶解。細胞溶解液在 4 °C 下，15000 rpm 離心 30 分鐘。取上清液，利用 Bradford 法定量總蛋白質含量。取 25 μg 之蛋白質樣本，注入已

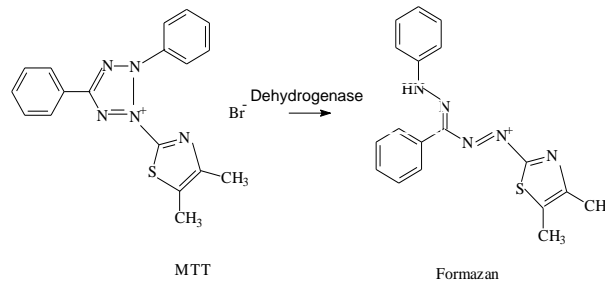
配置好之 10 % SDS-PAGE 膠體中。在 95 V 下電泳三小時後，利用電轉印槽 (Electrotransfer tank) 以 250 mA 將蛋白質自 SDS-PAGE 轉印至 Hybond-PVDF 膜，轉印完成後，以 1 % BSA blocking solution 作用 1~2 小時，再取出 PVDF 膜，置入 1:1000 之一級抗體，於 4 °C 下持續振搖作用隔夜。取出 PVDF 膜，以 PBST 振搖 5 分鐘，清洗 3 次。再加入 1 : 5000 之二級抗體，作用 1 小時後，以 PBST 振搖 5 分鐘，清洗 3 次。加入 NBT/ BCIP 之呈色劑，室溫下避光，至呈色後加入清水洗去呈色劑後晾乾。



3.細胞毒性試驗：MTT Assay

3.1. 分析原理

利用黃色 MTT 溶液被活細胞粒線體內的去氫酶間接還原成 formazan 呈紫黑色結晶如圖十，以含 0.04 N 鹽酸之異丙醇將結晶溶解，在 600 nm 波長下測吸光度，計算細胞存活率。



圖十、 MTT 被活細胞粒線體內的去氫酶間接還原成 Formazan 之原理

3.2. MTT 溶液的配製

精秤 50 mg MTT，加入 10 ml 1 % PBS 溶解後，以 0.22 μ m 濾膜過濾，避光儲存於 4°C 冰箱備用。

3.3. 分析步驟

將 96 孔盤中與藥物作用過後之 RAW 264.7 細胞吸取其上清液測定 NO 含量，剩餘的細胞部份以 PBS 清洗 2 次後離心，將上清液除去，加入 90 μ l 之 DMEM 及 10 μ l MTT (500 μ g/ml) 靜置 4 小時後離心，並取出 50 μ l 之上清液，再加入 200 μ l 含 0.04 N 之 HCl Isopropanol 至 Formazan 結晶溶解後以 ELISA reader (600 nm) 測吸光值。

3.4 抑制百分比 (Cytotoxicity Index ,CI %) :

$$CI\% = \left[1 - \left(\frac{\text{實驗組 O.D. 值}}{\text{對照組 O.D. 值}} \right) \right] \times 100 \%$$

(四) 肉豆蔻單一劑量皮膚毒性試驗

1. 實驗動物分組

取 6-8 週齡雌性 Wistar 大鼠，飼養於 12 小時光照 12 小時無光照循環交替之環境中，溫度控制於 25 ± 1 °C，給予充足的水與飼料。每個檢品劑量組 3 隻，共分九組。

1.1. 空白組：荷荷芭油

1.2. 正對照組：A 酸軟膏

1.3. 實驗組：

蒸餾萃取之肉豆蔻精油 100 %。肉豆蔻精油利用荷荷芭油稀釋後觀測肉豆蔻精油皮膚刺激的強弱，使用濃度為 80、20 及 10 % 稀釋。

另取殘渣之 50% 甲醇萃取之乙酸乙脂層萃取物以乙醇稀釋成 1 mg/ml、0.1 mg/ml 兩種濃度。

1.4. 負對照組：

Safrole 為肉豆蔻精油中之主要致肝毒性之有毒成分，myristicin 為肉豆蔻精油中可能產生精神毒性之物質，因此分別以高濃度 3.6% /site、2.1% /site 為測試劑量。

2. 實驗方法

將測試動物 Wistar 大鼠於測試前將背部之毛剔除。剔毛 24 小時後，先行檢測皮膚是否完整無過敏現象，再將製備不同濃度的標準品及肉豆蔻精油，塗抹於老鼠背上，每隻塗抹 3 處，每處塗抹面積為 $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ 之正方形，塗藥時觀察大白鼠是否有異狀，並先測量塗藥前 Wistar 大鼠皮膚的基礎顏色。

待塗藥後 24、48 小時測量，利用 MultiDoc-It Digital Imaging System 拍照記錄並參考 Draize-FHSA scoring System 觀察敷藥部位的皮膚反應，

紅斑與紅腫的發生頻率與程度可藉由與正對照組與空白組的比較加以評估。如表五（評分標準參考 Draize-FHSA scoring System）

表五、Draize-FHSA scoring System 皮膚紅腫評分表

Skin Reaction 〈皮膚反應〉	Value(刺激值)
Erythema and Eschar Formation (紅斑及痂皮生成)	
No erythema (無紅斑)	0
Very slight erythema(barely perceptible) (剛可辨認之輕微紅斑)	1
Well-defined erythema (明顯紅斑)	2
Moderate to severe erythema (中至強度紅斑)	3
Severe erythema(beet redness) to slight eschar Formation (injuries in depth) (強度紅腫及輕微痂皮生成)	4
Necrosis (death of tissue) (組織壞死)	+N
Eschar(sloughing or scab formation) (痂皮生成)	+E
Edema Formation (浮腫形成)	
No edema (無浮腫)	0
Very slight edema(barely perceptible)(剛可辨認之輕度浮腫)	1
Slight edema (edges of area well-definde by definite raising) (與周圍可明顯區別之浮腫)	2
Moderate edema(raised approximately one definite raising) (中至強度浮腫即約 1mm 左右的浮腫)	3
Severe edema(raised more than one millimeter and extending Beyond the area of exposure) (超過 1mm 且擴散至周圍區域之浮腫)	4

刺激指數(Primary Dermal Irritation Index, PDII)= 刺激值/觀察次數

PDII=0.0	nonirritant (完全無刺激性)
>0.0-0.5	negligible irritant (幾乎無刺激性)
>0.5-2.0	mild irritant (弱刺激性)
>2.0-5.0	moderate irritant (中度刺激性)
>5.0-8.0	severe irritant (強刺激性)

參、實驗結果

一、27種中草藥萃取物抗菌試驗

選用27種常見中草藥萃取物利用紙錠擴散法進行 *S. aureus* 之抗菌試驗，結果顯示在樣品濃度 10 mg 下肉豆蔻具有最大的抑菌圈直徑。(如表六)

表六、27種常見中草藥抗金黃色葡萄球菌之抑菌圈直徑

科別	植物	學名	抑菌圈直徑(mm)	Ratio*	
Apiaceae	錢幣草	<i>Hydrocotyle verticillata</i> Thunb	11	28.4	
	雷公根	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	9	23.2	
Apocynaceae	絡石	<i>Trachelospermum jasminoides</i> (Lindl.) Lem.	-	-	
	山馬茶	<i>Tabernaemontana divaricata</i> (L.) R. Br. Ex Roem. & Schult.	-	-	
Araliaceae	三葉五加	<i>Eleutherococcus trifolius</i> (L.) S. Y. Hu	11	28.4	
Caprifoliaceae	有骨消	<i>Sambucus formosana</i> Nakai	9.5	24.5	
Compositae	千里光	<i>Senecio scandens</i> Buch.-Ham. ex D. Don	10	25.8	
	紫錐花	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	-	-	
Crassulaceae	台灣佛甲草	<i>Sedum formosanum</i> N. E. Br.	-	-	
Elaeagnaceae	檳榔	<i>Elaeagnus oldhamii</i> Maxim.	-	-	
Euphorbiaceae	七日暈	<i>Breynia officinalis</i> Hemsley	10.5	27.1	
	疏花塔花	<i>Clinopodium laxiflorum</i> (Hayata) Matsum.	-	-	
	仙草	<i>Mesona procumbens</i> Hemsley	9.5	24.5	
	馬約蘭	<i>Origanum marjorana</i> (L.)	11.5	29.7	
	廣藿香	<i>Pogostemon Cablin</i> (Blanco) Benth.	-	-	
	荔枝草	<i>Salvia plebeia</i> R. Brown	13	33.6	
	山藿香	<i>Teucrium viscidum</i> Blume	10	25.8	
	地筍	<i>Lycopus lucidus</i> Turcz	9	23.2	
	貓鬚草	<i>Orthosiphon aristatus</i> (Blume) Miq.	-	-	
	香蜂草	<i>Melissa officinalis</i> Linnaeus	-	-	
	羅勒	<i>Ocimum basilicum</i> L.	-	-	
	Myristicaceae	肉豆蔻	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	13.5	34.9
	Rhamnaceae	小葉黃鱗藤	<i>Berchemia lineata</i> (L.) DC.	11	28.4
Rutaceae	月橘	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack.	-	-	
Scrofulariaceae	擬紫蘇草	<i>Limnophila aromaticoides</i> Yang ex Yen	10	25.8	
Thymelaeaceae	南嶺蕘花	<i>Wikstroemia indica</i> (L.) C. A. Mey.	11	28.4	
Verbenaceae	化石樹	<i>Clerodendrum calamitosum</i> L.	-	-	

Ratio*=[樣品抑菌圈直徑 (10mg/disc) / Penicillin 抑菌圈直徑 (10U/disc)] x 100

二、肉豆蔻成分分離純化

(一) 抗菌活性追蹤分離肉豆蔻及結構解析

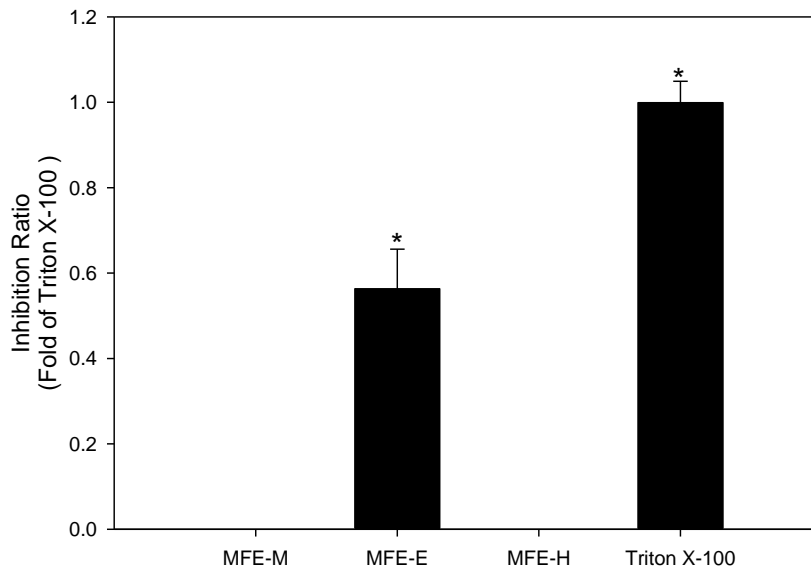
首先將肉豆蔻去精油後得到之藥渣曬乾，再以 50% 甲醇回流萃取、濃縮、乾燥得到之萃取物 MFE-M，分離部分請參照前述第 40 頁，將 MFE-M 以乙酸乙酯溶解後以等量水做液相分配萃取，乾燥後得到乙酸乙酯層 MFE-E 及水層 MFE-H 萃取物。

痤瘡致病菌為 *S. aureus* 及痤瘡桿菌 *P. acnes*，利用所得之精油及萃取物分別利用紙錠擴散法以及瓊脂井化擴散法進行 MIC 判定如下表(表七)。萃取物以效果優劣順序依次為 MFE-E > MFE-M > MFE-H，精油部分效果則不顯著。

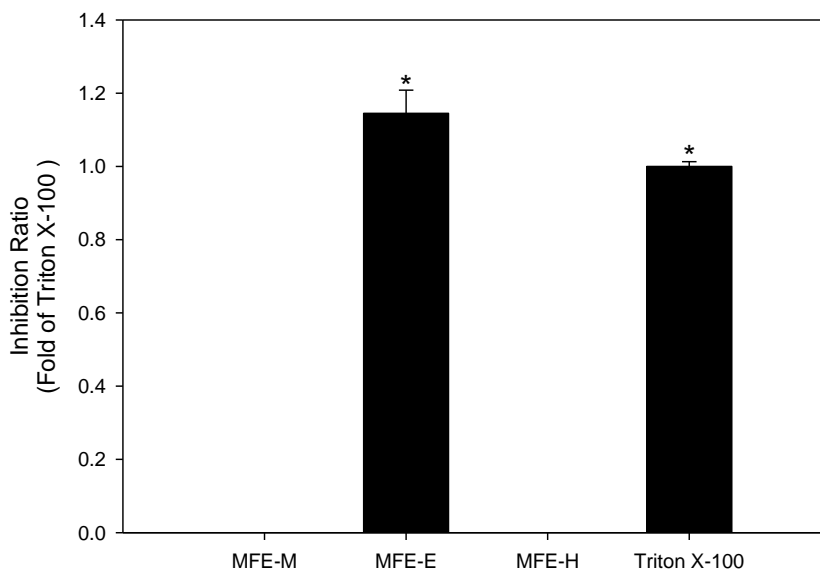
表七、肉豆蔻萃取物及精油抗痤瘡致病菌之最小抑菌濃度

<i>Microorganisms</i>	MIC			
	Essential Oil	MFE-M	MFE-H	MFE-E
<i>S. aureus</i>	20%	0.64 mg	10.24 mg	0.16 mg
<i>P. acnes</i>	80%	0.64 mg	1.28 mg	0.02 mg

利用萃取物再用稀釋液稀釋法對於 *S. aureus* 及 *P. acnes* 在 100 µg/ml 的濃度下進行抗菌試驗，結果顯示僅有 MFE-E 萃取物具有抗菌活性，因此針對 MFE-E 繼續進行成分分離。



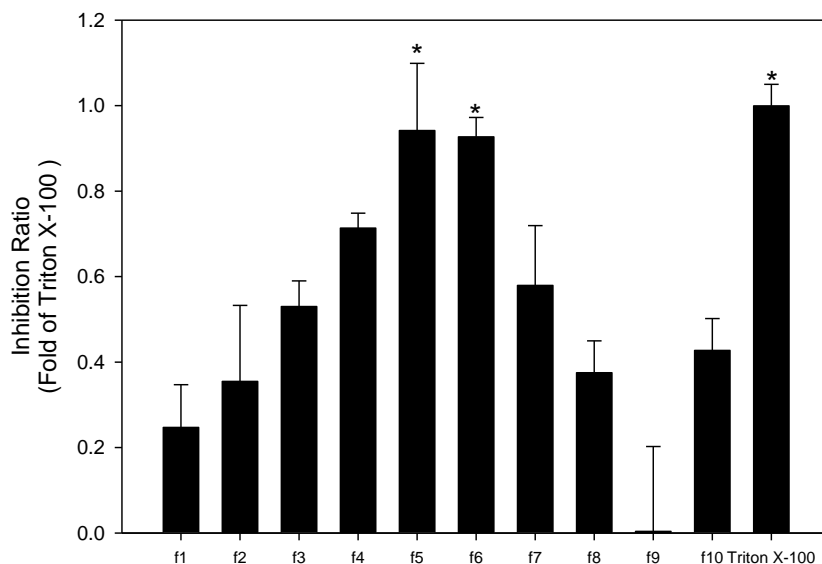
圖十一、肉豆蔻萃取物抑制金黃色葡萄球菌生長作用
 (樣品濃度 100µg/ml，正對照組為 1%Triton X-100，n=3，*：Student *t*-test
 $p < 0.05$)



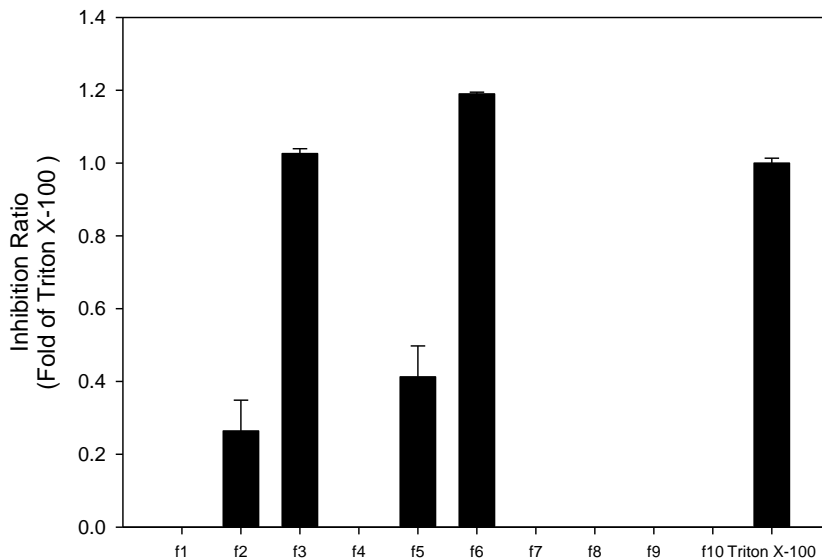
圖十二、肉豆蔻萃取物抑制痤瘡桿菌生長作用
 (樣品濃度 100µg/ml，正對照組為 1%Triton X-100，n=3，*：student *t*-test
 $p < 0.05$)

取MFE-E，以矽膠進行粗分，將*n*-Hexane從 100%梯度換至EA 100%進行沖提得到 10 個劃分部 (f1~f10)，在 100 µg/ml的濃度下用稀釋液稀釋法對於*S. aureus*及*P. acnes*進行抗菌試驗，結果顯示 25 % EA沖提物 f5 和 f6 在抑制*S. aureus*的生長較其他具有顯著的效果 (圖十三)；而 f3 和 f6 在抑制*P. acnes*則在所有劃分部中最有效 (圖十四)。

綜合兩菌株之結果，判斷 f6 具有最強之抗菌活性，因此針對f6 繼續進行成分分離。



圖十三、 MFE-E 經矽膠管柱分離所得之 10 個劃分部抑制金黃色葡萄球菌生長作用 (樣品濃度 100µg/ml，正對照組為 1%Triton X-100，n=3，*：Student *t*-test $p<0.05$)



圖十四、MFE-E 經矽膠管柱分離所得之 10 個劃分部抑制瘰癧桿菌生長作用 (樣品濃度 100 μ g/ml, 正對照組為 1%Triton X-100, n=3, *: Student *t*-test $p<0.05$)

取 *n*-Hexane : EA =3:1 沖提物經由矽膠管柱進行純化(40 mm i.d.x75 mm silica cartridge ; *n*-Hexane : Acetone = 5 : 2), 得到 **(2)**, 再經由 ODS 管柱進行純化 (20 mm i.d.x200 mm ; Acetonotrile : H₂O = 47 : 53) 得到 **(3)**和**(4)**。然而 f1 抗菌活性較差, 但根據 TLC 分析之結果, 其含有 myristicin, 因而利用矽膠管柱等比例沖提(40 mm i.d.x75 mm silica cartridge; *n*-Hexane : EA =30:1)得到 myristicin, 推測 MFE-E 以 *n*-Hexane : EA =20:1, 可將有毒物去除。

詳細流程如圖八, 其結構以 NMR 及 MS 分析, 解析如下:

1. Myristicin 之圖譜解析

Myristicin 為透明油狀，經 ESI 質譜測定後其準分子離子峰為 193.2

[M+H]⁺，代表其分子量為 192，分子式為 C₁₁H₁₂O₃。儀器分析數據如下：

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

6.39 (1H, br s, H-6), 6.35 (1H, br s, H-4), 5.92 (2H, s, O-CH₂-O), 5.90 (1H, m, H-2'), 5.10-5.05 (2H, m, H-3'), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.29 (2H, br d, J = 6.5 Hz, H-1')

¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃):

148.8 (C-2), 143.5 (C-1), 137.3 (C-3), 134.6 (C-2'), 133.5 (C-5), 115.8 (C-3'), 107.7 (C-4), 102.7 (C-6), 101.2 (O-CH₂-O), 56.5 (OCH₃), 40.2 (C-1')



圖十五、 Myristicin 化學結構式

由以上數據經分析及文獻比對後確認為 myristicin^[46]，其結構式如圖十五所示，質譜及核磁共振圖譜附於附錄一。

2. (+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan

之圖譜解析

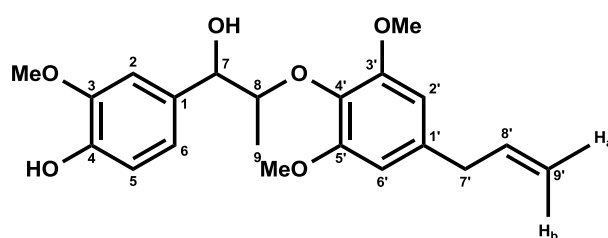
(+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 為透明油狀，經 ESI 質譜測定後其準分子離子峰為 373.3 [M-H]⁻，代表其分子量為 374，分子式為 C₂₁H₂₆O₆。[α]_D²⁵ = + 9.6° (c 0.8, CHCl₃)，儀器分析數據如下：

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD):

6.93 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2), 6.72 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.68 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, H-6), 6.52 (2H, br s, H-2' and H-6'), 5.97 (1H, ddt, *J* = 17.1, 10.4, 6.7 Hz, H-8'), 5.12 (1H, dd, *J* = 17.1, 1.8 Hz, H-9'a), 5.05 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.8 Hz, H-9'b), 4.74 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-7), 4.27 (1H, qd, *J* = 6.4, 3.7 Hz, H-8), 3.81 (9H, s, 3-OMe, 3'-OMe and 5'-OMe), 3.34 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-7'), 1.09 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-9)。

¹³C-NMR(125 MHz, CD₃OD):

154.7 (C-3' and C-5'), 148.7 (C-4), 146.7 (C-3), 138.8 (C-8'), 137.7 (C-1'), 134.8 (C-4'), 133.5 (C-1), 120.1 (C-6), 116.1 (C-9'), 115.8 (C-5), 111.1 (C-2), 106.9 (C-2' and C-6'), 83.8 (C-8), 75.5 (C-7), 56.6 (3'-OMe and 5'-OMe), 56.4 (3-OMe), 41.4 (C-7'), 13.8 (C-9)。



圖十六、 (+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 化學結構式

由以上數據經分析及文獻比對後確認為

(+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan [47] [48] [49]，其結構式如圖十六所示，質譜及核磁共振圖譜附於附錄二。

3. (+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan 之圖譜解析

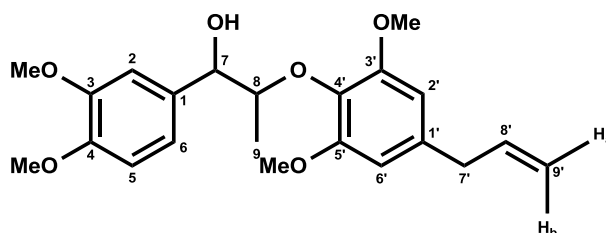
(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan 為透明油狀，經 ESI 質譜測定後其準分子離子峰為 411.3 [M+Na]⁺，代表其分子量為 388，分子式為 C₂₂H₂₈O₆ [α]_D²⁵ = + 6.2° (c 2.6, CHCl₃) 儀器分析數據如下：

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

6.95 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2), 6.84 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.77 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, H-6), 6.46 (2H, br s, H-2' and H-6'), 5.96 (1H, ddt, *J* = 17.1, 9.8, 6.7 Hz, H-8'), 5.12 (1H, dd, *J* = 17.1, 1.8 Hz, H-9'a), 5.09 (1H, dd, *J* = 10.0, 1.8 Hz, H-9'b), 4.80 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H-7), 4.33 (1H, qd, 6.7, *J* = 3.1 Hz, H-8), 3.86 (3H, s, 4-OMe), 3.85 (3H, s, 3-OMe), 3.83 (6H, s, 3'-OMe and 5'-OMe), 3.35 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-7'), 1.10 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-9)。

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

153.5 (C-3' and C-5'), 148.8 (C-4), 147.9 (C-3), 137.1 (C-8'), 136.1 (C-4'), 133.0 (C-1'), 132.7 (C-1), 118.1 (C-6), 116.2 (C-9'), 110.8 (C-2), 109.3 (C-5), 105.5 (C-2' and C-6'), 82.3 (C-8), 72.8 (C-7), 56.1 (3'-OMe and 5'-OMe), 55.9 (3-OMe and 4-OMe), 40.6 (C-7'), 12.8 (C-9)。



圖十七、(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan
化學結構式

由以上數據經分析及文獻比對後確認為(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan [47] [48] [49]，其結構式如圖十七所示，質譜及核磁共振圖譜附於附錄三。

4. *Erythro*- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan

之圖譜解析

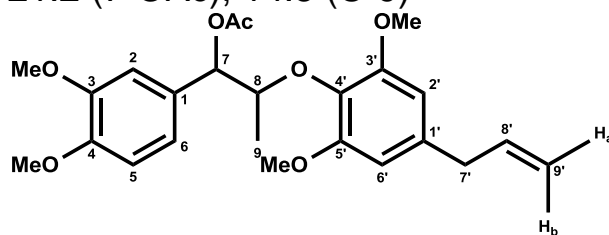
Erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan 為透明油狀，經 ESI 質譜測定後其準分子離子峰為 453.2 [M+Na]⁺，代表其分子量為 430，分子式為 C₂₄H₃₀O₇。儀器分析數據如下：

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

6.88 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2), 6.80 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.84 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, H-6), 6.39 (2H, br s, H-2' and H-6'), 5.96 (1H, ddt, *J* = 17.1, 10.4, 6.6 Hz, H-8'), 5.86 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-7), 5.11 (1H, dd, *J* = 17.9 Hz, 1.8, H-9'a), 5.08 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.8 Hz, H-9'b), 4.43 (1H, qd, *J* = 6.7, 3.7 Hz, H-8), 3.86 (3H, s, 4-OMe), 3.85 (3H, s, 3-OMe), 3.77 (6H, s, 3'-OMe and 5'-OMe), 3.33 (2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-7'), 2.17 (3H, s, 7-OAc), 1.28 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-9)。

¹³C-NMR(125 MHz, CDCl₃):

170.2 (7-OAc), 153.4 (C-3' and C-5'), 148.7 (C-4), 148.5 (C-3), 137.2 (C-8'), 135.7 (C-4'), 133.8 (C-1'), 130.6 (C-1), 119.3 (C-6), 116.0 (C-9'), 110.8 (C-2), 110.3 (C-5), 105.6 (C-2' and C-6'), 80.1 (C-8), 76.4 (C-7), 56.0 (3'-OMe and 5'-OMe), 55.9 (3-OMe and 4-OMe), 40.5 (C-7'), 21.2 (7-OAc), 14.5 (C-9)。



圖十八、*Erythro*- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan
化學結構式

由以上數據經分析及文獻比對後確認為

Erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan^[33, 50]，其結構式如圖十八所示，質譜及核磁共振圖譜附於附錄四。

5. 綜合以上結果，天然物 (2)、(3)、(4) 為 8-O-4' neolignans 類結構類似物。將三者間結構最簡單之 (2) 做為基準，(3) 較(2) 在 C-4 多了一個-OMe 的訊號；(4) 除了較天然物 (2) 在 C-4 多了一個-OMe 的訊號外，在 C-7 為-OAc 取代，因此 H-7 化學位移會較其於兩者往低磁場移動。整理後數據如下表所示：(表八)

表八、肉豆蔻分離得之 8-O-4'-neolignan 天然物之 ^1H 及 ^{13}C 化學位移比較表

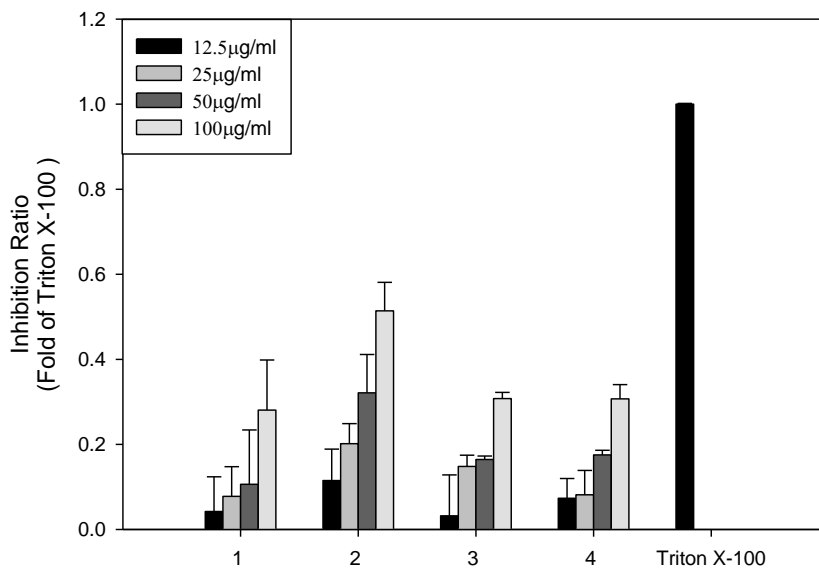
	2		3		4	
position	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	133.5		132.7		130.6	
2	111.1	6.93 (d, $J = 1.6$)	110.8	6.95 (d, $J = 1.6$)	110.8	6.88 (d, $J = 1.7$)
3	146.7		147.9		148.5	
4	148.7		148.8		148.7	
5	115.8	6.72 (d, $J = 8.2$)	109.3	6.84 (d, $J = 8.2, 1\text{H}$)	110.3	6.80 (d, $J = 8.2$)
6	120.1	6.68 (dd, $J = 8.2, 1.6$)	118.1	6.77 (dd, $J = 8.2, 1.6$)	119.3	6.84 (dd, $J = 8.2, 1.7$)
7	75.5	4.74 (d, $J = 3.7$)	72.8	4.79 (d, $J = 3.1, 1\text{H}$)	76.4	5.86 (d, $J = 3.4$)
8	83.8	4.27 (qd, $J = 6.4, 3.7$)	82.3	4.33 (qd, $J = 6.7, 3.1$)	80.1	4.43 (qd, $J = 6.7, 3.7$)
9	13.8	1.09 (d, $J = 6.4, 3\text{H}$)	12.8	1.10 (d, $J = 6.1, 3\text{H}$)	14.5	1.28 (d, $J = 6.7, 3\text{H}$)
1'	137.7		133.0		133.8	
2'	106.9	6.52 (br s, 2H)	105.5	6.44 (br s, 2H)	105.6	6.39 (br s, 2H)
3'	154.7		153.5		153.4	
4'	134.8		136.1		135.7	
5'	154.7		153.5		153.4	
6'	106.9	6.52 (br s)	105.5	6.44 (br s)	105.6	6.39 (br s)
7'	41.4	3.34 (d, $J = 6.7, 2\text{H}$)	40.6	3.35 (d, $J = 6.7, 2\text{H}$)	40.5	3.33 (d, $J = 6.6, 2\text{H}$)
8'	138.8	5.97 (ddt, $J = 17.1, 10.4, 6.7$)	137.1	5.96 (ddt, $J = 17.1, 9.8, 6.7$)	137.2	5.96 (ddt, $J = 17.1, 10.4, 6.6$)
9'	116.1	5.09 (dd, $J = 17.1, 1.8, \text{H-9'a}$) 5.05 (dd, $J = 10.4, 1.8, \text{H-9'b}$)	116.2	5.12 (dd, $J = 17.1, 1.8, \text{H-9'a}$) 5.09 (dd, $J = 10.0, 1.8, \text{H-9'b}$)	116.0	5.11 (dd, $J = 17.9, \text{H-9'a}$) 5.08 (dd, $J = 10.4, 1.8, \text{H-9'b}$)
3-OMe	56.4	3.81 (s, 3H)	55.9	3.85 (s, 3H)	55.9	3.85 (s, 3H)
4-OMe			55.9	3.86 (s, 3H)	55.9	3.86 (s, 3H)
7-OAc					170.2 21.2	2.17 (s, 3H)
3'-OMe	56.6	3.81 (s, 6H)	56.1	3.83 (s, 6H)	56.0	3.77 (s, 6H)
5'-OMe	56.6	3.81 (s, 6H)	56.1	3.83 (s, 6H)	56.0	3.77 (s, 6H)

J :(Hz)

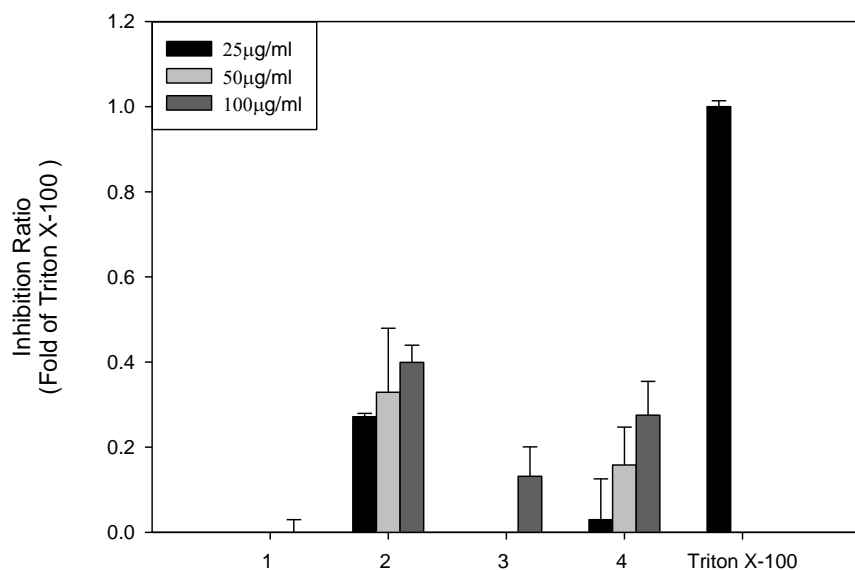
三、肉豆蔻之天然物抗痤瘡之活性

(一) 肉豆蔻之天然物抗痤瘡致病菌活性

4 個天然物在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度下用稀釋液稀釋法對於 *S. aureus* 及 *P. acnes* 在等倍稀釋 12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ 的 4 個濃度下進行抗菌試驗，結果顯示 (2) 在抑制金黃色葡萄球菌及痤瘡桿菌的生長較其他具有顯著的效果(圖十九、二十)，其最小抑菌濃度分別為 3.12 及 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (表九)。



圖十九、肉豆蔻之天然物抑制金黃色葡萄球菌生長作用
(正對照組為 1% Triton X-100, n=3)



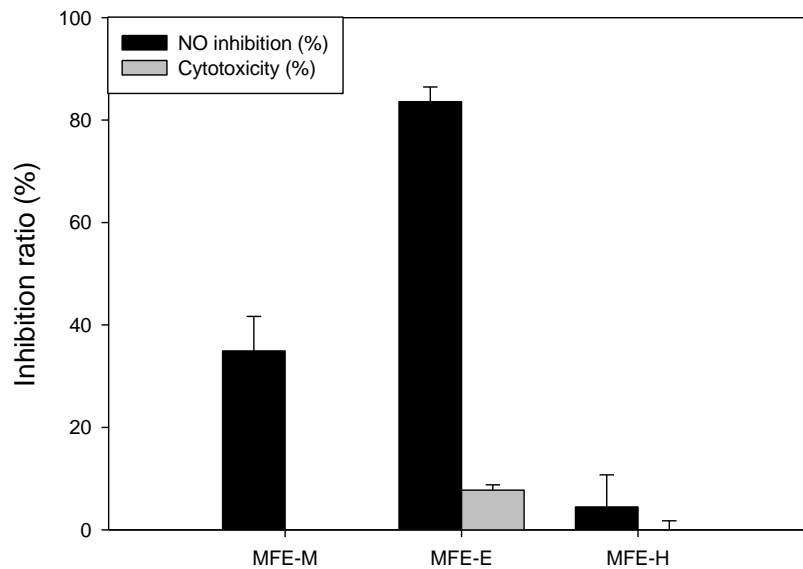
圖二十、肉豆蔻之天然物抑制痤瘡桿菌生長作用
(正對照組為 1% Triton X-100, n=3)

表九、肉豆蔻之天然物對痤瘡致病菌之最小抑菌濃度

Compounds NO.	MIC (µg/ml)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. acnes</i>
1	12.5	>100
2	3.12	6.25
3	6.25	100
4	12.5	25

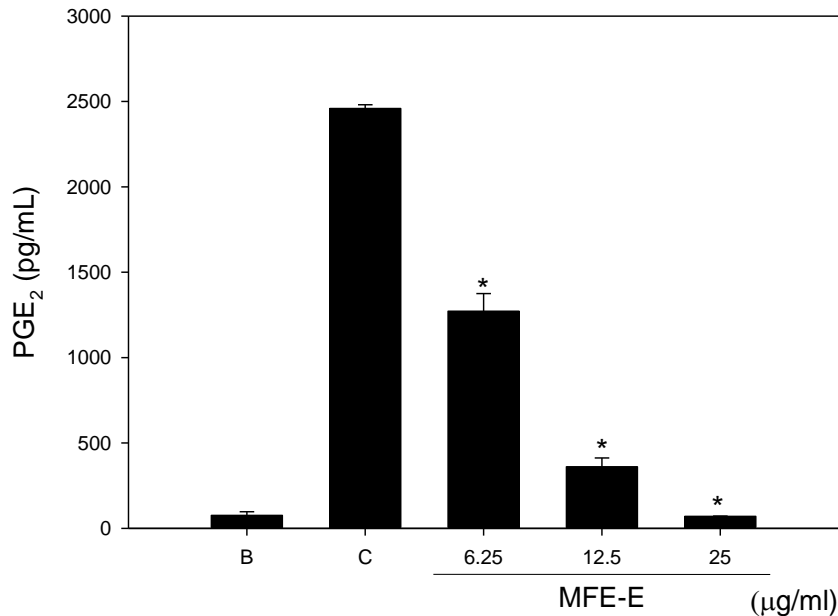
(二) LPS 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應及 MTT 試驗

將肉豆蔻萃取之 MFE-M、MFE-E 及 MFE-H 進行 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 之抗發炎試驗，並同時利用 MTT 進行細胞毒性試驗。結果發現在 25 $\mu\text{g/ml}$ 濃度時細胞毒性皆在 10% 以下，且 MFE-E 抗發炎抑制 NO 效果較 MFE-M 及 MFE-H 顯著。在 25 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下 MFE-E 抑制率為 $83.58 \pm 2.88\%$ 、MFE-M 為 $34.93 \pm 6.76\%$ 而 MFE-H 為 $4.48 \pm 6.27\%$ 。(圖二十一)



圖二十一、肉豆蔻萃取物對於抑制 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用。(樣品濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ ，n=3)

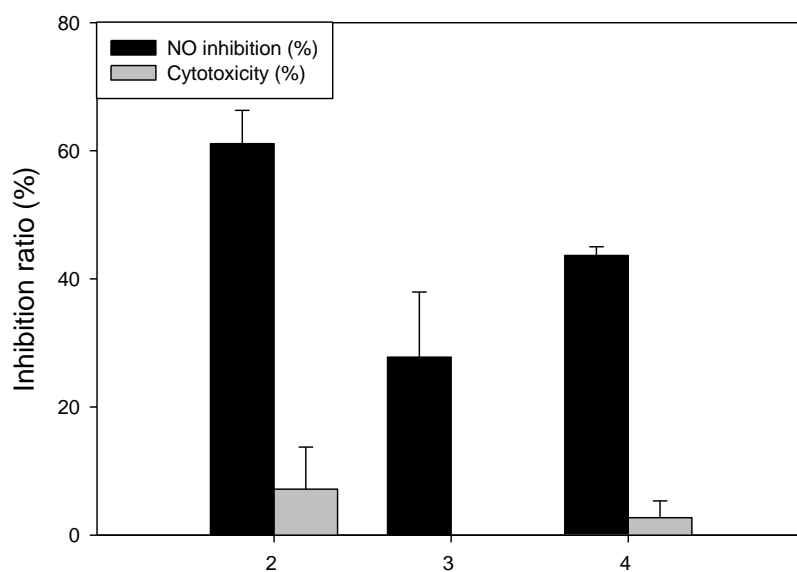
將 MFE-E 進行 PGE₂ 抑制之抗發炎試驗。實驗結果發現 MFE-E 在 6.25~25 µg/ml 等倍稀釋濃度下，抑制 PGE₂ 發炎效果有劑量依存性。(圖二十二)



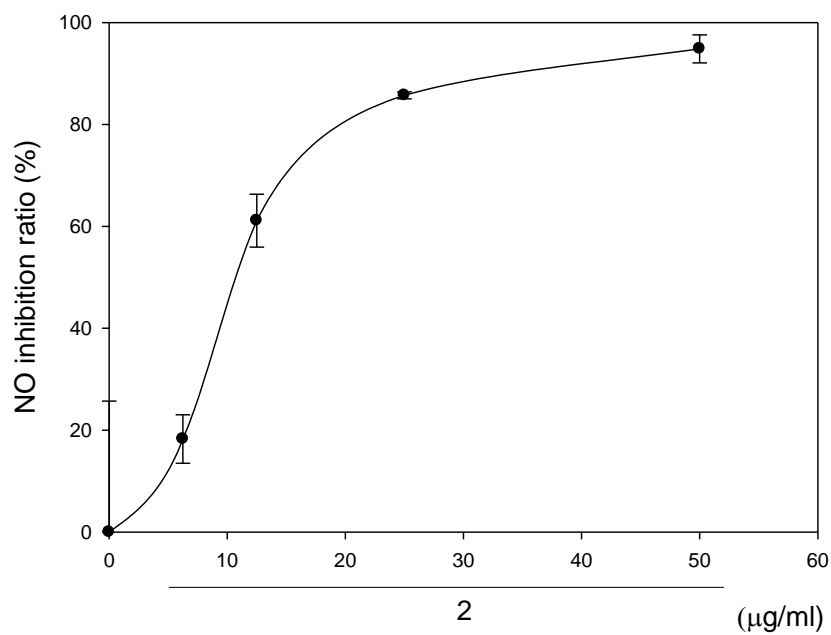
圖二十二、肉豆蔻萃取物 MFE-E 對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 PGE₂ 抑制作用。(n=2, * : Student t-test p<0.05)

B : 空白組 ; C : LPS 單獨組

將肉豆蔻分離所得之 3 個具有抗瘰癧致病菌活性之天然物進行 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 之抗發炎試驗，並同時利用 MTT 進行細胞毒性試驗。結果發現在 12.5 µg/ml 濃度下，各化合物之細胞毒性皆在 10% 以下，(2) NO 抑制率為 61.11 ± 5.19%、(3) 為 27.78 ± 10.17% 而(4) 為 43.65 ± 1.37% (圖二十三)，其中(2) 抑制 NO 最為明顯 IC₅₀ 為 11.07 µg/ml (圖二十四)。



圖二十三、肉豆蔻天然物(2)-(4)對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用 (樣品濃度 12.5 $\mu\text{g/ml}$, n=3)



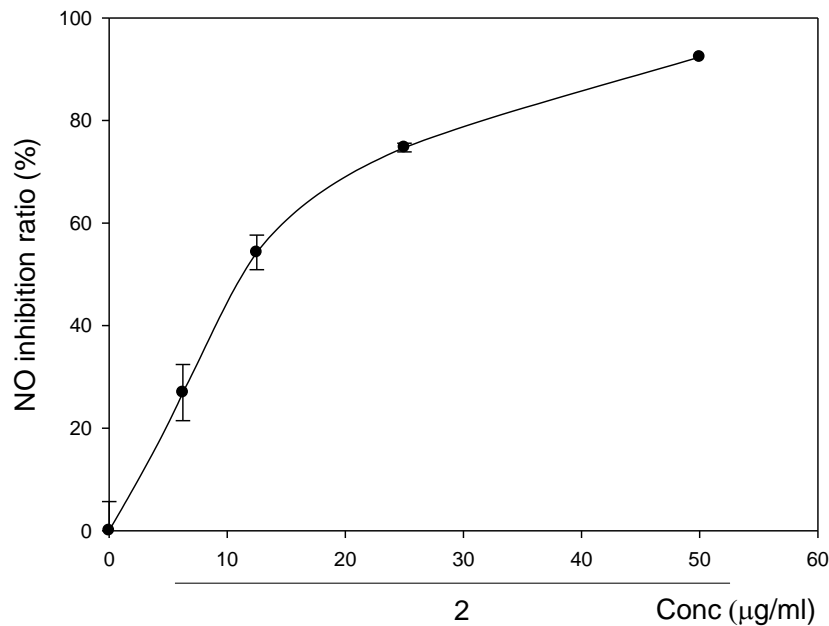
圖二十四、(+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用 (n=3)

(三) 熱處理 *P. acnes* 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應

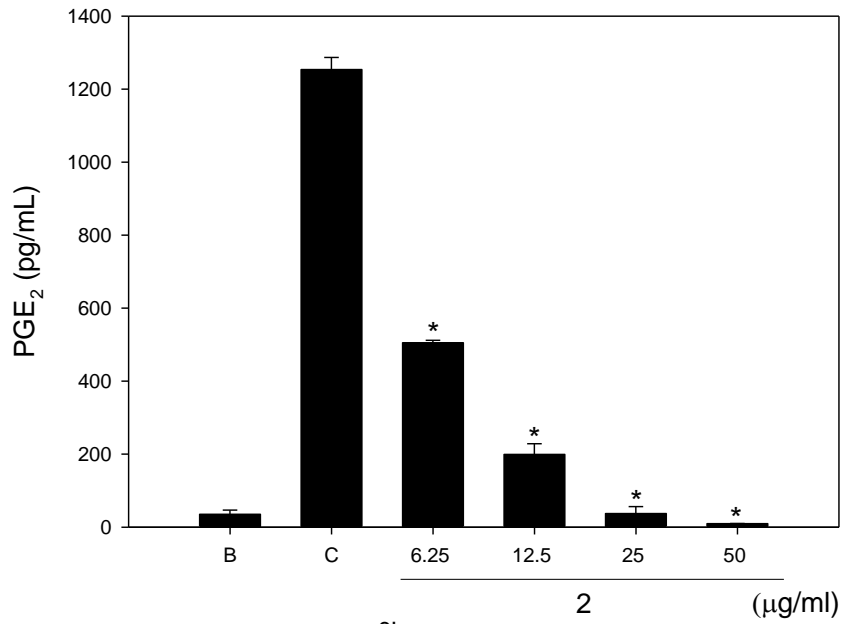
將 *P. acnes* 菌株熱處理後(以下簡稱 PA)配置成誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 之誘導劑。將肉豆蔻分離所得之具有良好抗痤瘡致病菌活性

(2) 進行 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 之抗發炎試驗。結果顯示在 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 等倍稀釋濃度下，(2) 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 發炎反應有好的抑制作用 (圖二十五)， IC_{50} 為 11.53 $\mu\text{g/ml}$ 。

將 (2) 繼續進行 PGE_2 抑制之抗發炎試驗。實驗結果發現 (2) 在 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 等倍稀釋濃度下，抑制 PGE_2 產生具劑量依存性。(圖二十六)



圖二十五、(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 抑制作用 (n=3)

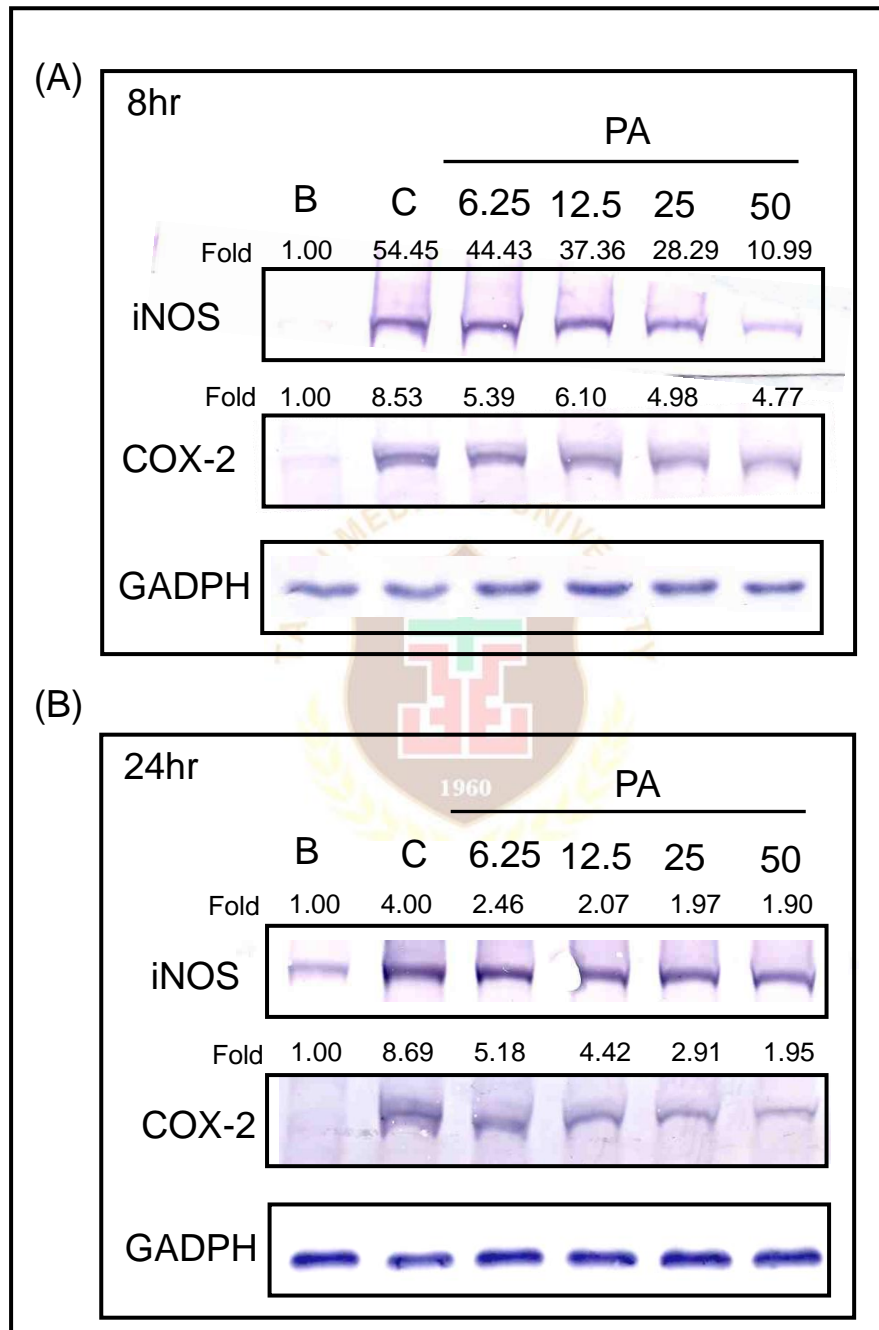


圖二十六、(+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- $\Delta^{8'}$,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 PGE₂ 抑制作用。(n=2, *: Student *t*-test *p*<0.05)

B: 空白組 ; C: PA 單獨組



將 (2) 繼續進行 iNOS 及 COX-2 蛋白抑制之抗發炎試驗。實驗結果發現 (2) 在 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 等倍稀釋濃度下，對於抑制 iNOS 及 COX-2 蛋白表現量有劑量依存性。(圖二十七)



圖二十七、(+)-Erythro-(7S,8R)- $\Delta^8,3,3',5'$ -trimethoxy-8-O-4'-neolignan 對於 PA 誘導 RAW 264.7 細胞產生 iNOS、COX-2 蛋白質表現在 8 (A) 及 24 (B) 小時之抑制作用。取一代表性圖片。

B: 空白組 ; C: PA 單獨組

四、肉豆蔻萃取物中 myristicin 及 safrole 之含量

(一) Myristicin 及 Safrole 檢量線

用高壓液相層析(HPLC)分析 safrole 之檢量線線性方程式 $y=13798x+50255$ ($r^2=0.9943$) 而 myristicin 為 $y=55665x+252568$ ($r^2=0.9986$)，在 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40, v/v) 條件下 safrole 和 myristicin 滯留時間為 38.8 以及 34.0 分鐘。

(二) 分析方法之確效性

本研究對同日內差異、異日內差異進行分析方法之確效。Safrole、myristicin 同日內差異之 RSD 各為 0.584% 及 0.824%。Safrole、myristicin 異日內差異之相對標準偏差各為 0.955% 及 0.461%。同日內差異及異日內差異之相對標準偏差 (RSD) 小於 5%，表示此分析方法之一致性與再現性良好，詳細之數值見表十所示。

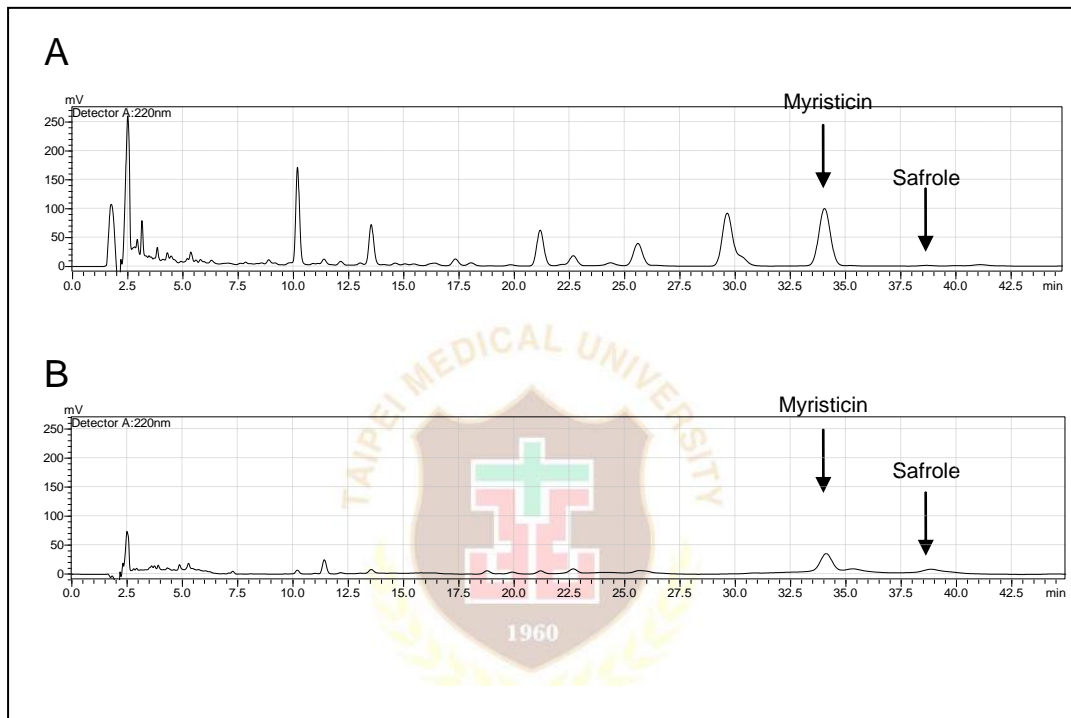
表十、Safrole、myristicin 分析方法之同日內差異及異日內差異

	同日內差異				異日內差異			
	Mean	±	S.D ^a	RSD(%)	Mean	±	S.D	RSD(%)
Myristicin	53.392	±	0.440	0.824	53.635	±	0.512	0.955
Safrole	57.875	±	0.338	0.584	57.988	±	0.268	0.461

^a : $\mu\text{g/ml}$

(三) Essential oil 及 MFE-M 成分含量

利用所得檢量線依相同條件對 essential oil 及 MFE-M 進行高效液相層析分析，可推得 safrole 及 myristicin 於樣品中含量百分比。其中 safrole 在 essential oil 及 MFE-M 中別含有 4.46% 及 0.01%；而 myristicin 在精油及萃取物中分別含有 2.62% 及 2.49%。(表十一)



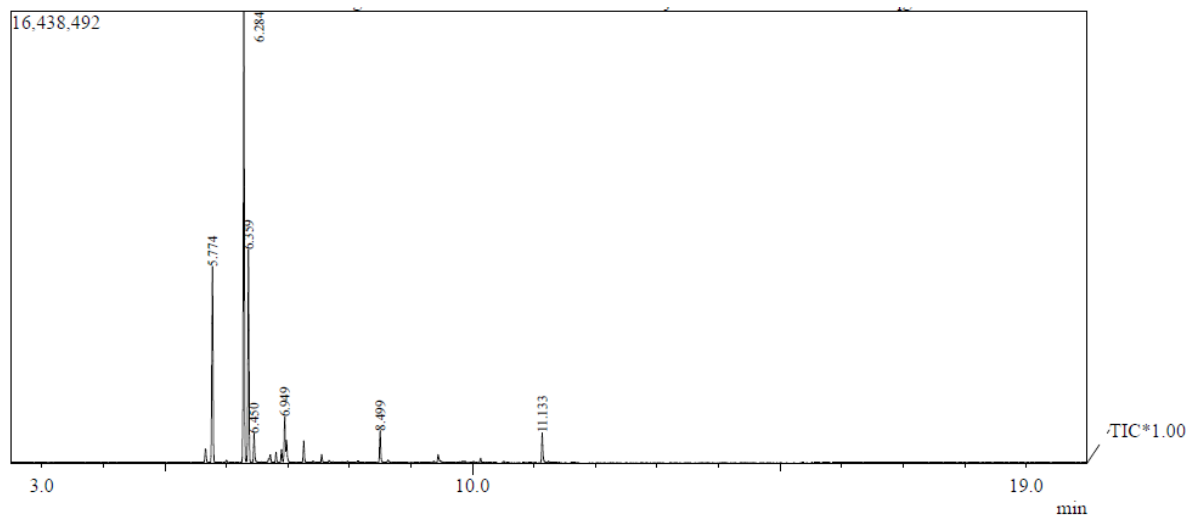
圖二十八、MFE-M (A) 及 Essential oil (B) 之 HPLC 成分分析圖

表十一、Essential oil 及 MFE-M 之產率以及 safrole、myristicin 含量

	產率 ^a (%)	Myristicin (%)	Safrole (%)
Essential oil	3.5	2.62	4.46
MFE-M	5.0	2.49	0.01

^a : (萃取物重量/原藥材之重量) x 100

另用氣相層析質譜儀 (GC-MS) 分析 essential oil 內成分，結果發現含量最高的三種成分由高至低依序為 sabinene、 α -pinene 和 β -pinene；而 myristicin 和 safrole 分別僅佔 3.38 以及 1.21%。(表十二)



圖二十九、Essential oil 之 GC-MS 成分分析圖

表十二、Myristicin、safrole 及主要成分在 GC-MS 滯留時間及含量

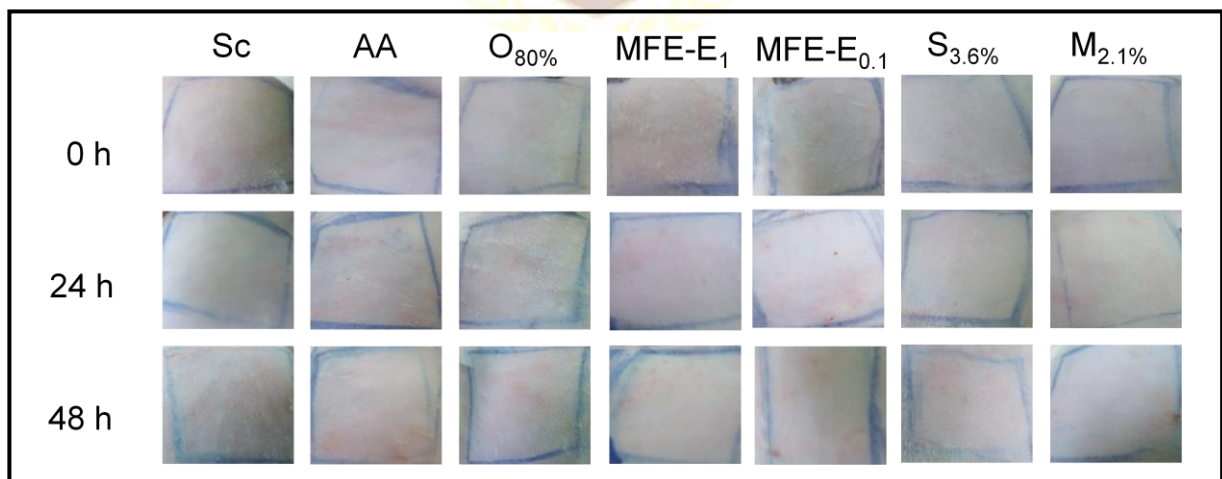
	Retention Time (mins)	Area (%)
Sabinene	6.283 ⁹⁶⁰	34.18
α -pinene	5.774	16.99
β -pinene	6.359	16.28
Limonene	6.947	6.01
Myristicin	11.134	3.38
Terpinen-4-ol	8.498	3.18
β -Myrcene	6.449	2.67
γ -Terpinene	7.257	1.90
Safrole	9.440	1.21

五、肉豆蔻單一劑量皮膚毒性試驗

單一劑量(急性)毒性試驗主要是探討藥物於 24 小時內投予單次或多次劑量後所產生毒性作用的試驗，不僅可看出延遲性毒性的反應，也可幫助第一期人體試驗之劑量選擇，避免人體試驗產生藥物過量反應。

實驗結果顯示以荷荷芭油為稀釋劑比較皮膚毒性的強度；荷荷芭油稀釋之肉豆蔻精油在濃度為抗 *P. acnes* 之 MIC 為 80%/site、抗 *S. aureus* 之 MIC 20%/site 以及 10%/site 時皆幾乎無刺激性。且肉豆蔻精油中可能有毒成分 safrole、myristicin 以不同濃度進行皮膚刺激試驗。本實驗所使用之肉豆蔻精油最高濃度是 80%，以同等含量的 safrole 3.6 %/site，myristicin 2.1 %/site 皆不具有皮膚刺激的毒性。

同時對於有效抗菌及抗發炎效果之 MFE-E 使用高濃度 1 mg/ml 及 0.1 mg/ml 進行皮膚毒性測試；在 1 mg/ml/site 及 0.1 mg/ml/site 皆不具有皮膚刺激的毒性。肉豆蔻精油及有效萃取物單一劑量皮膚刺激試驗紅腫比較如圖(圖二十八)所示。



圖三十、肉豆蔻精油及有效抗瘰癧萃取物動物單一劑量毒性評估

Sc : Solvent control 荷荷芭油；AA : 市售品 A 酸軟膏；O_{80%} : 80%肉豆蔻精油；
MFE-E₁ : 肉豆蔻萃取物乙酸乙酯層 (1mg/ml)；
MFE-E_{0.1} : 肉豆蔻萃取物乙酸乙酯層 (0.1mg/ml)；
S_{3.6%} : safrole 3.6%；M_{2.1%} : myristicin 2.1%

肆、討論

肉豆蔻雖然可作為食用調味品，其精油也被作為配製香精之原料而廣泛被應用，但是肉豆蔻使用上必須相當小心，因為常有過量服用或接觸後導致中毒，並須嚴格控制用量。根據文獻指出，肉豆蔻中 *myristicin* 對於神經具有毒性^[16]，對正常人有致幻作用，成人口服 6~7 mg/kg 的劑量下即可能產生精神上的影響^[51]，過量可導致中毒，出現昏迷、瞳孔放大以及驚厥等現象；*safrole* 為一致肝毒性成分^[52]且會降低免疫細胞之抗菌活性以及降低分泌超氧化物的能力，使得免疫細胞能力抗病能力下降^[53]，經實驗證實大鼠在口服 539 mg/kg/day 的劑量下，會有 50% 機率會造成肝毒性或是肝臟病變的產生。這兩種成分由於其低極性所以主要出現在肉豆蔻精油中，基於中藥炮製的目的在於減毒以及增強藥效，在古代對於肉豆蔻的用法也有記載：「肉豆蔻內服須煨熟去油用。」將古書記載之炮製方法結合現代科學成分分析，這項使用建議對於肉豆蔻在使用上佐證於現代藥理以及毒理的研究上是一致、合理且科學的。

為了探討有毒成分分別在精油及萃取物中之含量，判斷是否真正達到減毒的效果，且精油內組成具有高揮發性特色，為定量肉豆蔻精油中之主要成分及有毒成分，必須將精油利用適當方法萃取後收集，因此將肉豆蔻原藥材藉由水蒸氣蒸餾法除去精油後再以 50% 甲醇萃取分別得到 *essential oil* 及 MFE-M。利用高效液相層析分析，結果顯示 *safrole* 及 *myristicin* 於 MFE-M 中含量都比 *essential oil* 中低。且抑制瘰癧致病菌生長的結果中顯示 MFE-M 也較佳，因此在開發肉豆蔻做為抗瘰癧的使用上，MFE-M 具有安全、抗菌有效的優勢。去除精油後之 MFE-M 若再以矽膠管柱以 *n*-hexane : EA (20:1) 沖提可以將大部分之 *myristicin* 沖提出，且有效成分(2)仍在，因此為了減去毒性成分此分離方法可提供產業參考。

比較其他肉豆蔻分離成分之方法^[27]之研究，在管柱層析粗分常以矽膠管柱為主，但並無將藥材先進行去精油的步驟，相較之下，肉豆蔻為一富含精油之成分，精油內則多為低極性之萜類、脂肪酸或是長鏈烷類等難以在矽膠管柱分離之物質，先除去精油之步驟可將萃取物成分單純化，因此在本論文中對於先除去精油之萃取肉豆蔻之方法，可應用於其他如唇形科、芸香科、繖形科…等富含揮發油植物，且精油為非活性成分時之萃取方法。

從本草考察結果得知肉豆蔻常用於腸胃道細菌性痢疾及霍亂等用途；在現代藥理活性研究也指出肉豆蔻之成分具有良好抗菌活性，而市售痊瘡清潔用品則常添加肉豆蔻精油，雖然肉豆蔻精油具有抗菌效果^[54]，但效果不顯著，本研究利用氣相層析質譜儀分析結果顯示，肉豆蔻精油中主要含有 sabinene、 α -pinene 和 β -pinene 三種萜類成分，雖有文獻指出： α -pinene 對 *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Staphylococcus aureus* 等菌具有抗菌^[24]效果； β -pinene 對 *Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* 以及 *Escherichia coli* 等菌具有抗菌^[24]活性；sabinene 則對於 *Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter aerogenes*、*Citrobacter freundii* 等菌具有效果，但這三種成分在抗菌上並不強^[55]，因此，從抗菌有效 MFE-M 利用液相分離萃取得到 MFE-E 繼續進行成分分離，期望找尋一具有抗痊瘡之活性成分。而本研究以抗菌活性追蹤進行管柱層析方法分離得到三個天然物：
(+)-erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan (2)、
(+)-erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan (3)、
erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan (4)，而對於 *S. aureus* 及 *P. acnes* 之抗菌效果均以 (2) 為優；推測 (2) 應為肉豆蔻中主要具有對於兩株痊瘡致病菌抗菌效果之成分。

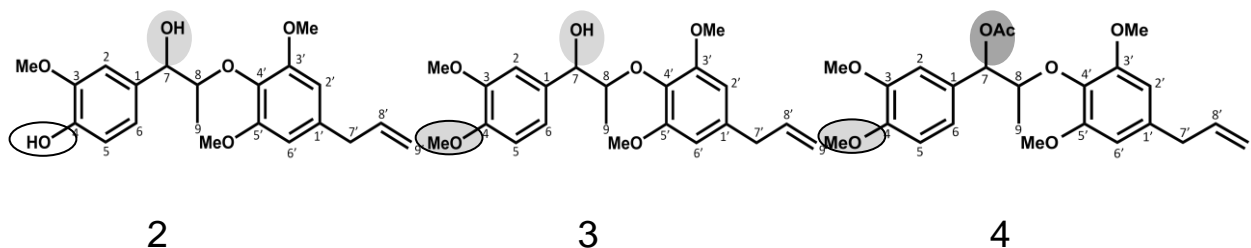
回顧近年對肉豆蔻藥理研究得知，肉豆蔻萃取物具有抗發炎效果^[27-28]，

已有文獻指出肉豆蔻成分除了對於 COX-2^[27]、NF- κ B^[28]...等發炎因子有抑制作用，因此應用肉豆蔻是否具有瘡瘡引起發炎反應抑制作用進行探討。在本研究中選擇 LPS 以及 PA 分別誘導小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 細胞產生發炎反應，以 NO、PGE₂、iNOS 以及 COX-2 作為評估發炎反應的指標，發現肉豆蔻萃取物及天然物具有好的抗發炎活性。(2) 對於 NO、PGE₂ 有好的抑制生成作用，也能降低 iNOS 以及 COX-2 的蛋白表現量，有好的劑量依存性抑制作用，推測 (2) 應為肉豆蔻中具有相當好抗發炎活性之成分。

多酚類化合物是結構中含有數個酚基的總稱，依結構可以分類為單寧(tannin)、黃酮類(flavonoid)、木質素(lignan)與酚酸(phenolic acid)等。此類的成分普遍具有強的抗氧化活性，同時具有抗菌與抗發炎的作用。亞麻子、全穀類、漿果類、蔬菜或水果中都含有木質素的成份，構造類似雌激素，是一種很好的植物性荷爾蒙來源，在結腸中經微生物的作用會形成 enterodiol 和 enterolactone，多數用於女性改善更年期症狀與乳癌預防方面以及降低前列腺癌的部份。目前醫學界已經證實木質素是血中好的清道夫具有抗氧化、抑制膽固醇和抑制癌細胞增生的作用。木質素所具的抗癌作用，經醫學研究，一方面是由於可抵抗體內氧化酶的生長，阻斷供給癌細胞繼續生長的作用；另一方面它可以縮短食物在腸道停留的時間，且可影響腸道內微生物的生長。

肉豆蔻成分以揮發油萜類以及木質素類成分為主，從肉豆蔻分離得其他木質素類天然物也被報導指出具有抗菌^[22]、抗氧化^[33]以及抗發炎^[27] ^[28]等活性。本實驗由肉豆蔻分離所得具有抑制瘡瘡致病菌生長天然物(2)、(3)、(4)為 8-O-4' neolignans 結構類似物，經文獻探索並無報告指出此 3 種天然物與抗瘡瘡活性之關係，本篇論文為首次探討這類型化合物在抗瘡瘡之致病菌以及發炎反應。並從根據前述抑菌及抗發炎結果得知 (2) 較其他兩者為優；因此

依結構推測 C-4 上之 -OH 基團在抗瘰癧活性上可能為一重要之官能基。故將來肉豆蔻應用於抗瘰癧藥物之開發上可考慮將 (2) 作為一指標成分。



圖三十一、天然物(2)、(3)及(4)之結構比較

本研究中對 safrole 及 myristicin 用了不同方法分析精油中之含量，結果顯示經由高壓液相層析分析後 safrole 及 myristicin 分別含量為 4.46% 及 2.62%；而利用氣相層析質譜儀為 1.21% 及 3.38%，推測由於實驗儀器方法不同分析精油而使結果有所差異。

高壓液相層析分析含量上較為通用且方便，靈敏度為 2.5 ppm，可將成分依不同極性大小分離後加以分析含量，常以 UV-Vis 為檢測器，但所含成分太過複雜，若圖譜中之不同成分訊號在同一個滯留時間重疊以及成分對紫外光-可見光吸收強度差異等情形都會增加而干擾

氣相層析儀是分析揮發性或半揮發性有機化合物之最適合儀器，靈敏度為 0.01 ppm 較高壓液相層析高，藉由質譜儀監測，因此可得到滯留時間以及分子量兩項資料，可較明確得到目標物的含量。根據原理，在分析精油上仍以氣相層析質譜儀較為適合。

芳香類中草藥精油以及萃取物常添加於外用製劑中作為抗菌以及芳香的用途，在瘰癧的治療中外用局部治療也較口服治療安全性高且副作用低，因此在肉豆蔻精油以及萃取物經實驗證明確實具有抗菌及抗發炎的效果的情形

下，進一步將肉豆蔻精油以及萃取物塗抹於小鼠皮膚評估是否會對皮膚具有刺激及致敏毒性。結果顯示肉豆蔻精油在 80%/site、20%/site 以及 10%/site 以及相當 80%精油含量之 safrole、myristicin 進行測試時皆幾乎無刺激性。在成分分析結果中指出 MFE-E 之 safrole 含量遠低於 essential oil，且具有效抗菌及抗發炎活性，使用高濃度 MFE-E 測試不具有皮膚刺激的毒性，因此在使用上，MFE-E 具有低含量有毒成分 safrole、myristicin、安全性高以及良好抗菌、抗發炎活性等優點。



伍、 結論

肉豆蔻在近代日常生活中除了為食物佐料外，果實亦為常見香料來源，其果仁萃取出香精油，常添加於皮膚類用品如化妝品或清洗用品中，標榜有抗菌、滋潤以及抗老化等功用。雖然肉豆蔻應用相當廣泛，但未曾有研究報導針對皮膚之痤瘡抗菌、抗發炎以及皮膚毒性進行評估，故本篇論文利用抗痤瘡菌及抗發炎之活性系統分析探討肉豆蔻抗痤瘡之活性。

據本研究結果顯示，去精油後之肉豆蔻甲醇萃取物 (MFE-M)，具有抑制痤瘡致病菌生長及抑制 LPS 以及 PA 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應。利用矽膠管柱以 *n*-hexane : EA (20:1) 沖提，可以去掉大部分 MFE-M 中的 myristicin，且 MFE-M 中仍含有 (2) 為主要抗痤瘡及抗發炎成分，故將來肉豆蔻應用於抗痤瘡藥物之開發上，可將 (2) 作為一活性指標成分。再者，MFE-E 進行動物皮膚毒性評估，發現有毒成分 safrole 於萃取物中含量低於精油，且在高劑量下塗抹於皮膚幾乎無刺激性。推測此 MFE-M 萃取物可應用於皮膚痤瘡之添加物。

有鑒於抗痤瘡之藥品常伴隨不良副作用或細菌抗藥性等問題，找尋不同藥理作用或化學結構之替代藥物為相當重要之課題，本篇除提供一尋找有效抗痤瘡天然物之方向及方法，亦發現肉豆蔻在開發為外用抗痤瘡之藥品、化妝品以及清潔用品之添加物上具有相當好之潛力。

陸、參考文獻

- [1] 吳敏綺, *中西醫會診：青春痘*, 書泉出版社, **2004**, 13-57
- [2] F. Dalgard, U. Gieler, J. Holm, E. Bjertness, S. Hauser. Self-esteem and body satisfaction among late adolescents with acne: results from a population survey. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2008**, 59 (5), 746-751
- [3] J. A. Cotterill, W. J. Cunliffe. Suicide in dermatological patients. *British Journal of Dermatology* **1997**, 137 (2), 246-250
- [4] 虞瑞堯, *痤瘡診治彩色圖譜*, 北京科學技術出版社, **2002**, 35-87
- [5] W. J. Cunliffe, *ACNE*, **2007**, 45-53
- [6] A. H. Jeremy, D. B. Holland, S. G. Roberts, K. F. Thomson, W. J. Cunliffe. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *Journal of Investigative Dermatology* **2003**, 121 (1), 20-27
- [7] M. Shibata, M. Katsuyama, T. Onodera, R. Ehama, J. Hosoi, H. Tagami. Glucocorticoids enhance Toll-like receptor 2 expression in human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* or proinflammatory cytokines. *Journal of Investigative Dermatology* **2009**, 129 (2), 375-382
- [8] L. Cordain, S. Lindeberg, M. Hurtado, K. Hill, S. Eaton, J. Brand-Miller. Acne vulgaris: a disease of Western civilization. *Archives of Dermatology* **2002**, 138 (2), 1584-1590
- [9] D. Thappa, B. Adityan, R. Kumari. Scoring systems in acne vulgaris. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* **2009**, 75 (3), 323-326
- [10] A. Doshi, A. Zaheer, M. Stiller. A comparison of current acne grading systems and proposal of a novel system. *International Journal of Dermatol* **1997**, 36, 416-418.
- [11] 李忠偉, *青春痘全治療手冊*, 尚文出版社, **1998**, 24-83

- [12] G. F. Webster, E. M. Graber. Antibiotic treatment for acne vulgaris. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* **2008**, 27 (3), 183-187
- [13] E. J. Lammer, D. T. Chen, R. M. Hoar, N. D. Agnish, P. J. Benke, J. T. Braun, C. J. Curry, P. M. Fernhoff, A. W. J. Grix, I. T. Lott. Retinoic acid embryopathy. *New England Journal of Medicine* **1985**, 313 (14), 837-841
- [14] J. C. Shaw. Low-dose adjunctive spironolactone in the treatment of acne in women: a retrospective analysis of 85 consecutively treated patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2000**, 43 (3), 498-502
- [15] 趙中振, 蕭培根, 當代藥用植物典, Vol. 4, **2007**, 332-336
- [16] D. G. Barceloux. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Disease-a-Month* **2009**, 55 (6), 373-379.
- [17] B. DG, *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*, **2008**.
- [18] 顏焜熒, 漢方醫學概論, 南天書局, **2003**, 129
- [19] T. Y. LIU, C. C. CHEN, C. L. CHEN, W. CHIC. Safrole-induced Oxidative Damage in the Liver of Sprague-Dawley Rats. *Food and Chemical Toxicology* **1999**, 37, 697-702.
- [20] A. McKenna, S. P. Nordt, J. Ryan. Acute nutmeg poisoning. *European Journal of Emergency Medicine* **2004**, 11 (4), 240-241.
- [21] G. S. Sonavane, V. P. Sarveiya, V. S. Kasture, S. B. Kasture. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2002**, 71 (1-2), 239-244.
- [22] J. Chung, J. Choo, M. Lee, J. Hwang. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* **2006**, 13 (4), 261-266.
- [23] J. Y. Cho, G. J. Choi, S. W. Son, K. S. Jang, H. K. Lim, S. O. Lee, N. D. Sung, K. Y. Cho, J.-C. Kim. Isolation and antifungal activity of lignans

- from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi. *Pest Management Science* **2007**, *63* (9), 935-940.
- [24] H. J. D. Dorman, S. G. Deans. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, *88*, 308-316.
- [25] C. Shinohara, S. Mori, T. Ando, T. Tsuji. Arg-gingipain inhibition and anti-bacterial activity selective for *Porphyromonas gingivalis* by malabaricone C. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1999**, *63* (8), 1475-1477.
- [26] Y. Tanaka, H. Kikuzaki, S. Fukuda, N. Nakatani. Antibacterial compounds of licorice against upper airway respiratory tract pathogens. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **2001**, *47* (3), 270-273.
- [27] Anggakusuma, Yanti, J. K. Hwang. Effects of macelignan isolated from *Myristica fragrans* Houtt. on UVB-induced matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 in HaCaT cells. *Journal of Dermatological Science* **2010**, *57* (2), 114-122.
- [28] M. A. Jinhua, Y. K. HWANG, W.-H. CHO, S.-H. HAN, J. K. HWANG, J.-S. HAN. Macelignan Attenuates Activations of Mitogen-Activated Protein Kinases and Nuclear Factor kappa B Induced by Lipopolysaccharide in Microglial Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2009**, *32* (6), 1085—1090.
- [29] Y. CHO, K.-H. KIM, J.-S. SHIM, J.-K. HWANG. Inhibitory Effects of Macelignan Isolated from *Myristica fragrans* HOUTT. on Melanin Biosynthesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2008**, *31*(5), 986—989.
- [30] E. Y. Park, S. M. Shin, C. J. Ma, Y. C. Kim, S. G. Kim. Meso-dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* down-regulates TGF-beta1 gene expression in activated hepatic stellate cells via inhibition of AP-1 activity. *Planta Medica* **1978**, *71* (5), 393-398.

- [31] T. Morita, K. Jinno, H. Kawagishi, Y. Arimoto, H. Suganuma, T. Inakuma, K. Sugiyama. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (6), 1560-1565.
- [32] T. A. Misharina, M. B. Terenina, N. I. Krikunova. Antioxidant properties of essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2009**, 45 (6), 642-647.
- [33] L. Duan, H.-W. Tao, X.-J. Hao, Q.-Q. Gu, W.-M. Zhu. Cytotoxic and Antioxidative Phenolic Compounds from the Traditional Chinese Medicinal Plant, *Myristica fragrans*. *Planta Medica* **2009**, 75 (11), 1241-1245.
- [34] A. Rasheed, G. M. Laekeman, A. J. Vlietinck, J. Janssens, G. Hatfield, J. Totte, A. G. Herman. Pharmacological influence of nutmeg and nutmeg constituents on rabbit platelet function. *Planta Medica* **1984**, 50 (3), 222-226.
- [35] J. Janssens, G. M. Laekeman, L. A. Pieters, J. Totte, A. G. Herman, A. J. Vlietinck. Nutmeg oil: identification and quantitation of its most active constituents as inhibitors of platelet aggregation. *Journal of Ethnopharmacology* **1990**, 29 (2), 179-188.
- [36] S.-U. Lee, K. S. Shim, S. Y. Ryu, Y. K. Min, S. H. Kim. Machilin A Isolated from *Myristica fragrans* Stimulates Osteoblast Differentiation. *Planta Medica* **2009**, 75, 152-157.
- [37] P. H. Nguyen, T. V. T. Le, H. W. Kang, J. Chae, S. K. Kim, K.-i. Kwon, D. B. Seo, S. J. Lee, W. K. Oh. AMP-activated protein kinase (AMPK) activators from *Myristica fragrans* (nutmeg) and their anti-obesity effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20 (14), 4128-4131.
- [38] Y. Xiu-Wei, H. Xin, M. Lian, W. Qi, W. Xu. The Intestinal Permeability of Neolignans from the Seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 Cell Monolayer Model. *Planta Medica* **2010**, 76, 1587-1591.

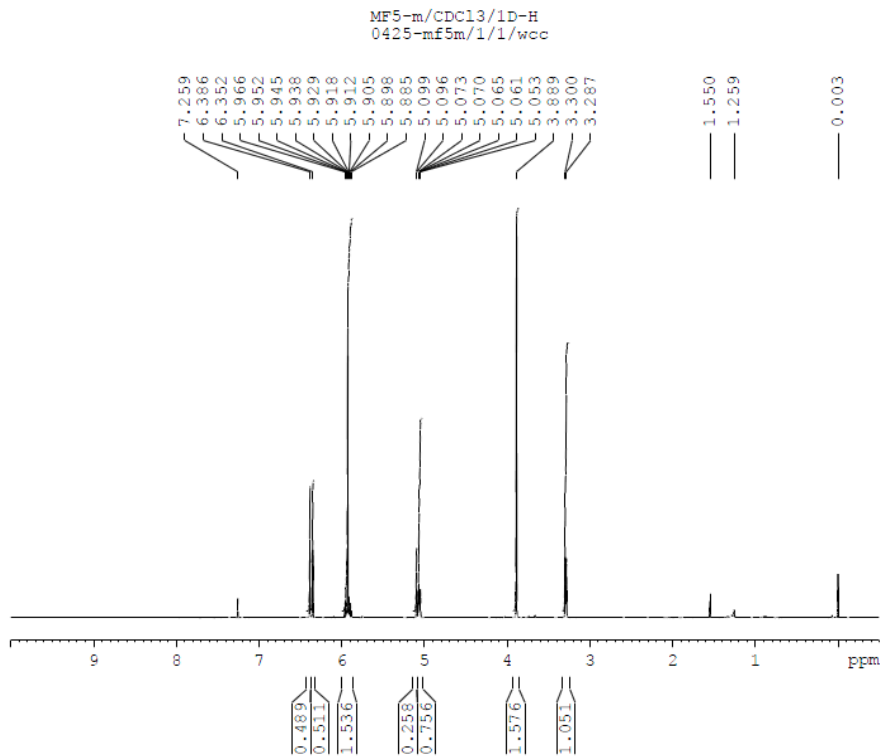
- [39] K. Yuka, I. Hideyuki, H. Tsutomu. Effects of Mace and Nutmeg on Human Cytochrome P450 3A4 and 2C9 Activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2010**, *33* (12), 1977—1982.
- [40] Muchtaridi, A. Subarnas, A. Apriyantono, R. Mustarichie. Identification of Compounds in the Essential Oil of Nutmeg Seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) That Inhibit Locomotor Activity in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*, 4771-4781.
- [41] S. Y. Shin, M. C. Shin, J. S. Shin, K. T. Lee, Y. S. Lee. Synthesis of auronones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE(2) productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 4520–4523.
- [42] L. Sang Eun, K. Ji-Min, J. Se Kyoo, J. Jeong Eun, Y. Hyun-Ju, J. Min-Kyung, L. Seung Hun. Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Archives of Dermatological Research* **2010**, *302*, 745–756
- [43] D. Yang, D. Pornpattananankul, T. Nakatsuji, M. Chan, D. Carson, C.-M. Huang, L. Zhang. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6035-6040.
- [44] T. Nakatsuji, M. C. Kao, J.-Y. Fang, C. C. Zouboulis, L. Zhang, R. L. Gallo, C.-M. Huang. Antimicrobial Property of Lauric Acid Against *Propionibacterium acnes*: Its Therapeutic Potential for Inflammatory Acne Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatol* **2009**, *129*(10), 2480–2488.
- [45] S. Mo, A. Krunic, B. D. Santarsiero, S. G. Franzblau, J. Orjala. Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Phytochemistry* **2010**, *71* (17-18), 2116-2123.
- [46] M. Razzaghi-Abyaneh, T. Yoshinari, M. Shams-Ghahfarokhi, M.-B. Rezaee,

- H. Nagasawa, S. Sakuda. Dillapiol and Apiol as Specific Inhibitors of the Biosynthesis of Aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007**, 71 (9), 2329-2332.
- [47] Y.-H. Kuo, Y.-T. Lin, Y.-T. Lin. Studies on the Extractive Constituents of the Nutmeg of *Myristica fragrans* HOUTT. *Journal of Chinese Chemistry* **1983**, 30, 63-67.
- [48] C. H. B. Antonio, Z. Susana, B. Héctor, G. S. Manuel, A. R. Edmundo. ¹³C NMR spectral and conformational analysis of 8-O-4' neolignans. *Phytochemistry* **1984**, 2025-2028
- [49] K. HIROYUKI, M. MITSUO, K. HIROMU. ABSOLUTE CONFIGURATION OF 8-O-4'-NEOLIGNANS FROM MYRISTICA FRAGRANS. *Phytochemistry* **1995**, 40 (5), 1515-1517.
- [50] A. Isogai, S. Muragoshi, A. Suzuli, S. Tamura. Structure of New Phenylpropanoids from *Myristica fragrans* Houtt. *Agriculture and Biological Chemistry* **1973**, 37 (6), 1479-1486.
- [51] S. A. Scott, R. S. Ruchir, M. Deepak, S. S. Cynthia, J. W. Nigel, K. V. Molly, A. B. Gary, D. I. Richard. Predicting the hepatocarcinogenic potential of alkenylbenzene flavoring agents using toxicogenomics and machine learning. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2010**, 243, 300-314.
- [52] E. C. Hagan, P. M. Jenner, W. I. Jones, O. G. Fitzhugh, E. L. Long, J. G. Brouwer, W. K. Webb. Toxic properties of compounds related to safrole. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1965**, 7 (1), 18-24
- [53] S. L. Hung, Y. L. Chen, Y. T. Chen. Effects of safrole on the defensive functions of human neutrophils. *Journal of Periodontal Research* **2003**, 38 (2), 130-134.
- [54] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 446–475.

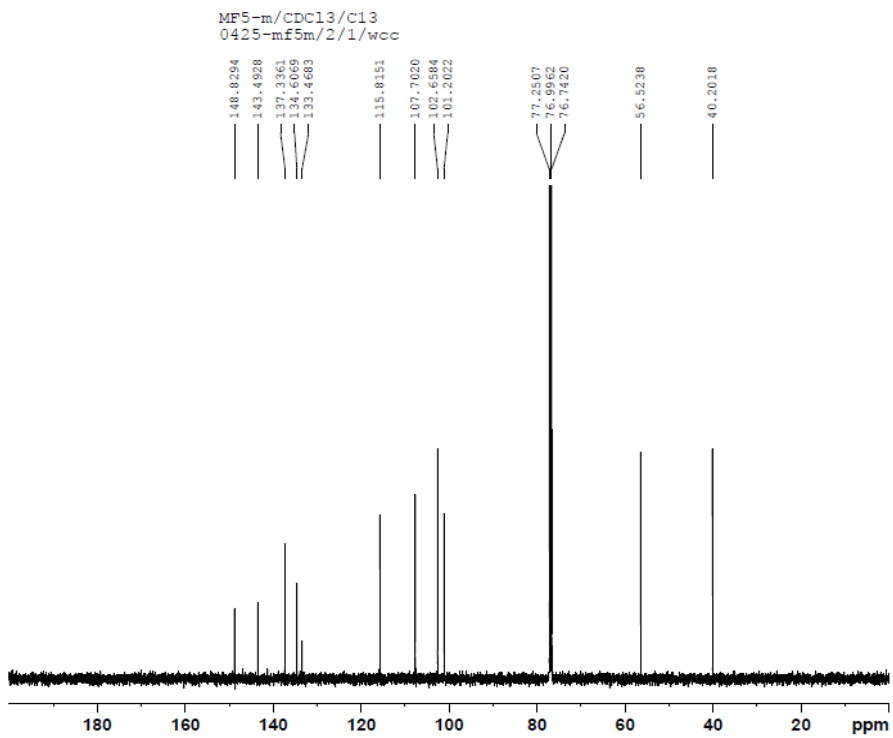
- [55] H. J. D. Dorman, S. G. Deans. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, 88, , 308–316.



附錄一



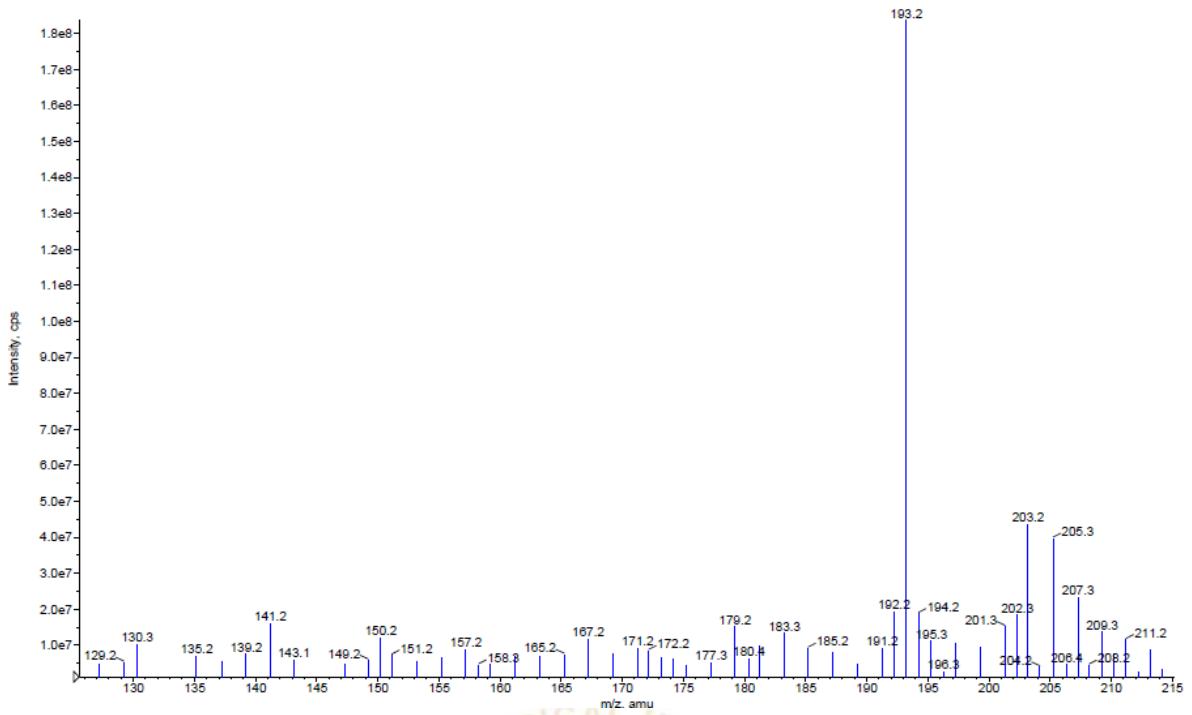
Myristicin $^1\text{H-NMR}$ 圖譜 (500MHz, CDCl_3)



Myristicin $^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜 (125MHz, CDCl_3)

■ +Q3: 20 MCA scans from Sample 1 (MY +Q3) of 20110615 HCW.wiff (Turbo Spray), Centroided

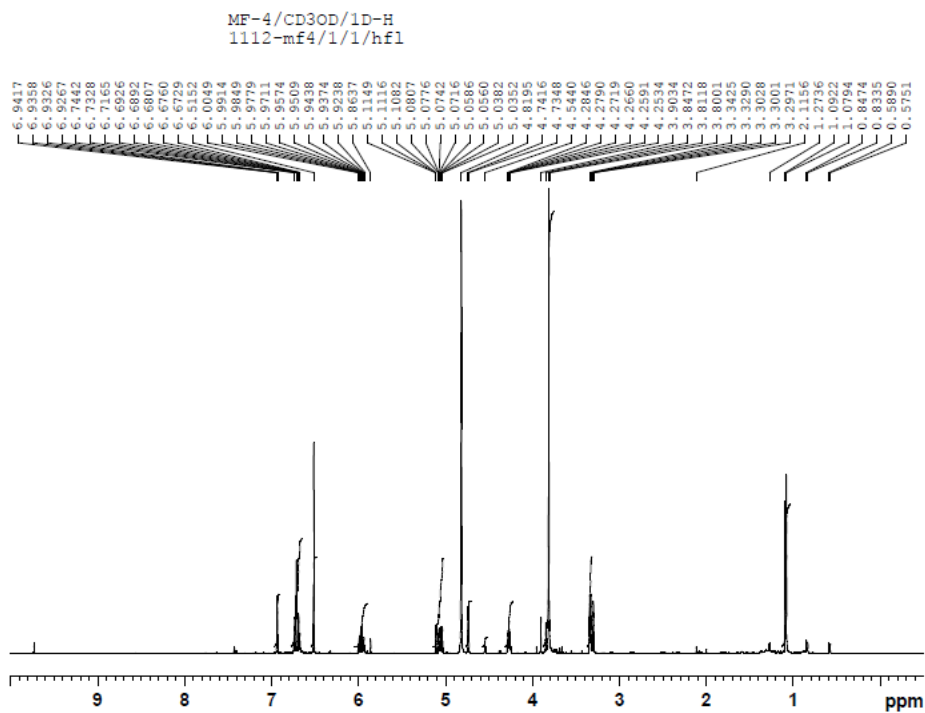
Max. 5.2e8 cps.



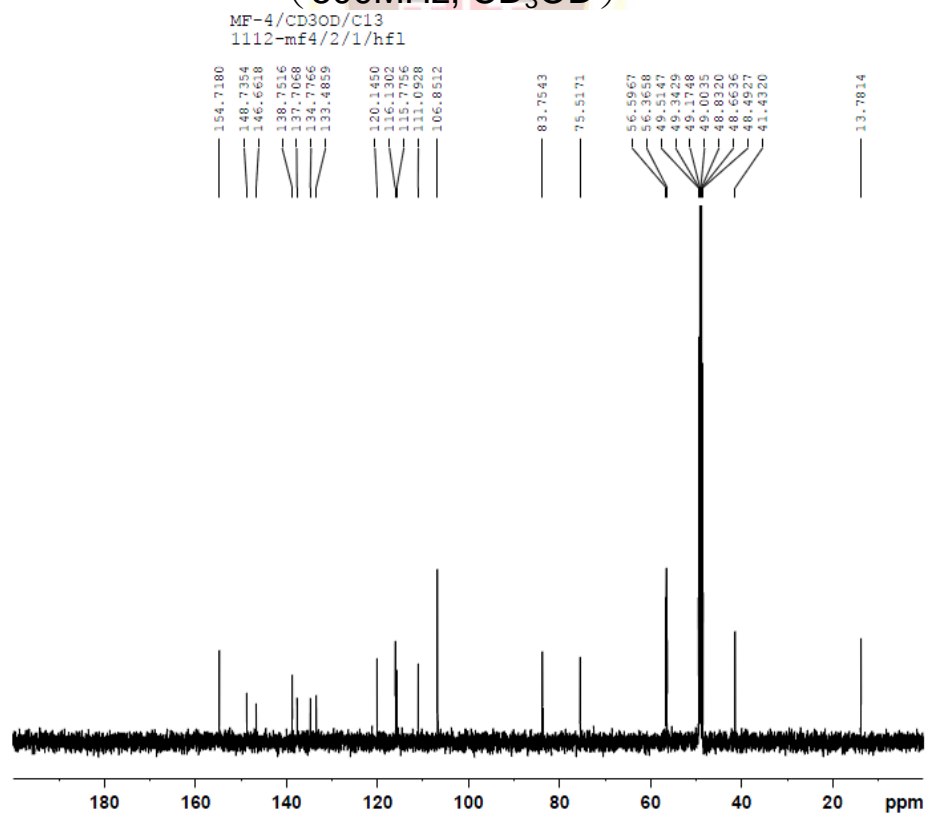
Myristicin 質譜圖



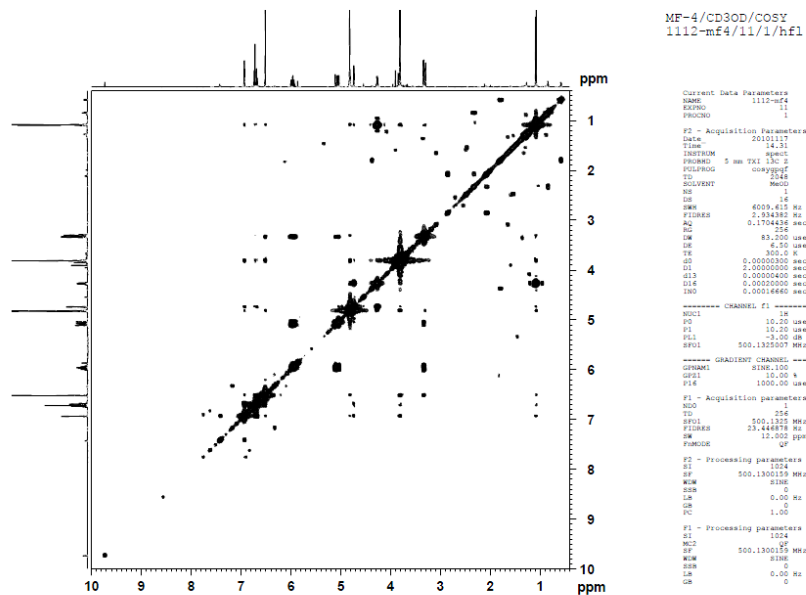
附錄二



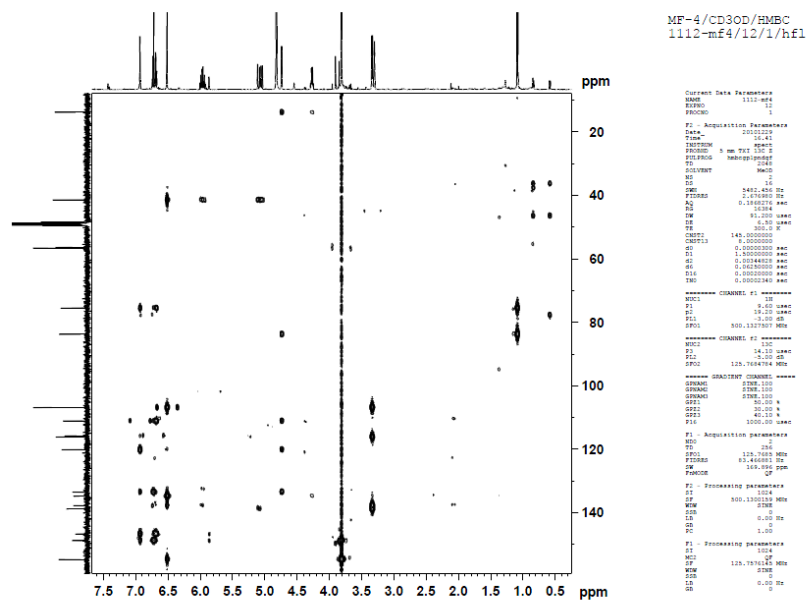
(+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan $^1\text{H-NMR}$ 圖譜
(500MHz, CD_3OD)



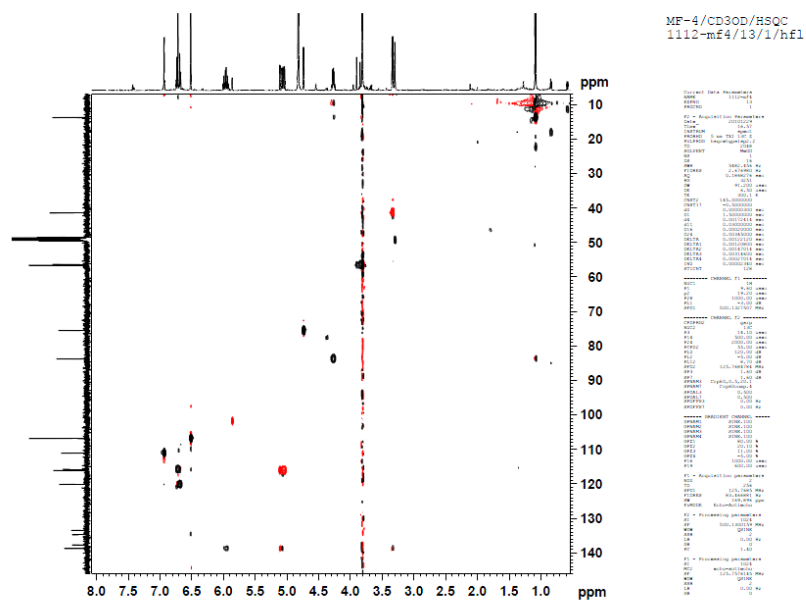
(+)-*Erythro*-(7*S*,8*R*)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan $^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜
(125MHz, CD_3OD)



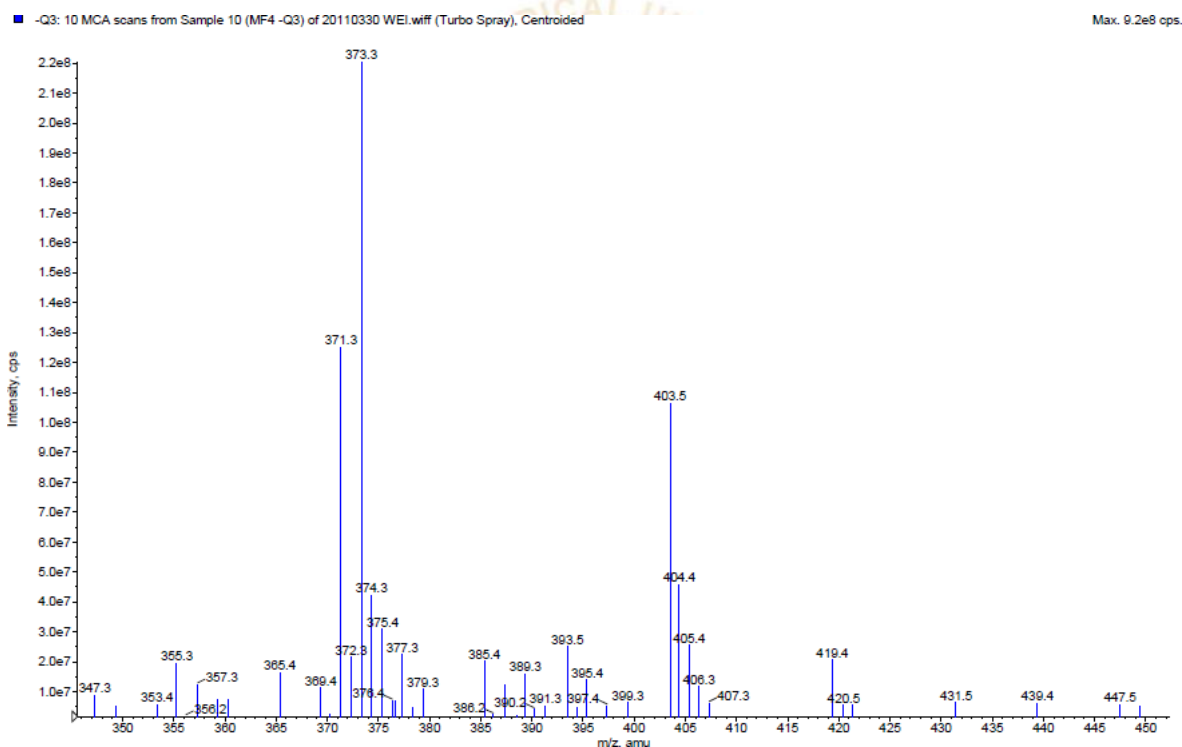
(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan COSY 圖譜



(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan HMBC 圖譜

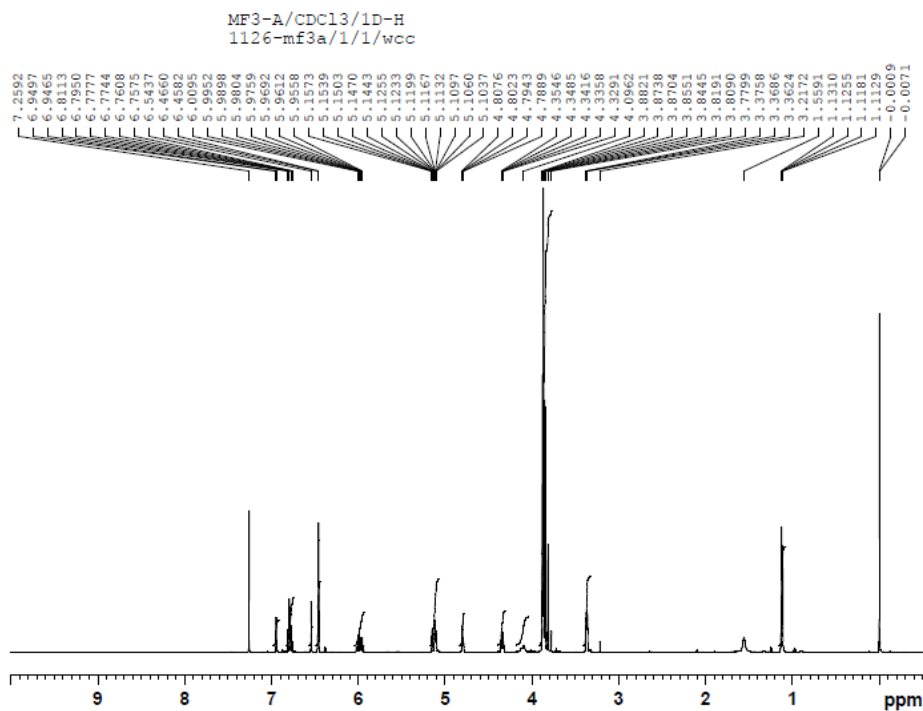


(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan HSQC 圖譜

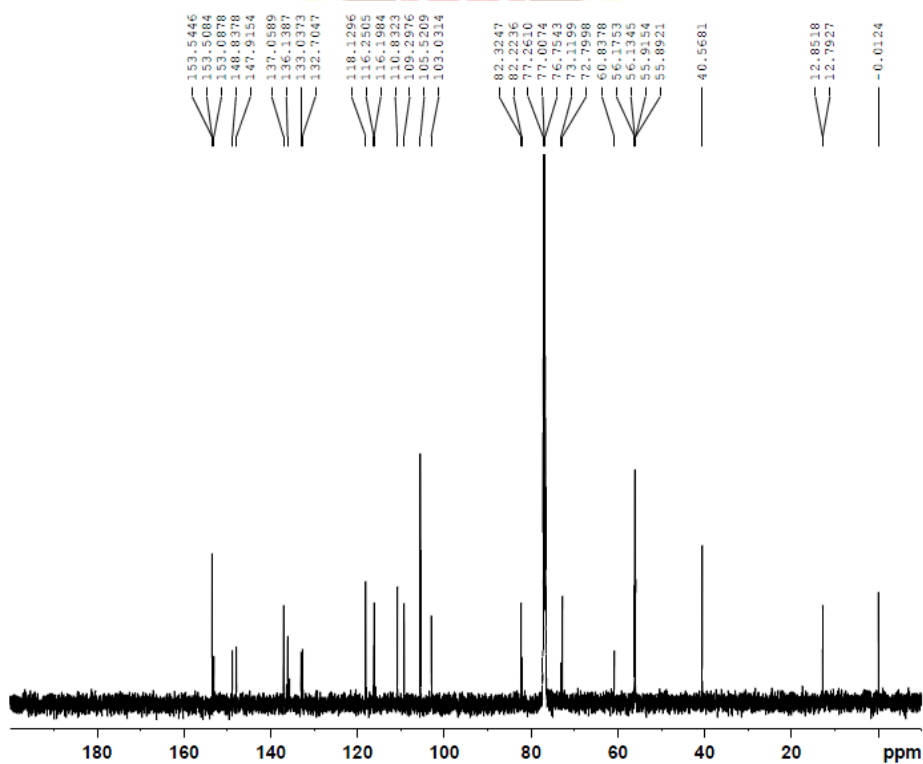


(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',5'-trimethoxy-8-O-4'-neolignan 質譜圖

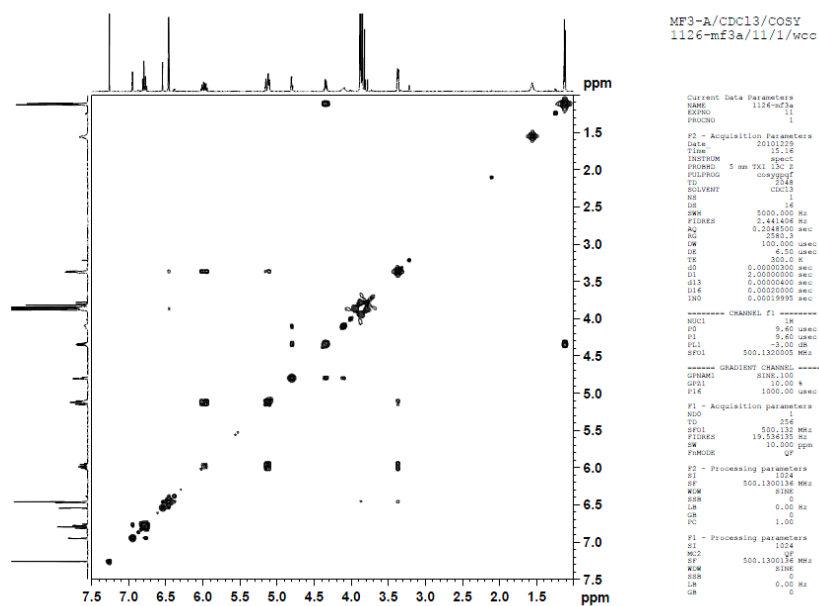
附錄三



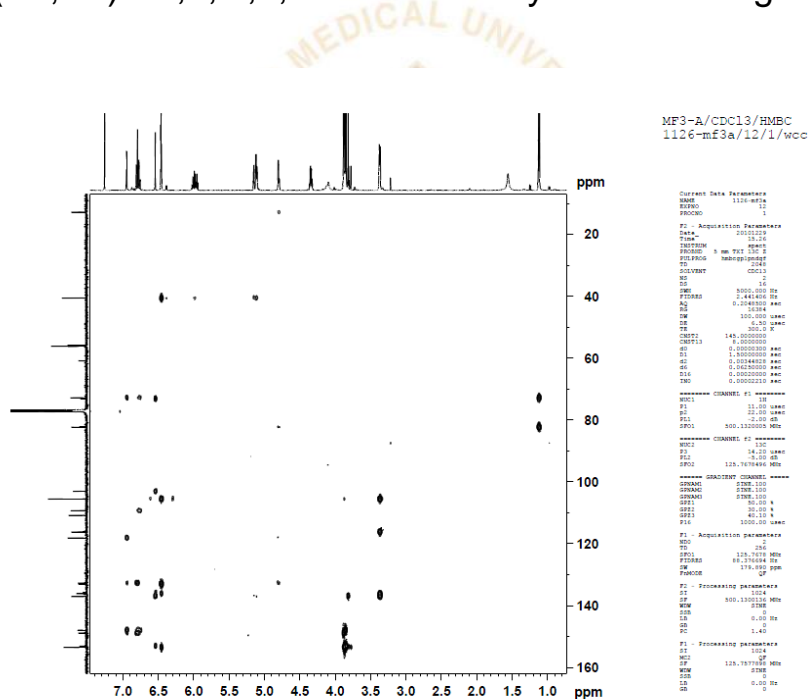
(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan $^1\text{H-NMR}$
圖譜 (500MHz, CDCl_3)



(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan $^{13}\text{C-NMR}$
圖譜 (125MHz, CDCl_3)

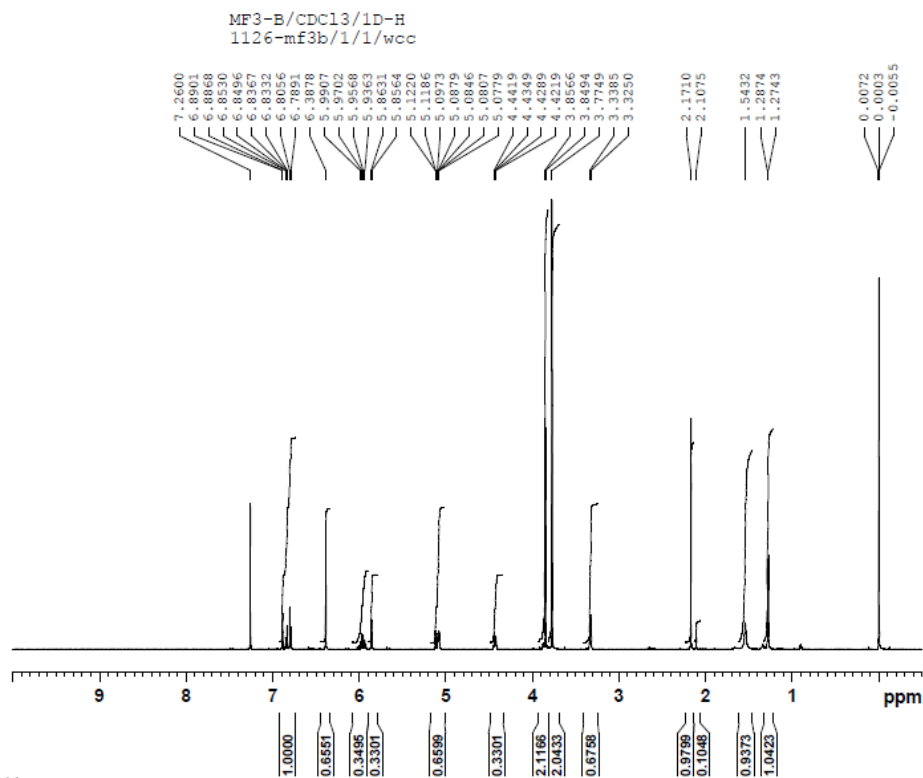


(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan COSY 圖譜

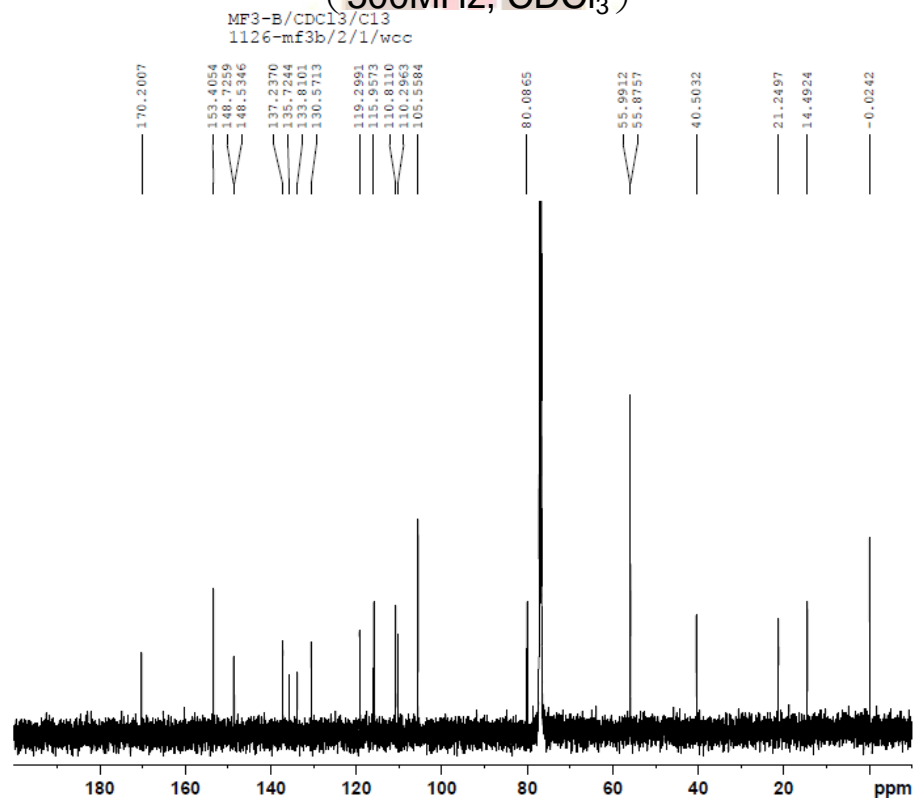


(+)-Erythro-(7S,8R)- Δ^8 ,3,3',4,5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan HMBC 圖譜

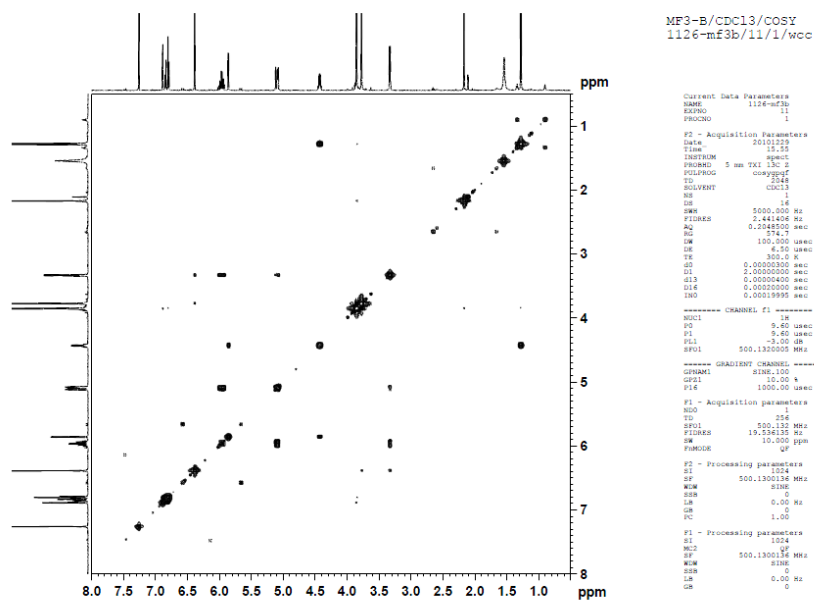
附錄四



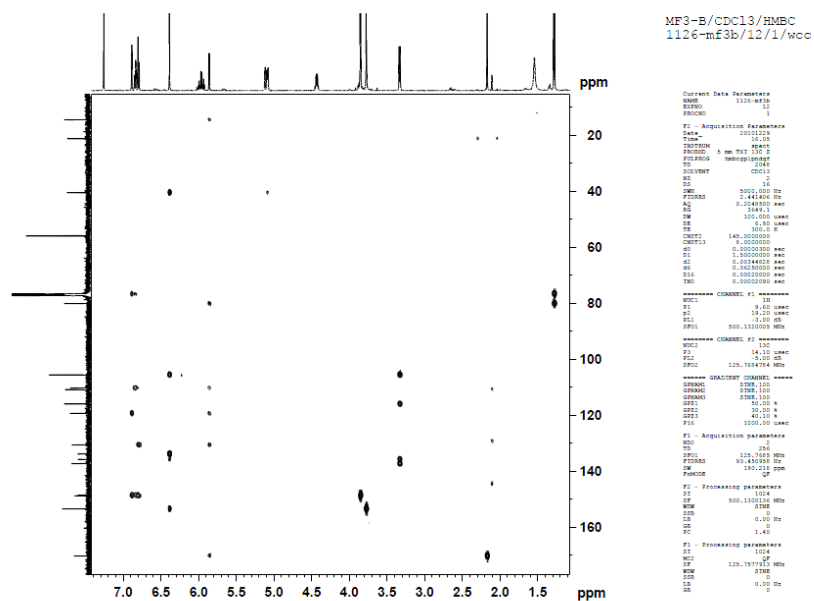
Erythro-Δ⁸-7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan ¹H-NMR 圖譜
(500MHz, CDCl₃)



Erythro-Δ⁸-7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan ¹³C-NMR 圖譜
(125MHz, CDCl₃)



Erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan COSY 圖譜



Erythro- Δ^8 -7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan HMBC 圖譜

