



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I492766 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：100102240

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 21 日

(51)Int. Cl. : A61K8/97 (2006.01)

A61K36/04 (2006.01)

A61P17/00 (2006.01)

A61Q19/00 (2006.01)

(71)申請人：國立高雄海洋科技大學(中華民國) NATIONAL KAOHSIUNG MARINE UNIVERSITY (TW)

高雄市楠梓區海專路 142 號

高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)  
高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：楊景雍 YANG, JING IONG (TW)；張學偉 CHANG, HSUEH WEI (TW)；曾昭能 TSENG, CHAO NENG (TW)；李景欽 LEE, JIN CHING (TW)；林志遠 LIN, CHIH YUAN (TW)；葉紀禎 YEH, CHI CHEN (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

TW 200716148A

碩士論文：海龍鬚菜萃取物抗氧化性之探討，國立高雄海洋科技大學，林志遠，2010/2/25

碩士論文：龍鬚菜抗氧化性質評估及其飲料產品研製，國立中興大學，廖姿婷，  
2002/11/26

Manikandan P et.al. Evaluation of Azadirachta indica leaf fractions for in vitro antioxidant potential and protective effects against H2O2-induced oxidative damage to pBR322 DNA and red blood cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009, Vol. 57, no. 15, p.6990-6996

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：5 共 41 頁

(54)名稱

用於減少自由基誘導之細胞內之DNA損傷的試劑、藥物或保健食品、與皮膚保養品或化妝品，以及紅藻龍鬚菜萃取物的用途

FREE RADICAL-INDUCED INTRACELLULAR DNA DAMAGE REDUCING REAGENT, MEDICAMENT OR HEALTH FOOD AND SKIN CARE PRODUCT OR COSMETICS, AND USES OF GRACILARIA SPP. EXTRACT

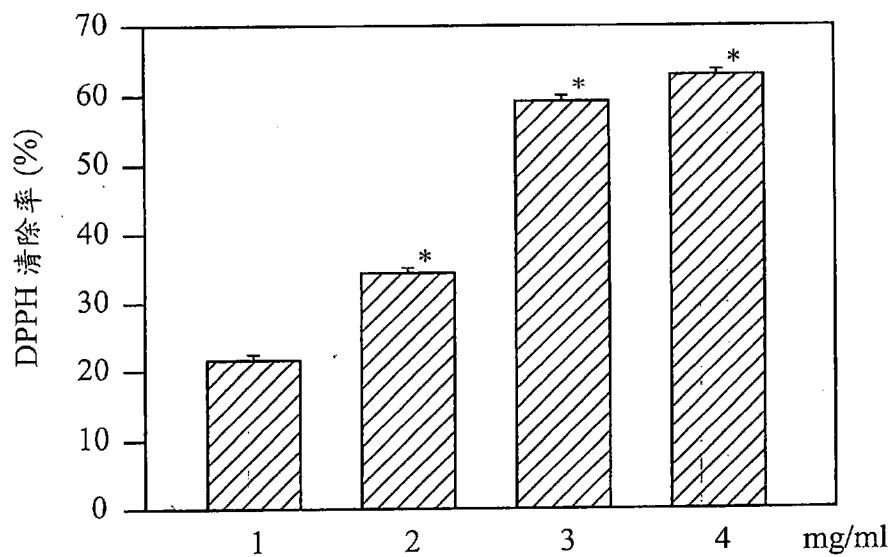
(57)摘要

本發明提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之DNA損傷的試劑，其具有減少自由基誘導之細胞內之DNA損傷的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜(Gracilaria spp.)萃取物為活性成分。

The invention provides a free radical induced intracellular DNA damage reducing reagent, being capable of reducing free radical-induced intracellular DNA damage and comprising an effective amount of Gracilaria spp. extract as an active ingredient.

I492766

TW I492766 B



第 1A 圖

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100102240

※申請日：100、1、21

※IPC分類：A61K 8/67, 36/4; A61P 17/00;  
A61Q 19/00

## 一、發明名稱：(中文/英文)

用於減少自由基誘導之細胞內之DNA損傷的試劑、藥物或保健食品、與皮膚保養品或化妝品，以及紅藻龍鬚菜萃取物的用途 /Free radical-induced intracellular DNA damage reducing reagent, medicament or health food and skin care product or cosmetics, and uses of *Gracilaria* spp. extract

## 二、中文發明摘要：

本發明提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之DNA損傷的試劑，其具有減少自由基誘導之細胞內之DNA損傷的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜(*Gracilaria* spp.)萃取物為活性成分。

## 三、英文發明摘要：

The invention provides a free radical induced intracellular DNA damage reducing reagent, being capable of reducing free radical-induced intracellular DNA damage and comprising an effective amount of *Gracilaria* spp. extract as an active ingredient.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第（ 1A ）圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種海藻萃取物，且特別關於一種紅藻龍鬚菜(*Gracilaria* spp.)萃取物，其具有抗自由基與減少自由基誘導之 DNA 損傷的功效。

### 【先前技術】

包括超氧化陰離子自由基(superoxide anion radicals)、羥基自由基(hydroxyl radical)與過氧化氫(hydrogen peroxide)之活性氧物質(reactive oxygen species)的產生為細胞代謝不可避免的結果或由環境因子所引起(Carcinogenesis, 2009, 30, 2070-2076)。也發現過度的自由基會造成細胞組成損傷，例如脂質氧化(lipid oxidation)、基因失調(gene dysregulation)、改變蛋白質功能(altered protein function)、DNA 損傷與突變(DNA damage and mutation)及延遲細胞生長(retarded cell growth)。因此，自由基壓力(或氧化壓力)對於老化(J Clin Oncol, 2007, 25, 1844-1851)與於人體中之癌症形成 (Lancet, 1994, 344, 862-863)影響重大。

先前研究已顯示海藻(seaweed)衍生物具有可抑制一些人類癌症細胞株生長的抗癌潛力，包括抑制前髓細胞性白血病細胞株(promyelocytic leukemia cell line) HL-60 (Queiroz, K.C.; Assis, C.F.; Medeiros, V.P.; Rocha, H.A.; Aoyama, H.; Ferreira, C.V.; Leite, E.L. Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells)、紅血球骨髓胚細胞白

血病細胞株(erythromyeloblastoid leukemia cell line) K562 (Int J Mol Med, 2004, 14, 925-929)、結腸腺癌細胞株(colon adenocarcinoma cell line) HT-29 (J Med Food, 2007, 10, 587-593)與乳腺癌(breast adenocarcinoma cell line) MCF7 (J Agric Food Chem, 2009, 57, 8677-8682)。海藻萃取物也已顯示具有對抗高膽固醇血症(hypercholesterolemia)與自由基壓力的保護作用(Phytother Res, 2005, 19, 506-510)並且可促進益生菌(probiotics)的生長(Pak J Pharm Sci, 1991, 4, 49-54)。

於臺灣周圍區域所發現的主要海藻種類包括細基龍鬚菜(*Gracilaria tenuistipitata*)、菊花心龍鬚菜(*Gracilaria coforvoides*)、大莖龍鬚菜(*Gracilaria gigas*)、野生長種龍鬚菜(*Gracilaria chorda*)與烏芎龍鬚菜(*Gracilaria compressa*)。來自這些種類之一些的海藻萃取物已被報導具有抗老化活性(Journal of Plant Diseases and Protection, 2009, 116, 263-270)且含有胺基酸、脂肪酸、維他命、礦物質、多酚性化合物(poly phenolic compound)與碳水化合物的豐富來源(Food Control, 2007, 18, 639-645)。細基龍鬚菜為可食用的且可做為食品與化妝品的成分。其為目前於臺灣所栽培之主要的龍鬚菜種類(林志遠，國立高雄海洋科技大學水產食品科學研究所碩士學位論文, 2009)。先前報導已顯示細基龍鬚菜具有對高壓蒸氣滅菌(autoclaving)敏感之自由基清除活性(Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64, 218-223)。

發現於海藻萃取物中的常見抗氧化劑包括酚類、類黃酮與抗壞血酸，它們作用為自由基清除者。已知一般具有抗氧化活性之酚類化合物主要為酚酸與類黃酮(J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 3954-3962)。已報導海藻多酚類對於海藻或其萃取物之主要抗氧化活性有貢獻(Hydrobiology, 1996, 326/327, 199-203; Fish Sci 1996, 62: 923-926; Food Chemistry, 2009, 112, 575-58.)。事實上，先前研究已報導介於 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除與植物性食物中之酚類含量的高度關連性，植物食物，例如穀類(Journal of Cereal Science, 2001, 33, 97-103)、草藥(J Agric Food Chem., 2001, 49(11):5165-70)、水果(J Sci Agric Food, 2000, 80:2021-7; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001a, 49, 5489-5493)、海藻(Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001a, 49, 5489-5493)與蔬菜(Food Chemistry 2004, 19-26)。黃酮類為最普遍與多變化之酚類，它們為被廣泛已知的抗氧化劑，其可阻止並中和自由基、淬滅單線態(quench singlet)與三重態(triplet)氧或分解之過氧化物(Food Chemistry, 1999, 401-436)。除了酚類化合物，存在於植物食物中之抗壞血酸的功能與生物活性也被提出(Public Health Nutr., 2004 7(3):407-22)。抗壞血酸為一有效之抗氧化劑且以其螯合作用(chelating action)被熟知(Food Chemistry, 2008, 107, 40-43)，又其也豐富地存在於大部分之海草中(Hydrobiologia, 1987, 477-481; FAO Nutr Stud., 1974, 1-66)。

### 【發明內容】

本發明提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜(*Gracilaria* spp.)萃取物為活性成分。

本發明也提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜萃取物為活性成分。

本發明還提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜萃取物為活性成分。

本發明另提供一種紅藻龍鬚菜萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑的用途。

本發明又一種紅藻龍鬚菜萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品的用途。

本發明更一種紅藻龍鬚菜萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品的用途。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

### 【實施方式】

在本發明一態樣中，本發明提供一種紅藻龍鬚菜 (*Gracilaria* spp.) 萃取物，其具有清除自由基的能力。

上述之紅藻龍鬚菜可包括細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*)、菊花心龍鬚菜 (*Gracilaria coforvooides*)、大莖龍鬚菜 (*Gracilaria gigas*)、野生長種龍鬚菜 (*Gracilaria chorda*)、東港紗仔龍鬚菜 (*Gracilaria lichenoides*) 或烏芎龍鬚菜 (*Gracilaria compressa*)。

獲得本發明紅藻龍鬚菜萃取物的步驟可包括對紅藻龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物為紅藻龍鬚菜萃取物。第一萃取步驟可包括以一溶劑來萃取紅藻龍鬚菜。

萃取紅藻龍鬚菜所使用之溶劑可包括，但不限於水、甲醇、乙醇、丙酮或其組合。在一實施例中，於第一萃取步驟中所使用之紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜，而所使用之溶劑為水。

在一實施例中，於第一萃取步驟中，紅藻龍鬚菜與溶劑之比例為約 1：15 (w/v) 至 1：25 (w/v)，較佳為約 1：20 (w/v)。

在一實施例中，第一萃取步驟的溫度為約 15-35°C，較佳為約於室溫下或約 24-26°C。又在一實施例中，第一萃取步驟的時間為約 15-30 小時，較佳為約 24 小時。

在另一實施例中，獲得紅藻龍鬚菜萃取物的步驟可更包括，在獲得上述第一萃取物後，將第一萃取物進行過濾

以獲得一濾液與一濾渣，其中濾液為一第二萃取物並作為本發明之紅藻龍鬚菜萃取物使用。

此外，在另一實施例中，獲得紅藻龍鬚菜萃取物的步驟可更包括下述步驟。首先在將上述第一萃取物進行過濾以獲得上述濾液與濾渣之後，對濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中第二萃取步驟包括以一溶劑來萃取濾渣。接著，將濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第一濾液。最後將第二濾液與上述第二萃取物混合以獲得一第三萃取物，並將第三萃取物作為本發明之紅藻龍鬚菜萃取物使用。

於第二萃取步驟中所使用之溶劑可包括，但不限於水、甲醇、乙醇、丙酮或其組合。第一萃取步驟與第二萃取步驟中所使用之溶劑可為相同或不同。在一實施例中，於第二萃取步驟中所使用之溶劑為水。又在一實施例中，第二萃取步驟的溫度為約 15-35°C，較佳為約於室溫下或約 24-26°C。另外，在一實施例中，第二萃取步驟的時間為約 15-30 小時，較佳為約 24 小時。

在又另一實施例中，可進一步將上述所獲得之紅藻龍鬚菜萃取物進行減壓濃縮及/或冷凍乾燥。

在一實施例中，每毫克乾燥之本發明紅藻龍鬚菜萃取物的總多酚類(total phenolics)、類黃酮(flavonoid)與抗壞血酸(ascorbic acid)的含量可分別為約 93-103 μg 五倍子酸(gallic acid)當量、約 17-27 μg 檉黃酮(quercetin)當量與約 0.1-6 μg 抗壞血酸。較佳為，每毫克乾燥之本發明紅藻龍鬚

菜萃取物的總多酚類、類黃酮與抗壞血酸的含量可分別為約 95-101 μg 五倍子酸當量、25-19 μg 檸黃酮當量與 0.5-4 μg 抗壞血酸。

本發明之紅藻龍鬚菜萃取物具有清除自由基之功效。在一實施例中，紅藻龍鬚菜萃取物可清除之自由基可包括氫氧自由基、超氧化陰離子、1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)等，但不限於此。在一實施例中，紅藻龍鬚菜萃取物對 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基有清除效應。在另一實施例中，紅藻龍鬚菜萃取物可清除由過氧化氫所產生之氫氧自由基。

在一實施例中，紅藻龍鬚菜萃取物還具有減少自由基誘導之 DNA 損傷的功效，及/或具有在自由基或氧化壓力下，減少細胞死亡或細胞週期遏止的功效。自由基誘導之 DNA 損傷可包括無細胞情況之自由基誘導的 DNA 損傷，或自由基誘導之細胞內的 DNA 損傷。

無細胞情況之自由基誘導的 DNA 損傷可包括由自由基所誘導之非細胞或細胞外之 DNA 的損傷，例如由自由基所誘導之細胞外質體 DNA 的損傷，但不限於此。而自由基誘導之細胞內的 DNA 損傷可包括由自由基所誘導之細胞核中之 DNA 的損傷，例如由自由基所誘導之基因體 DNA 的損傷，或者於細胞內之其他 DNA 的損傷，但不限於此。

因此，在本發明另一態樣中，本發明可提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力，且此試劑可包括

一有效量之上述紅藻龍鬚菜萃取物為活性成分。此外，本發明還可提供一種將上述紅藻龍鬚菜萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑的用途。

在一實施例中，上述用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑還可具有在自由基壓力或氧化壓下，減少細胞死亡或細胞週期遏止的功效。

在一實施例中，上述之減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑可更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。藥學上可接受之載體或鹽類可佔上述試劑之 0.01-99.99 wt%，較佳為 0.1-99.9 wt%。

又，在本發明另一態樣中，本發明可提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力，且此藥物或保健食品可包括一有效量之上述紅藻龍鬚菜萃取物為活性成分。此外，本發明還可提供一種將上述紅藻龍鬚菜萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品的用途。

在一實施例中，上述用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品還可具有在自由基壓力或氧化壓下，減少細胞死亡或細胞週期遏止的功效。

在一實施例中，上述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品可更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。藥學上可接受之載體或鹽類可佔上述藥物或保健食品之 0.01-99.99 wt%，較佳為 0.1-99.9 wt%。

而上述藥學上可接受之載體可包括，但不限於溶劑、分散媒 (dispersion medium)、套膜 (coating)、抗菌與抗真菌試劑與一等滲透壓與吸收延遲 (absorption delaying) 試劑等與藥學投予相容者。對於不同的給藥方式，可利用一般方法將藥學組合物配置成劑型 (dosage form)。

前述藥學上可接受之鹽類可包括，但不限於鹽類包括無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，鹼土金族鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或鎂鹽。此外，也可是為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡萄糖胺，胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、組織胺酸、麴胺酸醯胺。

前述試劑或藥物之給藥可以口服、非口服、經由吸入噴霧 (inhalation spray) 或藉由植入貯存器 (implanted reservoir) 的方式。非口服可包括 (subcutaneous)、皮內 (intracutaneous) 靜脈內 (intravenous)、肌肉內 (intramuscular)、關節內 (intraarticular) 動脈 (intraarterial)、滑囊 (腔) 內 (intrasynovial)、胸骨內 (intrasternal) 蜘蛛膜下腔 (intrathecal)、疾病部位內 (intraleaional) 注射以及灌注技術。

藥物口服成分或保健食品的形式可包括，但不限定於，藥錠、膠囊、乳劑 (emulsions)、水性懸浮液 (aqueous suspensions)、分散液 (dispersions) 與溶液。

再者，根據前述，在本發明又一態樣中，本發明可提供一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚

保養品或化妝品，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力，而此皮膚保養品或化妝品可包括一有效量之上述紅藻龍鬚菜萃取物為活性成分。此外，本發明還可提供一種將上述紅藻龍鬚菜萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品的用途。

在一實施例中，用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品還可具有在自由基壓力或氧化壓下，減少細胞死亡或細胞週期遏止的功效。

在一實施例中，上述用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品可更包括一美容或藥學上可接受之媒劑。

另外，上述美容或藥學上可接受之媒劑可做為活性成分之稀釋劑、分散劑或載體。美容或藥學上可接受之媒劑可包括常在皮膚護理產品中使用的材料，如水、液體或固體軟化劑、矽酮油、乳化劑、溶劑、濕潤劑、增稠劑、粉末、噴射劑與類似物。

媒劑可佔上述皮膚保養品或化妝品之 0.01-99.99 wt%，較佳為 0.1-99.9 wt%，並可以在沒有其它佐劑的存在下構成上述皮膚保養品或化妝品的其餘部份。

又，上述皮膚保養品或化妝品也可更包括其它特殊的皮膚受益活化物，如防曬劑及皮膚淡化劑。媒劑也可以進一步包括如香料、遮光劑、防腐劑、著色劑及緩衝液之類的佐劑。

此外，上述皮膚保養品或化妝品於一實施例中可製作

成一皮膚塗劑型式包括，但不限於，乳劑、膏劑、凝膠、噴劑、化妝水、洗髮水或幕斯等。一般來說，皮膚噴劑可由噴霧狀共聚物所組成，例如，聚乙稀吡咯烷酮、醋酸乙稀及其類似物，且其可具有化妝水之功能。皮膚凝膠的製備方法與噴劑類似，但其為凝膠狀且無乙醇的存在，可附著於皮膚上。皮膚幕斯為利用壓力釋放泡沫。皮膚乳劑為一疏水性或親水性乳劑、膏劑、凝膠、潤膚劑、噴劑、塗劑、皮膚調理水、洗髮水或幕斯。另外，更可添加適合的成份至皮膚乳劑，此額外添加的成份包括凡士林、蠟、羊毛脂、矽、微脂體、蔬菜、礦物油、增塑劑、香料、防腐劑、促滲透劑、pH 值調整劑或其他適合用於局部皮膚的成份。此額外的成份可濕潤皮膚，穩定活性化合物，增加保養品或化妝品-皮膚的接觸及局部區域的濃度，並控制皮膚保養品或化妝品的釋放。

### 【實施例】

#### 材料與方法

##### 1. 未經處理之材料

細基龍鬚菜(*Gracilaria tenuistipitata*)為於 2009 年春季收集自位於臺灣雲林縣口湖鄉海邊的養殖場，並以 0°C 運送至實驗室。在實驗室中，將海藻以自來水清洗以移除附生植物及鹽分、與雜質與沙。接著將海藻浸泡於蒸餾水中

兩次，然後將其冷凍乾燥。將經乾燥的樣本進行研磨並通過 60 網目(mesh)篩網。將經冷凍乾燥之樣本磨成細粉並儲存於-40°C。

## 2. 萃取與分離

於室溫下，將於前述步驟中所獲得之冷凍乾燥之粉末(50 g)以 1000 ml 之去離子水於機械震盪器中進行萃取 24 小時。將萃取物以 Whatman No.1 濾紙進行過濾。將濾液置於迴轉蒸發濃縮機(rotary evaporator) (Buchi Laboratoriums-Technik, Switzerland) 中在  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  下蒸發至乾燥，且之後將其進行冷凍乾燥。將冷凍乾燥之紅藻龍鬚菜萃取物儲存於一密封之容器於-40°C 直到使用。

## 3. 來自紅藻龍鬚菜之萃取物的總酚類(total phenolics)、類黃酮(flavonoid)與抗壞血酸(ascorbic acid)的測定

以 Folin-Ciocalteu 試劑根據 Singleton 與 Rossi 的方法 (Am J Enol Vitic, 1965, 16:144-158)，使用五倍子酸(gallic acid)為標準品，來測定於上述紅藻龍鬚菜萃取物中的總酚類化合物。將總酚類含量表示成每毫克之乾燥樣本的五倍子酸當量  $\mu\text{g}$ 。根據敘述於 Jones, E.; Hurghes, R.E. Foliar ascorbic acid in some angiosperms. Phytochemistry, 1983 中之 2,6-二氯吲哚酚鈉染料法(2,6-dichloroindophenol-Na dye)來進行抗壞血酸的定量測定。結果顯示為乾物重(dry matter

basis)( $\mu\text{g}$  抗壞血酸/ $\text{mg}$  乾燥樣本)。藉由使用敘述於(ournal of Agricultural Research, 1998, 37, 99-105)之比色法(colorimetric method)來測定類黃酮含量。將總類黃酮含量自校準曲線計算為槲黃酮(quercetin)量且表示為每毫克之乾燥樣本的槲黃酮當量  $\mu\text{g}$ 。

#### 4. 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基 (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除活性

上述紅藻龍鬚菜萃取物對於清除 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基的活性為藉由根據 Blois 的方法(Nature, 1958, 26, 1199-1200) 來測定。簡單而言，1 ml 之 1,1-二苯基-2-苦醯胼甲醇溶液(1 mM)分別與 3 ml 之不同濃度的萃取物溶液(1-4 mg/ml)混合。之後將混合物劇烈震盪並且在室溫下於黑暗中靜置 30 分鐘。於 517 nm 測定吸收值並將活性表示為相對於控制組之 1,1-二苯基-2-苦醯胼清除百分比。百分比清除活性以  $[(A_c - A_s)/A_c] \times 100$  來計算，其中  $A_s$  為於分析中以萃取樣本測量之吸收值； $A_c$  為控制組（無萃取樣本）之吸收值。將丁基羥基甲氧苯(butylated hydroxyanisole, BHA)與抗壞血酸作為正控制組(positive control)。將結果顯示為三重複實驗之平均值±標準差。

#### 5. 細胞培養

H1299 (人類肺腺癌細胞)，被培養於添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 盤尼西林、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  鍾黴素以及 0.03% 麥

胺酸的完全 RPMI-1640 培養基中。將細胞維持於 37 °C 在含 5% CO<sub>2</sub> 的潮濕大氣中。

## 6. 質體 DNA 裂解分析

超螺旋形式之質體 DNA 成為開口圓形形式及/或更進一步成為線狀形式的轉變，被視為 DNA 股斷裂的指標。含有 150 ng 質體 DNA、0.1 mM FeSO<sub>4</sub>、0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與於指定濃度之上述紅藻龍鬚菜萃取物的反應混合物(10 μl)培養於 37°C，30 分鐘。接著將 2 μl 6×載入膠片染劑(gel loading dye) (0.05% 溴酚藍(bromophenol blue)、40 mM EDTA 與 50% 甘油(v/v)) 加入反應混合物中以終止反應，並將反應混合物於 0.8% 瓊脂糖膠體(agarose gel)上以 0.5× TAE 緩衝溶液在 50 V 下進行電泳 1-2 小時。將於膠體中之 DNA 以溴化乙菲錠(ethidium bromide)染色，並且於紫外光下顯現與拍照。於相同條件下將所有實驗重複三次。

## 7. 豐星細胞核萃取物分析

由於添加細胞核萃取物，豐星細胞核萃取物分析相較於傳統豐星分析更為靈敏(Mutat Res, 2007, 629, 133-139; Anal Biochem, 2005, 337, 70-75)。豐星細胞核萃取物分析的步驟如 J Cell Biochem, 2008, 103, 528-537、DNA Repair (Amst), 2008, 7, 751-761 與 DNA and Cell Biology, 2009, 28(10):501-506 中所述。在指定濃度之上述紅藻龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4 mg/ml)存在下，於 37 °C 下以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或

不以  $H_2O_2$  處理 H1299 細胞 30 分鐘。將 100  $\mu l$  可分量之含 H1299 細胞懸浮液 ( $1 \times 10^6$  細胞/ml 於 PBS 中) 與等體積之 1.2% 低熔點瓊脂糖(low-melting agarose) (於 PBS 中，pH 7.4) 混合，並立即吸取於預先以 1%一般瓊脂糖 (於蒸餾水中) 塗佈的一玻璃載片上。之後將載片浸沒於新鮮配製之冰涼細胞分解溶液 (2.5 M NaCl、100 mM EDTA、10 mM Tris (pH 10)、1%十二烷基肌氨酸鈉(N-laurylsarcosine)、1% Triton X-100 與 10%二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 中，並於 4 °C 下培養 2 小時，且之後以去離子水輕洗三次。含有 0.6  $\mu g$  細胞核萃取物、50 mM Hepes-KOH (pH 7.9)、70 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.4 mM EDTA、2 mM ATP、40 mM 磷肌氨酸(phosphocreatine) 與 2.5 mM 肌酸激酶(creatine phosphokinase)的切除混合物(excision mixture)加於各載片上。將蓋玻片蓋於載片上並將載片於潮濕環境中在 37 °C 下培養 2 小時以使細胞核萃取物分解。將載片浸置於變性緩衝溶液(denature buffer) (0.3 N NaOH 與 1 mM EDTA) 20 分鐘，並於使其於 25 V，300 mA 下執行電泳 25 分鐘。在以去離子水清洗後，將載片於 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5) 中進行中和並以 40  $\mu l$  碘化丙啶(propidium iodide, PI)(50  $\mu g/ml$ ) 進行染色。在螢光顯微鏡觀察下，藉由使用尾距之參數(parameter of tail moment)，以電腦程式(<http://tritekcorp.com>)來測量來自各細胞之細胞核的 DNA 遷移，尾距之參數被定義為尾部之長度與在尾部中之總 DNA 片段的乘積。

## 8. 細胞生存能力分析

如於 J Agric Food Chem, 2010, 58, 8798-8805 中所述，來執行 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴鹽(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)分析。簡而言之，在 96 孔盤中的細胞加入含有 0.5 mg/ml 之 MTT 溶液，在 37 °C 下培養 2 小時。接著，在移除含有 MTT 溶液之培養基後，將 100 μl DMSO 加入各孔洞中。將 96 孔盤震盪至 Formazan 顆粒完全溶解為止。將溶有 Formazan 之二甲基亞礦於波長 595 nm 下測量其吸光值。

## 9. 藉由碘化丙啶染色之流式細胞測定(flow cytometric determination)細胞週期頻度分佈圖(cell cycle histogram)

如於 Cancer Detect Prev, 2005, 29, 286-293 中所述，測定出細胞週期頻度分佈圖。簡單而言，在指定濃度之上述紅藻龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4 mg/ml)存在下，以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或不以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理細胞 24 小時。在處理後，將細胞進行收集，並以 PBS 緩衝溶液清洗兩次，且隔夜浸泡於 70% 乙醇中以將其進行固定。之後於 4 °C 將含細胞之乙醇以 700 rpm 離心 5 分鐘以獲得細胞沈澱。再將細胞懸浮於含有碘化丙啶(10 μg/ml) (Sigma, St Louis, MO)與 RNase A (10 μg/ml)之 PBS 緩衝溶液中。在於黑暗中室溫下培養 15 分鐘後，以 FACScan 流式細胞儀(Becton-Dickinson, Mansfield, MA) 及 Cell-Quest 與 Modfit 軟體 (Becton-Dickinson, Mansfield, MA)來分析細胞。

## 10. 統計分析

所有資料以平均值±標準差來呈現。使用 Student's t-測試來測試於兩個群組間的平均值差異。

## 結果

### 1. 紅藻龍鬚菜萃取物的酚類、類黃酮與抗壞血酸的含量及其 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基自由基清除活性

先前研究指出特定之多酚類(polyphenol)，例如酚酸(phenolic acid)、類黃酮、單寧酸(tannin) (Ecklonia cava. Algae 18, 341-347., 2003a)、抗壞血酸(Hydrobiologia, 1987, 477-481)與色素(Food Sci Tech Int, 2004, 10:65-72)為海藻中之潛在的抗氧化化合物。於本實施例中，測定出每毫克乾燥之本發明紅藻龍鬚菜萃取物的總多酚類、類黃酮與抗壞血酸的含量分別為  $98.94 \pm 2.43 \mu\text{g}$  五倍子酸當量、 $22.59 \pm 1.08 \mu\text{g}$  檸黃酮當量與  $1.59 \pm 0.18 \mu\text{g}$  抗壞血酸。

1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除被廣泛應用來評估特定化合物或萃取物之自由基清除效果，且可被用以評估它們於短時間內之抗氧化活性(Food Chemistry, 2008, 107, 40-43; Food Chemistry, 2008, 110:128-36.)。紅藻龍鬚菜萃取物顯示濃度依賴 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除活性(第 1A 圖)。此外，濃度為 3 mg/ml 與 4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物的 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除率可達 60% (第 1A 圖)。又 4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物的 1,1-二苯

基-2-苦醯胼自由基清除率(60%)顯著高於 10 ppm 丁基羥基甲氧苯(BHA)與 100 ppm 抗壞血酸(VitC)的 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除率（第 1B 圖）。

## 2. 紅藻龍鬚菜萃取物避免於質體中之自由基誘導之 DNA 股斷裂

氧化之 DNA 損傷可由因細胞代謝或環境之自由基壓力所產生之活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)所引起，且被認為是老化、致癌作用與其他疾病之一貢獻因子(FASEB J, 2003, 17, 1195-1214)。超螺旋形式之質體 DNA 成為開口圓形形式或線狀形式的轉變，通常被做為 DNA 股斷裂的指標(Biochim Biophys Acta, 1994, 1225, 259-263)。於此實施例中，評估紅藻龍鬚菜萃取物對抗來自  $H_2O_2$  處理的自由基壓力所引起之 pBR322 質體 DNA 裂解的保護效果。在沒有  $H_2O_2$  存在下，pBR322 質體 DNA 主要為超螺旋形式(S)（第 2A 圖，控制組）。而在加入  $FeSO_4$  與  $H_2O_2$  之後，pBR322 質體 DNA 的超螺旋形式減少，且轉變為鬆散之開口圓形形式(OC)或線狀形式(L)(第 2A 圖，lane 2)。然而，在 1 至 4 mg/ml 紅藻龍鬚菜萃取物存在下，維持超螺旋形式之 pBR322 質體 DNA 的量增加（第 2A 圖，lane 3-5）。藉由  $H_2O_2$  處理，超螺旋形式 pBR322 質體的相對百分比減低至  $26.7 \pm 4.9$ ，而在 1、2 與 4 mg/ml 紅藻龍鬚菜萃取物存在下，超螺旋形式 pBR322 質體的相對百分比分別回復為  $56.2 \pm 1.4$ 、 $61.8 \pm 1.8$  與  $83.5 \pm 2.8$ （平均值±標準誤差）。

準差，第 2B 圖）。這些結果指出紅藻龍鬚菜萃取物具有中和由  $H_2O_2$  所引起之自由基壓力的能力，且因此增加了 DNA 分子的穩定度。

由此可知紅藻龍鬚菜萃取物具有減少自由基誘導之 DNA 損傷的能力。

### 3. 紅藻龍鬚菜萃取物保護細胞避免因自由基壓力造成之細胞 DNA 損傷

藉由使用彗星細胞核萃取物分析，於 H1299 細胞中證實紅藻龍鬚菜萃取物對抗氧化之 DNA 損傷的保護能力。在未經處理之控制組中，幾乎沒有細胞核萃取物出現“尾部”（如附件 A，其為正常細胞）。隨著  $H_2O_2$  處理下，細胞核萃取物出現清楚的尾部（如附件 B，僅有  $H_2O_2$  的處理），而尾部會隨著紅藻龍鬚菜萃取物的共處理而減少（如附件 C~E，在存在下經 1-4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物處理）。細胞核萃取物緩衝溶液控制組、僅有  $H_2O_2$  處理組、與紅藻龍鬚菜萃取物處理組（1、2 與 4 mg/ml）的平均尾距值（平均值±標準差）分別為  $12.8\pm7.3$ 、 $69.6\pm12.0$ 、 $53.6\pm17.9$ 、 $32.4\pm10.5$  與  $22.1\pm9.8$ （第 3 圖，介於控制組與 4 mg/ml 紅藻龍鬚菜萃取物處理組之間的差異， $P > 0.05$ ）。紅藻龍鬚菜萃取物顯示顯著之抗自由基誘導之 DNA 壓力的保護作用。這些結果指出紅藻龍鬚菜萃取物的 DNA 保護作用在無細胞與細胞脈絡(cell context)兩者中為有效的。

此外，由上述結果也可得知紅藻龍鬚菜萃取物具有減

少自由基誘導之細胞內 DNA 損傷的能力。

4. 在自由基壓力下紅藻龍鬚菜萃取物協助細胞存活  
於此實施例中測試是否紅藻龍鬚菜萃取物的保護效果  
在自由基壓力下也可協助 H1299 細胞的存活。將 H1299 細  
胞在在指定濃度之紅藻龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4  
mg/ml)存在下，以  $H_2O_2$  或不以  $H_2O_2$  處理細胞 24 小時。細  
胞存活率係藉由 3-(4，5-二甲基噻唑-2)-2，5-二苯基四氮  
唑溴鹽分析來測定且以未經處理之 H1299 細胞的存活率來  
進行標準化。以最高至 4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物來處  
理細胞對細胞存活率而言並無不良影響（第 4A 圖）。在  
 $H_2O_2$  誘導之自由基壓力存在下，紅藻龍鬚菜萃取物以劑量  
依賴方式增加細胞存活率，以 0.5、1、2 與 4 mg/ml 之紅  
藻龍鬚菜萃取物分別將經  $H_2O_2$  處理之細胞的細胞存活率  
增加至  $55.6 \pm 3.7$  至  $63.3 \pm 8.3$ 、 $76.4 \pm 4.6$ 、 $89.0 \pm 3.2$  與  
 $100.3 \pm 16.0$ （第 4B 圖）。特別是，以  $H_2O_2$  與 4 mg/ml 紅藻  
龍鬚菜萃取物兩者所處理 H1299 細胞的存活率與控制組細  
胞的存活率並無顯著差異。

5. 紅藻龍鬚菜萃取物緩和由於自由基壓力所引起之  
細胞週期遏止

藉由流式細胞技術，進一步分析在 0-4 mg/ml 之紅藻  
龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4 mg/ml)存在下，以  $H_2O_2$   
或不以  $H_2O_2$  處理 24 小時之 H1299 細胞的細胞週期分佈。

控制組 H1299 細胞分別顯示包括細胞族群之 62.0% 與 18.0% 的一主要 G1 波峰與一次要 G2/M 波峰（第 5 圖，圖板(panel) 1）。反之，經  $H_2O_2$  處理之細胞顯示 81.7% 之顯著的 G2/M 族群，其為因 DNA 損傷所引起之細胞週期遏止的清楚徵象（第 5 圖，圖板 2）。然而，此 G2/M 的遏止藉由以紅藻龍鬚菜萃取物來共處理漸增地被緩和且實際上消失於 2-4 mg/ml 之龍鬚菜萃取物存在下（第 5 圖，圖板 3-6）。此結果指出紅藻龍鬚菜萃取物具有避免 DNA 損傷且確保正常細胞週期進行的能力。

## 討論

於本發明中研究紅藻龍鬚菜萃取物的抗氧化能力，特別是對抗誘導之 DNA 損傷的細胞性保護作用。活性氧物質包括 8-羥基鳥嘌呤(8-oxoguanine)的形成，其累積誘導鹼基配對錯誤、蛋白質編碼錯誤、DNA 突變與甚至誘導基因體的不穩定。於本發明中確認，於無細胞分析中紅藻龍鬚菜萃取物有效抑制自由基誘導 DNA 股斷裂。此外，使用靈敏之彗星細胞核萃取物分析以測量細胞之 DNA 損傷的實驗與細胞週期圖譜也指出紅藻龍鬚菜萃取物保護 H1299 細胞免於自由基壓力，且因此在自由基壓力下增加細胞的存活率。

先前報導指出，在 1,1-二苯基-2-苦醯肼自由基清除分析中，細基龍鬚菜的沸騰萃取物(boiling extract)以 24.22

mg/ml 的半抑制濃度( $IC_{50}$ )具有 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除能力(Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64, 218-223)。於本發明中，本發明之紅藻龍鬚菜常溫萃取物具有更有潛力之抗氧化活性，其於僅僅 3 mg/ml 的濃度下表現出 60% 的 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除活性。

考慮到海藻之快速的生長速度及海藻萃取物於食品與化妝品工業的廣泛使用，因此本發明之紅藻龍鬚菜常溫萃取物在這些應用中表現出吸引人之多功能選擇。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

### 【圖式簡單說明】

第 1A 圖顯示不同濃度(1-4 mg/ml)之紅藻龍鬚菜萃取物的 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除活性，資料以平均值±標準差( $n = 3$ )來呈現， $*P < 0.001$  (相較於 1 mg/ml 紅藻龍鬚菜萃取物)。

第 1B 圖顯示正控制組丁基羥基甲氧苯(BHA, 10 ppm)與抗壞血酸(VitC, 100 ppm)及 4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物的 1,1-二苯基-2-苦醯胼自由基清除率，資料以平均值±標準差( $n = 3$ )來呈現， $*P < 0.001$  (相較於控制組 (紅藻龍鬚菜萃取物))。

第 2 圖顯示紅藻龍鬚菜萃取物對  $H_2O_2$  誘導之質體結構改變的保護作用。第 2A 圖顯示在不同濃度(1-4 mg/ml)之紅藻龍鬚菜萃取物存在下，經  $H_2O_2$  處理之 pBR322 質體 DNA 的電泳圖；第 2B 圖顯示在不同濃度(1-4 mg/ml)之紅藻龍鬚菜萃取物存在下，經  $H_2O_2$  處理之 pBR322 質體 DNA 的超螺旋形式含量，資料以平均值±標準差( $n = 3$ )來呈現， $*P < 0.001$  (相較於僅有  $H_2O_2$ )。

第 3 圖顯示負控制組、正控制組與經 1-4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物處理之細胞於彗星細胞核萃取物分析中於尾部中之 DNA 的百分比，資料以平均值±標準差( $n = 200$ )來呈現， $*P < 0.001$  (相較於僅有  $H_2O_2$ )。

第 4 圖顯示細胞存活率。第 4A 圖顯示將細胞在不同濃度之紅藻龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4 mg/ml)存在下，未以  $H_2O_2$  處理 24 小時的細胞存活率；第 4B 圖顯示將細胞

在不同濃度之紅藻龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4 mg/ml)存在下，以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 24 小時的細胞存活率，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，\*P < 0.001 (相較於僅有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。

第 5 圖顯示將細胞在 0-4 mg/ml 之紅藻龍鬚菜萃取物(0、0.5、1、2 或 4 mg/ml)存在下，以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或不以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 24 小時的細胞週期分佈 (24 小時)，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現。

#### 【主要元件符號說明】

無

## 七、申請專利範圍：

1. 一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力且包括一有效量之細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*) 之室溫水萃取物為活性成分，其中獲得該細基龍鬚菜之室溫水萃取物的步驟包括：

對該細基龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物，而該第一萃取步驟包括以水來萃取該細基龍鬚菜；

將該第一萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第二萃取物；

對該濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中該第二萃取步驟包括以水於室溫來萃取該濾渣；

將該濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第二濾液；以及

將該第二濾液與該第二萃取物混合以獲得一第三萃取物。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其中該第一萃取步驟於室溫下進行。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其中該第一萃取步驟的時間為約 15-30 小時。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其中該第二萃取步驟的時間為約 15-30 小時。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之用於減少自由基誘導

之細胞內之 DNA 損傷的試劑，其中該細胞內之 DNA 損傷包括細胞核內之 DNA 損傷。

6. 一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力且包括一有效量之細基龍鬚菜之室溫水萃取物為活性成分，其中獲得該細基龍鬚菜之室溫水萃取物的步驟包括：

對該細基龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物，而該第一萃取步驟包括以水來萃取該細基龍鬚菜；

將該第一萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第二萃取物；

對該濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中該第二萃取步驟包括以水於室溫來萃取該濾渣；

將該濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第二濾液；以及

將該第二濾液與該第二萃取物混合以獲得一第三萃取物。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品，其中該細胞內之 DNA 損傷包括細胞核內之 DNA 損傷。

8. 如申請專利範圍第 6 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品，更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。

9. 一種用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品，其具有減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的能力且包括一有效量之細基龍鬚菜之室溫水

萃取物為活性成分，其中獲得該細基龍鬚菜之室溫水萃取物的步驟包括：

對該細基龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物，而該第一萃取步驟包括以水來萃取該細基龍鬚菜；

將該第一萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第二萃取物；

對該濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中該第二萃取步驟包括以水於室溫來萃取該濾渣；

將該濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第二濾液；以及將該第二濾液與該第二萃取物混合以獲得一第三萃取物。

10.如申請專利範圍第 9 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品，其中該細胞內之 DNA 損傷包括細胞核內之 DNA 損傷。

11.如申請專利範圍第 9 項所述之用於減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品，更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。

12.一種細基龍鬚菜之室溫水萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的試劑的用途。

13.一種細基龍鬚菜之室溫水萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的藥物或保健食品的用途。

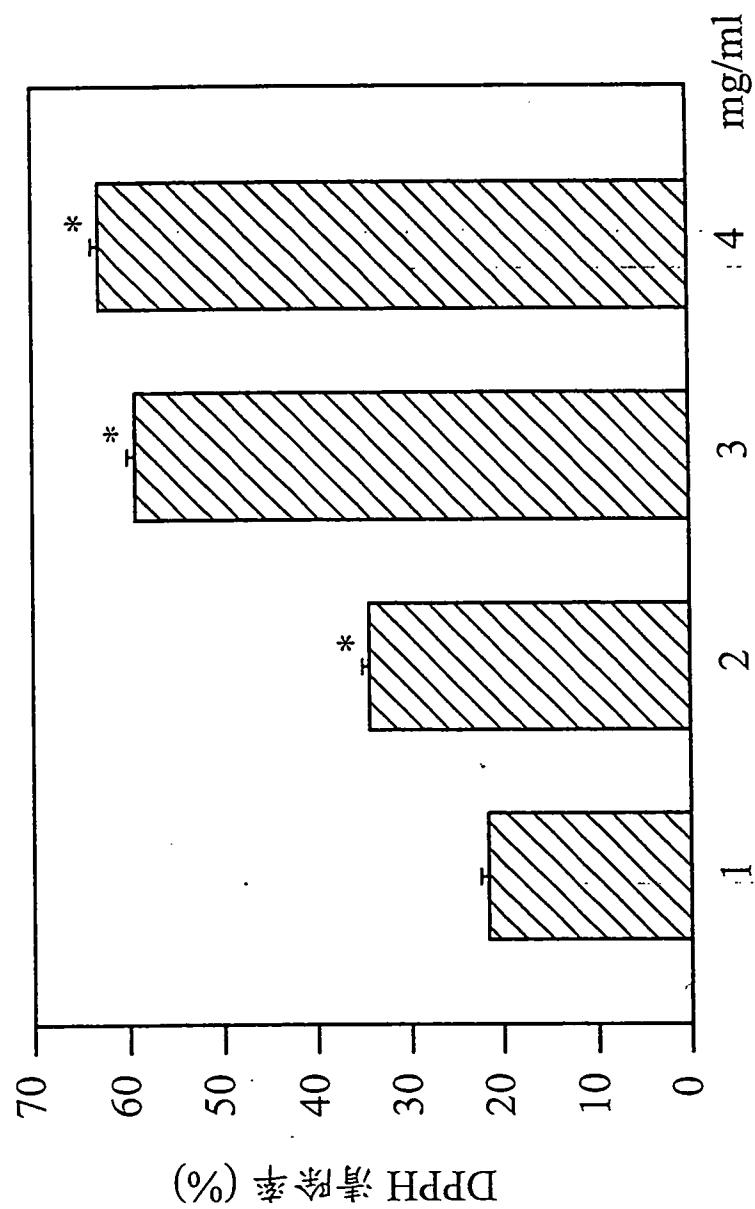
14.一種細基龍鬚菜之室溫水萃取物用於製備減少自由基誘導之細胞內之 DNA 損傷的皮膚保養品或化妝品的用途。

I492766

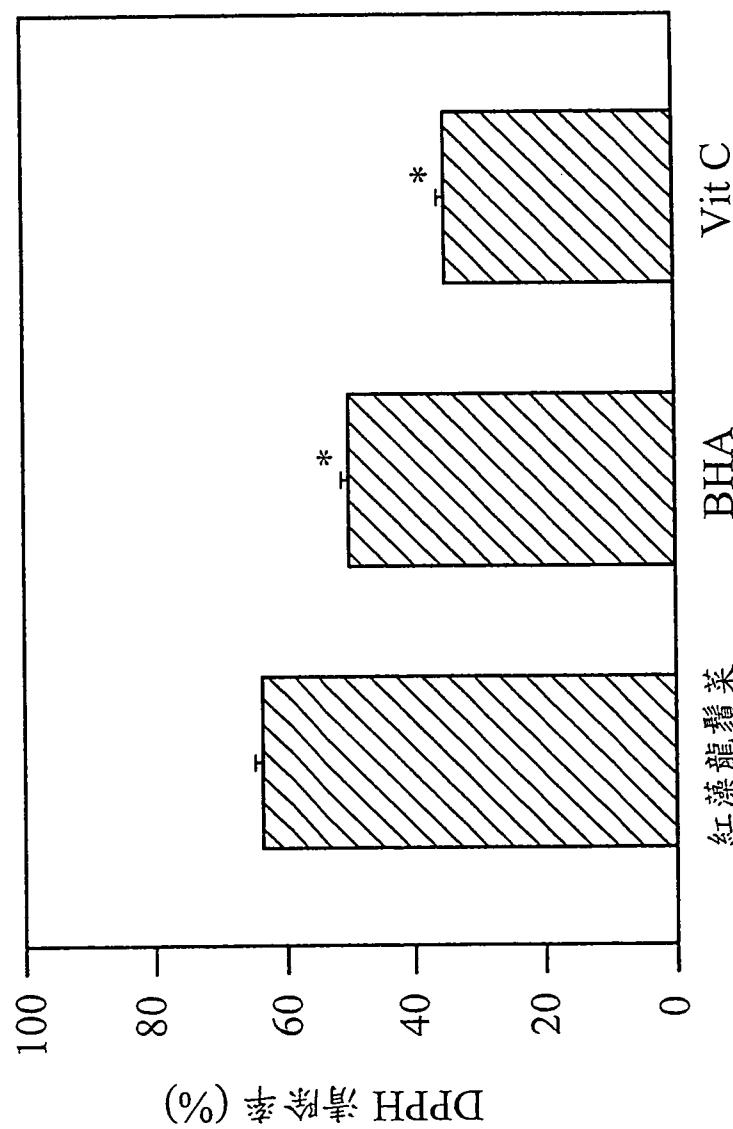
第 100102240 號申請專利範圍修正本

修正日期：102 年 10 月 21 日

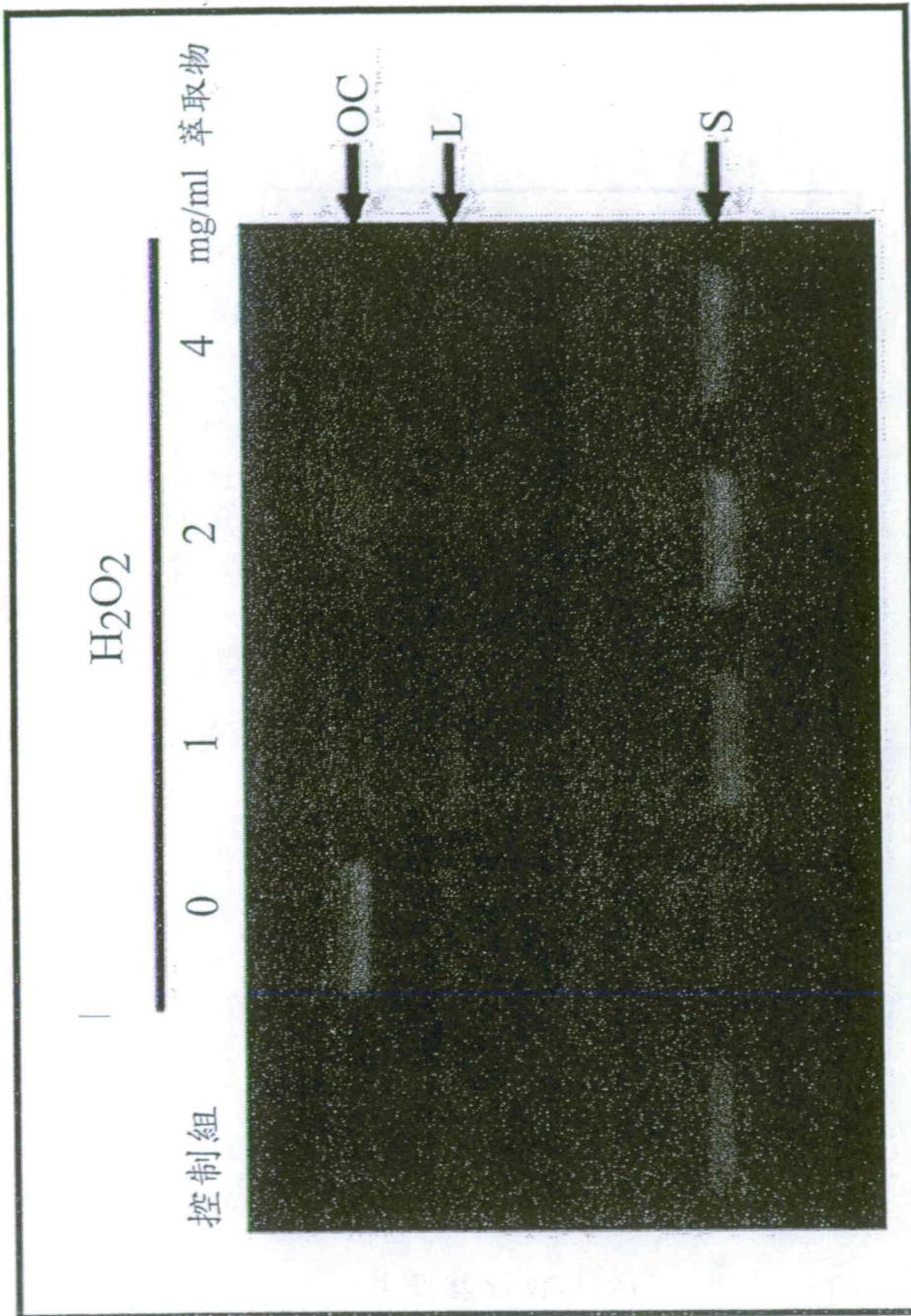
八、圖式：(如後所示)



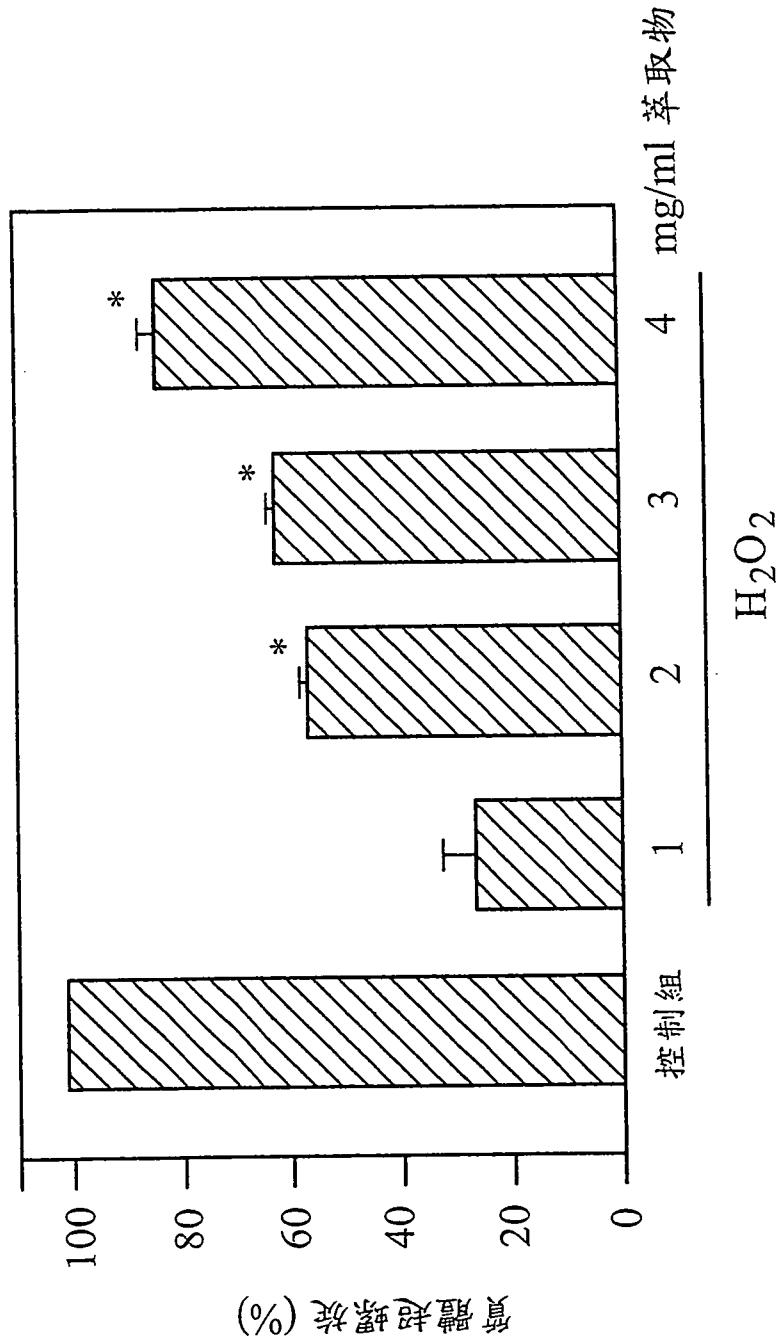
第 1A 圖



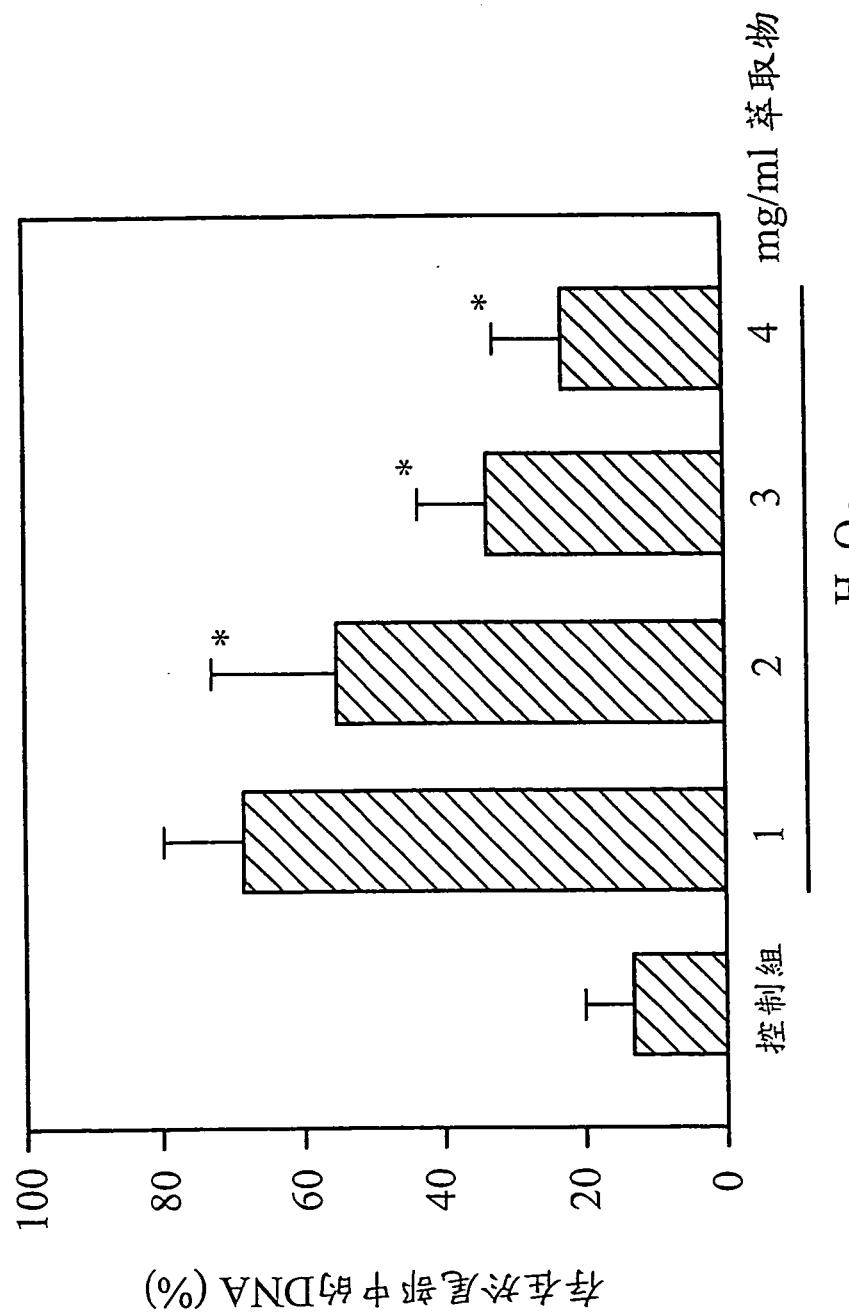
第 1B 圖



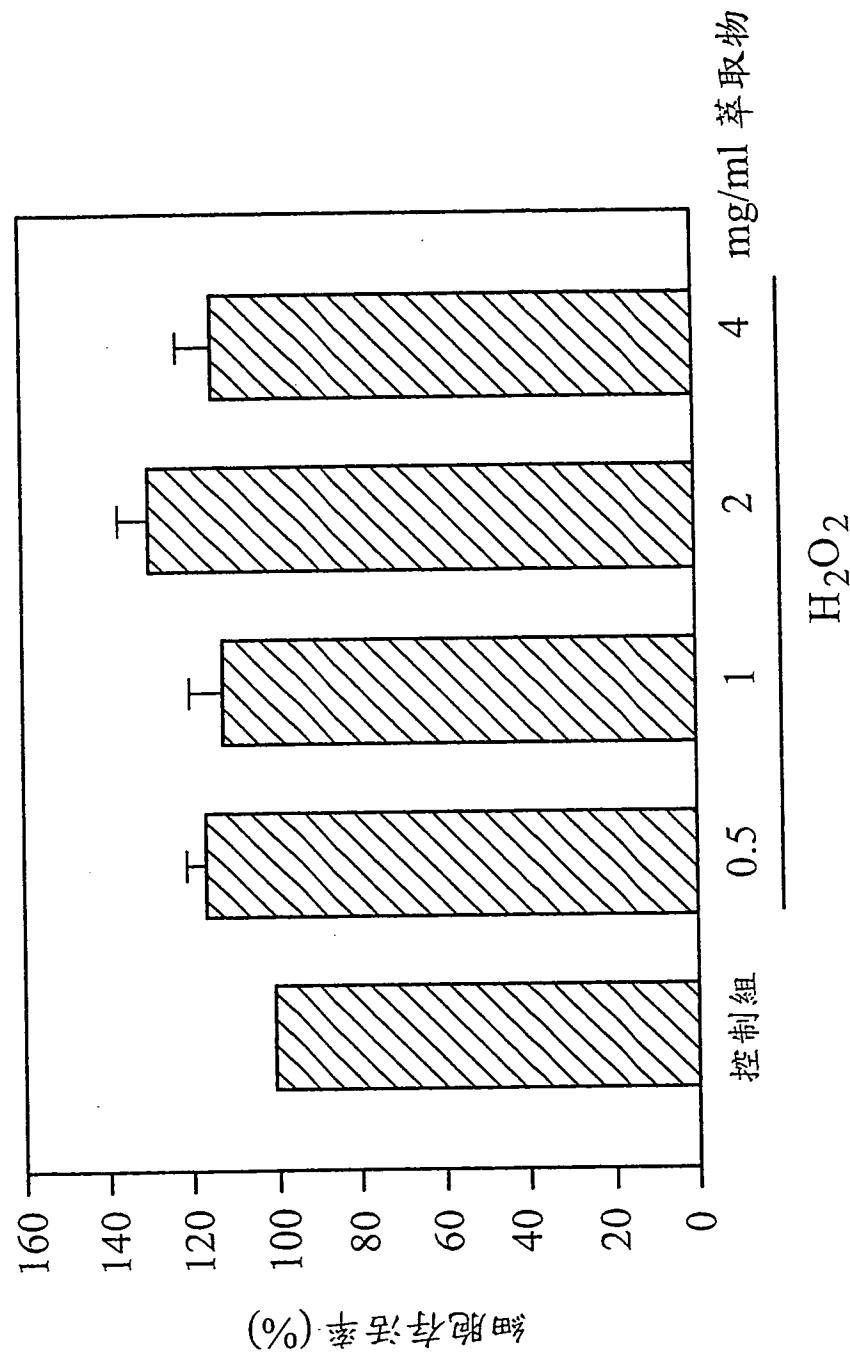
第 2A 圖



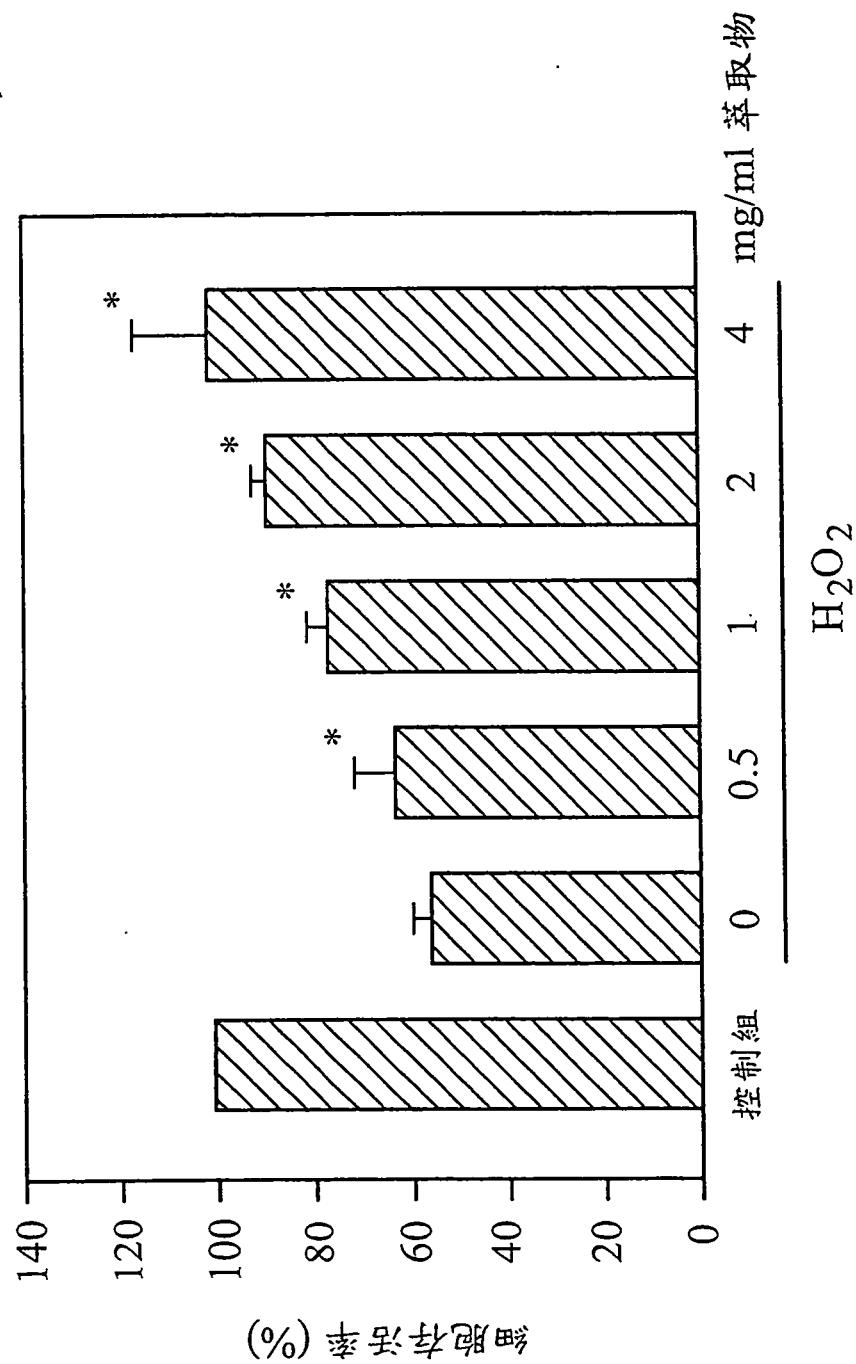
第 2B 圖



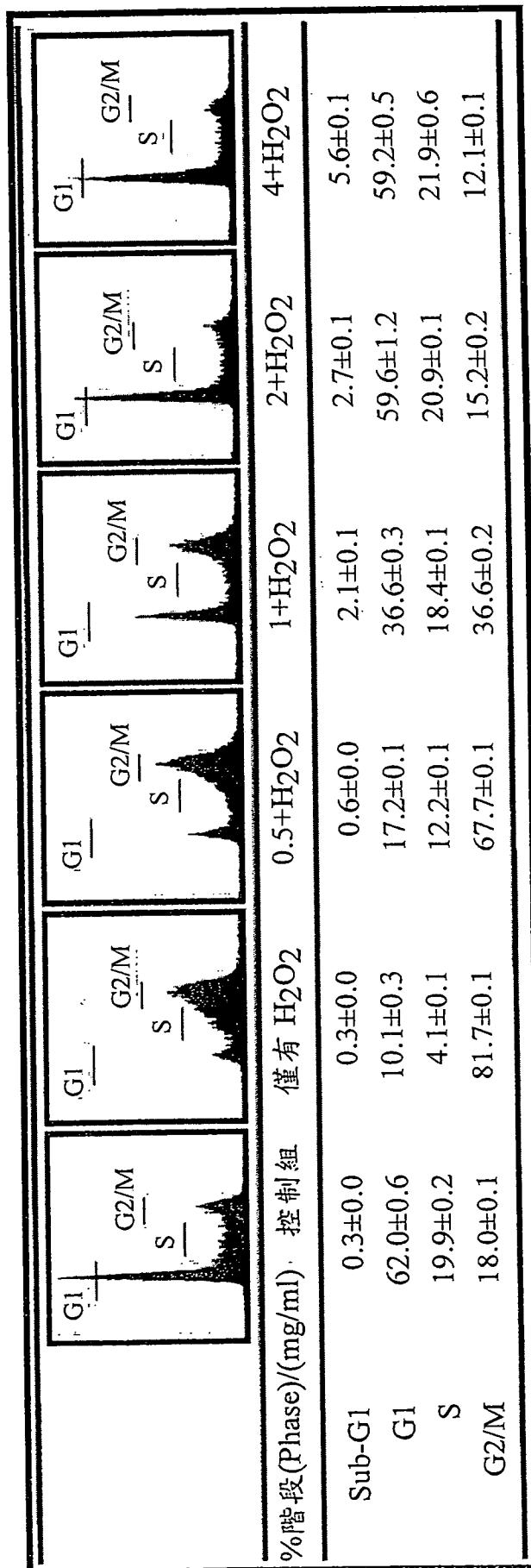
第 3 圖



第 4A 圖



第 4B 圖



第 5 圖