

編號：CCMP93-RD-045

## 台灣產茜草科植物美白作用之篩選

溫國慶

中國醫藥大學

### 摘 要

多酚類化合物具有抗氧化，捕捉自由基等作用。茜草科植物富含多酚類成分，本計畫就下列所載台灣產茜草科植物選出 11 種，如玉葉金花 (*Mussaenda parviflora* MATSUM)、林氏茜草 (*Rubia linii* Chao)、小梔子 (*Gardenia jasminoides* Ellis f. *radicans* (Thunb.) Makino)、山梔子 (*Gardenia jasminoides* Ellis)、白花蛇舌草 (珠仔草, *Hedyotis diffusa* Willd.)、賣子木 (*Ixora stricta* Roxb.)、雞屎藤 (*Paederia scandens*)、水線草 (*Hedyotis corymbosa* (L.) LAM.)、九節木 (*Psychotria rubra* (LOUR.) POIR.)、咖啡 (*Coffea arabica* Linn.)、檄樹 (*Morinda citrifolia* L.) 等。雞屎藤乾燥植物以正己烷萃取，殘渣再以乙酸乙酯萃取，其殘渣再以甲醇萃取。濃縮液經濃縮至乾供試，其他植物以甲醇萃取，濃縮供酪胺酸酶活性抑制試驗。抑制酪胺酸酶活性之篩選，依次以：(1)酪胺酸酶抑制圈平板試驗；(2)酪胺酸酶抑制率試驗；(3)以 B16 黑色素瘤細胞測定萃取物抑制其酪胺酸酶合成 DOPA quinone 之作用。

篩選結果各低極性及高極性溶媒萃取物之抑制酪胺酸酶活性均低於熊果苷。然甲醇萃取物經適當處理後之 KC-1T、KC-2T、KC-3T、KC-4T 產物，發現具有活性，其抑制酪胺酸酶活性就抑制圈而言，活性比熊果苷佳，且呈濃度依存性。另 KC-1T、KC-2T、KC-3T、KC-4T 產物，對 B16 黑色素瘤細胞之酪胺酸酶抑制率，分別為熊果苷 (2.72mg/mL) 之 0.50、1.53、1.60 及 1.04 倍。具有開發具美白作用成分之潛力。

關鍵詞：茜草科、酪胺酸酶、美白作用

Number: CCMP93-RD-045

# Screening of Rubiaceae Plants Produced in Taiwan for Whitening

Kuo-Ching Wen

China Medical University

## ABSTRACT

Many plants of Rubiaceae are rich in polyphenols, a group of compounds possessing a variety of biological activities including anti-oxidation and free radical scavenging effects. In this project, 11 plants of Rubiaceae, which are grown in Taiwan, were selected and screened for whitening activity. These plants included *Mussaenda parviflora* MATSUM, *Ixora stricta*, Roxb, *Rubia linii* Chao, *Gardenia jasminoides* Ellis f. *radicans* (Thunb.) Makino, *Gardenia jasminoides* Ellis, *Hedyotis diffusa* Willd., *Paederia scandens*, *Hedyotis corymbosa* (L.) LAM., *Psycotria rubra* (LOUR.) POIR, *Coffea arabica* Linn, and *Morinda citrifolia*.

*Paederia scandens* was extracted with n-hexane. The residue was extracted with ethyl acetate, and then extracted with methanol. Each extract was concentrated. For other plants, methanol was used for extraction. All the concentrated solutions were subjected to tyrosinase activity inhibition tests. Three tests used for evaluating inhibition on tyrosinase activity included (1) tyrosinase activity inhibition zone, (2) the inhibition on tyrosinase activity measured by O.D. value, and (3) the inhibition on synthesis of DOPA quinone by tyrosinase in the presence of B 16 melanoma cell.

The results indicated that the activities of all extracts from both non-polar and polar solvents were lower than arbutin. However, upon suitable treatment of various methanol extracts, the products KC-1T, KC-2T, KC-3T, and KC-4T showed higher activities than arbutin as compared with the inhibition zone test, and showed

dose dependency. Moreover, in the inhibition test on synthesis of DOPA quinone, higher inhibition was shown for KC-1T by 1.53-fold, KC-2T by 0.5-fold, KC-3T by 1.6-fold, and KC-4T by 1.04-fold when compared with arbutin. Through this investigation, products from target plants might be developed as whitening agents.

Keywords : Rubiaceae, tyrosinase, whitening

## 壹、前言

一白遮三醜，亦即白就是美，在東北亞國家的民族受此觀念之影響甚深，故美白化妝品更為消費者所熱衷，化妝品研發製造業者更是投入無數的人力、物力探討開發美白成分。近年來對引起皮膚色素沈著的機制有很大的突破，已知如皮膚因紫外線照射<sup>(1)</sup>而促進黑色細胞分泌成長因子-paracrine、autocrine的作用而誘發色素沈著。此等作用的活化因子如  $\alpha$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone)，ET-1 (Endothelin-1) 及與發炎有關的 chemical mediator-SCF (stem cell factor) /cj-kit。再者，superoxide anion radical ( $\cdot O_2^-$ ) 對於黑色素生合成速率之決定性階段，即酪胺酸藉由酪胺酸酶之羥基化 (hydroxylation) 形成 DOPA，以及 DOPA quinone 之氧化過程，都有促進作用<sup>(2)</sup>，另外在 melanosome 從 melanocyte 向 keratinocyte 的移行過程中，於 keratinocyte 發現 protease-activated receptor 2 (PAR2) 介入 melanocyte-keratinocyte interaction，也與色素沈著有關<sup>(3)</sup>。另外對於黑色素的生合成有關的酪胺酸酶的抑制作用，更是近年來美白劑開發的重點。

有關美白劑之開發，福島氏等<sup>(4)</sup>，曾就外台秘要方、本草綱目記載對肝斑、雀斑，改善黑色皮膚之處方中，使用頻率高的33種中藥進行是否阻斷酪胺酸酶活性探討，結果發現烏梅、桂皮、蔓荊子、山茱萸、夏枯草等5種具有強的酪胺酸酶活性阻斷作用，並自桂皮分離出 cinnamalehyde，蔓荊子的 *p*-hydroxy benzoic acid，*p*-anisic acid 等活性阻斷成分。P. Bernard 等<sup>(5)</sup>亦發表 *Stryphnodendron barbatimao*、*Portulaca pilosa*、*Cariniana brasiliensis*、*Entadad africana and Prosopis africana* 等五種熱帶性植物萃取物具有抑制酪胺酸酶之活性。Wu<sup>(6)</sup>等亦報告紅花 (*Crocus sativus*) 具抑制酪胺酸酶之活性，含 crocusatin-K 及 crocusatin-L 成分。Shim 等<sup>(7)</sup>亦報告自 *Zanthoxylum piperitum* 分離出之槲皮素 (Querceitin) 具抑制酪胺酸酶之活性。另據伊藤氏<sup>(8)</sup>報告，益母草抽出物具抑制黑色素生成作用。又 Maeyama<sup>(9)</sup>報導 *Waltherica indica* (Sterculiaceae) 萃取物具抑制酪胺酸酶活性作用，其成分為黃酮類、catechic tannin 及含 phenolic acid 衍生物。據高木氏<sup>(10)</sup>報告 *Jatoba* 果皮抽出物可應用作為美白劑，其作用機制為抑制酪胺酸酶活性，其有效成分為 procyanidin。又據橋爪氏<sup>(11)</sup>報告橘皮抽出物對黑色素生成具抑制作用，其作用機制主要為抑制酪胺酸酶之生合成，經分離其有效成分為 tangeretin 及 nobiletin，兩者均為含有多個 methoxy 之黃酮類成分。

由上述文獻報導，尤其是近年之資料顯示，含多酚類化合物因其具有抗氧化，捕捉自由基等作用，而備受重視。另一方面為開發本土產之植物以提高其經濟價值，不若中藥之開發，來源較不會被大陸所掌控，為近年來政府所傾向的政策。據文獻查詢，茜草科之被苞仙丹花<sup>(12)</sup> (*Michelia champaca*) 含黃酮類成分。檫樹<sup>(13)</sup> (*Morinda citrifolia*) 葉含 flavonol glycosides，剛果咖啡<sup>(14)</sup> (*Coffea robusta*) 含 chlorogenic acid，catechin 含多酚類成分，顯示茜草科之植物富含多酚類成分，極具開發價值。

## 貳、材料與方法

### 一、茜草科植物之採集及處理

山梔子採集自台中市大坑風景區；而多花水線草、白花蛇舌草則採集自台中縣霧峰鄉農業試驗所附近稻田；至於鉤藤則來自屏東縣恆春地區，林氏茜草採自南投縣鹿谷鄉溪頭森林遊樂區；九節木及玉葉金花則採自於台中市科博館附近；賣子木採自於台南縣仁德鄉；另咖啡、檫樹、小梔子購自園藝店。

植物經檢視剔除混雜物及其他植物後，置烘箱以低於 50°C 之溫度烘 1-2 天，烘乾後均予以秤重並紀錄重量，置於 4°C 冰箱保存。

### 二、植物鑑定

#### (一) 外部形質鑑別

利用五官檢查法並配合立體顯微鏡觀察。

#### (二) 內部構造鑑別

利用徒手切片法，將材料進行橫切 (Transverse section; X.S.)、放射性縱切 (Radial longitudinal section; R.L.S.)、切線性縱切 (Tangential longitudinal section; T.L.S.) 與表面切 (Surface section; S.S.) 等。以切片刀，切取近 10  $\mu\text{m}$  之薄片檢體置於載玻片上，先以 chloral hydrate solution 清除細胞內含物後，再滴加各種不同化學試劑，例如 phloroglucinol solution 與 hydrochloric acid 進行木化反應，或滴加 sudan III solution 進行木栓化反應，或利用 Schultze's 與 KOH maceration method 將材料予以解離，最後以 glycerin : water (1 : 1) 混合溶液將檢體封鎖，蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下，先用低倍鏡檢查其弱擴大圖，再以高倍鏡觀察各個內部組織之特徵，並以顯微測微計測量各組織或細胞之大小，同時利用顯微攝影技術將鑑別所需組織照相，記錄觀察結果，並利用描繪器及電腦和周邊設備等製成附加標記之組織圖，生藥組織略字說明如表。

#### (三) 結果分析

利用顯微攝影技術記錄觀察結果，並以電腦軟體製作組織鑑別圖。

### 三、植物萃取及處理

雞屎藤乾燥植物 50g 以正己烷萃取，殘渣再以乙酸乙酯萃取，之後殘渣再以甲醇萃取。各萃取液進行減壓濃縮至乾。其他植物各約取 10g，加適量甲醇浸潤（UP 級）後，以超音波震盪萃取二次，合併兩次濾液進行減壓濃縮至乾。

取適量萃取之檢品，以適當溶媒溶解後，經進一步處理供試。

### 四、酪胺酸酶活性抑制試驗：酪胺酸-酪胺酸酶 (tyrosine-tyrosinase) 體外試驗系統<sup>(15)</sup>

#### (一) 酪胺酸酶抑制圈平板試驗

取自 mushroom 之酪胺酸酶 (2400u/mL) 置於洋菜培養基，培養基之組成：純水 (97.5%)，L-tyrosine (0.08%)，Agar (2.0%)，Phenoxyethanol (0.4%)，次將測試檢品與對照品 (kojic acid, arbutin) 載於濾紙片後置於培養基上培養 3 小時後，比較抑制圈之大小。

#### (二) 酪胺酸酶抑制率試驗<sup>(15)</sup>

取 sample 1.8mL，加入 McIlvaine buffer (buffer 組成：0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1M Citric acid, pH 值調為 6.8) 2mL 及 0.03% Tyrosine 2mL 混合，置 37°C 之恆溫震盪槽中震盪後，加 2400u/mL Tyrosinase 0.2mL 反應，以紫外光-可見光分光光度計 (Spectrophotometer UV-160A) 檢測其在 475nm 之吸光度。另外製備不含 tyrosinase 之空白對照組 ( $A_0$ )，另製備控制組 ( $A_b$ )，實驗步驟與 sample 組相同，僅以等體積 buffer 取代 sample。另分別以熊果苷 (arbutin) sample 溶液當成正對照組 (positive control group)。測試檢品溶液於 37°C 震盪 30 分鐘後，於 475nm 測定 O.D. 值，與對照品比對評估之。

若前兩項試驗，顯現對酪胺酸酶有抑制作用者，繼續進行下列之試驗。

#### (三) 以 B16 黑色素瘤細胞測定萃取物抑制其酪胺酸酶合成 DOPA quinone 之作用<sup>(16)</sup>

小鼠黑色素瘤細胞 (Mouse melanoma) 購自財團法人食品工業發展研究所。於 12-well plate 置入  $4 \times 10^5$  cell/well 細胞，以 DMEM 培養液培養 (90% Dulbecco's modified Eagle's medium 含

有 4mM L-glutamine adjusted、1.5g/L sodium bicarbonate、4.5g/L glucose、10% fetal calf serum)，培養 24 小時，加入植物萃取物培養 24 小時後，加含 0.5% Tritox X-100 的磷酸緩液（50mM，pH 6.9）300 $\mu$ L 溶解後，置於-80 $^{\circ}$ C，30 分鐘後取出置室溫（25 $^{\circ}$ C）25 分鐘，之後於 37 $^{\circ}$ C 放置 5 分鐘。每孔加入含有 4%（V/V）N,N-dimethylacetamide 之受質溶液 2.85mL（含 6.3mM MBTH, 3-methyl-benzothiazolinone hydrazone, 1.1mM L-dopa in 48mM sodium phosphate buffer solution, pH 7.1），於 37 $^{\circ}$ C 反應 60 分鐘後，以紫外光-可見光分光光度計（Spectrophotometer UV-160 A）於波長 508nm 測定其 O.D.值。



## 參、結果與討論

### 一、植物之採集與鑑定

本研究之茜草科植物經五官與顯微鑑定結果如下：

#### (一) 外觀性狀鑑別

茜草科植物為草本灌木，葉對生具明顯托葉，花成漏斗狀。九節木果實為漿果，成熟成紅色；玉葉金花為攀緣灌木，具白色變態花瓣旗於花瓣呈黃色；梔子葉亮綠、花白具強烈香氣，5-12 月生黃色漿果，具 5-9 縱紋。雞屎藤為藤本，葉揉碎後有雞屎味，外披棉狀白毛，花淡紫。茜草科植物外觀見圖 Fig. 1-1 至 Fig. 1-4。

#### (二) 顯微鑑別

植物之切片如「材料與方法」所載步驟進行，其結果舉白花蛇舌草為例，如 Fig. 2。

### 二、酪胺酸酶活性抑制試驗

#### (一) 酪胺酸酶抑制圈平板試驗

雞屎藤逐次以正己烷、乙酸乙酯及甲醇萃取。各種溶媒抽取之萃取物，進行酪胺酸酶抑制圈平板試驗，抑制圈均比熊果苷低如 Table 1。因此其他植物先改以甲醇抽提濃縮，進行酪胺酸酶抑制圈平板預試驗，結果所有之甲醇萃取物之酪胺酸酶抑制圈亦均比熊果苷低如 Table 2。為求突破，因此將各甲醇萃取物進行處理後，再進行酪胺酸酶抑制圈平板試驗，結果有四種處理產物，即 KC-1T、KC-2T、KC-3T 與 KC-4T 具良好之抑制效果，經系列稀釋再進行酪胺酸酶平板試驗，其抑制圈活性具濃度依存性，結果如 Fig. 3 及 Table 3、4 所示。以 KC-2T 之抑制效果最佳，甚至超越熊果苷之活性。

#### (二) 酪胺酸酶抑制率試驗

本實驗進行吸光度偵測時，因檢品本身於吸光波長 475nm 具有吸收，會干擾檢測，致使本實驗無法順利進行。

#### (三) 以 B16 黑色素瘤細胞測定萃取物經處理之產物抑制其酪胺酸酶合成 DOPA quinone 之作用

以小鼠黑色素瘤細胞經培養，再加入萃取物處理產物培養後

洗下細胞，再以 DOPA 為起始物，另其合成 DOPA quinone 後，再加 MBTH 反應呈色，於波長 508nm 測定 OD 值，各萃取物處理產物之結果如 Table 5 所示。KC-2T 及 KC-3T 之抑制率分別為熊果苷之 1.5 及 1.6 倍。與 Table 3、4 之抑制圈比較，KC-1T 具較強的抑制圈，但在黑色素瘤細胞之試驗，似未顯現良好之抑制率，然而 KC-3T 則反之，此可能與細胞之通透性有關，尚待進一步探討。

綜合上述結果，此四種植物萃取物處理產物，本身為混合物，即有與熊果苷純品相當或更強之抑制酪胺酸酶之效果，可見其深具開發潛力。

## 肆、結論與建議

- 一、植物經低極性及高極性溶媒之萃取出，其抑制酪胺酸酶活性較熊果苷低。
- 二、另四種抽出物經處理後 (KC-1T、KC-2T、KC-3T、KC-4T)，顯示具抑制酪胺酸酶作用且具濃度依存性。
- 三、KC-1T、KC-2T、KC-3T、KC-4T 濃度分別相當於原植物之重量 (14.2 mg/mL、7.2mg/mL、8.7mg/mL 及 8.3mg/mL) 抑制黑色素瘤細胞之酪胺酸酶活性為熊果苷 (2.72mg/mL) 之 0.50、1.53、1.60 及 1.04 倍。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-RD-045 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、参考文献

1. 正木 仁, 2003, チロシナーゼ活性測定法および美白効果評価法, フレグランスジャーナル臨時増刊, No 18, 35-41。
2. Valverde P et al. 1996. *Exp Dermatol.* 5: 247.
3. Seiberg M et al. 2001. *J Invest Dermatol.* 115: 162-167.
4. 福島信ほか, 1989, 生薬, 43: 142.
5. Baurin N., Arnoult E., Scior T., Do QT., Bernard P., 2002, Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, *Journal of Ethnopharmacology.*, 82(2-3): 155-8.
6. Li C.Y., Lee E.J., Wu T.S., 2004, Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*, *Journal of Natural Products.* 67(3): 437-40.
7. Chang Ho Jeong and Ki Hwan Shim, 2004, Tyrosinase Inhibitor Isolated from the Leaves *Zanthoxylum piperitum*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(9): 1984-1987.
8. 伊藤三明, 2001, シン科植物の化粧品への応用ー益母草を中心に, フレグランスジャーナル, 29(5): 77-80。
9. Liye Maeyama. 2002. Whitening Complex with *Waltheria indica* Extract and Ferulic acid. *Cosmetics & Toiletries magazine.* 117(10): 69-74.
10. 高木啓二、野村重雄, 2003, Jatoba 果皮抽出物の美白剤への応用, フレグランスジャーナル, 臨時増刊, No18, p. 82-90。
11. Hashizume R., Hayashi S., 2003. Inhibitory effect of Kippi extracts on melanin synthesis. *Fragrance Journal. Special issue.* 18: 103-112.
12. Vimala R, Nagarajan S, Alam M, Susan T and Joy S. 1997. *Indian Journal of Experimental Biology.* 35(12): 1310-4.
13. Sang S, Cheng X, Zhu N, Stark RE, Badmaev V, Ghai G, Rosen RT and Ho CT. 2001. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* 49(9): 4478-81.
14. Shafiee M, Carbonneau MA, d'Huart JB, Descomps B and Leger CL. 2002. *Journal of Medicinal Food.* 5(2): 69-78.
15. 三井幸雄, 2002, “天然物素材の化粧品開発(1)酒粕の応用”, フレグランスジャーナル, 30(6):145-149。
16. Radoslaw D, Daniel MA, Leonard AL. 2000. *Exp. Eye Res.* 70, 563-569.

# 陸、圖

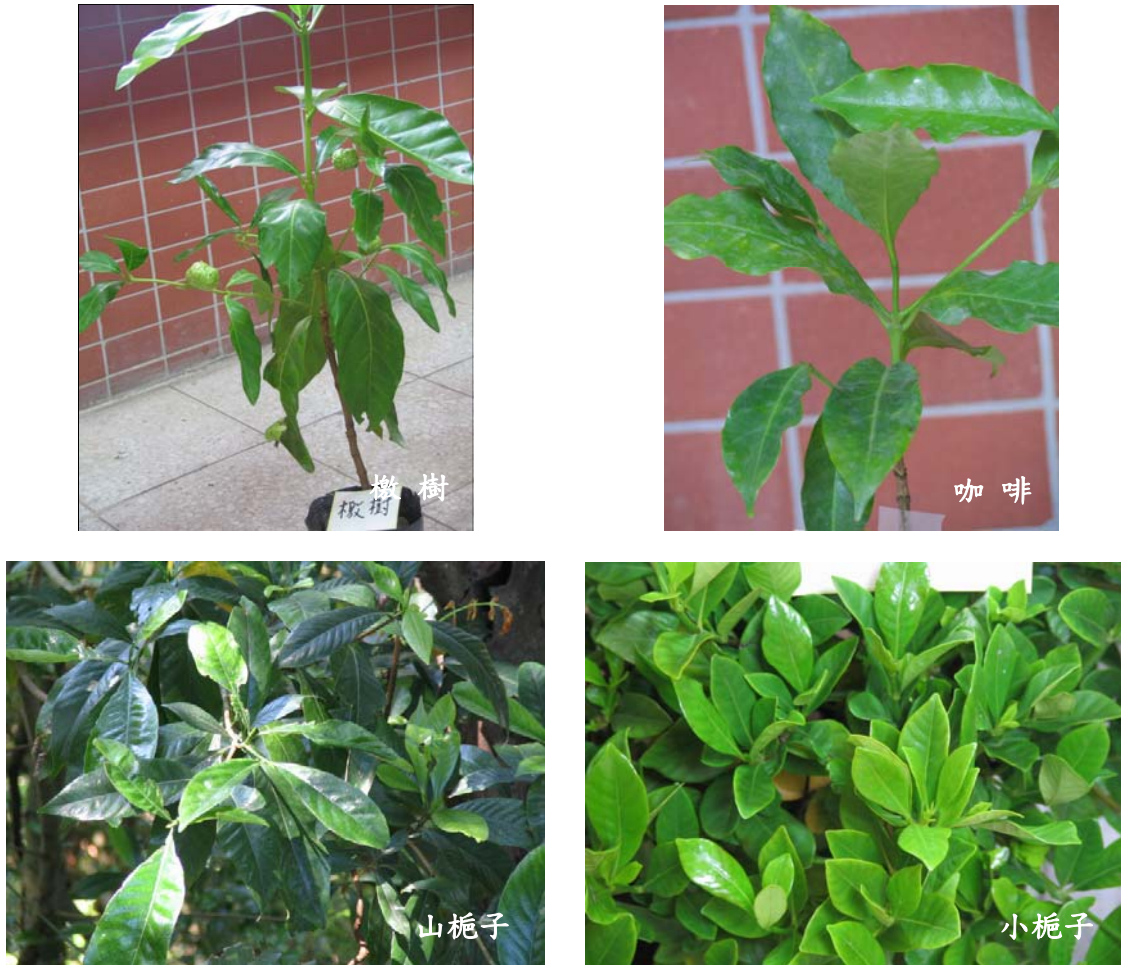


Fig. 1-1 茜草科植物（檫樹、咖啡、山梔子、小梔子）外觀



Fig. 1-2 茜草科植物（鈎藤、玉葉金花）外觀



Fig. 1-3 茜草科植物（雞屎藤、多花水線草、白花蛇舌草）



Fig. 1-4 茜草科植物（九節木、林氏茜草）外觀

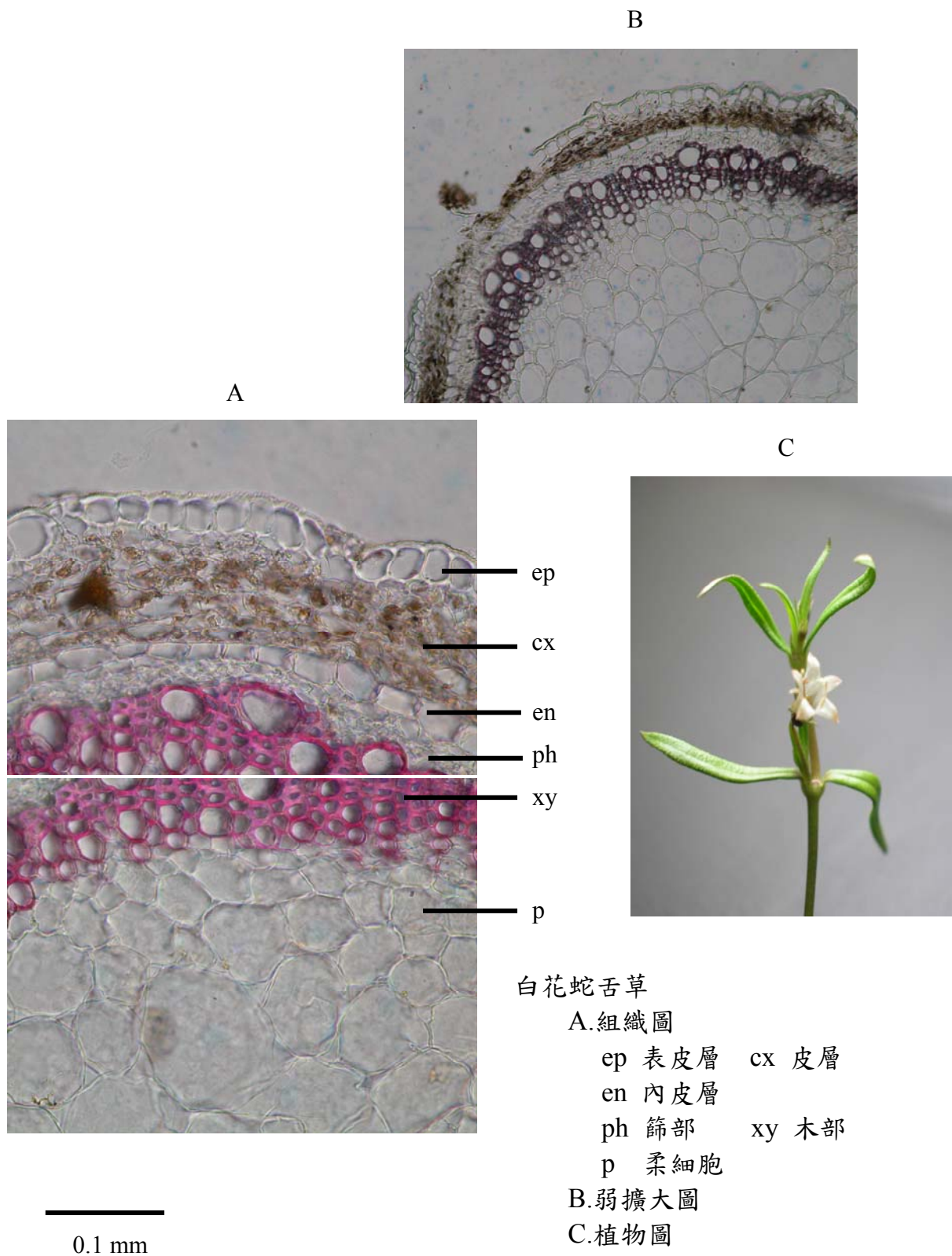


Fig. 2 白花蛇舌草之植物切片圖

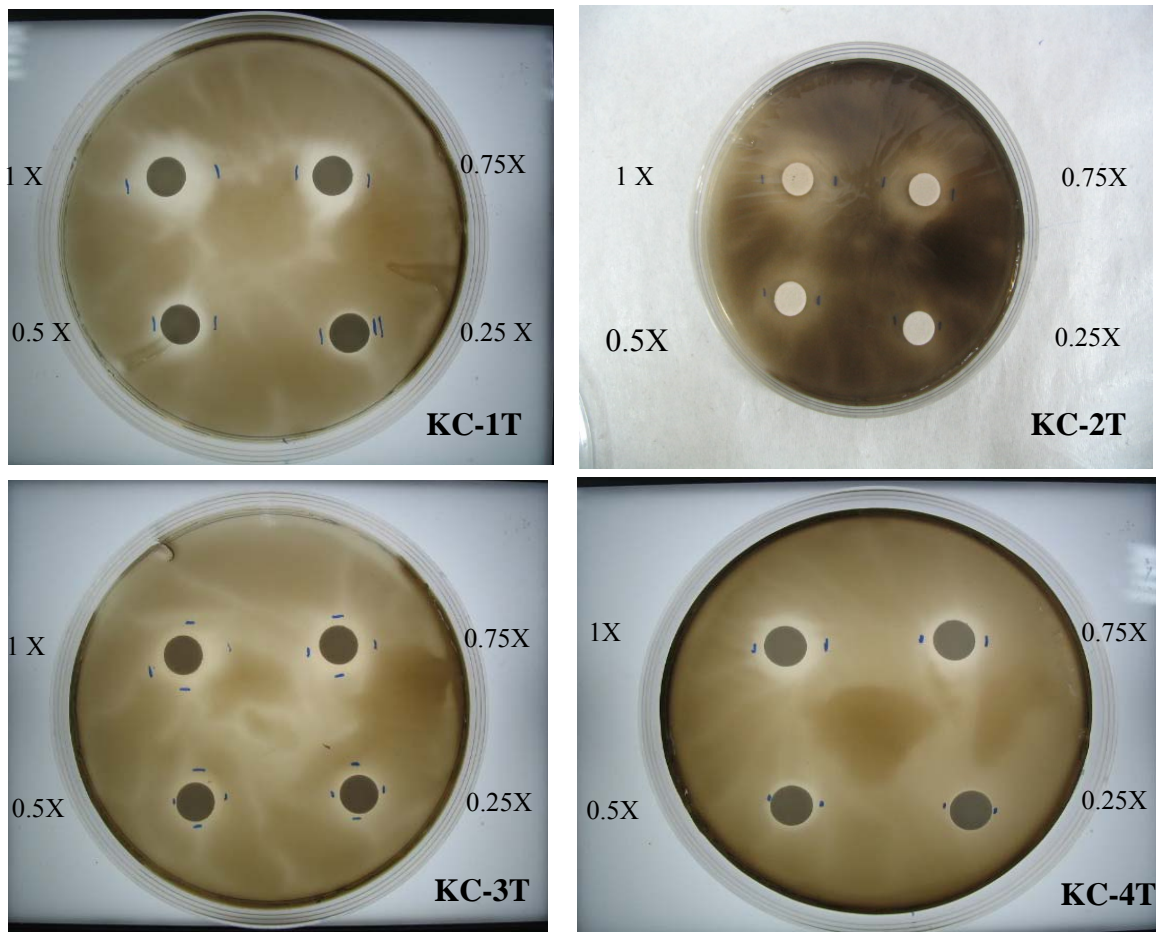


Fig. 3 KC-1T- KC-4T 不同稀釋濃度之酪胺酸酶抑制圈

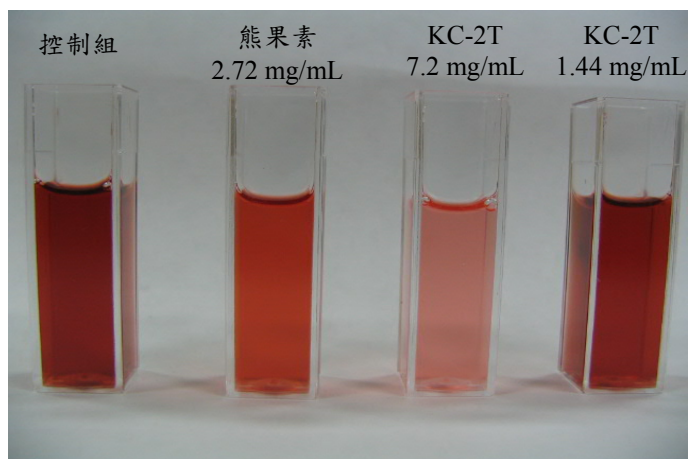


Fig. 4 KC-2T 對黑色素瘤細胞之酪胺酸酶之抑制作用



## 柒、表

Table 1 雞屎藤之不同溶媒萃取物之酪胺酸酶抑制圈平板試驗

溶媒 抑制圈(cm) 植物名稱	正己烷	乙酸乙酯	甲醇	水
雞屎藤	—	—	1cm	×
熊果苷	×	×	×	1.3 cm

“—”表無抑制效果

註：“×”表未以該項溶媒進行試驗

Table 2 茜草科植物萃取物以不同溶媒溶解進行酪胺酸酶抑制圈平板試驗

溶媒 抑制圈 (cm) 植物名稱	水	Tween 20	Pluronic F-68	Propylene Glycol	Cremophor EL
小梔子	—	1.3	—	—	—
咖啡	—	1.4	1	—	—
多花水線草	—	1.1	—	—	—
白花蛇舌草	1	1.1	—	—	—
檫樹	1	1.2	1.1	—	-
檫樹果	×	×	×	1.1	×
山梔子	—	12	1.1	—	—
賣子木	×	×	×	—	×
林氏茜草	×	×	×	—	×
鉤藤	×	×	×	—	×
玉葉金花	×	×	×	—	×
九節木葉	×	×	×	—	×
九節木枝	×	×	×	—	×
九節木果	×	×	×	—	×

註：“×”表未以該項溶媒進行試驗；“—”表無抑制效果

熊果苷 (27.23mg/mL) 之抑制圈直徑平均為 1.3 (cm)

Table 3 茜草科植物萃取物經處理後之產物其系列稀釋液之酪胺酸酶抑制圈平板試驗

產物名稱	濃度 抑制圈 (cm)	1X 相當於原 植物之含量 (mg/mL)	1 X	0.75 X	0.5 X	0.25 X	r <sup>2</sup>
KC- 1T		130	1.9 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0	1.2 ± 0	0.885
KC- 2T		57.6	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.985
KC- 3T		79.1	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.958
KC- 4T		68.0	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0	0.930

註：n=3

熊果苷 (27.23mg/mL) 之抑制率平均值為 1.3cm

Table 4 茜草科植物萃取物經處理後之產物與熊果苷、麴酸之酪胺酸酶抑制圈達 1.3cm 所需之濃度

各檢品形成抑制圈 (1.3cm) 所需之濃度 (mg/mL)					
arbutin	kojic acid	KC-1T	KC-2T	KC-3T	KC-4T
27.23	9.17	57.37	20.44	51.68	48.83

Table 5 KC-1T、KC-2T、KC-3T、KC-4T 對黑色瘤細胞之酪胺酸酶活性抑制率

Arbutin (2.72mg/mL)	KC-1T (14.2mg/mL)	KC-2T (7.2mg/mL)	KC-3T (8.7mg/mL)	KC-4T (8.3mg/mL)
100 %	50.3%	153 %	160.3%	104.1%