

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC94-02

計畫名稱：子計畫 5：美白化粧品原料之開發與作用機轉之探討

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

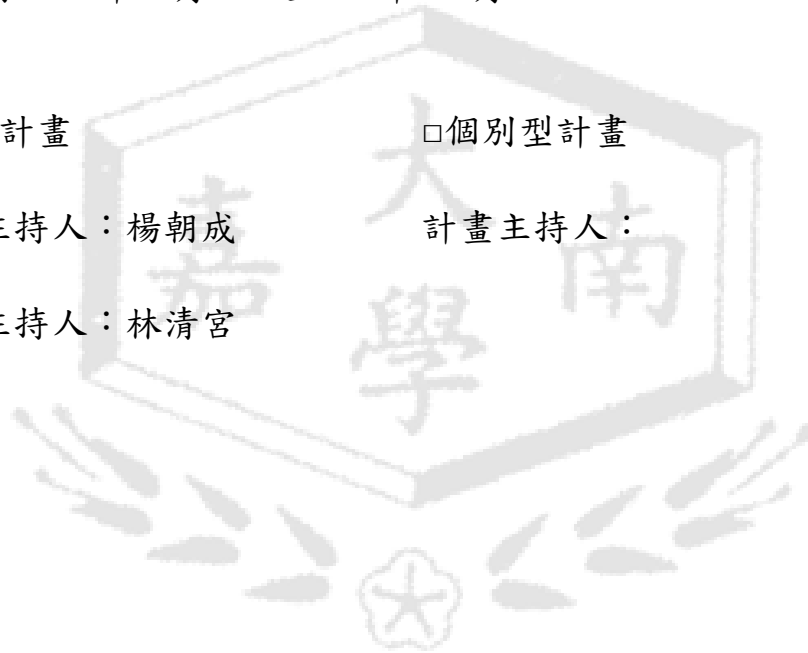
■整合型計畫

□個別型計畫

計畫總主持人：楊朝成

計畫主持人：

子計畫主持人：林清宮



中華民國 95 年 02 月 27 日

一、摘要：

東方女性大多希望擁有白皙的肌膚，為了滿足消費者對膚色淡化的需求，許多人努力尋找具有黑色素抑制效果之成分，目前較受肯定的美白成分為 vitamin C, hydroquinone, arbutin, kojic acid 等，這些成分均具有酪胺酸酶抑制活性，除了這些成分外，有些中藥如甘草(*Glycyrrhiza glabra*)及桑白皮(*Morus alba*)等的萃取液也被發現具有酪胺酸酶抑制活性，其他中藥之類似功效，目前正在研究當中。

本計畫以酪胺酸酶抑制活性為模式，加上 *in vitro* B16 melanoma 細胞株試驗，進行桑萃取液之美白活性評估，在活性評估中同時亦探討其作用機轉。

二、前言

KANG TAE LEE 等學者，於 2003 年的研究中，則是採用桑的嫩枝為材料，用 70% EtOH 為萃取溶劑加以萃取、乾燥，並以 1,3 butylene glycol 溶解後，進行評估。最終結論描述，嫩桑枝 70% 的酒精萃取物，會抑制酪胺酸酶的活性及抑制 B-16 黑色素瘤細胞中黑色素生合成的量，但無法影響 B-16 黑色素瘤

細胞中酪胺酸酶的合成和基因的表達。且實驗結果顯示出，嫩桑枝 70% 的酒精萃取物，可抑制天竺鼠皮膚受 UVB 照射後的色素沉積，並且在皮膚、眼睛的刺激性試驗及皮膚敏感性試驗中皆無不良作用，亦無急性口服毒性的產生，並認為嫩桑枝的萃取物具有很強的抑制黑色素生成的活性。繼續將萃取物加以分離與純化，得到單一化合物 2'-oxyresveratrol，並確認其結構為 2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene。

三、方法

I. 中藥酒精萃取液之製備

1. 將確認過之中藥材切細
2. 分別稱 100 克加入 2000 ml 純乙醇，浸泡 3 小時
3. 加熱 refluxing 萃取三次
4. 過濾
5. 真空濃縮
6. 乾燥，稱重備用

II. 中藥之美白效果評估

※體外(*in vitro*)酪胺酸酶抑制活性測定

1. 分別取定量中藥酒精萃取物，加入 70 units mushroom tyrosinase，再加入 0.5 ml L-tyrosine (0.1 mg/ml)中，於 37 °C 放置 10 分鐘。
2. 利用分光光度計測量波長 475 nm 之吸收值，將未加任何藥材之吸光值減去待測藥材之吸光值除以未加任何藥材之吸光值再乘以 100 即為該藥材之酪胺酸酶體外活性抑制百分比。
3. 比較中藥萃取物與美白成分之酪胺酸酶體外抑制活性。
4. 分別計算其酪胺酸酶體外抑制活性之 IC₅₀

※細胞黑色素抑制試驗

1. 培養 mouse melanoma B16 細胞至八分滿
2. 將中藥酒精萃取物材料分別加入細胞培養液中
3. 三天後將細胞溶解(1 % Triton-X/PBS)
4. 細胞溶解液中加入 10 mM 之 L-DOPA，置於 37 °C, 60 分鐘
5. 以分光光度計測量波長 475 nm 之吸收值，依上述方法計算其酪胺酸酶活性

四、結果

桑枝粉的 80%酒精的萃出物抑制過的 B-16 黑色素瘤細胞溶解物，以不同濃度，加入 PBS-L-tyrosine 溶液，反應後觀察發現，受桑枝粉的 80%酒精的萃出物作用過的 B-16 黑色素瘤細胞溶解物，會催化 PBS-L-tyrosine 使溶液明顯變黑，且加入的細胞溶解物的量越多，溶液的顏色則越黑。我們推論上述現象的產生，是因為桑枝粉的 80%酒精萃出物中的有效成份，會去抑制黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶的活性，使黑色素顆粒體處在 stage IV 以前的不成熟階段，不成熟的黑色素顆粒體不會被從黑色素細胞轉移輸送出去，黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶也不會被降解，會一直保留在黑色素細胞中，當 B-16 黑色素瘤細胞被反覆冷凍回溫，以 pipet 抽送沖細胞，會將細胞膜打破，使細胞中黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶，被釋放到細胞溶解物中，PBS-L-tyrosine 溶液受到細胞溶解物中酪胺酸酶的催化，形成黑色素而使溶液呈現出黑色，當所加的細胞溶解物的量越多，意味著酪胺酸酶的量也越多，催化形成黑色素的量也越多，所以溶液顏色則越黑。

我們將先前沒加萃出物去抑制的 B-16 黑色素瘤細胞溶解

物以不同濃度，加入 PBS-L-tyrosine 溶液後，幾乎沒變黑的現象。我們推論此現象的產生，是因為當 B-16 黑色素瘤細胞沒有加萃出物去抑制時，B-16 黑色素瘤細胞內黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶，一方面會催化黑色素的生合成，生合成出來的黑色素儲存在黑色素顆粒體中，所以離心後觀察，細胞看起來較黑。另一方面，黑色素顆粒體膜上酪胺酸酶的活性，會調控使黑色素顆粒體成熟，成熟的黑色素顆粒體被從黑色素細胞轉移輸送出胞外，所以細胞培養的上清液因含有輸送出來的黑色素而使顏色較深、吸光值較高。達 stage IV 階段後，黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶開始被降解到胞質液中，當細胞被打破，細胞溶解物中，所具有的是已降解不具催化能力的酪胺酸酶，所以加再多的細胞溶解物，亦無法將 PBS-L-tyrosine 溶液催化形成黑色素。

五、結論

桑枝粉、桑枝片的 80%酒精的萃出物，對酪胺酸酶活性的抑制率及對 B-16 黑色素瘤細胞的抑制率，都會隨著萃出物投與濃度的增加而增加，呈現 dose-dependent。

桑枝粉、桑枝片萃出物中的有效成份，可能是抑制了蘑菇酪胺酸酶的 DOPA 氧化酶的活性，使蘑菇酪胺酸酶的氧化能力受到抑制，因而阻斷了黑色素的生合成。所有的萃出物中，桑枝粉的 80%酒精的萃出物，對蘑菇酪胺酸酶有最佳的 IC_{50} 為 $2.3\mu\text{g/mL}$ 。

桑枝粉、桑枝片的 80%酒精的萃出物中的有效成份，可能是抑制了 B-16 黑色素瘤細胞內，黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶的活性，使酪胺酸酶無法將已進入黑色素顆粒體中的酪胺酸，催化形成黑色素，而使 B-16 黑色素瘤細胞內黑色素生合成的量受到抑制。

由於桑枝粉的 80%酒精萃出物中的有效成份，抑制了黑色素顆粒體膜上的酪胺酸酶的活性，而使黑色素顆粒體處在 stage IV 以前的不成熟階段，所以影響了 B-16 黑色素瘤細胞內，黑色素顆粒體的轉移輸送及細胞內酪胺酸酶的降解。

六、參考文獻

1. Bernard P, Berthon J-Y. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. International Journal of Cosmetic Sciences.2000 ; 22 ; 219-226.
2. Burchill S A, Bennett D C, Holmes A, Thody A J. Tyrosinase expression and melanogenesis in melanotic and amelanotic B16 mouse melanoma cells. Pathobiology. 1991 ; 59 ; 335-339.
3. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, A cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1994 ; 46 ; 982- 985.
4. Janis Ancans, Desmond J Tobin, Martin J Hoogduijn, Nico P Smit, Kazumasa Wakamatsu, Anthony J Thody. Melanosomal pH Controls Rate of Melanogenesis, Eumelanin/Phaeomelanin Ratio and Melanosome Maturation in Melanocytes and Melanoma Cells. Experimental Cell Research 2001 ; 268 ; 26-35.
5. Kaatz, H, Streffer K, Wollenberger U, Peter M G. Inhibition of mushroom tyrosinase by kojic acid octanoates. Journal of Biosciences.1999 ; 54 (1- 2) ; 70-74.
6. KANG TAE Lee, KWANG SIK Lee, JI HEAN JEONG, BYOUNG KEE JO, MOON YOUNG HEO, HYUN PYO KIM. Inhibitory Effects of *Ramulus Mori* extracts on Melanogenesis. J. Cosmet. Sci. 2003 ; 54 ; 133-142.
7. Kenji Ohguchi, Toshiyuki Tanaka, Tadashi Kido, et.al. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003 ; 307 ; 861-863.
8. Maeda K, Fukuda M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. Journal of Pharmacology

and Experimental Therapeutics .1996 ; 276 ; 765-769.

9. N Baurin, E Arnoult, T Scior, Q T Do, P Bernard. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002 ; 82 ; 155–158.
10. Nam-Ho Shin, Shi Yong Ryu, Eun Ju Choi, et.al. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.1998 ; 243 ; 801-803.
11. No J K, Soung D Y, Kim Y J, et.al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences*.1999 ; 65 ; 241- 246.
12. Yeon Mi Kim, Jieun Yun, Chong-Kil Lee, Hwanghee Lee, Kyung Rak Min, Youngsoo Kim. Oxyresveratrol and Hydroxystilbene Compounds INHIBITORY EFFECT ON TYROSINASE AND MECHANISM OF ACTION. *The Journal of Biological chemistry*. 2002 ; 16340–16344.