

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：

計畫名稱：台灣產葉下珠 *Phyllanthus urinaria* 所含多醣成分於化粧品的開發應用

執行期間：98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

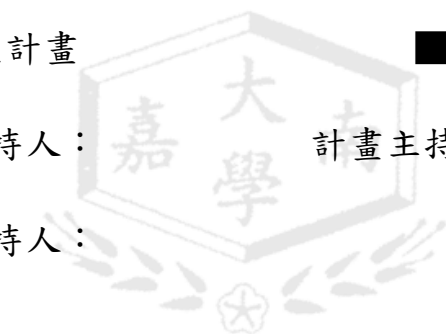
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：王 貴 弘

子計畫主持人：



中華民國九十九年二月二十日

摘要

由於大多數天然物或藥學研究人員主要針對藥物開發為研究重點，因此相當多可能具有特殊機能性化妝品的題材被嚴重忽略。本計畫研究標地葉下珠(*Phyllanthus urinaria* L.)為台灣民間藥，在台灣已有以”珍珠草”之名做為保肝的保健食品，其基源為大戟科植物的全草，能平肝清熱，被用治肝炎、痢疾、腸炎、腎水腫等。

根據以往文獻的報導，已經有許多研究證實葉下珠具有相當優異的抗氧化活性，因此本計畫即是以台灣所採集之葉下珠為研究標的，評估葉下珠在抗氧化、保濕等皮膚機能上的效力，本研究評估葉下株個粗分層之 DPPH 自由基清除率、Trolox 總抗氧化能力 (TEAC)、總多酚含量(TPC)活性評估測試，與不同濃度酒精沉澱所獲得粗多醣之保濕評估以用來研發美容保養品潛力的依據。本實驗先以丙酮浸泡葉下株來進行萃取，再以乙酸乙酯與水進行配比分離，分別得到水層與乙酸乙酯層。乙酸乙酯所獲得之粗萃物再進行分離層析出 18 個粗分層，這 21 個樣本來進行 DPPH、TEAC、TPC 三種方式分析其抗氧化能力，研究成果顯示，在抗氧化分析方面，DPPH 抑制效果、粗分層樣本越後面抑制率越高，樣本 18 與油層清除率皆到達 60%，水層清除率幾乎達 100%；TEAC 在粗分層第 9 層後抗氧化能力較佳，其中以第 18 層特別突出將近 100%；在總多酚定量測試，實驗結果顯示水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層 PUE15 具有相當高比例多酚的含量。將葉下株以水為溶劑，以加熱回流方式萃取粗多醣，再以醇沉法分別獲得 50%、75%與 87.5%乙醇沉澱之粗多糖、以經皮水分散失(TEWL)測定保濕能力。研究結果顯示 50%” 75%與 87.5%之乙醇沉澱粗多糖均有明顯之提昇保濕能力。

綜合以上數據，葉下株是非常具有開發潛力的中藥材，可應用在中草藥化妝品機能性原料的開發。

關鍵詞：葉下珠、*Phyllanthus urinaria*、抗氧化、DPPH、TEAC、保濕、化妝品

研究動機與研究問題

葉下珠 (*Phyllanthus urinaria*) 為台灣民間藥，屬於大戟科油柑屬植物，別名珍珠草、十字珍珠草、葉後珠、夜合草，客家語稱珍仔草。葉下株廣泛的生長在熱帶和亞熱帶的中國、印度、南美洲，數百年前就已經是中國民間藥物，被用在治療肝損傷、肝炎 (hepatitis)、黃疸 (jaundice)、腹瀉 (diarrhea)、水腫上 (dropsy)¹，目前韓國、中國、印度都非常積極研究葉下珠的療效，然而，葉下珠提取物應用於如添加於抗氧化化保養品中，且對年長者可能有修復保養效果，此不曾有相關研究報告。根據過去文獻研究報告指出葉下珠可以抗 B 型肝炎病毒作用、抗肝細胞損傷作用、抗發炎作用、抗細菌作用、抗氧化與保護心臟作用、消除 DPPH radical、超氧陰離子 (superoxide)、過氧化氫 (hydrogen peroxide)、一氧化氮 (nitric oxide) 等自由基作用。

近年來許多市售的化妝品都添加了許多中草藥原料，已成為現代化妝品開發新趨勢，眾所皆知抗氧化劑廣泛的應用在人類衛生保健上，許多證據表明自由基與化學藥品的傷害和中風、類風濕性關節炎、糖尿病、癌症和老化等等疾病，息息相關。因此於本計畫中，我們將研究葉下珠有機粗萃物與所含的多醣，評估開發具有功效性化妝保養品的潛力。

文獻回顧與探討

自古民間一直有著藥食同源思想，因此很多食物被用來養生、預防疾病和改善體質上。許多蔬菜、水果和天然中草藥都含有許多人類所需的各項營養成分，但現今人類對健康的訴求不僅是要求營養，更要求保健的功效。就以橄欖、蘋果、綠茶及地瓜葉而言，食用這些蔬果不是圖吃飽而是更希望健康抗老，因此重視這些蔬果中的抗氧化成分與抗氧化效能。追求健康抗老過程，訓練人們了解抗氧化成分，例如人們已經普遍知道多酚類含量越多則抗氧化能力越強，類黃酮亦是。相對的，如果身體缺少了多酚類和類黃酮等這些天然抗氧化成分，則身體被自由基氧化的風險更高。

所以研究葉下珠所含有的多醣成分應用在抗氧化上，是相當具有應用價值，如同前述的探討，葉下珠各項數據都優於市面上常用的抗氧化劑，且葉下珠在市場上也廣受好評，真的是值得開發的天然植物。據文獻報導得知，葉下珠在許多不同溶

劑的萃取物中，均表現多樣且優異的生物活性，不論在肝炎、自由基、心臟、血壓、泡疹、癌症、糖尿病、黃疸、腫瘤等抑制上都有明顯的效果。目前文獻所了解的葉下珠所含之天然成分相當多樣，有多酚類、類黃酮、黃酮醇、酚類、木脂素、生物鹼、三萜類、芳香族氨基酸等，而這些天然成分都是具備優異的抗氧化能力。

根據文獻研究指出，葉下珠對於 doxorubicin (DOX) 在心臟產生毒性有明顯抗氧化抑制成果，並且進一步實驗出，葉下珠在對心臟抗 DOX 產生毒性上氧化上效果遠優於維生素 C、N-Acetylcholine (NAC)，再用 malondialdehyde (MDA)、total glutathione (tGSH)、superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、caspase-3 來實驗，都明顯增加抗氧化含量。另一方面，在 NF κ B 發炎反應上也有抑制能力效果²。有人用了印度五種不同葉下珠在甲醇裡進行萃取，其成分有酚類、黃酮醇和黃酮，評估這五種抗氧化活性，其中以 *P. debilis* 的抗氧化活性最高其次 *P. urinaria*，並與維生素 C 與 BHT 在 DPPH 和過氧化氫實驗評估上進行比較，葉下珠在自由基的抗氧化活性，清除超氧陰離子、抑制一氧化氮生成與金屬螯合能力上，其效果都優於維生素 C 與 BHT³。葉下珠能把小鼠脾細胞上的細胞週期抑制在 G₀/G₁ 上，這項研究結果可以得知葉下珠可以調節免疫功能和炎症疾病⁴。另外用 *phyllanthus* 物種分離出幾種不同的天然物，包括了類黃酮、木脂素、生物鹼、三萜類化合物以及單寧酸，其中從葉下珠分離出 geranin 的化合物，它兼備抗氧化、抗 semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) 和抗高血壓活性⁵。根據報導指出，沸水提取 *P. urinaria* 顯示出抑制 Lewis 肺癌細胞⁶ 和人的癌細胞例如 HL-60、Molt-3、HT 1080、K-562、Hep G2 和 NPC-BM1⁷。同樣用沸水提取 *P. urinaria* 的粗萃物能在小鼠身上有抗腫瘤、抗血管生成影響⁸，而以丙酮、乙醇和甲醇等有機溶劑所提取的粗萃物，能夠抑制 HSV-2 感染⁹、抗氧化和心臟對 DOX 的心臟毒性¹⁰、對血小板凝聚具有抑制活性¹¹。

最近幾年，隨著政府推動綠色生態和民眾環保意識抬起，與化學物質藥物相比，中草藥接受意願頗高，天然化妝品更是受到青睞，因為減少副作用，不怕有抗生素或類固醇等對身體造成傷害，以現代人皮膚老化來說，常受到環境因素影響如空氣汙染、在太陽底下紫外線的曝曬、飲食、熬夜及使用化學藥物等，都是影響皮膚代謝上能力和老化主因。

本研究自民間常見草藥，葉下珠 (*Phyllanthus urinaria*)，屬於大戟科油柑植物，別名珍珠草，是一種小型藥草，廣泛的生長在熱帶和亞熱帶的中國、印度、南美洲，數百年前就已經是中國民間藥物，根據過去文獻研究報告指出葉下珠可以抗 B 型肝

炎病毒作用、抗肝細胞損傷作用、抗發炎作用、抗細菌作用、抗氧化與保護心臟作用、消除 DPPH radical、超氧陰離子自由基 (superoxide anion radical)、過氧化氫 (hydrogen peroxide)、一氧化氮 (nitricoxide) 等自由基作用。

根據許多文獻報導人類體內自由基主要是由氧在體內轉變成活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 及具有活性的氮氧化合物 (reactive nitrogen species, RNS) 如過氧化脂質 (lipid hydroperoxide)、單旋氧 (single oxygen)。它們會攻擊人體細胞膜上的多聚不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 及各種胺基酸，造成氧化傷害或基因異常表現等因素導致這種疾病，例如癌症、糖尿病、氣腫、動脈粥狀硬化、腦血管病變等，綜合前述對自由基，可歸類下列幾種：

(一) 超氧陰離子自由基 (superoxide anion radical)

O_2^- 通常是最常產生的自由基，在人體內的吞噬細胞及粒腺體中的電子等均會產生超氧陰離子自由基。但半衰期極短，可是會造成自由基會連鎖反應，接著產生的二級產物、三級產物等，將會造成傷害。

(二) 過氧化氫 (hydrogen peroxide)

H_2O_2 過氧化氫對細胞的傷害性較大，因為它通過細胞膜和體內轉運中的鐵和銅發生 fenton 反應，產生羥基自由基 ($HO\cdot$) 過氧化氫可活化 heme protein、hemoglobin 和 myoglobin，成為含鐵化合物，而這些化合物會促使細胞的脂質過氧化。

(三) 羥基自由基 (hydroxyl radical)

$HO\cdot$ 羥基自由基算是最會跑的自由基之一，除了自由基轉換之外，在很多情況下也會大量產生 $HO\cdot$ 。它會造成體內脂質過氧化進一步破壞細胞，且會和胺基酸、核糖體、磷脂質等生物體內反應。多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 和羥基自由基關係非常密切，普遍認為一個 $HO\cdot$ 會因連鎖反應產生數百個 PUFA 的過氧化。

(四) 單旋氧 (single oxygen)

1O_2 為體內穩定的氧，受紫外線照射後出現不穩定現象，且極易與氫反應，直接攻擊不飽和脂肪酸，造成自由基物及脂質氧化。

(五) 過氧化脂質 (lipid hydroperoxide)

LOOH 過氧化脂質是許多自由基物反應完的產物，且大部分發生在細胞膜上和脂肪酸。過氧化脂質也會產生有害的醛類、鹼類或其它產物。過氧化脂質或其它產物會和酵素、蛋白質、核酸作用，造成細胞病變或死亡。

隨著年紀增長生理機能及器官逐漸下降，在加上外在環境因素，使體內自由基

更加活躍，所以在膳食中增加蔬果或草藥攝取量，可降低相關疾病發生⁸。由於他們當中含有極性與非極性化合物可作為氫離子、還原劑、活性氧清除物，因此具有抗氧化能力，減少細胞受氧化的傷害⁹，使得人類壽命逐年增長，減少老化以成現今大家重視議題，因此如何清除體內過多自由基已被定義為防禦醫學一環，也就是在人體老化以前，就先給予預防，這樣能降低許多因自由基而引起的相關疾病及老化例如癌症、動脈硬化、心血管疾病、老年痴呆等，這些疾病都被認為與自由基相關。

隨著政府推動綠色生態產業和民眾環保意識抬起，與化學物質藥物相比，中草藥接受意願頗高，業界爭相開發，紛紛開發天然植物活性成分產品，以爭取中藥化妝品商機。本研究採非細胞抗氧化實驗，以 DPPH 自由基清除能力、TEAC 總抗氧化能力、TPC 總多酚含量檢測，評估葉下株在抗氧化方面的潛力，並討論葉下株在化妝品上的應用潛力。

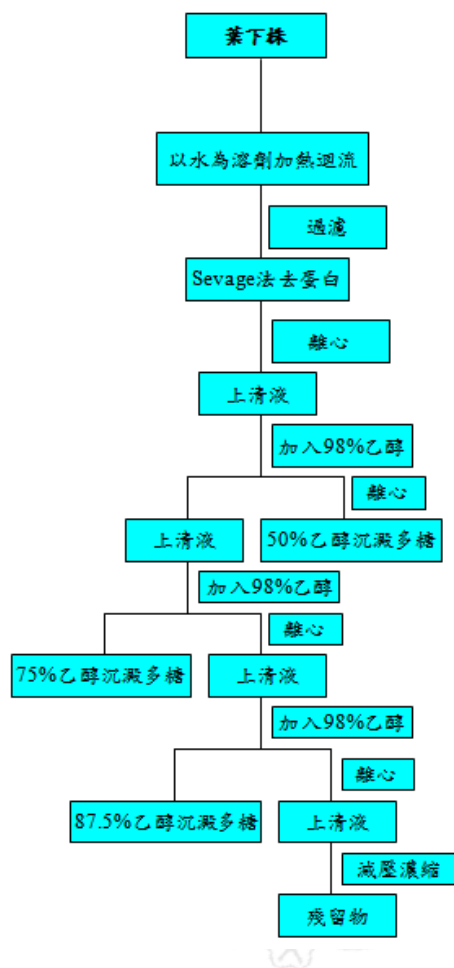
研究方法與步驟

(1) 萃取與分離

葉下株由本實驗室進行植物樣品之基源鑑定與採集，採集之樣品部份保留作為鑑種之用，其餘於室內蔭乾去除水分後秤重，再將樣品粉碎，以 95% 酒精進行重複多次萃取，酒精可溶粗萃物經乾燥秤重後以水與乙酸乙酯溶劑進行配比分離(partition)，配比分離獲得之乙酸乙酯層(EtOAc layer)經減壓濃縮後秤重再進行初步之分離。利用管柱層析法(column chromatography)將乙酸乙酯層分別以 100%己烷逐步增加溶劑之極性至 100%丙酮再調高移動相極性到丙酮：甲醇=1：4，如此將乙酸乙酯層粗萃物分成 18 個不同極性的層析部分(fractions)。

取葉下株乾燥體，粉碎後以純水為溶劑加熱迴流 2 小時萃取本植物所含多醣成分(重複兩次並合併)。加熱迴流後過濾，所獲得之澄清液經冷卻再減壓濃縮至原體積的三分之一(以不產生沉澱或混濁為原則)。以 Sevage 法去蛋白即是加入等量氯仿-正丁醇(4:1)充分振搖，經離心後取上清液棄下層凝膠物，相同步驟重複多次直到不再出現凝膠物。去蛋白後之上清液加入等體積之 98% 乙醇溶液，靜置 1 小時後再置入離心機中以 10000 rpm 離心 15 分鐘，沉澱固體即為 50%乙醇沉澱之多糖成分；之後上清液再加入等體積 98% 乙醇，同樣靜置後再置入離心機中以 10000 rpm 離心 15 分鐘，所獲得的固體即為約 75%乙醇沉澱之多糖成分；75%乙醇可溶之濾液再加入等體積

98% 乙醇，同樣置入離心機中以 10000 rpm 離心 15 分鐘，沉澱的固體即為約 87.5% 乙醇沉澱之多糖成分；剩下之濾液再經減壓濃縮乾燥，即為最後殘餘之多糖成分。



葉下珠多醣成分萃取流程圖

(2) 實驗方法

清除 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定

測定方法乃參考 Chu (2003) 之進行。分別在 96 well 盤中加入 50 μl ，於測試前再加入 150 μl 400 μM 新鮮配置之 DPPH 溶液(0.0157 g 溶於 100 ml 之 80% 甲醇)，及控制組和對照組，於溫度 25°C 下均勻混合 90 分鐘後，在使用波長為 517 nm 偵測反應前及反應後的吸光值，在代入清除自由基公式及，清除率%=[1-(檢品吸光度-檢品空白吸光度)/(對照組吸光度-對照組空白吸光度)]*100。

Trolox 當量的抗氧化能力(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)測定

配製好的 ABTS^{•+}、H₂O₂、Peroxidase，經 vortex 混合均勻後，室溫下靜置

避光反應 1 小時。1 小時後取出，分別在 96 well 盤中加入溶於 180 μL ABTS^{•+} 自由基溶液、待測樣本溶液 20 μL ，總體積為 200 μL ，另外在 96 well 盤中製作控制組 20 μL 甲醇、180 μL ABTS^{•+} 自由基溶液，及對照組 Trolox(1000ppm)1 μL 、19 μL 70 % 甲醇、180 μL ABTS^{•+} 自由基溶液，經 vortex 混合均勻，於室溫下反應 10 分鐘。對照組中不加樣品，以等量甲醇取代。最後使用紫外線/可見光分光光譜儀檢測其 720 nm 波長，根據 Trolox 和吸光值關係算出標準取線，將樣本數據代入可得樣本 TEAC 值。

總多酚含量(total phenolic contents)測定

總酚量(total phenolic contents)之測定係採 Folin-Ciocalteu reagent 來測定樣本總酚含量。標準品配置將 gallic acid 用 Methanol 稀釋濃度分別於 250 ppm、125 ppm、62.5 ppm、31.25 ppm、15.625 ppm、0 ppm 之標準液。沒食子酸(gallic acid)做為標準曲線與樣品對照，先配置好 sodium carbonate 20% (2 g 溶於 8 ml 去離子水)，再將 2 N Folin-Ciocalteu 釋成 1 N Folin-Ciocalteu，分別在 96 well 盤中加入 100 μL 樣本，隨後加 100 μL Folin-Ciocalteu's reagent 均勻混合後，靜置 5 分鐘。最後加 sodium carbonate 200 μL 混合均勻，靜置反應 20 分鐘後，於離心 10000 rpm 10 分鐘，取上清液使用 750 nm 波長測定吸光直，將樣品吸光直代入沒食子酸相對量 gallic acid equivalent (GAE)，換算每克樣本含多少總酚含量。

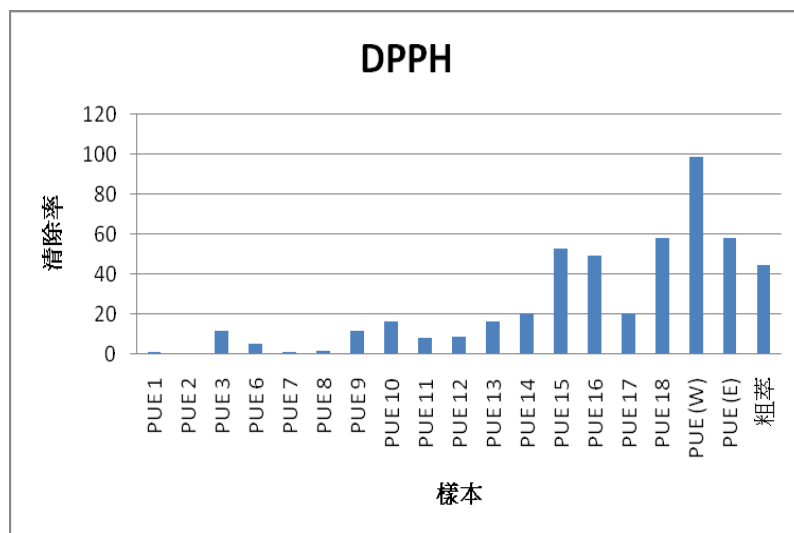
經皮水分散失(Transepidermal water loss, TEWL)評估

將葉下株 50%、75% 與 84.5% 乙醇沉澱之粗多醣體冷凍乾燥後，分別配製成濃度 1.0% 溶液備用。手部先使用肥皂清潔，自然乾燥後將配置 1% 之粗多醣體取 100 μL 均勻塗抹於左手臂前屈側表皮。於冷氣房中控制溫度約 25 $^{\circ}\text{C}$ 、濕度約 60% 下進行測量。經皮水分散失可以貼切地反映角質層的水分流動速率，以經皮水份散失測定儀(Tewameter® TM 300)的探針測量認取 4 點，依不同之時間點偵測皮膚水分散失量的變化。以去離子水當控制組，每 30 分鐘測定數值一次，連續四次共 120 分鐘，

結果與討論

1. 清除 DPPH 自由基

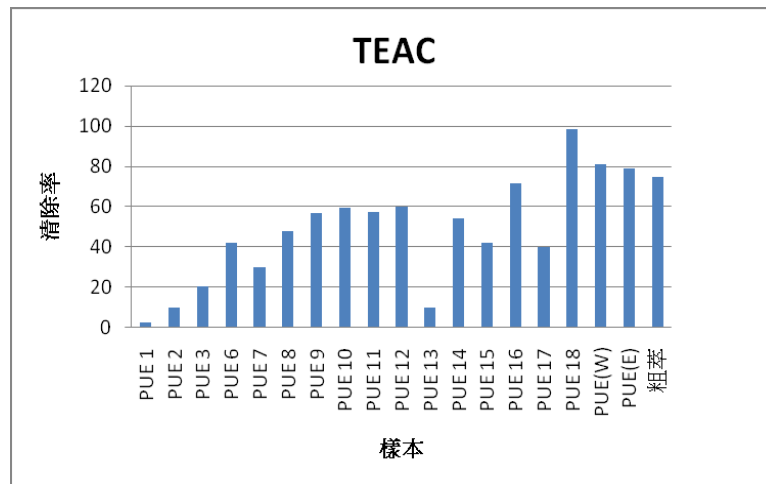
由於 DPPH 清除自由基試驗簡易且穩定，因此廣泛用在抗氧化活性測試上。由圖一所示，葉下株 1~13 fraction 之 DPPH 清除率皆未過 20%，第 18 fraction 幾乎到達 60%，水層更近 100% 清除率，丙酮粗萃物與乙酸乙酯配比層均比水層之抑制效率低，由此可見水層之 DPPH 抑制效果優異。乙酸乙酯個分層之抑制 DPPH 效果，也明顯顯示越高極性層之抑制效果較佳。



圖一、丙酮萃取物(粗萃)、水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層(PUE1 - PUE18)抑制 DPPH 自由基之清除率

2. Trolox 總抗氧化能力

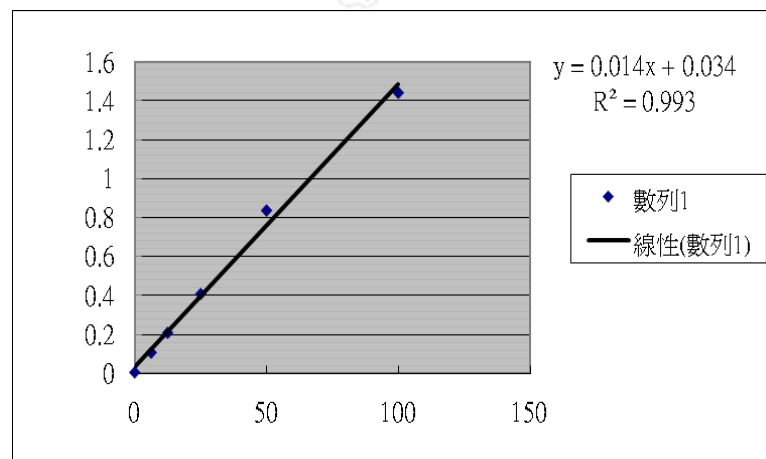
由圖二所示，除粗分層 13、15、17 外，其餘各層之抗氧化能力普遍接近 60%，尤其在粗分層第 16、18 層、水層與丙酮粗萃層均超過 60% 清除率，而粗分層第 18 層更高達 90% 以上清除率，可看出越後面之粗分層也就是極性較高之粗分層其抗氧化能力越顯優異。



圖二、丙酮萃取物(粗萃)、水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層(PUE1 - PUE18)之 TEAC 抗氧化能力

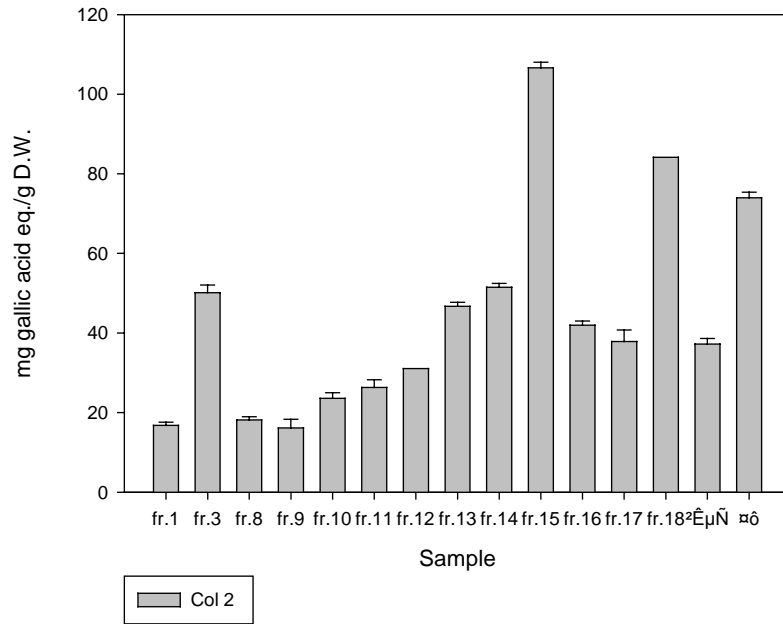
3.總分含量

本實驗先將標準品 gallic acid 稀釋濃度為 250、125、62.5、31.25、15.625、0 ppm 之標準液。檢測標準曲線 (圖三)。再分別測定水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層(PUE1 - PUE18)之總酚含量。實驗結果顯示水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層 PUE15 具有相當高比例多酚的含量，而 PUE2、5-7 等 4 個乙酸乙酯粗分層並不含有多酚(圖四)。



圖三、Gallic acid 標準品檢量線

Total phenolics



圖四、水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層(PUE1 – PUE18)之總分含量

4. 經皮水分散失(TEWL)

經皮水分散失實驗可明顯觀測出塗抹配製成濃度 1.0% 之葉下株 50%、75% 與 84.5% 乙醇沉澱之粗多醣體其水分散失率均有下降(表一)，表示不同濃度之乙醇葉下株粗多醣體均具有保濕之效果，再仔細分析我們發現 50% 之乙醇沉澱粗多醣體之保濕效果最優異，而 75% 與 87.5% 乙醇沉澱粗多醣其保濕效果不分軒輊。

表一、經皮水分散失(TEWL)評估(單位:g/hm²)

	30 分	60 分	90 分	120 分
Control (H ₂ O)	10.2±0.4	11.6±0.5	11.4±0.4	10.9±0.6
50% 粗多醣	8.0±0.2	8.2±0.4	7.8±0.4	8.4±0.5
75% 粗多醣	9.2±0.2	9.3±0.3	9.8±0.3	9.3±0.4
87.5% 粗多醣	8.9±0.5	9.2±0.4	9.4±0.5	9.0±0.3

(N=10, Mean±S.D.)

本計畫所完成之成果分述如下：

1. 完成葉下株有機層、水層粗萃物與乙酸乙酯層之層析工作並獲得葉下株粗多醣體；
2. 葉下株之水層粗萃物顯示優異之抑制 DPPH 自由基的效果，在有機層只有乙酸乙酯層第 18 粗分層具有較優異之抑制 DPPH 自由基的效果；
3. 葉下株在總抗氧化能力的分析結果，顯示乙酸乙酯層第 18 粗分層具有最優異的抗氧化能力，其餘在葉下株之水層、乙酸乙酯層與丙酮粗萃物其總抗氧化能力也是具有不錯之效果；
4. 在總酚含量的測定上，實驗結果顯示水粗萃物(PUEW)、乙酸乙酯粗萃物(PUEE)與乙酸乙酯粗分層 PUE15 具有相當高比例多酚的含量；
5. 經皮水分散失實驗可觀測出各種不同乙醇濃度沉澱之葉下株粗多醣體均具有保濕能力。尤其 50% 乙醇沉澱葉下株粗多醣體之水分散失率有最顯著的下降效果，以上實驗結果表示葉下株粗多醣體具有保濕之功效。
6. 綜合研究之結果葉下株具有優異之抗氧化與保濕能力，由其水層具有較優異之抗氧化效果，是具備機能性化粧品原料開發潛力的。

參考文獻

1. Xu, M., Zha, Z. J., Qin, X. L., Zhang, X. L., Ang, C. R., and Zhang, Y. J. “Phenolic Antioxidants from the Whole Plant of *Phyllanthus urinaria*” *Chemistry & Biodiversity* **2007**, *4*, 2246-2252.
2. Chularojmontri, L., Wattanapitayakul, S. K., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsakul, S., Srichairat, S. “Antioxidative and cardio protective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity” *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1165–1171.
3. Kumaran, A., Joel, R. R. “In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India” *LWT* **2007**, *40*, 344–352.
4. Fang, S. H., Rao, Y. K., Tzeng, Y. M. “Anti-oxidant and inflammatory mediator’s growth inhibitory effects of compounds isolated from *phyllanthus urinaria*” *J. Ethnopharmacol* **2008**, *116*, 333–340.
5. Lin, S. Y., Wang, C. C., Lu, L. Y., Wu, W. C., Hou, W. C. “Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*” *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2485–2492.
6. Huang, S. T., Yang, R. C., Yang, L. J., Lee, P. N., Pang, J. H. S. “*Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Lewis lung carcinoma cells” *Life Sci.* **2003**, *72*, 1705–1716.
7. Huang, S. T., Yang, R. C., Pang, J. H. S. “Aqueous extract of *Phyllanthus urinaria* induces apoptosis in human cancer cells” *Am. J. Chin. Med.* **2004**, *32*, 175–183.
8. Huang, S. T., Yang, R. C., Lee, P. N., Yang, S. H., Liao, S. K., Chen, T. Y., Pang, J. H. S. “Anti-tumor and anti-angiogenic effects of *Phyllanthus urinaria* in mice bearing Lewis lung carcinoma” *Internat. Immunopharm.* **2006**, *6*, 870–879.
9. Yang, C. M., Cheng, H. Y., Lin, T. C., Chiang, L. C., Lin, C. C. “Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection *in vitro*” *Antivir. Res.* **2005**, *67*, 24–30.
10. Chularojmontri, L., Wattanapitayakul, S. K., Herunsalee, A., charuchongkolwongse, S., Niumsakul, S., Srichairat, S. “Antioxidative and cardioprotective effects of *Phyllanthus urinaria* L. on doxorubicin-induced cardiotoxicity” *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1165–1171.
11. Iizuka, T., Nagai, M., Taniguchi, A., Moriyama, H., Hoshi, K. “Inhibitory effects of methyl brevilinocarboxylate isolated from *Phyllanthus niruri* L. on platelet aggregation” *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 382–384.