

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

具有抑制黑色素形成作用之中草藥的開發與研究

子計畫(1)：篩選具有抑制黑色素形成作用之中草藥

計畫類別：☐個別型計畫 ☒整合型計畫

計畫編號：CNPH93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切

計畫主持人：王四切

共同主持人：陳莉螢；楊政哲

計畫參與人員：陳雅秀；楊永達

執行單位：藥學系

中華民國 94 年 2 月 27 日

前言

國人自古以來有「一白遮三醜」的觀念，再加上近年來美白保養品大力的廣告與促銷，美白產品不斷地推陳出新，百家爭鳴，基於以上原因，本實驗室想開發新的具有美白效果的原料，於是進行一系列中草藥抑制黑色素生成的預試驗，發現數種中草藥的水抽出物具有抑制黑色素生成的效果，如：何首烏、仙鶴草、槐花米炒製品、旱蓮草等及民間傳說中具有美白作用的水果，如：木瓜、奇異果等，其中以旱蓮草(*Eclipta prostrata* L.)的水抽出物具有良好的抑制酪氨酸酶活性的作用。

旱蓮草是菊科植物鱧腸 *Eclipta prostrata* L.之全草，為一年生草本植物，是常用中藥之一，主用於各種出血性疾病（如吐血、咯血、衄血或外傷出血）、牙齒鬆動、鬚髮早白、眩暈耳鳴、腰膝酸軟、慢性肝炎、腸炎、痢疾、神經衰弱等之治療。

黑色素的形成是在酪胺酸（tyrosine）的存在下，先經酪胺酸酶的催化，再經由一系列酵素的催化下而形成。在我們初步的實驗結果中發現旱蓮草的萃取液具有抑制酪氨酸酶活性的作用，再加上旱蓮草取得容易又不昂貴，應該具有潛力可以發展成美白產品。

實驗方法

一、中草藥萃取液的製備

將買回來的乾燥中草藥或旱蓮草剪碎成小片狀，浸泡在二次水中，放入水浴鍋中，加熱至 50° C，處理 4 小時後放在室溫冷卻，過濾後之濾液以冷凍乾燥法製成粉末，再以二次水配製成 stock solution，放置於-20 °C 下備用。

二、酪胺酸酶的活性測試

酪胺酸酶的活性分析是採用 *in vitro* 的方式，在 96 孔洞培養皿中，於每個

孔洞中加入 70 μl 的 HBSS 緩衝液、10 μl 各種不同濃度的試劑、中草藥或旱蓮草萃取液，及 10 μl 之 2U 酪胺酸酶，放入 37°C 培養箱中反應 30 分鐘，然後再加入 10 μl 的 10 mM L-dopa，繼續反應 5 分鐘後，採用 492 nm 的波長來測其吸光值的變化量。

三、研究步驟 (fig. 1)

旱蓮草的水抽出物(EPW)先使用分子篩 Sephadex LH-20，以水為移動相，進行管柱分離為五個分劃(EPW-1, EPW-2, EPW-3, EPW-4, and EPW-5)，這五個分化再個別進行酪胺酸酶的活性測試，測試結果發現 EPW-2 活性最強；目前計畫以活性試驗的結果當指標，繼續進行分離，以找到真正的抑制黑色素形成的活性本體。活性本體發現後，再進行構造分析，來確定其結構。

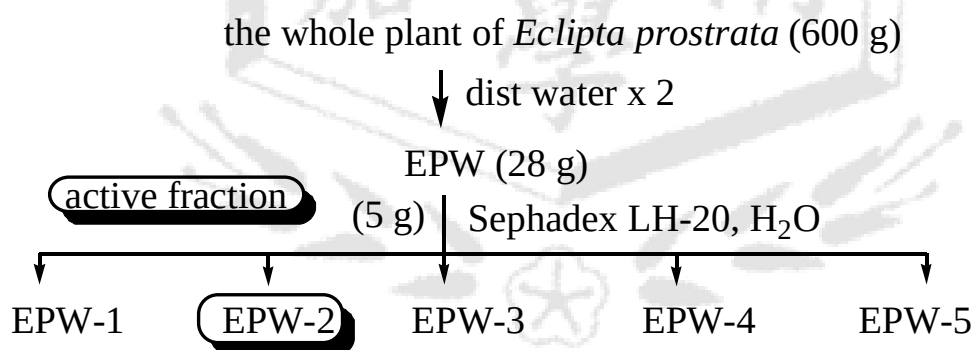


fig. 1

實驗結果及討論

從目前的實驗結果發現，旱蓮草的水萃取物中，以 EPW-2 的分劃抑制黑色素細胞的活性最強，今後將繼續分離出 EPW-2 中抑制黑色素細胞行程的活性本體，並進而決定其構造，以利由合成的方向來開發美白的產品。

另外由於本次的研究題材為水萃取物，在分離濃縮上，可能較耗時間。在本系的冷凍乾燥機若是維護得當，將對本實驗的進行，有相當的幫助。

參考文獻

1. Bachem, A. Ophthalmic action spectra. *Am. J. Ophthalmol.*, **41**, 969-975, 1956.
2. Andley, U.P. Photodamage to the eye. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 1057-1060, 1987.
3. Barker, F.M., Brainard, G.C., and Dayhaw-Barker, P. Transmittance of the human lens as a function of age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32S**, 1083, 1991.
4. Epstein, J.H. Photocarcinogenesis, skin cancer and aging. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **9**, 487-502, 1983.
5. Setlow, R.B. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer a theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3363-3366, 1974.
6. Redman, J.C. Stratospheric ozone depletion. *Am. J. Dermatopathol.*, **9**, 457-458, 1987.
7. Kojima, S., Yamaguchi, H., Morita, K., and Ueno, Y. Inhibitory effect of sodium 5,6-benzylidene ascorbate (SBA) on the elevation of melanin biosynthesis induced by Ultraviolet-A (UV-A) light in cultured B-16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1076-1080, 1995.

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

具有抑制黑色素形成作用之中草藥的開發與研究

子計畫(2)：純化及分離槐米炒製品中具有抑制黑色素形成作用成分

計畫類別：☐個別型計畫 ☒整合型計畫

計畫編號：CNPH93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切 副教授

計畫主持人：黃秀琴 副教授

共同主持人：游慧美 講師

計畫參與人員：王麗雅；蕭立森

執行單位：藥學系

中華民國 94 年 2 月 25 日

一、前言

槐米或稱槐花(*Sophorae Flos*)為豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)之乾燥花蕾。為中藥常用藥，性味屬苦寒，常用於清熱、涼血及止血，尤用於便血、痔血及衄血等的出血證。近年文獻報導也用於頸淋巴結核及抗氧化上¹⁾。但乾燥的槐米貯存，常導致有效成分芸香苷(rutin)之水解，而降低其有效性。因此，槐米為保持其有效性，在貯存前常進行炒製，以降低芸香苷之水解²⁾。

關於槐米之炒製品研究不多，只有崔等³⁾對不同溫度炒槐米炭之芸香苷含量之影響。文獻中指出，炒製之條件由 100℃炒 165 分，至 220℃炒至 40 分，芸香苷之含量由 7.82%降至 6.98%。崔等所使用之炒製條件並不適用於市場品之炒製條件。市場品有炒黃、炒焦及炒炭等產品，本研究將炒黃、炒焦及炒炭三種炒製品分析其芸香苷之含量，探討三種炒製品對芸香苷是否有影響，以確定其有效性。

二、研究方法

I. 炒黃、炒焦及炒炭槐米製備

經鑑定後之生槐米(*Sophora japonica* L.)分別炒製炒黃、炒焦及炒炭，其方法如下：

- (1) 炒黃：秤取生槐米 100g 於深鍋內，將鍋放於加熱板上，加熱至 120℃，翻炒 30 分，取出攤涼即為炒黃槐米。
- (2) 炒焦：秤取生槐米 100g 於深鍋內，將鍋放於加熱板上，加熱至 190℃，翻炒 30 分，取出攤涼即為炒焦槐米。
- (3) 炒炭：秤取生槐米 100g 於深鍋內，將鍋放於加熱板上，加熱至 220℃，翻炒 30 分，取出攤涼即為炒炭槐米。

II. 生槐米、炒黃、炒焦及炒炭槐米之甲醇抽出物製備

分別秤取生槐米及(1)中所製備之炒黃、炒焦及炒炭槐米各 5g 於圓底燒瓶中，分別加入 100ml MeOH，於水浴中加熱迴流，抽取 1 小時，過濾，取濾液。依此法反覆抽取三次，合併濾液，減壓濃縮至乾。秤重，求甲醇抽取率。

III. 生槐米、炒黃、炒焦及炒炭槐米中芸香苷成分分析

- (1) 槐米中芸香苷(Rutin)分析，採用 HPLC 分析方法，所採用 HPLC 組件及條件如下：

高效液相層析儀：Hitachi 系統

Pump：Hitachi L-7100

Detector：Hitachi L-7420

二、前言

槐米或稱槐花(*Sophorae Flos*)為豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)之乾燥花蕾。為中藥常用藥，性味屬苦寒，常用於清熱、涼血及止血，尤用於便血、痔血及衄血等的出血證。近年文獻報導也用於頸淋巴結核及抗氧化上¹⁾。但乾燥的槐米貯存，常導致有效成分芸香苷(rutin)之水解，而降低其有效性。因此，槐米為保持其有效性，在貯存前常進行炒製，以降低芸香苷之水解²⁾。

關於槐米之炒製品研究不多，只有崔等³⁾對不同溫度炒槐米炭之芸香苷含量之影響。文獻中指出，炒製之條件由 100℃炒 165 分，至 220℃炒至 40 分，芸香苷之含量由 7.82%降至 6.98%。崔等所使用之炒製條件並不適用於市場品之炒製條件。市場品有炒黃、炒焦及炒炭等產品，本研究將炒黃、炒焦及炒炭三種炒製品分析其芸香苷之含量，探討三種炒製品對芸香苷是否有影響，以確定其有效性。

二、研究方法

I. 炒黃、炒焦及炒炭槐米製備

經鑑定後之生槐米(*Sophora japonica* L.)分別炒製炒黃、炒焦及炒炭，其方法如下：

- (4) 炒黃：秤取生槐米 100g 於深鍋內，將鍋放於加熱板上，加熱至 120℃，翻炒 30 分，取出攤涼即為炒黃槐米。
- (5) 炒焦：秤取生槐米 100g 於深鍋內，將鍋放於加熱板上，加熱至 190℃，翻炒 30 分，取出攤涼即為炒焦槐米。
- (6) 炒炭：秤取生槐米 100g 於深鍋內，將鍋放於加熱板上，加熱至 220℃，翻炒 30 分，取出攤涼即為炒炭槐米。

II. 生槐米、炒黃、炒焦及炒炭槐米之甲醇抽出物製備

分別秤取生槐米及(1)中所製備之炒黃、炒焦及炒炭槐米各 5g 於圓底燒瓶中，分別加入 100ml MeOH，於水浴中加熱迴流，抽取 1 小時，過濾，取濾液。依此法反覆抽取三次，合併濾液，減壓濃縮至乾。秤重，求甲醇抽取率。

III. 生槐米、炒黃、炒焦及炒炭槐米中芸香苷成分分析

- (2) 槐米中芸香苷(Rutin)分析，採用 HPLC 分析方法，所採用 HPLC 組件及條件如下：

高效液相層析儀：Hitachi 系統

Pump：Hitachi L-7100

Detector：Hitachi L-7420

Recorder : Hitachi D-7000
Autosampler : Hitachi L-7200
Hitachi D-7000 HSM software

(2) 分析方法

精確稱取 II. 項中生槐米、炒黃、炒焦及炒炭槐米之甲醇抽出物各 5mg 於 3 支 25ml 量瓶中，各加入 MeOH 溶解並定容置 25ml。再分別取上溶液 1ml 於 10ml 中，並經 0.45 μ m 濾膜過濾後，成為甲醇分析溶液。

(3) Rutin 標準溶液之製備及 Calibration curve 之建立

精確稱取 Rutin 標準品(Rutin hydrate, 95% for HPLC, Sigma)，添加適量之 MeOH 溶解，並稀釋調配成 0.8932、4.9764、10.208、29.986 及 51.04 μ g/ml 五種不同濃度之標準溶液。各濃度之標準溶液並經 0.45 μ m 濾膜過濾，各取 10 μ L 注入 HPLC 進行分析。以標準品與內部標準品各波峰面積比為 y 軸及標準品之濃度為 x 軸，繪圖製作檢量線，並求得標準曲線之線性回歸方程式 ($y = ax + b$) 及相關係數(r)。

(4) 分析條件

層析管：C18 (D830986E)，4.6mm I.D. $\times$ 250mm

移動相：MeOH : 1% HAc = 1:1

流速：1.0ml /min

注入體積：10 μ L

檢測波長：UV 260nm

三、結果

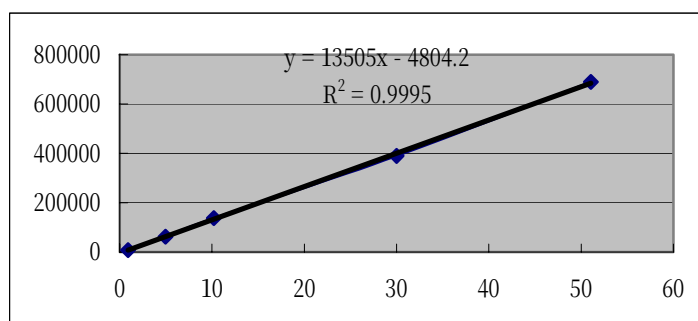
1. Rutin 檢量線

Rutin 之滯留時間為 5.84 分。

在 0.8932 μ g/ml ~ 51.04 μ g/ml 之間，濃度範圍標準曲線方程式為：

$$Y = 13505x - 4804.2, (R^2 = 0.9995, n=3)$$

2. Rutin 檢量線曲線圖



3.生槐米、炒黃、炒焦及炒炭 HPLC 定量結果

	Rutin 含量(g/g)(Mean±S.D.,n=3)
生槐米	0.1351 ± 0.006215
炒黃槐米	0.15018 ± 0.006695
炒焦槐米	0.1477 ± 0.005972
炒炭槐米	0.07068 ± 0.006582

四、討論

槐米性苦寒，常用於清泄血分之熱，為涼血、止血之常用藥。市場品所使用的槐花有四種，包括：生槐米、炒黃槐米、炒焦槐米及炒炭槐米。槐米生品用於肝熱目赤，瘡毒腫痛，清熱涼血。炒槐米之苦寒性緩和，其清熱涼血作用弱於生品，但止血作用則強於生品，適用於脾胃虛弱的出血患者。槐米炭之清熱涼血作用極弱，但止血作用力強於生品，常用於便血、痔血、崩漏下血等多種出血證。生槐米在市場品中較少，主要原因為槐米之主要有效成分屬配醣體類成分，此類成分在貯存過程中易被槐米中存在之水解酶水解，而形成水溶性較差的非醣苷基，使得槐米的吸收減少而效果降低。因此，市場品常用炒製之槐米，但市場之炒製品炒黃、炒焦及炒炭之程度常因各家炒法及溫度高低，而造成產品無法統一，品質則無法均一，槐米炒製品之療效則無法確立。

本研究以定溫方法炒製槐米，所得三種炒製品進行分析槐米中主成分芸香苷，了解以何溫度為最適槐米之炒製條件。由實驗結果得之炒黃槐米之後所得芸香苷成分最高，炒黃及炒焦之槐米其芸香苷成分經炒製之後皆有提高現象，分別提高 11.2%及 9.33%，槐米經 220℃炒製後芸香苷成分下降 47.7%。此結果可驗證槐米之炒製品效果比生品佳。槐米經炒黃及炒焦後芸香苷成分反比生品高，為一有趣結果，有待進一步探討原因。

五、參考文獻

- 1) 顏正華，中藥學(下)，知音出版社，1998，p.478。
- 2) 葉定江，中藥炮製學，知音出版社，2001，p.100。
- 3) 崔學文等，中藥通報，1985，10(12)，p.20。

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

具有抑制黑色素形成作用之中草藥的開發與研究

子計畫(3)：中草藥抑制黑色素形成作用之機轉研究

計畫類別：☐個別型計畫 ☒整合型計畫

計畫編號：CNPH93-01

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫總主持人：王四切

計畫主持人：陳秋蘭

共同主持人：陳莉螢；楊政哲

計畫參與人員：劉承忠；李育純；徐鳳文；林曉嵐

執行單位：藥學系

中華民國☐94 年☐2 月☐27 日

前言

黑色素是動物界中天然色素之一，它的合成途徑相當冗長、分岔，再加上它是一種聚合物，化學結構很複雜，以及它的不溶性，所以阻礙了對其結構的測定。黑色素的形成是在酪胺酸 (tyrosine) 的存在下，先經酪胺酸酶的催化，再經由一序列酵素的催化下而形成。所形成的黑色素主要有兩種，一種是棕黑色的，稱為 eumelanin，另外一種是黃棕色的，稱為 phaeomelanin (1)。

酪胺酸酶是一種含銅的酵素，是黑色素形成的主要速率決定因素 (2)，除了酪胺酸酶外，還有許多酵素的參與，包括像兩個與酪胺酸相關蛋白質 (tyrosine related-protein; TRP)，即 TRP-1 (DHICA oxidase) 及 TRP-2 (dopachrome tautomerase) (3)。

當表皮的黑色素細胞活性增加，黑色素生合成的作用增加以及黑色小體數目增加的情況下，會導致黑色素過度化 (hyperpigmentation) 的現象。此外，像是黑色小體分泌、轉移至角質細胞的能力增加，或是角質細胞分解黑色素的能力下降，也都會導致色素過度化的現象，此時皮膚的膚色會較黑。若黑色素過度化而引起色素沉著，就會形成了所謂的斑點 (4)。

另外，細胞由基底層新生，推至表皮約 14 天，而停留於表皮上保護皮膚約 14 天後，變成皮屑剝落。細胞由新生至剝落約 28 日，此皮膚生理稱為皮膚的新陳代謝。若基底細胞的增生速率減慢，導致皮膚的新陳代謝率減慢，含有黑色素小體的角質細胞還沒有脫落，也會讓皮膚看起來比較黑。

俗話說“一白遮三醜”，尤其在現今社會的審美觀，流行著擁有一身白皙的皮膚，而要讓皮膚看起來比較白皙的產品，即所謂的美白化妝品，在整個化妝品的市場佔有非常重要的比例。有幾個方針可以讓膚色看起來白皙：① 增加皮膚的新陳代謝率，即促進基底層細胞的增生；② 減少黑色素細胞的數目，但若處理不當，可能導致白斑症；③ 減少黑色素小體的數目或成熟度；④ 抑制黑色素的生合成，可透過抑制酪胺酸酶的活性或減少其表現量來達成。

目前市面上具有促進皮膚新陳代謝的產品中，其有效成分有維他命 A (retinol)、果酸、水楊酸 (salicylic acid) 等。維他命 A 是一種脂溶性的維生素，主要是因其具有促進表皮細胞分裂正常化，以及促進表皮細胞的新陳代謝，因此讓皮膚看起來顯得比較白皙光滑 (5)。至於果酸及水楊酸也都具有促進角質細胞新陳代謝的作用。

至於目前衛生署所核准上市的美白成分主要有七類，分別是 magnesium ascorbyl phosphate、kojic acid、ascorbyl glucoside、arbutin、chamomile ET、sodium ascorbyl phosphate 及 ellagic acid 等。其中維他命 C 的衍生物就有 3 種，主要是因維他命 C 易氧化且為水溶性，不易為表皮吸收所致。維他命 C 具有許多功效，像是治療壞血病 (6)；促進膠原蛋白的合成以幫助傷口的癒合 (7)；以及具有抗氧化的作用，可以將已形成的黑色素轉變成顏色較淡的黑色素，因此在皮膚的美白方面也具有效果 (8)。

熊果素 (arbutin) 是從 bearberry 這種小灌木的紅色果實中萃取出的天然成份。它具有皮膚美白的效果，主要是因為抑制酪胺酸酶的活性，而減低了黑色素的生合成 (9)。而麴酸 (kojic acid) 是由麴黴菌屬 (*Aspergillus*) 和青黴菌屬 (*Penicillium*) 中提煉而得。其作用機制是藉由與銅離子螯合，而抑制酪胺酸酶的生成及降低酪胺酸酶的活性，因此減少黑色素的生合成 (10)。

Endothelin 1 (ET1)是由內皮細胞所釋放，可作用在黑色素細胞上，使酪胺酸酶磷酸化，因此與 TRP-1 與偶合能力增強，進而促進黑色素生合成作用 (11)。chamomile ET 為 ET1 的拮抗劑，因此具有抑制黑色素生合成的作用。

綜觀上述具美白效果的成分，可以發現大多數的成分都在抑制黑色素的生合成路徑上，因此要開發一些具美白作用的成分，可以往這個方向著手。而酪胺酸酶是整個黑色素生合成路徑的速率決定步驟，且檢測酪胺酸酶活性的分析法是一種簡單、快速的方法 (12)，因此可以用來篩選一些具有抑制酪胺酸酶活性的成分。

中草藥是天然且在中國具有悠久的使用歷史，雖然有它原有的使用方法及治療適應症，但由於中草藥是複方使用，即多種成分相輔相成作用的結果，對於其單種成分的作用不是很清楚，因此具有極廣的開發及研究空間。

利用酪胺酸酶活性分析法可以篩選中草藥中是否具有抑制黑色素生合成作用的成分，雖然不具抑制作用的中草藥不見得在進入細胞後沒有作用，但此方法仍是最簡單、快速、方便的方法。

因此我們篩選了一些民間傳說具有烏髮效果的中草藥，包括何首烏、仙鶴草及旱蓮草等，另外還有槐米炒製品及民間傳說具有美白效果的水果如木瓜及奇異果等。

實驗方法

一、酪胺酸酶的活性測試

酪胺酸酶的活性分析是採用 *in vitro* 的方式，在 96 孔洞培養皿中，於每個孔洞中加入 70 μ l 的 HBSS 緩衝液、10 μ l 各種不同濃度的試劑、中草藥或旱蓮草萃取液，及 10 μ l 之 2U 酪胺酸酶，放入 37°C 培養箱中反應 30 分鐘，然後再加入 10 μ l 的 10 mM L-dopa，繼續反應 5 分鐘後，採用 492nm 的波長來測其吸光值的變化量 (12)。

二、細胞生長及毒性測試

此法是參考 Jiao 等學者於 1992 年所發表之方法 (13)，加以修飾而成。MTT 為一黃色染劑，加入細胞培養液中，曾經擴散進入細胞中，在存活細胞中，經粒線體之 succinate dehydrogenase 去氫還原後形成藍紫色的 formazan 結晶，用 DMSO 將 formazan 結晶溶出，可得到藍紫色溶液，於 550nm 測吸光值，由吸光值高低便可知存活細胞的多寡，因此常用於檢測藥物對細胞生長及存活率之影響。

將小鼠的黑色素瘤細胞 (B16-F0 cells) 培養在含 10%胎牛血清(FBS)、2mM L-glutamine、100 μ g/ml penicillin/streptomycin、1% non-essential amino acid 及 3.7g/l NaHCO₃，pH 7.2~7.4 的 DMEM 培養液中，每三天做一次繼代培養，整個過程在無菌操作臺中進行。

將 100 μ l 細胞植入 96 孔洞之培養盤(6*10³cells/well)，24 小時後加入含各種不同濃度試劑、中草藥或旱蓮草萃取液之培養液 100 μ l，經 72 小時培養後，以 HBSS 沖洗一次，再加入含 MTT 之新鮮培養液(0.5mg/ml) 100 μ l，置於培養箱中 2.5 小時後取出，並除去培養液，用 DMSO 將藍紫色結晶溶出，再以 ELISA reader 判讀波長 550nm 時之吸光值，可由此比較細胞處理不同濃度試劑或旱蓮草萃取液後生長曲線之變化。

三、黑色素含量分析 (melanin content assay)

利用錐蟲藍染劑計算出細胞數目後，將各稀釋的細胞懸浮液，取固定的細胞數目(1*10⁶細胞)來做黑色素含量的分析。

取完所需的細胞數目後，以同樣的轉速及時間再離心一次，倒掉上清液，將細胞 pellet 拍散，加入 1 毫升之 HBSS 沖洗，然後將細胞懸浮液轉移至小離心管內，再離心 6,000g、10 分鐘，倒掉上清液，將細胞 pellet 拍散後，加入 0.5 毫升 1N 之 NaOH，加熱溶解 30 分鐘；待 30 分鐘後，從小離心管中取出 200 μ l 的細胞懸浮液置於 96 孔洞培養皿中，以 415nm 的波長來測黑色素吸光值的變化量 (14)。

實驗結果及討論

從實驗結果中發現以早蓮草抑制酪氨酸酶活性的作用最強，早蓮草屬於菊科植物鱧腸 *Eclipta prostrata* L. 之全草，為常用中藥之一，主用於各種出血性疾病 (如吐血、咯血、衄血或外傷出血)、牙齒鬆動、鬚髮早白、眩暈耳鳴、腰膝酸軟、慢性肝炎、腸炎、痢疾、神經衰弱等之治療 (15)。

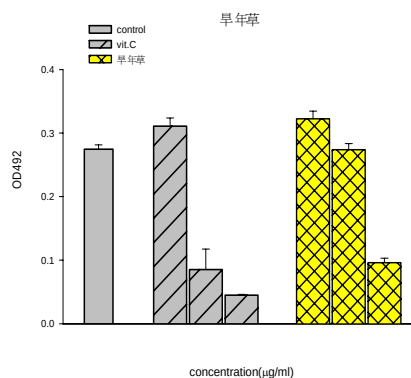
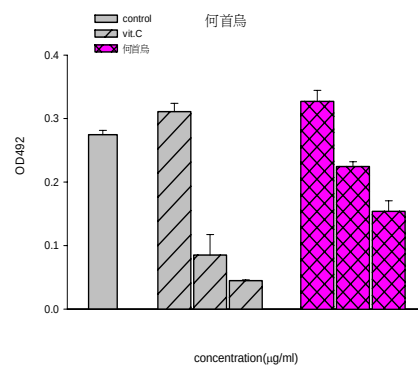
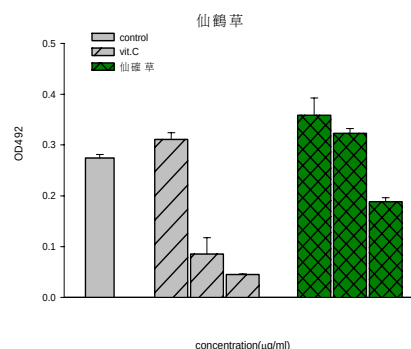
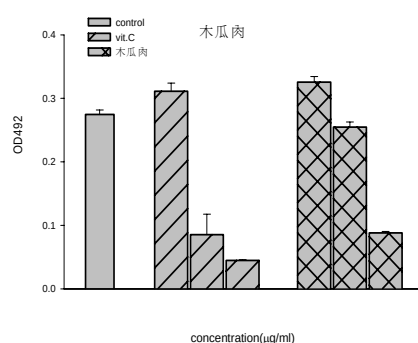
早期的研究發現：早蓮草的萃取液對四氯化碳在小白鼠或大白鼠誘發的肝毒性均具有保護的作用，其中以含有 coumestans 類成分如 wedelolactone 及 dimethylwedelolactone 的萃取層最具活性(16)。此外，也有研究顯示：早蓮草的乙醇萃取液對 cyclophosphamide 或 hydrocortisone 誘發小老鼠免疫力下降的實驗模式中具有促進免疫力的作用(17)；早蓮草也被證實具有中和蛇毒的作用，可能是因為 wedelolactone 具有抑制 trypsin 及 phospholipase A2 的活性所致 (18)。

在我們初步的實驗結果中發現早蓮草的萃取液具有抑制酪氨酸酶活性的作用，此作用是否具有淺力可以發展成美白產品，還需要非常漫長的研究。但是，早蓮草取得容易又不昂貴，實在有其開發的價值。因此，值得更進一步來測試早蓮草在黑色素細胞瘤細胞是否也具有抑制黑色素生合成的作用，同時分離其可能有效的成分及其可能之作用機轉。

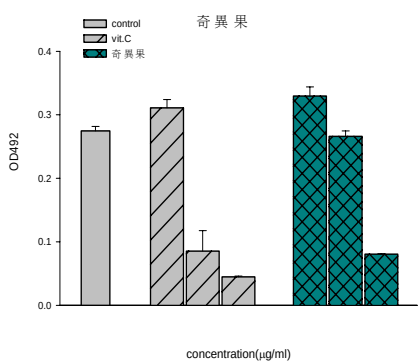
參考文獻

1. Ito, S., Wakamatsu, K., and Ozeki, H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, **13** (suppl. 8), 103-109, 2000.
2. Hearing, V.J. and Jimenez, M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, **19**, 1141-1147, 1987.
3. Boissy, R.E., Sakai, C., and Zhao, H., Kobayashi, T., Hearing, V.J. Human tyrosinase related protein-1(TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp. Dermatol.*, **7**, 198-204, 1998.
4. Jimbow, K. and Minamitsuji, Y. Topical therapies for melasma and disorders of hyperpigmentation. *Dermatol. Ther.*, **14**, 35-45, 2001.
5. Pathak, M.A., Fitzpatrick, T.B., and Kraus, E.W. Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **15**, 894-899, 1986.
6. Mumma, R.O., Mckee, E.E., and Verlangieri, A.J. Anti-ascorbic effect of ascorbic acid 2-sulfate in the guinea pig. *Nutr. Rep. Int.*, **6**, 133-137, 1972.
7. Manning, J.M. and Meister, A. Conversion of praline to collagen hydroxyproline. *Biochemistry*, **5**, 1154-1165, 1966.
8. Hayakawa, R. Effects of combination preparation of vitamin E and C in comparison with single preparation to the patients of facial hyperpigmentation: a double-blind controlled clinical trial. *Nishinippon. J. Dermatol.*, **42**, 1024-1034, 1980.
9. Maeda, K. and Fukuda, M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Pharmacol. & Experimental Ther.* **276**, 765-769, 1996.
10. Briganti, S., Camera, E., and Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**, 101-110, 2003.
11. Imokawa, G., Kobayashi, T., Miyagishi, M., Higashi, K., and Yada, Y. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, **10**, 218-28, 1997.
12. Choi, S.Y., Kim, S., Kim, H., Suk, K., Hwang, J.S., Lee, B.G., Kim, A.J., and Kim, S.Y. (4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, a nitrogen analog of stilbene as a potent inhibitor of melanin production. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 450-452, 2002.

13. Jiao, H., Soejima, Y., Ohe, Y., and Saijo, N.A. A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the nonadherent P388 leukemia cell line. *J. Immunol. Methods.*, **153**, 265-266, 1992.
14. Kim, D.S., Kim, S.Y., Chung, J.H., Kim, K.H., Eun, H.C., and Park, K.C. Delayed ERK activation by creamide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cellular Sig.*, **14**, 779-785, 2002.
15. 邱年永, 張光雄, 原色臺灣藥用植物圖鑑(5), 臺北, p.231-232, 1983.
16. Saxena, A. X., Singh, B., and Anand, K. K. Hepatoprotective effects of *Eclipta alba* on subcellular levels in rats. *J. Ethanopharmacol.*, **40**, 155-161, 1993.
17. Jayathirtha, M. G. and Mishra, S. H. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, **11**, 361-365, 2004.
18. Melo, P. A. and Ownby, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. *Toxicon.*, **37**, 199-215, 1999.



tynosinase:0.2U/µl



dopa:0.01M

