

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## KC-2T 美白作用安全性及其機轉探討(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-039-009-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中國醫藥大學藥用化妝品學系

計畫主持人：溫國慶

共同主持人：蔡尚元，徐素蘭，侯鈺琪

計畫參與人員：柯怡伶 余鍾蘭

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 5 月 24 日

# KC-2T 美白作用安全性及其機轉探討

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，於先前本研究室自台灣產茜草科植物篩選出四種甲醇萃取物，再經適當處理之產物 KC-1T，KC-2T，KC-3T，KC-4T，具有酪胺酸酶體外試驗抑制作用，且具濃度依存性。其中以 KC-2T（每 mL 相當於原植物 7.2 mg）之活性為純成分熊果苷（Arbutin, 2.72 mg/mL）活性之 1.5 倍，甚具開發潛力。

本計畫就 KC-2T 經進行動物試驗評估其美白作用，及其抑制黑色素合成徑路之機轉，作用機轉之部分，包括黑色素生成抑制試驗，發現 KC-2T 於 100 ug/mL 其及抑制效果較熊果苷佳。

此外就 KC-2T 原植物所含成分 hexacosanoic acid,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, oleanolic acid, triacontanoic acid, vanillic acid 等，進行酪胺酸酶體外試驗，發現 vanillic acid 具有比熊果苷佳之抑制效果。透過此研究，期望開發成為具有效又安全之美白作用成分。

關鍵詞：茜草科，美白作用，酪胺酸酶，黑色素，黑色素細胞刺激荷爾蒙

# **Whitening effect, safety and mechanisms of KC-2T**

**Wen Kuo-Ching**

**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. Our previous study on whitening constituents-containing plants (CCMP93-RD-045) found four active products, KC-1T, KC-2T, KC-3T, and KC-4T, derived from plants of Rubiaceae after suitable extraction and treatment. The four products showed stronger activities than arbutin as compared with the tyrosinase activity inhibition zone test in a dose dependent manner. Among the four products KC-2T showed the strongest inhibition activity as 1.53-fold of arbutin at lower concentration (7.2 mg/mL) than others.

In this project, the whitening effect of KC-2T was evaluated by UV-induced hyperpigmentation on the dorsal skin of Sprague-Dawley rats and Hartley guinea pigs. The result showed that the inhibition of melanin synthesis for KC-2T (100 ug/mL) was stronger than that of arbutin (2.72 mg/mL). In addition, the constituents in the plant containing KC-2T, including phytosterol, hexacosanoic acid, sitosterol-3-O-glucoside, lupeol, oleanolic acid, triacontanoic acid and vanillic acid, were screened by tyrosinase activity inhibition zone test. The result showed that the inhibition of tyrosinase activity for vanillic acid (16.8 mg/mL) was superior to that of arbutin (27.2 mg/mL) and vanillic acid could be developed as an effective whitening agent.

**Key words:** Rubiaceae, whitening effect, tyrosinase, melanin,  $\alpha$ -MSH

## 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。

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，茜草科之被芑仙丹花<sup>4)</sup> (*Michelia champaca*) 含黃酮類成分。檄樹<sup>5)</sup> (*Morinda citrifolia*) 葉含 flavonol glycosides，剛果咖啡<sup>6)</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、植物之採集

大坑地區附近採集得到。

### 二、植物之萃取及處理

稱取10 g 加入適量甲醇，先行靜置後再以超音波震盪萃取，過濾濾液並進行減壓濃縮至乾，經處理後以適當溶媒復溶，進行酪胺酸-酪胺酸酶(tyrosine-tyrosinase)體外試驗。酒粕稱取 100 g 以 50% 乙醇 500 mL，先行靜置後再以超音波震盪萃取，過濾濾液並進行減壓濃縮至乾，以適當溶媒復溶處理供試，進行酪胺酸酶抑制率試驗及以 B 16 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。

### 三、酪胺酸酶活性體外試驗，動物試驗評估其美白作用及作用機轉之探討

#### 1. KC-2T 其原植物所含相關成分之酪氨酸-酪氨酸酶(tyrosine-tyrosinase)體外試驗系統<sup>7)</sup>

成分包括, hexacosanoic acid,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, oleanolic acid, triacontanoic acid, vanillic acid 等。試驗步驟如下：

取自 mushroom 之酪胺酸酶(2400 U/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%)，次將測試檢品對照品 (arbutin) 載於濾紙片後置於培養基上以 37°C 培養 3 小時後，比較抑制圈之大小。

#### 2. 美白作用之有效性評估

評估之對象包括 KC-2T 及上項試驗具活性成分者，試驗方法<sup>8,9)</sup>如下：  
選用雄性 Sprague-Dawley 大白鼠及白色天竺鼠(Hartley guinea pig)經背部剃毛後，分別以 UV-Radiometer UVR-302/365 nm 隔天照射 1MED (minimum erythema dose, 630 mJ/cm<sup>2</sup> 及 900 mJ/cm<sup>2</sup>)，計 6 次，以形成色素沉著。

#### 3. KC-2T 改善色素沉著之機轉

##### (1) 黑色素生成抑制試驗<sup>9,10)</sup>

以黑色素瘤細胞 (melanoma, B16-FO)，以黑色素瘤細胞 B16-FO 置於 10cm 培養皿中，24 小時後加入不同濃度之 KC-2T，再經培養 1~2 天，添加 trypsin 將細胞剝離，離心、回收，加 10% TCA 後，加入乙醇/乙酸乙酯使之脫脂，再以氮氣吹乾，加入 1N NaOH 溶解以此細胞溶解為粗黑色素溶液，以 405 nm 測定其黑色素量，並評估其抑制黑色素生成量是否具濃度依存性。並且觀察細胞有無形態上之變化及生育數減少等細胞毒性之情形。

##### (2) 酪胺酸酶合成抑制試驗<sup>9,10)</sup>

以 B16-FO 培養在 96 well 24 小時，隔天加入 KC-2T 各種不同濃度(1X, 0.75X, 0.5X, 0.25X) 存在下培養數天，除去培養基後，以 PBS wash 再加入 1% Triton X-100 溶解細胞先置於 -80°C 後，再取出放於室溫回溫，添加最終濃度 0.04% 之 L-DOPA 後，

先以 ELISA 測定 405 nm(反應前),於 37°C 培養 1 小時,令其發色測定反應後吸光度 (405 nm)比較前後差異之差。評估細胞內酪胺酸酶活性。看其是否具抑制細胞內酪胺酸酶活性,及其是否有濃度依存性。評估細胞內酪胺酸酶活性。評估其是否具抑制細胞內酪胺酸酶活性,及其是否具有濃度依存性。

(3) 直接阻斷酪胺酸酶活性之試驗<sup>9,10)</sup>

以 B16-FO 培養在 96 well 24 小時,加入 1% Triton X-100,隔天添加 KC-2T 各種不同濃度(1X, 0.75X, 0.5X, 0.25X),及添加最終濃度為 0.04 % 之 L-DOPA 後先以 ELISA 測定反應前吸光度(405 nm),於 37°C 培養 3 小時後,測定反應後吸光度(405 nm),並比較前後之差。求出對酪胺酸酶活性之直接阻斷作用。

(4) 抑制  $\alpha$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone) 作用試驗<sup>1)</sup>

以  $\alpha$ -MSH 作用為指標之美白劑評估方法,係以正常黑色素細胞(Normal Human Epidermal Melanocytes)購自 Promo Cell。於 25T Flask 置入解凍後之細胞,以 Melanocyte Growth Medium / Supplement Mix 培養液培養(含 BPE 0.4%、basic Fibroblast Growth Factor 1ng/mL、insulin 5 mg/mL、Hydrocortison 0.5 mg/mL、Phorbol-Myristate-Acetate 10 ng/mL),培養 24 小時,並觀察其細胞型態。

## 參、結果

### 酪胺酸酶活性體外試驗，動物試驗評估其美白作用及作用機轉之探討

#### 1. KC-2T 其原植物所含相關成分之酪胺酸-酪胺酸酶(tyrosine-tyrosinase)體外試驗系統

KC-2T 其原植物所含相關成分包括, hexacosanoic acid,  $\beta$ -sitosterol, lupeol, oleanolic acid, triacontanoic acid, vanillic acid 等，可發現 vanillic acid 對酪胺酸酶具有較佳抑制作用，且效果優於熊果苷。其抑制圈結果如 Fig 1、Fig 2 及 Table 1、Table 2。

#### 2. 美白作用之有效性評估

利用兩種實驗動物如雄性 Sprague-Dawley 大白鼠及白色天竺鼠(Hartley guinea pig)經背部剃毛後，分別以 UV-Radiometer UVR-302/365 隔天照射 1MED (minimum erythema dose, 630 mJ/cm<sup>2</sup> 及 900 mJ/cm<sup>2</sup>)，計 6 次，期望形成色素沉著，但只能觀察到造成 SD 大白鼠背部紅斑及紅腫，對於白色天竺鼠並無影響。其結果如 Fig 3

#### 3. KC-2T 改善色素沉著之機轉

##### (1) 黑色素生成抑制試驗<sup>9,10)</sup>

以黑色素瘤細胞置於 10cm 培養 24 小時後加入 KC-2T 不同濃度培養 1~2 天，並且觀察細胞有無形態上之變化及生育數減少等細胞毒性之情形。

培養 24 小時及 48 小時，不同的培養天數可能會對其結果造成影響，其結果如 Table 3

##### (2) 酪胺酸酶合成抑制試驗<sup>9,10)</sup>

以 B16-FO 培養在 96 well 24，再加入 KC-2T 各種不同濃度存在下培養 1~2 天，溶解細胞，添加最終濃度 0.04% 之 L-DOPA 後，以 ELISA 測定 405 nm 反應前與反應後。發現培養 48 小時 KC-2T 於高濃度下具有較佳之抑制效果但無濃度依存性現象，其結果 Table 4

##### (3) 直接阻斷酪胺酸酶活性之試驗<sup>9,10)</sup>

以 B16-FO 培養在 96 well 24 小時，加入 KC-2T 各種不同濃度，及添加最終濃度為 0.04 % 之 L-DOPA 後先以 ELISA 測定反應 3 小時後之結果發現對酪胺酸酶直接阻斷效果未比熊果苷佳，其結果 Table 5。

##### (4) 抑制 $\alpha$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone) 作用試驗<sup>1)</sup>

培養 24 小時後受污染，日後須再做進一步探討。

## 肆、結論與討論

原植物所含之 vanillic acid 於酪胺酸-酪胺酸酶平板抑制試驗中，其抑制圈大小優於 Arbutin (27.2 mg/mL)，可在進一步探討其成分佔原植物之量，已確定是否為原植物之有效美白成分。

## 伍、參考文獻

1. 正木 仁，2003，チロシナーゼ活性測定法および美白効果評價法，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. Vimala R, Nagarajan S, Alam M, Susan T and Joy S. 1997. *Indian Journal of Experimental Biology.* 35(12): 1310-4.
6. 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.
7. 三井幸雄，2002 “天然物素材の化粧品開発(1)酒粕の應用”，*Fragrance Journal*, 6:145-149.
8. Kobayashi A, Hachiya A, Kitahara T, 2003, Inhibitory effect of *Matricaria chamomilla* L., on pigmentation, *Fragrance Journal*, special issue No.18, 91-96
9. Ando H, Ryu A, Hashimoto A, Oka M, Ichihashi M, 1998, Linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin, *Arch Dermatol Res*, 1998 290 : 375–381.
10. Hashizume R, Hayashi S, 2003, Inhibitory effect of Kippi extracts on melanin synthesis, *Fragrance Journal*, special issue No.18, 103-112.
11. 溫國慶，2004，台灣產茜草科植物美白作用之篩選，CCMP93-RD-045，行政院衛生署中醫藥委員會。
12. 許榮麒，2004，九節木 *Psychortia rubra* (Lour.) Poir.化學成分之研究，中國醫藥大學 中國藥學研究所碩士論文。

陸、圖

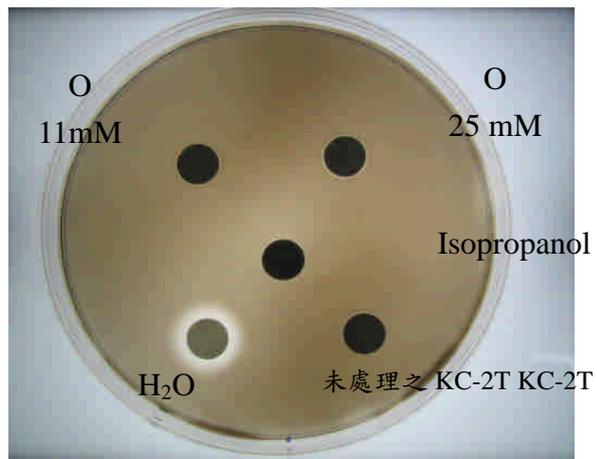


Fig 1 oleanolic acid 及 vanillic acid 之抑制圈



Fig 2 vanillic acid 以 Isopropanol 及 50% PG 溶解抑制圈之比較

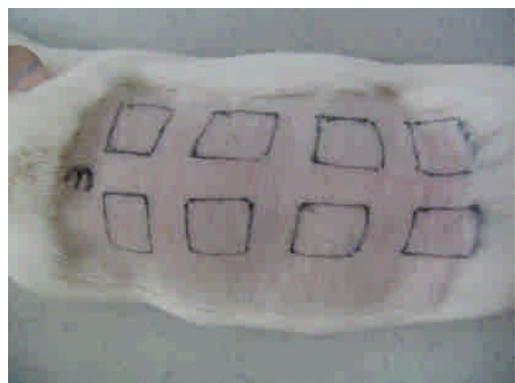


Fig 3 Sprague-Dawley 大白鼠及白色天竺鼠經照射後之情況

## 柒、表

Table 1 Oleanolic acid、Ursolic acid、Vanillic acid 對酪胺酸-酪胺酸酶之平板抑制試驗

	O 11mM	O 25mM	V 50 mM	U 11mM	Isopropanol
1	—	—	1.2	—	—
2	—	—	1.3	—	—
3	—	—	1.3	—	—

— 表無抑制圈 Oleanolic acid、Ursolic acid、Vanillic acid 於 plate 上呈現粉狀沉澱

Table 2 Vanillic acid 以不同溶媒溶解之酪胺酸-酪胺酸酶之平板抑制試驗

	Isopropanol	Vanillic acid 100 mM (Iso)	Vanillic acid 50 mM (Iso)	PG (50%)	Vanillic acid 100 mM (PG)	Vanillic acid 50 mM (PG)
抑制圈大小 (mean ± SD)	—	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.2	—	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1

— 表無抑制作用

Table 3 黑色素生成抑制試驗

	PG 50%	Ar(mM)		KC-2T(ug/mL)					
		10	2	200	150	100	75	50	25
Inhibition (%)	14.3	36.8	29.9	65.9	39.4	44.1	5.0	7.4	15.5

Table 4 酪胺酸酶合成抑制試驗

	Arbutin		PG	KC-2T (ug/mL)							
	3.3mM	0.7 mM	50%	800	600	400	200	100.00	75.00	50.00	25.00
24 小時	11.7	-11.5	-49.0	56.8	63.0	86.4	17.3	-0.4	-19.3	46.1	15.3
48 小時	58.4	20.0	-86.2	96.3	94.7	64.8	-42.7	-4.2	-38.2	-23.3	16.9

Table 5 直接阻斷酪胺酸酶活性之試驗

	PG	Ar. (mM)			KC-2T (ug/mL)							
	50 %	10	.2	0.5	800	600	400	200	100	75	50	25
Inhibition (%)	92.5	93.3	84.2	63.5	1.2	-57.9	-20.4	26.7	27.9	30.8	35.8	30.0