

編號：CCMP93-RD-034

中草藥功能性化妝品之應用開發

李美賢

台北醫學大學

摘 要

近幾年植物性皮膚保養品之應用已成為消費市場之風潮，因此對於中草藥在皮膚保養化妝之研究更是期待加強。本計畫目的在開發中草藥應用於抗老化、美白等皮膚保養的化妝品，擬利用清除氫氧（hydroxyl）自由基以及抑制酪氨酸酶（tyrosinase）活性，來進行皮膚抗老化、美白之活性測試。本計畫自傳統古籍文獻中被記載可作為化妝保養品之三十種中草藥材料，以酒精溶劑萃取後，利用抗老化、美白之活性測試，篩選活性強之中草藥，發現其中雞血藤具不錯活性，乃進一步進行以活性追蹤方式進行抽取、分離、純化有效成分，與結構之解析以及活性成分之抗老化、美白、防皺（抑制 matrix metalloproteinase 9 之活性）之活性測試。發現雞血藤中之 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 具有抗老化與美白活性，可做為將來中草藥相關化妝保養產品的添加劑，對將來中草藥於保養化妝品應用開發上更具實質幫助。

關鍵詞：中草藥、抗老化、美白

Number: CCMP93-RD-034

The Applied Development of Cosmetics in Chinese Herbal Medicines

Mei-Hsien Lee

Taipei Medical University

ABSTRACT

Recently, the consumers pay attention to the plant products cosmetics on their use within skin-care preparations. Therefore, the development of Chinese herbal medicines on skin-care cosmetics should be emphasized. The aim of this project was to screen material extracts of Chinese herbal medicines for developing the skin-care cosmetic application on anti-aging and whitening by using hydroxyl radical scavenging activity and inhibition of tyrosinase activity. We will collect thirty kinds of Chinese herbal medicines which usually were used in the skin-care on ancient books. After the extraction of these raw materials, anti-aging and whitening activities will be done. We selected one of these active extracts, *Spatholobus suberectus*, to isolate and purify the active components by using bio-guide. The active structure, 3',4',7-trihydroxyflavone, was identified by physical data, various spectra and references. Sequentially, the anti-aging, whitening, and anti-wrinkle activities (matrix metalloproteinase 9 inhibitory activity) of this component will be tested. 3',4',7-Trihydroxyflavone was exhibited the anti-aging and whitening activities. We hope this finding will be developed to the additives in the skin-care cosmetics. The results will be enabled us to offer one of the most comprehensive ranges of cosmetic Chinese herbal medicines extracts available in the future.

Keywords : Chinese herbal medicine, anti-aging, whitening

壹、前言

政府於近年來，積極推動中醫藥科學化之政策，為加速中醫藥科學化，達成中醫藥國際化政策之目標，行政院衛生署中醫藥委員會每年均會規劃發展重點，九十三年度在中藥品質管制及中藥資源類研究重點發展計畫中，訂定年度研究重點之一為中草藥在化妝品上之應用開發，本計畫乃擬進行有關中草藥應用於保養化妝品中抗老化、防皺、美白等產品之開發。

更由於近幾年來消費者綠色觀念的抬頭，全世界植物性產品的市場每年都在積極成長中，在天然化妝保養品中更是占有廣大之消費市場。植物類天然化妝品主要成分是天然植物精華等，這些精華從植物的葉、莖、花瓣、果實中提煉出來，對人體的皮膚應可做為營養和保護作用的化妝品。在皮膚的外用產品研發上，抗老化、抗紫外線、防皺、抗過敏、除紋、祛斑、祛異味及美白等方向發展，為化妝品市場之炫風。中國人於數千年前就會以天然植物調配成美容製品來使用，據「本草綱目」記載，大自然中的許多天然植物均可納入漢方的藥草寶庫中，這些植物可用來治療皮膚病，防止皮膚龜裂、紫外線傷害、增強皮膚健康、預防色素沈澱、皺紋產生以及美白的效果等。因中草藥裏含有許多天然造化的成份，由於各種成份相需、相輔、相制的多元性調節，從天然生成的中草藥中提煉出天然物作為保養品添加劑，使用這些有營養療效且副作用少的天然物為基礎所研發的保養化妝品，更為目前全球化妝產品的新趨勢。因此近年來中草藥醫學在世界上重新被注目，足以證明中草藥具有優越的本質。

目前的化妝保養品擁有很大市場，各家廠商無不競相推出新的產品，目的就是希望能夠在市場上有亮麗的成績。皮膚抗衰老、美白、防皺等功效性化妝品為市場上消費熱點，吸引許多不同年齡層的消費者。隨著人們環保意識的增強以及崇尚自然之風日漸，綠色天然化妝品更受到青睞，新一代天然化妝品從動、植物或中草藥中提取原料，用生物工程學和仿生學技術開發的功能性物質做為化妝品原料是今後市場發展及研發的主要趨勢。本計畫即針對此目的，進行中草藥抗老化、防皺、美白作用的中草藥篩選及其活性成分的純化分離，開發新的抗老化、防皺、美白保養品。

皮膚是身體最大的器官，皮膚分為三層，表皮 (epidermis)、真皮層 (dermis) 與皮下組織 (subcutaneous tissue)⁽¹⁾ 表皮主要由上皮角

質細胞 (keratinocytes) 組成，與黑色素之生成有關。真皮層主要是由膠原蛋白組成，主要是支撐著整個皮膚架構，此外還包括腺體、毛囊、神經、血管及彈力蛋白 (可使皮膚有彈性)，真皮層含有許多細胞外基質蛋白 (extracellular matrix proteins)；表皮和真皮層的厚度比約略為 1:19，其中表皮有基底細胞不斷的更新，週期約為 28 天，而角質層的更新週期約為 14 天。皮膚為什麼會老化？皺紋又因何而產生？人類肌膚老化的主要因素有二，一是外在環境的影響，如紫外線⁽³⁻⁶⁾、自由基⁽⁷⁻¹²⁾、吸煙、熬夜、長期處於密閉空調空間、臉部表情豐富及長期在陽光下曝曬空氣及水質的污染等，會影響皮膚正常代謝的速度，而使皮膚表皮出現細紋，呈現粗燥、沒有光澤或痘痘等現象。二是隨著年齡增長的自然老化，因為真皮層老化，肌膚的彈性隨著年齡的增長，進而導致膠原蛋白與彈力纖維結構改變。尤其是真皮層的膠原蛋白會隨著老化而性質改變、含量減少，導致肌膚細紋與皺紋的產生，因此真皮層膠原蛋白含量的減少是皺紋出現的主因之一^(13, 14)。

科學家發現細胞的氧化是造成皮膚過早老化鬆弛的原因之一⁽⁷⁻¹²⁾，因此自由基亦是造成皮膚老化的另一主要因素⁽⁷⁻¹²⁾。自由基大量增加會造成基因與蛋白質結構結構與功能的改變，進而造成皮膚傷害⁽¹⁵⁾。因紫外線照射經由能量的轉移產生超氧陰離子 (superoxide anion)⁽¹⁶⁾，經由 superoxide dismutase 轉換形成過氧化氫 (H_2O_2)，進一步藉由金屬離子 (例如： Fe^{3+}) 的催化產生氫氧自由基 ($OH\cdot$)⁽¹⁷⁻¹⁹⁾，過多活性氧能引起細胞中不飽和脂肪酸被氧化形成過氧化脂，繼而引起細胞內膜系通透性改變、蛋白質變性、細胞內容物流失等，加速細胞老化或死亡^(20, 21)。因此可利用自由基清除作用，進行抗老化天然物之快速篩選模式。

又當皮膚老化時，在皮膚生理上有些非常重要之改變，這些改變是因為經過長時間暴露在環境造成皮膚細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 之構造和功能的轉型 (transformation)。細胞外基質對於皮膚的不同生理功能扮演相當重要之角色，以及建立皮膚的三度空間結構。皮膚中存在一群酵素，稱為 matrix metalloproteinase (MMP)⁽²²⁻²⁴⁾，為一群需要鋅存在的內蛋白酵素 (zinc-requiring endoproteases)，負責分解皮膚細胞外基質 (ECM) 之大分子蛋白。目前大約有 20 多種 MMP 被分離出來^(25, 26)。皮膚老化與環境因素 (例如：紫外線照射)，都會讓此酵素之活性增加⁽²⁷⁻²⁹⁾ 而導致細胞外基質 (ECM) 之崩解而使皮膚產生之皺紋，失去彈性並導致表面細微血管之膨脹。其中 MMP-1

(interstitial collagenase), 3 (stromelysin B), 9 (gelatinase 92-kd) 會分解皮膚的成熟纖維膠原 (fibrillar collagen)^(30, 31)與經紫外線照射而導致皮膚老化之原因有關^(30, 31), 當人類皮膚經紫外線照射 24 小時會造成膠原蛋白斷鏈增加⁽³¹⁾。隨著年齡增長, 會增加 MMP-1, 2 (gelatinase A), 3, 9 的活性, 影響膠原蛋白的合成⁽³²⁾, 造成皮膚老化與皺紋產生。因此, 皮膚老化和長期暴露於紫外線時, 造成 MMP 活性增加、膠原蛋白纖維之合成降低及 MMP 抑制分子 (MMP inhibitors) 之表現降低等現象, 進而導致漸進性皮膚細胞外基質 (ECM) 大分子分解。於皮膚應用上, 抑制 MMP 酵素活性, 可保護皮膚細胞並降低皮膚受到周圍環境之傷害, 用來減緩皮膚上之細紋、增進皮膚之彈性、降低日曬引起對皮膚之傷害、減緩皮膚紅腫、增加皮膚細胞外基質 (ECM) 之強化作用等^(34, 35)。皮膚之生理功能乃依賴皮膚細胞外基質 (ECM) 之完整性, 提供皮膚之生理支持來維持其特有功能。因此若能抑制 MMP 活性, 對於減少皮膚細紋和皺紋, 延緩皮膚老化上應有所幫助, 亦可用來篩選天然物中防皺的活性成分。

在美白作用上, 由於皮膚變黑主要是由皮膚黑色素細胞所製造黑色素 (Melanin, 通稱麥拉寧) 量的多寡來決定。黑色素細胞會受到“酪胺酸酶” (tyrosinase) 的活動而產生大量的黑色素, 這就是皮膚曬黑、各種黑斑形成的主要因素。而酪胺酸酶 (tyrosinase) 是一種普遍存在於體內的酵素, 由酪胺酸分解而成, 是形成黑色素的主要活化劑。抗黑色素過度沈著之作用機制可從下列兩個方向討論^(36, 37): 一是對黑色素生合成途徑進行抑制作用; 二是黑色素細胞 (melanocyte) 的細胞毒性作用。對人類而言, 因黑色素具有吸收紫外線輻射能以減緩發炎反應⁽³⁸⁾以及具 SOD (superoxide dismutase) -like 活性能清除超氧陰離子之自由基⁽³⁹⁾等生理保護作用。而細胞毒性作用則會不可逆阻止黑色素生成, 使生理保護作用一併被抑制, 故科學研究不由黑色素細胞之細胞毒性著手, 而多從生合成途徑之抑制反應發展。黑色素 (melanin) 之生成^(40, 41)是酵素作用的過程, 此生化過程需有胺基酸 tyrosine、一種含銅酪胺酸酶 (tyrosinase) 及氧分子的參與。酪胺酸酶將 tyrosine 氧化成 dihydroxyphenylalanine (即 dopa)。然後 dopa 再轉變成 dopachrome, 在經一連串複雜的的氧化代謝步驟, 最後形成了黑色素。其中 tyrosinase 催化 dopa 變為 dopachrome 是速率限制步驟⁽⁴⁰⁾。能抑制 tyrosinase 反應的物質就有能力當作美白劑。其中大家最熟悉的是對苯二酚 (hydroquinone) 及麴酸 (kojic acid)^(42, 43)。麴酸 (kojic acid) 是新受認可的美白成分, 可抑制 melanin 生成之用。Koichi Iida 等人⁽⁴⁴⁾

從一些中藥中進行研究，得到幾種酪不同抑制效果的酪氨酸酶抑制成分，其中以藥用大黃的萃取物的抑制率 58.5% 為最高。1997 年 Dong-II Jang 等人發表以 95% 乙醇抽取構樹 (*Broussonetia papyrifera*) 乾燥根，所得到的一種天然物 5-(3-(2,4-dihydroxy-phenol) propyl)-3,4-bis(3-methyl-2-butenyl)-1,2-benzenediol，對酪氨酸酶的活性具有極強的抑制作用；該產品已被申請專利。此外，也有分別自藍綠藻⁽⁴⁵⁾、蘚苔及真菌^(46, 47)中，分離出來的酪氨酸酶抑制劑。在皮膚美白方面，可從切斷 UV、清除自由基、抑制酪氨酸酶的合成、抑制酪氨酸酶的活性及阻礙黑色素生成或促進其代謝等幾方面著手。因此利用抑制酪氨酸酶來減少黑色素生成，可用來作為天然物中美白活性成分篩選的模式。

近年來，隨著化妝品行業與醫藥衛生業越來越密切的發展關係，功效性含藥化妝品逐漸增多，它們對於保護人們皮膚健康、防治皮膚疾病產生很好的作用，為臨床醫療提供了輔助措施。因此利用植物萃取物添加入皮膚保養品的文獻報導亦越來越多，在中草藥的應用方面，韓國 Ok-Sub Lee 等人⁽⁴⁸⁾利用人參、山藥、地黃、蒼朮、黃芩、防風…等，針對各中藥材的有效部位，成分及活性，作一綜合性的報導，在活化皮膚方面，Ok-Sub Lee 和 Eun-Joung Kim 對篩選的原理及成功的產品做概略性的介紹⁽²²⁾。因此本計畫擬利用清除氫氧 (hydroxyl) 自由基、抑制酪氨酸酶 (tyrosinase) 活性，來進行皮膚抗老化、美白之活性測試，篩選活性強，毒性低，含量豐富，易採集的天然物，開發抗老化、美白、防皺 (明膠/酪蛋白酶譜分析 MMP-9 之活性) 化妝保養品之活性成分。將中草藥應用於化妝品，開發天然產品供消費者使用。

貳、材料與方法

一、中草藥材料

收集中草藥的參考資料及相關的報導，整理出與抗老化、防皺、美白相關之三十種中草藥進行萃取 (Table 1)。

二、中草藥之鑑定與萃取

收集之中草藥經專家鑑定後，乾燥、切割，以乙醇溶劑進行抽取，經過濾、濃縮後，冷凍乾燥於乾燥箱中保存，以進行各種活性試驗。

三、中草藥溶劑萃取物活性之測定

(一) 抗老化活性測定—氫氧 (hydroxyl) 自由基清除作用測定⁽⁵⁰⁾

反應液中加入 2.8mM deoxyribose, 20mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100M FeCl₃, 780 M EDTA, 1mM H₂O₂, and 100M ascorbic acid, 於 37°C 中培養 1 小時，加入等倍體積的 1% 2-thiobarbituric acid (TBA) 及 10% trichloroacetic acid (TCA), 於水浴中煮沸 5 分鐘，冷卻後，以 13,000×g 離心 5 分鐘，使用分光光度計於 532 nm 下測吸光值。

(二) 美白活性測定—酪氨酸酶 (Tyrosinase) 的活性測定^{(51)[47]}

將藥材萃取物 25mL 加入 0.5mL 2,000U/mL Mushroom tyrosinase 溶液, 75μL 2.5mM L-dopa 溶液, 75μL potassium buffer (pH 6.8) 緩衝溶液 (pH6.8), 以及 50μL H₂O, 在 25°C 下放置 30 分鐘，使用分光光度計於 475nm 下測吸光值。並依以下公式計算萃取藥物對 tyrosinase 的抑制百分率：

$$\text{Tyrosinase 抑制率(\%)} = ((D-C) - (B-A)) / (D-C) \times 100$$

A and B: the absorbance in the presence of the test specimen before and after incubation, respectively.

C and D: the absorbance without the test specimen, before and after incubation, respectively.

四、活性成分之萃取、分離與純化

乾燥植物體以乙醇萃取，過濾，濾液減壓濃縮後，依次以不同極性之溶劑（例如：hexane, ethyl acetate, n-butanol）進行成分之部分劃分。以活性為指標，進行活性成分之分離，具活性之劃分部再分別依其特性以不同之層析管柱進行分離，例如以 Diaion HP-20, Sephadex LH-20, TSK HW-40, MCI CHP-20P, ODS 等管柱，使用之溶媒系統亦依管柱與分離成分之特性選擇不同之系統（例如：MeOH-H₂O, EtOH-H₂O, acetone-MeOH-H₂O 等）。以不同層析管柱並配合薄層色層分析法（TLC）、高效能液相層析法（HPLC）之檢測、製備級 TLC 及 HPLC 進行成分分離與純化之工作。

五、活性成分構造之決定

經物理數據及各種圖譜等儀器分析之數據與參考文獻等，進行成分鑑定。

六、分離成分之活性測定

- (一) 抗老化活性測定—氫氧（hydroxyl）自由基清除作用測定⁽⁵⁰⁾
- (二) 美白活性測定—酪氨酸酶（Tyrosinase）的活性測定⁽⁵¹⁾
- (三) 防皺活性測定—明膠/酪蛋白酶譜分析（gelatin/casein zymography）⁽⁵²⁾

藥材萃取物與 MMP 酵素混合，於 37°C 作用 24 小時。取出後放置在 -80°C 終止反應。此反應物以 1:5 比例與 protein loading dye 混合後，取 20 至 30 μL 加入至含 Gelatin (or casein) 膠的 well 中，以 200 伏特跑膠 50 至 60 分鐘，或染料至底部邊緣。將膠取下至於容器中，以 4 種 washing buffer 在室溫各洗 20 分鐘，換掉最後一次的 washing buffer，以新鮮的 washing buffer 4 在 37°C 培養 12 小時，再以 Coomassie blue 將膠染色 30 分鐘，再以 destaining solution 脫色數小時，直至條帶清晰。

參、結果與討論

一、傳統古籍文獻中被記載

可作為化妝保養品之三十種中草藥材料，其乙醇萃取產率如 Table 2，其範圍為 2.2-33.55% 不等；酪氨酸酶抑制作用如 Table 3 所示，其中雞血藤、香薷、桑葉、甘草與玉竹具 50% 以上之抑制活性；氫氧自由基如 Table 4 所示，丹皮、雞血藤、橘皮、夏枯草、鼠尾草、商陸、白藜、桑葉、玉竹、葳蕤、白鮮皮、藿香、栝樓根具 60% 以上之抑制活性。本實驗經評估後，進一步進行其中雞血藤中活性成分之抽取。

二、雞血藤之萃取及分離流程

雞血藤 (*Spatholobus suberectus*) 乾燥中藥 12 公斤，用粉碎機打碎，以 95% 乙醇加熱迴流萃取三次後，合併濾液經減壓濃縮，其乙醇提取物分別以正己烷 (*n*-hexane)、乙酸乙酯 (EtOAc, EA)、正丁烷 (*n*-BuOH) 進行部份劃分，分別得到正己烷層萃取物、乙酸乙酯層萃取物、正丁烷層萃取物和水層萃取物。經酪氨酸酶 (Tyrosinase) 抑制測定結果發現其 EA 層最具活性效果 (Inhibition%=60.37%, 100 μ g/mL) (Fig. 1)。

EA 層萃取物溶於水，以 Diaion HP 20 層析管柱進行分離，利用 100% 水到 100% 甲醇梯度沖提，經過薄層層析片 (TLC plate) 分析，得到 SS-1-1~SS-1-7 七個部分，經酪氨酸酶 (Tyrosinase) 抑制測定結果發現其 SS-1-4, SS-1-5 最具活性效果 (SS-1-4 Inhibition%=76.96%, SS-1-5 Inhibition%=75.39%, 100 μ g/mL) (Fig. 2)，取 SS-1-4 (10g) 再經由 Sephadex LH-20 層析管柱，以 40% 甲醇到 100% 甲醇梯度沖提，劃分為 SS-2-1~SS-2-10 共十個部分，經酪氨酸酶 (Tyrosinase) 抑制測定結果發現其 SS-2-8, SS-2-9 最具活性效果 (SS-2-8 Inhibition%=85.51%, SS-2-9 Inhibition%=82.40%, 100 μ g/mL) (Fig. 3)，SS-2-8 再經由 C-18 層析管柱，以 45% 甲醇到 100% 甲醇梯度沖提，劃分為 SS-4-1~SS-4-7 共七個部分，經酪氨酸酶 (Tyrosinase) 抑制測定結果發現其 SS-4-3, SS-4-6 最具活性效果 (SS-4-3 Inhibition%=98.51%, SS-4-6 Inhibition%=73.88%, 100 μ g/mL) (Fig. 4)，SS-4-3 利用高效能液相層析儀進行分離，條件為一逆相層析管柱 Biosil 5 ODS-W 10mm I.D. X 250mm，移動相 55% 甲醇

(MeOH)，流速 3mL/min，偵測器 UV365nm 分離純化，得到化合物 SS-4-3-2。分離流程如 Chart 1 所示。

三、活性化合物之結構鑑定

此化合物外觀為黃色粉末，由 $^1\text{H-NMR}$ 光譜 (Fig. 5、6)，J-resolution spectrum (Fig. 7) 分析得知，有二組苯環上 ABX type 訊號分別在 $\delta 7.40$ (1H, d, $J=2.3\text{Hz}$)、 $\delta 7.40$ (1H, dd, $J=8.9, 2.3\text{Hz}$) 和 $\delta 6.89$ (1H, d, $J=8.9\text{Hz}$)，推定為黃酮類骨架 B 環上 H2'、H6' 及 H5' 位置，另一組苯環上 ABX type 訊號 $\delta 7.95$ (1H, dd, $J=0.6, 8.7\text{Hz}$)、 $\delta 6.91$ (1H, dd, $J=8.7, 2.3\text{Hz}$) 和 $\delta 6.93$ (1H, dd, $J=2.3, 0.6\text{Hz}$) 則推定為黃酮類骨架 A 環上 H5、H6 及 H8 位置 (Table 5)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜 (Fig. 8) 中，配合 HMQC (Fig. 9) 得知， $\delta 126.7$ (C5)、 $\delta 115.1$ (C6)、 $\delta 164.6$ (C7)、 $\delta 102.9$ (C8)、 $\delta 158.3$ (C9) 和 $\delta 115.6$ (C10) 為黃酮類骨架 A 環上的六個碳， $\delta 122.6$ (C1')、 $\delta 112.7$ (C2')、 $\delta 149.5$ (C3')、 $\delta 145.7$ (C4')、 $\delta 115.4$ (C5') 及 $\delta 118.8$ (C6') 則是黃酮類骨架 B 環上的六個碳，另外一組雙鍵的訊號 $\delta 164.0$ 及 $\delta 103.8$ 則是 C2 和 C3 的位置， $\delta 178.9$ 有酮基的訊號，推定為 C4 位置。由以上數據得知此化合物為 flavone 的結構 (Fig. 10)。綜合以上分析及經由文獻比對，證實 SS-4-3-2 為 3', 4', 7-Trihydroxyflavone⁽⁵³⁾。

四、活性化合物之活性試驗

(一) 酪胺酸酶抑制測定

實驗中將化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 分別配製成不同的濃度 (5 $\mu\text{g/mL}$ 到 80 $\mu\text{g/mL}$) 進行試驗，實驗數據如 Table 6 所示。由 Fig. 12 可看出化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 對於抑制酪胺酸酶都有濃度的正相關性，計算其 IC_{50} 為 54.02 $\mu\text{g/mL}$ (200.07 μM)，本實驗以 arbutin 作為正對照組 IC_{50} 71.68 $\mu\text{g/mL}$ (264.50 μM)。人體內酪胺酸酶扮演黑色素生合成過程中重要的角色，催化酪胺酸生合成黑色素中間數個重要的步驟，本實驗以酪胺酸酶催化酪胺酸形成黑色素，比較樣品化合物抑制此反應的能力。從 Table 6 可看出化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 之效果 ($\text{IC}_{50}=200.07\mu\text{M}$) 優於正對照組 arbutin ($\text{IC}_{50}=264.50\mu\text{M}$)。

(二) 氫氧自由基清除測定

化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 分別配製成不同的濃度 (0.0625 $\mu\text{g/mL}$ 到 2.0 $\mu\text{g/mL}$) 進行試驗，其實驗數據之圖表如

Table 7 所示。由 Fig. 所示，化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 對於清除氫氧自由基之濃度與抑制率皆有正相關性，其 IC₅₀ 為 1.237 μ g/mL (4.58 μ M)。

(三) 基質金屬蛋白酶-9 酵素抑制測定

在 MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) 抑制活性試驗中，化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 最終濃度分別 100、75、50 μ g/mL，在 37°C 反應 12 小時後，在含有 0.1% gelatin 的凝膠中進行電泳，其結果如 Fig. 7 所示。本實驗是採用 MMP-9 作為酵素，於含有 gelatin 的 SDS 膠片進行電泳和空白組比較，由於 MMP-9 會分解 gelatin，因此 gelatin 被分解的部分就無法經由 comassie blue 染色劑染色，經脫色後於 92 kDa 會呈現透明的帶狀，當化合物抑制 MMP-9 酵素的活性時，則透明帶狀越不明顯。Fig. 11 中可以看到化合物 3', 4', 7-Trihydroxyflavone 並無明顯抑制 MMP-9 活性。

(四) 活性成分皮膚細胞 (WS1) 毒性試驗

由雞血藤分離之活性成分 3', 4', 7-Trihydroxyflavone，於濃度 50 μ g/mL 下以 MTT 進行其細胞毒性，發現細胞具 80% 不錯之存活率。

肆、結論與建議

本計畫由古籍中選擇三十種常用於皮膚方面之中藥材以現代科學試驗方法測試其功效，進行美白、抗老化、防皺及皮膚細胞毒性等試驗，發現其中雞血藤、香薷、桑葉、甘草與玉竹具 50%以上之酪氨酸酶抑制活性；丹皮、雞血藤、橘皮、夏枯草、鼠尾草、商陸、白藜、桑葉、玉竹、葳蕤、白鮮皮、藿香、栝樓根具 60%以上之氫氧自由基清除活性。顯示中藥材中確實具有可以抗老化、美白之活性成分。本計畫先進行雞血藤中美白活性成分之抽取、分離、純化工作，主要先利用酪氨酸酶抑制作用為活性成分追蹤指標，自其中分離出一活性成分，經結構解析與文獻比對鑑定為 3', 4', 7-Trihydroxyflavone。進一步分析其活性試驗，於酪氨酸酶抑制活性，其 IC_{50} 為 $54.02\mu\text{g/mL}$ ($200.07\mu\text{M}$)；氫氧自由基清除活性，其 IC_{50} 為 $1.237\mu\text{g/mL}$ ($4.58\mu\text{M}$)，但對於 mmp 9 試驗中並無顯著活性。對於 WS-1 正常皮膚細胞毒性測試中，亦無顯示毒性試驗，顯示其具有發展為皮膚功能性產品之潛力，但未來若要朝產品化發展，需進一步在進行動物試驗等評估。

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 CCMP92-RD-034 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. Berardesca E, Maibach H. Ethnic skin: overview of structure and function. *J Am Acad Dermatol* 2003, 48(6 Suppl): S139-42.
2. Herouy Y. Matrix metalloproteinases in skin pathology. *Int J Mol Med* 2001, 7(1): 3-12.
3. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002, 138(11): 1462-70.
4. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001, 26(7):573-7.
5. Biesalski HK, Obermueller-Jevic UC. UV light, beta-carotene and human skin--beneficial and potentially harmful effects. *Arch Biochem Biophys* 2001, 389(1): 1-6.
6. Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci* 2000, 23 Suppl 1: S22-6.
7. Kagan VE, Kisin ER, Kawai K, Serinkan BF, Osipov AN, Serbinova EA, Wolinsky I, Shvedova AA. Toward mechanism-based antioxidant interventions: lessons from natural antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 2002, 959: 188-98.
8. Fischer TW, Elsner P. The antioxidative potential of melatonin in the skin. *Curr Probl Dermatol* 2001, 29: 165-74.
9. Benedetto AV. The environment and skin aging. *Clin Dermatol* 1998, 16(1): 129-39.
10. Pugliese PT. The skin's antioxidant systems. *Dermatol Nurs* 1998, 10(6): 401-16.
11. Pugliese PT. The skin, free radicals, and oxidative stress. *Dermatol Nurs* 1995, 7(6): 361-9.
12. Emerit I. Free radicals and aging of the skin. *EXS* 1992, 62: 328-41.
13. Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002, 1(4): 705-20.

14. Griffiths CE. The role of retinoids in the prevention and repair of aged and photoaged skin. *Clin Exp Dermatol* 2001, 26(7): 613-8.
15. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995, 6(3-4): 205-28.
16. Hanson KM, Simon JD. Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95(18): 10576-8.
17. Kondo S, Nishioka K. Hypersensitivity of skin fibroblasts from patients with chronic actinic dermatitis to ultraviolet B (UVB), UVA and superoxide radical. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1991, 8(5): 212-7.
18. Ozawa T. Studies on the activation of molecular oxygen and the biological defence mechanism against active oxygen species. *J Pharmaceut Soc Jap* 1990, 110(9): 617-38.
19. Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 1998, 273(9): 5279-87.
20. Armeni T, Battino M, Stronati A, Pugnali A, Tomassini G, Rosi G, Biagini G, Principato G. Total antioxidant capacity and nuclear DNA damage in keratinocytes after exposure to H₂O₂. *Biol Chem* 2001, 382(12): 1697-705.
21. Tyrrell RM. Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem Soc Symp* 1995, 61: 47-53.
22. Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, Wlaschek M, Peters T, Blaudschun R, Ma W, Kuhr L, Schneider L, Scharffetter-Kochanek K. UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr Probl Dermatol* 2001, 29: 83-94.
23. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 2000, 35(3): 307-16.
24. Bernstein EF, Uitto J. The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol* 1996, 14(2): 143-51.
25. Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen

- catabolism. *Biopolymers* 2002, 66(1): 19-32.
26. Marder G, Greenwald RA. Potential applications of matrix metalloproteinase inhibitors in geriatric practice. *Isr Med Assoc J Imaj* 2003, 5(5): 361-4.
 27. Wan YS, Wang ZQ, Voorhees J, Fisher G. EGF receptor crosstalks with cytokine receptors leading to the activation of c-Jun kinase in response to UV irradiation in human keratinocytes. *Cell signal* 2001, 13(2): 139-44.
 28. Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol* 1999, 69(2): 154-7.
 29. Greul AK, Grundmann JU, Heinrich F, Pfitzner I, Bernhardt J, Ambach A, Biesalski HK, Gollnick H. Photoprotection of UV-irradiated human skin: an antioxidative combination of vitamins E and C, carotenoids, selenium and proanthocyanidins. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002, 15(5): 307-15.
 30. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996, 379(6563): 335-9.
 31. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997, 337(20): 1419-28.
 32. Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002, 1(4): 705-20.
 33. Ma W, Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol* 2001, 26(7): 592-9.
 34. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997, 6(5): 199-213.
 35. Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM, Welgus HG. Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Ann NY Acad Sci* 1999, 878: 12-24.
 36. Sturm RA, Box NF, Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* 1998, 20(9): 712-21.

37. Sato S, Yamamoto H. Development of pigment cells in the brain of ascidian tadpole larvae: insights into the origins of vertebrate pigment cells. *Pigment Cell Res* 2001, 14(6): 428-36.
38. Mimura T, Itoh S, Tsujikawa K, Nakajima H, Satake M, Kohama Y, Okabe M. Studies on biological activities of melanin from marine animals. V. Anti-inflammatory activity of low-molecular-weight melanoprotein from squid (Fr. SM II). *Chem Pharm Bull* 1987, 35(3): 1144-50.
39. Chakraborty DP, Roy S, Chakraborty AK. Vitiligo, psoralen, and melanogenesis: some observations and understanding. *Pigment Cell Res* 1996, 9(3): 107-16.
40. Sulaimon SS, Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol* 2003, 14(2): 57-65.
41. Halaban R. Pigmentation in melanomas: changes manifesting underlying oncogenic and metabolic activities. *Oncol Res* 2002, 13(1): 3-8.
42. Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal Biochem* 1999, 270(2): 207-19.
43. Regnier M, Duval C, Galey JB, Philippe M, Lagrange A, Tuloup R, Schmidt R. Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis. *Cell Mol Biol* 1999, 45(7): 969-80.
44. Iida K, Hase K, Shimomura K, Sudo S, Kadota S, Namba T. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Med* 1995, 61(5): 425-8.
45. Sano T, Kaya K. Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *J Nat Prod* 1996, 59(1): 90-2.
46. Senji T. Melanoxazol, new melanin biosynthesis inhibitor discovered by using the larval Haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Antibiotics* 1996, 49(6): 513-518.
47. Mireille G, Selim K. Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 1996, 42: 935-940.
48. Lee OS. et al. Oriental herbs in Cosmetics. *Cos & Toxitol* 112(2): 57-64, 1997.

49. Lee OS, Kim EJ. Skin lightening. *Cos & Toxitol* 1995, 110: 51-56.
50. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987, 165(1): 215-9.
51. Shirota S, Miyazaki K, Aiyami R, Ichioka M, Yokokura T. Tyrosinase inhibition from Crude Drugs. *Biol Pharm Bull* 1994, 17(2): 266-269.
52. Gourevitch D, Clark L, Chen P, Seitz A, Samulewicz SJ, Heber-Katz E. Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev Dyn* 2003, 226(2): 377-87.
53. van Acker FA, Hageman JA, Haenen GR, van Der Vijgh WJ, Bast A, Menge WM. Synthesis of novel 3,7-substituted-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)flavones with improved antioxidant activity. *J Med Chem* 2000, 43(20): 3752-60.

陸、圖表

Table 1 常用作保養化妝品之中草藥

編號	中文名	學名(科名)	科名
1	魚腥草	Heartleaf Houttuynia Herb	三白草科
2	丹皮	Moutant Radicis Cortex	毛茛科
3	黑牽牛	Pharbitidis Semen	石竹科
4	薏米	Coicis Semen	禾本科
5	玉竹	Rhizoma Polygonati Odorati	百合科
6	葳蕤	<i>Polygonatum officinale</i> All.	百合科
7	黃耆	Astragali Radix	豆科
8	甘草	Glycyrrhizae Radix	豆科
9	槐花	Sophorae Immaturus Flos	豆科
10	雞血藤	<i>Spatholobus suberectus</i> Dunn.	豆科
11	橘皮	Aurantii Peicarpium	芸香科
12	桃仁	Persicae Semen	胡桃科
13	白蘚皮	Dictamni Radicis Cortex	茄科
14	益母草	Lenouri Herba	唇形科
15	香薷	Elsholtziae Herba	唇形科
16	夏枯草	Prunellae Spica	唇形科
17	藿香	Agastaahe Herb	唇形科
18	鼠尾草	<i>Salvia chinensis</i> Benth.	唇形科
19	火麻仁	Cannabis Fructus	桑科
20	桑葉	Mori Folium	桑科
21	蛇麻草	<i>Humulus lupulus</i> L.	桑科
22	丁香	Caryophylli Flos	桃金娘科
23	細辛	Asiasari Radix	馬兜鈴科
24	商陸	Phytolaccae Radix	商陸科
25	紫草根	Lithospemi Radix	紫草科
26	栝樓根	Trichosanthis Radix	葫蘆科
27	白藜	Ampelopsis Radix	葡萄科
28	秦艽	Centianen Macrophyllae Radix	龍膽科
29	砂仁	Amomi Semen	薑科
30	山楂	Cratagei Fuctus	薔薇科

Table 2 製備之三十種中草藥及其產率

編號	藥材名稱	產率(%)
1	魚腥草	9.2
2	丹皮	4.7
3	黑牽牛	6.4
4	薏米	3.8
5	槐花	6.5
6	雞血藤	6.2
7	橘皮	20.1
8	香薷	2.5
9	夏枯草	2.3
10	丁香	30.3
11	鼠尾草	2.2
12	商陸	3.5
13	紫草根	3.7
14	白藜	4.7
15	秦艽	17.7
16	砂仁	13.2
17	山楂	33.5
18	桑葉	5.9
19	火麻仁	10.4
20	甘草	24.0
21	玉竹	2.5
22	黃耆	17.1
23	葶藶	4.5
24	白鮮皮	2.4
25	益母草	4.5
26	桃仁	10.1
27	細辛	5.3
28	蛇麻草	5.8
29	藿香	3.8
30	栝樓根	2.1

Table 3 三十種中藥材對酪氨酸酶之抑制作用

編號	藥材名稱	抑制率(%)
1	魚腥草	21.9
2	丹皮	37.1
3	黑牽牛	4.8
4	薏米	-
5	槐花	45.7
6	雞血藤	86.1
7	橘皮	16.2
8	香薷	76.1
9	夏枯草	42.2
10	丁香	2.2
11	鼠尾草	-
12	商陸	27.2
13	紫草根	-
14	白蘇	23.2
15	秦艽	-
16	砂仁	-
17	山楂	-
18	桑葉	70.7
19	火麻仁	28.6
20	甘草	73.8
21	玉竹	55.6
22	黃耆	10.5
23	葳蕤	-
24	白鮮皮	-
25	益母草	-
26	桃仁	-
27	細辛	-
28	蛇麻草	4.1
29	藿香	-
30	栝樓根	-

“-“ no effect

Table 4 三十種中藥材對氫氧自由基之清除作用

編號	藥材名稱	清除作用(%)
1	魚腥草	50.4
2	丹皮	68.7
3	黑牽牛	53.2
4	薏米	36.5
5	槐花	57.7
6	雞血藤	65.0
7	橘皮	61.6
8	香薷	25.0
9	夏枯草	62.1
10	丁香	59.0
11	鼠尾草	63.0
12	商陸	73.5
13	紫草根	26.4
14	白蘇	68.2
15	秦艽	43.3
16	砂仁	51.5
17	山楂	43.1
18	桑葉	64.0
19	火麻仁	31.8
20	甘草	28.9
21	玉竹	67.8
22	黃耆	34.5
23	葳蕤	68.0
24	白鮮皮	63.8
25	益母草	46.1
26	桃仁	29.4
27	細辛	52.1
28	蛇麻草	56.2
29	藿香	62.1
30	栝樓根	72.5

Table 5 ^1H NMR (500MHz) and ^{13}C NMR (125MHz) data of 3', 4', 7- Trihydroxyflavone in CD_3OD NMR Spectral Data of **SSCP-1** (δ values, in CD_3OD , J in Hz)

position	δ_{C}	δ_{H} (mult, J in Hz)
2	164.0	
3	103.8	6.62(s)
4	178.9	
5	126.7	7.95(dd, $J=8.7, 0.6$ Hz)
6	115.1	6.91(dd, $J=8.7, 2.3$ Hz)
7	164.6	
8	102.9	6.93(dd, $J=2.3, 0.6$ Hz)
9	158.3	
10	115.6	
1'	122.6	
2'	112.7	7.40(d, $J=2.3$ Hz)
3'	149.5	
4'	145.7	
5'	115.4	6.89(d, $J=8.9$ Hz)
6'	118.8	7.40(dd, $J=8.9, 2.3$ Hz)

Table 6 The inhibitory effects of tyrosinase of 3', 4', 7-Trihydroxyflavone

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%)	SD	IC_{50} (μM) [$\mu\text{g/mL}$]
Arbutin (positive control)				
$f(x)=0.74x - 1.89$ $r^2=0.992$				
	100.0	70.97	1.7600	264.5 [71.68]
	64.0	44.96	0.7752	
	50.0	38.74	1.1096	
	32.0	20.16	0.7752	
	16.0	7.36	1.1627	
	2.0	1.55	2.3256	
3',4',7-Trihydroxyflavone				
$f(x)=0.75x + 9.48$ $r^2=0.950$				
	80.0	65.89	2.0509	200.1 [54.02]
	40.0	46.89	0.3875	
	20.0	27.52	0.3875	
	10.0	16.67	3.4883	
	5.0	7.36	1.1628	

Table 7 The inhibitory effects of hydroxyl radical of compound 3', 4', 7-Trihydroxyflavone

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%)	SD	IC50 (μM) [$\mu\text{g/mL}$]
3',4',7-Trihydroxyflavone				
$f(x)=24.94x+19.15$ $r^2=0.953$	2.0	65.98	0.5195	4.58 [1.237]
	1.0	47.80	2.6355	
	0.5	36.75	1.8384	
	0.25	27.00	2.8947	
	0.125	20.09	1.8159	
	0.0625	15.45	2.5166	

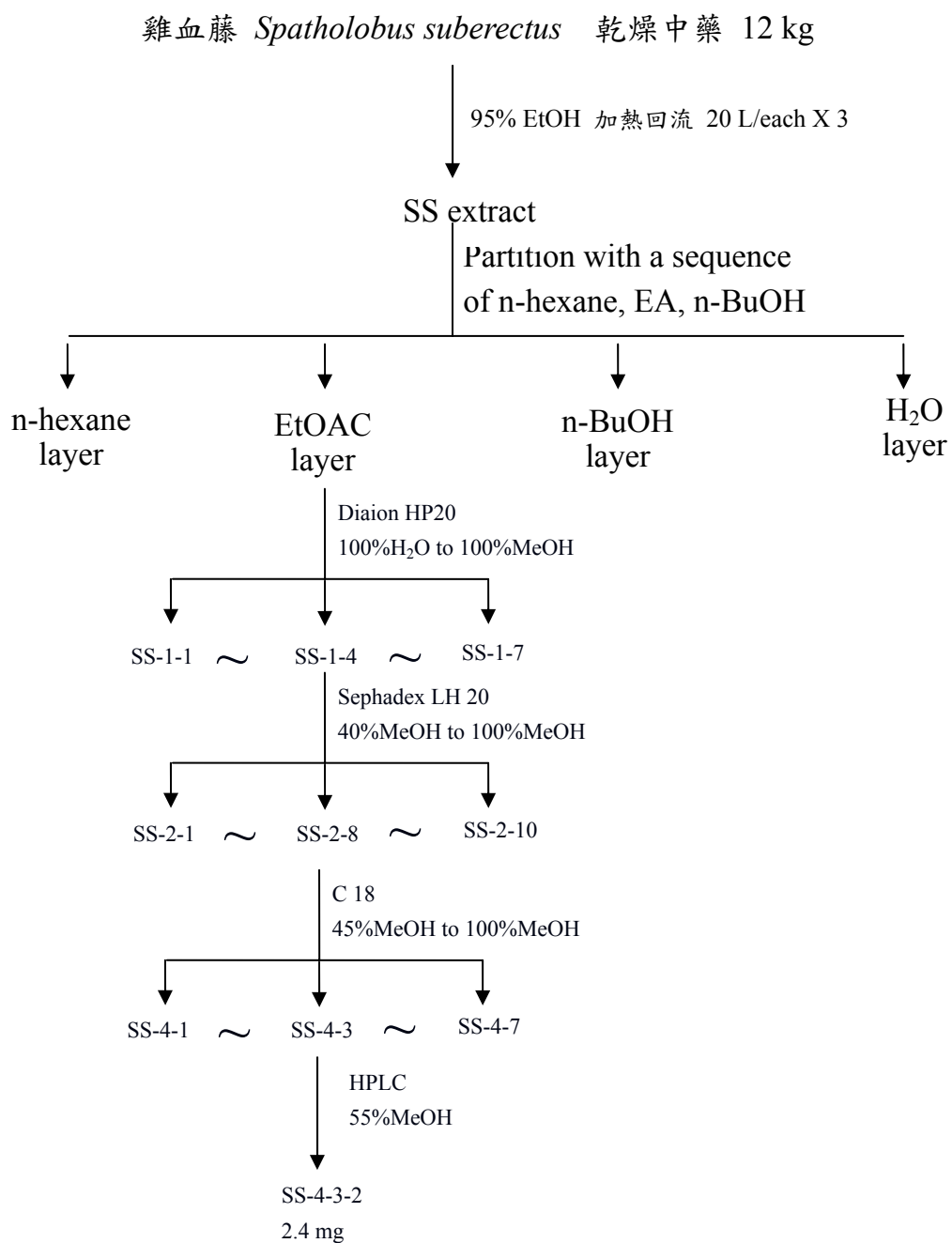


Chart 1 The isolation of *Spatholobus suberectus*

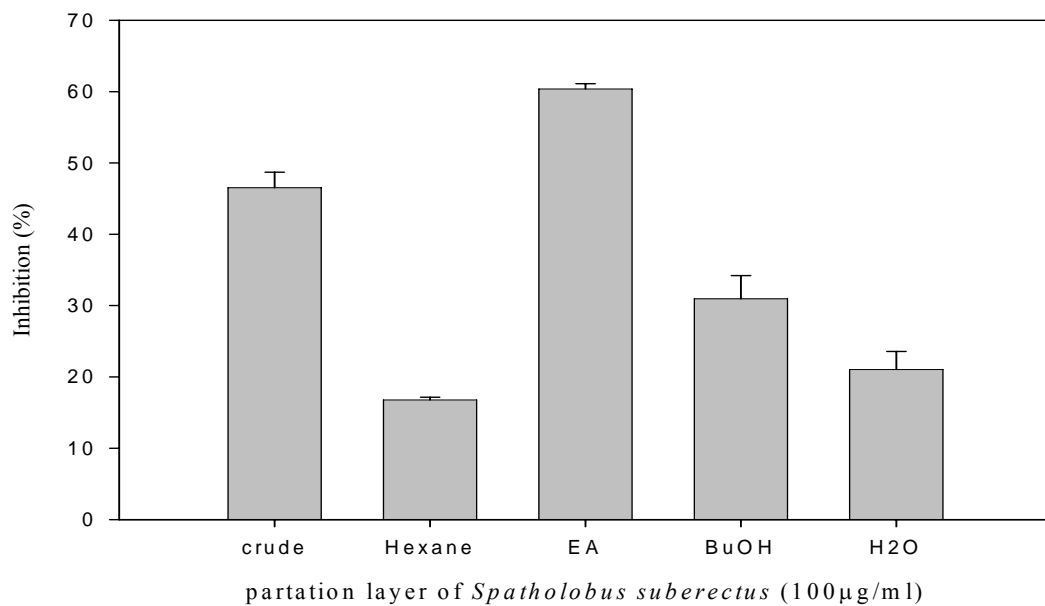


Fig. 1 Tyrosinase inhibition assay

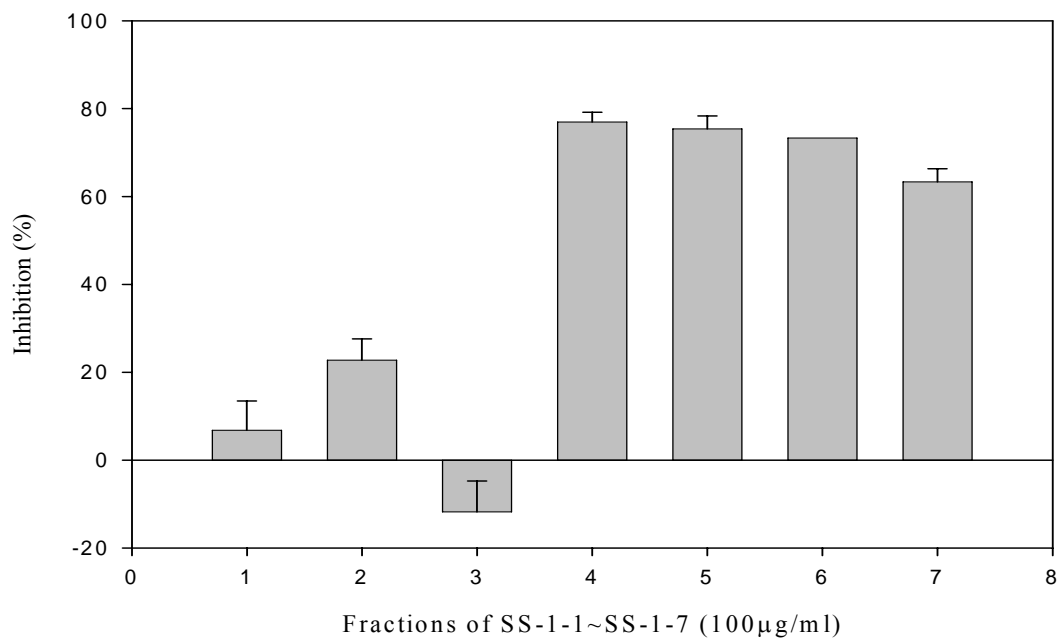


Fig. 2 Tyrosinase inhibition assay

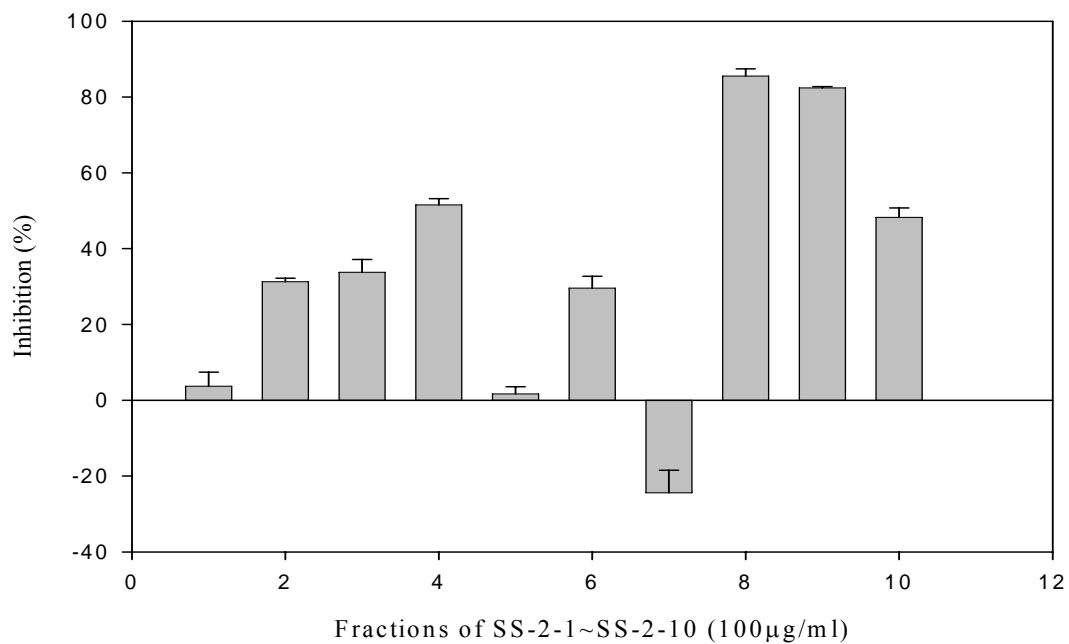


Fig. 3 Tyrosinase inhibition assay

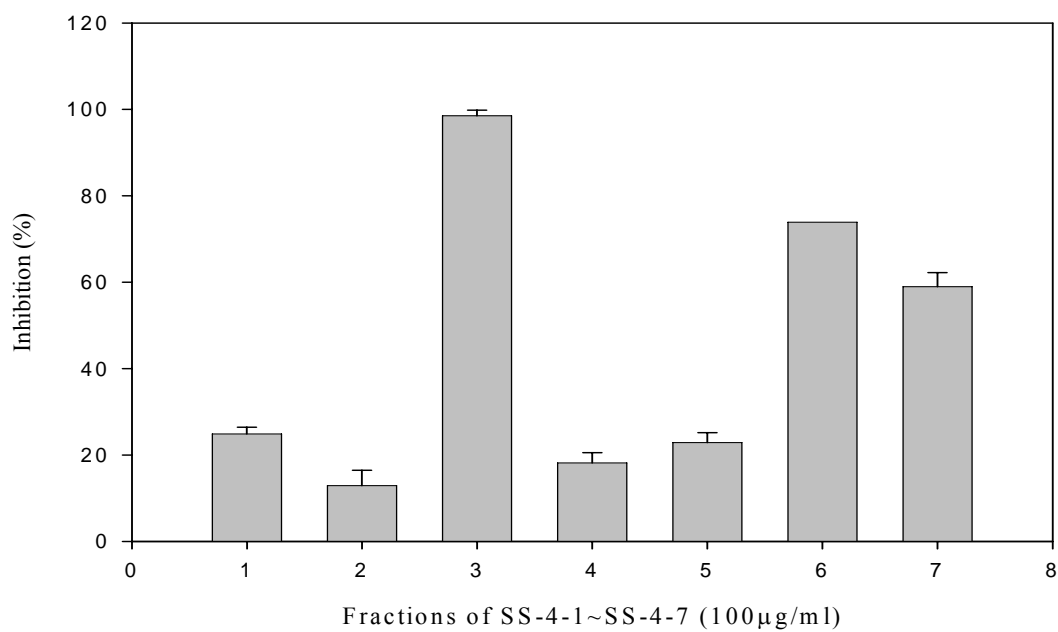


Fig. 4 Tyrosinase inhibition assay

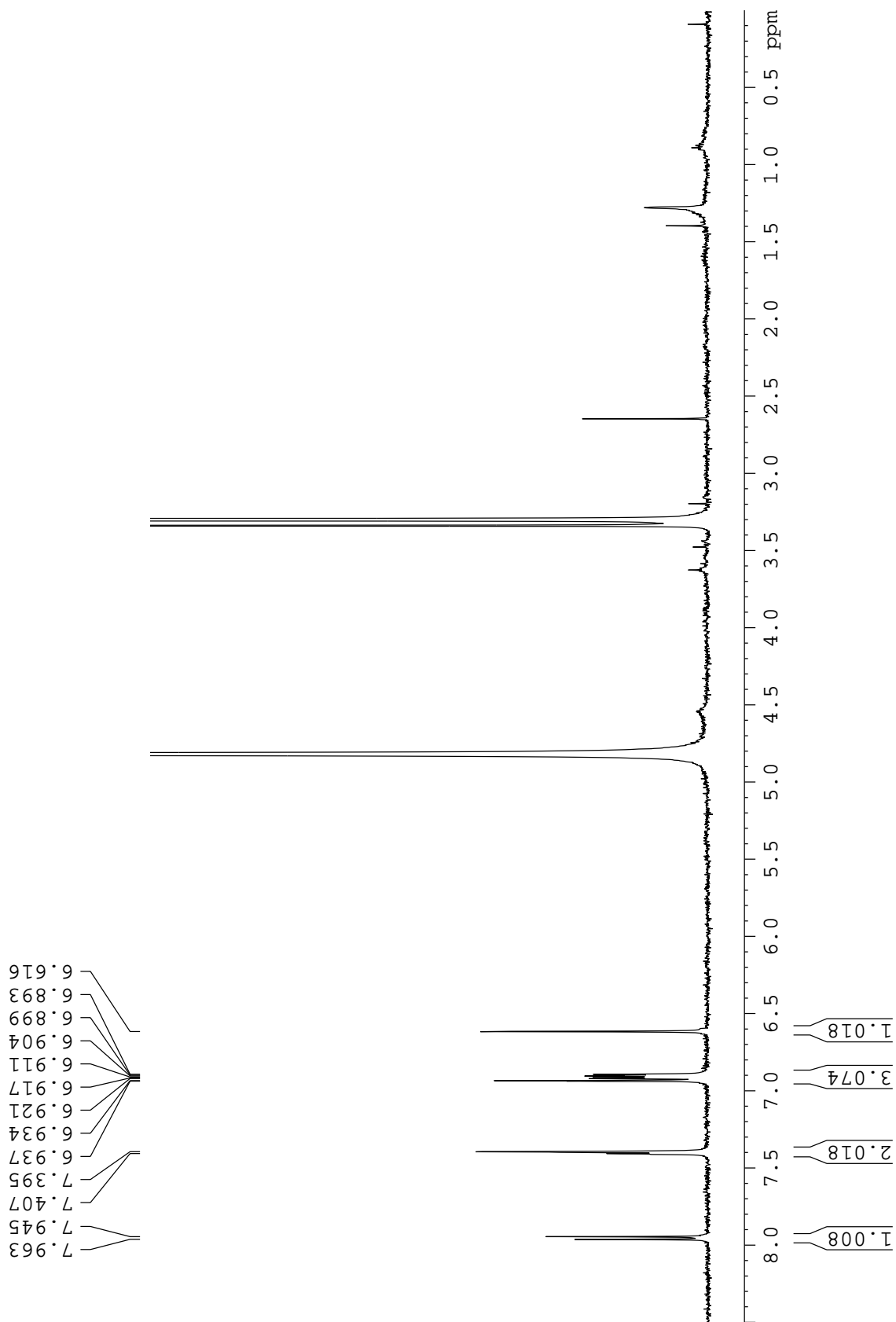


Fig. 5 ^1H NMR(500MHz) spectrum of 3', 4', 7-Trihydroxyflavone (SS-4-3-2) in CD_3OD

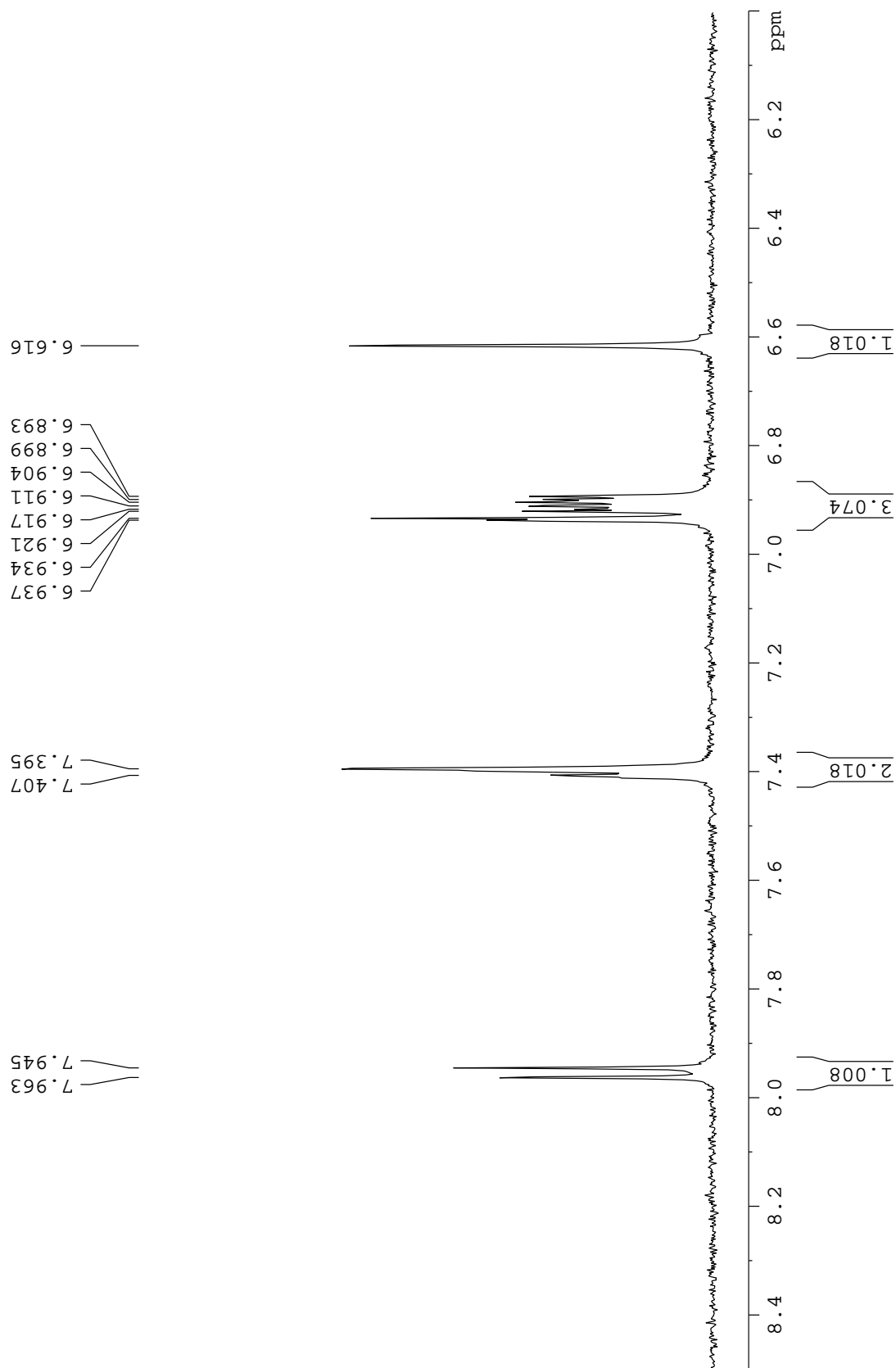


Fig. 6 ^1H NMR(500MHz) spectrum of 3', 4', 7-Trihydroxyflavone (SS-4-3-2) in CD_3OD

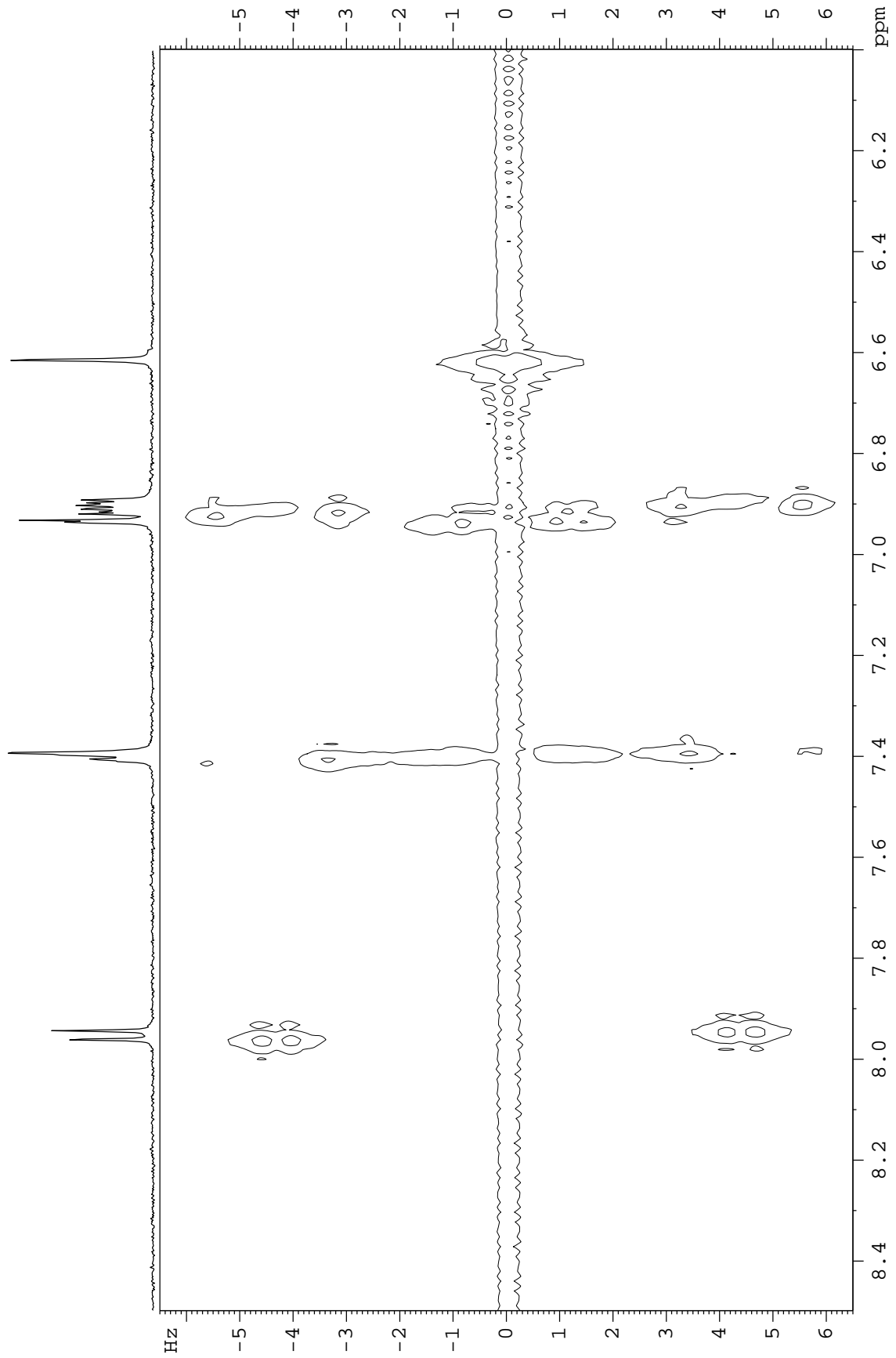


Fig. 7 J-resolution spectrum of 3', 4', 7-Trihydroxyflavone (SS-4-3-2) in CD₃OD

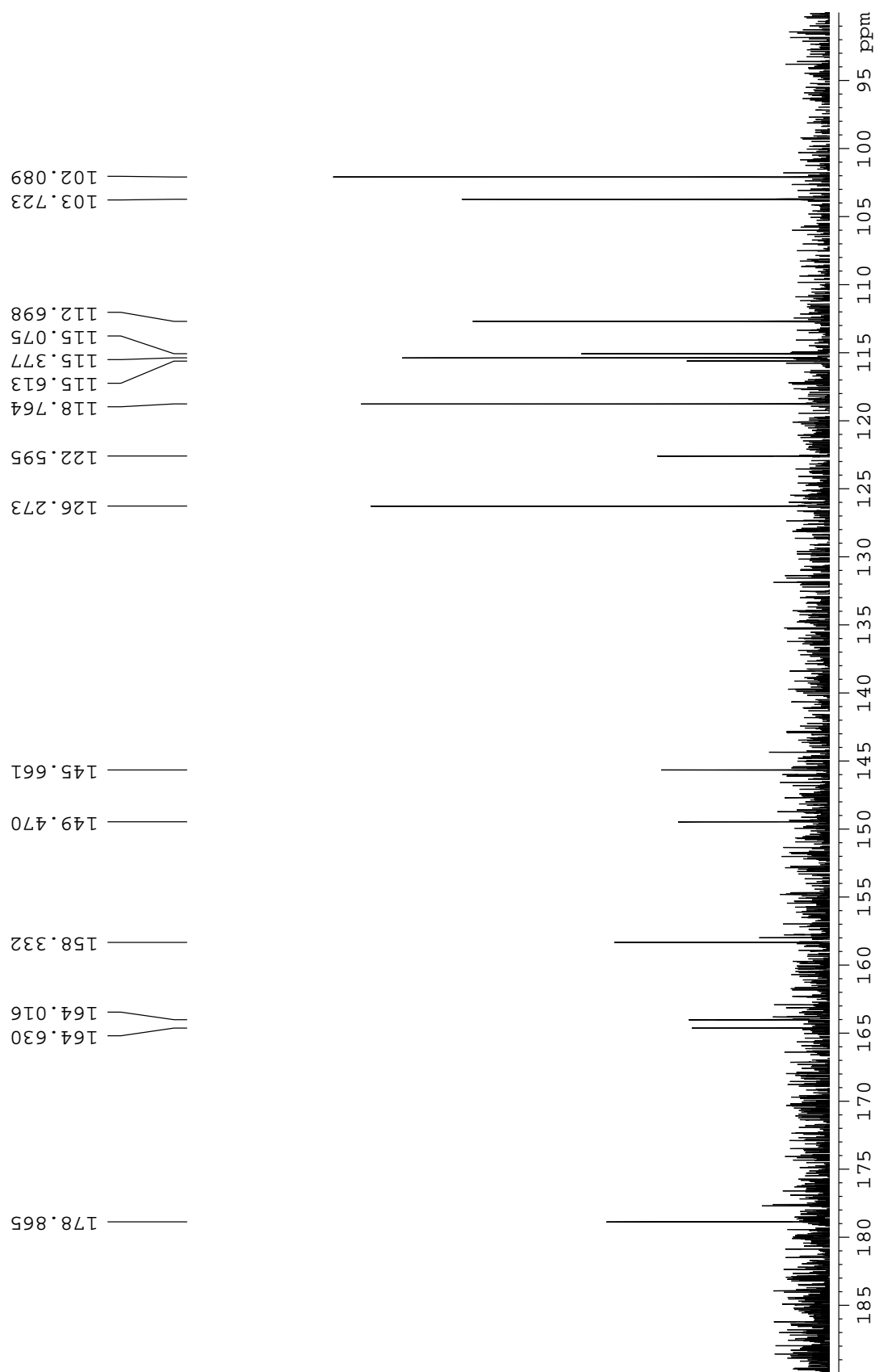


Fig. 8 ^{13}C NMR(125MHz) spectrum of 3', 4', 7-Trihydroxyflavone (SS-4-3-2) in CD_3OD

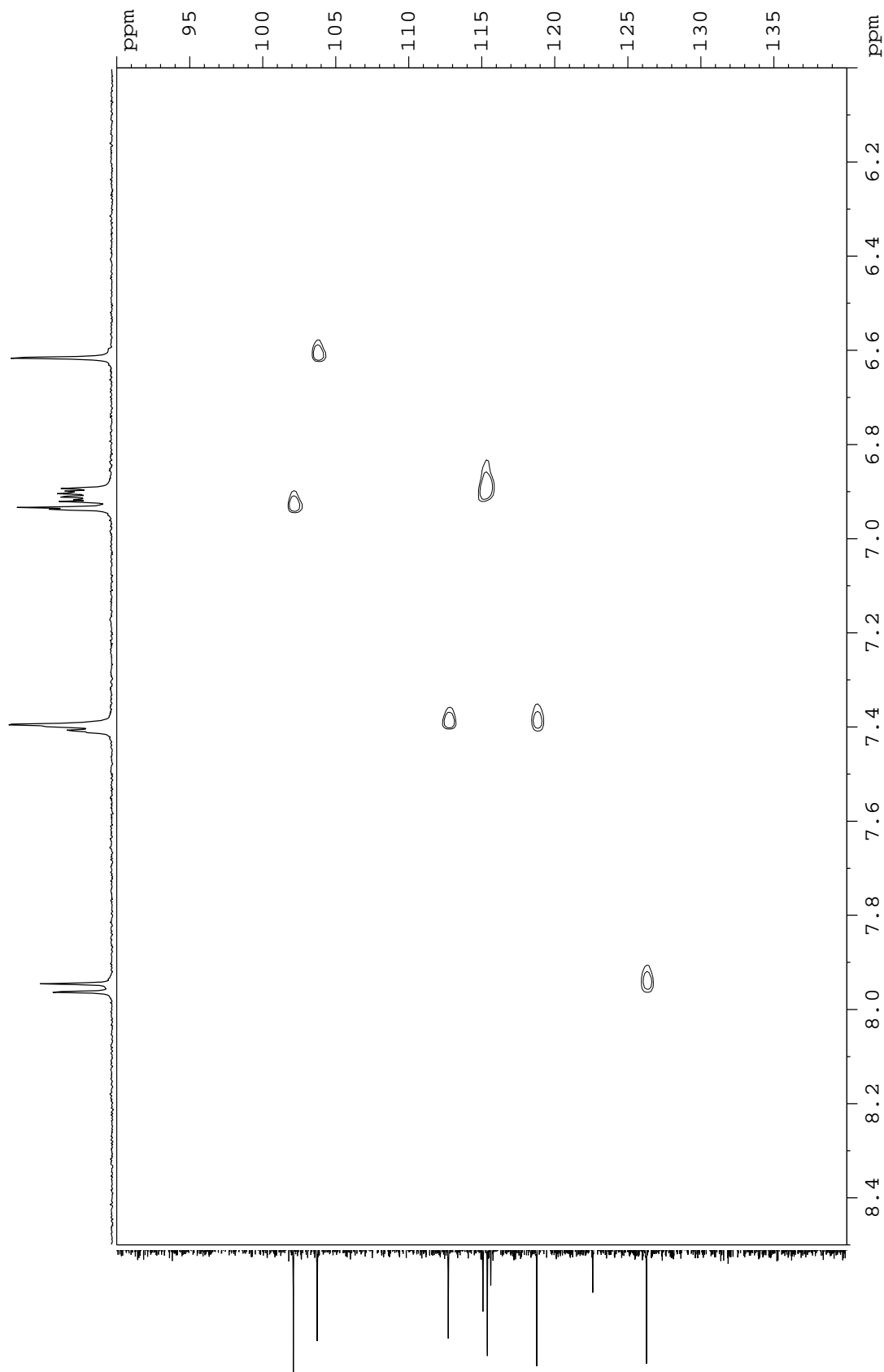


Fig. 9 HMQC spectrum of 3', 4', 7-Trihydroxyflavone (SS-4-3-2) in CD₃OD

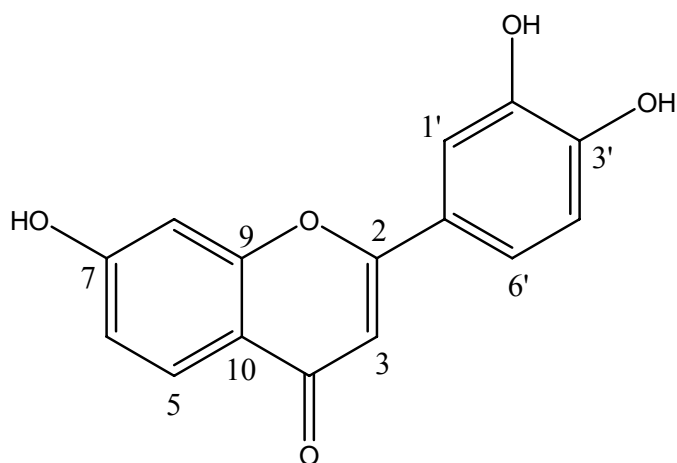
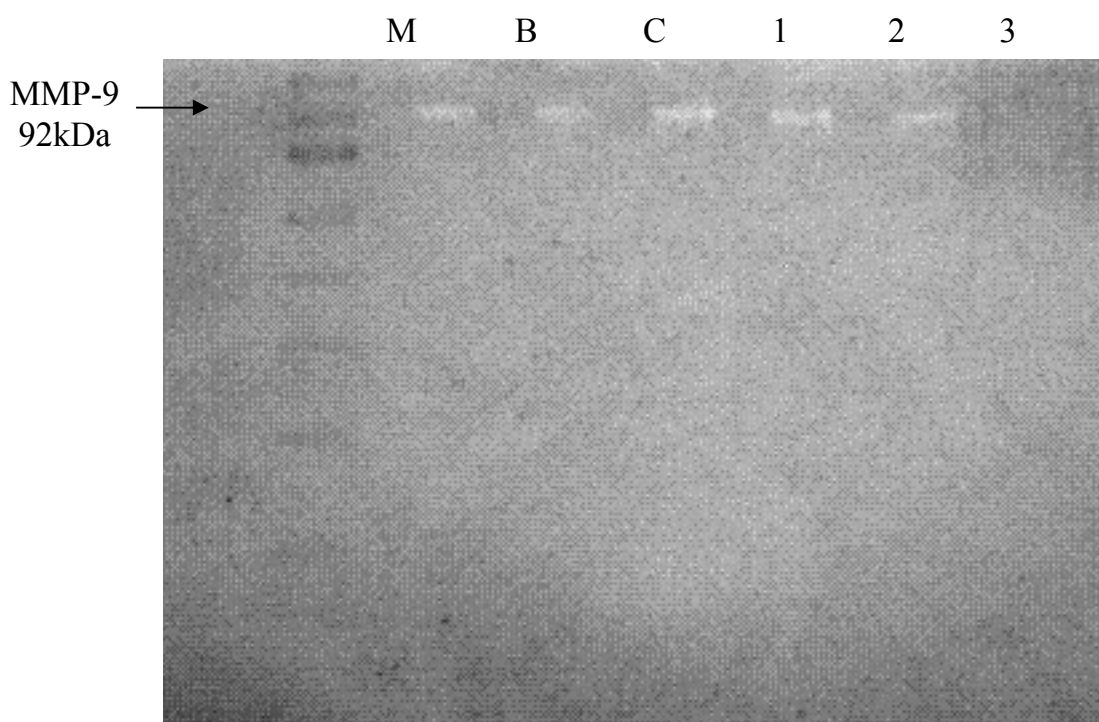


Fig. 10 The structure of 3',4',7-Trihydroxyflavone



- M : marker
- B : 空白組
- C : control (未經 37°C 反應 12 hr 之空白組)
- 1 : 3',4',7-Trihydroxyflavone 100 μ g/mL
- 2 : 3',4',7-Trihydroxyflavone 75 μ g/mL
- 3 : 3',4',7-Trihydroxyflavone 50 μ g/mL

Fig. 11 The mmp-9 inhibitory activity of 3',4',7-Trihydroxyflavone

