



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I522127 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：101140000

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 29 日

(51)Int. Cl. : *A61K8/97* (2006.01) *A61K36/85* (2006.01)
 A61P17/00 (2006.01) *A61P17/18* (2006.01)
 A61Q19/02 (2006.01) *A61Q19/08* (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

昶友實業股份有限公司(中華民國) BIOWORLD BEAUTY DEVELOPMENT CO., LTD. (TW)

新北市中和區板南路 653 號 11 樓

(72)發明人：柯宏慧 KO, HORNG HUEY (TW)；顏峰霖 YEN, FENG LIN (TW)；李江文 LEE, CHIANG WEN (TW)；王木琴 WANG, MOO CHIN (TW)；湯雲台 TANG, YUN TAI (TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

CN 101249177A

Shukla et al, "In-Vitro Antioxidant Activity Of Aerial Parts Of *Lippia Nodiflora* Rich", Pharmacologyonline, 2009, 2: 450-459.

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：21 共 52 頁

(54)名稱

石菟萃取物用於皮膚美白

PHYLA NODIFLORA EXTRACT FOR SKIN WHITENING

(57)摘要

本技術係揭示石菟(*Phyla nodiflora*)萃取物所製備之組合物，可呈現皮膚美白的功能。This invention is announcing a composition of *Phyla nodiflora* extract, which can improve the skin whitening effect.

公告本

103年11月3日替換頁

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：10/140000

※申請日：10/10/29

※IPC分類：

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/85 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

石莧萃取物用於皮膚美白 / *Phyla Nodiflora* Extract For Skin Whitening

二、中文發明摘要：

本技術係揭示石莧 (*Phyla nodiflora*) 萃取物所製備之組合物，可呈現皮膚美白的功能。

三、英文發明摘要：

This invention is announcing a composition of *Phyla nodiflora* extract, which can improve the skin whitening effect.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

公告本

103年11月3日替換頁

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：10/140000

※申請日：10/10/29

※IPC分類：

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/85 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

石莧萃取物用於皮膚美白 / *Phyla Nodiflora* Extract For Skin Whitening

二、中文發明摘要：

本技術係揭示石莧 (*Phyla nodiflora*) 萃取物所製備之組合物，可呈現皮膚美白的功能。

三、英文發明摘要：

This invention is announcing a composition of *Phyla nodiflora* extract, which can improve the skin whitening effect.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本技術係關於石莧萃取物所形成之組合物，可添加在化粧品、保養品或外用醫藥品呈現皮膚美白功用，可運用於製藥業及化學原料，具備產業用途。

【先前技術】

近年來天然物萃取物的應用越來越受到個個產業的重視，主因天然物的安全性高，故而常被化粧品產業開發作為原料之用，並添加在美容保養品做為皮膚膚質之改善。

石莧之學名為 *Phyla nodiflora* (L.) Greene，同義名為 *Lippia nodiflora* (L.) Michx 或 *Verbena nodiflora* (L.)，該植物隸屬於馬鞭草科鴨舌癩屬，民間將全草用於月經不調、酒後受風感、婦女白帶、耳下發炎生瘤、咽喉紅腫、帶狀疱疹、口角疔、牙疳、痢疾等疾病之治療。

石莧植物具有多種的生物活性；包括抗粥狀動脈硬化、止痛、抗大腸桿菌、抑制微生物的生長、保肝功效及降低脂質過氧化的現象之外，Shukla 等人於 2009 年之 *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 發現地上部甲醇和水的粗抽物皆具有利尿功效。Dodoala 等學者於 2010 年之 *Indian J. Nat. Prod. Sci.* 指出石莧全草的乙醇粗抽物具有防止結石的能力；而 Turaskar 等人在 2011 年之 *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 指出乙醇及氯仿的粗抽物對中樞神經系統有抑制作用，可運用在抗痙攣及抗憂慮的治療。

從石莧分離的化學成分陸續發表在文獻，包括有黃酮類 (flavonoids)、單萜烯類 (monoterpenes)、倍半萜烯類

(sesquiterpenes)、醌醇及其醣類 (quinols and quinol glucosides)、三萜烯類化合物 (triterpenoid)、固醇類 (steroids)、揮發油 (volatiles)、生物鹼 (alkaloids)、鞣質 (tannins)、皂素 (saponins) 及醣類 (sugars) 等。

發明人鑑於陳佩君於 2009 年碩士論文指出石莧地上部之甲醇萃取物以及已知化合物如澤蘭葉黃素 (eupafolin) 雖擁有抑制細胞外蘑菇酪胺酸酶的活性，惟該習知技術尚有所不完備處，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案「石莧萃取物用於皮膚美白」，能夠克服先前技術之不足，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

本發明為首次發現石莧甲醇萃取物對細胞擁有安全性且可透過抑制調節小眼畸形轉錄因子 (microphthalmia transcription factor, MITF) 蛋白表現達到抑制酪胺酸酶之合成，並進一步抑制黑色素生成呈現美白效用。

根據上述構想，本技術之一面向係提供一種包含石莧 (*Phyla nodiflora* (L.) Greene) 植物萃取物之美粧組合物。

根據上述構想，該美粧組合物係提供可用於治療色素沈澱過度所造成之不適或疾病，如雀斑 (freckle)、黃褐斑 (chloasma)、妊娠紋 (striae of pregnancy)、老人斑 (senile plaque) 以及黑色素瘤 (melanoma)。以及減少前膠原蛋白的合成，彈力及膠原蛋白的含量等抗老化功效。

根據上述構想，本技術之另一面向係提供一種包含石莧 (*Phyla nodiflora* (L.) Greene) 植物萃取物之多重組合投與方式 (multi-administered method) 美粧組合物。

根據上述構想，該美粧組合物可依照需求採取多重組合投與方式處理色素沈澱過度所造成之不適或疾病，以及減少前膠原蛋白的合成，彈力及膠原蛋白的含量等抗老化狀態。於實施例具體而言，該美粧組合物可依照一般化粧品或醫藥品方式外用或投與，單獨呈現其功效。亦可選用額外之化粧品或醫藥品，與該美粧組合物依照所需改善部位之狀態而分別或多個共同使用。

皮膚為具多種細胞型態和結構的複雜器官，其覆蓋在人體表面，作為保護屏障，隔絕內部器官和外環境刺激。近年來受到人造氟氯碳化物影響，致使臭氧層厚度變稀薄，導致紫外線輻射量增加。適度的照射陽光可以幫助人體內合成足夠的維生素D，維持健康骨骼生長，也能促進適量的黑色素生成當作對抗紫外線傷害的防護機制。但是過度的曝曬反而會導致肌膚中的基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表現量增加，細胞外基質蛋白的降解，減少前膠原蛋白的合成，彈力及膠原蛋白的含量降低而產生光老化 (photoaging) 的現象，如皮膚變粗糙、乾燥及產生皺紋。甚至促進黑色素細胞分化產生更多的黑色素至皮膚表層，造成不正常的色素沉著現象，如雀斑、曬斑及黃褐斑 (chloasma) 等，或老人斑 (senile plaque)、黑色素瘤 (melanoma) 影響皮膚的美觀，增加罹患皮膚癌的風險。

哺乳類生成的黑色素由黑褐色的真黑色素 (eumelanin) 及紅黃色的類黑色素 (pheomelanin) 組成，依照混合的比例不同，決定哺乳類皮膚及頭髮的顏色變化。在黑色素合成途徑，酪胺酸酶 (tyrosinase) 扮演重要角色，為速率決定步驟。此為一結構中含銅的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase，

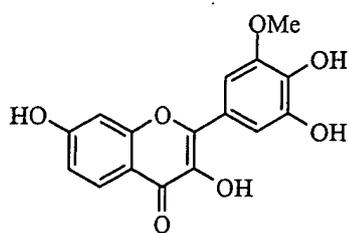
PPO)，廣泛存在於微生物、動物及植物間，是控制食品產生褐變及皮膚產生黑色素的關鍵酵素。酪胺酸酶催化酪胺酸 (L-tyrosine) 進行羥基化 (hydroxylation) 反應形成多巴 (L-dopa)，多巴再經由酪胺酸酶催化形成多巴醌 (dopaquinone)，此時分成兩條途徑，一是在穀胱甘肽 (glutathione) 或半胱胺酸 (cysteine) 存在的環境之下，反應形成類黑色素。二是多巴醌經由環化反應 (cyclization) 及氧化反應 (oxidation) 產生多巴色素 (dopachrome)，多巴色素再經由酪胺酸酶、多巴色素互變異構酶 (dopachrome tautomerase, TRP-2) 及5,6-二羥基吲哚羧酸 (5,6-dihydroxy indole carboxylic acid, DHICA) 氧化酶 (TRP-1) 催化生成真黑色素，和類黑色素依照混合比例不同決定皮膚和毛髮的顏色。此外，紫外線照射也會促進活性氧分子如一氧化氮 (nitric oxide) 的生成，此分子在紫外線B (ultraviolet radiation B, UVB) 誘導的紅斑現象中扮演重要角色。一氧化氮也作為黑色素生成調控因子藉由調控酪胺酸酶基因的表現量及磷酸化控管黑色素細胞成長及存活的小眼畸形轉錄因子 (MITF) 促進黑色素生成。因此，若能有效抑制一氧化氮的生成或有效的調控小眼畸形轉錄因子或酪胺酸酶及其相關蛋白之表現，將可有效的改善黑色素過渡增生所衍生之皮膚相關疾病。

秤取石莧地上部，如第一圖萃取流程圖所示，先以二氯甲烷 (dichloromethane) 浸泡，再以甲醇浸泡，分別將粗萃液經減壓濃縮獲得二氯甲烷粗抽物以及甲醇粗抽物。

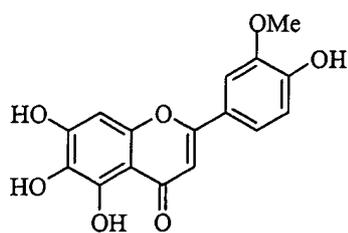
二氯甲烷粗抽物再經由二氧化矽 (SiO_2) 管柱層析法，以正己烷及丙酮進行梯度沖提，總共分成五個劃分層。依照各劃分層之性質利用正相、逆相薄層層析，管柱層析、中壓液

相層析等方式進行純化分離，獲得 3,7,4',5'-四羥基-3'-甲氧基黃酮 (3,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone) 稱為化合物 1。

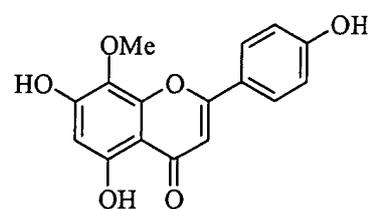
甲醇粗抽物經由二氧化矽管柱層析法，以正己烷、乙酸乙酯及甲醇進行梯度沖提，總共分成八個劃分層。依照各劃分層之性質利用正相、逆相薄層層析，管柱層析、中壓液相層析及分子篩等方式進行純化分離，分別獲得過江藤素 (nodifloretin) 稱為化合物 2、4'-羥基漢黃芩素 (4'-hydroxywogonin) 稱為化合物 3、大翅薊酚 (onopordin) 稱為化合物 4、去甲中國薊醇 (cirsiol) 稱為化合物 5、5,7,8,4'-四羥基-3'-甲氧基黃酮 (5,7,8,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone) 稱為化合物 6 及澤蘭葉黃素 (eupafolin) 稱為化合物 7。



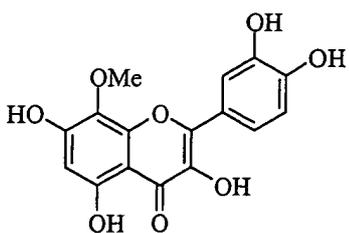
化合物 1



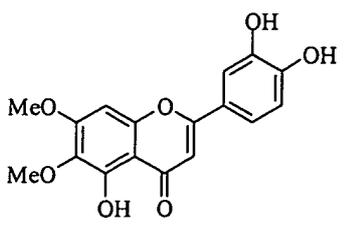
化合物 2



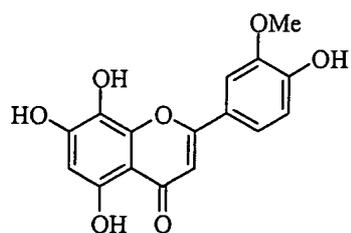
化合物 3



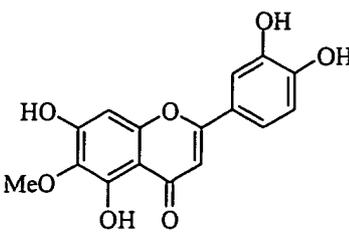
化合物 4



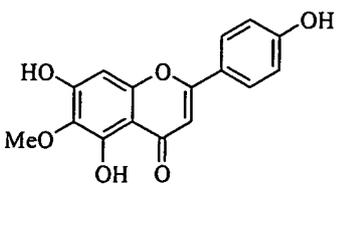
化合物 5



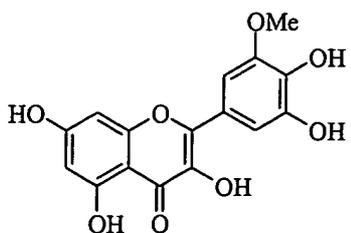
化合物 6



化合物 7



化合物 8



化合物 9

將包括高車前素 (hispidulin) 稱為化合物 8 及 3'-甲基楊梅黃酮 (larycitrin) 稱為化合物 9 等化合物，一併進行活性試驗。該等黃酮化合物，均係從石莧純化分離之習知化合物。

石莧粗抽物進行 2,2-聯苯基-1-苦基肼基 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除試驗，50 μ l 的待測物和 150 μ l 的 DPPH 自由基溶液 (0.1 mM) 混合後，在反應 30 分鐘和 60 分鐘後，於 517 nm 下測得吸光值並計算清除率， $n=3$ 。待測物對 DPPH 自由基的清除百分比為清除率 (%)，如表一所示，二氯甲烷粗抽物和甲醇粗抽物皆隨著時間越長及濃度越高，清除自由基的效果越好，具有劑量正相關 (dose-dependent) 的現象。兩層粗抽物相比之下，甲醇粗抽物清除 DPPH 的效果比二氯甲烷粗抽物為佳。清除率達 50% 的劑量 (SD_{50}) 於 30 分鐘前者為 $75.7 \pm 2.3 \mu\text{g/ml}$ 而 60 分鐘為 $67.8 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ ，相對之下後者為 381.9 ± 17.3 與 $235.1 \pm 12.7 \mu\text{g/ml}$ 。

表一、粗抽物之 DPPH 自由基清除試驗

粗抽物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	清除率(%)	
		30 分鐘	60 分鐘
二氯甲烷 粗抽物	100	30.0 ± 1.2	38.6 ± 0.9
	200	38.6 ± 1.3	48.6 ± 2.2
	500	59.1 ± 0.6	68.9 ± 0.9
	800	75.1 ± 1.4	82.9 ± 1.5
	1000	83.1 ± 0.4	87.9 ± 0.9
甲醇 粗抽物	10	10.8 ± 0.7	10.1 ± 1.0
	50	37.0 ± 1.1	40.7 ± 1.1
	80	54.6 ± 1.0	60.8 ± 1.3
	100	60.8 ± 0.7	68.0 ± 0.5
	200	92.2 ± 0.7	91.5 ± 0.9

Wang 等學者在 1998 年之 *J. Agric. Food Chem.*, 指出有些化合物雖然不具有 DPPH 清除能力，但對於 2,2'-聯氮雙(3-乙基苯並噻唑啉-6-磺酸)銨鹽 (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) 陽離子自由基試驗上卻展現清除效果。因此粗抽物亦進行 ABTS 自由基清除試驗，秤取 30 μl 的待測物和 170 μl 的 ABTS 陽離子自由基溶液混合後，在反應 7 分鐘和 20 分鐘後，於 734 nm 下測得吸光值並計算清除率， $n=3$ 。該濃度下待測物對 ABTS 陽離子自由基的清除百分比為清除率 (%)，如表二所示，甲醇粗抽物具有良好的 ABTS⁺ 清除效果，表示粗抽物具有可提供氫的能力，以終止自由基惡性的連鎖反應，減低對細胞組織的傷害，降低細胞死亡的現象。

表二、粗抽物之 ABTS 陽離子自由基清除試驗

粗抽物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	清除率(%)	
		7 分鐘	20 分鐘
二氯甲烷 粗抽物	100	17.8 \pm 1.0	19.8 \pm 2.2
	200	28.6 \pm 0.4	33.5 \pm 0.8
	300	36.1 \pm 0.8	42.1 \pm 1.2
	400	43.9 \pm 0.5	50.6 \pm 0.9
	500	53.1 \pm 2.2	61.4 \pm 2.9
甲醇 粗抽物	20	16.6 \pm 1.0	17.9 \pm 0.7
	50	34.1 \pm 1.0	36.5 \pm 0.7
	100	63.0 \pm 0.2	67.8 \pm 1.2
	150	82.4 \pm 1.7	88.4 \pm 1.0
	200	95.7 \pm 0.8	99.8 \pm 0.2
	300	99.7 \pm 0.3	99.7 \pm 0.3

兩層粗抽物相比之下，甲醇粗抽物清除 ABTS⁺ 的效果比二氯甲烷粗抽物為佳。清除率達 50% 的劑量 (SD₅₀) 於 7 分鐘前者為 81.9 ± 1.1 μg/ml 而 20 分鐘為 75.2 ± 0.8 μg/ml，相對之下後者為 464.0 ± 19.4 與 384.9 ± 15.7 μg/ml。

甲醇粗抽物具有較好的 ABTS⁺ 清除能力，也代表甲醇粗抽物為良好的電子供應者，能夠中止自由基所產生的連鎖反應，降低自由基的生成量來保護人體細胞、DNA、脂質或蛋白質。此外，兩層粗抽物皆有隨時間越長及濃度越高，清除自由基的效果越好的趨勢，顯示出劑量正相關(dose-dependent) 及時間正相關(time-dependent)。

表三、粗抽物之酪胺酸酶抑制試驗

粗抽物	濃度 (μg/ml)	抑制率(%)	
		30 分鐘	60 分鐘
二氯甲烷 粗抽物	150	10.3 ± 2.5	4.6 ± 2.2
	200	25.6 ± 0.9	19.4 ± 1.9
	300	59.4 ± 1.0	52.1 ± 1.2
	400	85.2 ± 1.1	74.6 ± 0.1
	500	96.2 ± 5.6	89.9 ± 3.9
甲醇 粗抽物	50	3.0 ± 4.0	1.6 ± 2.9
	100	6.9 ± 3.5	3.3 ± 3.2
	150	16.6 ± 3.7	11.2 ± 2.8
	200	23.1 ± 2.9	16.5 ± 2.1
	300	49.5 ± 3.6	39.7 ± 3.6
	400	81.6 ± 0.3	72.0 ± 0.2
	500	96.7 ± 2.5	93.3 ± 1.5
熊果素	50	25.8 ± 1.7	13.9 ± 1.2
	100	39.2 ± 0.7	25.3 ± 0.7
	150	57.5 ± 1.7	38.5 ± 0.8
	200	70.2 ± 0.6	48.1 ± 0.9
	300	94.2 ± 2.1	74.0 ± 5.0
	400	99.4 ± 0.3	95.5 ± 0.7
	500	100.2 ± 0.5	100.1 ± 0.3

酪胺酸酶為含銅多酚氧化酶，對黑色素細胞具有專一性，在黑色素生合成中多受酪胺酸酶調控，為速率決定步驟。主要經由(1) 單酚酶活性 (monophenolase activity)：催化酪胺酸轉變成多巴；(2) 雙酚酶活性 (diphenolase activity)：催化多巴形成多巴醌，接續一連串化學反應形成黑色素。降低酪胺酸酶的活性可有效地減少黑色素的生成，預防色素沉著的現象。將 80 μl 的酪胺酸 (2 mM) 和 100 μl 的粗抽物反應 10 分鐘後，再添加 20 μl 的酪胺酸酶溶液 (1000 U/ml)，在反應 30 分鐘和 60 分鐘後，於 490 nm 下測得吸光值並計算酪胺酸酶抑制率， $n=3$ 。結果如表三所示，二氯甲烷粗抽物和甲醇粗抽物隨著樣品濃度增加，抑制酵素活性的能力也隨之上升，顯示濃度正相關 (dose-dependent) 特性。兩層粗抽物之抑制率達 50% 的劑量 (ID_{50}) 值和標準品熊果素相比較，不論 30 分鐘或 60 分鐘均無顯著的抑制效果。但石莧粗抽物在 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之抑制率與 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之熊果素的效果相近，表示石莧粗抽物中具有抑制酪胺酸酶活性之成分存在，因為粗抽物中許多化學成分的協同或拮抗作用而無法產生顯著的酪胺酸酶抑制效果。因此，針對所分離而得知化合物進行相關活性評估。

化合物之酪胺酸酶抑制

在酪胺酸酶抑制試驗，80 μl 酪胺酸 (2 mM) 和 100 μl 的待測化合物 1~9 反應 10 分鐘後，再添加 20 μl 酪胺酸酶溶液 (1000 U/ml)，經 30 分鐘和 60 分鐘反應後，於 490 nm 下測得吸光值並計算抑制率， $n=3$ 。其中以維他命 C、麴酸及熊果素為當作正相對照組 (positive control)。此等為市面上常見的有效美白劑，但在運用上皆有所限制。維他命 C 不穩定，麴酸具有光敏感性且會造成過敏現象，而熊果素為對苯二酚衍生

物，在體內可能代謝成具基因毒性的對苯二酚之疑慮。所開發出之美白劑若能有效解決此等問題，將可提高所開發之美白劑的應用價值。

表四、化合物 1~9 之酪胺酸酶抑制試驗

化合物 (濃度 μM)	抑制率(%) ^a		IC_{50} (μM) ^b	
	30 分鐘	60 分鐘	30 分鐘	60 分鐘
2 (100)	37.59 \pm 0.76	44.00 \pm 1.07	127.56 \pm 1.30	119.81 \pm 0.78
3 (100)	21.46 \pm 2.13	29.98 \pm 2.49	169.95 \pm 3.78	157.50 \pm 8.57
4 (60)	43.92 \pm 1.41	36.25 \pm 2.89	65.77 \pm 3.17	78.64 \pm 1.77
5 (100)	36.15 \pm 2.83	38.36 \pm 2.70	121.77 \pm 4.78	118.61 \pm 4.24
6 (100)	27.38 \pm 2.39	40.09 \pm 1.25	152.80 \pm 4.41	128.94 \pm 3.60
7 (30)	32.33 \pm 4.12	21.69 \pm 1.32	56.04 \pm 5.04	64.65 \pm 3.38
熊果素(60)	8.85 \pm 2.55	26.20 \pm 2.90	120.49 \pm 0.58	104.79 \pm 1.69
麴酸 (100)	46.95 \pm 4.24	40.06 \pm 3.05	115.90 \pm 3.63	124.25 \pm 4.05
維他命 C (100)	31.66 \pm 4.87	42.95 \pm 4.72	145.11 \pm 3.50	130.41 \pm 5.08

(註) a. 該濃度下待測物對酪胺酸酶的抑制百分比；

b. IC_{50} 表示抑制率達 50% 的濃度

結果如表四所示。大翅薊酚 (onopordin, 4) 及澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7) 之抑制酪胺酸酶的能力與標準品熊果素、麴酸及維他命 C 比較具有顯著的抑制效果。過江藤素 (nodifloretin, 2) 及去甲中國薊醇 (cirsiliol, 5) 在 60 分鐘反應，抑制酪胺酸酶活性皆比維他命 C 和麴酸為佳。反之，4'-羥基漢黃芩素 (4'-hydroxywogonin, 3) 及 5,7,8,4'-四羥基-3'-甲氧基黃酮

(5,7,8,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone, 6) 則不具明顯的抑制效果。至於 3,7,4',5' 四羥基-3'-甲氧基黃酮 (3,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone, 1)、高車前素 (hispidulin, 8) 及 3'-甲基楊梅黃酮 (larycitrin, 9) 則因為量太少未偵測到抑制現象。從實驗結果可發現麴酸的抑制能力會隨著反應時間增長而衰退，但是化合物 2、3、5 及 6 的抑制能力則隨著反應時間之增長及濃度越高，抑制效果越好，呈現著濃度正相關及時間正相關 (concentration- and time-dependent) 的現象。

化合物與酵素的作用模式，依照其間係使酵素活性降低或失去活性，亦或與酵素產生非共價性結合阻礙基質進入酵素活性區或改變酵素構形而使其失活等不同方式，而改變化合物的應用。以酵素動力學試驗評估，具有抑制酪胺酸酶活性的大翅薊酚 (onopordin, 4) 及澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7) 化合物與酵素的作用模式。在酵素動力學實驗中，以酪胺酸酶溶液 (20 U) 與固定濃度的化合物大翅薊酚(4)及澤蘭葉黃素(7)和不同濃度的酪胺酸溶液進行反應，以雙倒數曲線 (Lineweaver-Burk plot) 作圖，判斷化合物對酪胺酸酶的抑制類型，結果如第二圖及比較圖第三圖所示。

由第二圖可知大翅薊酚 (4) 之交點在第一象限，表示大翅薊酚對酪胺酸酶是屬於混合型抑制模式，同時兼具競爭型及不競爭型抑制劑的特性。 K_m 值為要達一半最高催化速率時基質的濃度，是基質與酵素之間親和力的指標。 K_m 值越大，親和力越小。而最快速率 (V_{max}) 值為在足夠的基質下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率。化合物大翅薊酚之 K_m 值分別為 3.73 (10 μ M)、3.66 (60 μ M) 及 2.77 mM (100 μ M)； V_{max} [吸光值 (optical density, OD)₄₉₀/分鐘] 值為 0.107 (10 μ M)、0.033

(60 μM) 及 0.015 (100 μM)。而陳佩君於 2009 年碩士論文指出如第三圖所示化合物澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7)，屬於競爭型抑制模式。

根據 Kubo 等人於 2000 年之 *Bioorgan. Med. Chem.* 指出遲滯效應是酪胺酸被氧化形成多巴過程中的典型特徵，而當有還原劑或是供氫的待測物存在，特別是具有鄰二酚羥基取代的化合物，延遲時間 (lag time) 會被縮短或消失。而化合物大翅薊酚因為在 B 環上具有鄰二酚羥基取代可以提供氫或是電子，因此第四圖不具有延遲時間，可以縮短酪胺酸轉變成多巴的反應時間，而化合物澤蘭葉黃素 (7) 也有同樣的現象產生。

鑑於此，本發明可證實石莧甲醇萃取物中確實含有可開發成美白劑之活性成分。惟此僅為細胞外之結果，無法完全涵蓋細胞內之現象，為使本發明更為完整，遂進行石莧甲醇萃取物細胞內美白活性之評估。以 B16F10 細胞模式評估該萃取物之美白活性。

石莧全草甲醇萃取物之細胞存活率與控制組相比較，如第五圖證實，石莧全草甲醇萃取物之細胞存活率與控制組相比較下，證實石莧全草萃取物在濃度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下，對細胞生長之影響不具統計上之意義，故可視為對細胞不具毒殺性，因此將使用 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度做為其他活性檢測。

石莧全草甲醇萃取物濃度 12.5 至 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以 B16F10 黑色素細胞評估黑色素生成含量之抑制效果。經與控制組比較後，如第六圖所示，石莧全草甲醇萃取物在此系列濃度下呈現出劑量依賴性抑制效果，在實驗的濃度條件下，50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上即有抑制黑色素生成的效果，且不具細胞毒殺性，其中以 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 效果最佳，可以有效抑制黑色素含量達 52.31%。此外，

50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 下分別可以有效抑制黑色素含量達 20.16 及 44.29%。而低於此濃度，如 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 及 25 $\mu\text{g/ml}$ 下雖有抑制黑色素效用，但卻比不上石菟全草甲醇萃取物於高濃度之效用。

石菟全草甲醇萃取物抑制酪胺酸酶活性結果分析

石菟全草甲醇萃取物濃度 12.5 至 200 $\mu\text{g/ml}$ 對 B16F10 黑色素細胞之抑制酪胺酸酶活性。與控制組比較如第七圖所示，證實石菟全草甲醇萃取物在系列濃度下呈現出劑量依賴性抑制之效果，其中 200 $\mu\text{g/ml}$ 能抑制 30.75%酪胺酸酶活性而 100 $\mu\text{g/ml}$ 能抑制 26.55%酪胺酸酶活性。

石菟全草甲醇萃取物抑制黑色素生成路徑相關蛋白表現

石菟全草甲醇萃取物濃度 12.5 至 200 $\mu\text{g/ml}$ 對 B16F10 細胞黑色素生成路徑相關蛋白，呈現出劑量依賴性效用。如第八~十一圖所示，與控制組比較，證實石菟全草甲醇萃取物在 200 $\mu\text{g/ml}$ 能有效地抑制小眼畸形轉錄因子 (MITF) 的表現達 49.65%，並可進一步抑制酪胺酸酶 (TYR)，酪胺酸酶相關蛋白-1 (TRP-1) 及-2 (TRP-2) 之表現，其抑制率分別達 43.11%，29.97%，49.31%。在 100 $\mu\text{g/ml}$ 能有效地抑制調節小眼畸形轉錄因子 (MITF) 達 29.27%，並進一步抑制酪胺酸酶 (TYR)，酪胺酸酶相關蛋白-1 (TRP-1) 及-2 (TRP-2)，分別達 26.11%，28.41%，26.13%，最終可以抑制黑色素生合成。

鑑於此，本發明石菟甲醇萃取物以 B16F10 細胞模式評估該萃取物之美白活性。由發明結果得知，石菟萃取物對細胞不具毒殺，因此具有安全性；另外石菟萃取物可透過抑制調節小眼畸形轉錄因子 (microphthalmia transcription factor) 蛋白表現，顯示該萃取物具備抑制酪胺酸酶之合成，並進一步抑制黑

色素 (melanin) 生成達到美白效用。綜上所述，石莧萃取物可添加於化粧品、保養品或外用醫藥品呈現皮膚美白功用。

除石莧萃取物之美白功效外，本發明亦針對組合物中之澤蘭葉黃素(eupafolin, 7)進行相關分子生物機轉之探討，結果如第十二圖～十八圖。如第十二圖所示，澤蘭葉黃素(eupafolin, 7)之細胞存活率與控制組相比較下，除 80 μM 會影響 B16F10 細胞存活率，其餘濃度對細胞生長之影響不具統計上之意義，故可視為對細胞不具毒殺性，但為求更嚴謹的安全性考量，僅使用 10 μM 以下的濃度做為以下其他活性檢測之用。

澤蘭葉黃素以濃度 0.01 至 10 μM 對 B16F10 黑色素細胞之抑制黑色素生成含量，如第十三圖所示，經與控制組比較後，證實澤蘭葉黃素在此一系列濃度下呈現出劑量依賴性的抑制效果，在實驗的濃度條件下，0.01 μM 以上即有抑制黑色素生成的效果，且不具細胞毒殺性，其中以 10 μM 效果最佳，可以有效抑制黑色素含量達 43.33%。此外，0.1 及 1 μM 下分別可以有效抑制黑色素含量達 14.5 及 28.77%。

澤蘭葉黃素以濃度 0.01 至 10 μM 對 B16F10 黑色素細胞之抑制酪胺酸酶活性，如第十四圖所示，經與控制組比較後，證實澤蘭葉黃素在此一系列濃度下呈現出劑量依賴性抑制效果，在實驗的濃度條件下，0.01 μM 以上即有抑制酪胺酸酶活性的效果，且不具細胞毒殺性，其中以 10 μM 效果最佳，可以有效抑制酪胺酸酶活性達 56.04%。此外，0.1 及 1 μM 下分別可以有效抑制酪胺酸酶活性達 24.47 及 47.77%。澤蘭葉黃素以濃度 0.01 至 10 μM 對 B16F10 細胞黑色素生成路徑相關蛋白呈現出劑量依賴性效用。如第十五圖所示，經與控制組比較後，證實 Eupafolin 在 10 μM 能有效地抑制小眼畸形轉錄因子

(MITF) 的表現量達 65.9%，在 1 μ M 能有效地抑制小眼畸形轉錄因子 (MITF) 的表現達 48.9%。此外，0.1 及 0.01 μ M 下分別可抑制 MITF 表現量達 40.6 及 33.0%。

澤蘭葉黃素以濃度 0.01 至 10 μ M 對 B16F10 細胞黑色素生成路徑相關蛋白呈現出劑量依賴性效用。如第十六圖所示，經與控制組比較後，證實澤蘭葉黃素在 10 μ M 能有效地抑制酪胺酸酶 (TYR) 表現量達 58.6%，在 1 μ M 能有效地抑制酪胺酸酶 (TYR) 的表現達 42.6%。此外，0.1 及 0.01 μ M 下分別可抑制 TYR 表現量達 21.0 及 15.3%。

澤蘭葉黃素以濃度 0.01 至 10 μ M 對 B16F10 細胞黑色素生成路徑相關蛋白呈現出劑量依賴性效用。如第十七圖所示，經與控制組比較後，證實澤蘭葉黃素在 10 μ M 能有效地抑制酪胺酸酶相關蛋白-1 (TRP-1) 表現量達 49.5%，在 1 μ M 能有效地抑制 TRP-1 的表現達 27.2%。此外，0.1 及 0.01 μ M 下分別可抑制 TRP-1 表現量達 10.1 及 7.8%。

澤蘭葉黃素以濃度 0.01 至 10 μ M 對 B16F10 細胞黑色素生成路徑相關蛋白呈現出劑量依賴性效用。如第十八圖所示，經與控制組比較後，證實澤蘭葉黃素在 10 μ M 能有效地抑制酪胺酸酶相關蛋白-2 (TRP-2) 表現量達 68.6%，在 1 μ M 能有效地抑制 TRP-2 的表現達 51.8%。此外，0.1 及 0.01 μ M 下分別可抑制 TRP-2 表現量達 27.0 及 12.5%。

綜合上述，澤蘭葉黃素可透過調節小眼畸形轉錄因子的表現，進而抑制酪胺酸酶及其相關蛋白的表現量，故而達到抑制黑色素的生合成，更支持石菖萃取物可添加於化粧品、保養品或外用醫藥品呈現皮膚美白之功用。

指紋圖譜 (finger print) 或稱為指紋層析法 (finger print chromatogram)，藉由高效液相色譜 (high performance liquid chromatography, HPLC) 的分析能力，與再現性，建立中草藥化學指紋圖譜。本發明案之指紋圖譜作法係先秤取石莧地上部，先以二氯甲烷 (dichloromethane) 浸泡，再將浸泡後石莧以甲醇浸泡，粗萃液分別經減壓濃縮得到二氯甲烷粗抽物以及甲醇粗抽物。將此兩層粗抽物進行活性評估，再依活性化分層進行化學成分分離，並將含量最多或活性較佳的化合物做為指標成分建立石莧的指紋圖譜 (finger print)。

流動相組成之選擇

可選用不同溶媒系統進行搭配，包括乙腈-0.1%甲酸、甲醇-0.1%甲酸及甲醇-0.1%乙酸。如第十九圖 (a) 甲醇-0.1%甲酸及第十九圖 (b) 乙腈-0.1%甲酸的圖譜所示，發現兩個溶媒系統的沖提效果相差不多。其中以乙腈-0.1%甲酸為流動相，在 80 至 100 分鐘會有一團化合物聚集，而又因為乙腈為管制藥品且在購買價格上比較貴，基於安全與經濟考量選擇甲醇-0.1%甲酸做為流動相。將 0.1%甲酸置換成 0.1%乙酸，如第二十圖所示。兩張圖譜主要有滯留時間的差別，第二十圖 (a) 以甲醇-0.1%乙酸為流動相時峰的滯留時間會往前移，可能會使原本的單一峰與其它峰產生重疊的現象。另外，所呈現出來的峰也有明顯拖尾的情形。因此以第二十圖 (b) 甲醇-0.1%甲酸作為流動相所呈現出來的圖譜較為適合。

偵測波長之選定

以分光光度計對甲醇粗抽物掃描，在紫外光 (200 ~ 400 nm) 波長範圍下，可觀察吸光值的變化。從圖譜中可發現分別

在 200、273 及 326 nm 之波長，甲醇粗抽物其吸光值最大，但甲醇溶液本身的最大吸收範圍在 205 到 215 nm 之間，如果選定此波長可能會影響樣品吸光值的高低。且選定的 273 及 326 nm 屬於黃酮類化合物波段 I (300~400 nm) 與波段 II (240~280 nm) 的典型吸收範圍，適用於偵測黃酮類化合物。

比較不同波長下圖譜的變化，波長設定為 273 nm 的圖譜在 15 ~ 20 分鐘會有一些未知的化合物在此波長下有較大吸收，而主要的 40 到 70 分鐘訊號則變的較小或是消失，且基線 (baseline) 產生明顯飄移現象，因此選定 326 nm 作為偵測波長。因此，最佳化的層析方法為高壓液相層析搭配紫外/可見光偵測器，在波長 326 nm 下以甲醇-0.1%甲酸進行沖提，所得到的石莧粗抽物指紋圖譜如第二十一圖 (a) 所示，第二十一圖 (b) 為指標成分過江藤素 (nodifloretin, 2)、大翅薊酚 (onopordin, 4) 及澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7) 對應粗抽物之圖譜。因 nodifloretin (2) 未與旁邊未知化合物完全分離，在定量上會有誤差，因此指標成分 onopordin (4) 及 eupafolin (7) 可確認，並定量石莧粗抽物中 onopordin (4) 及 eupafolin (7) 的含量。

本技術係以石莧 (*Phyla nodiflora*) 植物之萃取物，製備成組合物，可呈現皮膚美白的功能。若非特別指明，其粗抽物或是萃取物，係指石莧植物運用有機溶媒進行萃取之產物。

藉由發明結果得知，石莧萃取物係安全的美白原料，可添加於化粧品、保養品或外用醫藥品呈現皮膚美白功用，運用於製藥業及化學原料等產業。

上述賦形劑或稱為『藥學上可接受之載體或賦形劑』、『生物可利用之載體或賦形劑』，係包括溶媒、分散劑、包衣、抗

菌或抗真菌劑，保存或延緩吸收劑等任何習知用於製備成劑型之適當化合物。通常此類載體或賦形劑，本身不具備治療疾病之活性，且將本技術所揭示之衍生物，搭配藥學上可接受之載體或賦形劑，製備之各劑型，投與動物或人類不致於造成不良反應、過敏或其它不適當反應。因而本技術所揭示之衍生物，搭配藥學上可接受之載體或賦形劑，係適用於臨床及人類。"有效劑量"係代表足以改善或防止醫學症狀或生物體狀態之劑量。有效劑量亦說明投與化合物之劑量足供用於診斷之劑量。除非說明書另有敘述，否則『活性化合物』以及『醫藥活性化合物』於此均可替換使用，係指稱一具有製藥學、藥理學或治療效果之物質。

運用本化合物之劑型經由靜脈、口服、吸入或經由鼻、直腸、陰道等局部或舌下等方式投藥，可達到治療效果。對於不同病症之病患，約每日投與 0.1mg 至 100 mg 之活性成分。

該載體隨各劑型而不同，無菌注射之組成物可將溶液或懸浮於無毒之靜脈注射稀釋液或溶劑中，此類溶劑如 1,3-丁二醇。其間可接受之載體可為甘露醇 (Mannitol) 或水。此外固定油或以合成之單或雙甘油酯懸浮介質，係一般習用之溶劑。脂肪酸，如油酸 (Oleic acid)、橄欖油或蓖麻油等與其甘油酯衍生物，尤其經多氧乙基化之型態皆可作為製備注射劑並為天然醫藥可接受之油類。此等油類溶液或懸浮液可包含長鏈酒精稀釋液或分散劑、羧甲基纖維素或類似之分散劑。其他一般使用之介面活性劑如 Tween、Spans 或其他相似之乳化劑或是一般醫藥製造業所使用於醫藥可接受之固態、液態或其他可用於劑型開發之生物可利用增強劑。

用於口服投藥之組合物則係採用任何一種口服可接受之劑型，其型式包括膠囊、錠劑、片劑、乳化劑、液狀懸浮液、分散劑、溶劑。口服劑型一般所使用之載體，以錠劑為例可為乳糖、玉米澱粉、潤滑劑，如硬脂酸鎂為基本添加物。而膠囊使用之稀釋液包括乳糖與乾燥玉米澱粉。製成液狀懸浮液或乳化劑劑型，係將活性物質懸浮或溶解於結合乳化劑或懸浮劑之油狀介面，視需要添加適度之甜味劑，風味劑或是色素。

鼻用氣化噴霧劑或吸入劑組成物，可根據已知之製劑技術進行製備。例如，將組成物溶於生理食鹽水中，添加苯甲醇或其他適合之防腐劑，或促吸收劑以增強生物可利用性。本技術所揭示化合物之組合物亦可製成栓劑，進行經直腸或陰道之投藥方式。

本技術所揭示化合物亦可運用『靜脈投藥』，其係包括經由皮下、腹腔、靜脈、肌肉，或關節腔內、顱內、關節液內、脊髓內注射，主動脈注射，胸腔注射，疾病部位內注射，或其他適合之投藥技術。

本發明之組成物可形成乳霜、軟膏、乳液、化粧水、乳漿、糊狀物或慕絲 (mousse) 等外觀。視需要可經由煙霧劑形式將其施用於皮膚，亦可為固體形式，例如棒狀物形式。尚亦可運用於任何局部施用製劑形態之保養品及/或作為化粧品，特別是水溶液、水-醇溶液或含油溶液，油溶於水或水溶於油或多重的乳狀液，水性或油性凝膠，液狀、糊狀或固狀無水產物。無庸多言，熟諳此技藝者會謹慎選擇輔助劑，及/或其量，係根據本發明之化合物性質考量，不會或實質上不至於因所構思之添加而有不利的影響。

本發明之組成物亦可包含於化粧品和皮膚科製劑常見的

輔助劑，例如親水性或親油性膠凝劑、親水性或親油性活性劑、保存劑、抗氧化劑、溶劑，香料、填充劑、防曬劑、顏料、氣味吸收劑及染料等。這些不同輔助劑的量為所考量領域中的習知用量，例如：佔組成物總重量之 0.01 至 20%。依其性質，這些輔助劑可被送入脂肪相、水相、脂囊。

當本發明之組成物為一種乳狀液時，相對於組成物總重量，脂肪相之比例範圍可從 5 至 80 重量%，且較佳從 5 至 50 重量%。用於乳狀液形式之本組成物中的油、乳化劑及輔助乳化劑等係選自習知用於所考量領域者。相對於組成物總重量，乳化劑與輔助乳化劑存在於組成物中的比例範圍係從 0.3 至 30 重量%，且較佳從 0.5 至 20 重量%。

可用於本發明之油類原料，例如礦物油（液體石油）、植物油（鱈梨油、大豆油），動物油、羊毛脂、合成油、全氫角鯊烯（perhydrosqualene），矽油、環甲矽氧烷（cyclomethicone）及氟化油、全氟聚醚。亦可使用脂肪醇（鯨蠟醇）、脂肪酸及蠟（巴西棕櫚蠟、地蠟）等作為脂肪物質。

作為可用於本發明之乳化劑與輔助乳化劑原料，例如：聚乙二醇之脂肪酸酯，如 PEG-20 硬脂酸酯，及甘油之脂肪酸酯，如硬脂酸甘油酯。親水性膠凝劑原料，例如：羧乙烯基聚合物、碳聚物（carbomer）、丙烯酸系共聚物（如丙烯酸酯/烷基丙烯酸酯共聚物）、聚丙烯醯胺、聚糖、天然樹膠及黏土，而作為親油性膠凝劑原料，例如改性黏土（如皂土）、脂肪酸之金屬鹽類、疏水性矽石及聚乙烯。

可使用之活性劑，例如多元醇、維他命、角質溶解劑及/或去鱗片劑、抗發炎劑、鎮靜劑（calmant）及其混合物、脫色素劑，例如麴酸及其衍生物。組成物中亦可使用親油性或親水

性之 UV 遮蔽劑，例如苯-1,4-雙(3-亞甲基-10-樟腦磺酸)、2-乙基己基 α -氰基- β,β -二苯基丙烯酸或氰雙苯丙烯酸辛酯 (octocrylen)、丁基甲氧基二苯甲醯基甲烷、甲氧基肉桂酸辛酯及/或氧化鈦和氧化鋅。

可使用之化粧品粉末通常包含填充劑、顏料、及珍珠。適宜的填充劑包括砂石、表面處理型砂石、氧化鋁、表面處理型氧化鋁、滑石及表面處理型滑石、硬脂酸鋅、雲母及表面處理型雲母、高嶺土、尼龍(Nylon)粉(如 Orgasol TM)、聚乙烯粉末、Teflon TM、澱粉、氮化硼、月桂醯離胺酸、共聚物微球、交聯聚甲基丙烯酸酯共聚物、及聚矽氧樹脂微珠、及類似物。

【實施方式】

本案所提出之「石莧萃取物用於皮膚美白」將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得熟習本技藝之人士可以據以完成之，然而本案之實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，熟習本技藝之人士仍可依據除既揭露之實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本技術所揭示之範圍。因此，本案揭示之創新技術，已深具產業價值，援依法提出申請。

實驗材料及方法：

磷酸鹽緩衝液 (Phosphate-buffered saline, PBS)- pH7.4 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4): 0.27g, 磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4): 1.42g, 氯化鈉(NaCl): 8g, 氯化鉀 (KCl) 0.2g, 加去離子水約 800mL 充分攪拌溶解，加入濃鹽酸調 pH 至 7.4，最後定容到 1L。高溫高壓滅菌後室溫保存。

含 0.05%吐溫之磷酸鹽緩衝液(PBS-T)-取 300 μ l 吐溫 (Tween-20) 加入 PBS 100ml，混勻後即可使用。

轉移緩衝液 (transfer buffer)-30.3 g 三羥甲基氨基甲烷 (tris base)、144 g 甘氨酸 (glycine)、20% 甲醇 (methanol)。

阻斷緩衝液(blocking buffer) - 5%脫脂奶粉溶於磷酸鹽緩衝液 (PBS-T)。

石莧全草甲醇萃取物之細胞安全性測試

首先將 10000 顆小鼠黑色素瘤細胞 (B16F10) 培養於 96 微孔盤的每一孔洞中，並於培養箱中培養 24 小時後將培養液移除，重新添加培養液及不同濃度的石莧全草甲醇萃取物，12.5、25、50、100 及 200 μ g/ml。48 小時後將培養液移除後，再添加 150 μ l 濃度為 5mg/mL 的四甲基偶氮唑鹽(methyl thiazolil tetracolum, MTT) 於每個孔洞內。其後放在 37°C，含有 5% 二氧化碳的培養箱中培養 4 小時，並移除培養液再添加 100 μ l 的二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 並反應 30 分鐘，最後將微孔盤放在微孔盤分光光度儀，以 550 nm 波長下檢測吸光值，藉此判讀細胞存活率說明石莧全草甲醇萃取物之細胞安全性。

石莧全草甲醇萃取物抑制細胞黑色素生成含量測試

首先將 100000 顆的 B16F10 細胞培養於 24 孔盤中，並於培養箱中培養 24 小時後將培養液移除，重新添加培養液及不同濃度的石莧全草甲醇萃取物，12.5、25、50、100 及 200 μ g/ml，再置於培養箱 48 小時後，以磷酸鹽緩衝液 (Phosphate-buffered saline, PBS) 清洗二次後並添加胰蛋白酶溶液 (Trypsin-EDTA) 收集細胞並放入微量試管進行離心。之後將上清液移除後添加 150 μ L 的 1N 氫氧化鈉溶液且

置於 95°C 加熱 10 分鐘。將各組之溶解液取 100 μ l 到 96 微孔盤再以微孔盤分光光度儀條件為 405 nm 檢測吸光值，此吸光值則為總黑色素含量。

石莧全草甲醇萃取物抑制細胞內酪胺酸酶活性分析

首先將 100000 顆的 B16F10 細胞培養於 24 孔盤中，並於培養箱中培養 24 小時後將培養液移除，重新添加培養液及不同濃度的石莧全草甲醇萃取物，12.5、25、50、100 及 200 μ g/ml，再置於培養箱 48 小時後，以 PBS 清洗二次後並添加 Trypsin-EDTA 來收集細胞並放入微量試管進行離心。將細胞取下後再添加 100 μ L 1% (v/v) Triton X 100 及 0.1 mM 苯甲基磺醯氟化物 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) / 50 mM PBS (pH 6.8) 溶解細胞。將其移放在微量試管並放置在 -80°C，30 分鐘後，移出後放在 37°C 下 5 分鐘回溫。將其放在 12000 rpm 離心 30 分鐘。取上清液 80 μ L 再加上 20 μ L 多巴 (L-dopa, 2 mg/mL) 於 96 微孔盤中作用，並於微孔盤分光光度儀條件為 405 nm 檢測吸光值來檢測細胞內酪胺酸酶活性。

石莧全草甲醇萃取物抑制黑色素生成路徑相關蛋白表現之試驗

將細胞種至 6 孔盤中，於培養箱中培養至八分滿後，添加不同濃度的石莧全草甲醇萃取物，12.5、25、50、100 及 200 μ g/ml。48 小時後細胞先以冰的 PBS 洗 2 次，添加定量的細胞溶解液後移至微量離心管中後加熱 95°C，10 分鐘使蛋白質變性。完成後，將 10~15% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 裝置在電泳槽，並注滿移動緩衝

液，將變性過的蛋白檢體 20 μ l 注入各孔中進行電泳。以甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作為對照組。

首先將電壓 80 V 進行 30 分鐘後直到檢體進行到堆積膠體 (stacking gel) 和分離膠體 (separation gel) 的介面時，再將電壓調整至 100V 進行蛋白質電泳分離。電泳結束後則進行轉漬。將裁剪好的聚二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 放在轉移緩衝液 (transfer buffer) 內備用。將 SDS-PAGE 層覆蓋在 PVDF 膜上，並在其上下各夾兩張 3 mm 濾紙，之後將此夾層置於 transfer buffer 中，將電流設定在 400mA，4°C 下轉漬 2 小時。

完成後，將轉漬 PVDF 膜添加阻斷緩衝液 (blocking buffer) 於室溫下進行 1 小時封閉，之後以含 0.05% 吐溫之磷酸鹽緩衝液 (PBS-T) 清洗三次，每次五分鐘，然後添加稀釋好不同的一級抗體均勻覆蓋在 PVDF 膜，振盪過夜，如酪胺酸酶及其相關蛋白-1 (TRP-1) 及-2 (TRP-2)，調節小眼畸形轉錄因子 (MITF) 完成後再以 PBS-T 清洗三次，每次五分鐘。將二級抗體稀釋後均勻倒在 PVDF 膜上反應 1 小時如過氧化物酶標記的兔抗山羊抗體 (Horseradish Peroxidase labeled Rabbit anti-Goat, HRP-Rabbit anti-Goat) 及過氧化物酶標記的羊抗小鼠抗體 (HRP-Goat anti-mouse)，完成後以 PBS-T 清洗 3 次。最後再添加化學冷光呈色劑 (ECL detection buffer) 作用再以冷光照相系統拍照即可比對結果。

實施例 1、石莧粗抽物之製備流程

秤取石莧地上部 4.6 公斤，先以二氯甲烷

(dichloromethane) 浸泡，再將浸泡後的石莧以甲醇浸泡，粗萃液分別經減壓濃縮得到二氯甲烷粗抽物 101 克以及甲醇粗抽物 525 克。

實施例 2、化合物之分離純化

二氯甲烷粗抽物 101 克利用二氧化矽管柱層析法 (SiO_2) 並以正己烷及丙酮進行梯度沖提，總共分成五個劃分層 (Fr. 1 – Fr. 5)：劃分層 1 (正己烷/丙酮：100/0，1.3 克)、劃分層 2 (正己烷/丙酮：90/10，45.8 克)、劃分層 3 (正己烷/丙酮：80/20，8.7 克)、劃分層 4 (正己烷/丙酮：65/35，12.4 克) 及劃分層 5 (正己烷/丙酮：30/70，16.0 克)。接著利用正向或逆向薄層層析或管柱層析、中壓液相層析進行純化分離，在 Fr. 2 得到 3,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone (1) (3.9 毫克)。

甲醇粗抽物 525 克取其中 160 克利用管柱層析法並以正己烷、乙酸乙酯及甲醇進行梯度沖提，總共分成八個劃分層 (Fr. 21 – Fr. 28)：劃分層 21 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：100/0/0，0.3 克)、劃分層 22 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：90/10/0，0.8 克)、劃分層 23 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：60/40/0，1.2 克)、劃分層 24 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：40/60/0，4.3 克)、劃分層 25 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：7/80/13，7.7 克)、劃分層 26 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：6/69/25，33.8 克)、劃分層 27 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：6/54/40，10.5 克) 及劃分層 28 (正己烷/乙酸乙酯/甲醇：5/45/50，65.6 克)。接著利用正相或逆相薄層層析或管柱層析、中壓液相層析及分子篩來進行純化分離如第一圖所示，分別從劃分層 25 得到 nodifloretin (2) (9.9 毫克) 及 eupafolin (7) (13.5 毫克)，劃分層 26 得到 4'-hydroxywogonin (3)

(10.4 毫克)、onopordin (4) (21.8 毫克)、cirsiol (5) (11.8 毫克) 及 5,7,8,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone (6) (10.8 毫克)，從石莧中共分離到七個純化合物。

實施例 3、石莧全草甲醇萃取物之萃取流程

首先稱取 200 克乾燥石莧全草並以研磨機將其磨成粉末後放入 2 公升三角錐瓶，之後添加 1 公升的甲醇。將三角錐形瓶加上冷凝管後放在加熱器上，其溫度控制在 100°C 並加熱 2 小時進行加熱迴流試驗。2 小時後將萃取液過濾取得第 1 次濾液，之後再將於三角錐形瓶之殘渣再次添加 1 公升甲醇進行加熱迴流萃取，此方式總共進行 2 次循環後，將 3 次濾液合併後以減壓濃縮機濃縮後再以真空冷凍乾燥機乾燥來獲得乾燥粉末。

實施例 4、指紋圖譜製備

將此兩層粗抽物進行活性評估，再依活性化分層進行化學成分分離，並將含量最多或活性較佳的化合物做為指標成分建立石莧的指紋圖譜 (finger print)。

一. 樣品與試劑前處理

將樣品秤重之後，以流動相的溶媒 (甲醇：0.1% 甲酸 = 1：1) 溶解，使樣品最後濃度為 1 mg/ml，接著利用 0.45 μm 鐵氟龍材質 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 的濾膜過濾，去除樣品中的雜質。使用的溶媒亦以 0.45 μm 聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 的濾膜過濾去除雜質，並以超音波震盪機震盪 15 分鐘進行除氣。

二. 圖譜層析條件

儀器設備：ELITE LaChrom 搭配 L-2420 UV-Vis 偵測器 (detector)、L-2200 自動注射器 (autosampler)及 L-2130 推動馬達 (pump)

管柱型態：Hypersil[®] ODS-C18 管柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)

流動相組成：甲醇及 0.1% 甲酸

梯度沖提：0 - 5 分鐘，0 - 2% 甲醇；5 - 9 分鐘，2 - 6% 甲醇；9 - 12 分鐘，6 - 8% 甲醇；12 - 14 分鐘，8 - 12% 甲醇；14 - 20 分鐘，12 - 17% 甲醇；20 - 30 分鐘，17 - 22% 甲醇；30 - 35 分鐘，22 - 27% 甲醇；35 - 41 分鐘，27 - 31% 甲醇；41 - 60 分鐘，31 - 40% 甲醇；60 - 75 分鐘，40 - 43% 甲醇；75 - 80 分鐘，43 - 45 甲醇；80 - 120 分鐘，45 - 80% 甲醇。

樣品濃度：1 mg/ml

流速：0.5 ml/min

波長：326 nm

注入體積：20 μl

三. 指標成分

石莧甲醇粗抽物中分離之化合物，過江藤素 (nodifloretin, 2)、大翅薊酚 (onopordin, 4)及澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7)

實施例 5、乳霜

流動石蠟	8
凡士林	3
甘油	5
二丙二醇	4
海藻糖	1

四(2-乙基己烷酸)季戊四醇酯	4
50% 石莧乙醇萃取物	0.1
羥乙基纖維素	0.5
精製水 其餘量香料	適量

實施例 6、乳液

二甲基聚矽氧烷	2
十甲基環五矽氧烷	25
十二甲基環五矽氧烷	10
聚氧化乙烯/甲基聚矽氧烷共聚物	1.5
三甲基矽烷氧矽酸	10
1,3-丁二醇	5
角鯊烷	0.5
滑石粉	0.5
甘草酸二鉀	0.1
石莧萃取物	0.1
球狀聚乙烯粉末	3
苯氧基乙醇	適量
精製水	其餘量
香料	適量

實施例 7、美白化粧品用品乳霜

鯨醇硬脂醇醚-2	1.5
鯨醇硬脂醇醚-21	2.0
鯨醇硬脂醇	2.0
流動石蠟	3

丁基甲氧基二苯醯基甲烷	0.5
辛酸癸酸三酸甘油酯	5.0
棕櫚酸乙基乙酯	3.0
聚二甲基矽氧烷	2.0
十四酸異辛酯	3.0
卡波姆	0.2
甘油	4.0
石莧萃取物	2
海藻糖	3
三乙醇胺	0.2
苯氧基乙醇	適量
精製水	其餘量
香料	適量

其他之實施例

1. 一種抗老化之組合物，其係包含石莧萃取物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之組合物，其係經由小眼畸形轉錄因子相關途徑，呈現作用。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之化粧品組合物，其石莧萃取物之 HPLC 圖，選自下列之圖。
4. 一種抗老化之組合物，其係包含化合物，選自過江藤素 (nodifloretin)、大翅薊酚 (onopordin)、去甲中國薊醇 (cirsiliol)、澤蘭葉黃素 (eupafolin)、5,7,8,4'-四羥基-3'-甲氧基黃酮 (5,7,8,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone)、4'-羥基漢黃芩素 (4'-hydroxywogonin) 之一，或其混合搭配之化合物。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述之組合物，其係經由小眼畸形轉錄因子相關途徑，呈現作用。
6. 如申請專利範圍第 4 項所述之組合物，其石莧萃取物之 HPLC 圖，選自下列之圖。
7. 如申請專利範圍第 4 項所述之組合物，可為化粧品或醫藥品。
8. 如申請專利範圍第 4 項所述之組合物，可採取多重組合投與方式 (multi-administered method)。
9. 一種抗老化之萃取物，其係包含石莧萃取物。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之萃取物，其係經由小眼畸形轉錄因子相關途徑，呈現作用。
11. 如申請專利範圍第 9 項所述之萃取物，其石莧萃取物之 HPLC 圖，選自下列之圖。
12. 如申請專利範圍第 9 項所述之萃取物，其係包含化合物，選自過江藤素 (nodifloretin)、大翅薊酚 (onopordin)、去甲中國薊醇 (cirsiliol)、澤蘭葉黃素 (eupafolin)、5,7,8,4'-四羥基-3'-甲氧基黃酮 (5,7,8,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone)、4'-羥基漢黃芩素 (4'-hydroxywogonin) 之一，或其混合搭配之化合物。
13. 如申請專利範圍第 9 項所述之萃取物，可為化粧品或醫藥品。
14. 如申請專利範圍第 9 項所述之萃取物，可採取多重組合投與方式 (multi-administered method)。

參考文獻：

- S. Shukla, R. Patel, R. Kukkar, Study of phytochemical and diuretic potential of methanol and aqueous extracts of aerial parts of *Phyla nodiflora* Linn., *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2009, 1, 85-91.
- S. Dodoala, R. Diviti, B. Koganti, K. V. S. R. G. Prasad, Effect of ethanolic extract of *Phyla nodiflora* (Linn.) Greene against calculi producing diet induced urolithiasis, *Indian J. Nat. Prod. Sci.*, 2010, 1, 314-321.
- A. O. Turaskar, S. L. Bhongade, S. M. More, A. S. Dongarwar, V. S. Shende, V. B. Pande, Effects of *Lippia nodiflora* extracts on motor coordination, exploratory behavior pattern, locomotor activity, anxiety and convulsions on albino mice, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2011, 4, 133-138.
- I. Kubo, I. Kinst-Hori, S. K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sánchez, T. Ogura, Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2000, 8, 1749-1755.

【圖式簡單說明】

第一圖 石菖全草甲醇萃取物之萃取流程圖

第二圖 化合物大翅薊酚 (onopordin, 4) 之酪胺酸酶酵素動力學

(◆) 不添加

(■) 添加 10 μ M 大翅薊酚

(▲) 添加 60 μ M 大翅薊酚

(×) 添加 100 μM 大翅薊酚

第三圖 化合物澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7) 之酪胺酸酶
酵素動力學

(×) 不添加

(▲) 添加 28 μM 澤蘭葉黃素

(●) 添加 56 μM 澤蘭葉黃素

(○) 添加 112 μM 澤蘭葉黃素

第四圖 不同濃度化合物大翅薊酚 (onopordin, 4) 對酪
胺酸酶的抑制曲線

(a ◆) 10 μM 大翅薊酚

(b ■) 60 μM 大翅薊酚

(c ▲) 100 μM 大翅薊酚

第五圖 石莧甲醇萃取物對 B16F10 黑色素細胞之安全
性分析圖

第六圖 石莧甲醇萃取物對 B16F10 黑色素細胞之抑制
黑色素生成含量圖

第七圖 石莧甲醇萃取物對 B16F10 黑色素細胞之抑制
酪胺酸酶活性圖

第八圖 調節小眼畸形轉錄因子蛋白表現圖

a-小眼畸形轉錄因子蛋白

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GADPH)

第九圖 酪胺酸酶蛋白表現圖

a-酪胺酸酶

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)

第十圖 酪胺酸酶相關蛋白-1 表現

a-酪胺酸酶相關蛋白-1 (TRP-1)

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)

第十一圖 酪胺酸酶相關蛋白-2

a-酪胺酸酶相關蛋白-2 (TRP-2)

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)

第十二圖 澤蘭葉黃素之細胞存活率

第十三圖 澤蘭葉黃素 對 B16F10 黑色素細胞之抑制黑色素生成含量

第十四圖 澤蘭葉黃素 對 B16F10 黑色素細胞之抑制酪胺酸酶活性

第十五圖 澤蘭葉黃素 對 B16F10 黑色素細胞生成路徑相關蛋白之活性

a-小眼畸形轉錄因子蛋白

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (GAPDH)

第十六圖 澤蘭葉黃素對酪胺酸酶蛋白表現圖

a-酪胺酸酶

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (GAPDH)

第十七圖 澤蘭葉黃素對酪胺酸酶相關蛋白-1 表現圖

a-酪胺酸酶相關蛋白-1 (TRP-1)

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)

第十八圖 澤蘭葉黃素對酪胺酸酶相關蛋白-2 圖

a-酪胺酸酶相關蛋白-2 (TRP-2)

b-甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)

第十九圖 不同流動相之指紋圖譜

a-甲醇-0.1%甲酸

b-乙腈-0.1%甲酸

第二十圖 不同流動相之指紋圖譜

a- 甲醇-0.1%乙酸

b- 甲醇-0.1%甲酸

第二十一圖 石菖粗抽物指紋圖譜

a-粗抽物 HPLC 圖譜

b-指標成分過江藤索 (nodifloretin, 2)

大翅薊酚 (onopordin, 4)

澤蘭葉黃素 (eupafolin, 7)

【主要元件符號說明】

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種組合物之用途，其係用於製備一美白之組合物，該組合物包含一石莧 (*Phyla nodiflora* (L.) Greene) 植物萃取物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該美白之組合物可為化粧品或醫藥品。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該美白之組合物的美白作用係用於治療雀斑 (freckle)、黃褐斑 (chloasma)、妊娠紋 (striae of pregnancy)、老人斑 (senile plaque) 以及黑色素瘤 (melanoma) 色素沈澱過度所造成之不適或疾病。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該美白之組合物可採取多重組合投與方式 (multi-administered method)。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該石莧植物萃取物經甲醇萃取，以 HPLC 方法分離，條件如下：

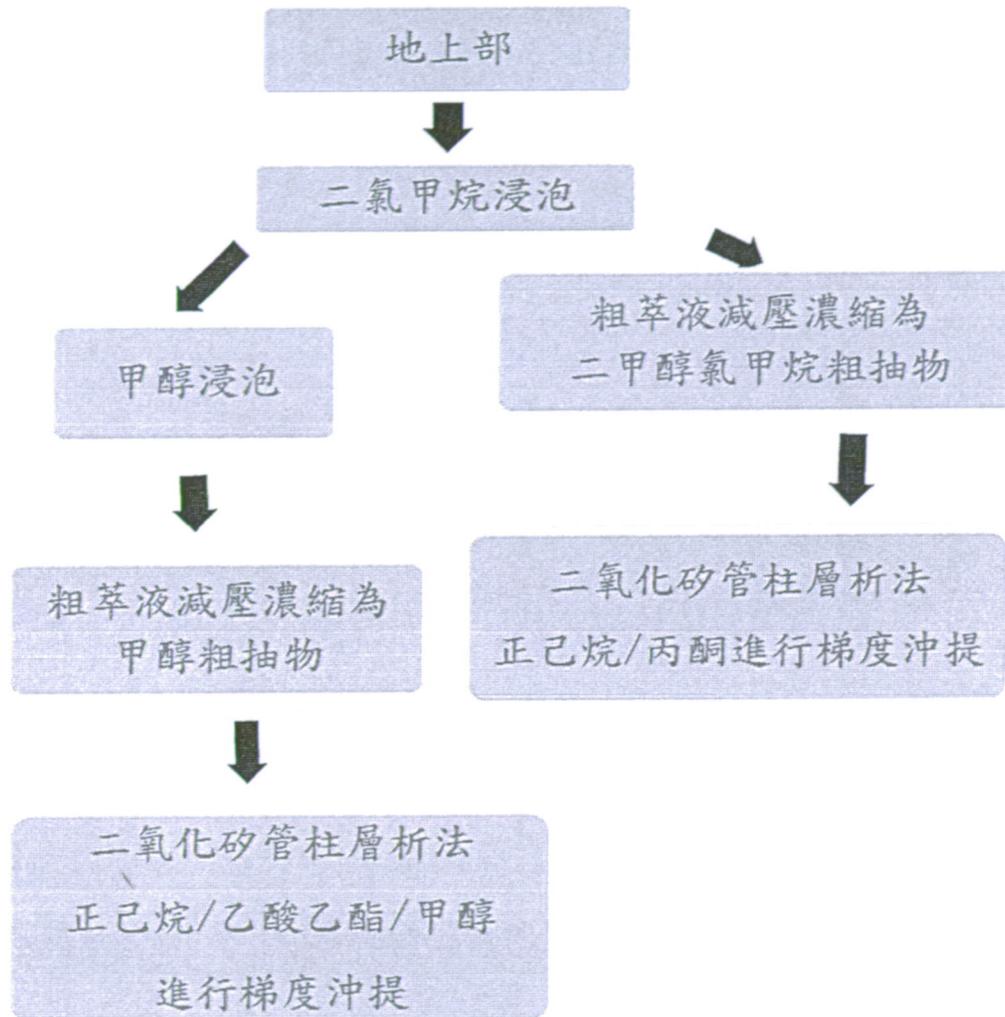
儀器設備：ELITE LaChrom 搭配 L-2420 UV-Vis 偵測器 (detector)、L-2200，自動注射器 (autosampler) 及 L-2130 推動馬達 (pump)，管柱型態：Hypersil[®] ODS-C18 管柱 (250 mm × 4.6 mm，5 μm) 所組成；

流動相組成：甲醇及 0.1% 甲酸；

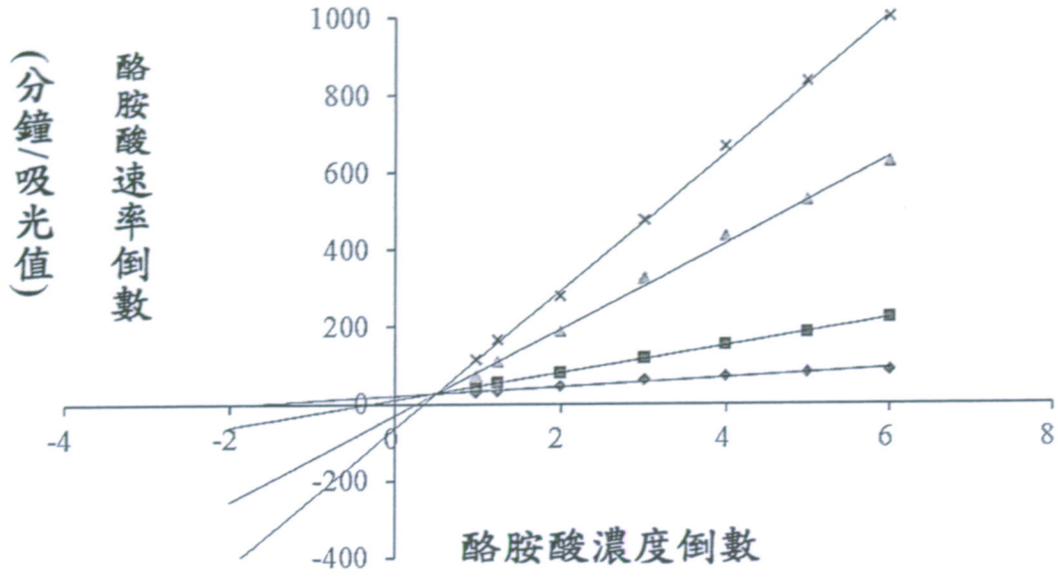
梯度沖提：0 - 5 分鐘，0 - 2% 甲醇；5 - 9 分鐘，2 - 6% 甲醇；9 - 12 分鐘，6 - 8% 甲醇；12 - 14 分鐘，8 - 12% 甲醇；14 - 20 分鐘，12 - 17% 甲醇；20 - 30 分鐘，17 - 22% 甲醇；30 - 35 分鐘，22 - 27% 甲醇；35 - 41 分鐘，27 - 31% 甲醇；41 - 60 分鐘，31 - 40% 甲醇；60 - 75 分鐘，40 - 43% 甲醇；75

- 80 分鐘，43 - 45 甲醇；80 - 120 分鐘，45 - 80% 甲醇；
樣品濃度：1 mg/ml，流速：0.5 ml/min，波長：326 nm，注入
體積：20 μ l，指標成分為石莧甲醇粗抽物中分離之化合物，
過江藤素 (nodifloretin)、大翅薊酚 (onopordin) 及澤蘭
葉黃素 (eupafolin)。
6. 一種組合物之用途，其係用於製備一美白之組合物，該組
合物包含化合物，選自過江藤素 (nodifloretin)、大翅薊酚
(onopordin)、去甲中國薊醇 (cirsiolol)、澤蘭葉黃素
(eupafolin)、5,7,8,4'-四羥基-3'-甲氧基黃酮
(5,7,8,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone)、4'-羥基漢黃芩素
(4'-hydroxywogonin) 之一，或其混合搭配之化合物。
 7. 如申請專利範圍第 6 項所述之用途，其中該美白之組合物
可為化粧品或醫藥品。
 8. 如申請專利範圍第 7 項所述之用途，其中該美白之組合物的
美白作用係用於治療雀斑 (freckle)、黃褐斑
(chloasma)、妊娠紋 (striae of pregnancy)、老人斑 (senile
plaque) 以及黑色素瘤 (melanoma) 色素沈澱過度所造
成之不適或疾病。

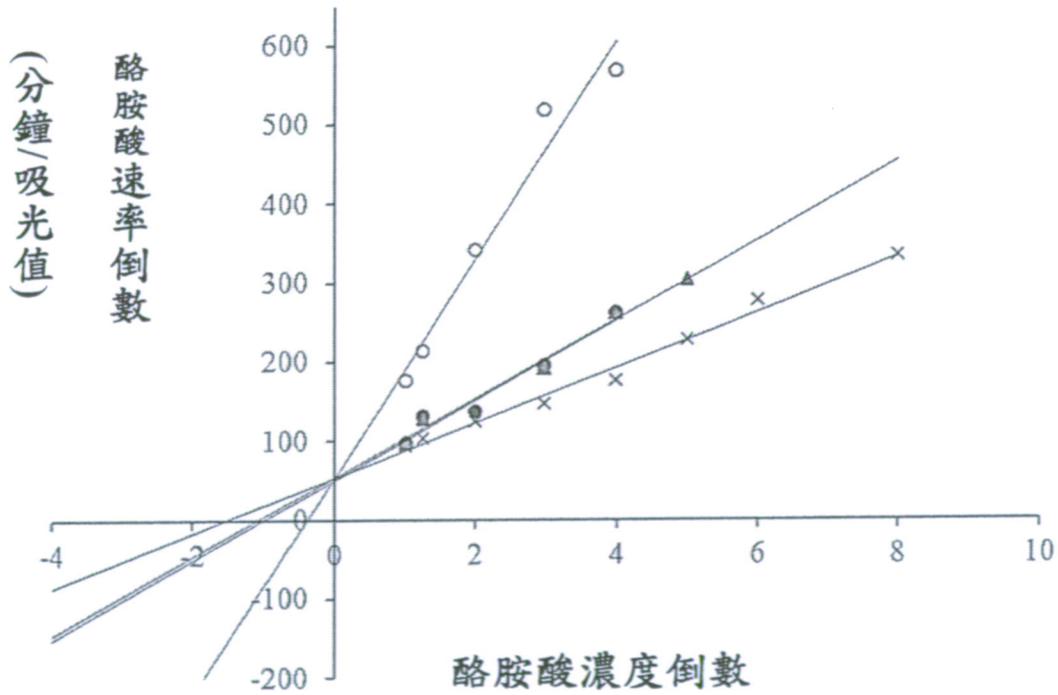
八、圖式：



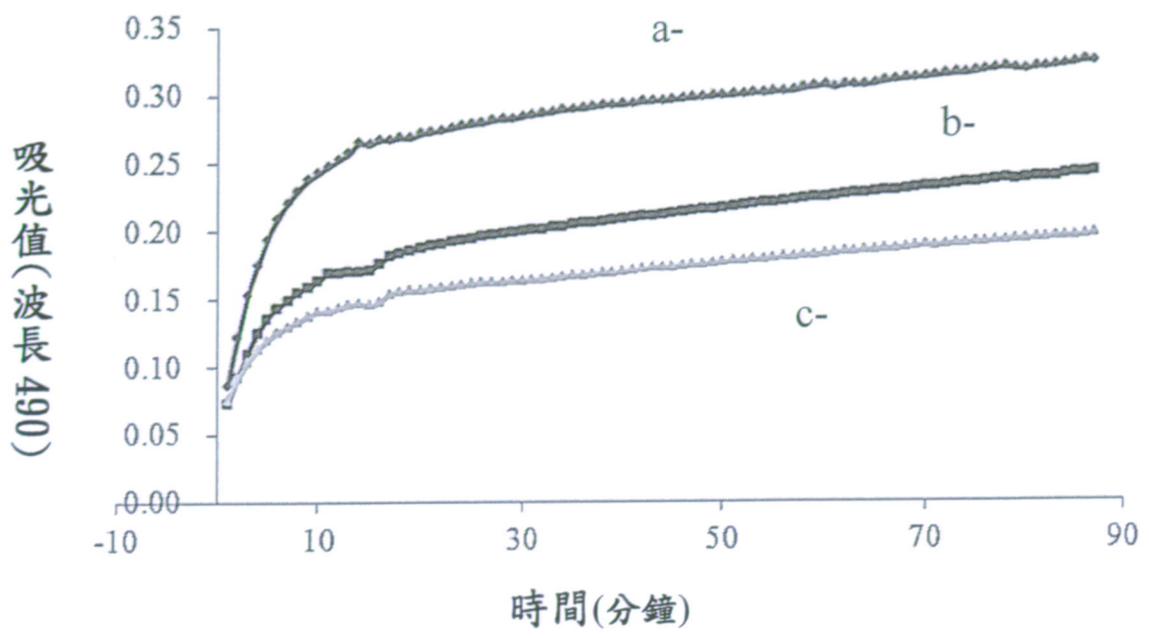
第一圖



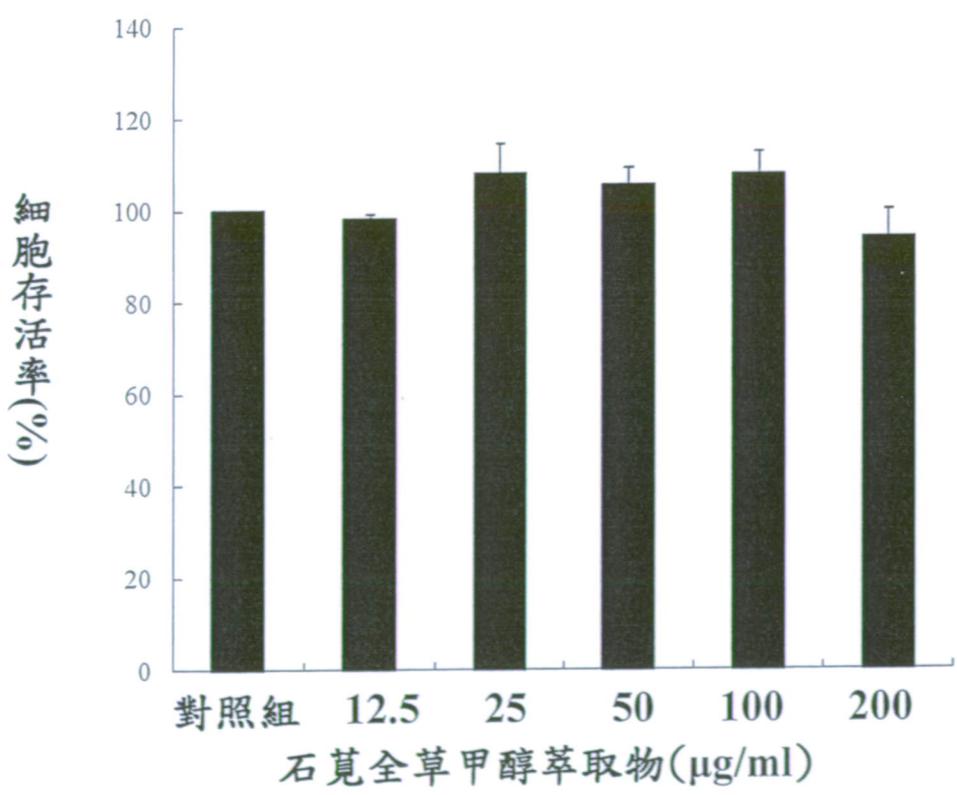
第二圖



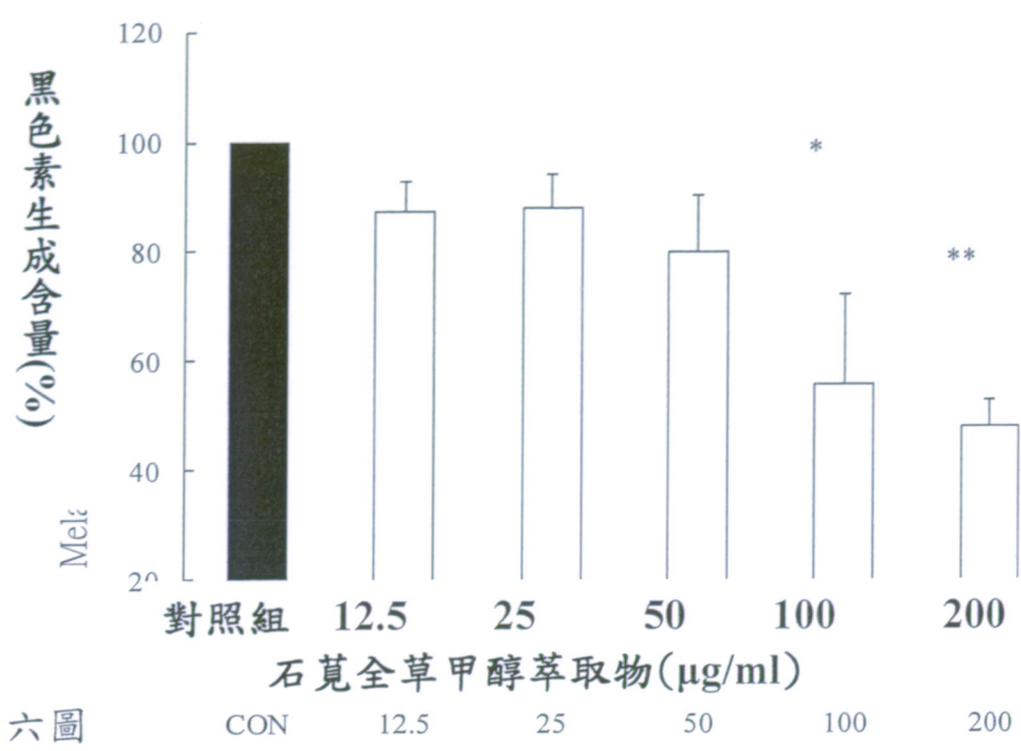
第三圖



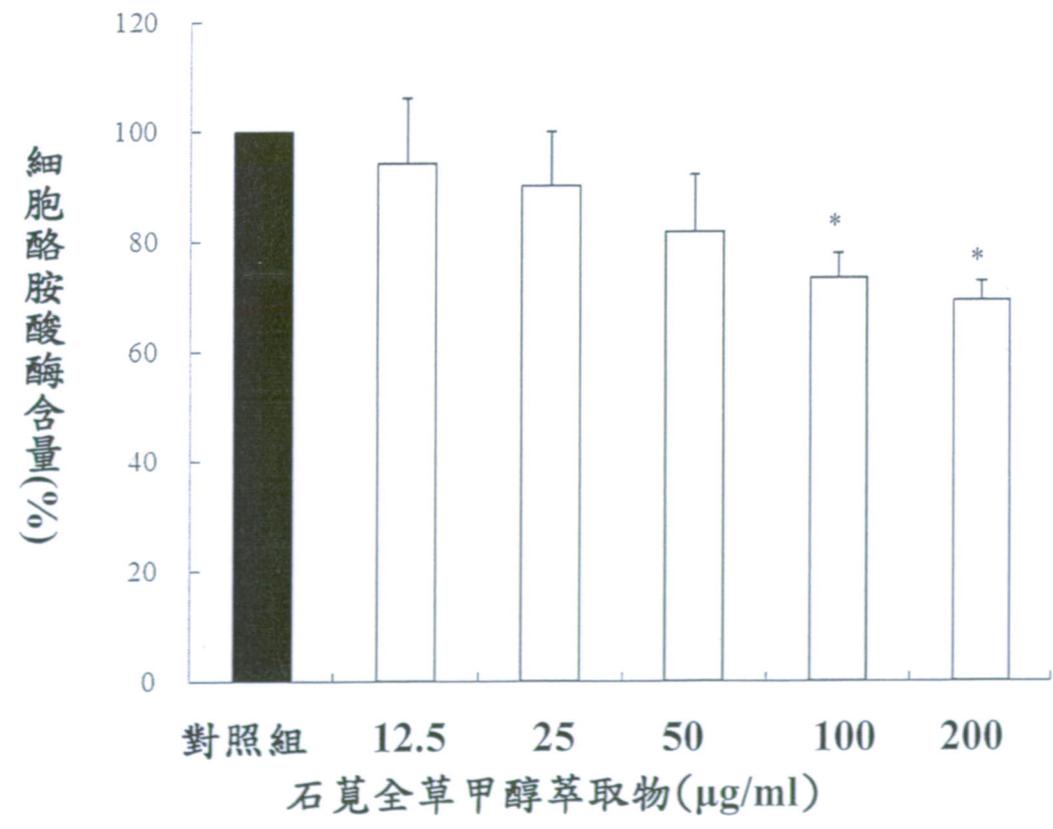
第四圖



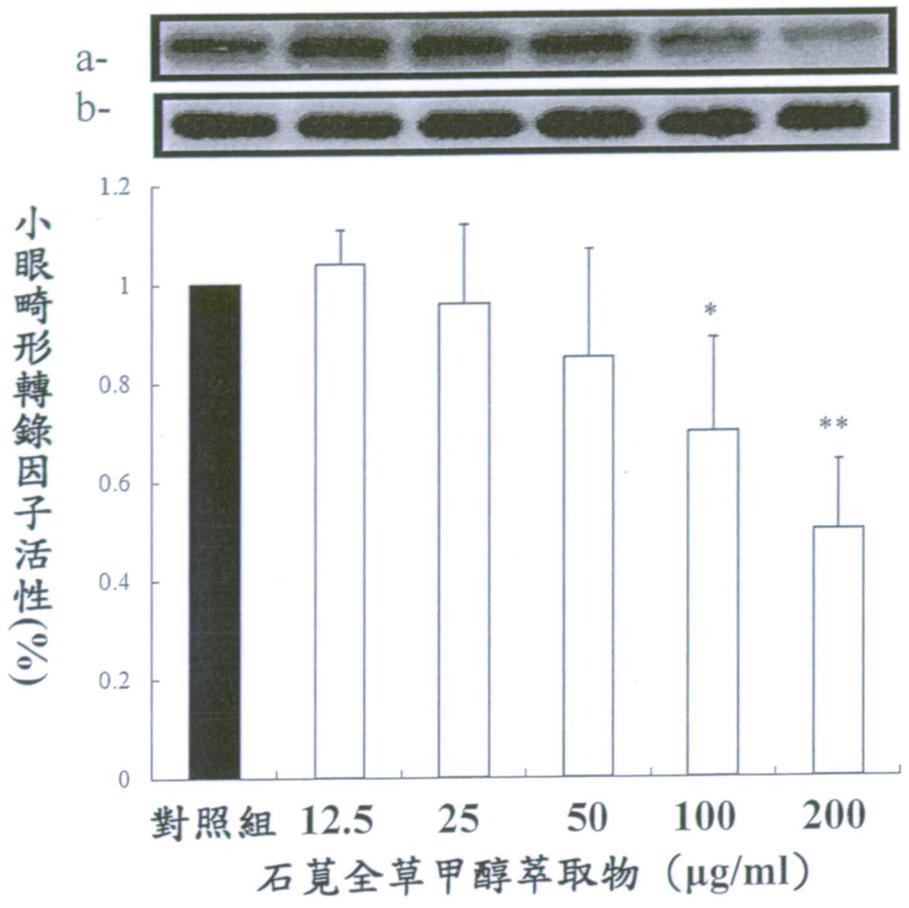
第五圖



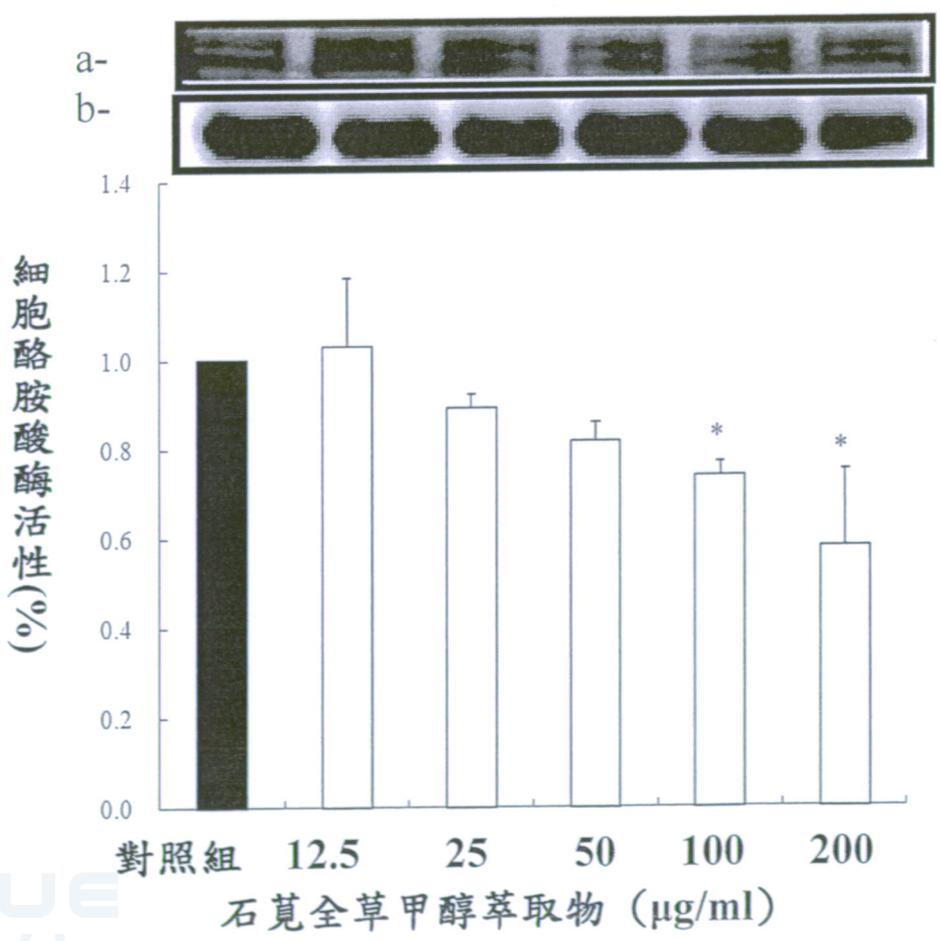
第六圖



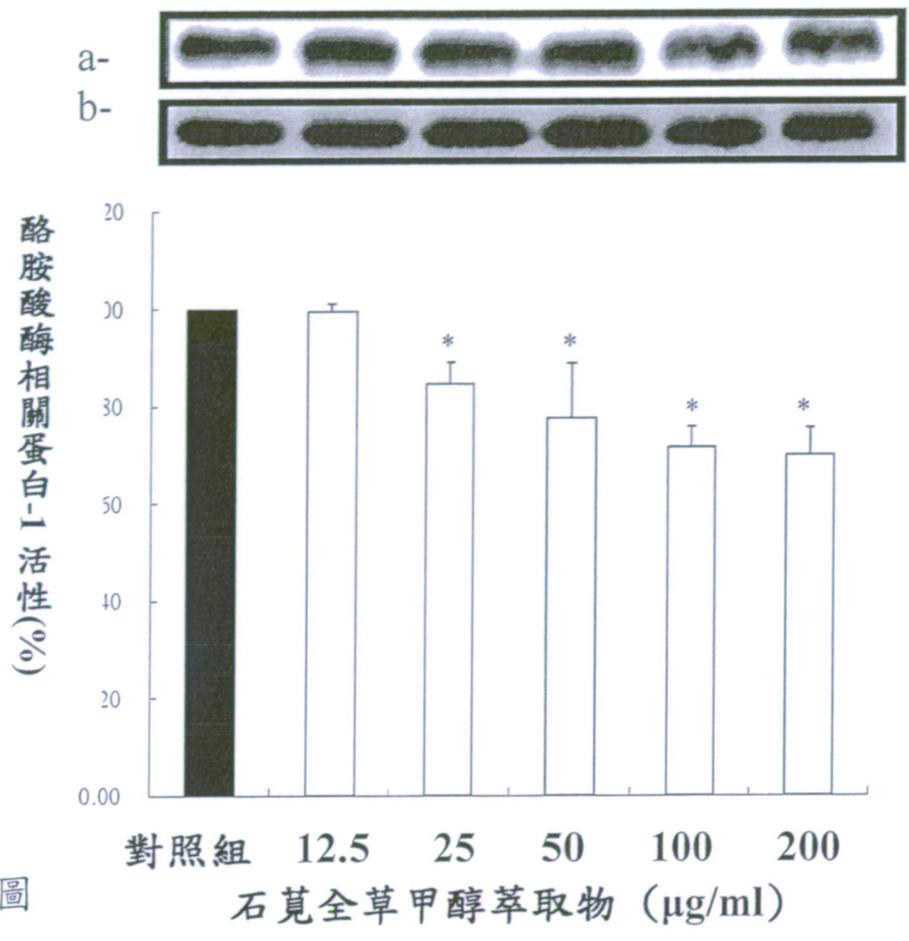
第七圖



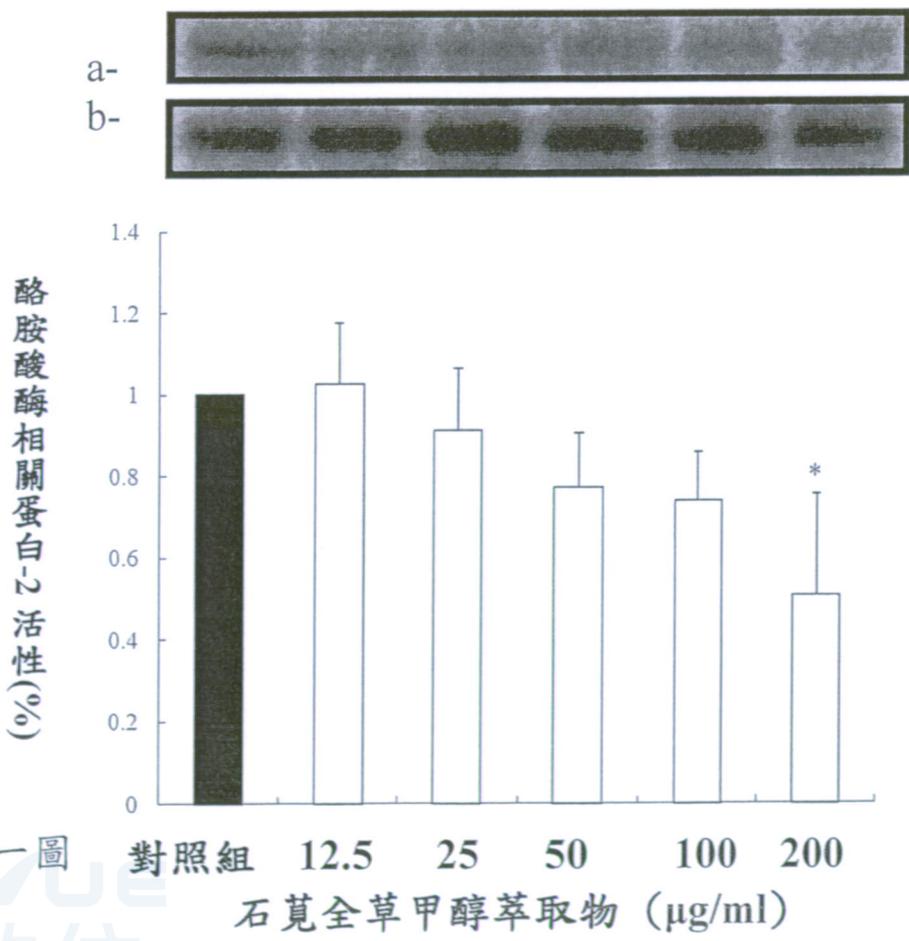
第八圖



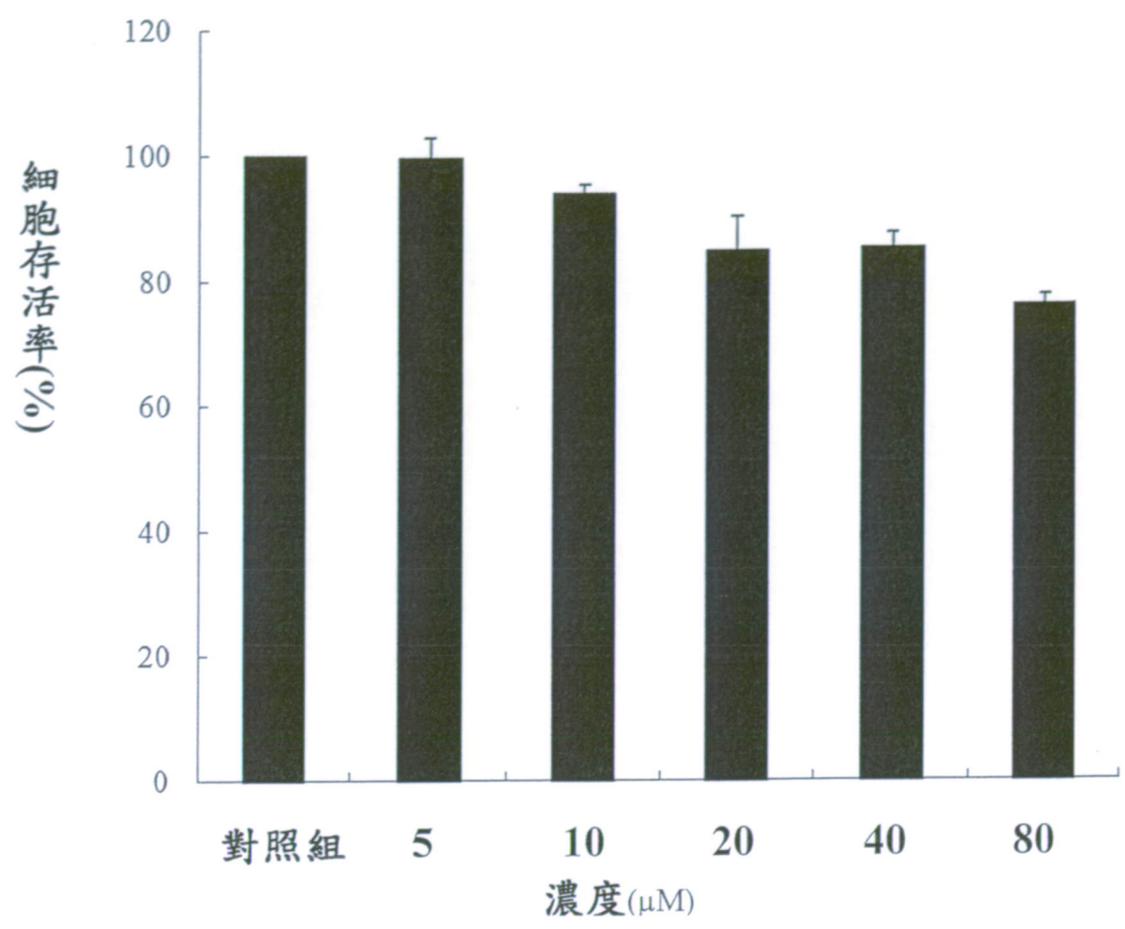
第九圖



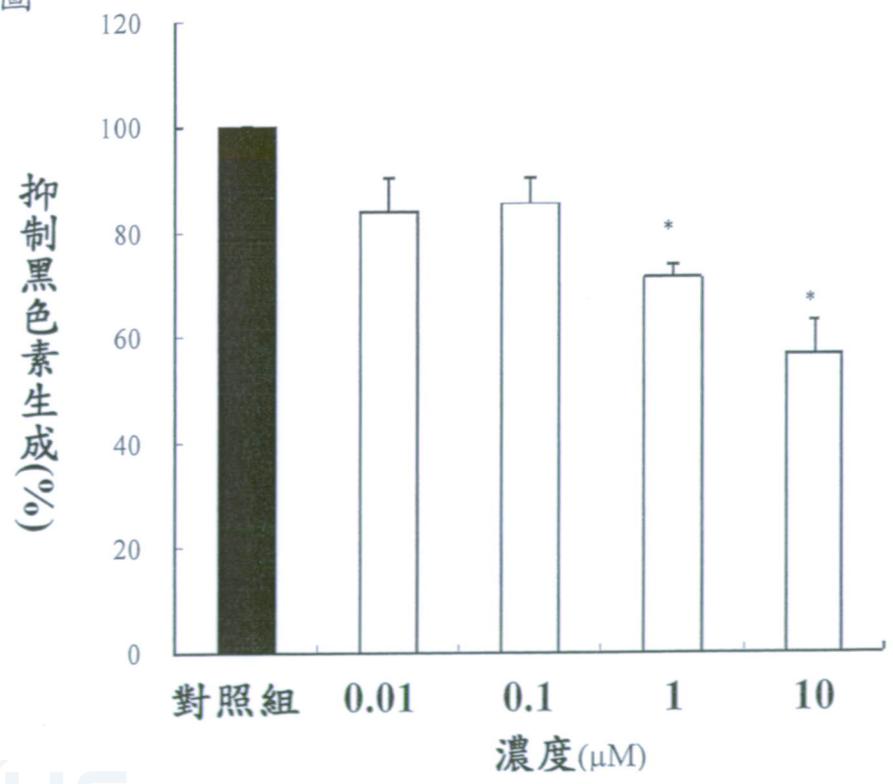
第十圖



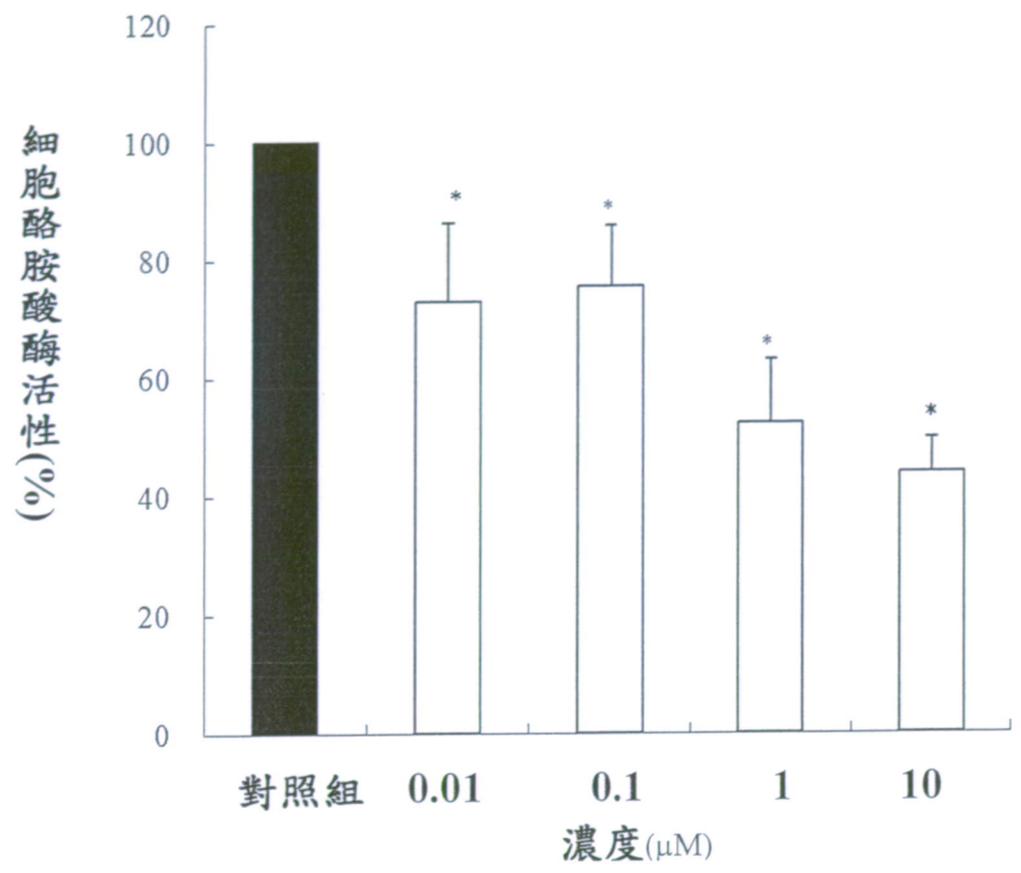
第十一圖



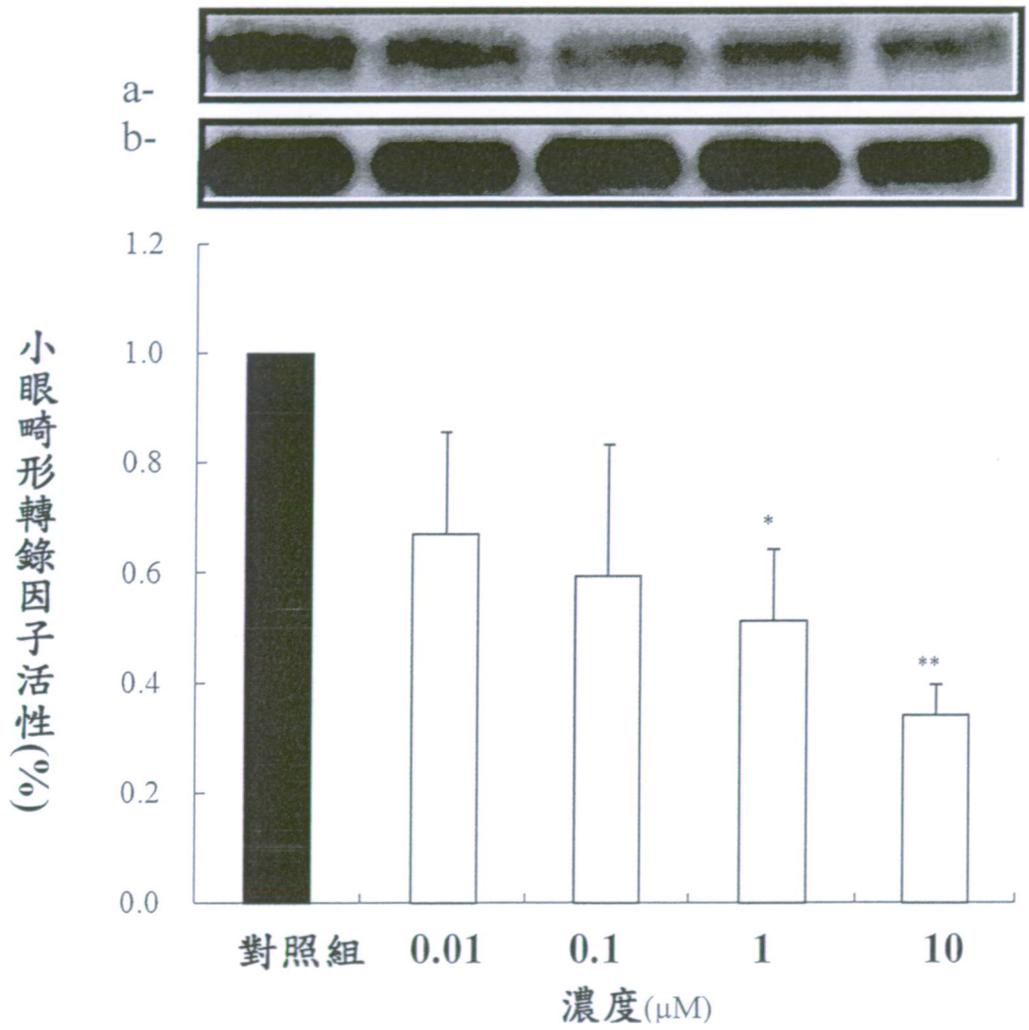
第十二圖



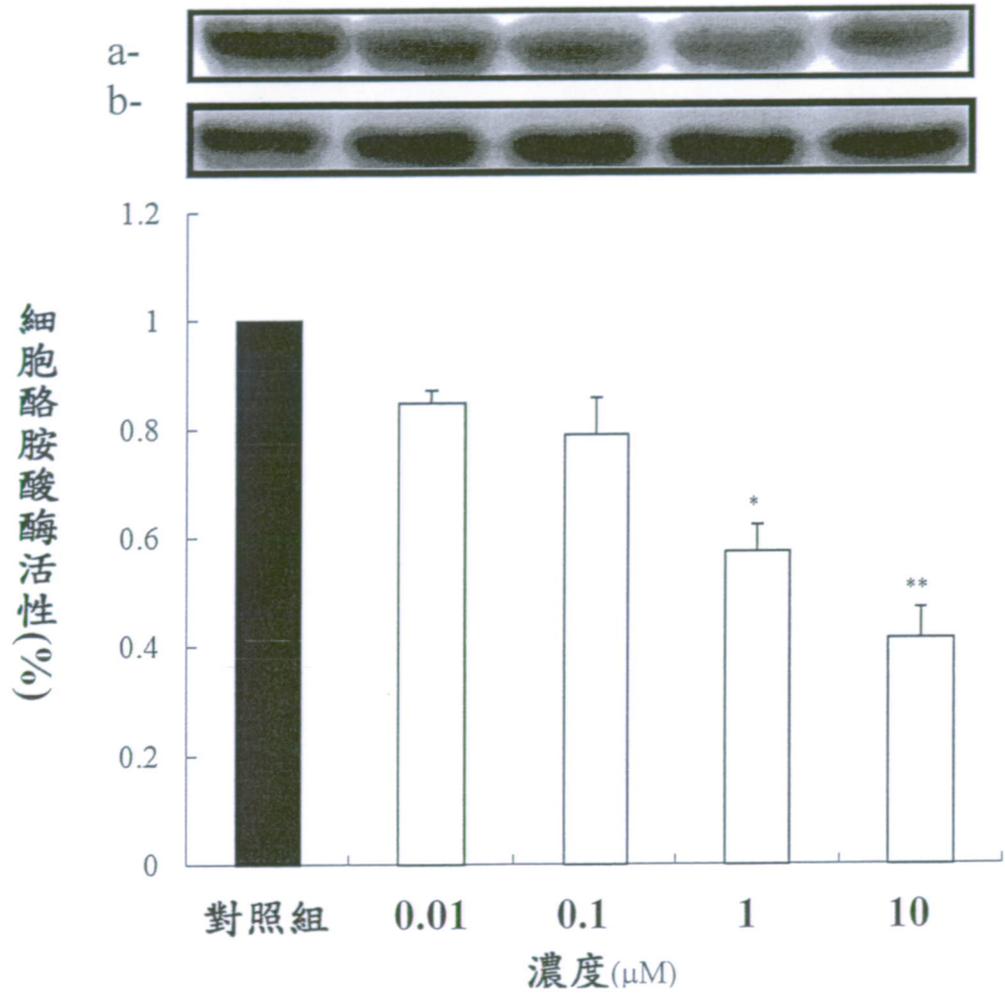
第十三圖



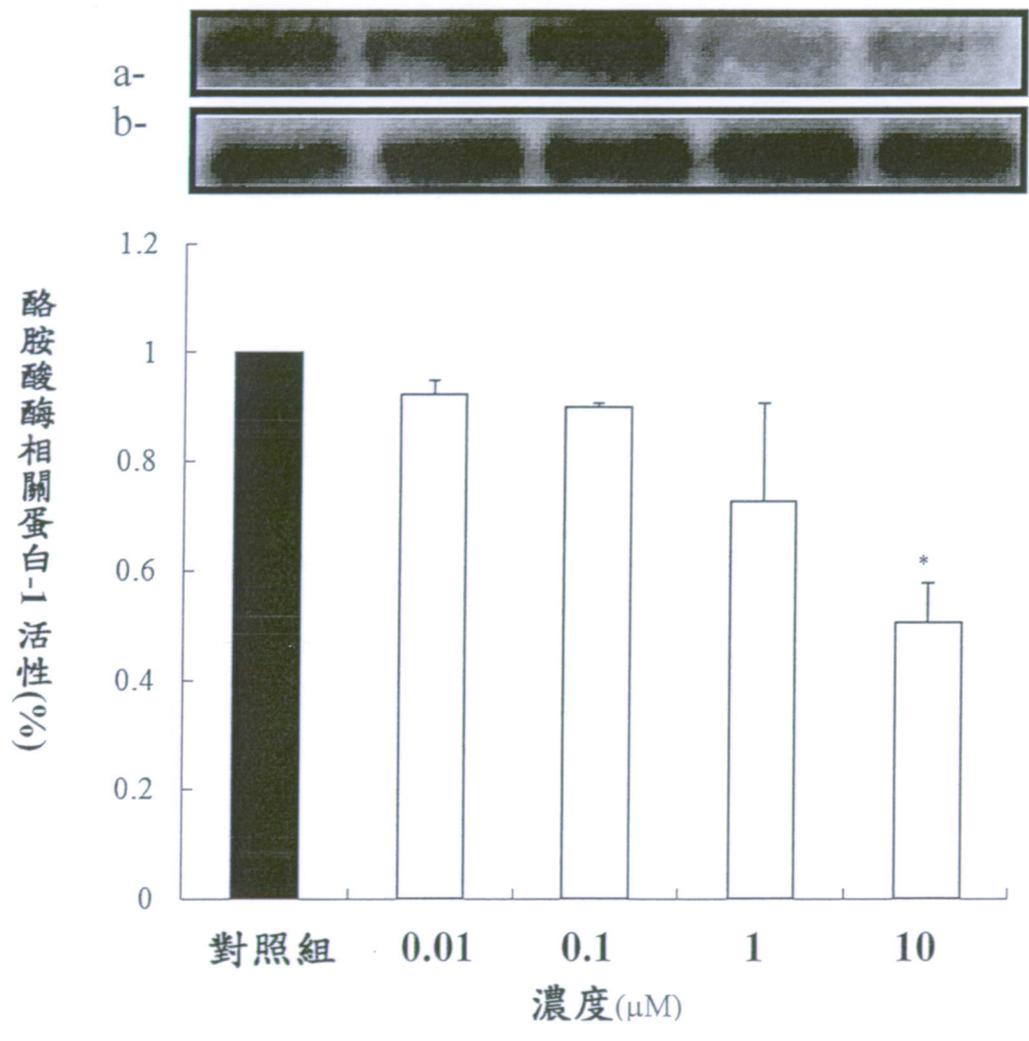
第十四圖



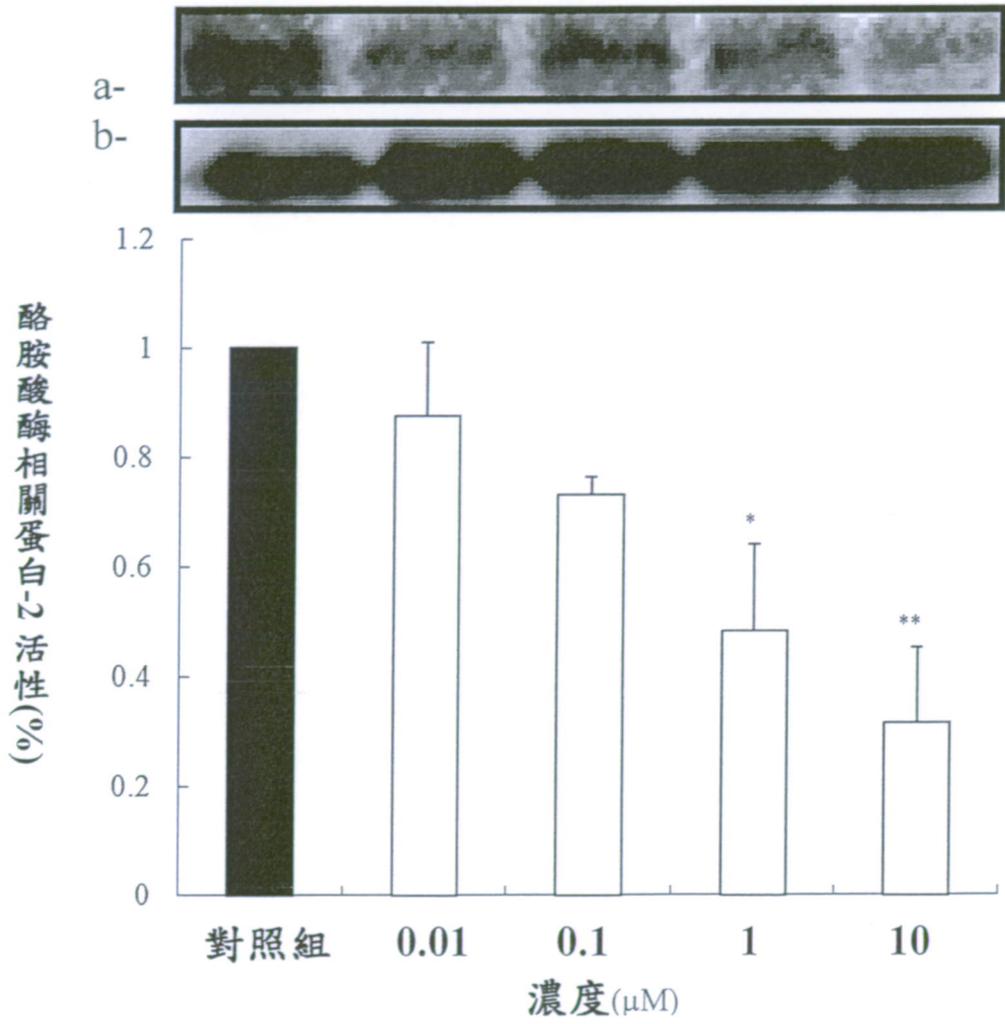
第十五圖



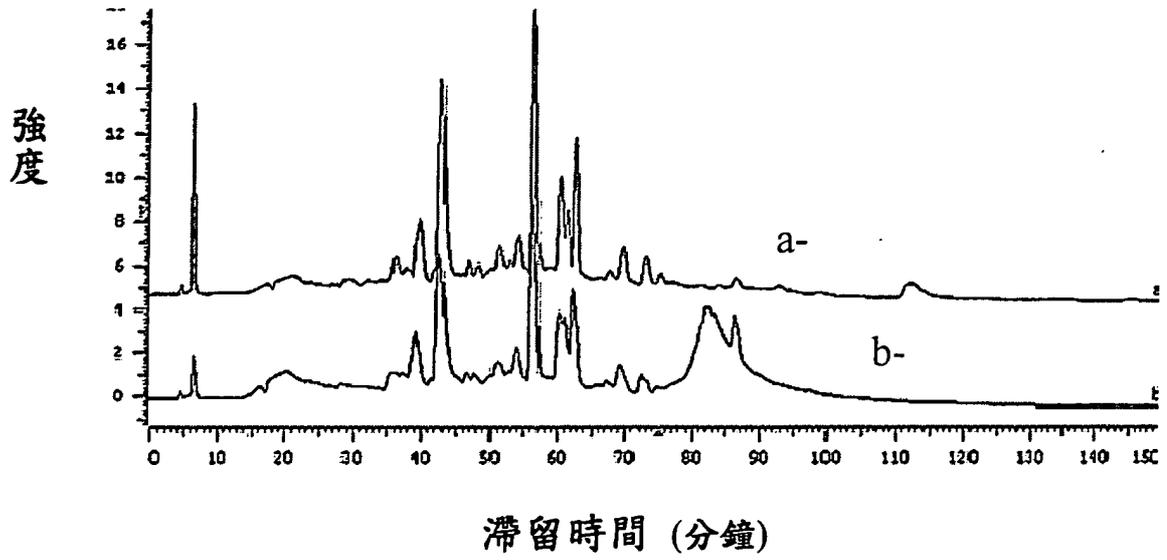
第十六圖



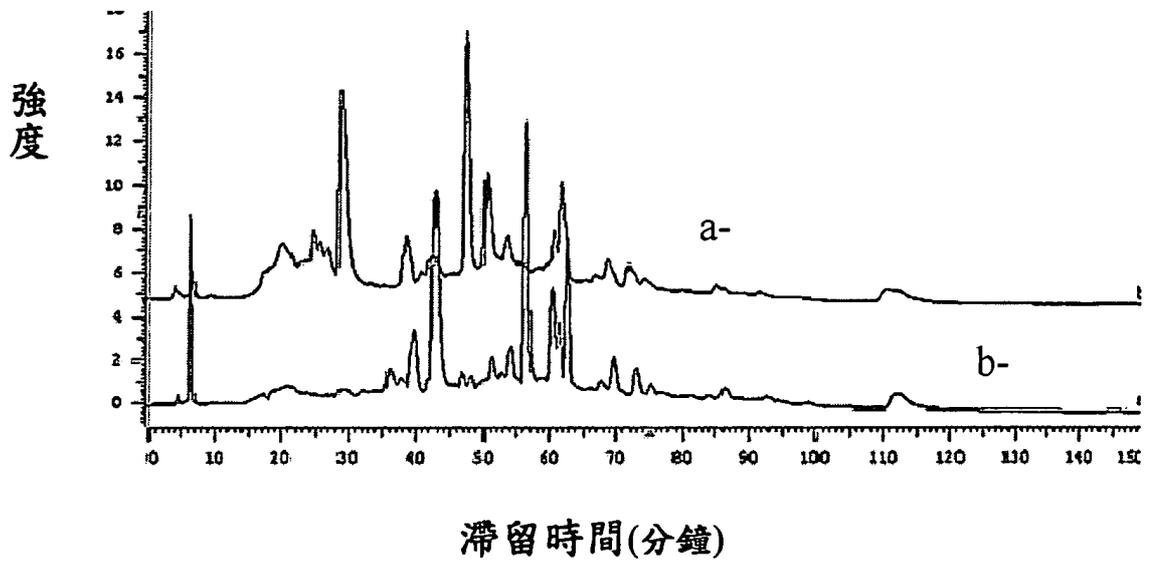
第十七圖



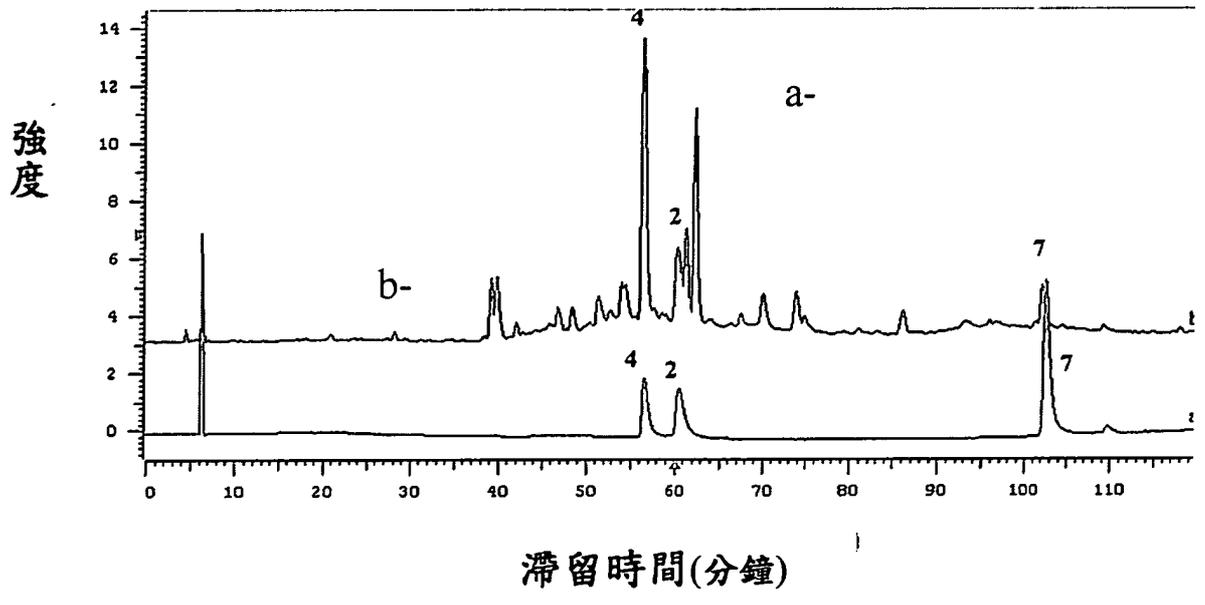
第十八圖



第十九圖



第二十圖



第二十一圖