

發明專利說明書

PD1072836(3)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96132173

A61K 8/97 (2006.01)

※申請日期：96.8.30

A61K 36/00 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 8/60 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 31/1034 (2006.01)

美白劑

A61Q 19/02 (2006.01)

WHITENING AGENT

A61K 31/1048 (2006.01)

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文) (簽章) ID：

札幌啤酒股份有限公司(サッポロビール株式会社)

SAPPORO BREWERIES LIMITED

代表人：(中文/英文) (簽章)

福永勝

FUKUNAGA, MASARU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都渋谷區惠比壽四丁目 20 番 1 號

20-1, Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中文/英文)

日本

Japan

三、發明人：（共4人）

姓名：（中文/英文） ID：

- 1.成田悠岐/NARITA, YUKI
- 2.瀨川修一/SEGAWA, SYUICHI
- 3.中北保一/NAKAKITA, YASUKAZU
- 4.高田善浩/TAKATA, YOSHIHIRO

國籍：（中文/英文）

- 1.~4.日本
Japan

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

日本 2006/09/01 特願 2006-238049

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

三、發明人：（共4人）

姓名：（中文/英文） ID：

- 1.成田悠岐/NARITA, YUKI
- 2.瀨川修一/SEGAWA, SYUICHI
- 3.中北保一/NAKAKITA, YASUKAZU
- 4.高田善浩/TAKATA, YOSHIHIRO

國籍：（中文/英文）

- 1.~4.日本
Japan

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

日本 2006/09/01 特願 2006-238049

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明為有關美白劑。

【先前技術】

忽布 (*Humulus lupulus*) 為製造啤酒不可欠缺之原料，予以啤酒苦味或香味、改善發泡·久泡性，並提高清澄性，也抑制雜菌之繁殖。又因忽布有健胃、促進消化等藥理作用，以往也作為藥用植物利用。

近年，著眼於如此忽布之有用性，試用其萃取物於啤酒以外之用途。提案例如以忽布萃取物為有效成分之耐熱性嗜酸性菌增殖抑制劑(專利文獻 1)，以忽布萃取物為有效成分之米加工食品用香味改良劑(專利文獻 2)，含有忽布萃取物之入浴劑(專利文獻 3)，具有活性酸素消去作用之萃取物(專利文獻 4)等用途。

對於忽布萃取物，也檢討用於皮膚外用劑，例如於含有由半日花科(Cistaceae)之植物體萃取之成分之皮膚外用劑，與此成分併用之植物萃取物之一例可舉出忽布萃取物(專利文獻 5)。

【專利文獻 1】特開 2005-137241

【專利文獻 2】特開 2005-269988

【專利文獻 3】特開平 9-67245

【專利文獻 4】特開平 4-202138

【專利文獻 5】特開 2003-300859

【發明內容】

發明欲解決之課題

但於忽布因多含萃取可能之成分，故若萃取媒體或萃取溫度等萃取條件相異，則得組成相異之萃取物，萃取物所奏效也成異質者。故以忽布萃取物為皮膚外用劑之一成分來適用時，也由萃取條件而美白效果等外用劑之效果不充分之場合也多。

於是本發明之目的為提供含有忽布萃取物，而美白效果特優之美白劑。

解決課題之手段

為達成上述目的，本發明為提供以忽布組織之冷水萃取物為有效成分之美白劑。

於此依冷水萃取之忽布萃取物以由羊齒精、羊齒精丙二醯基葡萄糖苷、異櫟素、異櫟素丙二醯基葡萄糖苷、櫟精丙二醯基葡萄糖苷、萘三羥黃酮醇芸香糖苷、萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷、芸香素及根皮醯苯配糖體而成之群選擇之類黃酮配糖體含有至少 1 種較佳，根皮醯苯衍生物以由根皮異丁醯苯-2-O- β -D-葡萄吡喃糖苷、根皮-2-甲基丁醯苯-2-O- β -D-葡萄吡喃糖苷及根皮異戊醯苯-2-O- β -D-葡萄吡喃糖苷而成之群選擇之至少 1 種較佳。

因上述成分以高含有率萃取，故忽布組織以忽布之莖、球花或葉較佳，乾燥之忽布花苞之粉碎物特佳。由同樣之觀點，忽布組織以由乾燥忽布球花之粉碎物、忽布花粉(lupulin)之大小以下之粉碎物之至少一部分去除者較佳，乾燥之忽布球花之粉碎物可用乾燥之忽布球花之凍結物之

粉碎物。忽布組織可用由乾燥之忽布球花令以有機溶劑萃取或超臨界流體萃取來萃取之物質之至少一部分，由該忽布球花去除所得之忽布殘渣。

如此美白劑當然可以皮膚外用劑或其一成分使用，唯也可以經口攝取型美白劑來機能。

發明之效果

提供含有忽布萃取物而美白效果特優之美白劑。

【實施方式】

實施發明之最佳形態

以下說明本發明美白劑之較佳實施形態。

本發明之美白劑之有效成分為忽布組織之冷水萃取物，任何品種之忽布皆可為冷水萃取之對象。但依所得萃取成分之美白效果高，以捷克產札字種、德國產哈拉島得拉得雄種、日本產富良野 18 號、其中日本產等啤酒釀造用忽布品種較佳、尤以捷克產札字種特佳。

本發明中忽布組織乃指忽布之任何組織或其一部分。冷水萃取所用忽布組織也可為葉、莖及球花之任一，以球花較佳，尤以忽布花苞更佳。忽布花苞乃指構成球花之花苞葉，可由球花去除忽布花粉部分(黃色之顆粒)之至少一部分而得。故本發明之冷水萃取所用忽布組織可為啤酒等發泡性酒精飲料之釀造所用忽布柱粒加工之際不粉碎成規定大小而捨棄之忽布花苞，也可為後述令忽布球花以超臨界流體或有機溶劑萃取後殘留之忽布殘渣。

忽布組織之冷水萃取物為令忽布組織以具備冷水萃取工

程之製法而得。於此「冷水」乃指室溫以下之水，通常指超過 0°C 而 50°C 以下之水。冷水之溫度以超過 0°C 而 40°C 以下較佳，5°C 以上 30°C 以下更佳，尤以 10°C 以上 30°C 以下更較佳，以 20±5°C (更以 20±3°C) 特佳。使用如此溫度之冷水，則萃取有效率，萃取物產量增多。使用 0°C 以下之冷水，則冷卻成本增大，使用超過 40°C 之水，則有連誘發炎症作用之成分也溶出之傾向。又為縮短萃取時間，可於水添加少量之醇，較佳為乙醇，10 質量%以下。

由忽布組織得萃取物之方法，可廣泛採用由植物以水萃取天然物之方法，例如令忽布組織和一定量之冷水投入容器，適宜攪拌並靜置所定時間，過濾萃取液而去除殘渣之方法。欲完全去除混入之殘渣或不純物等，可更離心過濾之萃取液，令其上清(以下稱離心上清)作為冷水萃取物使用。又所得之冷水萃取物也可濃縮、乾燥而使用。

忽布組織之冷水萃取物也可通經充填合成吸著劑之柱而精製來使用。合成吸著劑可為例如 Amberlite XAD-4、7 及 16(Organo 公司)、活性碳、聚乙烯吡咯啉酮(PVPP;多酚吸著劑)，其中以 Amberlite XAD-4 較佳。具體而言，可令忽布組織之冷水萃取物通經充填合成吸著劑之柱，令其吸著成分以例如水及甲醇之混合溶劑溶出，而使用溶出之劃份。

本發明之美白劑以乾燥之忽布花苞之粉碎物之冷水萃取物為有效成分較佳，又以由乾燥之忽布球花之粉碎物去除忽布花粉之大小以下之粉碎物之至少一部分者之冷水萃取

物為有效成分較佳。冷水萃取所用乾燥忽布球花之粉碎物可由具備例如令忽布球花乾燥而得乾燥忽布球花之乾燥工程，令乾燥忽布球花粉碎而得粉碎物之粉碎工程，由此粉碎物去除忽布花粉大小以下之粉碎物之選別工程之製法而得。

於乾燥工程，可令忽布球花於 100°C 以下之溫度乾燥，使忽布球花水分去除至保存可能之程度，唯以 55°C 以下之溫度乾燥至水分含量 $7\sim 9\%$ 較佳。於粉碎工程，可令忽布球花有效率粉碎成微粉狀即可，可用例如針磨、錘磨、球磨等粉碎機。於選別工程，可令粉碎物通過篩，例如令長徑 0.1mm 以上之粉碎物作為「超過忽布花粉之大小」者選別。於此場合中以不通過篩之大小為長徑 0.3mm 以上較佳，長徑 0.5mm 以上更佳。欲由乾燥忽布球花之粉碎物去除忽布花粉之大小以下之粉碎物，則例如以篩孔 0.1 、 0.3 或 0.5mm 之篩篩選乾燥忽布球花之粉碎物，回收不通過篩之粉碎物即可。又由乾燥忽布球花之粉碎物去除忽布花粉之大小以下之粉碎物之至少一部分者之冷水萃取物，可令如此選別之乾燥忽布球花之粉碎物，依上述以冷水萃取之工程記載之方法萃取即可。

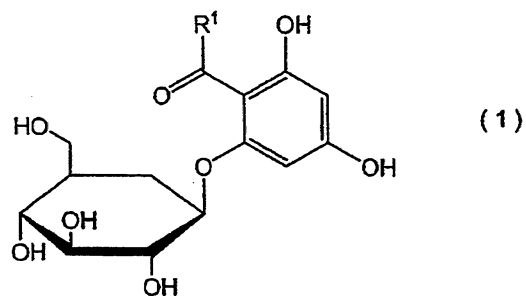
更於本發明中使用之乾燥忽布球花之粉碎物以乾燥忽布球花之凍結物之粉碎物較佳。令乾燥忽布球花凍結之方法無特限，凍結溫度以 -10°C 以下較佳， -35°C 以下更佳。

又冷水萃取物可為令由乾燥忽布球花依有機溶劑萃取或超臨界流體萃取而萃取之物質之至少一部分，由該忽布球

花去除所得之忽布殘渣之冷水萃取物。有機溶劑萃取所用有機溶劑可為例如醇或己烷，以碳數 1~4 之低醇較佳，乙醇更佳。超臨界流體萃取所用超臨界流體可為例如二氧化碳、水、甲烷、乙烷、乙烯、丙烷、戊烷、甲醇、乙醇，以二氧化碳較佳。

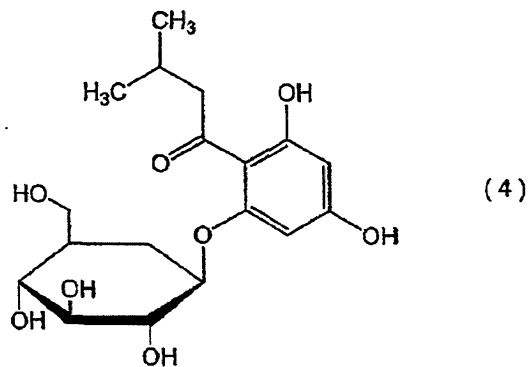
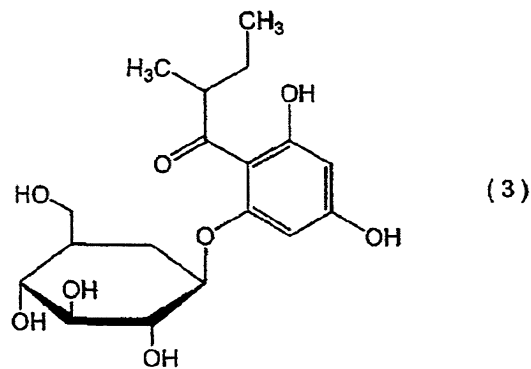
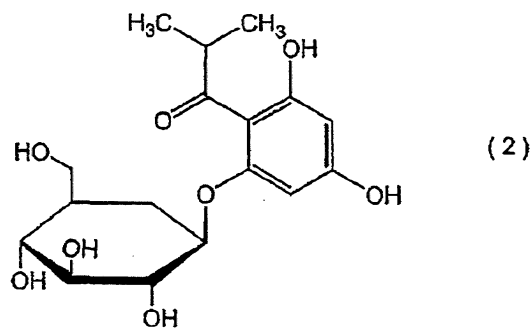
冷水萃取物典型為含有至少 1 種由羊齒精、羊齒精丙二醯基葡萄糖苷、異櫟素、異櫟素丙二醯基葡萄糖苷、櫟精丙二醯基葡萄糖苷、萘三羥黃酮醇芸香糖苷、萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷、芸香素及根皮醯苯配糖體而成之群選擇之類黃酮配糖體。

於此根皮醯苯配糖體可以如下式(1)表示。



[式(1)中 R^1 為異丙基、異丁基或第二丁基]。

若式(1)中 R^1 為異丙基時，根皮醯苯配糖體為如下式(2)所示之根皮異丁醯苯-2-O- β -D-葡萄吡喃糖苷，若 R^1 為異丁基時，根皮醯苯配糖體為如下式(3)所示之根皮-2-甲基丁醯苯-2-O- β -D-葡萄吡喃糖苷， R^1 為第二丁基時，根皮醯苯配糖體為如下式(4)所示之根皮異戊醯苯-2-O- β -D-葡萄吡喃糖苷。



美白劑中，忽布組織之冷水萃取物之含有量為以除去萃取媒體之成分按美白劑全質量基準以 0.0001~100 質量%較佳，0.01~100 質量%更佳，1~100 質量%更較佳，尤以 5~100 質量%特佳。

美白劑除忽布組織之冷水萃取物之外，可含有浸潤劑、油性成分、保濕劑、粉體、色素、乳化劑、分散助劑、可溶化劑、洗淨劑、紫外線吸收劑、增粘劑、藥劑、香料、樹脂、賦形劑、防菌防黴劑、消臭·脫臭劑、酵素、精製

水、醇。又可添加其他美白劑。

本發明之美白劑可以其單獨具有美白效果之皮膚外用劑適用於皮膚等，也可於化粧品或藥劑添加而於這些附與美白效果作為美白效果附與劑來使用。更也可作為服用而發揮美白效果之經口攝取型美白劑利用。

【實施例】

以下基於實施例及比較例更具體說明本發明，但本發明不受下列實施例限定。

[製造例 1]

冷水萃取：

令忽布(日本產富良野 18 號)之葉切碎，浸漬於 10 倍量(w/v)之蒸餾水而於 5℃ 靜置一晚。令此以 9200G 15 分之離心後，回收上清，得忽布之葉之冷水萃取物。

冷水萃取物之鑑定：

所得之冷水萃取物移入分液漏斗，加己烷而捨棄己烷移行成分。更於水層加乙酸乙酯，而捨棄乙酸乙酯移行成分。最後於水層加正甲醇，反復甲醇萃取操作 3 回所得甲醇層予以合併，減壓濃縮，得黃酮醇劃份(由忽布組織之冷水萃取物分離之類黃酮配糖體)。

所得黃酮醇劃份先以高速液體層析(HPLC)分析。依 HPLC 之分析令 C18 柱(Waters Symmetry)於 40℃ 使用，流速作成 0.2mL/分。移動相以 0.05% TFA/水為 1 液，以乙腈為 2 液，2 液之比例作成至 10%~50%以 16 分變化之線斜率。檢出以 350nm 之 UV 檢出器施行。

更令上述黃酮醇劃份之各峰以分取用 HPLC 分離、鑑定各峰之成分。依 HPLC 之分取用分離為令 C18 柱(Waters SunFire)於 40℃ 使用，流速作成 6mL/分。移動相為令 10%MeCN 保持 10 分，更以 150 分作成至 60% MeCN 變化之線斜率。檢出以 350nm 之 UV 檢出器施行。HPLC 之分析結果如第 1 圖。

如第 1 圖所示，於忽布葉之冷水萃取物之黃酮醇劃份有主峰 3 個存在，這些皆鑑定為萘三羥黃酮醇配糖體。詳言之，第 1 圖之 1 所示峰為萘三羥黃酮醇芸香糖苷、2 所示峰為羊齒精、3 所示峰為萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷。

[製造例 2]

冷水萃取：

令忽布(捷克產札字種)之型 90 柱粒 1kg 投入蒸餾水 10L，於 20℃ 適宜攪拌下使柱粒消失而靜置一晚。令此以 9200G 離心 15 分。離心機用日立公司製之 CR21G。離心後，回收上清，其更予以濃縮，得 150g 之濃縮液(以下稱冷水萃取物 A)。

冷水萃取物之鑑定：

製造冷水萃取物 A 時所得上清移入分液漏斗，仿製造例 1 之方法取得黃酮醇劃份，以 HPLC 分析而施行成分鑑定。HPLC 分析之結果如第 2 圖。如第 2 圖所示，於冷水萃取物 A 之黃酮醇劃份有主要峰 3 個存在，這些鑑定為萘三羥黃酮醇配糖體(羊齒精及萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷

)和櫟精丙二醯基葡萄糖苷。詳言之，第 2 圖之 1 所示峰為萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷、2 所示峰為羊齒精、3 所示峰為櫟精丙二醯基葡萄糖苷。又第 2 圖之 4 所示峰為芸香素、5 所示峰為異櫟素、6 所示峰為萘三羥黃酮醇芸香糖苷。

[製造例 3]

冷水萃取：

令乾燥忽布(中日本產)之球花予以超臨界 CO₂ 萃取，其殘渣予以柱粒化。此柱粒 1000kg 投入自來水 20kL，於 20℃ 適宜攪拌下使柱粒消失而靜置 12 時間。令此以 500G 離心後，回收上清，使其更濃縮，得 960kg 濃縮液(以下稱冷水萃取物 B)。冷水萃取物 B 中之固形分為 192kg。以下實施例中，令此固形分調製成該濃度來使用。

冷水萃取物之鑑定：

令冷水萃取物 B 就製造時所得上清，仿製造例 2 之方法施行 HPLC 分析，結果於冷水萃取物 B 之黃酮醇劃分有主要峰 3 個存在，這些鑑定為萘三羥黃酮醇配糖體(羊齒精及萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷)和櫟精丙二醯基葡萄糖苷。

[實施例 1-1] 酪胺酸酶活性抑制試驗 1

於本試驗以冷水萃取物 A(製造例 2 所得者)及冷水萃取物 B(製造例 3 所得者)為試料使用。試驗依如下順序施行。

於容器加 L-酪胺酸 40mg 和 MilliQ 水作成 100mL。其

容器於有熱水之燒杯中加溫。更用超音波，使 L-酪胺酸溶解於 MilliQ 水，作成酪胺酸溶液。令酪胺酸溶液分注而冷凍保存。

調製含有磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 4.536g 之酸性 MilliQ 水溶液 500mL，作為 A 液。調製含有磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4) 4.73g 或磷酸氫二鈉 12 水合物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12$ 水加成物) 11.938g 之 pH9 程度之 MilliQ 水溶液 500mL，作為 B 液。令 A 液與 B 液以 1:1 之比例混合，而調製 PH6.8 之 1/15M 磷酸緩衝液。

冷水萃取物 A 及冷水萃取物 B 各以 MilliQ 水稀釋，而調製各濃度之試料溶液。每一濃度之試料溶液預備 10mL 扭口試管 4 支。4 支之試管中，2 支作為樣品 (+) 用，殘留之 2 支作為樣品 (-) 用。又預備對照組用之扭口試管 4 支，其中 2 支作為對照組 (+) 用，殘留之 2 支作為對照組 (-) 用。於此 (+) 為添加酪胺酸溶液，(-) 為不添加酪胺酸溶液。以下調製各試管之反應溶液。表 1 乃示各試管之反應溶液之組成。

【表 1】

	As 樣品(+)	Ab 對照組(+)	As' 樣品(-)	Ao 對照組(-)
酪胺酸溶液之有無	+	+	-	-
試料溶液	2ml	無	2ml	無
1/15M 磷酸緩衝液	2ml	2ml	2ml	2ml
酪胺酸溶液	0.5ml	0.5ml	無	無
MilliQ 水(液量調整)	無	2ml	0.5ml	2.5ml
酵素溶液	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml

依表 1，於樣品 (+) 用試管及樣品 (-) 用試管，各添加試料溶液 2mL。於對照組 (+) 用試管及對照組 (-) 用試管，試料溶液代之以 MilliQ 水各添加 2mL。次於所有之試管各添加 PH6.8 之 1/15M 磷酸緩衝液 2mL。

於樣品 (+) 用試管及對照組 (+) 用試管，各添加酪胺酸溶液 0.5mL。於樣品 (-) 用試管及對照組 (-) 用試管，酪胺酸溶液代之以 MilliQ 水各添加 0.5mL。

於 Falcon 管投入必要量程度之酪胺酸酶，量其重量。依酪胺酸酶之量加 MilliQ 水，調製 1000 單位/mL 之酵素溶液。酵素溶液乃於使用即前調製。所有試管皆添加酵素溶液 0.5mL，試管加蓋，以渦流攪拌之作業每隔 15 秒施行。

所有試管設定於保持 37°C 之恆溫振盪器內，以 70/分振盪 1 小時。由恆溫振盪器取出所有試管，混合 2、3 次，為使酵素反應停止而冰冷 5 分。於充分冷卻之 96 穴板，令各試管之溶液注意不加溫並各添加 300 μ L，用板讀機測定 475nm 之吸光度。歸零以 MilliQ 水施行。

由樣品 (+)、對照組 (+)、樣品 (-)、對照組 (-) 用試管之溶液測定之吸光度之值各為 A_s 、 A_b 、 A_s' 、 A_o 時，依下式求出值作為酪胺酸酶活性抑制率。第 3 圖為展示冷水萃取物 A 及冷水萃取物 B 之酪胺酸酶活性抑制率 (%) 之圖。作為正對照組使用麴酸之 MilliQ 水稀釋液。

$$[(A_b - (A_s - A_s')) / (A_b - A_o)] \times 100(\%)$$

如第 3 圖所示，因冷水萃取物 A 及冷水萃取物 B 之試料溶液而酪胺酸酶活性抑制率上昇。也即得知於冷水萃取物 A 及冷水萃取物 B 具有酪胺酸酶活性抑制作用。尤其於添加冷水萃取物 A 400ppm 之樣品，與對照組相較具有顯著之酪胺酸酶活性抑制作用。

[實施例 1-2] 酪胺酸酶活性抑制試驗 2

於本試驗，以冷水萃取物 C (製造例 1 所得者) 為試料使用。試驗仿實施例 1-1 之順序施行。

試料溶液乃將冷水萃取物 C 以 MilliQ 水稀釋，調製冷水萃取物 C 之 1 倍稀釋溶液 (原液) ($\times 1$)、2 倍稀釋溶液 ($\times 1/2$)、及 10 倍稀釋溶液 ($\times 10$)。酵素反應後之各試管之溶液則於 96 穴板各添加 $200 \mu\text{L}$ 。其他則仿實施例 1-1 之順序，求出酪胺酸酶活性抑制率。第 4 圖展示冷水萃取物 C 之酪胺酸酶活性抑制率 (%)，以對照組 (MilliQ 水) 之酪胺酸酶活性抑制率為 0% 時之相對值之圖。

如第 4 圖所示，因冷水萃取物 C 之試料溶液而濃度依存地酪胺酸酶活性抑制率減少。也即得知與冷水萃取物 C 濃度依存之酪胺酸酶活性抑制作用。

[實施例 2] 對 B16 黑色素瘤培養細胞之黑色素生成抑制試驗

於本試驗，以冷水萃取物 A、冷水萃取物 B 及冷水萃取物 C 為試料使用。試驗以如下順序施行。

於含有 10% 之 FBS(牛胎兒血清)、青黴素及鏈黴素之 Yeagle MEM 培養基，懸浮 B16 黑色素瘤細胞(人類科學資源庫 JCRB0202)呈 1×10^5 細胞/mL，而於板播種。移入調整為 5%CO₂ 之保溫箱，於 37°C 培養 24 小時。於板添加溶解於 DMSO 之試料，於同條件培養 3 日。又試料代之以 DMSO 添加時作為對照組，添加熊果苷(albtin)時為正對照組。

培養後，由胰蛋白酶處理來回收細胞，以血球計算盤測定細胞數。基此算出每穴之細胞數，求出細胞生存率。第 5 圖、第 7 圖、第 9 圖各為冷水萃取物 A、冷水萃取物 B、冷水萃取物 C 添加時之黑色素瘤細胞之細胞生存率，以對照組之細胞生存率為 100% 時之相對值展示之圖。

又細胞數測定後，以磷酸緩衝液 PBS(-)將細胞洗淨而回收。回收之黑色素瘤細胞之白色化狀況以肉眼目視判定。表 2 乃示目視判定之基準。第 6 圖、第 8 圖、第 10 圖各為添加冷水萃取物 A、冷水萃取物 B、冷水萃取物 C 時之黑色素瘤細胞之白色化狀況和目視判定之結果之照片圖。

【表 2】

判定	基準
++	與對照組相較極白色
+	與對照組相較白色
±	與對照組相較稍白色
-	與對照組同黑色

由第 5 圖 ~ 第 10 圖得知，冷水萃取物 A、冷水萃取物 B 及冷水萃取物 C 於無毒性之範圍內依濃度而呈示黑色素生成抑制作用。

[實施例 3]對正常人皮膚 3 次元模式之黑色素生成抑制試驗

於本試驗，以冷水萃取物 A 作為試料使用。試驗仿如下順序施行。

於人正常皮膚 3 次元模式 (MEL-300A (Asian donor)、Lot、No.6761、倉紡)，UVB 以 $31.5\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射。UV 照射乃以透射照明器 DT-20MP (ATTO) 施行。UV 量之測定乃將 UVX 數位輻射計 (UVP Inc.) 裝在 UVX-31 檢出器，而測定 UV310nm 之強度。

第 11 圖為展示皮膚模式杯之構造之斜視圖 (a) 及斷面圖 (b)。皮膚模式杯 100 為於組織培養穴 2 之內部具備培養內管 4。於培養內管之內側依水平方向伸張膜 8，組織培養穴 2 充填培養液 6 至膜 8 之高度。於培養內管 4 中之膜 8 上，設置由人正常表皮角化細胞或黑細胞而成之組織 10。皮膚模式杯 100 中，由培養液 6 通過膜 8 向組織 10 供給營

養。

UV 照射後，於皮膚模式杯之培養液添加試料溶液。試料溶液代之以培養液添加時為對照組。於調整為 5%CO₂ 之保溫箱移入皮膚模式杯，於 37°C 開始培養。培養使用 EPI-100-LLMM 長期維持培養基來施行。24 小時之培養後，更換培養基，再添加試料溶液。3 日後，再更換培養基，添加試料溶液。更 2 日後，施行培養基更換和試料添加，24 小時後施行細胞毒性試驗。

細胞毒性試驗乃以 MTT 分析施行。MTT 分析乃依如下順序施行。皮膚模式杯以 PBS250 μL 洗淨 3 回。於注入 MTT 溶液 300 μL 之 24 穴板投入組織，於調整為 5%CO₂ 之 37°C 保溫箱培養 3 小時。再皮膚模式杯以 PBS 洗淨。於含有 0.04N 之鹽酸之異丙醇 2mL 之 24 穴板投入組織，萃取 2 小時。令萃取液 200 μL 移入 96 穴板，測定 560nm 之吸光度。又參照物為 655nm。由吸光度之值，求出組織細胞之生存率。第 12 圖為令冷水萃取物 A 添加時之組織細胞之生存率，以對照組之生存率為 100% 時之相對值展示之圖。

培養後，施行各組織之照片攝影。第 13 圖為展示對照組之黑色素生成狀況之照片，第 14 圖為展示添加冷水萃取物 A 之 0.08 質量% 溶液時之黑色素生成狀況之照片，第 15 圖為展示添加冷水萃取物 A 之 0.008 質量% 溶液時之黑色素生成狀況之照片。

由第 12 圖～第 15 圖得知，添加冷水萃取物 A 時，與對

照組相較組織無黑化。尤其添加冷水萃取物 A 之 0.08% 溶液時，與對照組相較甚白。也即冷水萃取物 A 於無細胞毒性之範圍，依濃度而展示黑色素生成抑制作用。

[產業上之利用可能性]

本發明提供含有忽布萃取物而美白效果特優之美白劑。

【圖式簡單說明】

第 1 圖由忽布(日本產富良野 18 號)之葉以水萃取之黃酮醇劃份之 HPLC 圖。

第 2 圖由忽布(捷克產札字種)之柱粒以水萃取之黃酮醇劃份之 HPLC 圖。

第 3 圖展示冷水萃取物 A 及冷水萃取物 B 之酪胺酸酶活性抑制率(%)之圖。

第 4 圖冷水萃取物 C 之酪胺酸酶活性抑制率(%)，以對照組之酪胺酸酶活性抑制率為 0% 時之相對值展示之圖。

第 5 圖於實施例 2 添加冷水萃取物 A 時之黑色素瘤細胞之細胞生存率(%)，以對照組之細胞生存率為 100% 時之相對值展示之圖。

第 6 圖於實施例 2 令添加冷水萃取物 A 時之黑色素瘤細胞之白色化狀況和目視判定之結果之照片圖。

第 7 圖於實施例 2 添加冷水萃取物 B 時之黑色素瘤細胞之細胞生存率(%)，以對照組之細胞生存率為 100% 時之相對值展示之圖。

第 8 圖於實施例 2 添加冷水萃取物 B 時之黑色素瘤細胞之白色化狀況和目視判定之結果之照片圖。

第 9 圖於實施例 2 添加冷水萃取物 C 時之黑色素瘤細胞之細胞生存率(%), 以對照組之細胞生存率為 100%時之相對值展示之圖。

第 10 圖於實施例 2 添加冷水萃取物 C 時之黑色素瘤細胞之白色化狀況和目視判定之結果之照片圖。

第 11 圖(a)為展示皮膚模式杯之構造之斜視圖、(b)展示皮膚模式杯之構造之斷面圖。

第 12 圖於實施例 3 添加冷水萃取物 A 時之組織細胞之生存率, 以對照組之生存率為 100%時之相對值展示之圖。

。

第 13 圖展示實施例 3 中對照組之黑色素生成狀況之照片。

第 14 圖展示實施例 3 中添加冷水萃取物 A 之 0.08 質量%溶液時之黑色素生成狀況之照片。

第 15 圖展示實施例 3 中添加冷水萃取物 A 之 0.008 質量%溶液時之黑色素生成狀況之照片。

【主要元件符號說明】

- 2 組織培養穴
- 4 培養內管
- 6 培養液
- 8 膜
- 10 組織
- 100 皮膚模式杯

五、中文發明摘要：

【 課題 】

提供以忽布 (*Humulus lupulus*) 組織之冷水萃取物為有效成分之美白劑。

【 解決手段 】

本發明之冷水萃取物為以含有由羊齒精 (astragalín)、羊齒精丙二醯基葡萄糖苷、異櫟素 (isoquecitrín)、異櫟素丙二醯基葡萄糖苷、櫟精 (quercetin) 丙二醯基葡萄糖苷、槲三羥黃酮醇 (kaempferol) 芸香糖苷、槲三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷、芸香素及根皮醯苯 (phloracylophenone) 配糖體而成之群選擇之類黃酮配糖體至少 1 種較佳。

六、英文發明摘要：

[subject]

The present invention provides a whitening agent containing the cold water extract from the tissue of *Humulus lupulus* as the active component.

[means]

The cold water extract of the present invention preferably comprises at least one kind of a flavonoid glycoside selecting from a group consisting of astragalín, astragalín malonylglycoside, isoquecitrín, isoquecitrín malonylglycoside, quercetin malonyl glycoside, kaempferol rutinoside, kaempferol malonyl glycoside, rutin and phloracylophenone glycoside.

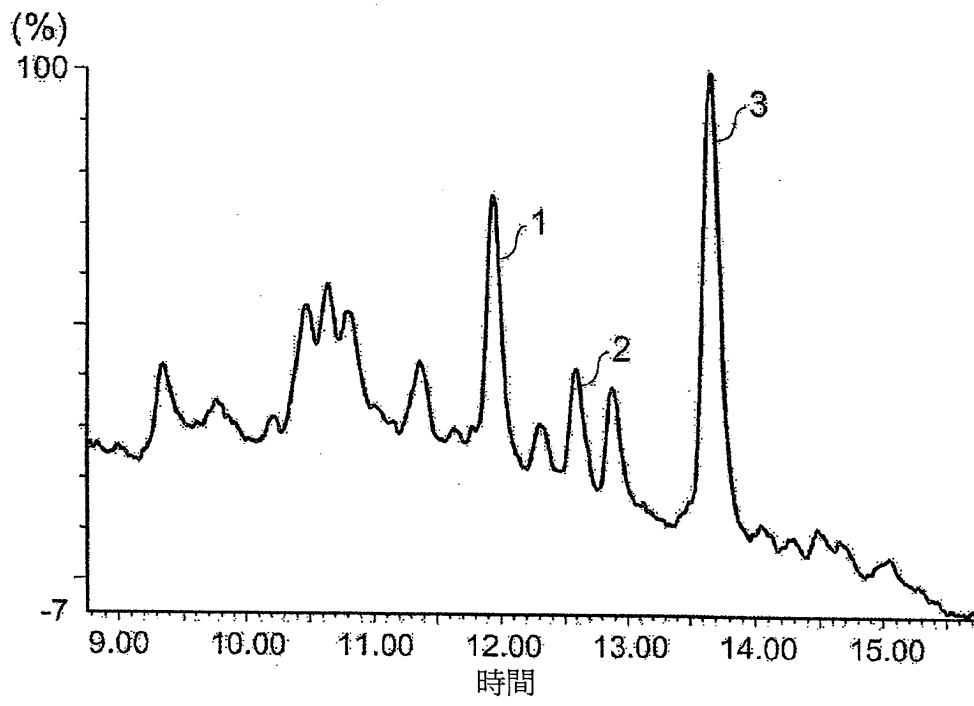
十、申請專利範圍：

1. 一種美白劑，係以忽布 (*Humulus lupulus*) 組織之冷水萃取物為有效成分。
2. 如申請專利範圍第 1 項之美白劑，其中含有冷水萃取物為由羊齒精 (astragalins)、羊齒精丙二醯基葡萄糖苷、異櫟素 (isoquercitrin)、異櫟素丙二醯基葡萄糖苷、櫟精 (quercetin) 丙二醯基葡萄糖苷、萘三羥黃酮醇 (kaempferol) 芸香糖苷、萘三羥黃酮醇丙二醯基葡萄糖苷、芸香素及根皮醯苯 (phloracylophenone) 配糖體而成之群選擇之類黃酮配糖體至少 1 種。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之美白劑，其中含有根皮醯苯衍生物為由根皮異丁醯苯 -2-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、根皮 -2-甲基丁醯苯 -2-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷及根皮異戊醯苯 -2-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷而成之群選擇之至少 1 種。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之美白劑，其中忽布組織為忽布之莖、球花或葉。
5. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之美白劑，其中忽布組織為乾燥之忽布花苞之粉碎物。
6. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之美白劑，其中忽布組織為由乾燥之忽布球花之粉碎物去除忽布花粉 (lupulin) 之大小以下之粉碎物之至少一部分者。
7. 如申請專利範圍第 6 項之美白劑，其中乾燥之忽布球花之粉碎物為乾燥之忽布球花之凍結物之粉碎物。

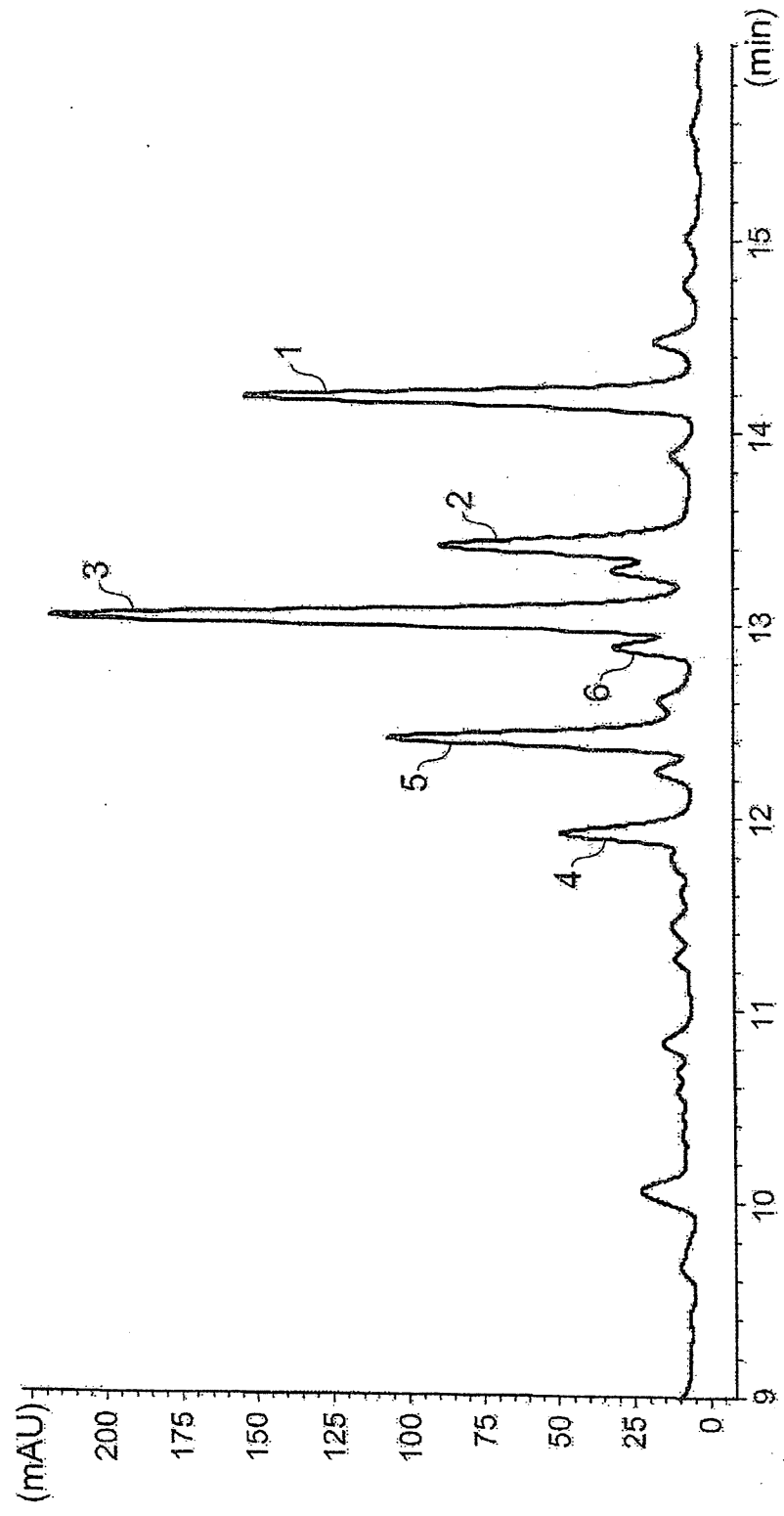
- 8.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之美白劑，其中忽布組織為將乾燥之忽布球花以有機溶劑萃取或以超臨界流體萃取而萃取之物質之至少一部分，由該忽布球花去除所得之忽布殘渣。
- 9.如申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項之美白劑，其係經口攝取型美白劑。

十一、圖式：

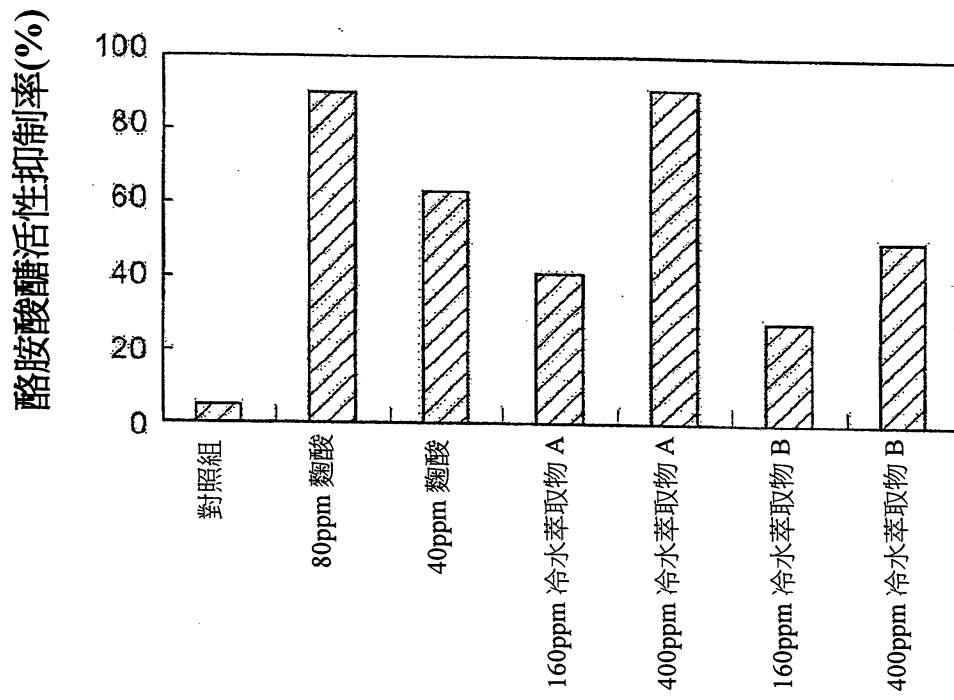
第 1 圖



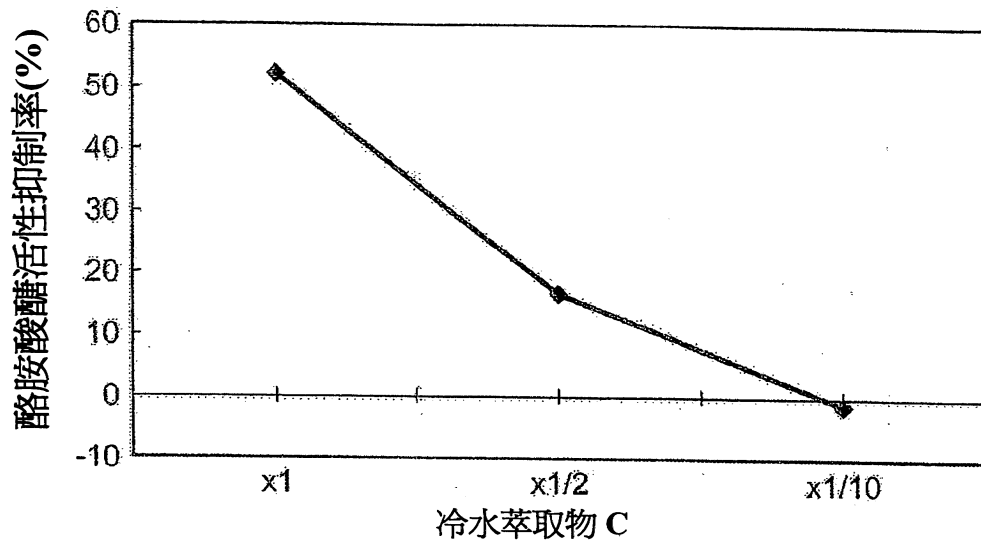
第 2 圖



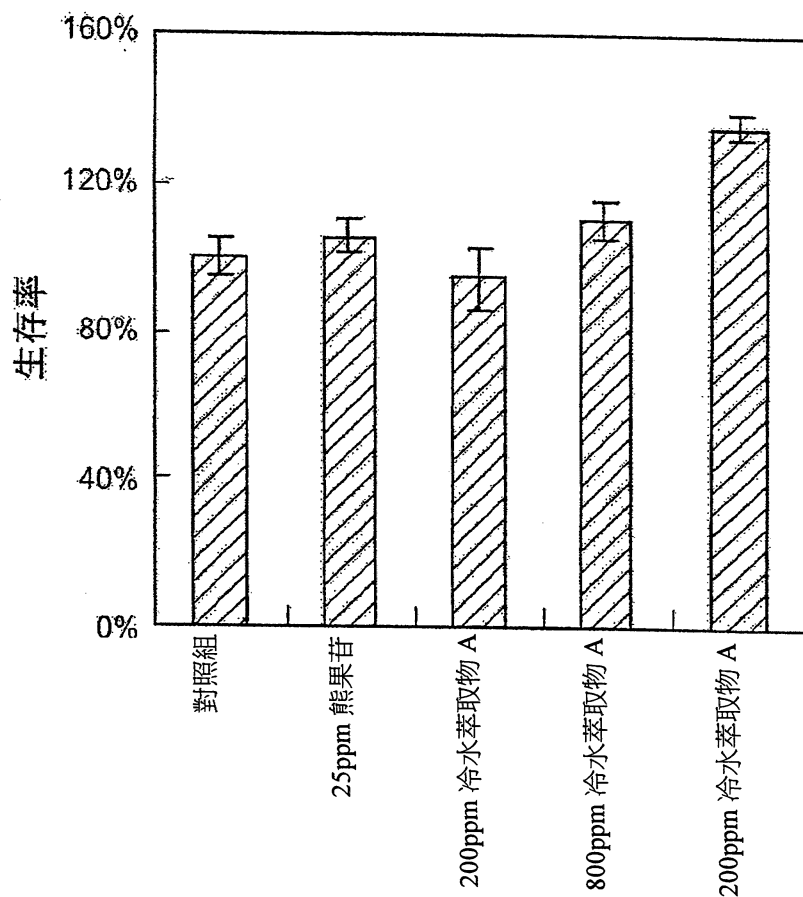
第 3 圖



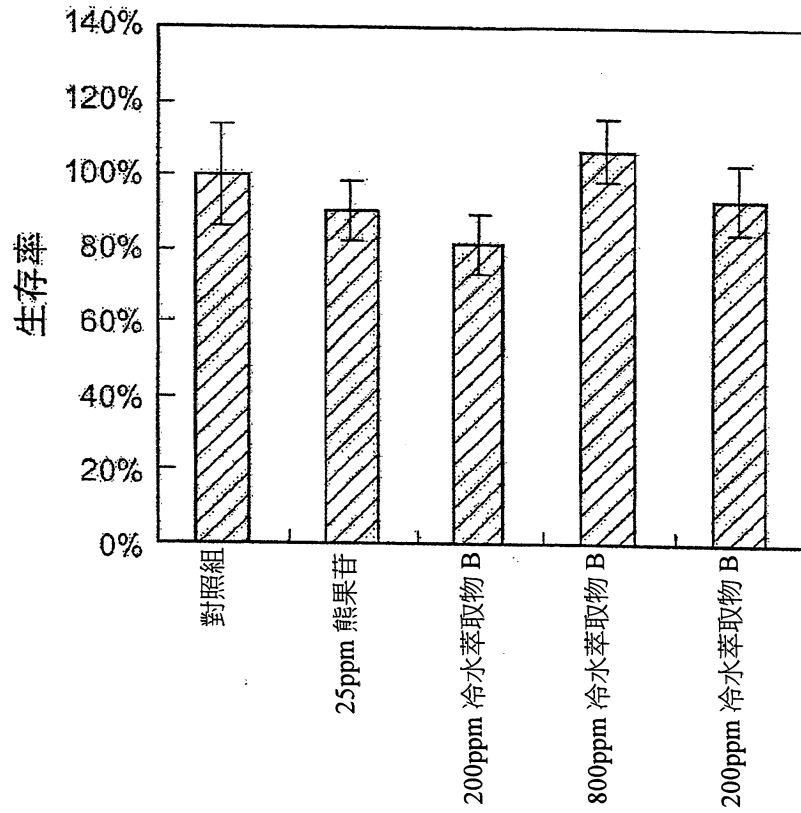
第 4 圖



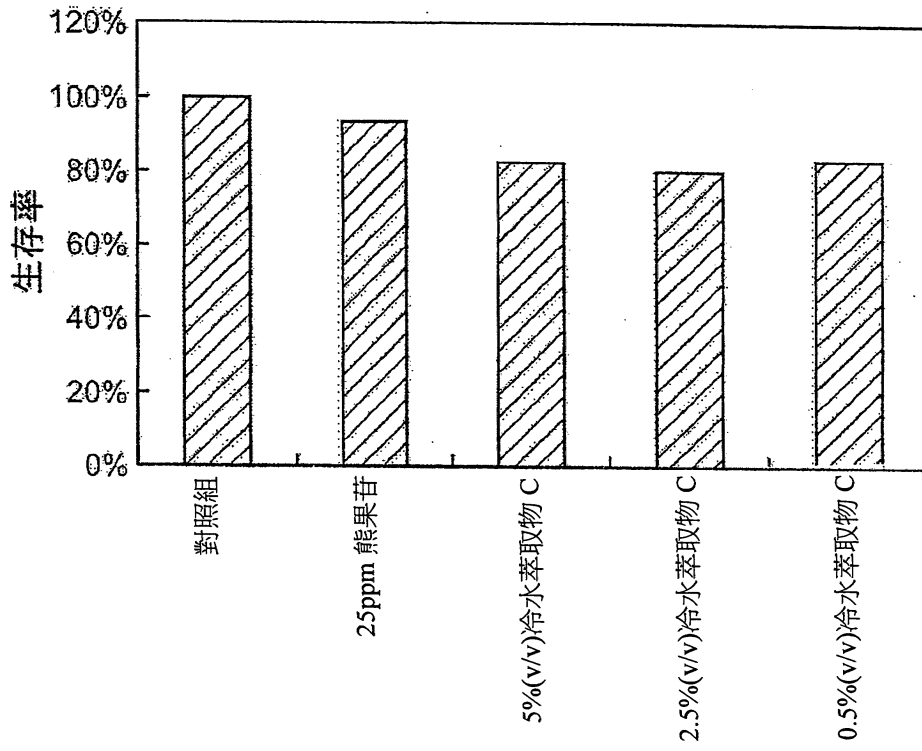
第 5 圖



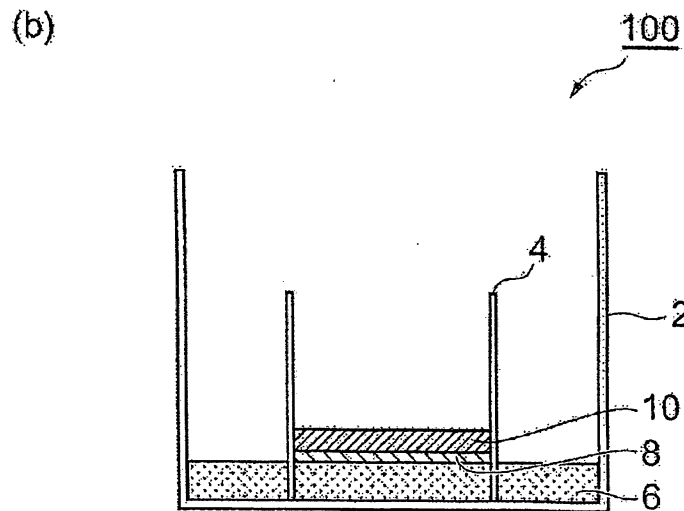
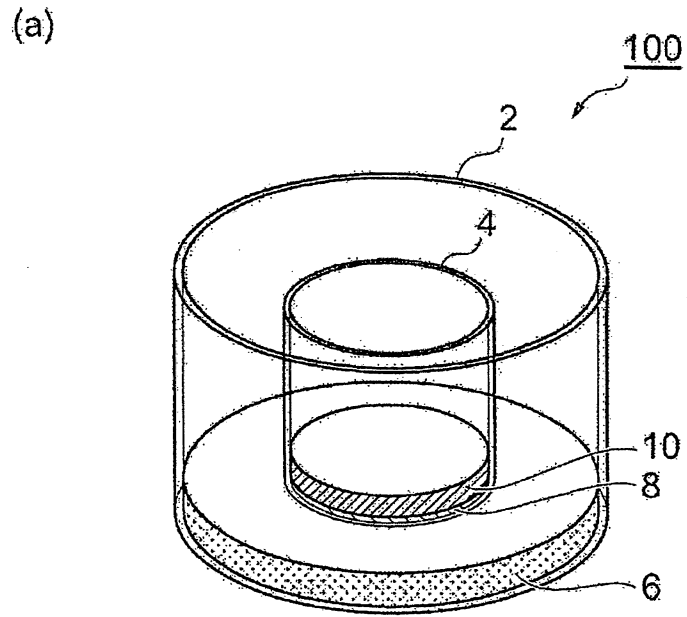
第 7 圖



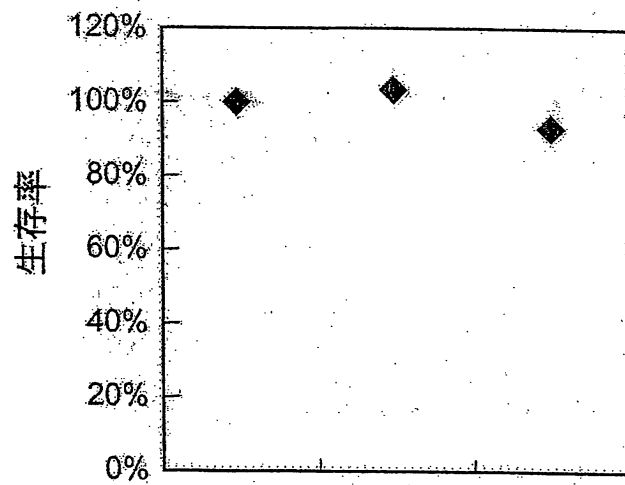
第 9 圖



第 11 圖



第 12 圖



七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無。

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明
無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。