

摘 要

本報告主要利用有機合成方法，進行一系列多羥基取代二苯乙烯化合物 (polyhydroxylated stilbene)，經由酪胺酸酵素活性抑制測定之體外試驗(*In vitro*)，探討其美白效果。從實驗結果顯示，我們發覺多羥基取代二苯乙烯化合物對酪胺酸酵素活性抑制作用與苯環上多羥基取代位置有關，間位較鄰對位者佳。另外我們也發覺多羥基取代二苯乙烯化合物除了對酪胺酸酵素活性抑制有美白作用外，其在紫外線也有很強之吸收，因此也有防曬效果，很值得應用於化粧品對美白防曬之利用研究。

前 言

由於東方民族性普遍存在「一白遮三醜」之觀念，因此美白化粧品已然成為在臺灣市場之主流商品；綜觀市售美白化粧品之美白機制，不外乎下列幾點：一、加速黑色素分離剝落，如果酸、水楊酸等；二、加素細胞活化增生，如 Petira 酵素等；三、抑制黑色素產生，如防曬、具有抑制酪胺酸酵素活性之美白劑等成分。其中又以添加具有抑制酪胺酸酵素活性之美白天然萃取成分為當今各家廠牌主要研發方向，如熊果素(Arbutin)、甘草精()、桑椹素(Morus alba L.)等。

從文憲報導，我們發覺從桑椹萃取出之 Oxyresveratrol 對酪胺酸酵素抑制作用之 IC_{50} (1 μ M) 達到 95% 以上效果。而我們知道 Oxyresveratrol 結構為 2,4,3',5'-四羥基取代二苯乙烯之結構，因此，我們利用有機合成方法，合成一系列多羥基取代二苯乙烯化合物，利用酪胺酸酵素活性抑制測定之體外試驗，探討其美白效果。

結 果 與 討 論

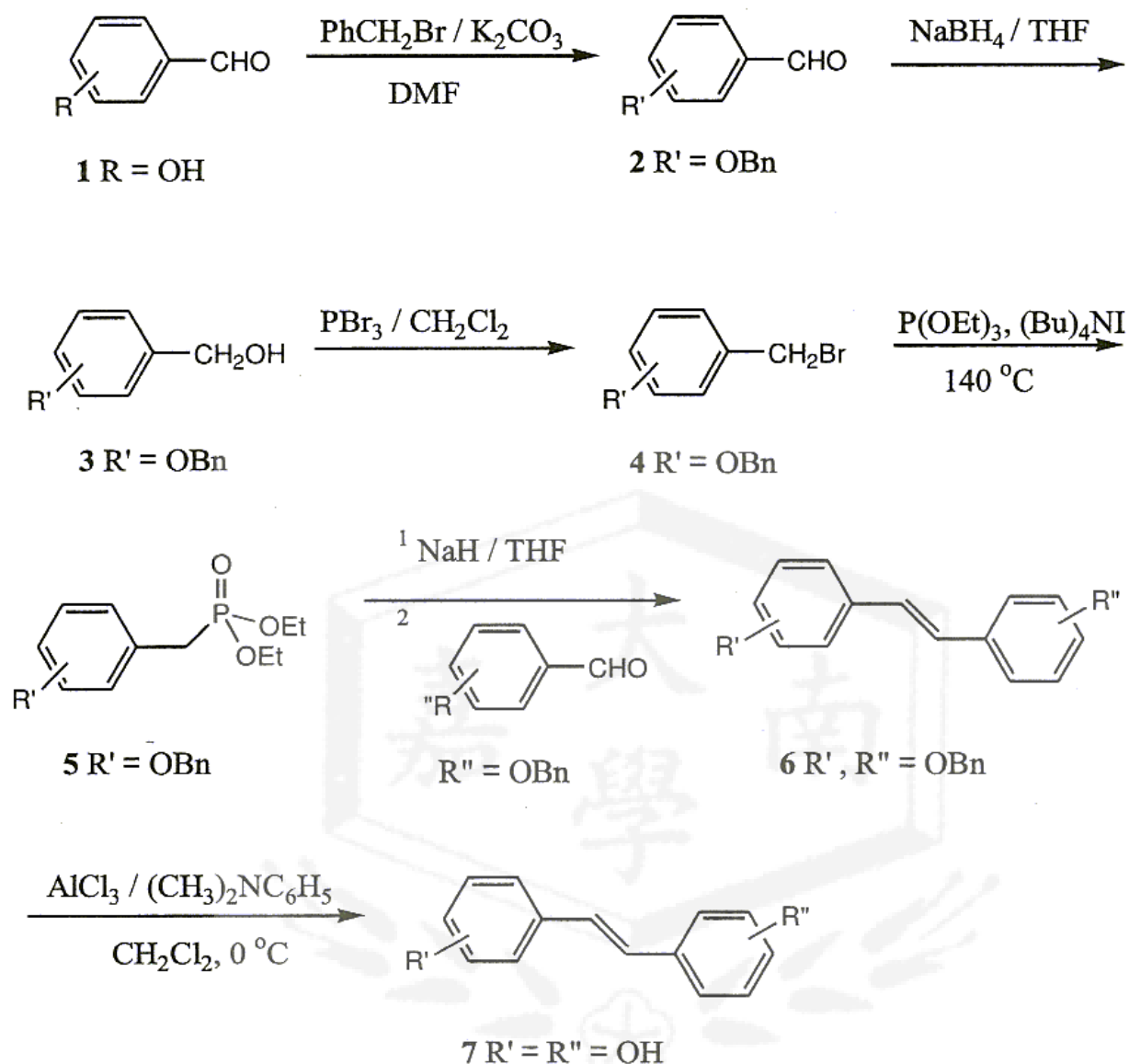
一、合成多羥基取代二苯乙烯化合物：

從文憲中我們可以取甲氧基取代之苯甲醛(methoxy benzaldehyde)化合物利用 Wittig Reaction 方法建構二苯乙烯結構，再利用去甲基反應方法(demethylation)即可得到多羥基取代二苯乙烯化合物。

首先我們從單取代或多取代之甲氧基取代苯甲醛與 Wittig 試劑進行 Wittig 反應得到 90-99% 高產率之甲氧基取代二苯乙烯化合物，但是，接下來，進行各種去甲基化反應方法，我們皆無法成功。

由於去甲基化反應之困難，我們將苄基(benzyl group)來作為酚上之保護，在進行 Wittig 反應，架構二苯乙烯(stilbenes)結構，再利用三氯化鋁($AlCl_3$)及 *N,N*-二甲基苯胺(*N,N*-dimethylaniline)在二氯甲烷溶劑於冰浴中，進行去苄基反應(debenzylation)，得到一系列多羥基取代二苯乙烯化合物，如程式(一)及表(一)所示。

程式(一)



表(一) 合成多羥基取代二苯乙烯化合物：

Entry	Starting Material		Products(yield %)	
	R'	R''	R'	R''
1	6a 2,3-(OBn) ₂	H	7a (62) 2,3-(OH) ₂	H
2	6b 2,4-(OBn) ₂	H	7b (56) 2,3-(OH) ₂	H
3	6c 2,5-(OBn) ₂	H	7c (65) 2,3-(OH) ₂	H
4	6d 3,5-(OBn) ₂	H	7d (66) 2,3-(OH) ₂	H
5	6e 2-OBn	2-OBn	7e (60) 2-OH	2-OH
6	6f 2-OBn	3-OBn	7f (50) 2-OH	3-OH
7	6g 2-OBn	4-OBn	7g (55) 2-OH	4-OH
8	6h 3-OBn	4-OBn	7h (60) 3-OH	4-OH
9	6i 4-OBn	3,5-OBn	7i (70) 4-OH	3,5-(OH) ₂

二、多羥基取代二苯乙烯化合物抑制酪胺酸活性：

我們利用酪胺酸(tyrosin)在酪胺酸酶(Tyrosinase)作用下會產生黑色素，再與多羥基取代二苯乙烯化合物對酪胺酸及酪胺酸酵素抑制功效，經由分光光度計測

量波長 450nm 之紫外線吸收值，最後計算酪胺酸酶體外活性抑制百分比。

由於需找尋多羥基取代二苯乙烯化合物之溶解條件，各多羥基取代二苯乙烯化合物之抑制!活性精確值尚未完整測試計算，但我們從可溶解多羥基取代二苯乙烯化合物測試結果發現，間位取代之多羥基取代二苯乙烯化合物具有很好之抑制活性功效，如 2,4-dihydroxy stilbene 及 2,3'-dihydroxy stilbene。我們將持續對一系列多羥基取代二苯乙烯化合物作完整測試，以應用於美白產品!上。

結 論

從實驗結果發覺多羥基取代二苯乙烯化合物對酪胺酸酵素活性抑制作用與苯環上多羥基取代位置有關，間位較鄰對位者佳。另外我們也發現多羥基取代二苯乙烯化合物除了對酪胺酸酵素活性抑制有美白作用外，其在紫外線也有很強之吸收，因此也有防曬效果，很值得應用於化粧品對美白防曬之利用研究。由於多羥基取代二苯乙烯化合物上具有酚類結構，相信對抗氧化也應具有作用，在化粧品主流抗老化作用下並對其細胞毒性，有繼續值得研究探討之議題，期待應用於美白產品上，造福人生。

實 驗 部 分

所有反應均需攪拌，且於高純度之氬氣下操作，反應用之玻璃器皿需在 100 °C 烘箱中乾燥 2 小時以上，取出後置放於乾燥箱中冷卻後使用，反應用之無水(THF)需經金屬鈉除水後蒸餾出來使用，溶劑(DMF)也需經氫化鈣除水後蒸餾使用；二氯甲烷溶劑須氫化鈣除水後蒸餾使用。

苄基保護羥基取代苯甲醛反應步驟 2: 在 100 毫升之圓底燒瓶中加入 4-羥基取代苯甲醛 **1**(10 毫莫耳)加入 50 毫升 DMF 充分攪拌，加入過量無水碳酸鉀，在氬氣下反應 2 小時，再加入苄基溴(benzyl bromide)(15 毫莫耳)，加熱至 50 °C 反應 6 小時，加入冰水終止反應，加入乙酸乙酯 50 毫升，用水洗去 DMF 溶劑，加入飽和食鹽水，乾燥，利用減壓濃縮，經由 70-230 mesh 之矽膠管柱，以 5 % (EtOAc / n-hexane) 分離，得到高產率之苄氧基苯甲醛 **2** 化合物。

4-Benzyloxybenzaldehyde 2i : yield 95 % ; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 5.31 (2 H, s), 7.25 (2 H, dd, J = 7 Hz, 2 Hz), 7.54-7.62 (5 H, m), 8.01 (2 H, dd, J = 7, 2 Hz), 10.06 (1 H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 70.1 (t), 115.0 (2 C, d), 127.4 (2 C, d), 128.2 (d), 128.6 (2 C, d), 130.0 (s), 131.9 (2 C, d), 135.8 (s), 163.6 (s), 190.6 (d).

製備苄氧基苯甲基醇之一般步驟 3: 在 100 毫升之圓底燒瓶中加入苄氧基取代苯甲醛 **2**(10 毫莫耳)加入 40 毫升 THF 充分攪拌，加入 NaBH₄(0.4 克)之 10 毫升 THF 溶液，於 0 °C 反應 4 小時，加入冰水終止反應，先以減壓濃縮反應之 THF 溶劑，再以乙酸乙酯萃取(4 x 20 mL)，合併有機層，加入飽和食鹽水洗，用無水硫酸鈉乾燥，利用減壓濃縮，經由 70-230 mesh 之矽膠管柱，以 20 % (EtOAc / n-hexane) 分離，得到苄氧基苯甲基醇 **3** 化合物。

4-Benzyloxybenzyl alcohol 3i : yield 92% ; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.70

(br s, OH), 4.49 (2 H, s), 5.03 (2 H, s), 6.92 (2 H, dd, $J = 8, 2$ Hz), 7.20 (2 H, dd, $J = 8, 2$ Hz), 7.40 (5 H, m).

製備苄氧基苯甲基溴之一般步驟 3: 在 100 毫升之圓底燒瓶中加入苄氧基取代苯甲基醇 3(8 毫莫耳)加入 40 毫升 CH_2Cl_2 充分攪拌, 加入三溴化磷(PBr_3)(1.22 當量)於 0°C 反應 2 小時, 再回溫反應 1 小時, 加入冰水終止反應, 先以減壓濃縮反應之 THF 溶劑, 再以乙酸乙酯萃取(4 x 20 mL), 合併有機層, 加入飽和食鹽水洗, 用無水硫酸鈉乾燥, 利用減壓濃縮, 經由 70-230 mesh 之矽膠管柱, 以 5%(EtOAc / n-hexane)分離, 得到苄氧基苯甲基溴 4 化合物。

4-Benzyloxybenzyl bromide 4i: yield 82%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})\delta$ 4.49 (2 H, s), 5.06 (2 H, s), 6.95 (2 H, dd, $J = 8, 2$ Hz), 7.37 (2 H, dd, $J = 8, 2$ Hz), 7.40 (5 H, m).

製備 Wittig 反應試劑之一般步驟 5: 再 100 毫升之圓底燒瓶中加入苄氧基取代苯甲基溴 4(8 毫莫耳)加入 40 毫升二甲苯中, 加入三乙氧基化磷($\text{P}(\text{OEt})_3$)(1.5 當量)及添加催化劑量之碘化四丁基胺, 加熱至 140°C 反應過夜, 利用真空濃縮除去二甲苯溶劑, 得到純之 Wittig 反應試劑 5。

Diethyl [4-(benzyloxy)benzyl]phosphate 5i: $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})\delta$ 1.26 (6 H, t, $J = 7$ Hz), 3.08 (2 H, d, $J = 22$ Hz), 3.99 (4 H, q, $J = 7$ Hz), 5.02 (2 H, s), 6.89 (2 H, d, $J = 8$ Hz), 7.41 (2 H, dd, $J = 8, 2$ Hz), 7.50 (5 H, m).

製備二苯乙烯架構之化合物的一般步驟 6: 在 100 毫升之圓底燒瓶中加入氫化鈉(100 毫克)及 20 毫升 THF 溶劑中, 於 0°C 時加入 Wittig 反應試劑 5(2.5 毫莫耳於 10 毫升 THF), 回溫至室溫反應 1 小時, 加入苄氧基苯甲醛(2 毫莫耳於 10 毫升 THF), 反應 8 小時, 加入飽和氯化銨水溶液終止反應, 先以減壓濃縮反應之 THF 溶劑, 再以乙酸乙酯萃取(4 x 20 mL), 合併有機層, 加入飽和食鹽水洗, 用無水硫酸鈉乾燥, 利用減壓濃縮, 經由 70-230 mesh 之矽膠管柱, 以 2%(EtOAc / n-hexane)分離, 得到苄氧基取代二苯乙烯 6 化合物。

(E)-1-[2,4-Bis(benzyloxy)phenyl]-2-phenylethene 6b: yield 85%; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})\delta$ 5.05 (2 H, s), 5.10(2 H, s), 6.59-6.63 (2 H, m), 7.06 (1 H, d, $J = 16$ Hz), 7.23-7.55 (19 H); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3, 50 \text{ MHz})\delta$ 70.1 (t), 70.4 (t), 110.9(d), 106.5 (d), 120.1 (s), 123.3 (d), 126.3 (3 C, d), 126.5 (d), 127.0 (4 C, d), 127.3 (2 C, d), 127.4 (d), 127.5 (d), 127.9 (4 C, d), 128.0 (6 C, d), 136.8 (s), 136.9 (s), 138.2 (s), 157.1 (s), 159.5 (s).

去苄基保護之一般步驟 7: 在一 50 毫升之圓底燒瓶中加入苄氧基取代二苯乙烯 6 化合物(1 毫莫耳於 20 毫升無水之 CH_2Cl_2 溶劑)中, 在氮氣下加入 *N,N*-二甲基苯胺(3 當量)及無水三氯化鋁(4 當量)於 0°C 時反應 1 小時, 加入水終止反應, 在加入 1 M HCl 15 毫升中和, 洗去 *N,N*-二甲基苯胺, 再以乙酸乙酯萃取(4 x 20 mL), 合併有機層, 加入飽和食鹽水洗, 用無水硫酸鈉乾燥, 利用減壓濃縮, 經由 70-230 mesh 之矽膠管柱, 以 20-30%(EtOAc / n-hexane)分離, 得到苄氧基取代二苯乙烯 7 化合物。

(E)-1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-phenylethene 7b: yield 56 %; ^1H NMR(MeOD, 200 MHz) δ 6.35 (2 H, m), 7.01 (1 H, d, $J = 16$ Hz), 7.19-7.53 (7 H, m); ^{13}C NMR (MeOD, 50 MHz) δ 103.7 (d), 108.6 (d), 118.0 (s), 125.0 (d), 126.4 (d), 127.1 (2 C, d), 127.7 (d), 128.6 (d), 129.7 (2 C, d), 140.2 (s), 157.5 (s), 159.4 (s).

多羥基取代二苯乙烯化合物抑制酪胺酸活性之一般試驗步驟：

取多羥基取代二苯乙烯化合物 10mg，先加 100 μL 的 DMSO，待稍融合後再加入 900 μL 的水(H_2O)，完成後取上 100 μL ，再加入 900 μL 的酪胺酸(tyrosin)及 5 μL 的酪胺酸酶(Tyrosinase)。另外在這實驗過程中需含兩組對照組，一是 100 μL 的 DMSO 加 900 μL 的水(H_2O)，融合後取 100 μL ；加入 900 μL 的酪胺酸(Tyrosin)及 5 μL 的酪胺酸酶(Tyrosinase)。二是與一的步驟相同，但不須加 5 μL 的酪胺酸酶(Tyrosinase)。以上步驟完成，將此置於室溫之下一小時後，利用分光光度計測量波長 450nm 之紫外線吸收值，最後計算酪胺酸酶體外活性抑制百分比：未加任何藥材之 450nm 紫外線吸收值減去含中藥材之 450nm 紫外線吸收值；再除以未加任何藥材之 450nm 紫外線吸收值，在乘以百分比即可。

謝誌

本研究感謝嘉南藥理科技大學王昭雄校長經費支持下得以完成，另外感謝黃坤忠同學及汪梅英老師在實驗工作上之努力，並感謝林清宮主任在酵素活性抑制實驗上之指導。

參考文憲

1. Shin, N.-H.; Ryu, S. Y.; Choi, E. J.; Kang, S.-H.; Chang, I.-M.; Min, K. R.; Kim, Y. *Biochem. And Biophysical Research Commun.* **1998**, *243*, 801.
2. Thakkar, K.; Geahlen, R. L. Cushman, M. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2950.
3. Drewes, S. E.; Fletcher, I. P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 961.
4. Jung, M. E; Lyster, M. A. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3761.
5. Olah, G. A.; Narang, S. C.; Balaram Gupta, B. G.; Malhotra, R. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1247.
6. Kutney, J. P.; Abdulrahman, N.; Quesne, P. L.; Piers, E.; Vlattas, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3656.
7. Ali, M. A.; Kondo, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1130.
8. Inamori, Y.; Ogawa, M.; tsujibo, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Nakamura, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 805.