

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNAC9507

計畫名稱：抗氧化藥物的電化學性質與自由基捕捉能力之間的關係研究

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：張朝明

子計畫主持人：



中華民國 96 年 02 月 26 日

嘉南藥理科技大學 95 年度專題研究計畫成果報告

一、緒論

生物體常因外在環境或周遭的化學物質影響，使得在內部的生物代謝反應過程中產生不同種類及含量的自由基(free radicals)。由於自由基高活性的特性常會促使 DNA、脂質以及蛋白質的氧化反應，使得細胞正常功能失效，因而產生多種疾病，例如：腫瘤(tumor)，發炎(inflammation)，休克；中風(shock)，動脈硬化症(atherosclerosis)，糖尿病(diabetes)，脂肪肝(fatty liver)，以及局部缺血(ischemia)等(1-6)。因此如何有效抑制自由基含量增加的研究更是吸引生物，醫學(藥)界的廣泛投入與重視，而捕捉自由基藥物的開發在抑制自由基含量的研究中更是重要的一環。其中抗氧化藥物(anti-oxidants)因具有生物體中自由基捕捉的活性(free radicals scavenging activity)(7-8)，更引起重視而積極投入研究(9-12)。然而具有抗氧化活性的物質，種類繁多，而抗氧化活性大小也依其物種性質不同而具有很大的差異性，進而使得捕捉自由基能力也有很大不同。在物種各性質中，以物種的氧化還原性質，是最直接作為評估物種抗氧化活性的主要參數(13-15)。因此，快速有效的測定不同物種在不同環境中的電化學性質，無疑的將是研究抗氧化藥物活性的初步以及必需的重要步驟。其次物種抗氧化的活性是否直接代表捕捉自由基的能力，則是另一重要的研究課題。由於生物體中的自由基經研究證實與癌症及多種疾病的發生，有非常密切的依循關係。因此如何有效抑制自由基含量增加的研究更是吸引生物，醫學(藥)界的廣泛投入與重視。抗氧化藥物由於具有捕捉生物體中自由基的能力，已被開發應用在不同疾病的治療與控制。然而不同抗氧化藥物捕捉自由基的能力依其性質不同而具有很大的差異。本研究目的即是針對解決以上兩基礎而重要課題所提出，以期能對捕捉自由基藥物的開發提供更有系統及重要的參考。首先，即針對抗氧化藥物的電化學性質與捕捉自由基的能力之間的關係進行研究。由於具有抗氧化能力的藥物有多種不同的類型，例如無機，維他命，氨基酸，多氬類等。其中多氬類化合物因普遍存在天然植物中而更吸引研究者的注意。因此本年度之研究則以多氬類化合物作為研究的對象物。首先，選擇具有代表性的多氬類抗氧化化合物以及一些參考的常用抗氧化試藥。(例如：Gallic acid、Hydroquinon、Vanillic acid、Protocatechuic acid、

Caffeic acid、Ferulic acid、Propylgallate、Quercetin、Rutin、BHA、Vitamin C、BHT 等)進行電化學性質的測試，以了解各抗氧化藥物的氧化還原的電化學性質。其次，比較以上各種不同抗氧化藥物對於 DPPH 及 ABTs 自由基的捕捉能力以測試其抗氧化活性。由以上的測試結果進行分析及歸納，以建立抗氧化藥物的氧化還原性質對自由基捕捉能力影響的變化關係。進而整理出從藥物的氧化還原性質預估自由基捕捉的能力以及抗氧化活性。

二、實驗

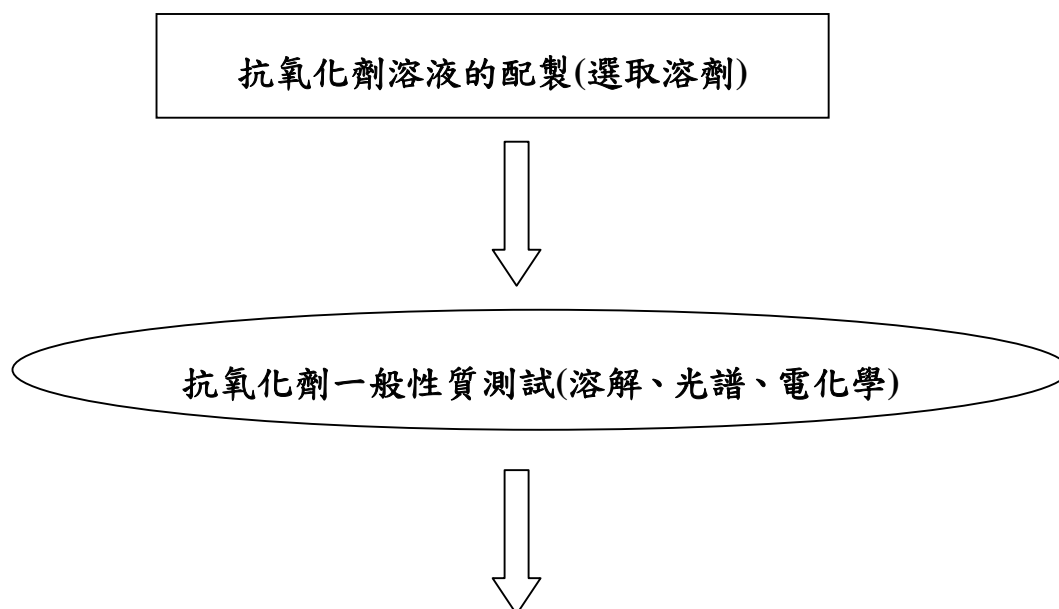
2-1 儀器與器材

紫外-可見光譜儀(190-780 nm)，伏特安培儀(EG&G)，FIA 分析儀(利用層析儀)，酸鹼度計、電磁加熱板，電子天秤($d = 0.0001 \text{ g}$)，超音波振盪器，離心機。

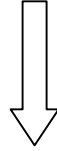
2-2 藥品

抗氧化藥物包含：Gallic acid、Hydroquinon、Vanillic acid、Protocatechuic acid、Caffeic acid、Ferulic acid、Quercetin、Rutin、BHA、Vitamin C、BHT 等分別購自 TCI、Sigma 等藥廠。另外包含地藥品與試劑分別有：磷酸、氫氧化鈉、甲醇、DPPH 自由基、ABTs 試劑等分別購自聯工、TCI、Sigma 以及 Merck 等藥廠。純水 Purified water 得自凡事康 R.O.純水製造機-FLUXTEI。

2-3 實驗流程



抗氧化能力的評估



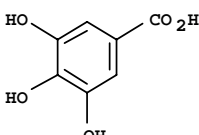
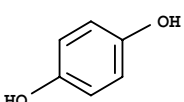
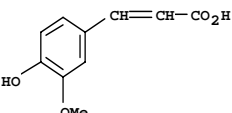
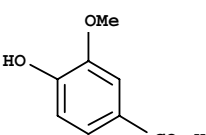
- (1) 捕捉 DPPH 自由基能力評估
- (2) 捕捉 ABTs 自由基能力評估
- (3) 電化學的氧化還原能力評估
- (4) FIA 的氧化還原能力評估

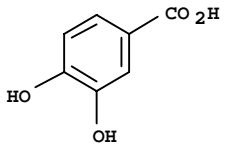
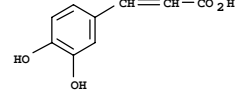
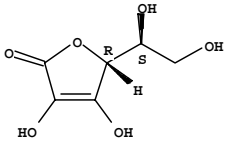
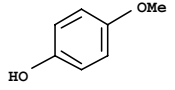
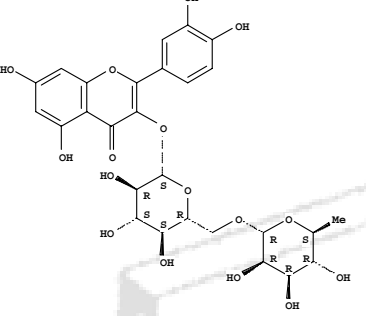
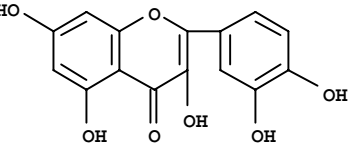
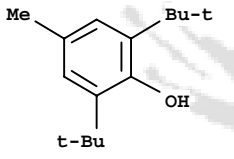
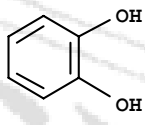
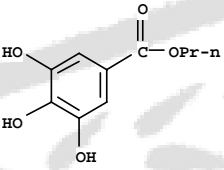
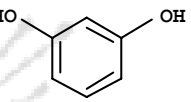
結果與討論

一、分析物的化學結構

分析物的化學結構如表一所示，表中所列的各分析物除了 Vitamin C 之外，皆含有芳香基(phenolic group)，其中大部份分析物更是屬於多氬類化合物，因此容易被氧化成穩定的相關氧化態化合物，所以皆具有不同程度的抗氧化能力。而分析物 Vitamin C 雖然不是氬類化合物，但是因具有多氬氧基的環酯類，也是容易被氧化成穩定的氧化態化合物，因此常被用來當作表示抗氧化能力的參考物。

表一各分析物的化學結構

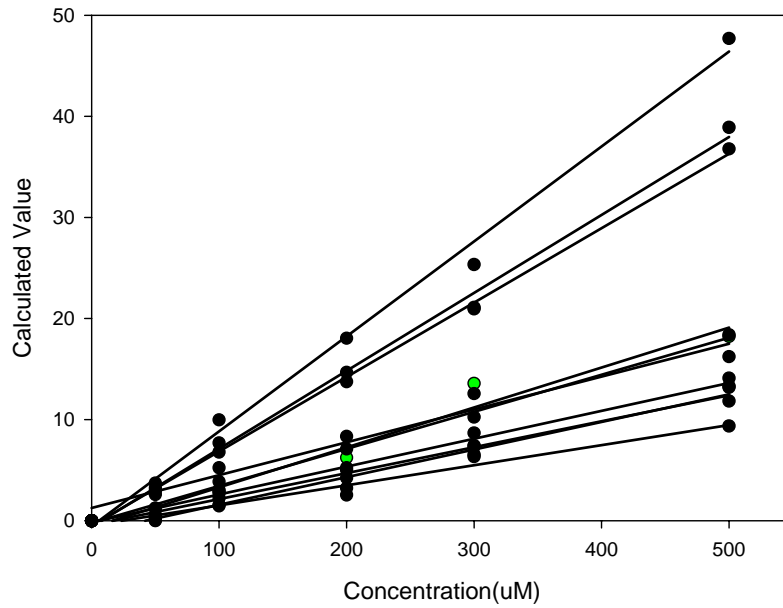
Gallic acid	Hydroquinone	Ferulic acid	Vanillic acid
			
Protocatechuic acid	Caffeic acid	Vitamin C	Butylatedhydroxyanisole

			 D1 - Bu-t BHA
Rutin		Quercetin	
			
Butylatedhydroxytoluene	Catechol	Propylgallate	m-hydroquinone
 BHT			

二、捕捉 DPPH 自由基的能力

依據 Yen & Duh (18) 利用 DPPH 自由基與抗氧化藥劑作用，測其 DPPH 自由基減少的量以評估藥劑捕捉 DPPH 自由基的能力，進而作為表示藥劑抗氧化能力的基準。本研究是將各種藥劑的不同濃度溶液 50ul 加入到 2ml 的 10.00mM DPPH 自由基溶液中，於室溫中靜置反應 60 分鐘之後，於 517nm 波長下測其吸收度(A)。依下列方程式求出計算值。

$$AA(\%) = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$$



圖二、分析物的濃度線性關係(甲醇溶解)

表二、分析物的濃度線性關係(甲醇溶解)

品名	截距	斜率	相關係數
Gallic acid	-0.5365	93894.6537	0.9943
Vanillic acid	-0.6465	39488.4213	0.9690
Protocatechuic Acid	1.2673	32465.3268	0.9649
Caffeic acid	-0.1611	27582.7118	0.9928
Rutin	-0.4977	73570.6634	0.9989
Ferulic acid	-0.2902	26641.9418	0.9956
Quercetin	-0.5877	77089.874	0.9959
BHT	-0.4683	19862.3438	0.9714
BHA	-0.2234	36658.1404	0.9969
Hydroquinone	-1.1457	27308.3777	0.9737
VitaminC	-0.4229	25669.6852	0.9709

依據實驗結果顯示，由 AA(%)對濃度的線性關係線的斜率的大小次序為 Gallic acid> Quercetin> Rutin> Vanillic acid> BHA> Protocatechuic Acid> Caffeic acid> Hydroquinone >

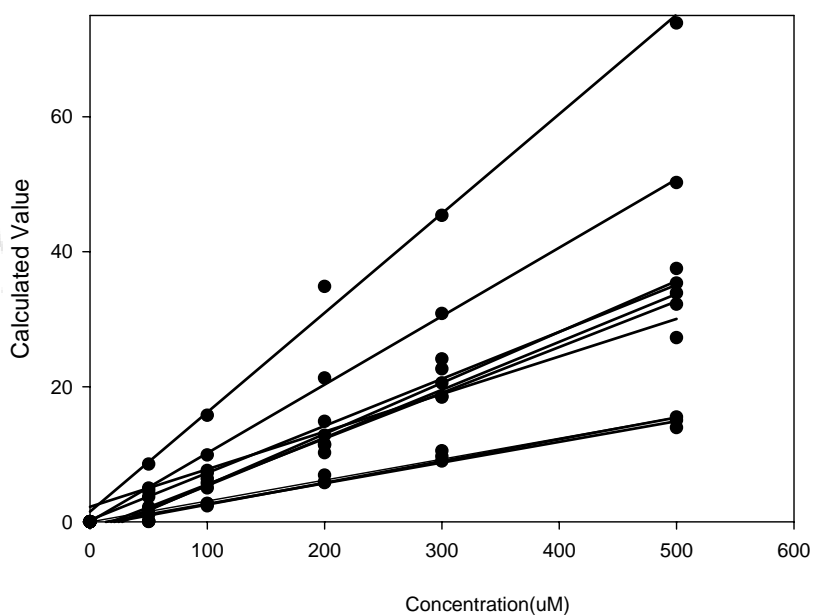
Ferulic acid> VitaminC> BHT。

三、捕捉 ABTS 自由基的能力

依據 Yen & Duh (19)利用 ABTS 自由基與抗氧化藥劑作用，測其 ABTS 自由基減少的量以評估藥劑捕捉 ABTS 自由基的能力，進而作為表示藥劑抗氧化能力的基準。本研究是將各種藥劑的不同濃度溶液 20ul 加入到 2ml 的 ABTS 自由基溶液中，於室溫中反應，於 734nm 波長下測其不同反應時間下的吸收度(A)。依下列方程式求出計算值。

$$AA(\%) = (A_{\text{Sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100$$

$$= \left[\frac{(A_{\text{Sample}(0)} - A_{\text{blank}(5)}) - (A_{\text{Sample}(5)} - A_{\text{blank}(0)})}{(A_{\text{Sample}(0)} - A_{\text{blank}(0)})} \right] \times 100$$



圖二各分析物的濃度線性關係(甲醇溶解)

表三各分析物的濃度線性關係(甲醇溶解)

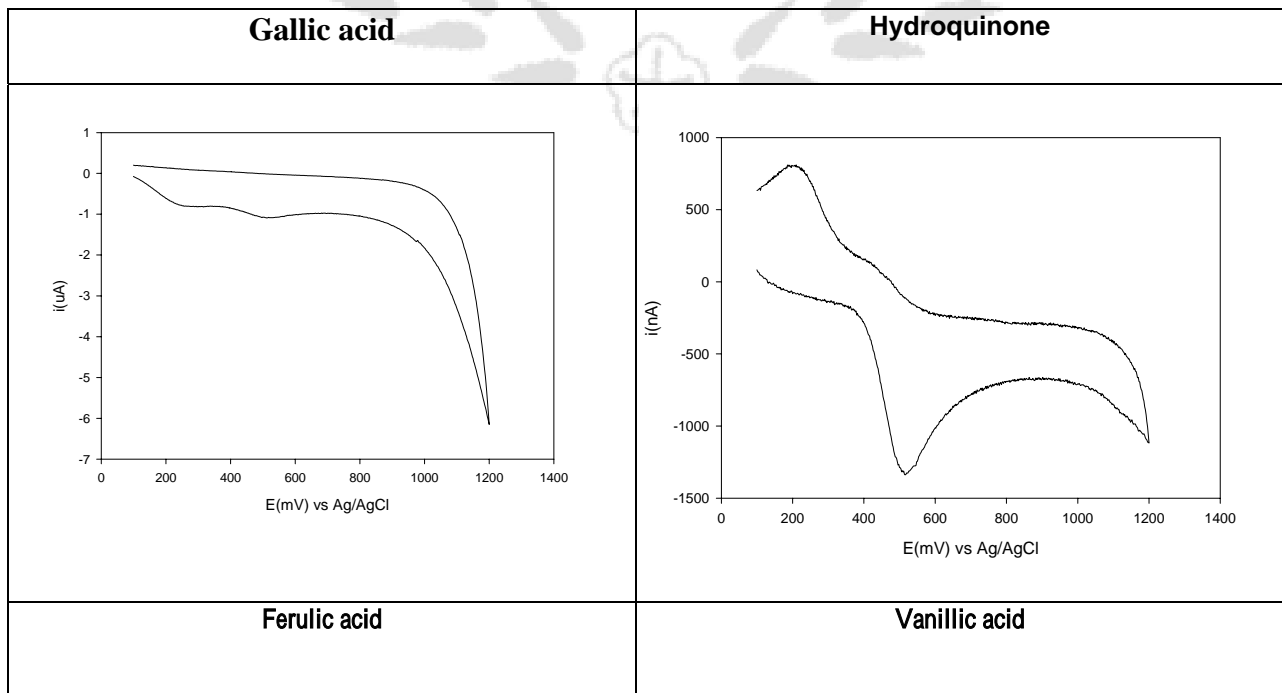
品名	截距	斜率	相關係數
Gallic acid	1.5222	147180.1308	0.9948
Vanillic acid	2.2192	55668.9636	0.9486
Protocatechuic Acid	-2.0739	75483.2590	0.9855

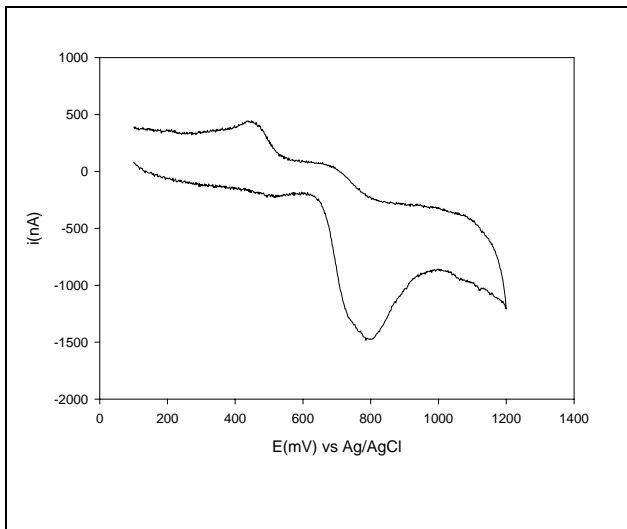
Caffeic acid	-1.2264	67773.3462	0.9877
Rutin	0.2709	69622.2615	0.9856
Ferulic acid	-1.7464	70991.5447	0.9863
Quercetin	0.0274	101442.0581	0.9980
BHT	-0.0132	30952.6295	0.9932
BHA	0.7704	37343.0847	0.9854
Hydroquinone	-0.6644	32223.433	0.9931
VitaminC	-0.4164	30600.6053	0.9675

依據實驗結果顯示，由 AA(%)對濃度的線性關係線的斜率的大小次序為 Gallic acid > Quercetin > Vanillic acid > Protocatechuic Acid > Ferulic acid > Rutin > Caffeic acid > Hydroquinone > BHA > VitaminC > BHT。

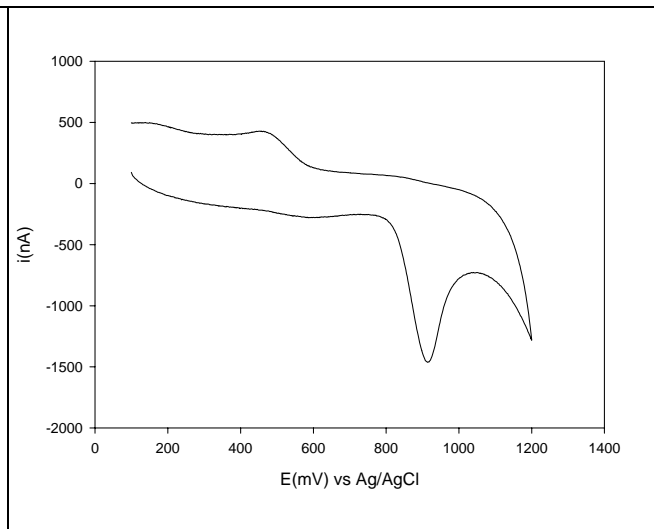
四、電化學的性質

表二、各分析物的 CV 圖(溶解在磷酸 Buffer)

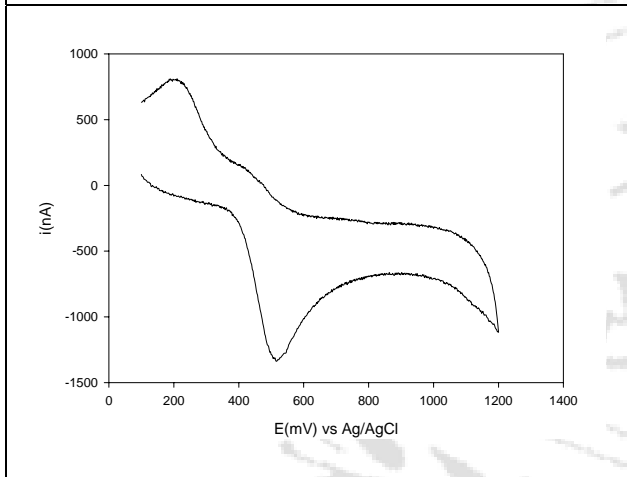




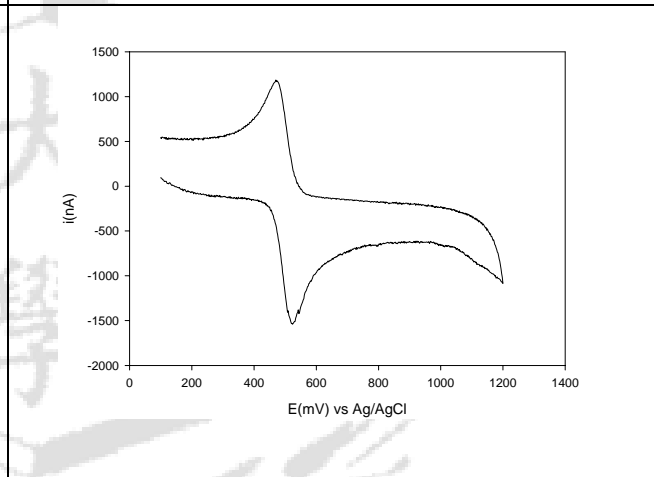
Protocatechuic acid



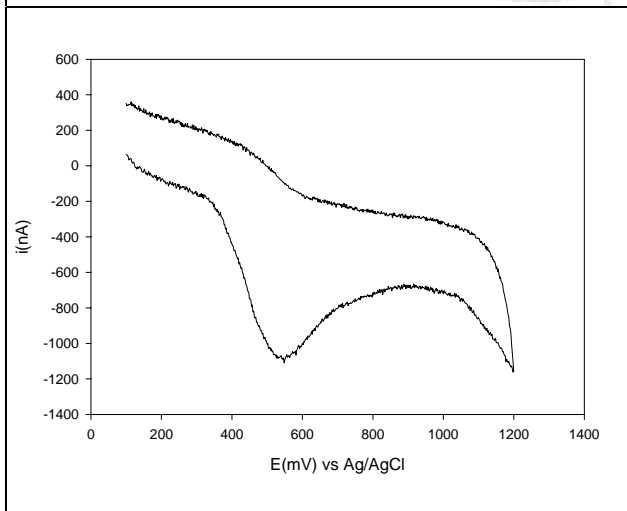
Caffeic acid



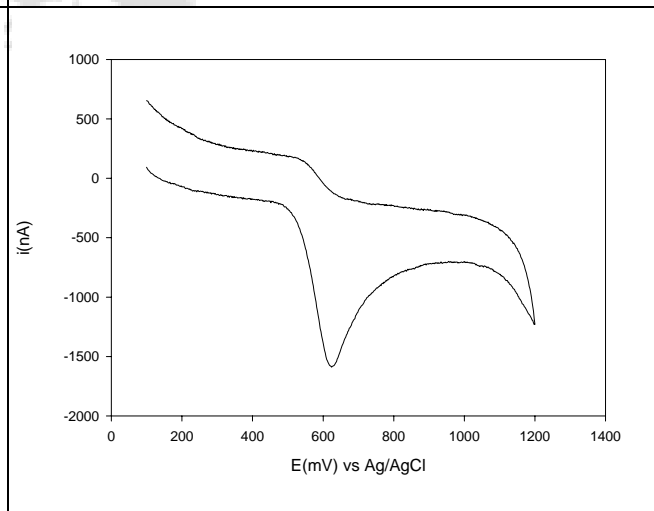
Vitamin C



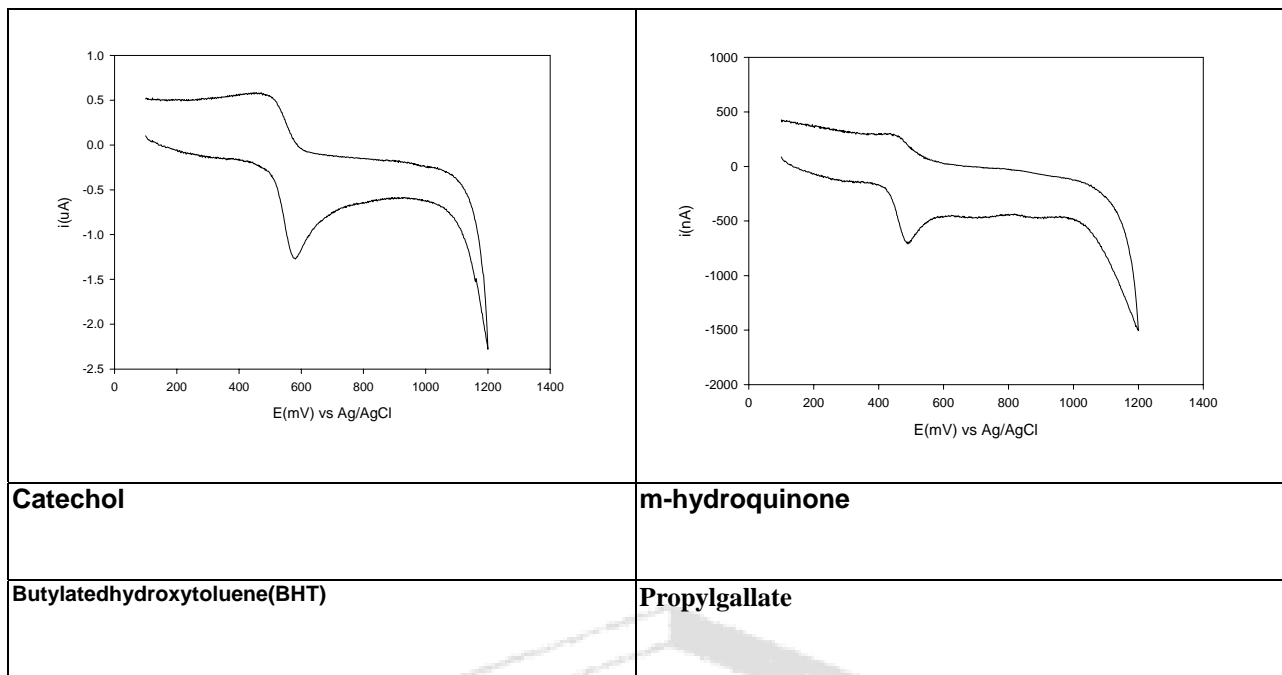
Butylatedhydroxyanisole(BHA)



Rutin



Quercetin

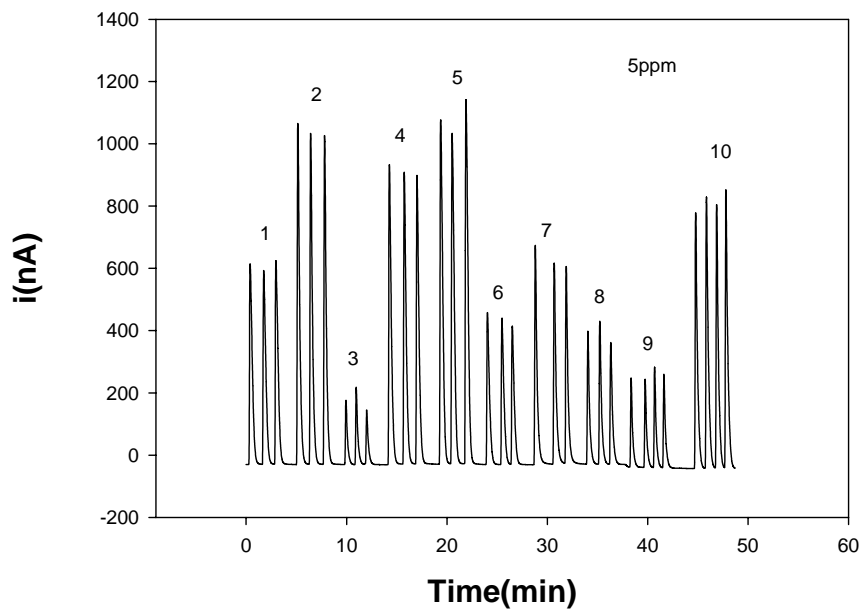
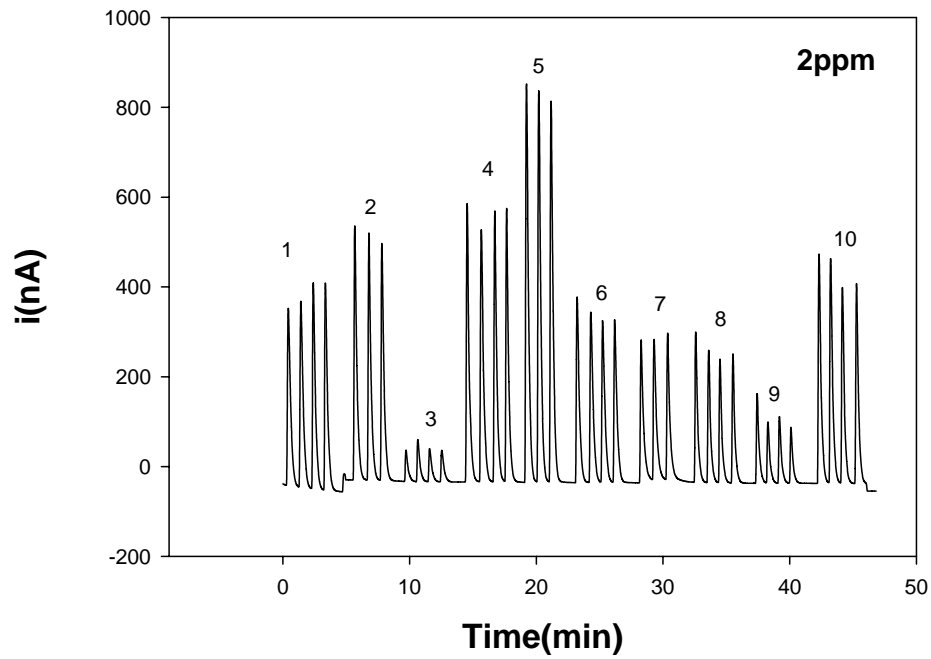


依據實驗結果顯示，由各分析物的氧化電位次序為 Gallic acid < VitaminC < Quercetin < Hydroquinone < Caffeic acid < Rutin < BHA < Protocatechuic Acid < BHT < Ferulic acid。氧化電位愈低理論上其抗氧化力愈大。

表二、各分析物濃度對 CV 圖中氧化波峰電流的線性關係

品名	截距	斜率	相關係數
Gallic acid(1)	268.89152	10344305.08	0.9915
Gallic acid(2)	274.1561	9512663.438	0.9920
Vanillic acid	393.2619	16324111.38	0.9929
Protocatechuic Acid	305.36077	9978726.392	0.9893
Caffeic acid	457.4861	9575811.138	0.9744
Rutin	433.8958	9264891.041	0.9527
Ferulic acid	708.3053	6750493.947	0.8618
Quercetin(1)	660.2130	9439757.869	0.9435
Quercetin(2)	425.9927	8375690.073	0.9756
BHT1	489.3099	9130556.901	0.9643
BHT2	157.6205	4759544.794	0.9887
BHA	345.5012	11273384.99	0.9906
Hydroquinone	278.4595	9307341.404	0.9910
VitaminC	167.5401	8779181.598	0.9934

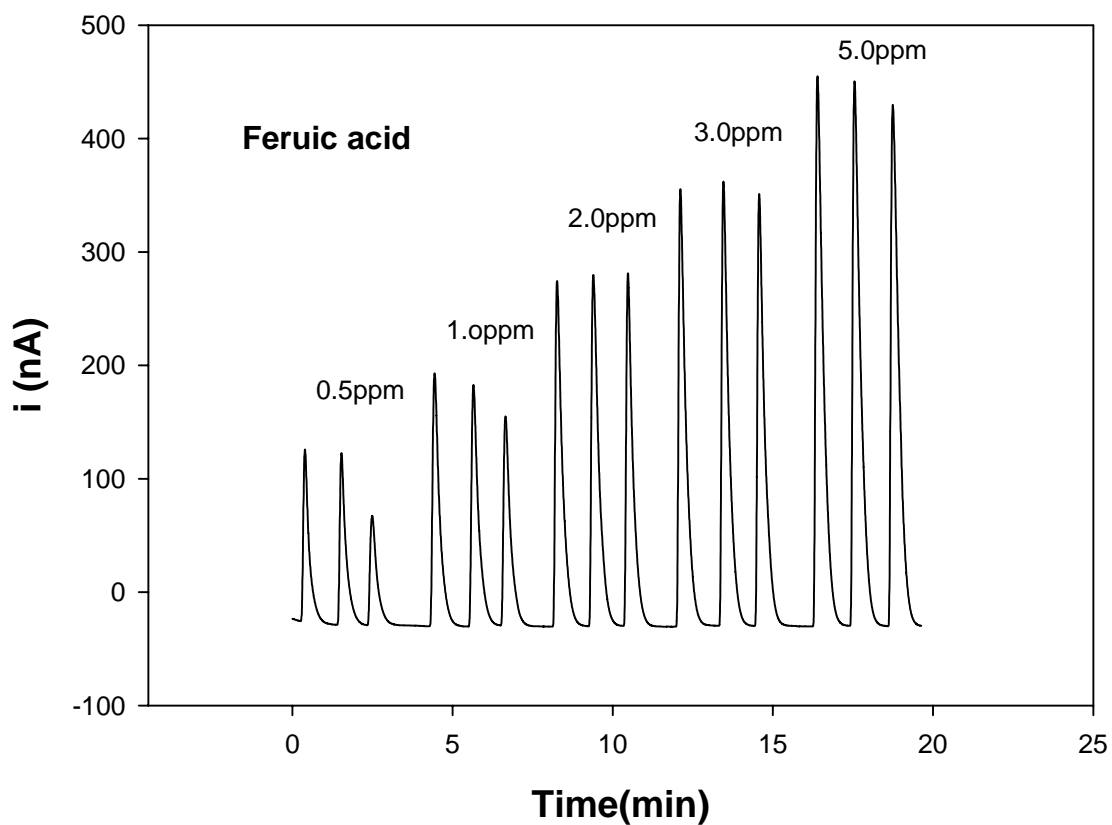
四、FIA-ECD



- 1.BHA
- 2.Caffeic acid
- 3.Ferulic acid
- 4.Gallic acid
- 5.Hydroquinone
- 6.Petechuic acid
- 7.Quercetine
- 8.Rutin
- 9.Vallic acid
- 10.Vitamin c

圖二、各分析物的 FIA 訊號關係(2 及 5ppm)

依據實驗結果顯示，由各分析物的氧化波峰電流次序為 Hydroquinone > Gallic acid > Caffeic acid > VitaminC > BHT > Protocatechuic Acid > Rutin > Vallic acid > Ferulic acid。



表二、各分析物濃度對波峰訊號的線性關係

品名	截距	斜率	相關係數
Gallic acid	117.02	233.49	0.9962
Vanillic acid	57.249	147.63	0.879
Protocatechuic Acid	1.5835	3.1052	0.9595
Caffeic acid	144.32	80.527	0.9656
Rutin			
Ferulic acid	38.499	135.67	0.9465
Quercetin	92.178	4.4027	0.9975
BHT			
BHA			
Hydroquinone	159.83	214.44	0.9341
VitaminC	108.4	93.486	0.9793

結論

本研究完成關於抗氧化劑的抗氧化活性以及自由基捕捉活性的測定，其次利用電化學方法完成各抗氧化劑的氧化電位測定，最後則以 FIA-ECD 測定各抗氧化物的氧化電流作為抗氧化活表示的依據。雖然不同方法所測得的抗氧化活性次序有所不同，但仍有其相關性。因此，對於抗氧化活性次序的不同差異，則需要更進一步探討各物種對於不同溶液環境的影響變因。以便建立出更有規則性以提供開發捕捉自由基藥物研究的重要參考。

參考文獻

1. Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S. and Mori, H., 2000. Action of chlorogenic acid in vegetable and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology* **38**, pp. 467–471.
2. Jin, Z.Q and Chen, X., 1998. A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **39**, pp. 63–70.
3. Ballal, Kalpana; Huang, Peng. Role of free radicals in cancer development. *Recent Research Developments in Cancer* (2001), 3(Pt. 2), 491-523.
4. Olas, Beata; Wachowicz, Barbara; Mielicki, Wojciech P.; Buczynski, Andrzej. Free radicals are involved in cancer procoagulant-induced platelet activation. *Thrombosis Research* (2000), 97(3), 169-175.
5. Dreher, D.; Junod, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer, Part A* (1996), 32A(1), 30-8.
6. Wallace, K.B., 1997. Free radical toxicity. , Taylor & Francis, Washington, DC.
7. Ames, B.N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative disease. *Science* **221**, pp. 1256–1263.
8. Leong, L.P. and Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry* **76**, pp. 69–75.
9. Melatonin: clinical relevance and biologic activities. *Pharmakeutike* (2005), 18(4), 120-133.
10. Oda, Masaya; Tanahashi, Norio; Niimi, Hideyuki; Itoh, Yoshiaki; Takaoka, Rie; Ohira, Masayuki; Abe, Takato; Tanahashi, Norio; Suzuki, Norihiro. Reactive oxygen species generated by mitochondrial injury in human brain microvessel endothelial cells. *Clinical*

Hemorheology and Microcirculation (2006),34(1,2),163-168.

11. Jainu, Mallika; Devi, C. S. Shyamala. In vitro and in vivo evaluation of free-radical scavenging potential of *Cissus quadrangularis*. *Pharmaceutical Biology* (Philadelphia, PA, United States)(2005), 43(9), 773-779.
12. Pu, Hanlin; Huang, Xia; Deng, Yuesong; Dai, Yun; Chen, Xiaojia. Free radical scavenging and inhibition by 2-ethyl-3-hydroxy-6-phenylthio-4(1H)-pyridinone. *Jinan Daxue Xuebao, Ziran Kexue Yu Yixueban* (2004), 25(3), 351-355.
13. Cosio, M. S.; Buratti, S.; Mannino, S.; Benedetti, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chemistry* (2006),97(4),725-731.
14. Martinez, S.; Valek, L.; Resetic, J.; Ruzic, D. Ferenc. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity - Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry* (2006), 588(1), 68-73.
15. Korotkova, E. I.; Avramchik, O. A.; Angelov, T. M.; Karbainov, Y. A. Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives. *Electrochimica Acta* (2005),51(2),324-332.
16. Jin, Z.Q and Chen, X., 1998. A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **39**, pp. 63–70.
17. Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C. and Kefalas, P., 2000. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**, pp. 507–512.
18. Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., and Kefalas, P. (2005), *Food Chemistry*, 89, 27-36.
19. Robert, R.E., Pellegrini, N., (1999). *Free radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.