

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNCS9501

計畫名稱：異黃酮結構衍生物對抑制防曬效果之探討

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：何文岳

子計畫主持人：

計畫參與人員：何文岳、徐良義、

戴火木

中華民國 96 年 2 月 27 日

## 一、摘要

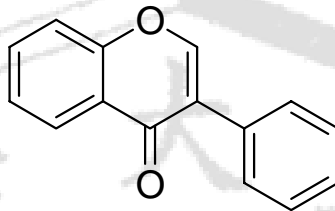
本研究合成異黃酮及其磺酸鹽衍生物，經由核磁共振光譜與質譜儀確認結構後，進行對紫外光之吸收及酪胺酸酶活性的抑制作用的測試。結果顯示：異黃酮對酪胺酸酶活性有抑制作用，並且隨著異黃酮濃度的增加而提高其抑制率，在濃度 1mg/ml 時，其對酪胺酸酶活性的抑制率可達 89.91%。而在紫外光之吸收測試中，其會吸收 280-300nm UVB 範圍之紫外光。

## 二、簡介

皮膚是由表皮、真皮和皮膚附屬器官三部分組成，其中真皮結構的改變是皮膚老化的主要原因。衰老的真皮厚度變薄，密度降低，主要是由於真皮膠原含量降低所引起的。由日光中紫外線輻射所產生的自由基除了直接對細胞生物大分子造成損傷外，還可啟動皮膚角質形成細胞和成纖維細胞表面的生長因子和細胞因子受體信號轉導通路，導致轉錄因子 AP-1 異常活化。AP-1 活化一方面可使皮膚膠原合成能力降低，另一方面啟動基質金屬蛋白酶（MMP）表現，MMP 活性增強，分解真皮膠原。由於真皮層膠原合成減少，同時分解又在增加，所以膠原不斷減少，從而致使皮膚鬆弛，出現較深的皺紋。大量研究

資料表明，酪胺酸蛋白激酶啟動是自由基介導 AP-1 異常活化信號轉導通路的關鍵[1]。

異黃酮結構為(圖一)其主要來自 Leguminosas 科植物，在日常生活中則以大豆及其衍生製品為飲食之主要來源[2,3]。目前已知的異黃酮超過 1000 種，在大豆中主要以 Genistein、Daidzein 以及 Glycetein 的結構存在[4,5]。



圖一 異黃酮結構

在目前文獻的報導中指出異黃酮對於乳癌、前列腺癌、骨質疏鬆症以及心血管疾病的預防上有明顯的效果[6-10]。在研究上顯示：異黃酮在結構上類似於體內產生的雌激素具有弱雌激素之活性，因此異黃酮又被稱為植物雌激素。雖然異黃酮的活性遠小於正常的雌激素，然而當雌激素的感受器位置已經被較弱的植物雌激素占據時，那麼雌激素就不能再被結合，進而可抑制對荷爾蒙相關的疾病出現 [11-13]。

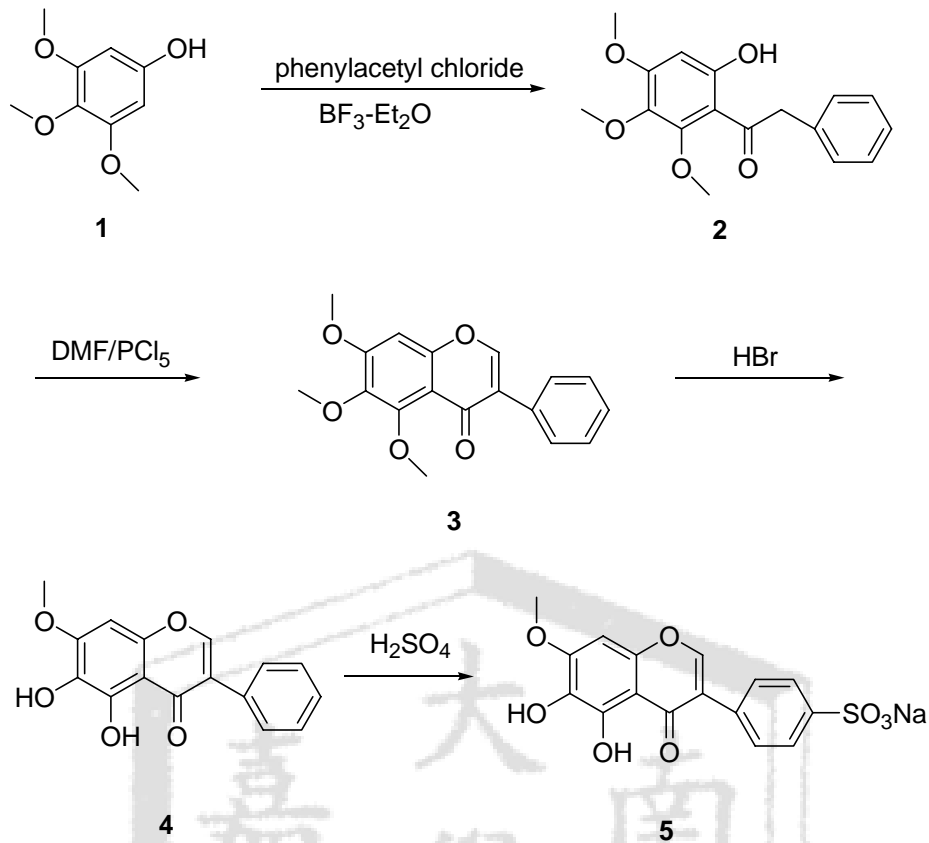
此外文獻亦指出異黃酮具有抗氧化作用，其可與活性氧反應，消除活性氧[14,15]、抑制 LDL 膽固醇的氧化[16]以及過量一氧化氮(NO)

的產生[17]。此外研究指出異黃酮對紫外線照射小鼠皮膚引起的光老化損傷具有明顯的防護作用[18]。由於異黃酮具有較強的抗氧化作用，穩定性佳，不僅自身能夠清除自由基，還能提高身體內抗氧化酶的活力[19]。因此，本研究以異黃酮結構為基礎，合成異黃酮及其磺酸鹽衍生物藉此探討此類衍生物對紫外光之吸收及酪胺酸酶活性的抑制作用。

### 三、結果與討論

#### 3.1 異黃酮及其磺酸鹽衍生物之合成

合成異黃酮的前驅物如圖所示：化合物 3,4,5-trimethoxyphenol (1) 與 phenylacetyl Chloride 進行 Friede-Crafts acylation 的反應，以  $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$  為催化劑加熱至 85 進行醃化反應，可得化合物 2，產率為 92.7%。接著利用化合物 2 在  $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$  為溶劑下由 DMF 提供一個碳進行環化反應，可得到異黃酮化合物 3，產率為 84.3%。其次將化合物 3 於  $\text{HBr/HOAc}$  於加熱迴流 4 小時，即可得到具有多酚結構之類異黃酮化合物 4 產率為 71%。最後化合物 4 與硫酸加熱至 60°C 反應 35 分鐘，之後加入食鹽將產物變成磺酸鈉鹽，產率為 73%。藉由此步驟可獲得數種不同結構之異黃酮衍生物，反應流程如圖一所示：



圖一 反應流程圖

### 3.2. 抑制酪胺酸酶活性與UV吸收測試

酪氨酸酶活性測定：取不同濃度的異黃酮與酪氨酸酶 100  $\mu$ L (50  $\mu$ ) 混和，37  $^{\circ}$ C 孵育 10 分鐘，加入 0.003 mol/L 多巴反應液 2 mL，繼續在 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 小時，立即在 450 nm 處測吸光度。酪氨酸酶活性抑制率按下列公式計算：

$$\text{抑制率}\% = (A_0 - A_t) / A_0 * 100$$

其中  $A_0$  為無抑制劑時空白的酶活性， $A_t$  為有抑制劑時的酶活性。

測試結果如下表所示：

濃度(mg/ml)	化合物 3	化合物 4	化合物 5	維他命 c
0.1	20.3%	28.8%	34.3%	41.2%
0.3	40.4%	45.7%	50.6%	60.4%
0.5	50.6%	68.7%	72.4%	77.4%
1	73.0%	85.3%	89.9%	97.1%

表一 酪氨酸酶的抑制率

UV 吸收測試結果顯示此類化合物會吸收 280- 300nm UVB 範圍之紫外光。

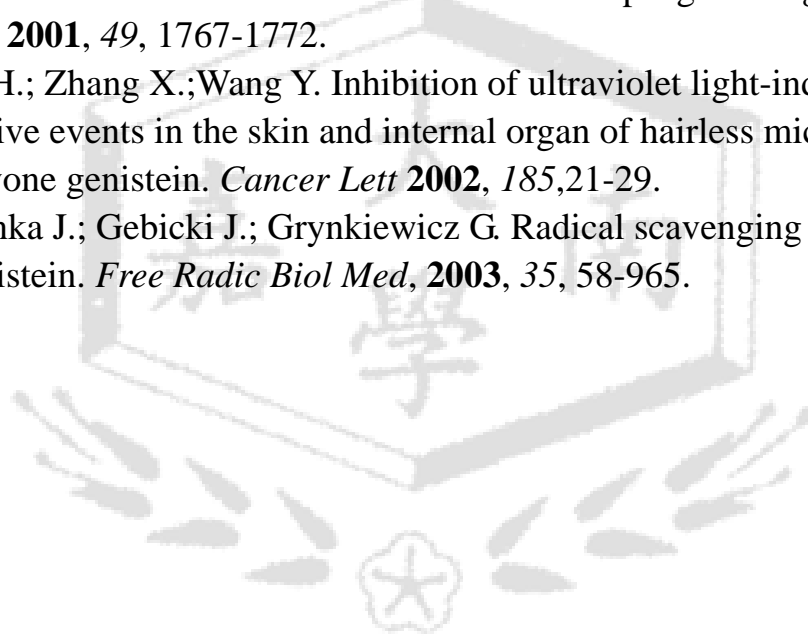
#### 四、結論

本研究所合成之異黃酮化合物對酪氨酸酶活性均有抑制作用，並且隨著異黃酮濃度的增加而提高其抑制率，其中以磺酸鹽化合物 5 之效果最佳，當其濃度在 1mg/ml 時，其對酪氨酸酶活性的抑制率可達 89.9%。而在紫外光之吸收測試中，其會吸收 280- 300nm UVB 範圍之紫外光，因此有潛力可做為未來在多功能性之防曬化妝品原料之開發。

## 五、參考文獻

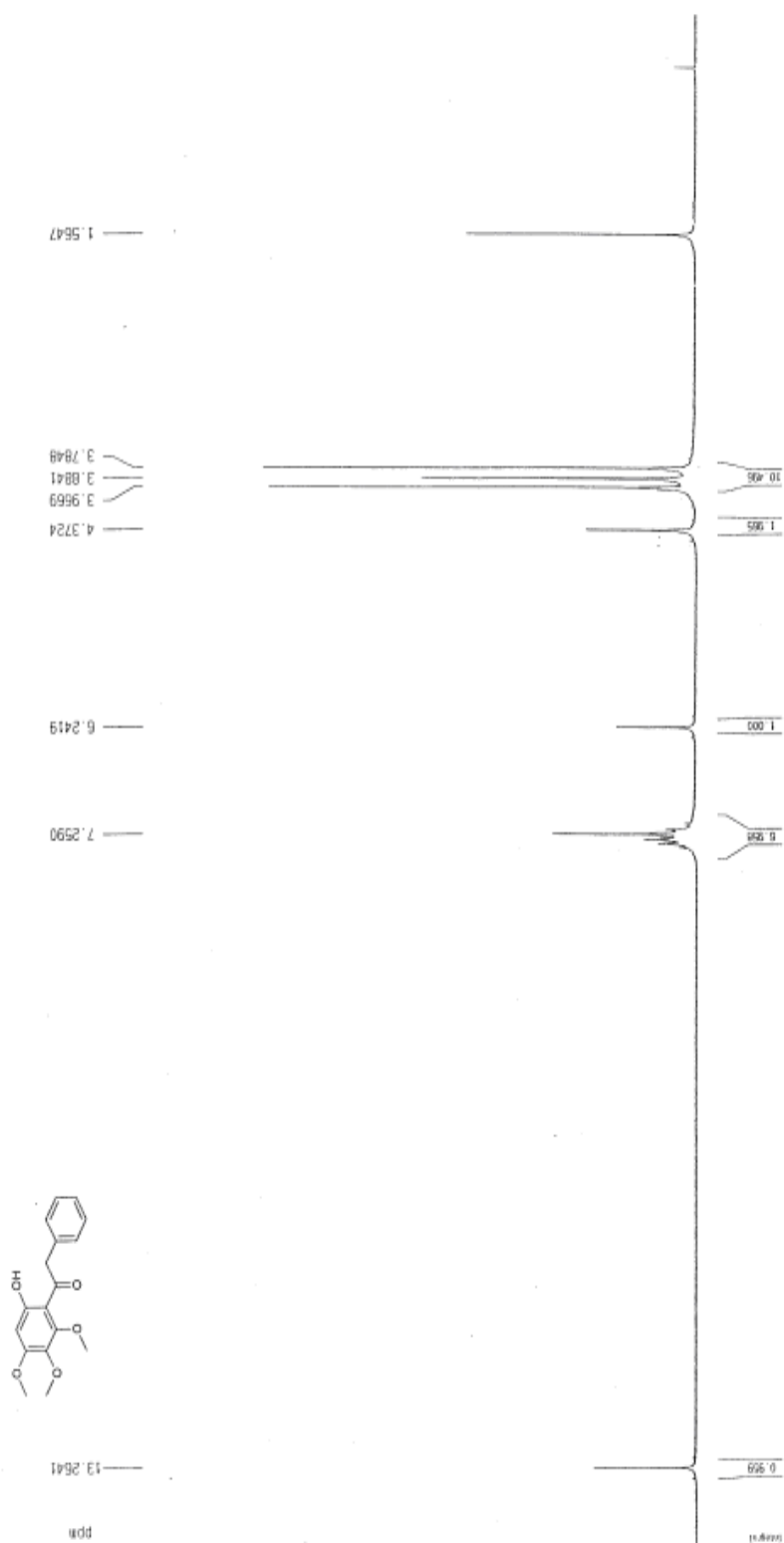
1. 王詩吟，吳景東，皮膚光老化與其防治的研究述評，遼寧中醫學院學報，2004，6，18-19.
2. Axelson, M.; Sjövall, J.; Gustafsson, B. E.; Setchell, K. D. R. Soya - a dietary source of the nonsteroidal oestrogen in man and animals. *J. Endocrin.* **1984**, *102*, 49-56.
3. Wang, H.; Murphy, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1666-1673.
4. King, R. A.; Bignell, C. M. Concentrations of isoflavone phytoestrogens and their glucosides in Australian soya beans and soya foods. *Aust. J. Nutr. Diet.* **2000**, *57*, 70-8.
5. Barnes, S.; Kirk, M.; Coward, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods - extraction conditions and analysis by HPLC massspectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2466-74.
6. Clarkson, T. B. Soy, soy phytoestrogens, and cardiovascular disease. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 566S-569S.
7. Messina, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 439S-450S.
8. Anderson, J. J.; Smith, B. M.; Washnock, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 464S-74S.
9. Hasler, C. M. The cardiovascular effects of soy products. *J. CardioVasc. Nurs.* **2002**, *16*, 50-63; quiz 75-6.
10. Hermansen, K.; Sondergaard, M.; Hoie, L.; Carstensen, M.; Brock, B. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* **2001**, *24*, 228-33.
11. Dalais, F. S.; Rice, G. E.; Wahlqvist, M. L.; Grehan, M.; Murkies, A. L.; Medley, G.; Ayton, R.; Strauss, B. J. Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric* **1998**, *1*, 124-9.
12. Knight, D. C.; Eden, J. A. A Review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* **1996**, *87*, 897-904.
13. Dwyer, J. T.; Goldin, B. R.; Saul, N.; Gualtieri, L.; Barakat, S.; Adlercreutz, H. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. *J. Am. Diet. Assoc.* **1994**, *94*, 739-43.

14. Anderson, J. W.; Diwadkar, V. A.; Bridges, S. R. Selective effects of different antioxidants on oxidation of lipoproteins from rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1998**, *218*, 376-381.
15. Appelt, L. C.; Reicks, M. M. Soy induces phase 2 enzymes but does not inhibit dimethylbenz [a]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1820-1826.
16. Meng, Q. H.; Lewis, P.; Wa'ha'la', K.; Adlecreutz, H.; Tikkanen, M. J. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1438*, 369-376.
17. Sheu, F.; Lai, H.-H.; Yen, G.-C. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1767-1772.
18. Wei, H.; Zhang X.; Wang Y. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organ of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett* **2002**, *185*, 21-29.
19. Zielonka J.; Gebicki J.; Gryniewicz G. Radical scavenging properties of genistein. *Free Radic Biol Med*, **2003**, *35*, 58-965.

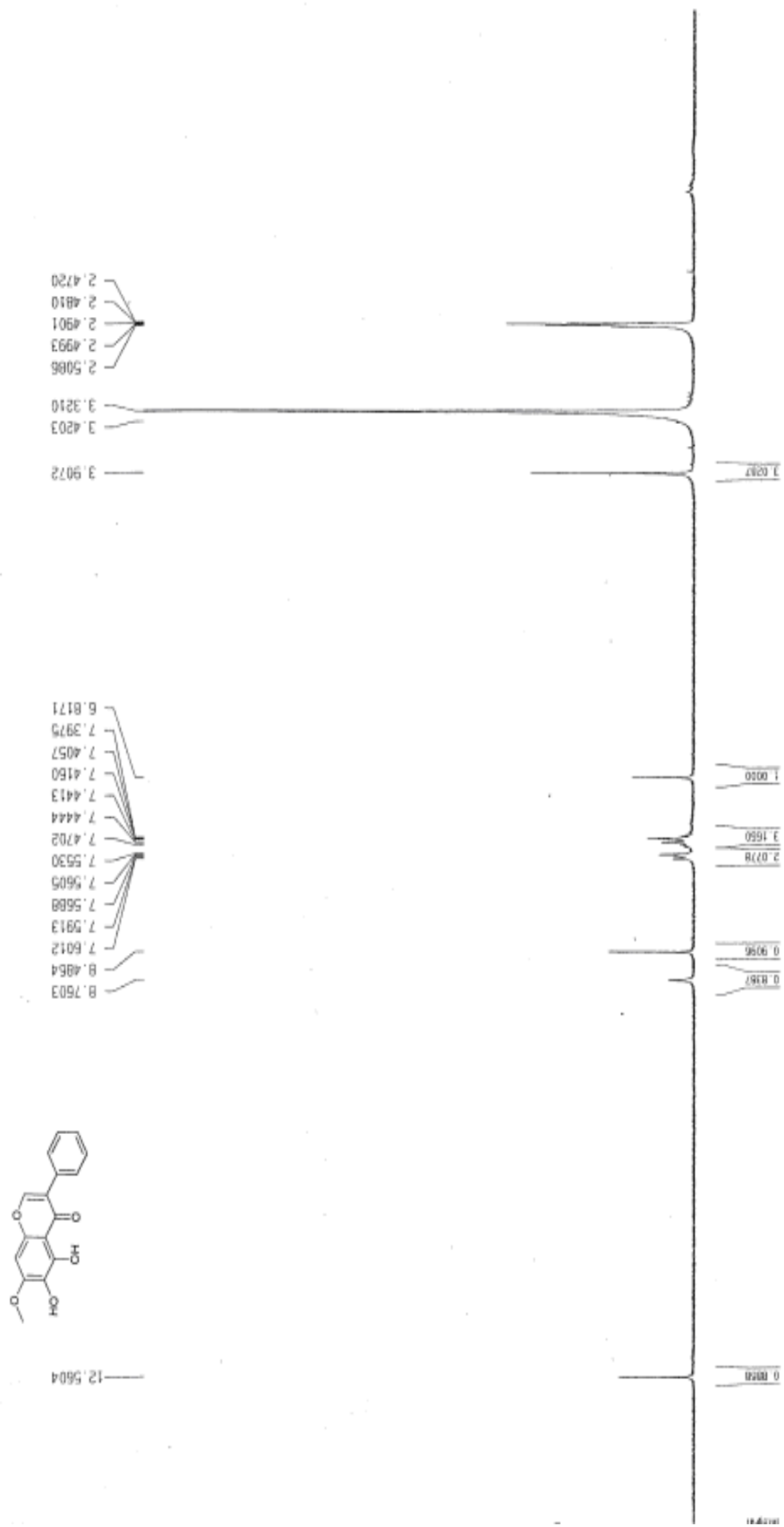




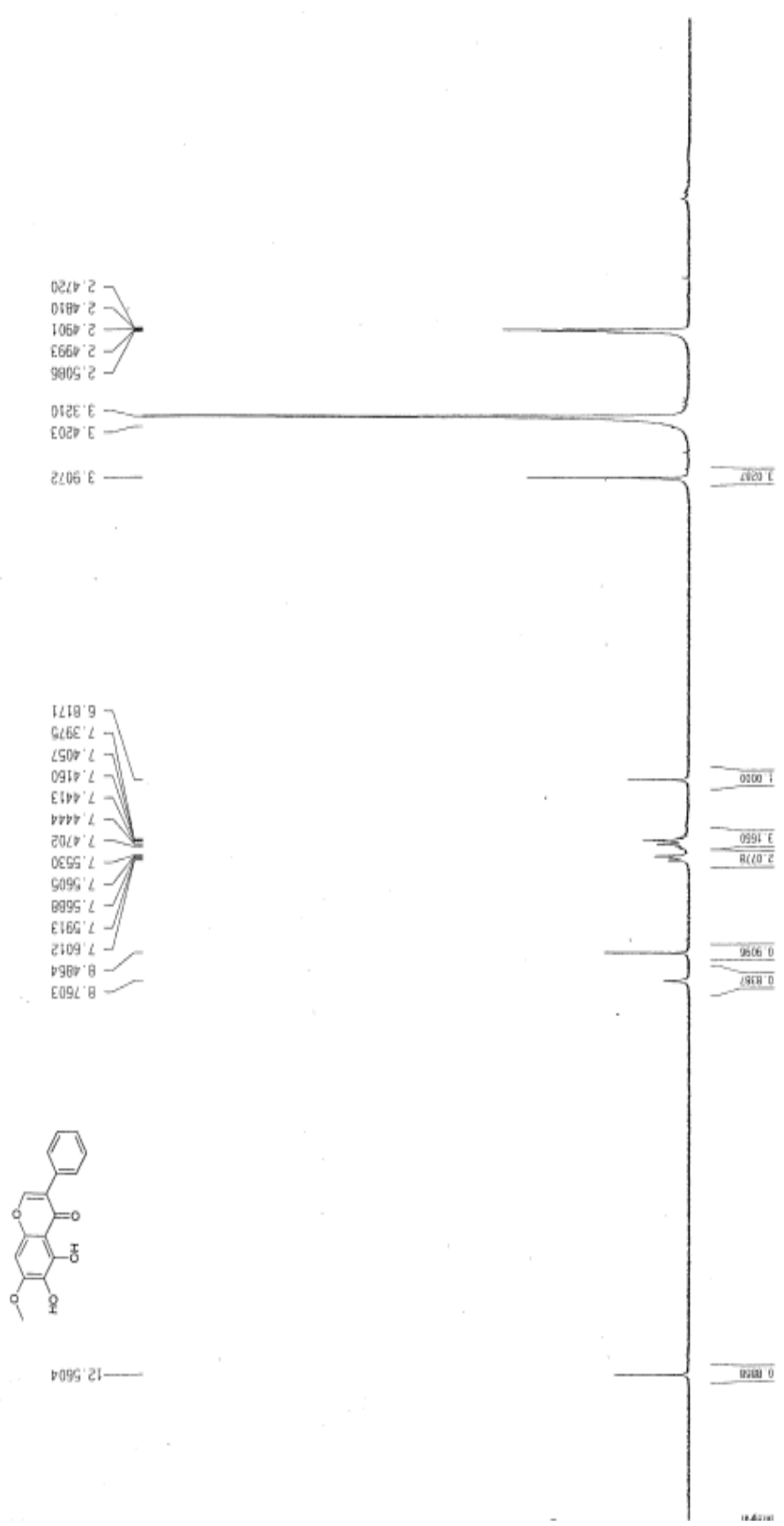
六、附件



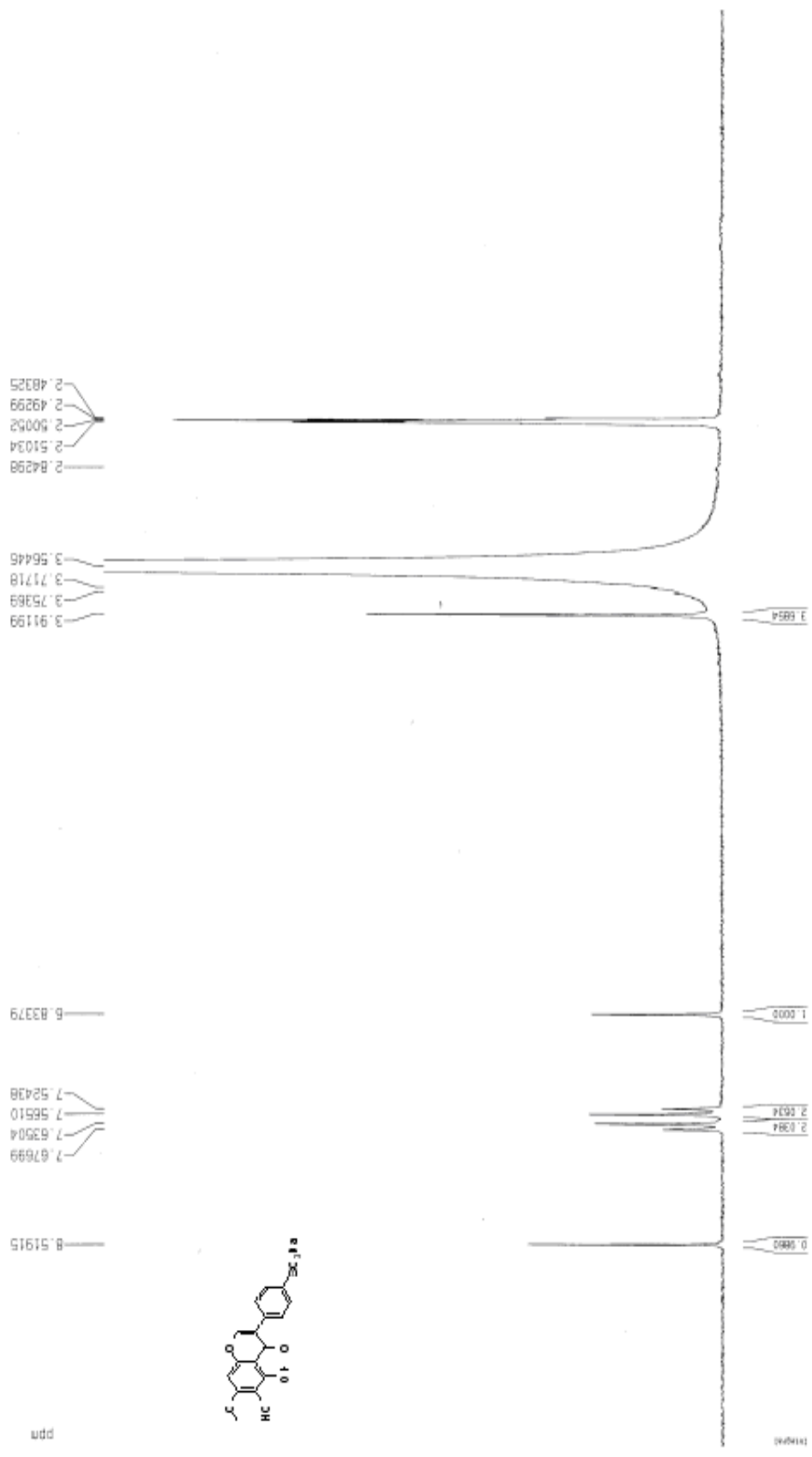
化合物 2 之  $^1\text{H}$ NMR 光譜圖



化合物 3 之  $^1\text{H NMR}$  光譜圖



化合物 4 之  $^1\text{H}$ NMR 光譜圖



化合物 5 之  $^1\text{H}$ NMR 光譜圖