

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC-95-02

計畫名稱：利用簡易有機方法製備具有抗氧化能力之多酚類化合物

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

整合型計畫

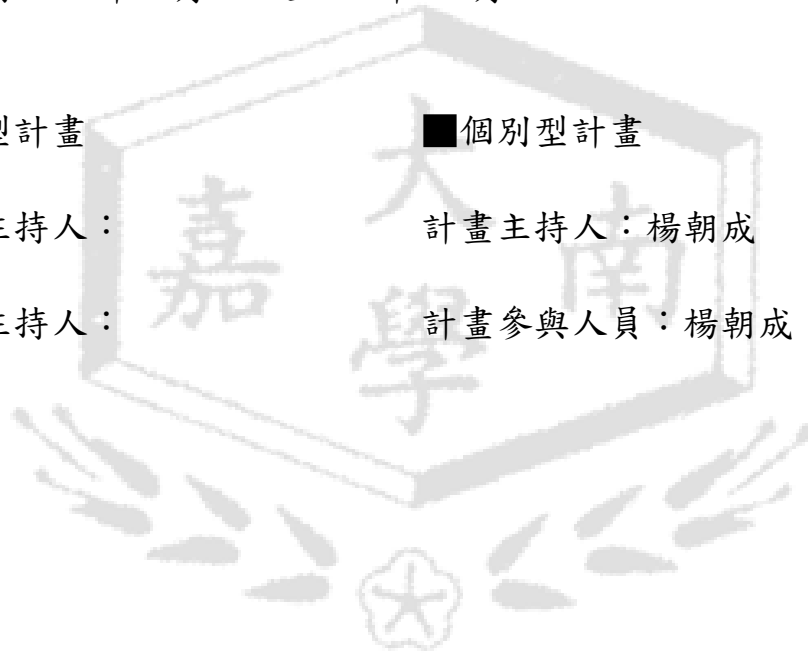
個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：楊朝成

子計畫主持人：

計畫參與人員：楊朝成、張嘉苓



中華民國 96 年 02 月 28 日

摘要

本研究主要利用簡易有機反應方法合成一系列 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物，進一步以體外試驗進行抗氧化的能力，並與水溶性維生素 E 比較其抗氧化的功效。由結果顯示，抗自由基能力與羥基數量及取代位置有關，其中又以環上具有兩個或三個羥基取代且在鄰位或對位時具有較佳之抗氧化效果。

關鍵字：*N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺、抗氧化。

Abstract

In this study we aim to originally synthesize a series of highly productive *N*-(hydroxy phenyl) polyhydroxy-benzamides and observe their *In vitro* of antioxidant activity. The results not only depended on number and position of hydroxyl substitutes, but also theirs at *ortho* and *para* positions are greater effective on antioxidant.

Key words : *N*-(hydroxy phenyl) polyhydroxy-benzamides, antioxidant activity.

前言

當今全球化粧品與美容相關市場高達 2 仟億美元，且該產業並以每年 7% 速度成長，超越世界 GDP 成長率的兩倍之多。如此龐大商機主要來自(1)提高外在吸引力是人類自古以來之基本需求；(2)化粧品廠商善用現代化媒體力量主攻廣告與行銷策略；(3)化粧品科技的進展滿足消費者的心理期待，並轉為廠商行銷手法之一環。

化粧品市場之成長主要來自產品功效之提昇，而整體護膚功效分析，與護膚產品相關的基本功能有七項，依序分別為抗老、保濕、去角質、潔膚、消炎、美白、防曬等，而其中又以延遲老化原因之抗氧化訴求特別強烈。因此，廠商及各研究機構投入大量研究人力與金錢致力於抗氧化產品原料與配方之開發。

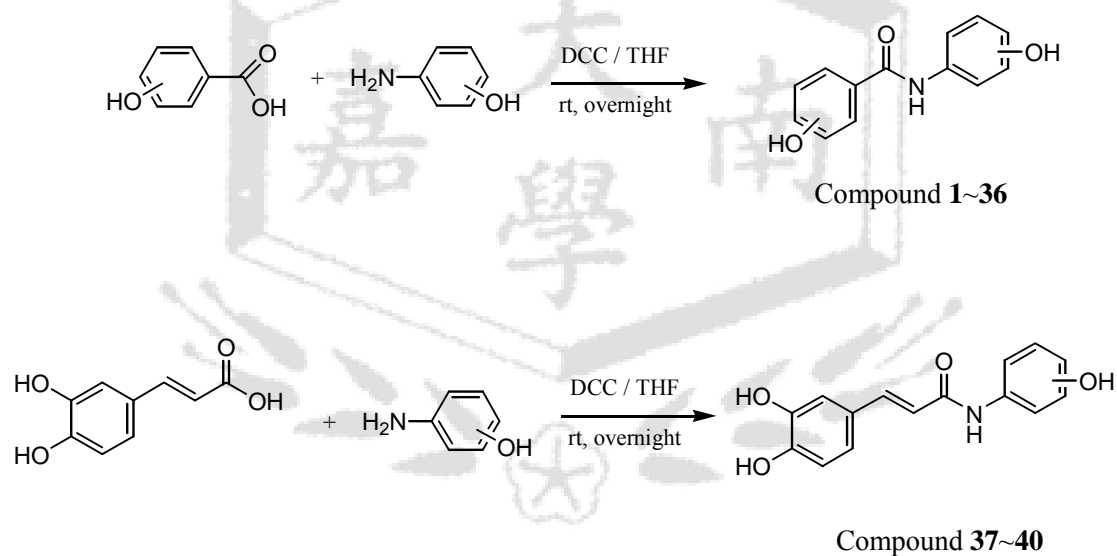
近年來有關導致人類老化因素研究有許多報導，自古以來，人們追求永生青春就不曾間斷，現今世界科技仍無法讓人長生不生與青春永駐，但在化粧品世界，藉助彩粧修飾皮膚使人外表光彩，生活更有自信與尊嚴，而皮膚抗老化問題，就成了目前最熱門也是化粧品最明顯有研究的課題之一；自由基理論是目前受歡迎也是最易被接受，所謂自由基即是指一化學物質具有不成對電子，而此不成對電子本身極不穩定，可直接攻擊身體組織，使得細胞破壞，而加速皮膚老化或促成癌症產生。雖然人類身體本身自有一套完整抗氧化系統以防止自由基傷害(如超氧化物轉化酶(superoxide dismutase)、過氧化氫酶(catalase)等等)，但由於這些體內抗氧化酵素隨年齡增長而逐漸減少，因此藉由許多維生素或天然抗氧化成分的攝取，來彌補其抗氧化之不足，但由於自由基有許多種類，現今並無一成分可以完全防止自由基的傷害，目前已知許多含有酚類化合物具有抗自由基能力，我們實驗室以往已合成一系列(polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl) amines 化

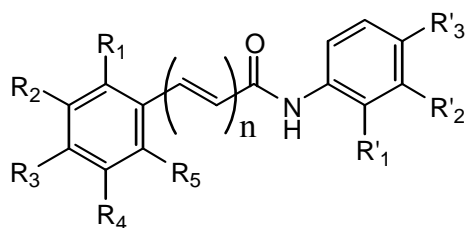
合物，並進行其抗氧化研究，其抗氧化能力受羥基取代數量與位置有關且有不錯之抗氧化效果，但由於亞胺結構不穩定，容易受酸水解，因此，本論文將進行合成 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺一系列具穩定之醯胺化合物，利用體外抗氧化測試效果，探討其對抗自由基之能力。

結果與討論

一、 合成 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物：

分別利用羥基苯甲酸(oxybenzoic acid)或咖啡酸(caffeic acid)與胺基苯酚(aminophenol)經由 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)在無水四氫呋喃(Tetrahydrofuran, THF)溶液中，進行脫水反應後，經由矽膠管柱分離，以 ^1H 及 ^{13}C NMR 測試鑑定其結構，得到高產率之醯胺(amides)化合物(compound 1~40)，如表一所示。





Compounds	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R' ₁	R' ₂	R' ₃
1	0	OH	H	H	H	H	H	H	H
2	0	OH	H	H	H	H	OH	H	H
3	0	OH	H	H	H	H	H	OH	H
4	0	OH	H	H	H	H	H	H	OH
5	0	H	OH	H	H	H	H	H	H
6	0	H	OH	H	H	H	OH	H	H
7	0	H	OH	H	H	H	H	OH	H
8	0	H	OH	H	H	H	H	H	OH
9	0	H	H	OH	H	H	H	H	H
10	0	H	H	OH	H	H	OH	H	H
11	0	H	H	OH	H	H	H	OH	H
12	0	H	H	OH	H	H	H	H	OH
13	0	OH	H	OH	H	H	H	H	H
14	0	OH	H	OH	H	H	OH	H	H
15	0	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
16	0	OH	H	OH	H	H	H	H	OH
17	0	OH	H	H	OH	H	H	H	H
18	0	OH	H	H	OH	H	OH	H	H
19	0	OH	H	H	OH	H	H	OH	H
20	0	OH	H	H	OH	H	H	H	OH
21	0	OH	H	H	H	OH	H	H	H
22	0	OH	H	H	H	OH	OH	H	H
23	0	OH	H	H	H	OH	H	OH	H
24	0	OH	H	H	H	OH	H	H	OH
25	0	H	OH	OH	H	H	H	H	H
26	0	H	OH	OH	H	H	OH	H	H
27	0	H	OH	OH	H	H	H	OH	H
28	0	H	OH	OH	H	H	H	H	OH
29	0	H	OH	H	OH	H	H	H	H
30	0	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
31	0	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
32	0	H	OH	H	OH	H	H	H	OH

33	0	H	OH	OH	OH	H	H	H	H
34	0	H	OH	OH	OH	H	OH	H	H
35	0	H	OH	OH	OH	H	H	OH	H
36	0	H	OH	OH	OH	H	H	H	OH
37	1	H	OH	OH	H	H	H	H	H
38	1	H	OH	OH	H	H	OH	H	H
39	1	H	OH	OH	H	H	H	OH	H
40	1	H	OH	OH	H	H	H	H	OH

表一、製備 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物：

二、體外抑制酪胺酸酵素之測試：捕捉 DPPH 自由基能力測試：

DPPH 溶於乙醇中呈藍紫色，本身是一種穩定的自由基，此實驗系統廣泛運用在抗氧化能力的測定，常使用 DPPH 來評估抗氧化物的供氫能力。當加入的樣品，若可以和 DPPH 自由基直接反應，則會阻止 DPPH 自由基進行連鎖反應，溶液顏色會轉成黃色，即表示加入的樣品具有捕捉 DPPH 自由基的能力，而呈現的顏色愈淡，則表示捕捉 DPPH 自由基的能力愈佳。將樣品先稀釋成各種不同濃度，利用分光光度劑(ELISA reader)測其 OD_{540 nm} 之吸光值，並與空白對照組的吸光值作比較，求出抑制百分比，作圖畫線計算出 IC₅₀，即可判斷出樣品捕捉自由基能力的強弱。

$$\text{捕捉 DPPH 自由基能力(\%)} = [1 - (A_{540 \text{ nm, sample}}/A_{540 \text{ nm, blank}})] \times 100$$

三、體外抑制酪胺酸酵素之測試結果：

我們將 40 種不同數量及位置之羥基取代醯胺化合物(Compound 1~40)，分別配置不同濃度之乙醇溶液中(最終測試濃度分別為 1.0，2.0，5.0，10.0，20.0，25.0，30.0 μg/ml)作體外抗自由基之測試，利用 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。並求出其之 IC₅₀ 之濃度。

其結果如下表二所示：

	1 μg/ml	2 μg/ml	5 μg/ml	10 μg/ml	20 μg/ml	25 μg/ml	30 μg/ml	IC ₅₀ (μg/ml)
1	1.85	1.81	3.18	2.28	3.50	3.18	3.93	567.9
2	6.87	9.23	24.16	35.70	54.91	55.77	59.11	20.88
3	1.92	3.97	3.77	7.54	10.80	11.43	13.55	122.0
4	3.34	8.05	18.54	32.99	68.70	71.88	75.26	17.0
5	2.48	1.14	1.45	0.63	0.90	—	1.26	—
6	3.14	5.03	7.27	12.81	20.64	22.44	25.98	59.0
7	0.75	0.67	1.34	0.59	1.77	0.86	2.67	530.4
8	3.03	6.60	16.16	31.33	46.11	49.17	52.87	24.5
9	0.71	1.65	0.94	1.26	0.67	0.98	0.83	—
10	2.71	3.18	8.45	13.68	23.15	25.04	29.80	50.1

11	1.34	0.35	2.08	0.86	0.90	0.71	1.69	–
12	3.81	5.70	16.43	31.09	49.10	52.59	55.46	23.2
13	2.15	2.58	4.13	6.66	9.20	8.60	9.67	166.6
14	0.09	4.39	12.90	25.02	47.33	52.97	57.14	23.67
15	3.40	–	6.10	7.44	10.88	8.34	3.53	71.43
16	2.58	3.65	11.48	22.83	44.50	54.39	66.64	22.61
17	5.19	12.95	32.65	64.95	88.86	89.91	91.33	11.8
18	19.14	21.72	31.50	49.63	53.29	53.18	53.74	19.7
19	8.39	10.62	34.04	70.38	85.56	85.28	86.56	12.0
20	8.88	13.85	34.39	51.54	82.00	81.97	81.83	13.1
21	5.92	11.24	24.82	38.71	55.55	58.61	61.82	19.8
22	2.89	4.98	13.40	31.99	59.10	63.17	67.77	19.4
23	3.27	5.29	17.02	26.07	43.82	47.16	52.31	25.8
24	2.82	5.46	16.08	31.01	73.58	79.74	82.81	16.0
25	7.00	10.96	32.58	75.79	81.16	80.17	81.00	12.5
26	10.73	21.58	58.28	79.71	80.51	79.90	80.05	10.6
27	7.58	13.82	36.73	76.89	80.89	80.21	80.89	12.1
28	12.60	22.31	48.46	78.80	81.08	80.21	80.89	10.8
29	2.19	2.49	5.72	6.41	13.67	11.39	12.34	110.5
30	1.68	7.27	11.61	18.83	26.61	29.28	31.81	44.3
31	0.60	3.83	6.49	7.31	12.04	6.32	14.70	98.8
32	–	6.02	12.38	20.81	41.40	43.64	47.81	28.2
33	8.47	17.73	40.34	69.71	81.84	82.55	82.00	11.8
34	10.02	18.52	48.97	80.64	82.47	82.47	85.59	10.9
35	8.66	15.46	43.60	79.45	92.97	92.05	92.05	10.4
36	4.81	18.96	48.81	81.32	82.67	83.15	83.11	11.1
37	7.83	13.63	94.90	64.27	79.13	79.09	78.97	12.9
38	4.53	13.00	34.10	68.44	78.18	79.61	79.25	13.0
39	7.67	13.59	33.55	59.42	77.54	78.46	78.74	13.3
40	3.02	14.19	32.55	49.96	73.73	75.00	76.55	14.6
Trolox	3.65	6.20	16.86	40.16	86.33	89.46	91.97	13.9

表二、*N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物 DPPH 抗氧化效果

註 1. 以 Trolox 為比較試品。

四、結果與討論：

實驗結果發現 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物體外抗自由基能力與羥基取代數量及位置有關，當酸基之苯環上只有單羥基取代時，不管羥基所在位置其抗氧化能力皆不佳，但苯胺基上羥基在與胺基為鄰位及對位取代(1~12)時其抗氧化

力明顯優於間位及無羥基取代之醯胺化合物。

當酸基之苯環上有兩個羥基取代且互為間位(13~16, 29~32)時, 其抗氧化能力雖然較單取代時強, 但與 Trolox 有明顯差距, 另外化合物 21~24 也互為間位但其也有不錯之抗氧化能力, 其原因不明, 推測如在 R₁ 位置單取代時較其他兩個位置具有較強效果, 使用化合物 21~24 具有在酸基兩個鄰位位置取代使得其具有較強之抗氧化能力; 而苯胺基上羥基位置取代也與酸基苯環上單羥基取代有類似影響, 但較不顯著。

若酸基之苯環上有兩個羥基取代且互為羥基互為鄰位或對位時(17~20, 29~32, 37~40), 具有良好之抗氧化能力, 但苯胺基上羥基位置取代之影響就很小, 其抗氧化能力可能是兩個羥基取代且互為羥基互為鄰位或對位時, 可以較容易氧化為醌類(quinone)化合物。

當酸基之苯環上具有鄰位之三個羥基取代(33~36, R₂ & R₃ & R₄)時, 具有最強之抗氧化效果。

由於此部分只有 DPPH 測試結果, 我們將進一步對這些化合物進行其他方式作抗氧化能力測試、抑制黑色素細胞形成之美白測試及毒性測試, 期待其能應用於化粧品產品上。

結論

N-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物之抗氧化能力由本實驗結果顯示: (1)與羥基取得數量及位置有關; (2)在羧酸之苯上羥基對抗氧化影響較大, 具有兩個或三個羥基取代且鄰位或對位者有較佳之抗氧化能力; (3)在苯胺基之羥基取代, 當其具有強抗氧化能力時影響不明顯, 而在弱抗氧化結果時, 在 R'₁ 或 R'₃ 位置時顯示比在 R'₂ 或無羥基取代較強之抗氧化能力。

實驗部分

一、合成 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物一般步驟: 取 5 mmol 的 Oxybenzoic acid 於圓底瓶中, 加入 6 mmol 的 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)及 20 毫升之無水四氫呋喃(THF), 於 0 °C 中反應半小時, 再加入 5 mmol 的 aminophenol 之 10 毫升 THF 溶液, 回至室溫繼續反應隔夜, 以 YLC 檢測反應, 待反應完成後, 減壓濃縮機抽去 THF 溶劑, 加入 30 毫升蒸餾水, 以乙酸乙酯萃取(4 x 20 ml), 合併有機層以飽和食鹽水洗, 之後用無水硫酸鈉乾燥, 過濾濃縮, 再經矽膠管柱以乙酸乙酯及正己烷(30~70%)為沖提液分離, 分別利用 ¹H 及 ¹³C NMR 測試鑑定其結構。

N-(3'-羥基苯)-3,4-二羥基苯醯胺 *N*-(3'-hydroxy phenyl)-3,4-dihydroxy-benzamide 31: 橘色固體, ¹H NMR(200 MHz, MeOH-d₄) δ 6.45(1 H, dd, *J* = 2, 2 Hz), 6.57(1H, dd, *J* = 8, 1 Hz), 6.78(2 H, d, *J* = 2 Hz),

7.01~7.17 (2 H, m), 7.25 (1H, dd, $J = 2, 2$ Hz); ^{13}C NMR(50 MHz, MeOH- d_4), 106.76(d), 107.00(2C, d), 109.40(d), 112.57(d), 113.41(d), 130.45(d), 138.56(s), 140.82(s), 158.79(s), 159.83(2C, s), 169.20(s).

二、體外抑制酪胺酸酵素之測試：其詳細步驟如下：

取 20 μl 不同濃度(1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)之合成的醯胺化衍生物乙醇溶液，分別加入 96 well 中，每 well 添加 180 μl 之 DPPH 溶液，每次處理三重複，混合均勻，避光靜置 30 分鐘後，以 ELISA reader 測其 540 nm 之吸光值，並求出清除率(百分比)，再分別計算出 IC_{50} 值。空白對照組不加待測物，直接以 20 μl 之乙醇代替，此實驗以 Trolox 為正相對照，比較其補捉 DPPH free radical 之差異。DPPH 自由基清除能力之計算方法如公式(1)所示。 IC_{50} 之計算方法：由公式(1)求出不同濃度之清除率，再以 EXCEL 2003 軟體之 TREND 函數進行運算後所得。

謝誌

感謝嘉南藥理科技大學及教育部經費支持，另外感謝林清宮老師老師在抑制酪胺酸酵素實驗上之協助。

參考文獻

1. 郭俊賢、殷正華、蔣亞婷、林翠芊、郭光揮；”奈米生技化粧品專利地圖及分析”，行政院國家科學委員會科學技術資料中心。2004, 6 月
2. N.-H. Shin; S. Y. Ryu; E. J. Choi; S.-H. Kang; I.-M. Chang; K. R. Min; Y. Kim. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* **1998**, 243, 801.
3. R. Kohen, *Biomed & Pharmacother*, **1999**, 53, 181-192.
4. I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*; **1995**, 64, 97-112.
5. 林小菁；”(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物抗氧化之研究”，嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所碩士論文，2005，7 月。蔡哲秀，”原兒茶酸及咖啡酸衍生物之合成及在化粧品之應用”，嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所碩士論文，2006，7 月。
6. S. Y. Choi; S. Kim; J. S. Hwang; B. G. Lee; H. Kim; S. Y. Kim; *Biochem. Pharm.* **2004**, 67, 707.
7. T. Hatano, H. Kagawa, H. T. Yasahara, T. Okuda, *Chem. Pharmaceutical. Bull.*, **1988**, 36, 2090-2097.
8. A.-G. Carlos, G. Grace, B.-M. Mercedes, H. Particio, C. G. Victor, *Food Chem.* **2006**.