

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC9505

計畫名稱：中草藥化粧品原料之開發與應用(II)

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

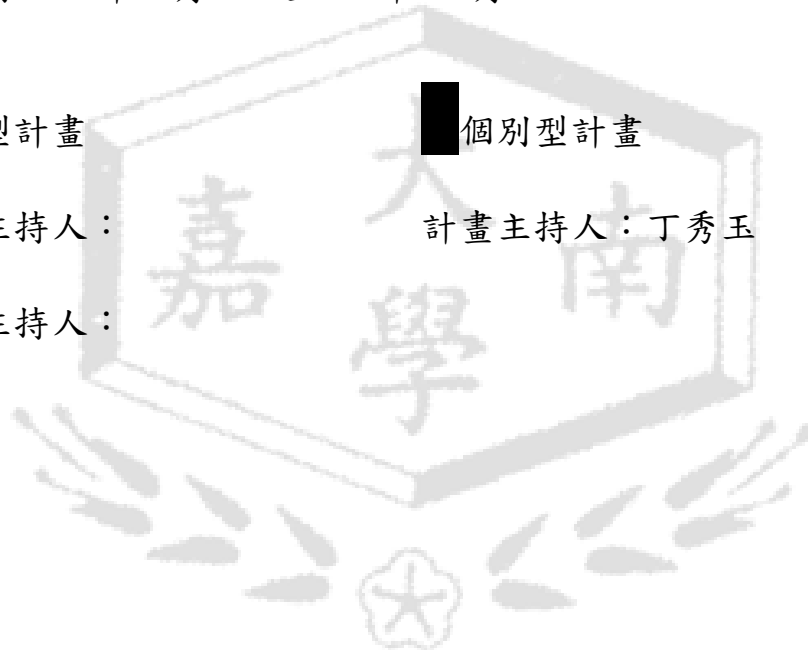
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：丁秀玉

子計畫主持人：



中華民國九十六年二月二十八日

中文摘要

中藥牡丹皮 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 以生物活性指標導引純化分離有效成分，其結果得到具有掃除自由基 DPPH 的成分為 2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (1)、2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (2)、Methyl gallate (4)、Benzoic acid (5)、4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (6)、Ethyl gallate (7)、*p*-Hydroxybenzoic acid (8) 及 Gallic acid (9) 和抑制酪氨酸酶活性的成分為 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (3)、Benzoic acid (5)、Ethyl gallate (7) 及 *p*-Hydroxybenzoic acid (8)。分離出化合物中 4 和 7 為首次自此植物中分離得到。化合物 1、2、5 和 6 為首次發現其具有將其應用在掃除自由基 DPPH，化合物 3、7 和 8 為首次發現其具有抑制酪氨酸酶之活性。上述有效成分之化合物是經由光譜分析而確定其化學結構，

關鍵字：牡丹皮、抗自由基、酪氨酸酶抑制劑

Abstract

Chinese herb” Mudanpi “ (root cortex of *Paeonia suffruticosa* Andr.) has been described to possess cosmetic activity in tradition Chinese medicine. The bioassay guided purification to get nine compounds. Among of isolated compounds, 2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (**1**), 2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (**2**), Methyl gallate (**4**), Benzoic acid (**5**), 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**6**), Ethyl gallate (**7**), *p*-Hydroxybenzoic acid (**8**), and Gallic acid (**9**) show DPPH scavenging activity and 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (**3**), Benzoic acid (**5**), Ethyl gallate (**7**), and *p*-Hydroxybenzoic acid (**8**) inhibit tyrosinase activity. Among the purified compounds, **4** and **7** were the first purified from plant; **1**, **2**, **5**, and **6** were first identified with DPPH scavenging activity; **3**, **7**, and **8** were first identified as tyrosinase inhibitors. Their structures have been established on the basis of spectral evidences.

Key words : Mudanpi、 free radical scavenger、 tyrosinase inhibitor

實驗方法

(一)、抽取及純化分離

取10.0公斤的牡丹皮，以乙醇浸泡連續抽取四次，所得之抽取液經減壓濃縮後得到暗褐色濃縮物1.48公斤；將其暗褐色濃縮物用不同極性之溶媒進行萃取，其溶媒如下：*n*-Hexane - 95% MeOH (1:1)、EtOAc - H₂O (1:1)、*n*-BuOH - H₂O (1:1)。將萃取所得之*n*-Hexane層、EtOAc層、*n*-BuOH層與H₂O層濃縮物進行抑制酪氨酸酶及掃除自由基DPPH分析之測試，結果發現在EtOAc層有明顯之生物活性。

將所得之 EtOAc層以矽膠管柱層析法，使用沖提溶媒系統為CHCl₃，CHCl₃/MeOH，MeOH，依序增大溶媒之極性進行純化分離。其純化分離得到之收集液，可粗分成七個 Fraction (Fr. 1~7)。再將此 Fr. 1~7進行抑制酪氨酸酶及掃除自由基DPPH活性分析之藥理試驗，結果發現在Fr. 2及Fr. 4同時具有明顯的抑制酪氨酸酶及掃除自由基DPPH的作用。而Fr. 3及Fr. 6則僅有明顯的掃除自由基DPPH的作用。

將上述有效之部分分別以分子篩 (Sephadex LH-20) 管柱分離，再用低壓製備式碳-18逆相層析法進行純化或再以製備式高效液相色層分析法以製備式苯基型管柱進行純化分離，在Fr. 2得到具有掃除自由基 DPPH 的化合物 2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (**1**, 149.2mg)、2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (**2**, 5.4mg)及得到具

有抑制酪氨酸酶活性的化合物3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (**3**, 66.7mg)。Fr. 3得到掃除自由基DPPH的化合物Methyl gallate (**4**, 10.7 mg)。Fr. 4得到同時具有抑制酪氨酸酶及掃除自由基DPPH的化合物Benzoic acid (**5**, 2.2 g)、Ethyl gallate (**7**, 51.8 mg)及*p*-Hydroxybenzoic acid (**8**, 430.4 mg)，具有掃除自由基DPPH的化合物4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**6**, 7.7 mg)。

Fr. 6得到具有掃除自由基DPPH的化合物Gallic acid (**9**, 85.6 mg)。

(二)、生物活性試驗

1. 抑制酪氨酸酶活性分析⁽¹⁾

1mM酪氨酸溶液的配製：精秤酪氨酸0.18 g，溶於1 L 50 mM的磷酸緩衝溶液(pH 6.8)中，震盪混合均勻。

酪氨酸酶溶液的配製：依藥品上標示之活性單位量(U)，以50 mM的磷酸緩衝溶液(pH 6.8)為溶劑，配置成10 U/ul的酪氨酸酶溶液，震盪混合均勻後，分裝並冰凍儲存。

將不同濃度的待測樣品，取20 ul至96孔微陣列盤。控制組以水代替待測樣品。再加入79 ul的1 mM酪氨酸溶液。最後加入1 ul的10 U/ul酪氨酸酶溶液。將96孔微陣列盤置於震盪器上震盪反應30 min。反應完成後加入100 ul之0.1當量的冰醋酸終止反應。取終止反應混和液

160 ul加至已含640 ul水之塑膠比色槽，混合均勻後，以分光光度計於475 nm測其吸光值。

酪氨酸酶抑制率計算公式

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

A = 控制組反應於475 nm測得吸光值。

B = 實驗組反應於475 nm測得吸光值。

2. 掃除自由基DPPH活性分析⁽²⁾

1 mM DPPH溶液的配製：精秤 DPPH 0.39g，溶於1公升50 %的甲醇中，震盪混合均勻。

加入50 mM的磷酸緩衝溶液(pH 6.8) 100 ul至96孔微陣列盤。將不同濃度的待測樣品，取 20 ul 至96孔微陣列盤。控制組以水代替待測樣品。再加入80 ul 1 mM的DPPH溶液。反應液80 ul加至已含720 ul水之塑膠比色槽，混合均勻後以分光光度計於517 nm測其吸光值。

掃除自由基 (DPPH) 能力之計算公式

$$\text{DPPH radical Scavenging (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

A = 控制組反應於517 nm測得吸光值。

B = 實驗組反應於517 nm測得吸光值。

結果與討論

針對我國傳統中藥牡丹皮(*Paeonia suffruticosa* Andr.)進行其具有掃除DPPH自由基及抑制酪胺酸酶活性之有效成分純化分離，結果自牡丹皮中純化出多種具有生物活性的化合物。

(一)、牡丹皮有效成分純化分離之結果

在牡丹皮進行有效成分分離，其結果得到六個 Aromatic acid 之衍生物：Methyl gallate (4)、Benzoic acid (5)、4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (6)、Ethyl gallate (7)、*p*-Hydroxybenzoic acid (8)和 Gallic acid (9)及三個 Acetophenone 衍生物：2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (1)、2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (2) 及 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (3)共計九個已知有效成分。其中 Methyl gallate (4)和 Ethyl gallate (7)首次從牡丹皮分離得到。

(二)、牡丹皮有效成分掃除 DPPH 自由基之作用：

牡丹皮 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 純化分離流程如圖一所示，經由掃除 DPPH 自由基分析指標來純化分離，最後得到具有掃除 DPPH 自由基的純化合物八個，分別是 2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (1)、

2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (2)、Methyl gallate (4)、Benzoic acid (5)、4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (6)、Ethyl gallate (7)、*p*-Hydroxybenzoic acid (8)和 Gallic acid (9)。其掃除 DPPH 自由基活性 50 % (SC₅₀) 如表一所列。

表一. 牡丹皮掃除DPPH自由基有效成分之作用

Compound	SC ₅₀ (uM)
2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (1)	116
2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (2)	307
Methyl gallate (4)	70
Benzoic acid (5)	1500
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (6)	577
Ethyl gallate (7)	116
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (8)	297
Gallic acid (9)	82
L-ascorbic Acid	127

植物成分具有掃除自由基 DPPH 的研究目前已相當的多，其中 1、2 和 6 目前只在牡丹皮中被分離出。此外，4 是植物成分中掃除自由基 DPPH 最為有效的代表⁽⁴¹⁾。

(三)、牡丹皮有效成分抑制酪氨酸酶之作用

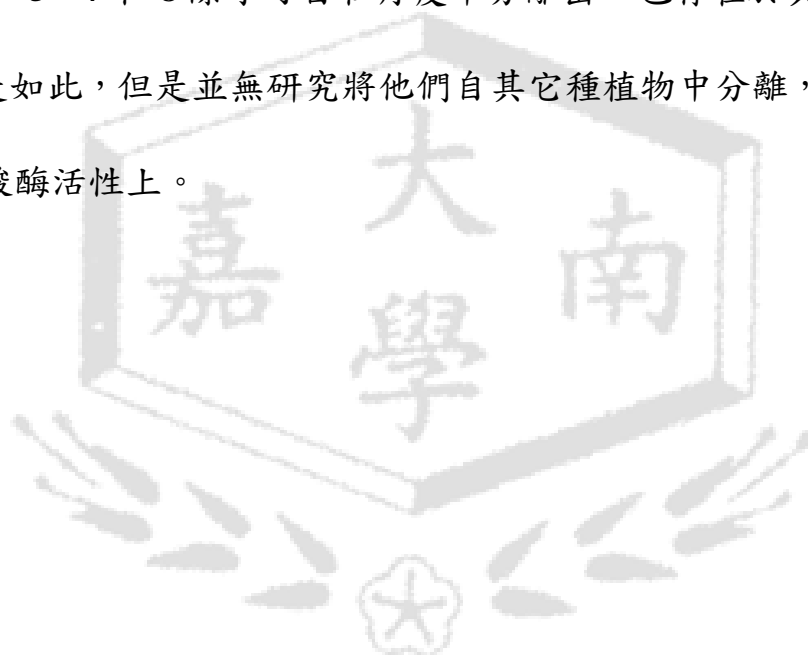
牡丹皮經由以抑制酪氨酸酶活性分析指標來純化分離，最後得到具有抑制酪氨酸酶活性的純化物四個，分別是 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (3)、Benzoic acid (5)、Ethyl gallate (7) 和 *p*-Hydroxybenzoic acid (8)。此四個純化合物抑制酪氨酸酶活性

50 % (IC₅₀) 如表二所列。

表二. 牡丹皮抑制酪氨酸酶有效成分之作用

Compound	IC ₅₀ (uM)
3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (3)	901
Benzoic acid (5)	877
Ethyl gallate (7)	1651
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (8)	891
Kojic acid	49

3、5、7 和 8 除了可自牡丹皮中分離出，也存在於其它種植物中，雖是如此，但是並無研究將他們自其它種植物中分離，應用在抑制酪氨酸酶活性上。



結論

中藥牡丹皮中得到具有掃除自由基 DPPH 的成分：
2,5-Dihydroxy-4-methylacetophenone (1) 、
2,5-Dihydroxy-4-methoxyacetophenone (2)、Methyl gallate (4) 、Benzoic acid (5)、4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (6)、Ethyl gallate (7) 、
p-Hydroxybenzoic acid (8)和 Gallic acid (9) 和抑制酪氨酸酶活性的成分：
3-Hydroxy-4-methoxyacetophenone (3) 、Benzoic acid (5) 、Ethyl gallate (7) 和 *p*-Hydroxybenzoic acid (8)。其中化合物 4 和 7 為首次自此植物中分離得到，化合物 1、2、5 和 6 為首次發現其具有將其應用在掃除自由基 DPPH 之活性，化合物 3、7 和 8 為首次發現其具有抑制酪氨酸酶之活性。研究結果除了讓我們了解到牡丹皮中是何種有效成分具有皮膚美白及改善皮膚外觀因老化所產生的問題外，也告訴了我們有效成分其美白之作用機轉之一是抑制酪氨酸酶。

中國醫藥美容在發展已經有了很長的歷史，這點可以從歷代流傳下來的典籍略窺一二。用現代科學的方法去研究中草藥有效成分對於改善皮膚外觀的功效，將其應用在日常生活上，造福人群也提昇生活的品質。

參考文獻

1. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, “ Inhibition of tyrosinase by green tea components”, *Life science* **65**, 241-246, 1999.
2. Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M, ”Separation of *Leucas aspera* , a medicinal plant of Bangladesh , guided by Prostaglandin inhibitory and antioxidant activity”, *Chem. Pharma. Bull.* **51**, 595-598, 2003.

