

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9751

總計畫名稱：生技藥物開發應用(一)

子計畫(三)名稱：傳統有機合成製藥開發研究

執行期間：97年1月1日至97年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：楊朝成

計畫主持人：

子計畫(三)主持人：楊朝成

計畫參與人員：

計畫參與人員：楊朝成、王詠騰、

莊庭珣

中華民國 98 年 02 月 28 日

摘要

本研究主要利用有機合成的方法，進行合成與番紅萃取物相似之衍生物，首先將羥基取代桂皮衍生物與色洛冬寧進行醯胺化反應，得到一系列羥基取代 N -色洛冬寧桂皮醯胺化合物(化合物1~8)，進行抑制DPPH自由基及總抗氧化能力反應，探討其抗氧化能力，並以trolex當對照組；及進行抑制酪胺酸酶的活性能，並以維生素C、麴酸為對照組，套探討其美白能力，進一步探討其在化粧品上的應用價值。

(關鍵字：番紅萃取物、 N -色洛冬寧桂皮醯胺、DPPH自由基、總抗氧化能力、酪胺酸酶)

Abstract

Many epidemiological and clinical studies have suggested that antioxidants play a preventive role in atherogenesis. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds have been used as an herbal medicine for the promotion in the treatment of osteoporosis and rheumatism. Serotonin derivatives such as *p*-coumaroylserotonin and feruloylserotonin were identified as the major and unique phenolic constituents of safflower seeds.¹ The family of plant polyphenol compounds, have been implicated in an array of biological effects including antioxidative activity.² The purpose of the present study, serotonin hydrochloride and *N*-cinnamic acid derives are conjugated to form phenolic compounds *via* EDAC and HOBT linkages during the synthesis of serotonin derivatives 1-8. The inhibitory effects of eight phenolic compounds on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and TEAC assay were detected.

(Key words : safflower seeds, *p*-coumaroylserotonin, feruloylserotonin, DPPH, TEAC)

前言

一般市面上所市售的化粧品機能性成份，由於原料取得不易、或是效果不彰、或是成本昂貴，因此，本研究希望能藉由合成的技術，合成一系列高產率、高經濟效益以及多功能用途的原料、並且希望藉由這些原料的研發，藉以降低原料成本的考量，實際應用在化粧品或其他附加價值上。過去我們實驗室已進行(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物合成，其在抗氧化評估試驗中，已經證實其在捕捉DPPH 自由基能力、TEAC 總抗氧化能力、liposome 氧化能力及清除一氧化氮自由基能力上皆有不錯抗氧化表現¹，但由於亞胺化合物不穩定且容易水解，而使其應用性質受到限制；因此在本實驗設計上，透過簡單的合成步驟合成一系列醯胺類化合物(1~8)，我們將不穩定的亞胺類結構，改為較具穩定性的醯胺類結構。

然而會選擇『羥基取代 N -色洛冬寧桂皮醯胺化合物』作為研究主架構也並非憑空而得，主要是在文獻報導中有探討到由番紅花種子之萃取物，其美白效能相

當優越²，如表1-1 所示。其萃取物主要有效成分為『羥基取代*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物』，如圖1-1所示。

因此本研究利用有機合成方法，合成出一系列之『不同羥基取代*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物』，試著探討羥基取代之位置或者數量對其效能之影響，期許能合成出更強效之機能性化合物，進而應用於化粧品之中。

Compound	<i>S. bikiniensis</i>	Tyrosinase
	Inhibition zone (mm) ^{a)}	IC ₅₀ (mM)
<i>N</i> -Feruloylserotonin	35	0.023
<i>N</i> -(<i>p</i> -Coumaroyl)serotonin	28	0.074
Acacetin	11	0.779
Arbutin	0	0.223

表 1、抑制酪胺酸酶活性一覽表

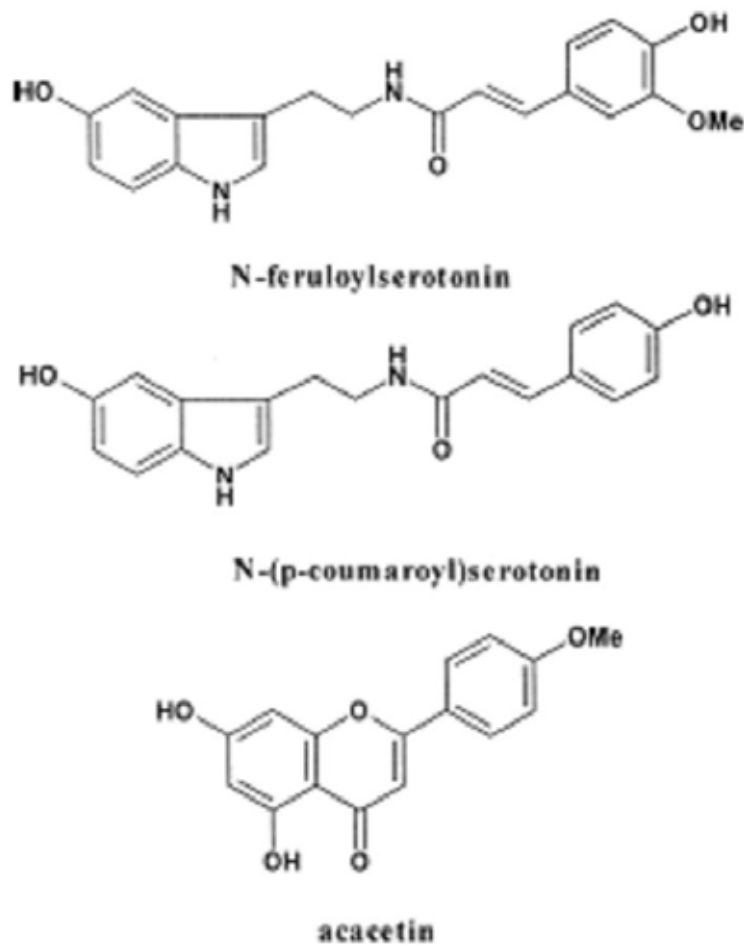


圖 1、番紅花種子萃出之活性成分

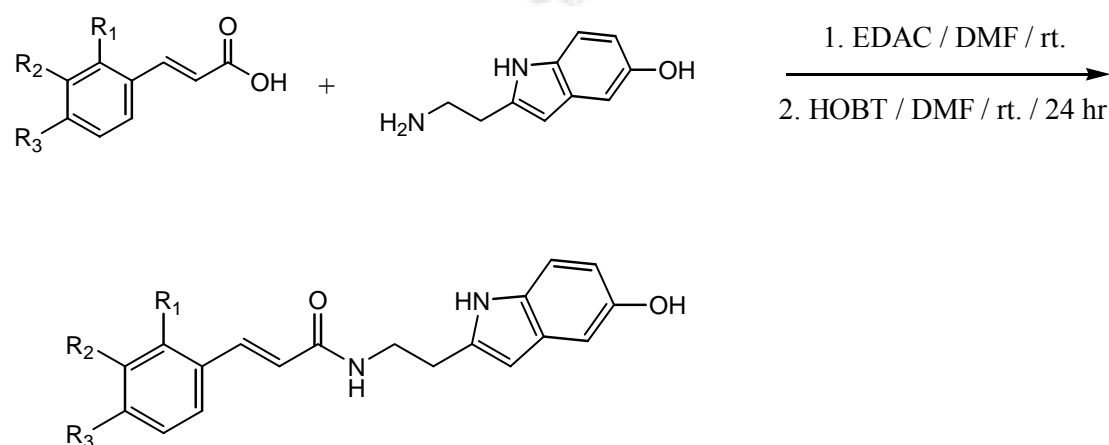
我們將利用下列幾種活性測試，來探討其抗氧化、抑制黑色素生成以及防曬能力：

- (一)清除DPPH 自由基能力測試，並與Trolox(水溶性維生素E)做比較。
- (二)利用TEAC 的抗氧化評估測試清除ABTS+自由基活性能力，並與Trolox(水溶性維生素E)做比較。
- (三)抑制酪胺酸酶的活性，並與維生素C (L-Ascorbic acid)和 KojicAcid(麴酸)做比較。

結果與討論

一、 羥基取代之 *N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物製備方法³⁻⁴：

- (1) 在100mL 圓底燒瓶分別加入羥基取代之桂皮酸衍生物(3mmol)、EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide Hydrochloride) (3 mmol) 及DMF (20 mL)於室溫下攪拌，反應40 分鐘之後再加入HOBT (3 mmol)，繼續反應40 分鐘。
- (2) 另取一個100mL 圓底燒瓶分別加入SerotoninHydrochloride (3 mmol)、TEA (3 mmol) 及DMF (10 mL)於室溫下攪拌，反應15 分鐘。
- (3) 直到(1)跟(2)反應時間皆完成，將(2)加入至(1)室溫下攪拌(反應時間24小時)。
- (4) 24 小時過後以TLC 檢驗反應是否完全(以70%EtoAc/n-Hexane為展開劑)，確認反應後使用真空幫浦將DMF 溶劑抽掉。
- (5) 濃縮物加入10%NH₄Cl 水溶液30mL，用乙酸乙酯萃取3 次(20mLX3)、合併有機層，先用飽和食鹽水去水，再用無水硫酸鈉乾燥過濾，用減壓濃縮機濃縮。
- (6) 濃縮物進行正相管柱層析，靜相為粗silical gel，沖提液70%EtoAc/n-Hexane，分離純化後再以¹H 及¹³C NMR 鑑定結構。即可得一系列羥基取代之 *N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物(compounds 1~8)，如表2所示。



1~8

式一、羥基取代之 *N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物反應式

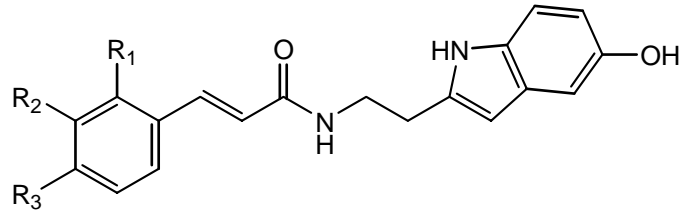


表2、羥基取代之*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃
1	OH	H	H
2	H	OH	H
3	H	H	OH
4	H	H	OMe
5	H	OH	OMe
6	H	OMe	OH
7	H	OH	OH
8*	H	H	OH

註: Compound 3 結構同文獻中*N*-(*p*-Coumaroyl)serotonin

Compound 6 結構同文獻中*N*-Feruloylserotonin

(Compound 8* 處為 C-C 其餘皆為 C=C)

二、體外抗氧化能力之測試⁵⁻⁸:

(一)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。

我們將 8 種不同數量及位置之 *N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物(Compound 1~8)，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。

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

其結果如下表 3 所示:

表 3、*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物 DPPH 抗氧化效果

	1 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	30 µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
1	5.90	22.74	14.92	36.28	71.88	84.56	14.97
2	1.56	5.28	16.94	35.50	69.58	83.23	16.10
3	6.80	8.13	21.70	50.16	82.64	83.72	13.71
4	9.51	8.25	18.43	39.38	73.35	86.10	14.84
5	3.88	8.89	16.78	35.60	66.51	86.00	15.94
6	4.48	7.63	16.37	40.96	71.55	87.57	15.14
7	7.09	12.87	36.41	67.99	87.90	90.79	11.16
8	0.01	12.84	13.83	29.50	56.16	80.69	17.76
Trolox	7.56	13.94	23.86	52.91	95.36	97.07	11.76

註 1. 以 Trolox 為比較試品。

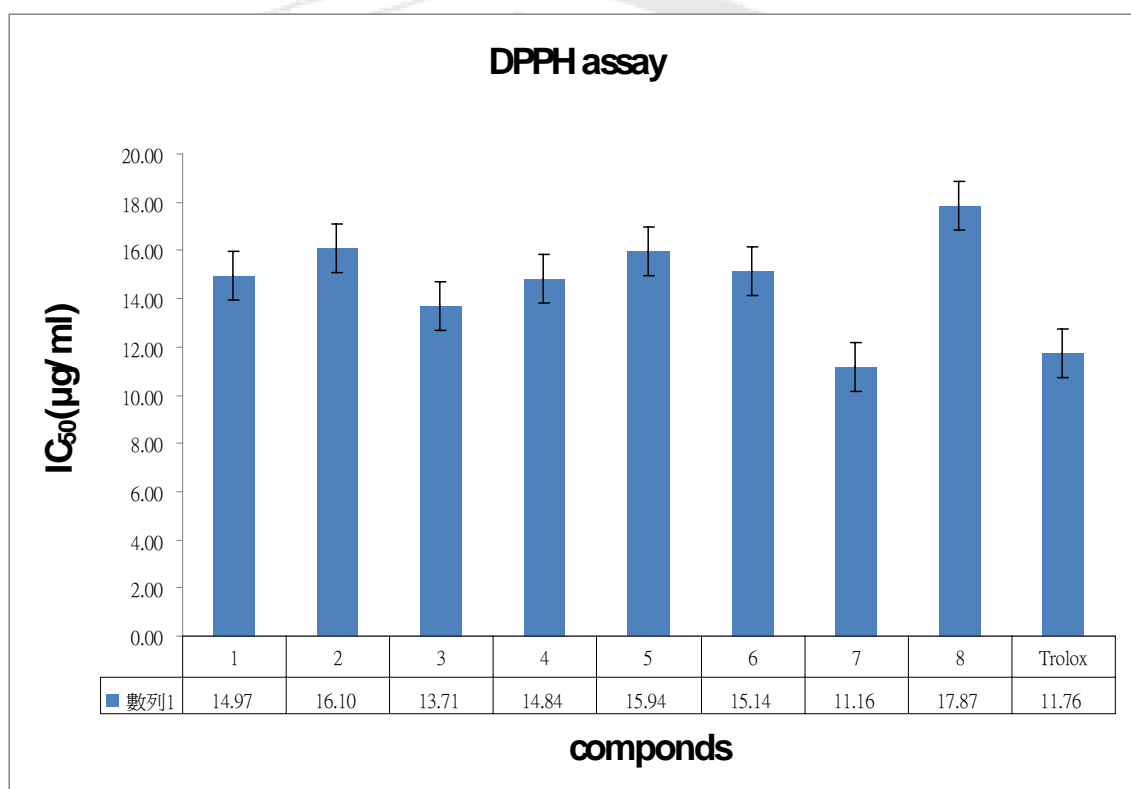


圖 2、DPPH 自由基清除能力

(二) 抗氧化能力測試(TEAC)

ABTS經H₂O₂催化後形成ABTS+自由基，呈現穩定藍綠顏色，在734 nm下有強的吸光值。當抗氧化物(AH)參與反應，ABTS+自由基得以還原成ABTS而使藍綠色減弱或消失(ABTS+· + AH → ABTS+ A· + H⁺)，因此可藉由734 nm 吸光值的變化來評估各物質抗氧化能力，吸光值越低時表示樣品抗氧化能力越佳。

本研究之清除ABTS+自由基之能力測試步驟為首先在每管tube當中加300 µl

的去離子水，之後於每管tube 中分別再加入ABTS50 μ l (扣色組不加ABTS 以等量的去離子水補足) 以及H₂O₂50 μ l 與Peroxidase 50 μ l，充分震盪混合均勻後置於暗室反應一小時(反應完成為藍綠色)，最後再加入配製好的不同濃度的樣品50 μ l (依次配製成最終濃度為0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μ g/ml)，空白對照組不加樣品以去離子水補足)，再於暗室內反應10 分鐘後，取反應後之溶液200 μ l 置於96 well 當中以ELISA reader 測定波長700nm之吸光值。並求出清除率(百分比%)，計算式如式(3-5)，再以EXCEL2007 軟體之TREND 函數進行運算，分別計算出個別之IC₅₀ 值，觀察羥基取代之*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物彼此之間對清除·ABTS+自由基之差異性。

抑制率計算公式(TEAC)：

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left[\frac{\text{control 700nm OD 值} - \text{sample 700nm OD 值}}{\text{control 700nm OD 值}} \right] \times 100\%$$

抗氧化能力(TEAC)之測試結果，如表 4 及圖 3 所示

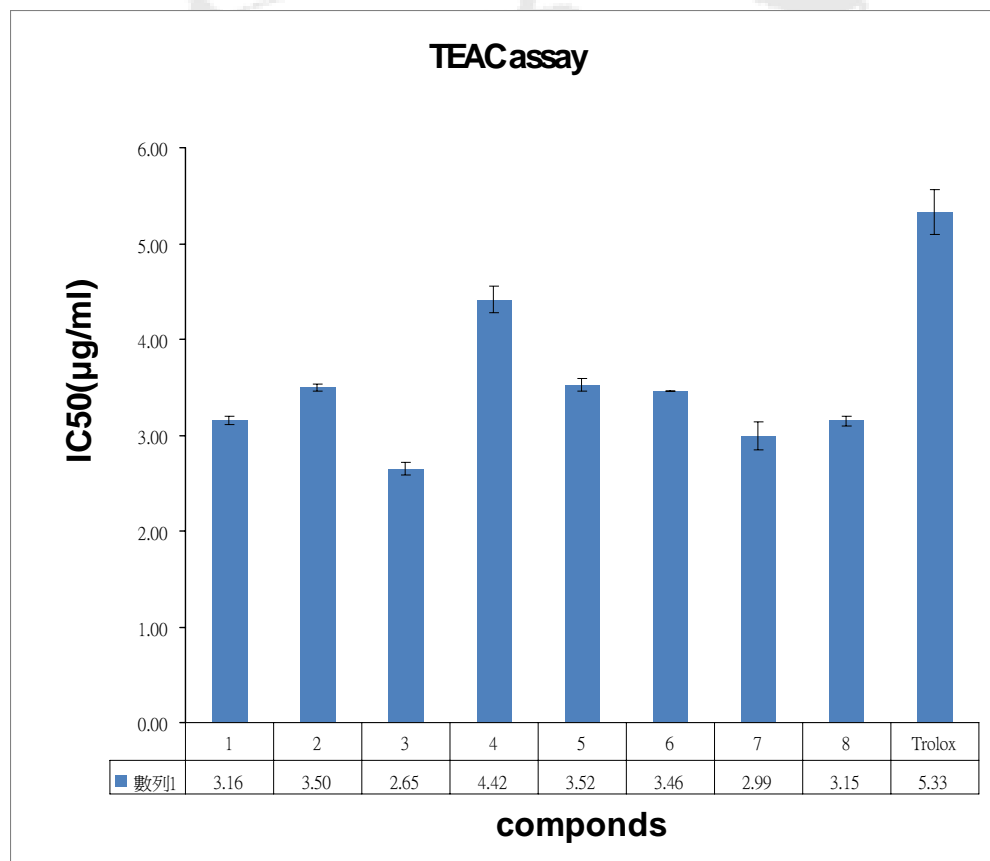


圖 3、TEAC 總抗氧化能力測試

表 4 TEAC 抗氧化能力測試結果

	0.1 µg/ml	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
1	6.38	18.53	28.24	57.03	87.62	93.38	3.16
2	9.83	17.84	29.52	39.31	82.24	97.32	3.50
3	11.40	23.83	41.01	62.29	90.82	99.17	2.65
4	2.66	14.94	25.75	32.77	54.26	97.88	4.42
5	8.72	17.58	25.37	46.59	78.82	97.93	3.52
6	10.66	19.15	25.36	44.92	80.41	98.39	3.46
7	8.71	19.47	31.45	57.50	89.12	100.27	2.99
8	8.07	15.97	32.94	56.51	85.68	97.35	3.15
Trolox	7.00	9.24	19.79	25.07	46.65	86.40	5.33

註 1. 以 Trolox 為比較試品。

三、結果與討論：

在抑制DPPH自由基測試結果，由(compounds **1~8**)之IC₅₀ 值可看出羥基取代 *N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物整系列皆有很強的DPPH 自由基清除能力，如表3及圖2 所示，其中又以compound **7** 效果最強，比Trolox 抗氧化能力更加優越，主因在於compound **7** 雙羥基取代位置互為鄰位，容易與DPPH 自由基反應形成穩定的Benzoquinone 結構。然而compounds **1**、**2**、**3** 皆是單羥基取代，與DPPH 自由基反應雖不能形成穩定的Benzoquinone，但也能形成穩定的共振，其中compound **3** 效果較**1**、**2** 優越，主因在於其羥基在對位，立體因素，使得較鄰位更容易失去氫質子。compound **8** 與compound **3** 比較之下僅僅差別在於雙鍵的有無，效果卻有天壤之別，因此可推斷桂皮酸根上具有C=C 比C-C更具有清除DPPH 之效能。

在Antioxidant-TEAC assay 結果顯示，羥基取代*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物，總抗氧化能力相當強效，如表4 及圖3 所示，IC₅₀值介於2.65~4.42µg/ml，皆比對照組trolox=5.33µg/ml 優越。整系列效能最差的是compound **4**，然而最強的是compound **3**，兩者皆在對位位置上有一取代基，差別在compound **4** 取代基為甲氧基，compound **3** 取代基為羥基可提供H· 而有抗氧化效果，可見羥基取代較甲氧基取代效能優越。然而compound **3** 與compound **8** 也僅差別在C-C 與C=C，可見C=C 可吸收自由基形成穩定之共振。由於所合成之羥基取代*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物對於清除TEAC 自由基效果很強，使得羥基所在位置在清除自由基的差異就不是那麼明顯。

結論

由以上結果得知，羥基取代*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物在捕捉DPPH 能力與TEAC 整體抗氧化能力皆表現相當良好，尤其在TEAC實驗中所有化合物效果皆

強於Trolox。以DPPH 自由基捕捉能力而言，效能與結構上的官能基關係密切，羥基取代越多效果越強。另一點在於桂皮酸根上C=C 亦較C-C具有較強效果。

經由上述結果顯示出羥基取代*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物，在抗氧化展現出相當強的效能，且合成步驟簡易僅需一步反應，純化過程亦不繁雜，可供大量生產之用，下一年度擬進行美白以及抗UV上的研究，期待其能在化粧品活性成分開發應用。

本研究成果已在97年中國化學會年會於97年12月5~7日假彰化師範大學發表。

實驗部分

合成*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物一般步驟：在100mL 圓底燒瓶分別加入羥基取代之桂皮酸衍生物(3mmol)、EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide Hydrochloride) (3 mmol) 及DMF (20 mL)於室溫下攪拌，反應40 分鐘之後再加入HOBT (3 mmol)，繼續反應40 分鐘。另取一個100mL 圓底燒瓶分別加入SerotoninHydrochloride (3 mmol)、TEA (3 mmol) 及DMF (10 mL)於室溫下攪拌，反應15 分鐘。直到(1)跟(2)反應時間皆完成，將(2)加入至(1)室溫下攪拌(反應時間24小時)。24 小時過後以TLC 檢驗反應是否完全(以70%EtoAc/n-Hexane為展開劑)，確認反應後使用真空幫浦將DMF 溶劑抽掉。濃縮物加入10%NH₄Cl 水溶液30mL，用乙酸乙酯萃取3 次(20mLX3)、合併有機層，先用飽和食鹽水去水，再用無水硫酸鈉乾燥過濾，用減壓濃縮機濃縮。濃縮物進行正相管柱層析，靜相為粗silical gel，沖提液70%EtoAc/n-Hexane，分離純化後再以¹H 及¹³C NMR 鑑定結構。即可得一系列羥基取代之*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物(compounds 1~8)，如表2所示。

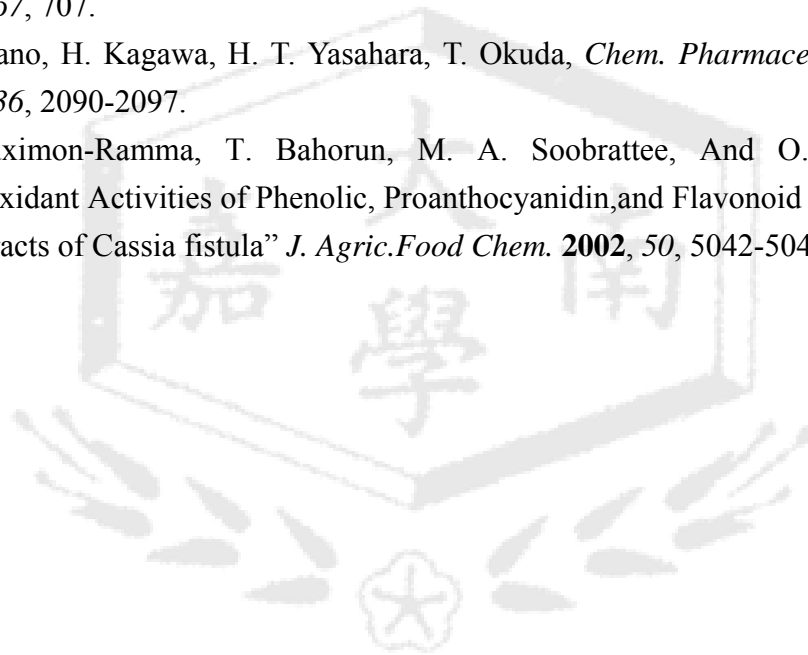
N-鄰位-香豆醯胺色洛冬寧 [*N*-(*m*-Coumaroyl)-serotonin]**1**，米白色固體，mp. 195~202 0C, *R*_f=0.58 (EtOAc:n-hexane=70:30); ¹H NMR(200 MHz, MeOH-d₄) δ 2.99 (2 H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.65 (2 H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.76 (1 H, d, *J* = 15.5 Hz), 6.77 (1 H, dd, *J* = 8,2 Hz), 6.86 (1 H, d, *J* = 8 Hz), 6.90 (1 H, d, *J* = 8 Hz), 7.08 (1 H, s), 7.09(1 H, s), 7.20(1 H, dd, *J* = 8, 8 Hz), 7.24 (1 H, d, *J* = 8 Hz), 7.48(1H, dd, *J* = 8,1 Hz), 7.95 (1 H, d, *J* = 15.5 Hz); ¹³C NMR (50 MHz, MeOH-d₄) δ 26.3.(t), 41.3(t), 103.5(d), 112.4(d), 112.4(d), 112.4(s), 112.7(d), 116.8(d), 120.6(d), 121.5(d), 123.1(s), 124.2(d), 129.3(s), 129.6(d), 131.7(d), 132.9(s), 137.5(d), 151.0(s), 157.7(s), 169.3(s) .

謝誌

感謝嘉南藥理科技大學及教育部經費支持，本實驗得以順利進行。

參考文獻

1. 林小菁，“(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物抗氧化之研究”，民國94年。
2. Roh J. S., Han J. Y., Kim J. H., and Hwang J. K., “Inhibitory Effects of Active Compounds Isolated from Safflower(*Carthamus tinctorius* L.)Seeds for Melanogenesis”*Biol. Pharm. Bull.* **27**(12), 1976–1978, 2004.
3. N.-H. Shin; S. Y. Ryu; E. J. Choi; S.-H. Kang; I.-M. Chang; K. R. Min; Y. Kim. *Biochem. and Biophy. Research Commun.* **1998**, 243, 801.
4. R. Kohen, *Biomed & Pharmacother*, **1999**, 53, 181-192.
5. I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*; **1995**, 64, 97-112.
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. Luximon-Ramma, T. Bahorun, M. A. Soobrattee, And O. I.Aruoma., “Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of *Cassia fistula*” *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5042-5047,.



仿硫辛酸之抗氧化化合物之合成研究

王詠騰

化粧品應用與管理系

摘要

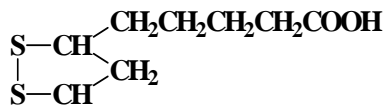
本實驗係為改善 α -硫辛酸於調製時之分散性，而試合成仿硫辛酸之 dithiol 化合物 1,2-benzenedimethanethiol，祈能有較好油溶性之界面活性化合物。以 1,2-benzenedimethanol 為原料與 Thiourea 於鹽酸下反應得 dithiol 化合物。於溫和條件下 ($60^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$)，得 50% 之產率。

Abstract

In this project the dispersive of Alpha lipoic acid should be provided by changing structure during it has been preperated to be a Cosmetic products. A dithiol compound 1,2-benzenedimethane-thiol would be used to react with Thiourea in concentrated Hydrogen chloride water solution under a gentle condition. About 50% yield was got here.

前言

α -硫辛酸是一種抗氧化效果勝過 A、C、E，並能消除加速老化與致病的自由基的物質，是一種存在於粒線體的酵素，在體內經腸道吸收後進入細胞，兼具脂溶性與水溶性的特性，兼具脂溶性與水溶性，因此可以在全身通行無阻，到達任何一個細胞。



α -硫辛酸

但調製化粧品時，易沾附於容器，使設計的濃度無法控制，應與其分子結構（如上圖）有關，推測可能與雙硫鍵有關，為改良此狀況於本實驗另設計以 1,2-苯二甲硫醇（1,2-benzenedimethanethiol），以進行測試化粧品之調製。

實驗部份

a. 材料

1. Thiourea、1,2-benzenedimethanol、濃鹽酸皆購買（友和化工）。
2. RO 水以 minipo 純水機。

b. 儀器

- 200 MHz NMR 儀

c. 實驗步驟

取 0.38 克 (5mmol) Thiourea，置於 100 毫升三頸圓底燒瓶，及毫升濃鹽酸，先以低溫加熱後，冷卻至 30°C，再加入溶於 100 毫升水含 0.56 克 (5mmol) 1,2-benzenedimethanol 一起加熱超過 60°C，並一面攪拌至反應液呈現澄清深綠色，停止反應。以 100 毫升含 5.5mmol 氫氧化鈉之水溶液，於抽氣櫃內倒入反應液中，分離出深褐色油層為 1,2-benzenedimethanisthiourea，並進一步轉變為 1,2-benzenedimethanethiol。

結果與討論

反應得 1,2-benzenedimethanethiol 0.38 克，產率 50%。初步經 H^1 -NMR 儀鑑定與 1,2-benzenedimethanol 相似，但於 3.1ppm 有 thiol 之氫的訊號，將進一步以 IR 及 Mass 鑑定之。

參考資料

Org. Syntheses Coll. Vol. 4 401. **1967.**

