

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

中草藥化妝品開發子計畫(1)—類黃酮素之活性評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC93-01

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

計畫主持人：陳榮秀

共同主持人：林清宮

計畫參與人員：

執行單位：化粧品科技研究所

中華民國 94 年 02 月 20 日

一、摘要：

在文獻及往年研究發現天然物中含有豐富之類黃酮素、異黃酮素，此類其藥理作用部分已確認，但在化粧品之應用仍不足，故本計畫以類黃酮素及相關衍生物檢測其抗氧化活性，希望能將此類成分開發在化粧品之應用上。

本計畫使用之黃酮素或類黃酮的成分，包括 Catechin、EGCG、Quercetin、Myricetin 等，分別進行各項抗氧化效果之評估，方法包含 DPPH、NO 清除等。結果顯示其濃度在 100 μ M 時，清除 DPPH 能力均大於 80 %；而一氧化氮清除能力則以 Myricetin 效果最好，同時也具有酪胺酸酶抑制能力，因此未來開發化粧品時可考慮此類成分。

二、前言：

基於實驗環境分析設備的利用性以及研發者的興趣，有很多很複雜的方法來評估自由基活性。在缺乏任何自由基活性測定的黃金標準，三種主要的方法已被運用：(1) 內源性抗氧化劑濃度的測定、(2) 氧化性聚分子產物的測定、(3) 自由基的直接偵測。為了分析內源性抗氧化劑能力，大部分的研究已經在血漿及細胞測定抗氧化劑濃度(例如：vitamin E、C、carotenoids、folate、GSH 和 zinc)以及細胞的抗氧化酵素的活性(例如 glutathion reductase、SOD、catalase 和 glutathione peroxidase)。因為 GSH 可由自由基和其他活性氧快速地氧化成 GSSG，而且 GSSG 會從細胞被釋出，所以，細胞內[GSSG]:[GSH]的比例可以提供氧化壓力一項參考指標。

脂質過氧化的評估包含分析脂質過氧化、isoprostanes、diene conjugates 以及脂質裂解的產物(例如 malonaldehyde、ethane、pentane 和 4-hydroxynonenal)。在這些產物中，malonaldehyde 是時常被用來當作脂質過氧化可靠的標的物。為了測定活性氧所誘發的蛋白質氧化，大部分研究者已經測定醣蛋白產生中蛋白質內游離硫基團的喪失，以及蛋白質鍵結酪胺酸殘基的硝酸反應。事實上蛋白質硝基酪氨酸已被廣泛當作穩定標地物，用於活性氮中心氧化劑的產生(例如一氧化氮及過氧亞硝鹽)。特殊的 DNA 鹼基氧化的產物，例如：

8-hydroxydeoxyguanosine、5-OH cytosine、8-OH adenine、8-OH guanine 以及 thymine glycol 已經被測定出時常用來評估 DNA 鹼基的氧化反應。重要的是，尿液中 8-hydroxydeoxyguanosine 成分在人體和動物上，可以提供有用的非侵犯性的來評估整體的 DNA 鹼基氧化反應。另一方面自由基直接的偵測已經可以利用電子自旋技術及電子捕捉儀而呈現，但此技術是適於偵測自由基在溶液化學上，對於生物組織的應用上仍有限制。總之，雖然測抗氧化的方法很多，不過以簡便性而言，仍以 DPPH 及 NO 清除率最為簡易。

三、材料與方法：

1. 一氧化氮濃度的測定

I、試劑的配置

SNP 儲存溶液(Stock solution):

精稱適量 SNP 粉末溶於 ddH₂O 至最終濃度為 100mM，分裝後儲存於-20 冰箱，實驗中置於冰上慢慢解凍以維持其活性。

II、測定方法

a. 備好不同濃度之樣品於 1.5ml eppendorf 中，每個均加入 5mM SNP 溶液 (Sample solution)，另外取一個空 eppendorf 加入 5mM SNP 溶液(Positive control)，置於室溫，在 2.5 小時於各自不同濃度的 eppendorf 取樣定量一氧化氮之濃度。

b. 每個樣品取 50 μ l 加入 96 well ELISA reader plate 中，再加入 50 μ l Griess reagent，然後置於室溫 10 分鐘。

c. 利用 ELISA reader 波長 540nm 偵測吸光值此方法主要測定 NO₂⁻ (NO 會變成穩定的 NO₂⁻)，共作三次。

d. 一氧化氮產生的清除率:

由實驗結果所測得的值，可利用下列公式計算其抑制率:

Nitric Oxide Scavenging Percentage(%)

$$= ((\text{Positive control Abs} - \text{Sample solution Abs}) / \text{Positive control Abs}) * 100\%$$

2. 清除 1,1-二苯基-2-苦味氫氧基團(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH) 自由基能力測定：

I、試劑的配置(stock solution preparation)

DPPH 乙醇溶液：

精秤適量 DPPH 粉末溶於乙醇溶液至最終濃度為 20mg/l，冷暗藏保存。

II、測定方法：

a. 取 375 μ L 之不同濃度之乙醇溶液，分別加入配製好之 20mg/ml DPPH 乙醇溶液 750 μ L，呈深紫藍色，混合均勻，反應 0-30 分鐘。

b. 以分光光度計，在 517nm 波長下，測定其吸光值。(DPPH 自由基清除能力 % = [(控制組在 517nm 下吸光值 - 試樣在 517nm 下吸光值) / 控制組在 517nm 下吸光值] x 100)

3. 酪胺酸酶活性抑制的測定 (Assay of Tyrosinase Inhibitory Activity)

I、試劑的配置(stock solution preparation)

a. 酪胺酸緩衝溶液(Tyrosine Buffer Solution)：

精稱 0.5 克酪胺酸(L-Tyrosine)，加入磷酸緩衝溶液(PBS)定量至 100 毫升，混合後靜置 30 分鐘，取上清液。

b. 酪胺酸酶水溶液(Tyrosinase Solution)：

將酪胺酸酶(Tyrosinase, 3216 unit/mg) 溶於緩衝液至最終濃度為 2mg/ml，分裝後儲存於-20 冰箱，要用時置於冰上慢慢解凍以維持其活性。

II、測定方法

a. 取 100 μ l 待測濃度加入 900 μ l 酪胺酸溶液(B)及 5 μ l 酪胺酸酶(E)，另外取 1000 μ l 酪胺酸溶液(B)同樣加入 5 μ l 酪胺酸酶(E)當負向空白對照組以及 1000 μ l 酪胺酸溶液(B)當正向空白對照組，充分混合十分鐘後置入 37 的恆溫循環水浴箱(water bath)中 1 小時。

b. 每個樣品取 100 μ l 加至 96 well ELISA reader plate，利用 ELISA reader 波

長 450nm 偵測吸光值，共作三次。

c.酪胺酸酶活性的抑制率:

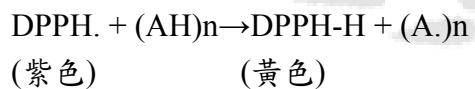
由實驗結果所測得 B，B+E，S+B+E，S+B 的 Abs 值，可利用下列公式計算其抑制率:

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = ((\text{BE}-\text{B}) - (\text{SBE}-\text{SB})) / (\text{BE}-\text{B}) * 100\%$$

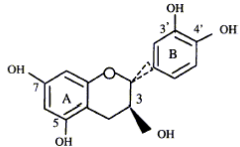
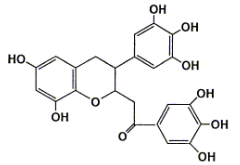
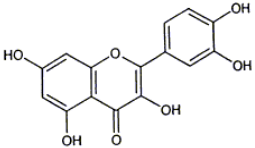
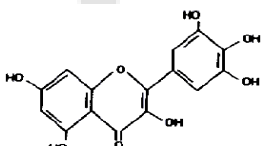
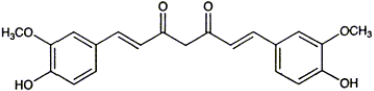
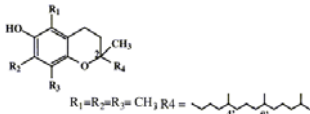
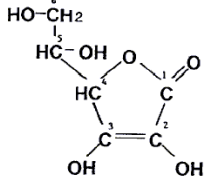
四、結果與討論：

我們利用 Griess reaction 來探討一氧化氮清除能力，一氧化氮(nitric oxide)的產生，是從 SNP 與氧反應形成亞硝酸(nitrite)的累積。在表中明顯顯示一氧化氮清除效果 myricetin>quercetin，EGCG>Catechin。myricetin 具有較佳的一氧化氮作用，推測其結構中，氫氧基團(OH)具有還原一氧化氮自由基能力，使自由基變成非自由基而達到清除的目的。由此可見含有氫氧基團對於自由基的清除作用具有很大的影響力，至於詳細的機制就更待進一步的研究了。

為了評估一氧化氮的抑制是否與自由基的清除有相關性，於是利用 DPPH 自由基清除試驗來評估其功能。研究指出 DPPH 的機轉可由下列方程式表示：



研究顯示減少 DPPH 的吸光值，是由於酚類化合物的結構中，提供了氫原子給 DPPH 自由基，因此酚類化合物中的氫氧基團扮演清除的重要角色。尤其是黃酮類化合物 A 環中 3-,5-氫氧基團、B 環中若含有 catechol 基團(o-dihydroxyl)及 C 環的 2,3-雙鍵與 4-oxo 構型時，會增加 DPPH 自由基的清除。本實驗較佳的 DPPH 清除劑中，大多含有四到八個不等的氫氧基團，是具備清除活性的原因。總結，myricetin 在抑制酪胺酸酶、DPPH、NO 清除方面，均有不錯的效果。顯示氫氧基團之數目及位置均扮演重要角色。

Compounds (100 μ M)	Scavenging effect of DPPH free radical production	Scavenging effect of nitric oxide	Inhibitory effect of tyrosinase activity
Flavanol compounds			
Catechin 	97.99 \pm 0.23	29.53 \pm 1.29	N
EGCG 	93.86 \pm 3.66	33.57 \pm 4.93	9.46 \pm 1.41
Flavonol compounds			
Quercetin 	96.44 \pm 0.00	18.57 \pm 1.83	28.49 \pm 6.03
Myricetin 	85.13 \pm 5.94	37.92 \pm 4.78	51.07 \pm 3.42
Other compounds			
Curcumin 	87.55 \pm 3.43	17.68 \pm 1.88	62.54 \pm 2.21
-Tocopherol 	95.96 \pm 2.06	4.37 \pm 0	5.59 \pm 0.79
Ascorbic acid 	82.22 \pm 18.29	12.46 \pm 1.56	9.63 \pm 4.88

N, no effect up to a concentration of 100 μ M.

*The value \pm SE obtained from three separate experiments are shown.

五、參考文獻：

1. April CS, Jackson IJ, and Kidson SH. Molecular cloning and sequence analysis of a chicken cDNA encoding tyrosinase-related protein-2/DOPAchrome tautomerase. *Gene* 219: 45-53, 1998.
2. Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437, 1996.
3. Evans P and Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 Suppl 2: S67-74, 2001.
4. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893: 13-18, 1999.
5. Fuchs J, Mehlhorn RJ, and Packer L. Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates. *J Invest Dermatol* 93: 633-640, 1989.
6. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, and Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 591-593, 1997.
7. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, and Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47: 357-362, 2001.
8. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, and Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 879-886, 1999.
9. Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc* 58: 1001-1006, 1999.
10. Johnson MK and Loo G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 459: 211-218, 2000.
11. Kahkonen MP, Hopia AI, and Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49: 4076-4082, 2001.
12. Kahraman S and Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg* 84: 1127-1129, 1997.
13. Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, and Hirobe M. Real time measurement of nitric oxide produced ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. *J Biol Chem* 268: 23106-23110, 1993.
14. Lass A, Suessenbacher A, Wolkart G, Mayer B, and Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol Pharmacol* 61: 1081-1088, 2002.
15. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, and Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 47-52, 2002.
16. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108: 652-659, 2000.
17. Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, and Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1425: 189-203, 1998.

18. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, and Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci* 65: PL241-246, 1999.
19. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, and Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyntirite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med* 25: 1057-1065, 1998.
20. Olivares C, Garcia-Borron JC, and Solano F. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 41: 679-686, 2002.
21. Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, and Pietta P. Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *J Agric Food Chem* 48: 732-735, 2000.
22. Perez-Gilabert M and Garcia Carmona F. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 48: 695-700, 2000.
23. Pfeiffer S, Schrammel A, Koesling D, Schmidt K, and Mayer B. Molecular actions of a Mn(III)Porphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxyntirite scavenger: reaction with nitric oxide and direct inhibition of NO synthase and soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 53: 795-800, 1998.
24. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, and Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 103: 1547-1560, 1999.
25. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiss C, Strauer BE, Feelisch M, and Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest* 109: 1241-1248, 2002.
26. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, and Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 801-803, 1998.
27. Squadrito GL and Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyntirite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 25: 392-403, 1998.
28. Sreejayan and Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49: 105-107, 1997.
29. Sun JS, Hang YS, Huang IH, and Lu FJ. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Radic Biol Med* 20: 107-112, 1996.
30. Szabo A, Hake P, Salzman AL, and Szabo C. Beneficial effects of mercaptoethylguanidine, an inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase and a scavenger of peroxyntirite, in a porcine model of delayed hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 27: 1343-1350, 1999.
31. Timmins GS, dos Santos RE, Whitwood AC, Catalani LH, Di Mascio P, Gilbert BC, and Bechara EJ. Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxyl radicals to dioxetane radical intermediates. *Chem Res Toxicol* 10: 1090-1096, 1997.
32. Velazquez E, Tournier HA, Mordujovich de Buschiazzo P, Saavedra G, and Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74: 91-97, 2003.