

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

子計畫 2：利用簡易有機方法合成多酚類化合物應用於美白的功能

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIC-94-01 子計畫(2)

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

總計畫主持人：陳榮秀

子計畫主持人：楊朝成

計畫參與人員：楊朝成、林小菁、張嘉苓、蔡哲秀

執行單位：化粧品科技研究所

中華民國 95 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(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物，進一步以體外試驗進行抑制酪胺酸酵素的能力，並與維生素 C 及麴酸比較其美白的功效。

關鍵字：(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺、酪胺酸酵素、美白。

Abstract

In this study we aim to originally synthesize a series of highly productive (polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl)amines and observe their *In vitro* efficacy test for skin-whitening by the tyrosinase inhibition test.

Key words : (polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl)amines, skin-whitening, tyrosinase.

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。

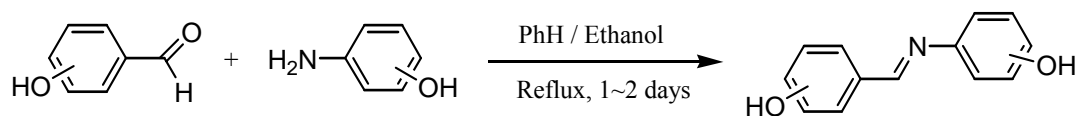
化粧品市場之成長主要來自產品功效之提昇，而整體護膚功效分析，與護膚產品相關的基本功能有七項，依序分別為抗老、保濕、去角質、潔膚、消炎、美白、防曬等，而在東方亞洲國家中以中國、日本、韓國與台灣對美白的訴求特別強烈。因此，廠商及各研究機構投入大量研究人力與金錢致力於美白產品原料與配方之開發。

從文獻報導中指出，1998 年 N.-H. Shin 從桑椹中萃取之 oxyresveratrol 對 Dopa oxidase 之抑制 IC_{50} 為 $1\mu M$ 比麴酸強許多，文中也指出，當苯環上羥基取代基轉變成甲氧基或醣基取代時，其抑制效果極速下降。但 Oxyresveratrol 不管從天然萃取或由合成方法取得皆不易。2002 年 S. Y. Kim 報導其合成 (3-methoxy-benzylidene)-(4'-methoxy-phenyl)amine 化合物對 Dopa oxidase 之抑制效果較麴酸佳。因此，本論文將合成 (polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl)amines 一系列化合物，利用體外抑制酪胺酸酵素的效果，探討其對黑色素形成抑制能力。

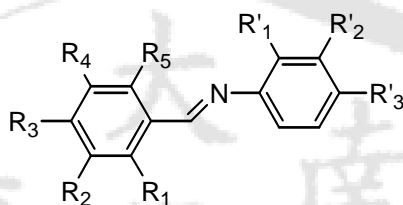
結果與討論

一、 合成(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物：

利用羥醛(oxybenzaldehyde)與胺基苯酚(aminophenol)進行氮親核性加成脫水反應後，經由 ^1H 及 ^{13}C NMR 測試鑑定其結構，得到完全反應之亞胺(imine)化合物(compound 1~15)，如表一所示。



Compound 1~14



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R' ₁	R' ₂	R' ₃
1	OH	H	H	H	H	H	OH	H
2	H	H	OH	H	H	H	OH	H
3	H	OH	H	H	H	H	H	OH
4	OH	H	H	OH	H	H	OH	H
5	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
6	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
7	H	OH	H	OH	H	H	H	OH
8	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
9	OH	OH	H	H	H	H	OH	H
10	H	OH	OH	H	H	H	H	OH
11	OH	OH	OH	H	H	OH	H	H
12	OH	OH	OH	H	H	H	OH	H
13	OH	OH	OH	H	H	H	H	OH
14	OH	H	OH	OH	H	OH	H	H

表一、製備(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物：

二、體外抑制酪胺酸酵素之測試：主要參考文獻報導方法，利用酪胺酸在緩衝液中，經由酪胺酸酵素催化反應，分別加入不同濃度的我們合成多酚酯類及醯胺化合物與空白對照組測試，藉由分光光度計在 540 nm 波長吸收值，計算其對酪胺酸酵素之抑制效果。其詳細步驟如下：

材料：

- a. 酪胺酸緩衝溶液(Tyrosine Buffer Solution) :
以磷酸緩衝溶液(PBS)配製 0.5 %酪胺酸(L-Tyrosine)。
- b. 酪胺酸酶溶液(Tyrosinase Solution):
將酪胺酸酶(Tyrosinase) 溶於磷酸緩衝溶液(15 units/ μ l)，分裝後儲存於 -20°C 冰箱。

方法：

- a. 分別取不同濃度之待測樣品(S) 加入適量酪胺酸溶液及 5 μ l (75 unit) mushroom 酪胺酸酶 (最終體積為 1 ml) 及取相同濃度待測樣品(NT)但不加入酪胺酸溶液只加入 5 μ l (75 unit) mushroom 酪胺酸酶 (最終體積為 1 ml) 當扣色組，另外取 1ml 酪胺酸溶液同樣加入 5 μ l 酪胺酸酶當作正向對照組(PC)以及 1ml 酪胺酸溶液當負向空白對照組(NC)，充分混合後置入 37°C 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 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。
- c. 酪胺酸酶活性的抑制率：
所測得的吸光值，利用下列公式計算其抑制率：
1. Tyrosinase inhibition(%)=(PC-NC)-(S-NT)/(PC-NC)*100%

三、體外抑制酪胺酸酵素之測試結果：

我們將 14 種不同數量及位置之羥基取代亞胺化合物，分別配置不同濃度之 DMSO 溶液中(最終測試濃度分別為 0.5、0.3、0.1、0.05 及 0.01 mg/ml) 作體外抑制酪胺酸酵素之測試，利用 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。並求出其之 IC₅₀之濃度。其結果如下表所示：

0.1 mg/ml 抑制率(%)		IC ₅₀ (mg/ml)	0.1 mg/ml 抑制率(%)		IC ₅₀ (mg/ml)
1	73.12	0.011	9	73.87	0.031
2	68.56	0.025	10	75.33	0.062
3	92.48	0.094	11	86.13	0.056
4	47.15	0.208	12	84.19	0.047
5	67.70	0.051	13	95.48	0.035
6	23.01	0.777	14	>98	0.022
7	59.00	0.096	Vit.C	44.23	0.151
8	76.45	0.025	K.A.	67.11	0.094

表(二)(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物體外抑制酪胺酸酵素能力：

註 1. 以 Vit.C(維生素 C)及麴酸(Kojic acid K.A.)為比較試品。

四、結果與討論：

實驗結果發現(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物體外抑制酪胺酸酵素能力大部分比維生素 C 或麴酸效果佳，其抑制效果與化合物羥基取代之數量及位置有所關連，但尚未有完整之規律性，我們將進一步合成更多化合物進行比較且將進行黑色素細胞抑制測試，可進度探討其美白之功效並能進一步探討其細胞毒性，期待其能應用於美白產品上。

實驗部分

一、合成(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物一般步驟：取 10 mmol 的 Oxybenzaldehyde 於圓底瓶中，加入 10 mmol 的 aminophenol，以 20 ml 之 benzene 及 20 ml 之 ethyl alcohol 當溶劑，加熱迴流 1~2 天，反應完成後，減壓濃縮機抽去溶劑，分別利用 ^1H 及 ^{13}C NMR 測試鑑定其結構。

(2-羥基苯亞甲基)-(3'-羥基苯)胺 (2-Hydroxy-benzylidene)-(3'-hydroxyl-phenyl) amine 2：橘色固體，mp.176~180 °C， ^1H NMR(200 MHz, DMSO) . H:6.78~6.87(3 H, m), 6.94~6.99(2H, m) 7.25(1H, t, $J = 8\text{Hz}$), 7.42(1H, ddd, $J = 8, 8, 1.5\text{Hz}$), 7.66(1H, dd, $J = 8, 15\text{Hz}$) , 8.89(1H, s), 9.74(1H, brs, OH), 13.16(1H, brs, OH) ; ^{13}C NMR(50 MHz, DMSO) . 108.18(d), 112.09(d), 114.14(d), 116.61(d), 119.13(d), 119.26(s), 130.23(d), 132.63(d), 133.26(d), 149.29(s), 158.39(s), 160.37(s), 163.25(d).

二、體外抑制酪胺酸酵素之測試：其詳細步驟如下：

材料：先配好下列材料濃度。

b. 酪胺酸緩衝溶液(Tyrosine Buffer Solution)：

以磷酸緩衝溶液(PBS)配製 0.5 %酪胺酸(L-Tyrosine)。

b. 酪胺酸酶溶液(Tyrosinase Solution):

將酪胺酸酶(Tyrosinase) 溶於磷酸緩衝溶液(15 units/ μl)，分裝後儲存於 -20°C 冰箱。

方法：

a. 分別取不同濃度之待測樣品(S) 加入適量酪胺酸溶液及 5 μl (75 unit) mushroom 酪胺酸酶 (最終體積為 1 ml 及最終濃度分別為 0.5、0.3、0.1、0.05 及 0.01 mg/ml) 及取相同濃度待測樣品(NT)但不加入酪胺酸溶液只加入 5 μl (75 unit) mushroom 酪胺酸酶 (最終體積為 1 ml) 當扣色組，另外取 1ml 酪胺酸溶液同樣加入 5 μl 酪胺酸酶當作正向對照組(PC)以及 1ml 酪胺酸溶液當負向空白對照組(NC)，充分混合後置入 37°C 的恆溫循環水浴箱(water bath)中 1 小時。

b. 每個樣品取 100 μl 加至 96 well ELISA reader plate，利用 Anthos 2010 ELISA reader 波長 540 nm 偵測吸光值。

c. 酪胺酸酶活性的抑制率：

所測得的吸光值，利用下列公式計算其抑制率：

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)}=(\text{PC-NC})-(\text{S-NT})/(\text{PC-NC})\times 100\%$$

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. N. Baurin; E. Arnoult; T. Scior; Q.T. Do; P. Bernard; *J. Ethnopharmacology*, **2002**, 82, 155.
4. J. P. Ley; H. J. Bertram; *Bioorg. & Med. Chem.* **2001**, 9, 1897.
5. L. Startor; E. Pezzato; I. Dell; R. Caiato; *Biochem. Pharm.* **2002**, 64, 229.
6. I. Kubo; K.-I. Nihei; K. Tsujimoto; *Bioorg. & Med. Chem.* **2004**.12.5349.
7. I. Kubo; P. Xiao; K.-I. Fujita; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**.11.347.
8. S. H. Lee; S. Y. Chio; H. Kim. J. S. Hwang; B. G. Lee; *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 1045.
9. S. Rudra; A. V. Eliseev; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11543.
10. I. Kubo; P. Xiao; K.-I. Nichi, K.-I. Fujita; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3992.
11. S. Y. Choi; S. Kim; J. S. Hwang; B. G. Lee; H. Kim; S. Y. Kim; *Biochem. Pharm.* **2004**, 67, 707.
12. S. Y. Chio; S. Kim. H. Kim; K. Suk; J. S. Hwang; B. G. Lee; A.-J. Kim; S. Y. Kim; *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 450.