

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 生技藥物開發應用(一)

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

執行期間：97年1月1日至97年12月31日

整合型總主持：楊朝成

子計畫一：中草藥資源開發應用-抗氧化活性篩選

計畫主持人：林清宮

子計畫二：生技藥物開發

計畫主持人：王姿文

子計畫三：傳統有機合成製藥開發研究

計畫主持人：楊朝成、王詠騰

執行單位：嘉南藥理科技大學

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9747

計畫名稱：子計畫(一)：中草藥資源開發應用-抗氧化活性篩選

執行期間：97年01月01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：

子計畫主持人：林清宮

中華民國 98 年 02 月 27 日

## 一、摘要

隨著現代化產業的加快和生活環境的諸多污染，使得許多疾病叢生，再加上高齡化社會中慢性疾病的問題亦日漸嚴重，因此，如何加強預防與人體有關的生理病變，已逐漸成為世界先進國家及人民所共同關注之主題。其中，抗氧化更是近年來醫藥界的研究主流之一。所謂抗氧化，通常是指能捕捉活性氧(Reactive oxygen species, ROS)以避免活性氧所造成的鏈鎖反應(Chain reaction)。事實上，抗氧化物質普遍存在植物體內，因此，有關中草藥資源在抗老化、抗氧化以及癌症化學預防(Cancer chemoprevention)等方面之研究十分熱門。

要消除與疾病相關的氧化壓迫，可從膳食中攝取豐富的蔬菜與水果，以確保身體中有充分的抗氧化營養素。近年來，許多的研究亦嘗試由天然來源以尋求安全且具有強抗氧化效力之抗氧化劑，其中以多酚及類黃酮為被研究最多之抗氧化物質，此類物質廣泛存在於各種蔬菜、水果、種子、茶、紅酒或香辛料中，其可作為一抗氧化劑，有效終止自由基鏈鎖反應。因此從植物中尋求具有強抗氧化性的天然抗氧化物質進而達到生物體保健之目的，已成為重要的研究課題。

本計畫結合藥理學院14位對中草藥資源開發應用有興趣專業師資，擬由21種中草藥資源中篩選出具有抗氧化活性之物

質，方法是以DPPH• (1, 1 - diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical) 及 ABTS•+ [2-azino-bis(3- ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid) radical] 總抗氧化活性作為評估依據。中草藥包括三大來源，有植物、動物及礦物，其所含之化學成分相當複雜，因此在進行中草藥萃取前，對所用之材料的基源、產地、藥用部位、採集時間與方法等進行考查，計畫所得成果可供有興趣教師繼續探討中草藥資源在醫藥、食品及化粧品之應用與開發。

## 二、研究動機與研究問題

近年來「抗氧化」相關的「研究與應用」快速的發展，不論在醫藥、食品、化粧品等與健康相關的產業中，我們可以發現各式各樣與抗氧化相關的概念與產品。有許多研究已證實「抗氧化與抗自由基」在美白與抗老化的功能上有顯著的正面效益，因此市面上不斷有許多抗氧化與抗自由基的新成份被推出，但是其「抗氧化功效」，仍待進一步確認。

人體在進行代謝情況下，而產生了自由基，這些自由基會來攻擊我們的細胞，導致蛋白質、細胞膜以及DNA發生變異，隨著這些損害的累積，組織和器官也在不斷退化，這也正是衰老的象徵。另外，氧化DNA還會導致細胞的癌變，造成某些慢性疾病的發生和退化性疾病的病因，包括心血管疾病。

研究顯示，抗氧化劑能有效清除體內過量自由基的物質，它能阻止氧化的發生，修復和防止氧化DNA損害，進而可以增強免疫系統功能和延緩衰老。而目前常見的抗氧化劑有：維他命C、維他命E、β-胡蘿蔔素、類黃酮(flavonoid)、多酚類(polyphenol)和人體內自行製造的抗氧化酶等，這些抗氧化物質可以防止自由基的損害。

於生物體正常之有氧化代謝過程中會自然形成許多活性氧物質(reactive oxygen species)，活性氧物質包括超氧陰離子(superoxide anion radical,  $\cdot\text{O}_2^-$ )、過氧化氫(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、氫氧自由基(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )、單重態氧(single oxygen,  $^1\text{O}_2$ )等，其來源可分為內在和外在兩方面,內在來源包括粒腺體電子傳遞鏈、氧化反應、噬菌體細胞和自我氧化反應等；另外生物體亦可經由傳染、離子幅射、空氣污染、抽煙與毒物之入侵產生活性氧物質；截至目前為止，包含內在及外在產生活性氧物質之路徑，有部分之機轉仍未完全明瞭。這些具未成對電子的自由基化性相當活潑，可和體內許多重要分子如核酸、蛋白質、或生物膜上之多元性不飽和脂肪酸反應，導致生物體氧化性傷害，主要之反應為自由基除易引發細胞膜上之不飽和脂肪酸進行脂質過氧化反應外並會與膜上酵素或接受體

行共價結合，導致細胞膜完整性破壞，改變其結構功能及通透性；另外自由基亦可和細胞內之蛋白質行交錯連結反應致使蛋白質變性或結構改變，導致生物體內催化生化代謝反應進行所需之酵素活性喪失，進而使細胞內之正常功能無法進行；而自由基亦會攻擊 DNA 分子，破壞其鹼基結構使其功能改變，造成基因突變及毒性之產生；除此之外，脂質過氧化產物再經分子內的環化、裂解等步驟所產生的丙二醛 (malondialdehyde, MDA)，亦具相當活性會和體內之脂質、蛋白質、核酸等分子行交錯連結反應。近年來許多證據顯示自由基之堆積與破壞是造成老化或與老化相關的退行性疾病如癌症、心血管疾病、白內障、關節炎及巴金森氏症等疾病發生的重要因素，因此為了有效的防制疾病的發生與發展，生物體必須抑制或清除這些活性氧物質，於正常情況下，生物體中具有抗氧化之防禦系統，這個系統由兩大部分組成，即抗氧化酵素及非酵素性之抗氧化物質以交互協同之作用來移除活性氧與自由基，共同保護生物體免受到活性氧物質之氧化性傷害。

酵素性抗氧化防禦系統主要含有 superoxide dismutase(SOD)、catalase 與 Se-dependent glutathione peroxidase (GSH-Px)等，SOD 會促使超氧陰離子轉化成過氧化氫，以消除

超氧陰離子；而過氧化氫會再經由 catalase 或 GSH-Px 還原成水和氧；另外 GSH-Px 亦會還原脂質過氧化物成為無毒害產物。

非酵素性之抗氧化系統主要包括維生素 E(tocopherol)、維生素 C(ascorbic acid)、麩胱甘胺酸(glutathione, GSH)、β-胡蘿蔔素(β-carotene)及有機硒等。維生素 E 存在於生物膜及脂蛋白中是一種重要的脂溶性抗氧化劑，可直接與自由基反應以有效阻止自由基對生物膜及脂蛋白上多元不飽和脂肪酸進行脂質過氧化鏈鎖反應，減少氧化緊迫(oxidative stress)之產生，進而降低對生物體之傷害。維生素 C 為細胞內外液主要之水溶性抗氧化劑，除可直接消除自由基進而有效終止自由基引發之鏈鎖反應外，亦可將維生素 E 還原，然而維生素 C 的活性還原可以經由 GSH 加以再生，由此可知，抗氧化物質可以相輔相成的提供抗氧化保護作用。麩胱甘胺酸為細胞內液主要之抗氧化劑，不僅可經由 GSH peroxidase 之酵素性反應以還原脂質過氧化物或  $H_2O_2$  而間接抑制自由基之鏈鎖反應，亦可與自由基反應，使細胞免受到自由基之傷害，另外 GSH 在體內尚具有許多重要之生理、生化功能。β-胡蘿蔔素為自然界廣泛存在之脂溶性色素，其為維生素 A 的前趨物，在體內它可以消除單重態氧的毒性及作為自由基的清除劑，特別是消除白血球(如吞噬細胞)所

產生的過多自由基。有機硒有很強的抗氧化作用，硒為 GSH peroxidase 中之重要成分且參與 coenzyme Q 的合成，coenzyme Q 是另一個可以作為阻斷自由基鏈鎖反應的抗氧化物。

綜合上述，生物體內此等抗氧化防禦系統之物質或酵素彼此具有交互協同之作用。事實上，適量的活性氧物質是維持生命所必需的，如白血球活化時可產生超氧陰離子與過氧化氫等活性氧物質，此活性氧物質對於白血球在殺滅細菌上扮演相當重要的角色，而活性氧物質是否會對人體造成傷害，主要決定於體內產生的活性氧物質與體內抗氧化防禦系統之間是否可以達到平衡的狀況，然而此種平衡會因疾病、營養不良或隨著年齡的增長而受到破壞，一旦失去平衡，即會形成氧化緊迫，劇烈的氧化壓迫仍會造成細胞傷害或死亡，進而導致許多疾病的形成，如前所述，此類疾病包括相關的退化性疾病如：癌症、心血管病、巴金森氏症、白內障等，另外在促進老化上亦為一重要因素。

### 三、文獻回顧與探討

天然藥物一直是人類獲得藥物的主要途徑，根據美國「Annual Reports of Medicinal Chemistry」報導，1989~1995年食品及藥品管理局(FDA)批准臨床觀察的299種抗癌新藥中，61



%來自於天然物，顯示植化物(Phytocompound)或植物二次代謝物在醫療保健之重要性。

多酚類(polyphenol)植物體成分中，以纖維素的含量最多，其次是半纖維素、木質素，多酚類則是含量第四多成份，在陸地上的植物幾乎含有多酚類。多酚類是植物體內所含有的數種羥基的總稱，這種成分關係著植物的演化，目前也是植物分類的重要指標之一。多酚類在植物體內的功能是防禦紫外線、抑制植物體過氧化作用。單寧是最早被知道的多酚類，其能夠使蛋白質及重金屬沉澱(Lai, 1999)。

USDA 於 2007 年 11 月公佈 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods—2007，包括了 277 種經選擇具有抗氧化能力的食品。眾所周知許多慢性與退化性疾病如癌症、心臟病、神經元退化疾病如阿茲海默症 (Alzheimer) 及帕金森氏症 (Parkinson) 等均被認為是因為過氧化物或含自由基物質在人體體內引起的一連串反應，造成身體組成物質如蛋白質、脂質及 DNA 受到傷害，這也是引起老化的主因。攝食蔬菜、水果與堅果類食品可獲取抗氧化所需之礦物質及維生素，如硒 (Selenium)、維生素 C、E 與  $\beta$  胡蘿蔔素等，是氧化物的極佳來源。

在食物中含有許多抗氧化物質，傳統的抗氧化物質包括了維生素 C、維生素 E、 $\beta$  胡蘿蔔素及硒元素；其他還有聚苯酚、類黃酮素、原花青素及蕃茄紅素。其中以原花青素(Oligomeric proanthocyanidins，OPC 屬多酚類，為水溶性、高生體利用率之生物黃酮素)最受專家重視，因為它的小分子結構能夠通透血腦障壁，提供及加強腦內抗氧化的功能。同時它的抗氧化力比維生素 C 強 20 倍，比維生素 E 強 50 倍。

除此之外原花青素也是血管的守護神，保護血管彈性、阻止 LDL 膽固醇囤積在血管壁上及減少血小板凝集。對於皮膚，原花青素可保護肌膚免於紫外線的荼毒、預防膠原纖維及彈性纖維的退化，使肌膚保持應有的彈性及張力，避免皮膚下垂及皺紋產生。在免疫系統上，原花青素具有毒殺乳癌、肺癌及胃癌細胞的功能，對於胃黏膜細胞有促進生長效果。原花青素可有效的紓解關節發炎現象，同時它也具有抗過敏的作用。

原花青素存在於某些植物、蔬菜、水果的皮、莖、葉、種子中。葡萄籽、藍莓、小紅莓、松樹皮及夏威夷果葉子，都含有原花青素的成份。其中以葡萄籽所含的原花青素比率獨佔鰲頭。而在葡萄籽當中還含有許多強力之抗氧化物質，如兒茶酸、咖啡酸、表兒茶酸、肉桂酸、延胡索酸與香草酸等各種天然有

機酸，不但共同組成強力之抗氧化家族，也能夠幫助 OPC 的吸收，同時這些物質都屬於水溶性的，攝取過多時會如同水溶性維生素一樣，由尿液排出體外。

OPC 能幫助維生素 C、E 的吸收作用，也能抑制有害性酵素的活動，有保護膠原蛋白(Collagen) 及彈性蛋白 (Elastin) 功效，防止皮膚皺紋提早出現，減少紫外線對皮膚之傷害；它也可以增加夜視力，保護眼睛，降低因糖尿病造成的視網膜病變之可能性；另外它還有調節控制神經傳導物質的酵素，改善精液結構而增加生育力，改善女性經前症候群之不適，阻礙黑色素形成；另外也有實驗顯示 OPC 對於雄性禿頭之症狀有改善之效果。

#### 四、研究方法與步驟

##### ※中草藥之萃取：

自順天堂藥廠取得所需中草藥(經過基源鑑定)，將中草藥磨成粉，用乙醇或乙醇/水萃取，經減壓濃縮後之萃取物，以冷凍乾燥方式製備，分別稱重備用。

對於已被使用或未經過使用但有應用潛力之中草藥，在前項萃取處理後，利用已建立抗氧化功效篩選與評估平台，進行抗氧化有效性評估測試，確認中草藥資源之抗氧化能力。以下

為本計畫擬篩選抗氧化之中草藥名稱、藥理作用及相關文獻：

**※有效性評估：**

各種中草藥，在前項萃取處理後，利用已建立抗氧化功效篩選與評估平台，進行 *in vitro* 評估測試。

**1、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<sub>540 nm</sub> 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 IC<sub>50</sub>，即可判斷出樣品捕捉自由基能力的強弱。

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

**2、TEAC 總抗氧化能力測試：**

此實驗系統是以 ABTS 經過氧化氫與過氧化酶產生作用，產生 ABTS<sup>•+</sup> 陽離子自由基，待呈現穩定藍綠色，加入的待樣品，若有清除 ABTS<sup>•+</sup> 陽離子自由基的能力，則顏色會變淺吸光值會降低，以評估總抗氧化能力，並使用 trolox 為正標準品，作標準曲線當對照，因此一般稱此實驗系統為 TEAC。總抗氧化能力

的表示方式，可以用上述方式表示，或是以抗氧化力的方式呈現，本研究的表示方式是用抗氧化力方式表示。先將樣品稀釋成各種不同濃度，利用分光光度計，測其在 OD<sub>734 nm</sub> 之吸光值，比較空白對照組之吸光值，計算抑制百分比，作圖畫線求出 IC<sub>50</sub> 值，即可比較出樣品清除總自由基能力的強弱。

$$\text{總抗氧化能力(\%)} = [1 - (A_{734 \text{ nm, sample}} / A_{734 \text{ nm, blank}})] \times 100$$

## 五、結果

篩選植物	桑樹皮(Mulberry) 銀杏(Ginkgo biloba)	學 名	白果
植物基本介紹	<p><b>桑樹皮</b>：桑樹有許多種，有喬木也有灌木，有「華桑」、「白桑」、「雞桑」等多個品種。桑樹原產亞洲西部、中國、日本，是養蠶業的重要飼料，很早就在中國培育，果實稱為桑椹，初生白色，成熟後成為紫黑色。根皮（桑白皮）、桑椹、桑葉都可以作為中藥使用。此外桑椹可以釀酒，樹皮可以造紙，造出的紙稱為「桑皮紙」。桑白皮含樺木酸(betulinic acid)及四種新的黃酮類衍生物及 α-及 β-香樹精、揮發油、軟脂酸、谷甾醇、葡萄糖、果膠、多縮戊糖、十一萜烯醇(undecaprenol)及十二萜烯醇(dodecaprenol)。藥理：利尿、降血壓、鎮靜、安定、抗驚厥。</p> <p><b>銀杏</b>：銀杏(Ginkgo biloba)，又名白果，和它相親的植物</p>		

	<p>在兩億七千年前就已經生成，屬於銀杏門。有人將銀杏稱為「活化石」和「子遺植物」。銀杏為裸子植物，只有種子的構造，尚未演化出被子植物的果實，但銀杏種子的種皮發達，粗看起來與被子植物的果實沒有什麼不同。據《本草綱目》記載：「白果小苦微甘，性溫有小毒，多食令人腹脹」。「熟食溫肺、益氣、定喘嗽、縮小便，止白濁，生食降痰，消毒殺蟲，嚼漿塗鼻面手足，去鼻疽皴黑干黯皴皴及疥癬疔蟲陰虱」。直到近代才有西方學者研究銀杏的藥用價值，銀杏葉子裡包含黃酮類化合物，可以入藥。</p>
<p>抗氧化篩選結果</p>	<p><b>桑樹皮:</b>抗氧化能力 <math>65.8\text{mg} \pm 8\%/100\text{ml}</math>(萃取液)</p> <p><b>銀杏:</b> 抗氧化能力 <math>13.6\text{mg} \pm 6.3\%/100\text{ml}</math>(萃取液)</p> <p>附註:1.上述結果是利用捕捉 DPPH 自由基能力測定法測定。</p> <p>2.抗氧化能力表示方式是利用不同濃度的標準參考物為 gallic acid，分別測出捕捉 DPPH 自由基能力後製成檢量線(Calibration curve)，然後測出萃取液的捕捉 DPPH 自由基能力，代入檢量線方</p>

	<p>程式計算出 100ml 植物萃取液相當於 X mg gallic acid 的捕捉 DPPH 自由基能力。</p>
<p>參考文獻</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Microwave-assisted extraction of flavonoids in mulberry leaf and root-bark.</b> Chen, Jingjing; Li, Xiangrong. <i>Zhongyaocai</i> (2006), 29(10), 1090-1092.</li> <li><b>2. Physiochemical, antioxidant and whitening properties of extract from root cortices of mulberry as affected by membrane process.</b> Yu, Zer-Ran; Hung, Chien-Ching; Weng, Yih-Ming; Su, Chun-Li; Wang, Be-Jen. <i>LWT--Food Science and Technology</i> (2007), 40(5), 900-907.</li> <li><b>3. The optimization of process for extraction and separation of flavonoids and polysaccharides from mulberry leaves.</b> Li, Xianjia; Yu, Jianping; Dou, Guodong. <i>Shipin Kexue</i> (2005), 26(6), 159-162.</li> <li><b>4. Biology and chemistry of Ginkgo biloba.</b> Singh, Bikram; Kaur, Pushpinder; Gopichand; Singh, R. D.; Ahuja, P. S. Institute of Himalayan Bioresource Technology, Palampur, HP, India. <i>Fitoterapia</i> (2008), 79(6), 401-418.</li> <li><b>5. Jin, Z.Q and Chen, X., 1998.</b> A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by ,1-diphenyl-2-picryl -hydrazyl (DPPH). <i>Journal of Pharmacological and Toxicological Methods</i> <b>39</b>, pp. 63–70.</li> <li><b>6. Ballal, Kalpana; Huang, Peng.</b> Role of free radicals in cancer development. <i>Recent Research Developments in</i></li> </ol>

	Cancer (2001), 3(Pt. 2), 491-523.
--	-----------------------------------

篩選植物	橄欖(olive)	學名	Olea Europaea
植物基本介紹	<p>橄欖:最近陸陸續續有許多研究發表橄欖萃取物對健康有多方面的好處，除了是很好的抗氧化劑來源外，對骨骼健康也有幫助。橄欖葉中還有一種稱為 Oleuropein 的苦味成份，此成份可使樹長得比較強壯，還能抵抗昆蟲咬和細菌的侵害，經科學家研究 Oleuropein 對於骨骼健康應也有幫助。橄欖含大量的多酚化合物，如水合酪氨酸 (Hydroxytyrosol) 及酪醇 (Tyrosol)，在預防心血管疾病、抗氧化及抗發炎反應都很有正面助益。橄欖萃取物 (oleuropein) 能降低血脂質過氧化物等不好物質的產生，這些不好的物質會造成血管的不通暢而影響血量的流通，若是組織長期缺血會導致氧化壓力的增加，進而引發疾病的產生。多攝取這類天然抗氧化物對健康應都是有多方面益處的。橄欖含大量的多酚複合物，對於預防心血管疾病、抗氧化及抗發炎反應都有幫助。</p>		



<p>抗氧化篩選結果</p>	<p>本實驗取市售不同品牌之橄欖萃取液進行抗氧化能力測定,結果如下:</p> <p>橄欖萃取液 1:抗氧化能力 426.2mg(gallic acid)/100ml(萃取液)</p> <p>橄欖萃取液 2:抗氧化能力 106.2mg(gallic acid)/100ml(萃取液)</p> <p>附註:1.上述結果是利用捕捉 DPPH 自由基能力測定法測定。</p> <p>2.抗氧化能力表示方式是利用不同濃度的標準參考物為 gallic acid，分別測出捕捉 DPPH 自由基能力後製成檢量線(Calibration curve)，然後測出萃取液的捕捉 DPPH 自由基能力，代入檢量線方程式計算出 100ml 植物萃取液相當於 X mg gallic acid 的捕捉 DPPH 自由基能力。</p>
<p>參考文獻</p>	<p>1. Chemistry and Bioactivity of Olive Biophenols in Some Antioxidant and Antiproliferative in Vitro Bioassays. Obied, Hassan K.; Prenzler, Paul D.; Konczak, Izabela; Rehman, Ata-u; Robards, Kevin. School of Biomedical Sciences, School of Agricultural and Wine Sciences, E. H. Graham Centre for Agricultural</p>

	<p>Innovation, Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW, Australia. <i>Chemical Research in Toxicology</i> (2009), 22(1), 227-234.</p> <p>2. <u>Jin</u>, Z.Q and Chen, X., 1998. A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by ,1-diphenyl-2-picryl -hydrazyl (DPPH). <i>Journal of Pharmacological and Toxicological Methods</i> <b>39</b>, pp. 63–70.</p> <p>3. Ballal, Kalpana; Huang, Peng. Role of free radicals in cancer development. <i>Recent Research Developments in Cancer</i> (2001), 3(Pt. 2), 491-523.</p> <p>4. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (<i>Olea Europaea</i> L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. Leonardis, Antonella; Aretini, Alessandra; Alfano, Gabriele; Macciola, Vincenzo; Ranalli, Giancarlo. Department of Agricultural, Food, Environmental and Microbiological Science and Technologies (DiSTAAM), University of Molise, Campobasso, Italy. <i>European Food Research and Technology</i> (2008), 226(4),</p>
--	---

A. 對於產業界、國家發展及其他應用方面預期之貢獻：

1. 在學術研究方面：了解中草藥抗氧化基本活性作用之訊息，提供中草藥科學化依據與學術應用價值。
2. 在其他應用方面，從分出之部分或成分之活性篩選可以了解此中草藥之抗氧化作用，藉以開發新化粧品或其他產品，確立漢中草藥之抗氧化活性成份，並期望進一步開發成為新的化粧品經濟作物，以提高中草藥之經濟效益，進而增加中草藥之應用性，開發應用資源。
3. 對於參與之工作人員，預期可獲之訓練。參與人員可從研究中學到分離技術，以及對所分離之化合物所進行的生物

活性篩選有進一步之訓練。了解化學與生物活性之相互配合之重要性，並進一步了解化粧品製造的流程。訓練其遇到困難時如何著手思考和尋求解決的方法。計畫在各類專業教師團隊與研究所學生人力的投入，配合現有之生物技術中心、中草藥開發應用中心、民生保健發展暨健康促進中心、化粧品檢驗中心支援，相互搭配合作，彼此間相互交流與討論，將中草藥進行完整的應用探討。

#### B. 中草藥資訊服務中心

1. 本計畫兼具實務與學術特色，具體收集各類中草藥資訊，提供實務與學術研究所需資源，建立具有豐富性、實用性、快速性、可靠性與服務性的網路搜尋資料平台，期許成為令人肯定並且卓越的一流資訊服務中心。
2. 廣泛且具體收集中草藥資訊、研究文獻與實際使用之中草藥有效成分之研究。
3. 建立台灣中草藥科技資訊網站，建置各國法規與相關科學文獻資料庫。

#### C. 推廣中草藥資源之應用價值：

1. 推廣傳統中草藥添加於化粧品或其他產品，促進相關產業(例如中藥廠、化粧品產業)之多元發展與互動。
2. 推廣傳統中草藥與生活文化間多樣性利用之應用。

## 六、結論：

中草藥應用在護膚、美容上流傳已久，古代人已將天然動植物應用於化粧上：如用鳳仙花染指甲、指甲花染髮、無患子洗髮、動物油脂護膚；後來隨著科技的進步，更能由天然物中取得有效成分，且將中草藥應用於化粧品符合當今世界化粧品發展的潮流，加上國人有許多人對於中草藥研發具有豐富經驗，因此有潛力能將天然物加以研究製造出一系列無毒、無害、無副作用、具有營養和療效的化粧品，以提昇產業水準，並將具我國祖先藥學智慧之化粧品推向國際舞台。

## 七、參考文獻

1. Bernard, P. and Berthon, J. Y. 2000. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *International journal of Cosmetic Science*. 22, 219-226.
2. Boots the chemist Ltd. The guide to practical measurement of UVA/UVB ratios. The Boots Chemist, PLC, Nottingham, England.
3. Cabanes, J. et al. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 982-985.
4. Cosmetics & toiletries 1996. Natural and Botanical products formulary. Vol 111, 81-94.
5. Easton, A. Women have deadly desire for paler skin in the Philippines. *The Lancet* 352, 555.
6. Fitzpatrick, T. B. 1995. Pathophysiology of hypermelanoses. *Clin. Drug. Invest.* 10 (suppl. 2)
7. Goihman-Yahr, M. 1996. Skin aging and photoaging: an outlook. *Clinics in Dermatology*. 14,153-160.
8. Lee, K. T. et al., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science*. 19, 291-298.

9. Lin, C.-G., Kao, Y.-T., Liu, W.-T., Huang, H.-H., Chen, K.-C. and Lin, H.-C. 1996. Cytotoxic effects of *Bacillus anthracis* lethal toxin on macrophage-like cell line. *Current Microbiology* 33, 224-227.
10. Luckewicz, W. 1990. Determination of ascorbyl dipalmitate in cosmetic whitening powders by differential scanning calorimetry. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41. 359-367.
11. Maeda K. et al. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosm. Chem.* 42, 361-368.
12. Masuda, M. et al. 1996. Skin lighteners. *Cosmet. Toil.* 111, 65-75.
13. Melo, P. S., Duran, N., and Haun, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. 2000. *Toxicology letters* 116, 237-242.
14. Merot, F., Seniuta, R., Benita, G. and Masson, Ph. 1992. Method for quantifying cutaneous pigmentation in animals and preliminary study in humans. *International Journal of Cosmetic Science.* 14, 173-182.
15. Motoyoshi, K., Ota, Y., Takuma, Y. and Takenouchi, M. 1998. Wrinkles from UVA exposure. 113, 51-56.
16. Phillips, B. J. 1996. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicology in vitro* 10, 69-76.
17. Schallreuter, K. U. et al. 1994. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 263. 1444-1446.
18. Shin, N. H. et al. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochememical And Biophysical Research Communications.* 243, 801-803.
19. Shirota, S. et al. 1994. Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 266-269.
20. Smith, J. 1996. State of the industry: the Asia-Pacific cosmetics and toiletries sector, 1995. *DCI.* 24-34.
21. Stern, M. Klausner, M., Alvarado, R., Renskers, K., and Dickens, M. 1998. Evaluation of the EpiOcular tissue model as an alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 12, 455-461.

## 八、附錄

### 參與教師一覽表

系(所)別	教師姓名	職稱	電話	e-mail
粧品所	陳榮秀	特聘教授	2409	azschen@mail.chna.edu.tw
粧品系	李佳芬	教授	0933611286	D766@ms8.hinet.net
粧品所	林清宮	副教授	7380	ncglin@mail.chna.edu.tw
粧品系	李淵博	助理教授	2427	yuanpo@mail.chna.edu.tw
粧品系	周宗翰	助理教授	2417	tzunghan@mail.chna.edu.tw
粧品系	梁家華	助理教授	2421	tinna_ling@mail.chna.edu.tw
藥學系	陳莉瑩	助理教授	2209	eijodesu@mail.chna.edu.tw
藥科所	黃秀琴	副教授	2105	schuang@mail.chna.edu.tw
醫化系	陳榮才	副教授	0930855696	ztc19530612@mail.chna.edu.tw
藥學系	楊政哲	副教授	2210	jjyang@mail.chna.edu.tw
醫化系	李淑婉	副教授	2319	Swlee95465@mail.chna.edu.tw
粧品系	蔡玫琳	助理教授	0956877722	meilints@mail.chna.edu.tw
醫化系	張朝明	副教授	2304	jchurmin@mail.chna.edu.tw
粧品系	張妙玲	助理教授	2416	s22165@mail.chna.edu.tw

# 嘉南藥理科技大學 97 年度教師專題研究計畫報告

重點研究總計畫名稱：生技藥物開發應用

子計畫名稱：生技製藥開發應用

重點研究總計畫主持人：楊朝成

子計畫主持人：王姿文

中華民國九十八年二月二十六日

## 中文摘要

本計劃乃選用各類中草藥，分析其抗氧化機能，包括以植物組織培養來誘發癒傷組織，作為藥材開發之選擇，分析抗氧化能力，初步結果顯示雷公藤癒傷組織具有抗氧化效用(0.22)。另外也選用市售二十種中草藥，將其中的成分經過乙醇萃取，經減壓濃縮、乾燥之後之粉末，加入米麴菌發酵培養液中進行發酵作用。發酵完成之培養液再經甲醇萃取、濃縮、乾燥之後得到發酵後之粉末。接著我們測試同一個中草藥發酵前粉末與發酵後粉末中，其酪胺酸酶抑制活性分析之比較實驗。結果發現在所測試的二十個中藥中，有三個中草藥其發酵後成分之酪胺酸酶抑制活性，比發酵前成分之抑制活性強。

因此，在接下來的研究中，我們以不同溶劑之分配萃取層進行抑制酪氨酸酶之活性測試，結果發現在所測試的二十個中草藥之中，共有三個中草藥成分經發酵後具有增強抑制酪氨酸酶活性。其中，黃琴、黃耆及當歸在乙酸乙酯層之萃取物經過米麴菌發酵後，其抑制酪氨酸酶的活性分別為增強十倍、九倍及二倍（黃琴：發酵前  $IC_{50} = >200$  ug/ml，發酵後  $IC_{50} = 20.5$  ug/ml；黃耆：發酵前  $IC_{50} = >1000$  ug/ml，發酵後  $IC_{50} = 111.7$  ug/ml；當歸：發酵前  $IC_{50} = 719.4$  ug/ml，發酵後  $IC_{50} = 386.8$  ug/ml），為增強效果最明顯的中藥。



## 研究計畫之目的

利用組織培養技術誘發藥用植物的癒傷組織是一項新的嘗試，有鑒於環境變遷，使許多中藥材的產量受到嚴重影響，品質也大不如前，故以生物技術來生產中藥材是相當可行的方式，當技術成熟後不僅可提供適量的中藥材，也讓品質有所保證。另外亦嘗試將二十多種市售的中草藥置於米麴菌發酵培養液中進行發酵作用，分析其與抗氧化美白有關的酪胺酸酶抑制活性。

酪胺酸酶抑制劑是目前含藥美白化妝品中廣泛使用的有效成分。然而，目前化妝品市場上所使用的有效美白成分[對苯二酚(hydroquinone)、熊果素(arbutin)與麴酸(kojic acid)]大多具有生理毒性，在使用上有其限制。除了上述二種之外，麴酸則是目前美白化妝品成分中，抑制黑色素生成最有效的成分。麴酸的發現與對苯二酚類似，不過這次是藉由一群在釀酒工廠中工作的工人，發現他們的手由於長期接觸醃漬槽中的發酵液而越來越白。同樣經過研究後，正式從米麴菌屬的麴菌(*Aspergillus niger*)的代謝產物中，分離純化到美白有效成分，也就是麴酸。由於麴酸美白效果顯著，因此獲得全球第一大化妝品集團歐萊雅的青睞，旗下專櫃品牌的美白保養品都以麴酸為主要成分。根據衛生署網站公開資料，目前向衛生署申請以麴酸為美白含藥的美白產品共有六十支，其中包含多支國際品牌商品，可見麴酸的美白療效是有商機支持的。但是經歷十多年的風光後，日前(2003年四月)遭到日本衛生主管機關厚生省以致癌危險性為由(可能導致肝癌)，列為化妝品觀察成分，並暫時凍結含有麴酸保養品的製造與進口。

由上述說明中可知，目前化妝品市場上所使用的有效美白成分大多具有生理毒

性，在使用上有其限制。而全球美白化妝品市場又極其龐大，因此各大化妝品公司與研究單位莫不積極從事新一代美白成份的研究開發。

酪胺酸酶抑制劑是目前含藥美白化妝品中廣泛使用的有效成分。由於目前化妝品市場上所使用的有效美白成分大多具有生理毒性，因此我們嘗試自天然食品中開發新一代安全的化妝品美白有效成分。



## 研究方法

### (一) 雷公藤組織培養藥材部份

#### 1. 癒傷組織之培養<sup>3,4</sup>

本研究之雷公藤培植體為以培養好之癒傷組織，亦可取雷公藤植株之莖尖，嫩葉與嫩莖開始培養。在培養 1 個月後選擇適當癒傷組織繼續繼代培養，將癒傷組織量增加以利實驗進行。

#### 2. 抗氧化作用

將培養之癒傷組織以水及有機溶劑(如乙醇)萃取後，依清除 $\alpha$ · $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定方法測定，其原理如下：

清除 $\alpha$ · $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定：

油脂在自氧化的過程中會產生自由基而造成油脂酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫(hydrogen doner)來清除脂質過氧化物自由基(peroxyl radical)進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行，在抗氧化的研究上通常使用 DPPH 來評估抗氧化的供氫能力。DPPH 之甲醇或乙醇溶液在 517 nm 下會有強吸光，但是被抗氧化劑(AH)還原時則吸光值降低，因此在 517 nm 的吸光值愈低即表示抗氧化劑的供氫能力愈強。樣品若有顏色干擾情形，則可採用 HPLC 方法分析。

(二) 以中草藥提取物加入米麴菌發酵為研究的題材上。我們選用二十種中草藥，將其中的成分經過甲醇萃取，濃縮，乾燥之後之粉末，分別加入米麴菌發酵培養液中進行發酵作用。發酵完成之培養液再經甲醇萃取，濃縮，乾燥之後得到發酵

後之粉末。接著我們測試發酵前粉末與發酵後粉末，其中抑制酪胺酸酶活性分析之比較實驗。

本研究計畫之工作項目可細分為下列四點，其實驗步驟詳述如下:

## 1 中藥發酵前及發酵後成分之萃取

1. 中藥材購自藥行。
2. 將購得之中藥磨成粉後以乙醇浸泡數次，將萃取液以減壓濃縮機濃縮。
3. 將抽提物用不同極性之溶媒分配萃取（正己烷、乙酸乙酯、水），所得之乙酸乙酯抽取液減壓濃縮後得到中藥萃取物，並進行抑制酪氨酸酶之活性分析之藥理試驗以及添加入米麴菌發酵液中進行發酵試驗。

## 2 菌株孢子採集

1. 將購買自菌種保存中心的菌株冷凍乾燥管於無菌操作台中利用冷熱破碎法將之打破。
2. 將乾燥的保存菌體經無菌水潤濕後，加入預先配置好的 PM 固態培養基(麥芽糖萃取物 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 洋菜 20 g/L, 並調 pH=7.0), 並利用無菌玻璃塗抹棒均勻塗抹。
3. 將接種完成的固態培養基置於室溫中培養一週，等待其中菌絲體生產孢子。
4. 菌種培養完成後，在無菌操作台上，將直徑約 0.2mm 之玻璃珠約 30 顆倒入已佈滿孢子的培養皿中。
5. 將培養皿劇烈左右搖晃至小玻璃珠上沾滿孢子。
6. 用滅過菌之刮杓將玻璃珠刮至 50ml 離心管中。離心管已裝了含 0.1%

Tween-80 清潔劑的無菌水 30ml 並且滅過菌。

7. 將離心管的蓋子鎖緊後拿出無菌操作台，放至超音波震盪箱中震盪 10 分鐘。
8. 於無菌操作台中利用無菌 30% 甘油水將離心管內的孢子液置於-20°C 冰箱保存，作為本研究所使用的菌株孢子保存液來源。

### 3 菌株發酵培養

1. 將欲培養之菌株的孢子保存液自-20°C 冰箱中取出並置於 30°C 水浴槽使其回溫。
2. 將回溫的孢子保存液接種進入含有 50ml PM 培養基(接種濃度為  $10^5$  spore/ml，培養基成分：麥芽糖萃取物 20 g/L，葡萄糖 20 g/L，蛋白胨 1 g/L，並調 pH=7.0)，的 250ml 平底三角錐瓶中。其中培養液含有濃度 1mg/ml 的中草藥萃取粉末。
3. 將接種完成的培養基置於 30°C 恆溫震盪培養箱，於轉速 120rpm 下進行培養。

### 4 發酵液萃取

1. 將 50ml 甲醇加入發酵液 (50ml) 樣品中，在 40°C 中震盪四小時。
2. 萃取完成後，利用減壓過濾法去除固態物質。
3. 將萃取溶液進行減壓濃縮。
4. 再將濃縮物進行抑制酪氨酸酶之活性分析之藥理試驗並進行管柱液相層析進一步純化分離其中有效成分。

## 結 果

### (一) 雷公藤癒傷組織之抗氧化效用

將培養至約 1 公克之癒傷組織以液態氮處理後，經乙醇萃取，濃縮乾燥後進行分析。結果顯示雷公藤癒傷組織具有抗氧化效用(0.22)。未來將繼續改良培養基等培養條件，找出更具抗氧化效用之植材。

(二) 選用二十個中草藥，將其中的成分經過甲醇萃取、再將抽提物用不同極性之溶媒（正己烷、乙酸乙酯、水）分配萃取、再將乙酸乙酯層與水層濃縮（正己烷層不進行往後之研究）、乾燥後之粉末，分別加入米麴菌發酵培養液中進行發酵作用。發酵完成之培養液再經甲醇萃取、濃縮、乾燥之後得到發酵後之粉末。接著我們分別測試乙酸乙酯層與水層發酵前粉末與發酵後粉末中其酪胺酸酶抑制活性分析之比較實驗。

結果發現所有測試的中草藥，其分配萃取水層之濃縮乾燥粉末，在發酵後均不具有增強抑制酪胺酸酶之活性。因此，我們以乙酸乙酯層為研究重點。在所測試的二十個中草藥之中，共有三個中草藥成分經發酵後具有增強抑制酪胺酸酶活性（如表一）。其中，黃琴、黃耆及當歸在乙酸乙酯層之萃取物經過米麴菌發酵後，其抑制酪胺酸酶的活性分別為增強十倍、九倍及二倍（黃琴：發酵前  $IC_{50} = >200$  ug/ml，發酵後  $IC_{50} = 20.5$  ug/ml；黃耆：發酵前  $IC_{50} = >1000$  ug/ml，發酵後  $IC_{50} = 111.7$  ug/ml；當歸：發酵前  $IC_{50} = 719.4$  ug/ml，發酵後  $IC_{50} = 386.8$  ug/ml），為增強效果最明顯的中藥。

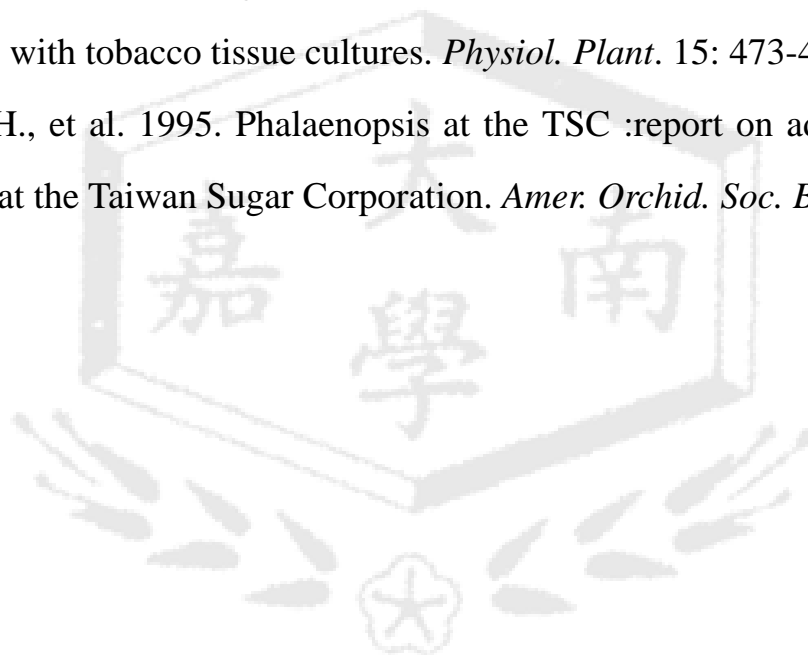
表一、中草藥經米麴菌發酵前、後乙酸乙酯層萃取出抑制酪胺酸酶之活性

中藥名稱	酪胺酸酶抑制活性 IC <sub>50</sub> (ug/ml)		中藥名稱	酪胺酸酶抑制活性 IC <sub>50</sub> (ug/ml)	
	前	後		前	後
黃琴	>200	20.5	銀杏	397.9	>1000
黃耆	>1000	111.7	苟杞	390.3	>1000
當歸	719.4	386.8	女貞子	>1000	N.D. <sup>a</sup>
龍膽草	>700	>1000	麥門冬	527.2	528.9
大黃	463.3	>1000	梔子	589.7	N.D. <sup>a</sup>
馬兜玲	577.5	754.7	刺五加	243.1	>1000
澤瀉	461.3	755.9	五味子	>500	>1000
薑	275.5	N.D. <sup>a</sup>	防己	>1000	732.4
甘草	45.2	>1000	柴胡	>1000	>500
生地	>1000	>700	桑枝	18.1	35.3

<sup>a</sup>: Not detectable due to cytotoxicity.

## 參考文獻

1. Chang TS, Ding HY, Tai SSC, Wu CS. (2007) Mushroom Tyrosinase Inhibitory Effects of Isoflavones Isolated from Soygerm Koji Fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chem.* 105: 1430–1438.
2. Chang TS (2007) Two potent suicide substrates of mushroom tyrosinase: 7,8,4'-trihydroxyisoflavone and 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2010–2015.
3. Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
4. Chen W.H., et al. 1995. Phalaenopsis at the TSC :report on advance research in breeding at the Taiwan Sugar Corporation. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* 64 : 492-495.





# 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效能，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.<sup>1</sup> The family of plant polyphenol compounds, have been implicated in an array of biological effects including antioxidative activity.<sup>2</sup> 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<sup>1</sup>，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<sup>2</sup>，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) <sup>a)</sup>	IC <sub>50</sub> (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

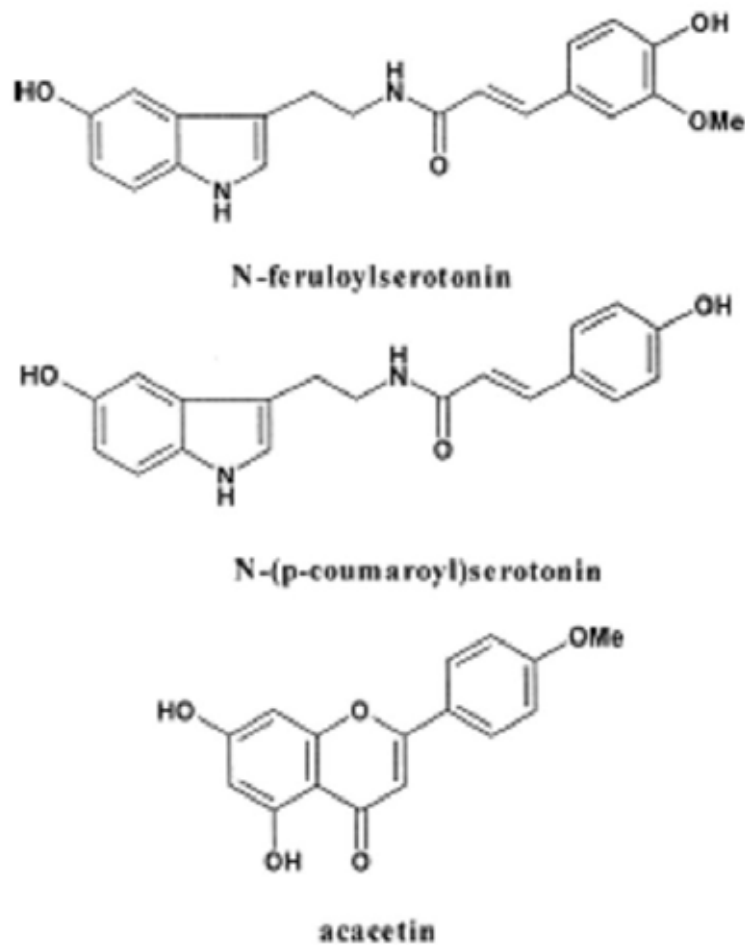


圖 1、番紅花種子萃出之活性成分

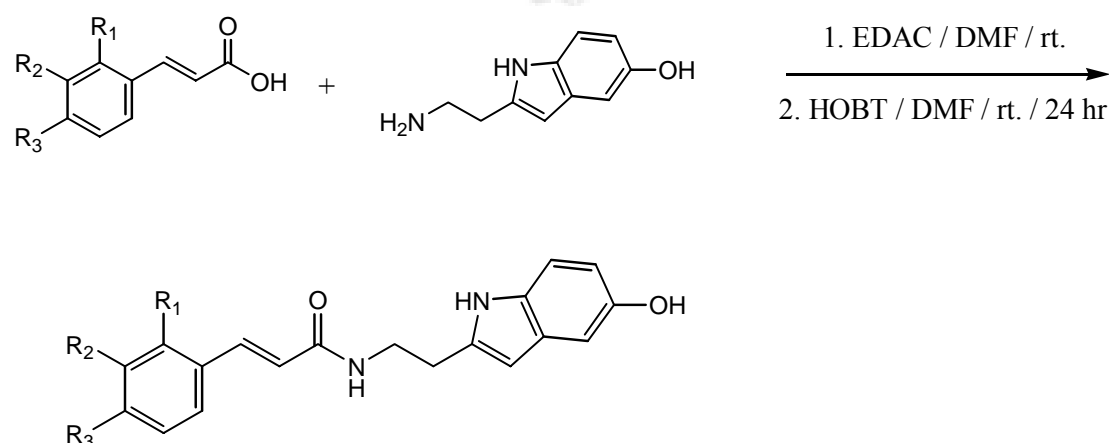
我們將利用下列幾種活性測試，來探討其抗氧化、抑制黑色素生成以及防曬能力：

- (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<sup>3-4</sup>：

- (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%NH<sub>4</sub>Cl 水溶液30mL，用乙酸乙脂萃取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<sup>1</sup>H 及<sup>13</sup>C 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

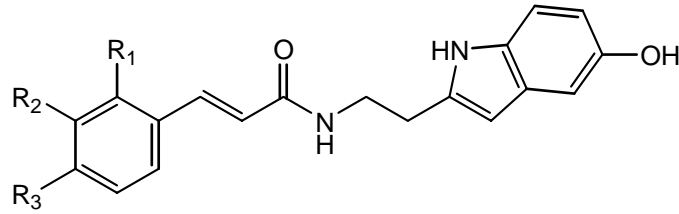


表2、羥基取代之*N*-色洛冬寧桂皮醯胺化合物

Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
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<sup>5-8</sup>：

### (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<sub>540 nm</sub> 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 IC<sub>50</sub>，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 IC<sub>50</sub> 之濃度。

捕捉 DPPH 自由基能力(%) = [1 - (A<sub>540 nm, sample</sub>/A<sub>540nm, blank</sub>)] × 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 <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>1</b>	5.90	22.74	14.92	36.28	71.88	84.56	14.97
<b>2</b>	1.56	5.28	16.94	35.50	69.58	83.23	16.10
<b>3</b>	6.80	8.13	21.70	50.16	82.64	83.72	13.71
<b>4</b>	9.51	8.25	18.43	39.38	73.35	86.10	14.84
<b>5</b>	3.88	8.89	16.78	35.60	66.51	86.00	15.94
<b>6</b>	4.48	7.63	16.37	40.96	71.55	87.57	15.14
<b>7</b>	7.09	12.87	36.41	67.99	87.90	90.79	11.16
<b>8</b>	0.01	12.84	13.83	29.50	56.16	80.69	17.76
<b>Trolox</b>	7.56	13.94	23.86	52.91	95.36	97.07	11.76

註 1. 以 Trolox 為比較試品。

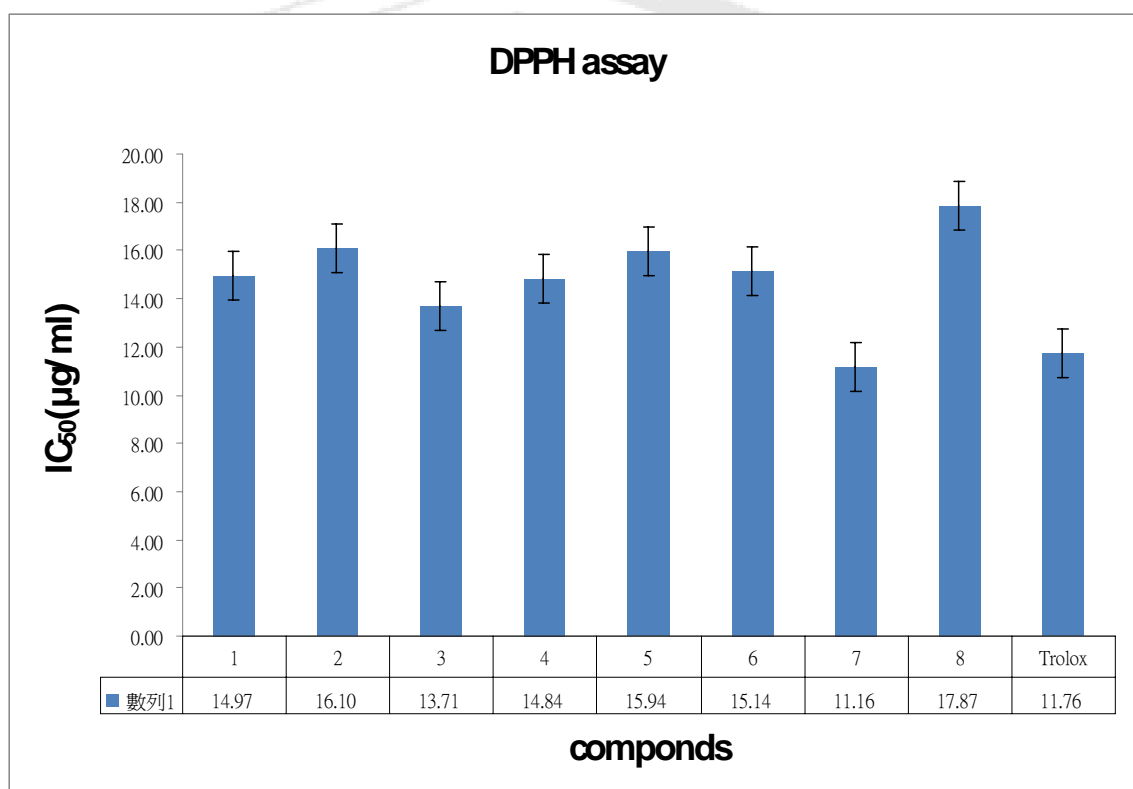


圖 2、DPPH 自由基清除能力

## (二) 抗氧化能力測試(TEAC)

ABTS經H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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<sup>+</sup>)，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  $\mu$ l (扣色組不加ABTS 以等量的去離子水補足) 以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>50  $\mu$ l 與Peroxidase 50  $\mu$ 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  $\mu$ l (依次配製成最終濃度為0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0  $\mu$ 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  $\mu$ 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IC<sub>50</sub> 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

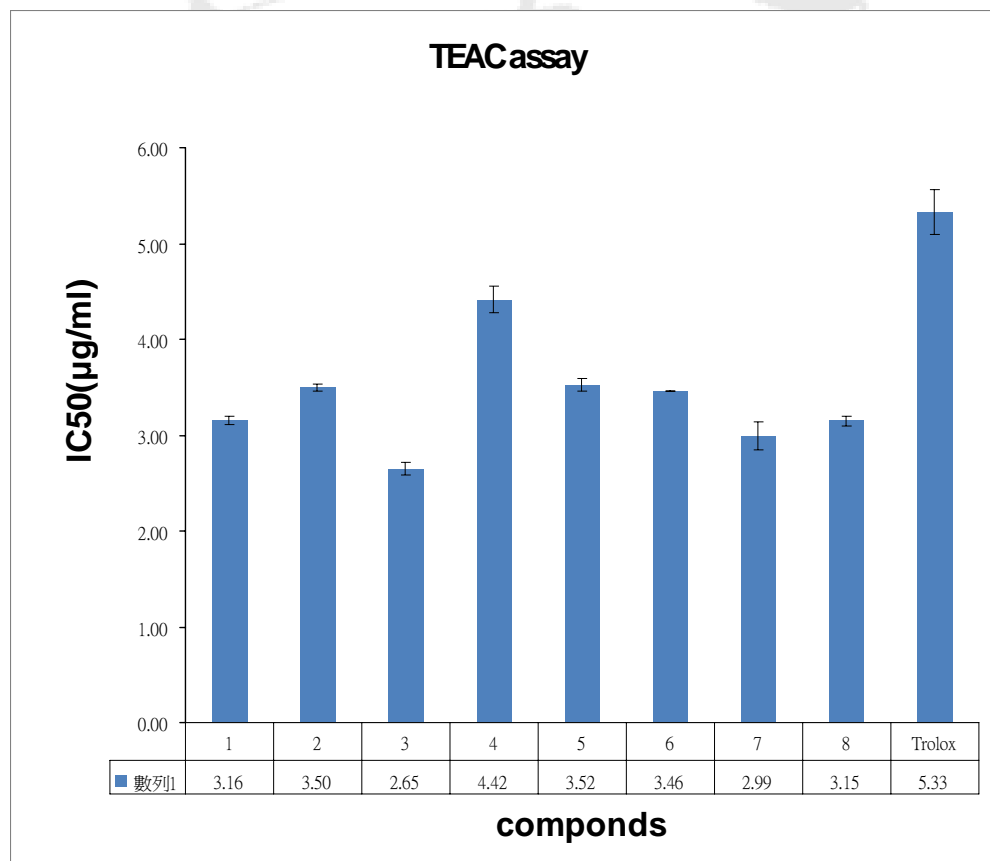


圖 3、TEAC 總抗氧化能力測試

**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 <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>1</b>	6.38	18.53	28.24	57.03	87.62	93.38	3.16
<b>2</b>	9.83	17.84	29.52	39.31	82.24	97.32	3.50
<b>3</b>	11.40	23.83	41.01	62.29	90.82	99.17	2.65
<b>4</b>	2.66	14.94	25.75	32.77	54.26	97.88	4.42
<b>5</b>	8.72	17.58	25.37	46.59	78.82	97.93	3.52
<b>6</b>	10.66	19.15	25.36	44.92	80.41	98.39	3.46
<b>7</b>	8.71	19.47	31.45	57.50	89.12	100.27	2.99
<b>8</b>	8.07	15.97	32.94	56.51	85.68	97.35	3.15
<b>Trolox</b>	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IC<sub>50</sub> 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，IC<sub>50</sub>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%NH<sub>4</sub>Cl 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<sup>1</sup>H 及<sup>13</sup>C 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。

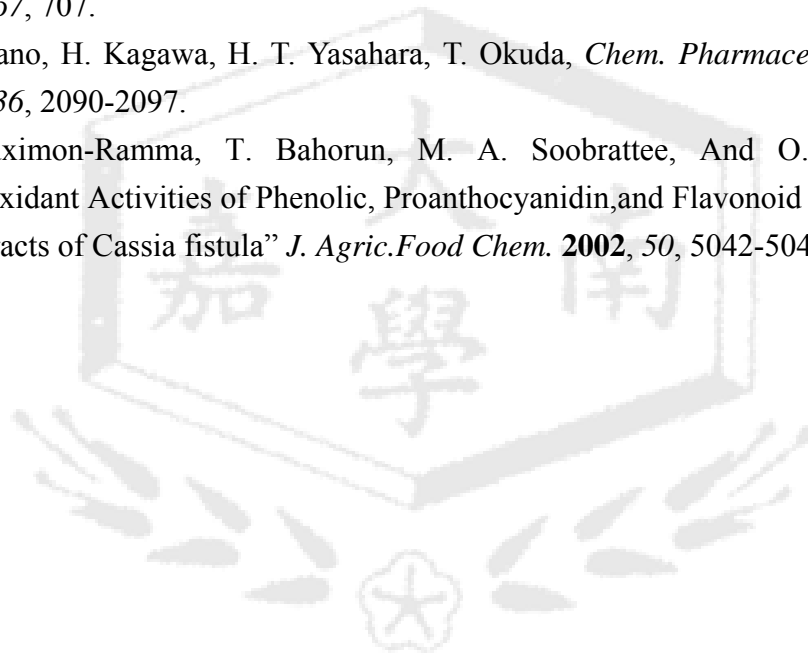
*N*-鄰位-香豆醯胺色洛冬寧 [*N*-(*m*-Coumaroyl)-serotonin]**1**，米白色固體，mp. 195~202 0C, *R*<sub>f</sub>=0.58 (EtOAc:n-hexane=70:30); <sup>1</sup>H NMR(200 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) δ 2.99 (2 H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.65 (2 H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.76 (1 H, d, *J* = 15.5 Hz), 6.77 (1 H, dd, *J* = 8,2 Hz), 6.86 (1 H, d, *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); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) 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 Biophys. 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

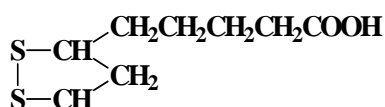
本實驗係為改善  $\alpha$ -硫辛酸於調製時之分散性，而試合成仿硫辛酸之 dithiol 化合物 1,2-benzenedimethanethiol，祈能有較好油溶性之界面活性化合物。以 1,2-benzenedimethanol 為原料與 Thiourea 於鹽酸下反應得 dithiol 化合物。於溫和條件下 ( $60^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ )，得 50% 之產率。

## Abstract

In this project the dispersivity of Alpha lipoic acid should be provided by changing structure during it has been prepared 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

$\alpha$ -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。



$\alpha$ -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<sup>1</sup>-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.**

