

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNIC-9602

計畫名稱：利用簡易有機合成方法製備具有天然活性相似結構之物質並探討其抗氧化及美白效果之研究

執行期間：96年1月1日至96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(二)主持人：楊朝成

計畫參與人員：

計畫參與人員：楊朝成、張嘉苓

中華民國 97 年 03 月 31 日

摘要

本研究主要利用簡易有機反應方法合成一系列 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物，進一步以體外試驗進行抗氧化的能力，並與水溶性維生素 E 比較其抗氧化的功效；另外，進一步以美白活性測試—抑制酪胺酸酶活性測試。由結果顯示，抗自由基能力及美白活性測試皆與羥基數量及取代位置有關，其中又以環上具有兩個或三個羥基取代且在鄰位或對位時具有較佳之抗氧化效果。

關鍵字：*N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺、抗氧化、美白活性、酪胺酸酶。

Abstract

In this study we aim to originally synthesize a series of highly productive *N*-(hydroxy phenyl) polyhydroxy-benzamides and observe their *In vitro* of antioxidant activity and the activity evaluation of tyrosinase inhibitory for whitening. The results not only depended on number and position of hydroxyl substitutes, but also theirs at *ortho* and *para* positions are greater effective on antioxidant.

Key words : *N*-(hydroxy phenyl) polyhydroxy-benzamides, antioxidant activity, tyrosinase inhibitory, whitening.

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¹。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，而其中又以延遲老化原因之抗氧化訴求特別強烈。因此，廠商及各研究機構投入大量研究人力與金錢致力於抗氧化產品原料與配方之開發。

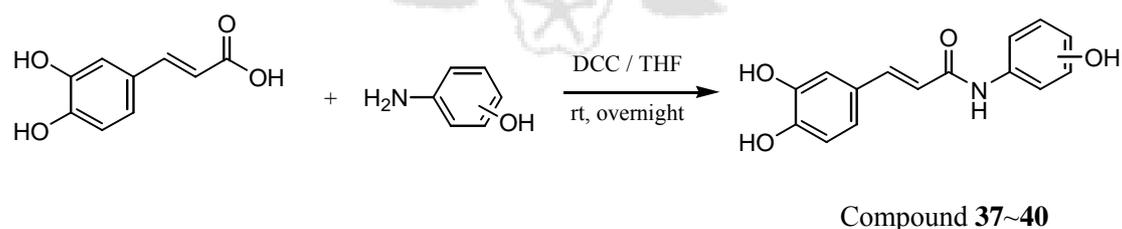
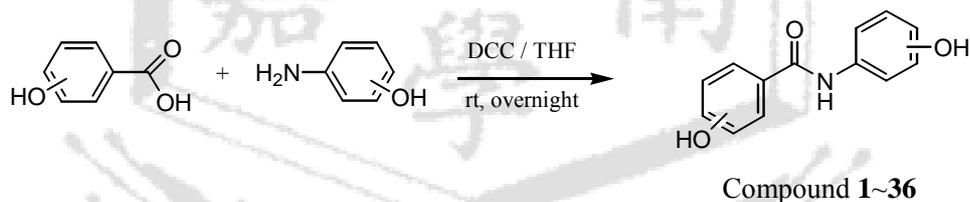
近年來有關導致人類老化因素研究有許多報導，自古以來，人們追求永生青春就不曾間斷，現今世界科技仍無法讓人長生不生與青春永駐，但在化粧品世界，藉助彩粧修飾皮膚使人外表光彩，生活更有自信與尊嚴，而皮膚抗老化問題，就成了目前最熱門也是化粧品最明顯有研究的課題之一；自由基理論是目前受歡迎也是最易被接受，所謂自由基即是指一化學物質具有不成對電子，而此不成對電子本身極不穩定，可直接攻擊身體組織，使得細胞破壞，而加速皮膚老化或促成癌症產生。雖然人類身體本身自有一套完整抗氧化系統以防止自由基傷害(如超氧化物轉化酶(superoxide dismutase)、過氧化氫酶(catalase)等等)，但由於這些體內抗氧化酵素隨年齡增長而逐漸減少，因此藉由許多維生素或天然抗氧化成分

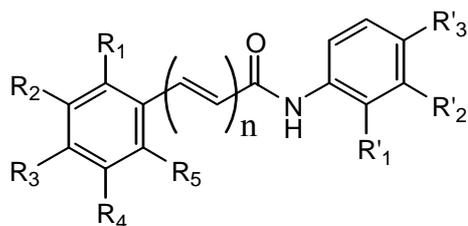
的攝取，來彌補其抗氧化之不足，但由於自由基有許多種類，現今並無一成分可以完全防止自由基的傷害，目前已知許多含有酚類化合物具有抗自由基能力，我們實驗室以往已合成一系列(polyhydroxy-benzylidene)-(hydroxy-phenyl) amines 化合物，並進行其抗氧化研究，其抗氧化能力受羥基取代數量與位置有關且有不錯之抗氧化效果，但由於亞胺結構不穩定，容易受酸水解，因此，本論文將進行合成 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺一系列具穩定之醯胺化合物，利用體外抗氧化測試效果，探討其對抗自由基之能力。

結果與討論

一、 合成 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物²⁻³：

分別利用羥基苯甲酸(oxybenzoic acid)或咖啡酸(caffeic acid)與胺基苯酚(aminophenol)經由 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)在無水四氫呋喃(Tetrahydrofuran, THF)溶液中，進行脫水反應後，經由矽膠管柱分離，以 ¹H 及 ¹³C NMR 測試鑑定其結構，得到高產率之醯胺(amides)化合物(compound 1~40)，如表一所示。





Compounds	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R' ₁	R' ₂	R' ₃
1	0	OH	H	H	H	H	H	H	H
2	0	OH	H	H	H	H	OH	H	H
3	0	OH	H	H	H	H	H	OH	H
4	0	OH	H	H	H	H	H	H	OH
5	0	H	OH	H	H	H	H	H	H
6	0	H	OH	H	H	H	OH	H	H
7	0	H	OH	H	H	H	H	OH	H
8	0	H	OH	H	H	H	H	H	OH
9	0	H	H	OH	H	H	H	H	H
10	0	H	H	OH	H	H	OH	H	H
11	0	H	H	OH	H	H	H	OH	H
12	0	H	H	OH	H	H	H	H	OH
13	0	OH	H	OH	H	H	H	H	H
14	0	OH	H	OH	H	H	OH	H	H
15	0	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
16	0	OH	H	OH	H	H	H	H	OH
17	0	OH	H	H	OH	H	H	H	H
18	0	OH	H	H	OH	H	OH	H	H
19	0	OH	H	H	OH	H	H	OH	H
20	0	OH	H	H	OH	H	H	H	OH
21	0	OH	H	H	H	OH	H	H	H
22	0	OH	H	H	H	OH	OH	H	H
23	0	OH	H	H	H	OH	H	OH	H
24	0	OH	H	H	H	OH	H	H	OH
25	0	H	OH	OH	H	H	H	H	H
26	0	H	OH	OH	H	H	OH	H	H
27	0	H	OH	OH	H	H	H	OH	H
28	0	H	OH	OH	H	H	H	H	OH
29	0	H	OH	H	OH	H	H	H	H
30	0	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
31	0	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
32	0	H	OH	H	OH	H	H	H	OH

33	0	H	OH	OH	OH	H	H	H	H
34	0	H	OH	OH	OH	H	OH	H	H
35	0	H	OH	OH	OH	H	H	OH	H
36	0	H	OH	OH	OH	H	H	H	OH
37	1	H	OH	OH	H	H	H	H	H
38	1	H	OH	OH	H	H	OH	H	H
39	1	H	OH	OH	H	H	H	OH	H
40	1	H	OH	OH	H	H	H	H	OH

表一、製備 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物：

二、體外抗氧化能力之測試⁴⁻⁷：

(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 40 種不同數量及位置之羥基取代醯胺化合物(Compound 1~40)，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

其結果如下表二所示：

	1 μg/ml	2 μg/ml	5 μg/ml	10 μg/ml	20 μg/ml	25 μg/ml	30 μg/ml	IC ₅₀ (μg/ml)
1	1.85	1.81	3.18	2.28	3.50	3.18	3.93	567.9
2	6.87	9.23	24.16	35.70	54.91	55.77	59.11	20.88
3	1.92	3.97	3.77	7.54	10.80	11.43	13.55	122.0
4	3.34	8.05	18.54	32.99	68.70	71.88	75.26	17.0
5	2.48	1.14	1.45	0.63	0.90	—	1.26	—
6	3.14	5.03	7.27	12.81	20.64	22.44	25.98	59.0
7	0.75	0.67	1.34	0.59	1.77	0.86	2.67	530.4
8	3.03	6.60	16.16	31.33	46.11	49.17	52.87	24.5
9	0.71	1.65	0.94	1.26	0.67	0.98	0.83	—

10	2.71	3.18	8.45	13.68	23.15	25.04	29.80	50.1
11	1.34	0.35	2.08	0.86	0.90	0.71	1.69	-
12	3.81	5.70	16.43	31.09	49.10	52.59	55.46	23.2
13	2.15	2.58	4.13	6.66	9.20	8.60	9.67	166.6
14	0.09	4.39	12.90	25.02	47.33	52.97	57.14	23.67
15	3.40	-	6.10	7.44	10.88	8.34	3.53	71.43
16	2.58	3.65	11.48	22.83	44.50	54.39	66.64	22.61
17	5.19	12.95	32.65	64.95	88.86	89.91	91.33	11.8
18	19.14	21.72	31.50	49.63	53.29	53.18	53.74	19.7
19	8.39	10.62	34.04	70.38	85.56	85.28	86.56	12.0
20	8.88	13.85	34.39	51.54	82.00	81.97	81.83	13.1
21	5.92	11.24	24.82	38.71	55.55	58.61	61.82	19.8
22	2.89	4.98	13.40	31.99	59.10	63.17	67.77	19.4
23	3.27	5.29	17.02	26.07	43.82	47.16	52.31	25.8
24	2.82	5.46	16.08	31.01	73.58	79.74	82.81	16.0
25	7.00	10.96	32.58	75.79	81.16	80.17	81.00	12.5
26	10.73	21.58	58.28	79.71	80.51	79.90	80.05	10.6
27	7.58	13.82	36.73	76.89	80.89	80.21	80.89	12.1
28	12.60	22.31	48.46	78.80	81.08	80.21	80.89	10.8
29	2.19	2.49	5.72	6.41	13.67	11.39	12.34	110.5
30	1.68	7.27	11.61	18.83	26.61	29.28	31.81	44.3
31	0.60	3.83	6.49	7.31	12.04	6.32	14.70	98.8
32	-	6.02	12.38	20.81	41.40	43.64	47.81	28.2
33	8.47	17.73	40.34	69.71	81.84	82.55	82.00	11.8
34	10.02	18.52	48.97	80.64	82.47	82.47	85.59	10.9
35	8.66	15.46	43.60	79.45	92.97	92.05	92.05	10.4
36	4.81	18.96	48.81	81.32	82.67	83.15	83.11	11.1
37	7.83	13.63	94.90	64.27	79.13	79.09	78.97	12.9
38	4.53	13.00	34.10	68.44	78.18	79.61	79.25	13.0
39	7.67	13.59	33.55	59.42	77.54	78.46	78.74	13.3
40	3.02	14.19	32.55	49.96	73.73	75.00	76.55	14.6
Trolox	3.65	6.20	16.86	40.16	86.33	89.46	91.97	13.9

表二、N-(羥基苯)-多羥基苯醌胺化合物 DPPH 抗氧化效果

註 1. 以 Trolox 為比較試品。

(二) 抑制過氧化氫活性測試⁸⁻⁹

過氧化氫本身雖不具有未成對電子之自由基，但本身具有強烈氧化能力，而且在體內氧化壓力下可形成氫氧自由基(Hydroxy radical)，對身體有極度的破

壞性，因此，我們進一步利用 BJI 超微弱冷光儀來測試多酚醯胺化合物對過氧化氫抑制能力之評估。

本測試套組系列，包含過氧化氫啟動試劑，以及冷光產生之特異探針。當過氧化氫與探針作用後，產生之超微弱冷光，以超微弱冷光儀偵測過氧化氫。當超微弱冷光儀之計數達平衡時(約 10-15 分鐘後)，加入欲測試樣品溶液，若該樣品有清除過氧化氫的能力，則冷光之計數會急速下降。本方法主要藉由添加不同劑量測試樣品對產生冷光值之變化來計算抑制過氧化氫能力之 IC₅₀ 值，藉以評估測試樣品的抑制過氧化氫能力。在數據方面由公式(2)求出不同濃度之清除率，再以 EXCEL 2003 軟體之 TREND 函數進行運算後所得。

本研究之清除過氧化氫自由基之能力測試步驟為：首先將已配置好的過氧化氫第 I 劑(Luminol 2mM) 取 1 ml、第 II 劑(PH7.3 PBS)取 1 ml、第 III 劑(1.2% H₂O₂) 取 0.5 ml，分別加入於 BJI 超微弱冷光儀之石英測量杯內混合，搖晃測量杯數次，使量杯內溶液充份混合均勻，放入儀器測定冷光值(約 600 秒)，當冷光值達平衡後，再取 5mg 樣品與去離子水配製成濃度 10 μg/ml，分次將 10 μg/ml 樣品取 10 μl 加入試劑中，觀看冷光值的變化，等冷光再達平衡後，記錄其冷光值，再加入 10 μl 相同劑量，觀察再度下降之冷光值，並記錄之，測試步驟重覆四次，求出四次的清除率(百分比%)，再分別計算出抑制過氧化氫能力之 IC₅₀ 值。並且以水溶性維他命 E(Trolox)為正相(+)作對照，觀察多酚醯胺化合物彼此間清除過氧化氫自由基能力的差異性。抑制過氧化氫能力之計算方法如公式(2)所示。IC₅₀之計算方法：由公式(2)求出不同濃度之清除率，再以 EXCEL 2003 軟體之 TREND 函數進行運算後所得。

$$\text{過氧化氫清除能力(\%)} = [(A_{\text{initial}} - A_1) / A_{\text{initial}}] \times 100 \%$$

A_{initial}：原始冷光吸收值

A₁：不同濃度之樣品添加量之冷光吸收值

BJI 抑制過氧化氫能力之測試結果，如表(三)所示

Compound	BJI 清除過氧化氫活性能力%				
	3.33 (μg/ml)	6.67 (μg/ml)	10.00 (μg/ml)	13.33 (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)
1	12.61	19.21	20.56	25.06	33.19
3	12.18	14.11	19.11	23.60	35.33
4	13.83	19.48	27.09	31.78	22.84
5	26.82	10.40	3.28	6.67	-4.85
6	9.60	19.32	22.95	27.26	25.12
7	19.19	23.02	31.13	37.39	19.99
8	13.74	22.94	28.95	32.54	21.40
9	2.26	6.32	11.24	11.06	48.23

10	27.65	34.69	41.04	41.82	16.89
11	10.19	16.01	18.91	26.46	28.48
12	10.64	12.89	17.67	19.91	43.00
13	23.79	35.38	45.01	50.47	12.45
14	25.97	33.31	36.81	40.11	19.41
15	32.96	50.17	56.48	61.66	8.23
16	21.67	38.34	46.15	50.53	11.85
22	38.98	37.19	43.35	46.37	16.06
25	9.77	13.20	16.59	15.64	53.96
26	43.01	55.79	68.37	70.95	5.24
27	13.41	31.31	39.15	55.68	12.00
28	13.20	18.92	19.12	20.65	45.77
29	40.75	49.49	56.70	63.61	7.18
31	28.14	43.97	51.66	58.67	9.74
32	24.47	38.85	50.23	53.57	10.94
33	13.83	20.46	22.27	27.14	30.56
34	22.71	41.97	52.96	61.38	9.66
35	ND	14.10	33.54	38.77	13.07
36	20.37	25.55	34.88	41.75	17.02
39	27.74	41.35	53.64	56.00	10.03
Trolox	38.89	43.39	49.99	48.31	12.06

BJL 清除過氧化氫活性能力%

Compound	33.00 ($\mu\text{g/ml}$)	66.67 ($\mu\text{g/ml}$)	100.00 ($\mu\text{g/ml}$)	133.30 ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
2	11.57	13.85	16.91	23.10	365.40
Trolox	38.89	43.39	49.99	48.31	12.06

BJL 清除過氧化氫活性能力%

Compound	0.33 ($\mu\text{g/ml}$)	0.67 ($\mu\text{g/ml}$)	1.00 ($\mu\text{g/ml}$)	1.33 ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
17	25.66	40.30	53.52	61.10	0.97
18	26.25	41.66	53.54	61.10	0.95
20	33.67	44.57	52.10	54.18	1.01
21	26.21	41.36	50.72	54.42	1.06
23	21.38	33.18	41.60	47.67	1.36

30	20.47	32.50	45.67	49.91	1.24
37	12.81	25.03	23.83	27.86	2.38
38	26.30	30.55	43.61	45.17	1.43
40	17.92	22.71	33.23	34.85	1.99
Trolox	38.89	43.39	49.99	48.31	12.06

Compound	BJL 清除過氧化氫活性能力%				
	0.03 ($\mu\text{g/ml}$)	0.07 ($\mu\text{g/ml}$)	0.10 ($\mu\text{g/ml}$)	0.13 ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
19	14.17	28.69	30.17	37.37	2.12
24	14.44	27.89	30.89	36.99	0.18
Trolox	38.89	43.39	49.99	48.31	12.06

表(三)多酚醯胺化合物清除過氧化氫自由基能力測試

註：ND:表示效果不顯著

三、美白活性測試：抑制酪胺酸酶活性測試¹⁰：

酪胺酸酶是酪胺酸形成麥拉寧色素的主要酵素，當其受紫外線照設時會促進酪胺酸酶的活化，使得酪胺酸產生一系列氧化反應，形成黑色素，造成我們皮膚表皮產生色素沉澱現象，為了阻止這種現象產生，當今美白主要方法即是抑制酪胺酸酶的活化，達成防止酪胺酸進行合成黑色素反應，而本研究中所合成出一系列多酚類醯胺化合物，其結構與酪胺酸及其反應中間體 DOPA 相似；因此，我們利用體外抑制 Tyrosinase 活性試驗，探討其抑制酪胺酸酶活性且降低黑色素生成之有效成分。

多酚醯胺化合物之抑制酪胺酸酶活性測試方法：首先分別取多酚醯胺化合物(1~40)2.5 mg 加入 250 μl 倍量的 DMSO 溶液，配製成原液 10 mg/ml 濃度，再從中取出 120 μl 加入 1080 μl 的 DMSO 配製成 1 mg/ml 濃度，之後，分別取 200 μl 之 1 mg/ml 濃度樣品於 epon doff 中，再加入 100 μl 之 DMSO，再加入酪胺酸 PBS 溶液 685 μl ，最後加入 15 μl 酪胺酸酶酵素(Enzyme)PBS 溶液(濃度為 35 units/12 μl)，配製成總體積 1000 μl ；配置成最終濃度分別為 200 $\mu\text{g/ml}$ 之 DMSO 溶液的測試濃度；另外，再分別取不同體積之樣品之 1 mg/ml 原液，配置成最終測試濃度為 10、20、60、150 $\mu\text{g/ml}$ 等，分別測試其不同濃度下樣品的抑制酪胺酸酶活性。扣色組含樣品及 PBS 磷酸緩衝液，不加酪胺酸溶液，其他步驟如上。在控制組(+)方面則不加待測樣品；空白組(-)則不加酪胺酸酶酵素(Enzyme)，另外以 Vit. C 和 Kojic acid 作為本實驗對照組，溶液配製完成後，震盪均勻並放入 37°C 培養箱中一小時，之後分別取出 100 μl 樣品於 96 well 中，用 ELISA 測其在 540 nm 之吸光值。再算出抑制率，並求出多酚醯

胺化合物抑制酪胺酸酶活性之 IC₅₀ 濃度。酪胺酸酶抑制活性之計算方法如公式 (3) 所示。IC₅₀ 之計算方法：並求出不同濃度之抑制率，再以 EXCEL 2003 軟體之 TREND 函數進行運算後所得。本測試之所以要做扣色其主要原因是因為本試驗中之多酚醯胺化合物與酪胺酸結構相似，因此，可能會與 Tyrosinase 反應而造成有吸光效果，進行影響其對抑制酪胺酸活性測試效果，其測試結果及其 IC₅₀ 如表 (四) 所示。

$$\text{Tyrosinase 抑制活性(\%)} = \{[(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)] / (A_1 - A_2)\} \times 100 \%$$

A₁：控制組 540 nm 之吸光值 A₂：空白組 540 nm 之吸光值

A₃：樣品 540 nm 之吸光值 A₄：扣色組 540 nm 之吸光值

Compound	酪胺酸酶活性抑制率%					IC ₅₀ (μg/ml)
	20.0 (μg/ml)	60.0 (μg/ml)	100.0 (μg/ml)	150.0 (μg/ml)	200.0 (μg/ml)	
1	ND	ND	3.57	15.91	27.27	322.28
2	ND	ND	ND	2.44	11.53	488.70
3	ND	3.25	16.23	33.60	36.36	209.16
4	ND	ND	8.60	18.18	26.62	274.18
5	ND	18.50	18.50	30.20	32.08	220.59
6	10.69	18.06	23.84	30.06	23.99	326.50
7	ND	7.37	13.58	22.69	25.43	311.39
8	0.29	13.87	15.46	18.06	19.22	397.42
9	5.44	14.61	32.27	40.77	46.48	194.08
10	28.15	35.72	42.50	47.14	53.52	167.57
11	4.12	15.67	24.17	30.01	43.43	232.49
12	30.01	45.55	67.33	82.47	83.80	71.70
13	8.28	24.01	32.75	41.03	41.03	205.23
14	ND	4.55	11.54	15.27	27.27	337.59
15	13.87	17.60	23.54	30.77	42.42	257.12
16	18.65	33.45	41.61	42.31	44.41	187.84
17	3.64	29.70	54.67	61.36	72.47	119.82
18	6.29	24.29	35.79	58.01	64.50	141.82
19	4.62	34.81	52.11	63.32	69.42	119.25
20	7.61	45.65	67.21	78.80	89.86	89.78
21	0.74	21.45	30.70	37.24	49.57	189.12
22	ND	13.07	23.43	34.28	46.36	208.15
23	ND	3.95	19.24	30.09	43.77	219.80
24	24.91	62.89	85.70	94.82	95.81	57.26

25	10.01	23.76	28.83	34.38	29.19	258.37
26	12.91	27.38	31.00	34.38	31.85	256.61
27	ND	9.29	15.56	35.83	33.05	231.00
28	29.31	14.35	29.67	34.38	39.20	215.12
29	2.97	11.40	20.90	29.69	36.22	263.00
30	3.56	10.69	24.35	32.90	33.85	252.38
31	11.05	17.10	24.58	31.95	31.59	305.66
32	10.45	19.48	22.21	28.27	35.39	307.68
33	23.36	45.19	55.71	64.83	72.14	97.93
34	2.95	32.86	45.06	55.71	68.93	130.28
35	23.88	56.61	78.18	89.73	97.56	62.41
36	16.82	44.80	64.06	76.38	78.05	90.40
37	7.98	35.95	69.20	97.30	97.67	85.82
38	0.37	36.69	70.31	106.13	126.63	81.11
39	ND	22.33	46.63	67.12	76.07	123.10
40	13.87	55.71	78.90	93.62	99.63	71.03
Vit.C	17.26	35.72	50.20	67.33	77.29	107.26
Kojic acid	17.53	51.53	69.72	81.94	83.53	80.11

表(四)多酚醯胺化合物抑制酪胺酸酶活性能力測試

註：ND:表示效果不顯著

四、結果與討論：

實驗結果發現 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物體外抗自由基能力與羥基取代數量及位置有關，當酸基之苯環上只有單羥基取代時，不管羥基所在位置其抗氧化能力皆不佳，但苯胺基上羥基在與胺基為鄰位及對位取代(1~12)時其抗氧化力明顯優於間位及無羥基取代之醯胺化合物。

當酸基之苯環上有兩個羥基取代且互為間位(13~16, 29~32)時，其抗氧化能力雖然較單取代時強，但與 Trolox 有明顯差距，另外化合物 21~24 也互為間位但其也有不錯之抗氧化能力，其原因不明，推測如在 R₁ 位置單取代時較其他兩個位置具有較強效果，使用化合物 21~24 具有在酸基兩個鄰位位置取代使得其具有較強之抗氧化能力；而苯胺基上羥基位置取代也與酸基苯環上單羥基取代有類似影響，但較不顯著。

若酸基之苯環上有兩個羥基取代且互為羥基互為鄰位或對位時(17~20, 29~32, 37~40)，具有良好之抗氧化能力，但苯胺基上羥基位置取代之影響就很小，其抗氧化能力可能是兩個羥基取代且互為羥基互為鄰位或對位時，可以較容易氧化為醌類(quinone)化合物。

當酸基之苯環上具有鄰位之三個羥基取代(33~36, R₂ & R₃ & R₄)時，具有最

強之抗氧化效果。

多酚醯胺化合物抑制過氧化氫活性評估，從結果顯示皆有良好抑制效果且明顯與羥基取代數量有關；當羧酸苯環上具有三羥基或二羥基取代之醯胺化合物普遍其抗氧化力較單羥基取代時($IC_{50} = 0.18\sim 17.02$ g/ml)比 Trlox($IC_{50} = 12.06$ g/ml)之抑制過氧化氫活性能力強，但也有少許例外，如(25 之 $IC_{50} = 53.96$ g/ml、28 之 $IC_{50} = 45.77$ g/ml 及 33 之 $IC_{50} = 30.56$ g/ml)；其原因尚不清楚，可能是在測試本試驗時，樣品必須配置成水溶液，但由於本研究中所合成之多酚醯胺化合物雖屬高極性物質但不溶於水，使得配置樣品水溶液時無法完全相溶，而呈現懸浮液狀態，可能大大影響其抑制效果，尤其是極性較低之單羥基取代之化合物(1~12)顯示其抑制能力有減弱。但測試結果仍然具有良好之抑制過氧化氫能力，值得改用其他測試方法以探討其對抑制過氧化氫活性之確實效果。

美白活性測試：抑制酪胺酸酶活性評估結果，以咖啡酸、沒食子酸及 2,4-二羥基苯甲酸之醯胺衍生物效果最為顯著($IC_{50} = 62.41\sim 130.28$ g/ml)，但也有少許之化合物顯示出明顯抑制酪胺酸酶活性能力，如(12 之 $IC_{50} = 71.70$ g/ml、24 之 $IC_{50} = 57.26$ g/ml 及 33 之 $IC_{50} = 97.93$ g/ml)也出現強之抑制酪胺酸酶活性能力，與對照組維生素 C($IC_{50} = 107.26$ g/ml)及麴酸($IC_{50} = 80.11$ g/ml)之抑制酪胺酸酶活性能力比較不相上下，但其他測試樣品對抑制酪胺酸酶活性能力就沒有明顯之效果，原因尚需進一步做測試印證。

結論

由實驗結果得知我們合成之多酚醯胺化合物具有下列幾項特性：

- (一) 起使物製備容易、為高極性且化性穩定不受 pH 值影響的物質，添加於化粧品中適用性廣。
- (二) 多酚醯胺化合物具有清除 DPPH 自由基的能力，影響因素歸納如下：
 1. 多酚醯胺化合物清除自由基能力與羧酸苯環上之羥基取代數量有關，數量越多其抗氧化能力越強。
 2. 多酚醯胺化合物之羧酸苯環上多羥基取代時，其清除 DPPH 自由基的能力與羥基取代位置有關，當多羥基取代彼此互為互為鄰位或是對位較間位時具有較強之抗氧化能力，其因素推測是多羥基取代彼此互為互為鄰位容易進一步與 DPPH 反應後形成穩定之 quinone 結構。
 3. 當多酚醯胺化合物為單羥基取代或二羥基互為間位位置取代時其清除自由基能力下降，但胺基苯環羥基取代顯示較強之影響，無羥基取代時其抗氧化能力最弱；羥基(R'1 或 R'3)與胺基互為鄰位或是對位較間位(R'2)時具有較強之清除自由基

能力；另外，當羥基在 R'3 位置時其能力又較 R'3 時稍強，其原因可能是立體因素影響。

- (三) 多酚醯胺化合物抑制過氧化氫活性評估結果，皆有良好的抑制效果，明顯與羥基取代數量有關；當羧酸苯環上具有三羥基或二羥基取代之醯胺化合物普遍其抗氧化力較單羥基取代時($IC_{50} = 0.18\sim 17.02$ g/ml)比 Trlox($IC_{50} = 12.06$ g/ml)之抑制過氧化氫活性能力強，但也有少許例外如(25 之 $IC_{50} = 53.96$ g/ml、28 之 $IC_{50} = 45.77$ g/ml 及 33 之 $IC_{50} = 30.56$ g/ml)。
- (四) 美白活性測試：抑制酪胺酸酶活性評估結果，以咖啡酸、沒食子酸及 2,4 二羥基苯甲酸之醯胺衍生物效果最為顯著($IC_{50} = 62.41\sim 130.28$ g/ml)，但也有少許之化合物顯示出明顯抑制酪胺酸酶活性能力，如(12 之 $IC_{50} = 71.70$ g/ml、24 之 $IC_{50} = 57.26$ g/ml 及 33 之 $IC_{50} = 97.93$ g/ml)也出現強之抑制酪胺酸酶活性能力。

總結歸納多羥基醯胺化合物以 20、24、35、37、38 及 40 同時具有清除 DPPH 自由基、抑制過氧化氫及抑制酪胺酸酶活性之極強能力，值得進一步探討其應用於抗老化兼具美白化粧品之有效成分。

實驗部分

一、合成 *N*-(羥基苯)-多羥基苯醯胺化合物一般步驟：取 5 mmol 的 Oxybenzoic acid 於圓底瓶中，加入 6 mmol 的 *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)及 20 毫升之無水四氫呋喃(THF)，於 0 °C 中反應半小時，再加入 5 mmol 的 aminophenol 之 10 毫升 THF 溶液，回至室溫繼續反應隔夜，以 YLC 檢測反應，待反應完成後，減壓濃縮機抽去 THF 溶劑，加入 30 毫升蒸餾水，以乙酸乙酯萃取(4 x 20 ml)，合併有機層以飽和食鹽水洗，之後用無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，再經矽膠管柱以乙酸乙酯及正己烷(30~70%)為沖提液分離，分別利用 1H 及 ^{13}C NMR 測試鑑定其結構。

N-(3'-羥基苯)-3,4-二羥基苯醯胺 *N*-(3'-hydroxyphenyl)-3,4-dihydroxy-benzamide 31：橘色固體， 1H NMR(200 MHz, MeOH- d_4) δ 6.45(1 H, dd, $J = 2, 2$ Hz), 6.57(1H, dd, $J = 8, 1$ Hz), 6.78(2 H, d, $J = 2$ Hz), 7.01~7.17(2 H, m), 7.25(1H, dd, $J = 2, 2$ Hz); ^{13}C NMR(50 MHz, MeOH- d_4), 106.76(d), 107.00(2C, d), 109.40(d), 112.57(d), 113.41(d), 130.45(d), 138.56(s), 140.82(s), 158.79(s), 159.83(2C, s), 169.20(s).

二、體外抑制酪胺酸酶之測試：其詳細步驟如下：

取 20 μ l 不同濃度(1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 30.0 μ g/ml)之合成的醯胺化衍生物乙醇溶液，分別加入 96 well 中，每 well 添加 180 μ l 之 DPPH 溶液，每次處理三重複，混合均勻，避光靜置 30 分鐘後，以 ELISA reader 測

其 540 nm 之吸光值，並求出清除率(百分比)，再分別計算出 IC₅₀ 值。空白對照組不加待測物，直接以 20μl 之乙醇代替，此實驗以 Trolox 為正相對照，比較其補捉 DPPH free radical 之差異。DPPH 自由基清除能力之計算方法如公式(1)所示。IC₅₀ 之計算方法：由公式(1)求出不同濃度之清除率，再以 EXCEL 2003 軟體之 TREND 函數進行運算後所得。

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. 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 Biophy. Research Commun.* **1998**, 243, 801.
3. R. Kohen, *Biomed & Pharmacother*, **1999**, 53, 181-192.
4. I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*; **1995**, 64, 97-112.
5. 林小菁；”(多羥基苯亞甲基)-(羥基苯)胺化合物抗氧化之研究”，嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所碩士論文，2005，7 月。蔡哲秀，”原兒茶酸及咖啡酸衍生物之合成及在化粧品之應用”，嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所碩士論文，2006，7 月。
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. T. Z. Liu, M. L. Cheng, C. H. Tsai, D. T. Y. Chiu; “Chemiluminescent evidence that the autoxidation of epinephrine at an elevated pH generate superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical”, *J Biomed Lab Sci* **2000**, 12, 79-82,.
9. G. A. Reichard, C. L. Skutches, R. D. Hoeldtke, O. E. Owen , “Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis”, *Diabetes* **1986**, 35, 668-674,.
10. S. H. Lee, S. Y. Chio, H. Kim, J. S. Hwang, B. G. Lee, J. J. Gao and S. Y. Kim, “Mulberroside F Isolated from the Leaves of *Morus alba* Inhibits Melanin Biosynthesis” *Biol. Pharm. Bull* **2002**, 25(8), 1045-1048.