

## N,N'-Diferuloyl-putrescine (DFP)과 그 유도체의 합성 및 항산화 활성

황준필 · 하지훈 · 김명규\* · 박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 에너지바이오대학 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, \*(주)삼경코스텍  
(2014년 8월 13일 접수, 2014년 9월 18일 심사, 2014년 11월 24일 채택)

### Synthesis and Antioxidative Activities of N,N'-Diferuloyl-putrescine (DFP) and Its Derivatives

Jun Pil Hwang, Ji Hoon Ha, Myung Kyoo Kim\*, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

\*Samkyung Costech Co., Ltd.

(Received August 13, 2014; Revised September 18, 2014; Accepted November 24, 2014)

#### 초 록

N,N'-diferuloyl-putrescine (DFP)은 회화나무 잎 등 식물계에 함유되어 있는 화합물로 피부 미백활성 및 항산화 활성 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 식물계에서 미량 존재하는 DFP를 기능성 화장품 원료로 사용할 목적으로 다량 확보하고자 DFP 및 그 유도체(DFP-D)를 합성하였다. 합성한 DFP 및 DFP-D에 대한 항산화 활성을 DPPH법, 루미놀 발광법을 통하여 확인하였으며, 추가적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>에 대한 세포보호 효과를 평가하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 DFP가 61.25 ± 2.25 μM, DFP-D는 12.92 ± 0.72 μM을 나타냈으며, 루미놀 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)에서 DFP와 DFP-D는 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid보다 각각 2배(1.84 ± 0.12 μM) 및 13배(0.174 ± 0.01 μM) 더 큰 총항산화능을 나타내었다. 피부 광노화에 있어서 핵심 역할을 하는 활성산소인 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 세포 손상에 있어서 50 μM의 DFP-D의 세포 보호능(τ<sub>50</sub> = 80.2 min)은 (+)-α-tocopherol (τ<sub>50</sub> = 43.6 min)보다 약 2배 정도 더 우수한 세포보호 효과를 나타내었다. 이상의 결과들을 통해 합성된 DFP 및 유도체 DFP-D의 강력한 항산화 활성은 기능성 화장품 원료로 사용하여 화장품 산업에 응용 가능성이 있음을 시사한다.

#### Abstract

N,N'-Diferuloyl-putrescine (DFP) present in plants such as *Sophora japonica* has been reported to have skin depigmentative and antioxidative activities. In this study, DFP, usually presents in nature a very little amount and its derivative (DFP-D) were synthesized in a large quantity for the use as functional cosmetic materials. The antioxidative activities of synthesized DFP and DFP-D were evaluated by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay, chemiluminescence assay, and cell protective effect induced by <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, stress. DFP and DFP-D showed DPPH radical scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) at 61.25 ± 2.25 μM and 12.92 ± 0.72 μM, respectively. ROS (reactive oxygen species) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) in the Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system of DFP and DFP-D were 2 times (1.84 ± 0.12 μM) and 13 times (0.174 ± 0.01 μM), respectively higher than that of L-ascorbic acid. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, one of ROS playing a key role in the skin photo-aging, induces cellular membrane damages. DFP-D (50 μM) showed good cell protective effects (τ<sub>50</sub> = 80.2 min) about 2 times more than that of (+)-α-tocopherol (τ<sub>50</sub> = 43.6 min). These results suggest that the great antioxidative activities of DFP and DFP-D could be applied to cosmetic industries as functional cosmetic materials.

**Keywords:** *Sophora japonica*, N,N'-Diferuloyl-putrescine, Antioxidants, synthesis

## 1. 서 론

최근 항노화 연구 분야 중에서 피부 노화 연구가 활발히 진행되고

있다. 피부 노화에서 가장 중요한 요인은 자외선에 의한 광노화이다 [1]. 피부가 자외선에 노출되면 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 이들 ROS는 피부의 광산화적 손상을 일으켜 피부노화를 가속화시킨다. ROS는 산화력이 큰 활성산소로 superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hydroxy radical (·OH), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 그리고 이들이 생체 분자들과 반응하여 생성된 peroxy radical (ROO·) 및 alkoxy radical (RO·) 등을 말한다[2-4]. ROS는 반응성이 매우 커서 세포막을 손상시켜서 세포를 파괴할 뿐만 아니라 지질, 단백질 및 DNA와 같은 생체 구성 성

<sup>†</sup> Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology, Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, College of Energy and Biotechnology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea  
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

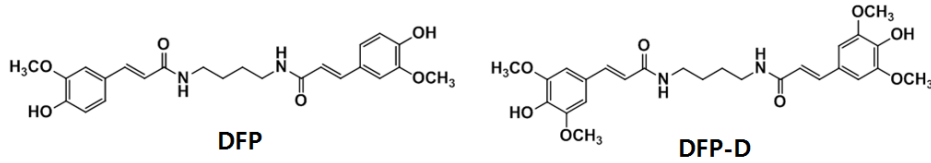
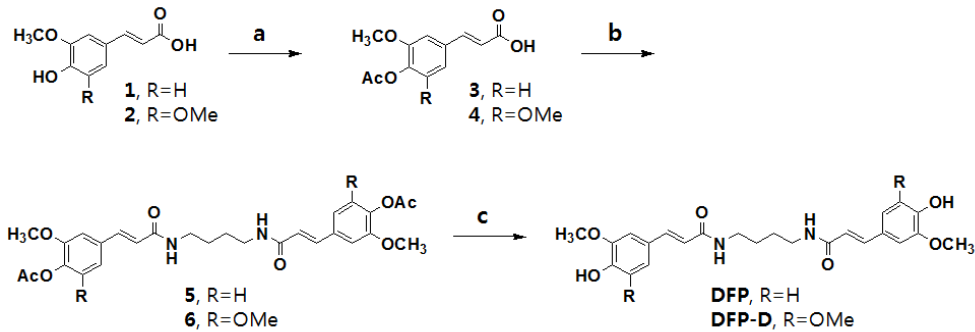


Figure 1. Structures of DFP and DFP-D.



Scheme 1. Reagents and conditions : (a) acetic anhydride, pyridine; (b) 1,4-diaminobutane, MC; (c) KOH, MeOH-THF.

분들의 산화적 손상을 일으킨다. 또한 피부 진피층의 매트릭스 구성 성분들인 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 등에 대한 직접적인 결합조직의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합이나 matrix-metalloproteinase (MMP)의 발현을 유도하여 콜라겐 및 엘라스틴 섬유를 분해시켜서 궁극적으로 피부 주름을 생성시키고 피부노화를 가속화시킨다[5-8]. 또한 ROS는 피부에서 멜라닌 세포를 활성화시켜서 멜라노사이트의 증식과 멜라닌 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[9,10]. 따라서 ROS의 산화적 스트레스로부터 피부를 보호하고 피부노화를 억제하기 위해서 피부 항산화 방어망 구축을 위한 새로운 항산화제 개발이 화장품 분야에서 절실히 요구되고 있는 실정이다[11-13]. 본 연구에 앞서 저자들은 사람 세포를 대상으로 활성산소로 유도된 세포손상에 있어서 골몰 성분인 dehydroeffusol이 ROS에 대한 세포보호능과 항산화 활성이 매우 큼을 확인하고 그 항산화 메커니즘을 밝혀 보고한 바도 있다[14-16].

천연 소재 및 그 유도체의 합성을 통하여 기능성 화장품 원료개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 율굴나무 등 천연에 존재하는 알부틴은 기능성 화장품 미백원료로 개발된 이후 현재 합성에 의해 대량 생산되어 기능성 미백소재로 널리 사용되고 있다. 또한 코직산 및 그 유도체가 합성되어 이들에 대한 tyrosinase 저해활성, 미백활성 및 항산화 활성 등이 보고된 바 있으며[17,18] 기타 trolox 부분을 갖는 코직산 유도체 및 소수성기를 갖는 하이드록시 카복사마이드 유도체의 미백활성에 대한 연구들이 보고되고 있다[19,20].

본 연구에서는, 회화나무 등 천연에 미량 존재하는 N,N'-diferuloyl-putrescine (DFP)가 미백 활성 및 항산화능이 있는 것으로 보고되고 있으며 유사한 구조를 갖는 dimeric cinnamoylamide 유도체들의 미백활성에 대한 평가 또한 보고되었다[21]. DFP 및 그 유도체(DFP-D, (3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-N-[4-(3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)acryloyl)butyl]-acrylamide)를 합성하였고 이들의 활성(항산화 활성, 미백활성 및 항노화 활성)을 측정하여 기능성 화장품 원료로서 이용 가능성이 있는지 알아보고자 하였다. 우선 합성된 DFP 및 그 유도체가 항산화 활성 및 활성산소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 활성이 매우 우수한 것으로 밝혀져 이를 보고하고자 한다

(Figure 1).

## 2. 실험 장치 및 실험방법

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible 분광기는 Varian (Australia)사의 Cary 50, Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였다. 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, 핵자기공명분광기는 Varian Inc. (USA)의 400MHz NMR System을 사용하였다.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 루미놀, 헤파린, rose-bengal, 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을 사용하였다. 완충 용액 제조에 사용된 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, NaCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), 아세토나이트릴 및 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 등의 용매와 합성에 사용한 시약인 ferulic acid, 1,4-diaminobutane 및 N,N-diisopropylethylamine 등은 시판 특급을 이용하였다.

### 2.2. N,N'-diferuloyl-putrescine (DFP)와 DFP-D의 합성방법

DFP와 DFP-D에 대한 합성 개요를 Scheme 1에 나타내었다.

DFP의 합성은 시작물질인 ferulic acid **1**을 pyridine에 녹인 후 무수아세트산을 첨가하여 3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)acrylic acid **3**을 합성하였다. Methylene chloride에 용해시킨 1,4-diaminobutane과 화합물 **3**을 반응시켜 화합물 **5**를 얻었다. 이어서 화합물 **5**를 가수분해하여 DFP를 얻었다(Scheme 1).

Scheme 1에서와 같이 DFP-D는 시작물질인 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)acrylic acid **2**를 pyridine에 녹인 후 무수아세트산을 첨가하여 3-(4-acetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)acrylic acid **4**를 합성하였다. 화합물 **4**와 1,4-diaminobutane을 반응시켜 화합물 **6**를 합성한 후 이를 가수분해하여 DFP-D를 얻었다(Scheme 1).

Ferulic acid **1** (5 g, 25.75 mmol) 또는 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)acrylic acid **2** (5 g, 29.60 mmol)를 pyridine 20 mL에 녹인 후

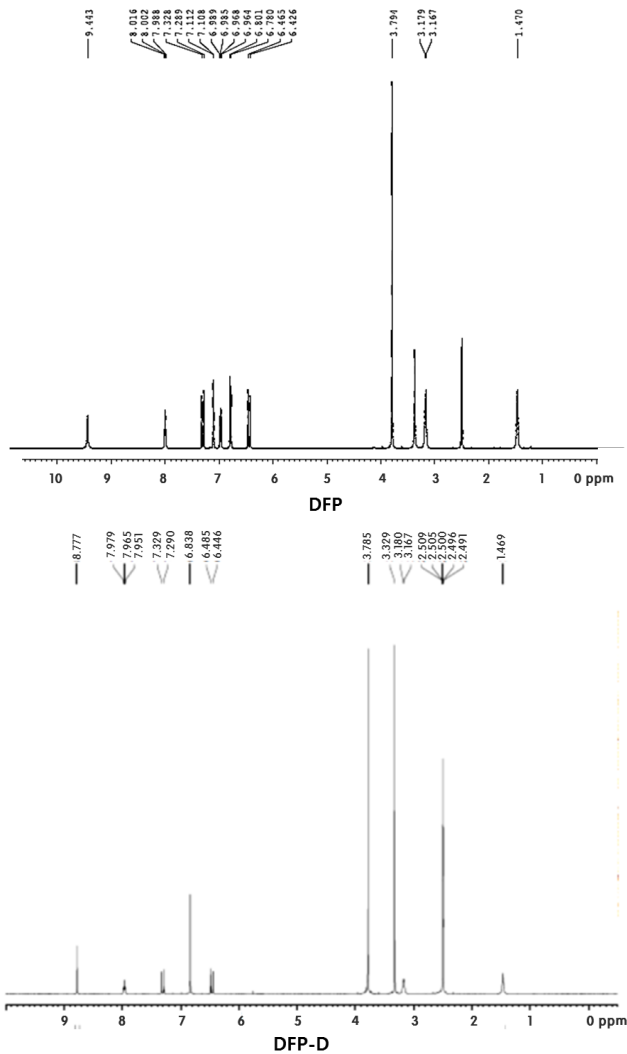


Figure 2. Nuclear magnetic resonance spectroscopy data of DFP and DFP-D.

무수아세트산(9.7 mL, 103 mmol)을 첨가 한 후 실온에서 12 h 동안 교반하였다. 이후 1 N HCl 200 mL를 넣은 후 50 mL의 에틸아세테이트로 추출·감압농축하여 화합물 3 또는 4를 얻었다. 화합물 3 또는 4 (21.17 mmol), N-(3- dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (4.87 g, 25.40 mmol)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 mL에 녹인 후 0 °C에서 1,4-diaminobutane (932 mg, 10.58 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액 10 mL를 첨가하였다. 이어서 N,N- diisopropylethylamine (8.8 ml, 50.8 mmol) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액 10 mL를 첨가한 후 실온에서 12 h 동안 교반하면서 반응시켰다. 증류수 50 mL, 1 N HCl 50 mL, 증류수 50 mL, 10% NaHCO<sub>3</sub> 50 mL의 순서로 분획한 다음 얻어진 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 수분을 제거한 후 감압·농축하여 화합물 5 또는 6을 얻었고, 이것을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>와 *n*-헥산으로 재결정하여 최종 물질로 DFP와 DFP-D를 얻었다.

### 2.3. DFP 및 유도체(DFP-D)의 항산화 효과 측정

#### 2.3.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

메탄올에 용해된 0.2 mM DPPH 용액, 에탄올, 실험물질을 혼합한 후 실온에서 10 min 동안 반응시켰다. 반응시간이 지난 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료

를 넣지 않고 10 min 후에 흡광도를 측정하여 라디칼 소거가 이루어지지 않았을 때의 값을 측정하였다. 공시험(blank)으로 DPPH를 용매로 대체한 후 흡광도를 측정하여 517 nm에서 시료와 용매의 영향을 보정해주었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>, μM)로서 표기하였다. 자유라디칼(DPPH) 소거 활성을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[ \frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100 \quad (1)$$

#### 2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

증류수, 시료, 25 mM EDTA, 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 및 35 mM 루미놀을 화학발광 측정용 튜브에 넣고 5 min 동안 상온에서 유지시킨 후 Fenton 반응 개시제로서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 mM)를 넣고 화학발광기를 이용해 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 제외하고 해당 용매로 대체하였다. 공시험(blank)은 ROS를 생성시키는 주요 물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 제외하고 나머지는 실험군과 동일한 조건으로 진행하였다. 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, μg/mL)로서 표기하였다. 활성산소 저해율(%)은 다음 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100 \quad (2)$$

### 2.4. 광용혈법을 이용한 세포보호 효과 측정

#### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

건강한 성인 남녀로부터 채혈한 후 헤파린이 첨가된 시험관에 넣었다. 적혈구와 혈장은 원심분리를 통하여 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 9.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.6 mM)로 세척하였다. 분리한 적혈구는 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 24 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 투과도를 측정하였으며, 적혈구 수는 약 1.5 × 10<sup>7</sup> cells/mL이었다.

#### 2.4.2. DFP와 그 유도체의 광용혈 억제 효과

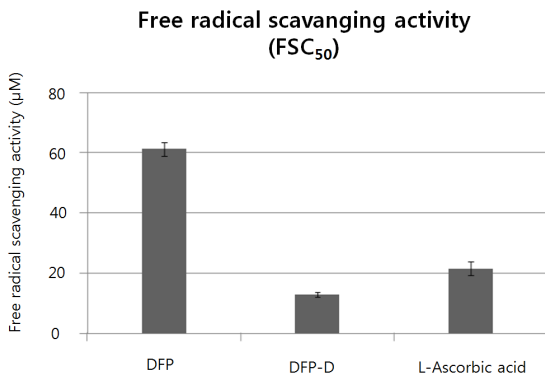
적혈구 현탁액에 시료를 첨가한 후 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시켰다. 광증감제인 rose-bengal (12 μM)을 가하고 15 min 동안 광조사하여 광증감 반응을 일으켰다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 상자 안에 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 15 min 동안 광조사하였다. 광조사가 끝난 후 15 min 간격으로 700 nm에서 투과도(transmittance, %)를 측정하여 암반응(post-incubation)에 의한 적혈구의 파괴정도를 확인하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투과도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 상온에서 진행하였다. DFP와 그 유도체의 세포보호 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ<sub>50</sub>을 구하여 비교하였다.

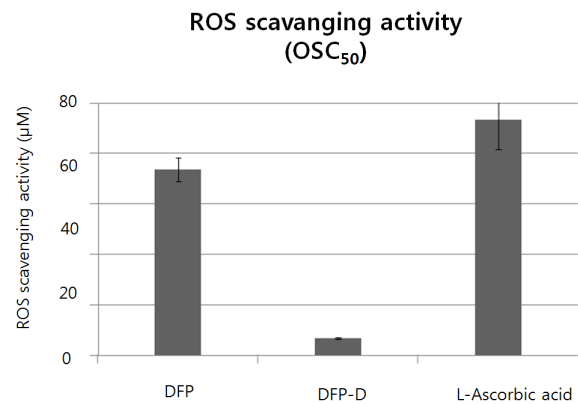
**Table 1. Cellular Protective Effects of DFP, DFP-D and (+)- $\alpha$ -Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes (Control = 30.0  $\pm$  1.0 min)**

Concentration ( $\mu$ M)	$\tau_{50}$ (half time of hemolysis <sup>1)</sup> )			
	5	10	25	50
DFP	36.0 $\pm$ 3.1	51.7 $\pm$ 8.6	55.5 $\pm$ 5.9	67.9 $\pm$ 11.1
DFP-D	53.0 $\pm$ 2.1	57.5 $\pm$ 0.6	67.1 $\pm$ 5.5	80.2 $\pm$ 3.3
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	35.4 $\pm$ 2.1	37.0 $\pm$ 2.1	40.2 $\pm$ 0.5	43.6 $\pm$ 0.9

<sup>1)</sup> Control,  $\tau_{50}$  = 30.0  $\pm$  1.0 min



**Figure 3. Free radical scavenging activity of DFP, DFP-D and reference.**



**Figure 4. Reactive oxygen species scavenging activity of DFP and DFP-D in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.**

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. DFP와 DFP-D의 합성

##### 3.1.1 DFP, N,N'-diferuloyl-putrescine의 합성

DFP는 위의 합성 방법(2.2)을 통하여 70%의 수율로 얻었다. DFP의 분광학적 자료는 다음과 같다. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.47 (4 H, s), 3.18 (4 H, d, J = 4.8), 3.79 (6 H, s), 6.47 (2 H, d, J = 1.60), 6.80 (2 H, d, J = 8.4), 6.99 (2 H, t, J = 2.0), 7.12 (1 H, d, J = 2.0), 7.34 (2 H, d, J = 18.4), 8.01 (2 H, t, J = 5.6), 9.45 (2 H, s). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO) : 165.8, 148.7, 139.3, 126.9, 121.3, 119.5, 116.1, 111.1 55.9, 38.8, 27.3 (Figure 2).

##### 3.1.2. DFP-D, 3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)-N-{4-[3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)-acryloylamino]-butyl}-acrylamide의 합성

DFP-D는 위의 합성 방법을 통하여 74%의 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.47 (4 H, s), 3.32 (4 H, s), 3.79 (6 H, s), 6.49 (2 H, d, J = 3.6), 6.84 (2 H, s), 7.33 (2 H, d, J = 15.6), 7.78 (2 H, t, J = 5.6), 8.78 (2 H, s). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO) : 165.6, 149.2, 139.3, 127.4, 120.3, 117.5, 114.1, 111.4 56.0, 38.8, 27.3 (Figure 2).

#### 3.2. DFP와 DFP 유도체의 항산화 활성

##### 3.2.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

자유라디칼은 비공유 전자를 갖는 반응성이 높은 화학종이다. 피부에서 생성되는 ROS에는 hydroxyl radical ( $\cdot$ OH)과 같은 라디칼종이 포함되어 있다. 이렇게 생성된 라디칼은 높은 반응성으로 인해 피부의 여러 구성 물질과 반응함으로 조직 손상을 야기한다. (+)- $\alpha$

-Tocopherol과 같은 항산화제는 피부에 존재하면서 지질과산화 반응과 같이 산소 유래 라디칼이 일으키는 여러 가지 손상 반응으로부터 조직을 보호한다. 이러한 항산화 물질들은 라디칼에 수소 주개로 작용하여 산화 반응을 방지하고 라디칼로 야기된 지질과산화 연쇄반응을 종결시킨다. 따라서 항산화제의 환원력이 클수록 세포막 보호 효과가 커진다. 라디칼을 환원시키는 항산화제의 능력은 DPPH를 이용해 알아볼 수 있다. DPPH는 상대적으로 안정한 자유라디칼이기 때문에 실험에 많이 응용되는 산화제이다.

DPPH 소거 반응을 이용하여 DFP와 DFP-D에 대한 자유라디칼의 소거 활성을 측정하였다. DFP와 DFP-D의 라디칼 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 각각 61.25  $\pm$  2.25  $\mu$ M 및 12.92  $\pm$  2.25  $\mu$ M로 두 화합물 모두 라디칼을 소거하는 능력이 있음을 보여주었다. 특히, DFP-D는 비교물질인 L-ascorbic acid보다 더 큰 라디칼 소거능을 나타냈으며 DFP보다도 큰 항산화능을 보여주었다(Figure 3).

##### 3.2.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성 산소 소거 활성(총항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서는 Fe과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 Fenton 반응이 일어난다. Fenton 반응에서는 대부분의 ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>,  $\cdot$ OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성된다. 또한 O<sub>2</sub><sup>-</sup>은 생체 내에서 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 상호 전환이 가능한 것으로 알려져 있다. 피부에서 일어나는 이와 같은 Fenton 반응은 세포 및 조직 손상을 야기하는 활성산소 생성의 또 다른 원인이기 때문에 활성산소의 생성 억제 및 제거시키는 항산화제의 개발을 위해서, Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서의 항산화능 측정은 큰 의미를 갖는다. 본 실험에서는 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 생성된 ROS에 의해 루미놀이 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된다. 아미노프탈산은 다시 바닥상태로 떨어

지면서 발광(420~450 nm)하는 원리를 이용하여 계에서 생성된 활성 산소종들에 대한 항산화제의 소거작용은 총항산화능으로 나타낼 수 있다.

DFP와 DFP-D의 활성산소 소거능(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 각각 1.84 ± 0.12 μM, 및 0.17 ± 0.01 μM으로 나타났다. DFP와 DFP-D 모두 비교물질인 L-ascorbic acid보다도 훨씬 더 큰 항산화능을 나타냈다. DFP-D는 DFP보다도 10배 이상의 활성산소 소거율을 나타내었다 (Figure 4).

### 3.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

활성산소에 의한 세포손상 모델로 사람 적혈구와 광증감 반응을 사용하였다. 피부에 존재하는 여러 가지 광증감제에 자외선이 조사되면 광증감 반응이 일어나며 빠르게 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>과 ROS를 생성한다. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>은 반응성이 매우 큰 ROS로서 세포 막 구성성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 연쇄반응을 개시시킨다. 이렇게 개시된 연쇄 반응은 세포를 파괴시켜 피부의 노화를 촉진시킨다. 이외에도 다양한 ROS가 부가적으로 생성되면서 세포의 형태를 유지시켜주는 단백질을 산화하면서 세포 용해를 유도한다. 따라서 해당 실험을 통해 활성산소에 의한 지질 과산화반응, 단백질 산화 그리고 항산화제의 파괴 및 세포의 파괴 등을 알아볼 수 있다. 상기 실험에서와 같이 매우 큰 항산화능을 보여준 DFP 및 DFP-D에 대하여 활성산소(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)로 유도된 세포손상 및 파괴에 있어서 세포보호 효과를 측정하였다. 비교군으로는 대표적인 지용성 항산화제로 주로 세포막에 존재하는 항산화제인 (+)-α-tocopherol을 사용하였다. 세포 보호능은 실험에 사용한 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)으로 표시하였다. 이 값은 시료의 세포 보호능이 클수록 크게 나타난다. 시료 대신 용매만 넣어준 대조군은 τ<sub>50</sub>이 30 ± 1 min으로 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다.

DFP와 DFP-D의 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과에 대한 실험 결과를 Table 1에 나타내었다. DFP의 경우, τ<sub>50</sub>이 5, 10, 25, 50 μM의 농도에서 각각 36.0, 51.7, 55.5, 67.9 min으로 농도 의존적으로 세포보호 효과가 증가하였다. 반면에 DFP-D의 경우 53.0, 57.5, 67.1, 80.2 min으로 매우 큰 세포 보호능을 나타냈다. 비교 물질인 (+)-α-tocopherol의 경우 35.4, 37.0, 40.2, 43.6 min의 결과를 보여주었다. DFP와 DFP-D는 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol보다 높은 세포보호 효과를 나타내었다. 결과적으로, DFP와 DFP-D는 모든 농도에서 세포 손상을 막는 주요 항산화제인 (+)-α-tocopherol보다 우수한 세포 보호능을 보여주었으며, 활성산소에 대항하는 세포 보호제로서의 응용가능성이 있음을 확인하였다.

## 4. 결 론

본 연구를 통하여 저자들은 항산화 능력이 있는 두 가지 화합물을 합성하였고 그들의 항산화능을 평가하였다.

1) N,N'-diferuloyl-putrescine (DFP)와 그 유도체(DFP-D, 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)-N-[4-[3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)-acryloylamino]-butyl]-acrylamide)를 각각 70%와 74%의 수율로 합성하였다.

2) DPPH 라디칼 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 DFP가 61.25 ± 2.25 μM, DFP-D는 12.92 ± 0.72 μM을 나타냈으며, 두 화합물 모두 큰 라디칼 소거능을 나타내었다. 특히, DFP-D는 비교물질인 L-ascorbic acid보다

더 큰 라디칼 소거능을 나타냈으며 DFP 보다도 큰 항산화능을 보여주었다.

3) 루미놀 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 DFP가 1.84 ± 0.12 μM, DFP-D는 0.174 ± 0.01 μM을 보여주었다. DFP 및 DFP-D는 총항산화능에서 대조군인 L-ascorbic acid보다 각각 2배 및 13배 더 큰 총항산화능을 나타내었다.

4) 피부 광노화에 있어서 핵심 역할을 하는 활성산소인 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 세포 손상에 있어서 50 μM의 DFP-D의 세포 보호능(τ<sub>50</sub> = 80.2 min)은 지용성 항산화제로 알려진 (+)-α-tocopherol (τ<sub>50</sub> = 43.6 min)보다 약 2배 더 큰 세포 보호능을 나타내었다.

이상의 결과들은 합성 DFP 및 그 유도체인 DFP-D의 항산화 활성은 기능성 화장품 원료로 화장품에 응용 가능성이 있음을 시사한다. 앞으로 이 화합물들에 대해 피부 광노화 억제 및 미백활성관련 연구를 더 진행하여 기능성화장품 원료로 개발하기 위한 연구가 필요하다고 사료된다.

## 감 사

본 연구는 중소기업청의 기술혁신개발과제의 연구비에 의하여 수행된 논문으로 이에 감사드립니다(과제 고유번호 : S2048552).

## References

1. D. S. Lee, M. S. Lim, S. S. Kwan, S. Y. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract, *Appl. Chem. Eng.*, **23**(1), 93 (2012).
2. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
3. S. N. Park, Effect of natural products on skin cells: action and suppression of reactive oxygen species, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **25**(2), 77 (1999).
4. J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
5. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph.D. Thesis, Seoul National University (1989).
6. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases : role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**, 324 (2007).
7. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**, 129 (1995).
8. S. B. Berman and T. G. Hastings, Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species, *J. Neurochem.*, **69**(3), 1185 (1997).
9. M. Iwata, T. Corn, S. Iwata, M. A. Everrett, and B. B. Fuller, The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 9 (1990).
10. K. Kameyama, T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, and S. Nishi-yama, Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J.*

- Invest. Dermatol.*, **100**, 126 (1993).
11. H. R. Andersen, J. B. Nielsen, F. Nielsen, and P. Grandjean, Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, *Clinical Chemistry*, **43**(4), 562 (1997).
  12. M. Bilicia, H. Efe, M. A. Koroglu, H. A. Uydu, M. Bekaroglu, and O. Deger, Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments, *J. Affective Disorders*, **64**, 43 (2001).
  13. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *IJBCB*, **39**(1), 44 (2007).
  14. C. H. Choi, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. N. Park, Antioxidative effect of extracts from different parts of *Juncus effusus* L., *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(3), 275 (2012).
  15. S. N. Park, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. B. Han, Cellular protective effects of dehydroeffusol isolated from *Juncus effusus* L., and the mechanisms underlying these effects, *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 3046 (2014).
  16. N. R. Jo, S. A. Park, J. H. Ha, S. H. Jeon, and S. N. Park, Cellular protective effects and antioxidative activity of resveratrol, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(5), 483 (2013).
  17. J. C. Cho, H. S. Rho, Y. H. Joo, C. S. Lee, J. Lee, S. M. Ahn, J. E. Kim, S. S. Shin, Y. H. Park, K. D. Suh, and S. N. Park, Depigmenting activities of kojic acid derivatives without tyrosinase inhibitory activities., *BMCL*, **22**, 4159 (2012).
  18. H. S. Rho, C. S. Lee, S. M. Ahn, Y. D. Hong, S. S. Shin, Y. H. Park, and S. N. Park, Studies on tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of benzoic acid derivatives containing kojic acid moiety, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **32**(11), 4422 (2011).
  19. S. M. Ahn, H. S. Rho, H. S. Baek, Y. H. Joo, Y. D. Hong, S. S. Shin, Y. H. Park, and S. N. Park, Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis., *BMCL*, **21**, 7466 (2011).
  20. J. C. Cho, H. S. Rho, Y. H. Joo, S. M. Ahn, D. H. Won, S. S. Shin, Y. H. Park, K. D. Suh, and S. N. Park, The depigmenting activities of hydroxyl carboxamide derivatives containing hydrophobic moiety, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **33**(4), 1133 (2012).
  21. M. K. Kim, H. S. Youk, J. J. Yoo, S. M. Ahn, H. S. Rho, J. H. Ha, J. P. Hwang, and S. N. Park, Synthesis of dimeric cinnamoylamide derivatives an evaluation of their depigmenting activities, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **35**(10), 3085 (2014).