Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 19, No. 12 pp. 62-70, 2018

https://doi.org/10.5762/KAIS.2018.19.12.62
ISSN 1975-4701 / eISSN 2288-4688

올리고 펩타이드 유도체의 합성과 생리활성에 관한 연구

김보미
원광대학교 화학융합공학과

The study of oligopepetide synthesis and biological activity

Bo-Mi Kim
Division of Chemical Engineering, Wonkwang University

요 약 본 연구에서는 미백 개선 효과가 알려진 올리고 펩타이드(Lys-Val-Ala-Arg-Pro : KVARP)를 기본 구조로 하여 고체상 합성법(SPPS)으로 합성하였다. 합성된 올리고 펩타이드에 게란산(geranic acid), 리포익산(lippoic acid), 살리실산(salicylic acid)를 접합하여 올리고 펩타이드 유도체를 합성하였다. 미백개선 효과는 tyrosinase(티로시아나제) 저해실험으로 측정하였으며, Geranic-KVARP의 5000㎍/㎖에서 93%의 저해율로 가장 좋은 효과를 나타내었고, IC50 값은 68㎍/㎖로 측정되었다. 주름개선 효과는 elastase(엘라스타아제) 저해 실험으로 측정한 결과 Salicylic-KVARP의 400㎍/㎖에서 63%의 저해율을 보였으며, IC50값은 253㎍/㎖으로 확인되었다. DPPH법으로 실시한 항산화효과 측정실험에서는 Caffeic-KVARP가 최고 농도인 400㎍/㎖에서 95% 이상의 항산화효과를 보였으며 IC50값은 31㎍/㎖로 나타났다. Nitric Oxide 저해실험을 통한 항염효과를 측정한 결과 Lipoic-KVARP의 400㎍/㎖에서 67%의 저해율을 보였다. 다양한 실험결과로부터 합성된 KVARP유도체 4종은 새로운 의약품 및 화장품 소재로서의 이용할 가능성이 있으며, 산업적인 면에서 응용이 가능하다고 판단된다.

Abstract In this study, we synthesized Oligo Peptide (Lys-Val-Ala-Arg-Pro: KVARP) and peptide derivatives using Solid Phase Peptide Synthesis(SPPS). KVARP was commonly known to improve whitening of skin. We measured bio-activity of the synthesized compounds. The whitening effect was measured in tyrosinase inhibition and the result showed to be highly effective with 93% inhibition rate at 5000 ㎍/㎖ of Geranic‐KVARP, on the other hand the IC50 value was 68 ㎍/㎖. The wrinkle-reducing effect was measured by elastase inhibition at a concentration of 63% at 400 ㎍/㎖ of Salicylic-KVARP, and the IC50 value was 253 ㎍/㎖. In the DPPH assay, Caffeic-KVARP showed more than 95% antioxidant activity at 400 ㎍/㎖ with high concentration and IC50 value was 31 ㎍/㎖. The anti-inflammatory effect of Nitric Oxide inhibition was 67% at 400 ㎍/㎖ of Lipoic-KVARP. Therefore, the four types of KVARP derivative that were synthesized from various experiments has shown that it could have potential to be used to develop new medicines, cosmetics as well as in various industries.

Keywords : Peptide, Biological activity, Whitening, Cosmetic, SPPS

1. 서론

젊고 아름다운 모습을 그대로 오랫동안 간직하고 싶은 것은 인간의 욕망 중 하나이다. 최근 화장품 연구는 치유개념이 도입된 기능성 화장품 개발에 집중되어 있다고 할 수 있는데, 이러한 기능성 화장품을 한 단계 더 발전시켜 코스메슈티컬(cosmeceutical)이라 부르는 화장품 시장이 등장하였다.[1,2] 코스메슈티컬 이라는 신조어는 독일의 피부과학자 Kligman이 처음으로 제안한 단어로써, 화장품(cosmetic)과 약품(pharmaceutical)의 합성어로 약용화장품을 의미한다.[3,4]

우리나라의 화장품 법에서 제 2조 2항에서 규정하고

본 논문은 원광대학교 2017년도 교비지원 연구과제로 수행되었음
*Corresponding Author : Bo-Mi Kim(Wonkwang Univ.)
Tel: +82-63-850-7278 email: 123456@wonkwang.ac.kr
Received October 11, 2018 Revised November 20, 2018
Accepted December 7, 2018 Published December 31, 2018

있는 법적 의미의 기능성 화장품은 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 제품, 모발의 색상 변화·제거 또는 영양공급에 도움을 주는 제품과 피부나 모발의 기능약화로 인한 건조함·갈라짐·빠짐·각질화 등을 방지하거나 개선하는데 도움을 주는 제품 중 어느 하나에 해당되는 것으로 총리령으로 정하는 화장품을 말한다.[5]

미백 기능성 화장품은 자외선에 의한 기미, 주근깨 등을 완화시키고 멜라닌 색소의 생성을 억제하기 위한 목적으로 개발된 제품이다.[6,7] 현재, 국내에서 기능성 미백제로 식품의약품안전처에서 유효성과 안정성을 입증받은 성분은 닥나무 추출물, 알부틴, 코직산, 비타민C, 에칠아스코빌에텔, 유용성 감초추출물, 아스코빌글루코사이드, 마그네슘아스코빌포스페이트, 나이아신아마이드, 알파비사보롤, 아스코빌테트라이소팔미테이트가 있다. 그러나 이러한 입증 받은 기능성 미백제에도 단점이 존재한다.

먼저 알부틴은 하이드로퀴논에 당 분자가 붙은 형태로 티로시나아제의 활성을 저해하여 멜라닌 색소의 생성을 억제하지만 멜라닌 세포의 직접적인 괴사를 유도하지는 않아 비교적 안전한 물질로 판단되어 화장품에 사용이 가능하나 분자가 커서 피부 깊숙이 침투하기 힘든 구조를 가지고 있다.[10] 코직산은 일명 누룩산이라고도 하며 누룩이 발효될 때 생성되는 물질로 미백 원료 중에서 비교적 안정성이 높지만, 온도가 높거나 공기와 접촉할시 황색으로 변하게 된다. 비타민 C(ascorbic acid)는 가장 오래된 미백 원료로 강한 환원작용에 의해 미백 효과를 갖으나, 비타민 C 자체는 수용성이라 피부 흡수력이 떨어지며 안정성이 매우 나빠서 비타민 C에 지방을 결합하거나 인산마그네슘으로 만든 유도체가 사용된다. 또한 안정성이 향상된 유도체 역시 상당히 불안정한 물질이므로 주의가 필요하게 되는 원료이다.[8]

기존에 고시되어 있는 미백제를 사용하지만 앞서 말했듯이 일부 소재들은 피부 알레르기 반응, 일정농도 이상에서는 독성 반응을 보이기도 하며 안정성이 떨어진다는 점에 화장품 미백 소재로서 이용되는데 한계점이 있기에 최근에 새로운 기능성 화장품 소재로 제시된 물질이 펩타이드 원료이다.[9]

Peptide는 한 개 아미노산의 카르복시 그룹과 또 다른 아미노산의 아미드 말단이 축합하여 물 한 분자를 내어놓은 펩타이드 결합이라는 화학 결합 형태로 연결된 물질을 말한다. 펩타이드는 합성법의 발전으로 고순도로 대량 생산이 가능해졌으며, 분자생물학의 발전에 따른 정확한 생체내의 메커니즘이 밝혀짐에 따라 중요한 고기능성 원료로서 주목을 받기 시작하고 있다. 펩타이드 의약품은 저분자 유기 약물 보타 탁월한 몇 가지 장점이 있다. 펩타이드는 분해되면 아미노산이 되기 때문에 독성에 대한 위험을 줄일 수 있으며, 반감기가 짧기 때문에 체내 조직에서 축적 되지 않는다. 저점도 상태의 고농도로 용해가 가능하며, 높은 청징성(맑은 용액) 유지가 가능하다. 따라서 펩타이드의 단점은 줄이면서, 장점을 극대화 할 수 있는 방법들이 연구되고 있다.[16,17] 예를 들면 생체막을 구성하는 단백질에는 알라닌, 류신, 아이소류신 등의 소수성 아미노산이 많이 함유되어 소수성이 강하다. 아스코르빈산은 친수성이기 때문에 생체막에 대한 투과도가 낮지만, 소수성 아미노산 잔기를 포함하는 펩타이드가 도입된 아스코르빈산 펩타이드 유도체는 높은 생체막 투과성을 갖게 된다.[11]

본 연구에서 미백 기능성을 가진 KVARP 펩타이드에 유도체를 합성하였는데 각 유도체에 대한 특성을 살펴보면 Salicylic acid의 경우는 피부장벽, 장벽기능 및 콜라겐 생성을 향상 시키고, 각질제거제로 피부를 각질제거하고 세포가 더 쉽게 나오게 하며 모공이 막히는 것을 방지하고 새로운 세포 성장을 위한 공간을 마련하는 역할을 한다. Lipoic acid는 세포질 막에 집중하여 자유라디칼을 중화 시킨 다음, 세포의 수분이 많은 내부 세포질로 알려진 곳으로 이동한다. 이곳에서 자유라디칼의 활성을 진정시키고 다른 프로 염증성 화학물질의 활성화를 막을 뿐더러 항산화효과를 가지고 있다. Geranic acid는 멜라닌의 생성을 억제하고, 멜라닌 생성 초기과정에 주요한 역할을 하는 티로시나제(tyrosinase)활성을 억제할 뿐만 아니라 티로시나제의 발현을 억제함으로써 멜라닌의 생합성과정에 영향을 미쳐 미백 효과를 상승시킨다. Caffeic acid는 In vitro 및 In vivo에서 강력한 항산화활성을 가진다는 것이 밝혀져 있고, 또한 면역조절 및 항염증활성도 갖고 있다.[12-15] 이와 같은 유도체들을 미백기능성을 가진 펩타이드에 합성하게 되면 각각의 활성들을 가지고 합성되었기 때문에 시너지 효과를 가지게 된다. 본 연구에서는 미백기능성 펩타이드인 KVARP 시퀀스에 다양한 생리활성을 가지고 있다고 알려진 Lipoic aicd, Geranic acid, Caffeic acid 및 Salicylic acid를 결

합시키고자한다. 이러한 생리활성을 가지는 소재들은 에스터화반응을 이용하여 합성하고자 한다.

2. 본 론

2.1 실험 재료

본 연구에서 사용된 시약은 중국의 GL Biochem제와 Aldrich제, Sigma제 및 TCI Tokyo Kogyo제 제품을 사용하였고, 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 합성된 물질의 분자량 확인에 사용된 기기는 MALDI TOF Bruker-daltonics Ultraflex Ⅲ TOF/TOF이다.

2.2 실험 방법

2.2.1 보호된 펩타이드 KVARP의 합성

본 반응용기에 Rink amide AM resin(1g, 0.4mmol/g)을 넣고, N,N-Dimethylformamide(DMF)를 30ml 넣어 30분간 용매로 부풀렸다. Vacuum pump로 용매 제거 후 9-fluoreyl methoxy carbonyl (Fmoc)으로 보호된 Rink amide AM resin(1g, 0.4mmol/g)을 20% piperidine in DMF (piperidine 200mL/ DMF 800mL)로 30분 동안 흔들어주고 Fmoc을 제거하였다. 충분히 흔들어준 후 N,N-Dimethylformamide(DMF) 3분씩 3번, Dichloro-methane(DCM) 3분씩 3번 세척한 후, 용매를 다 제거한 후에 resin소량을 취하여 kaiser test(Potassium cyanide solution, Phenol solution, Ninhydrin solution)를 한 결과 청남색이 나왔다. 첫 번째 아미노산인 Fmoc-Pro-OH(4eq, 0.54g)을 PyBOP(4eq, 0.83g), DIPEA-N,N-Diisopropylethylamine(8eq, 557.2㎕)와 함께 20mL Vial bottle에 DMF로 녹이고 이것을 Fmoc을 제거한 Rink amide AM resin(1g, 0.4mmol/g)에 가하여 2시간 짝지음 반응을 하였다. 반응 후 DMF와 DCM으로 3번씩 세척한 후 Kaiser test 하여 유리아민을 확인한 결과 노란색이 나왔다. 반응이 완료된 Fmoc-Pro- Rink amide AM resin 의 Fmoc group은 20% piperidine in DMF 로 30분 동안 제거하였다. 그리고 DMF와 DCM으로 세척한 후 kaiser test 한 결과 청남색이 나왔다. 두 번째 아미노산인 Fmoc-Arg(Pbf)-OH(4eq, 1.04g), 세 번째 아미노산인 Fmoc-Ala-OH(4eq, 0.5g), 네 번째 아미노산인 Fmoc-Val-OH(4eq, 0.54g)까지는 한 종류의 아미노산을 짝지음 반응할 때 한번의 짝지음 반응으로 잘 진행이 되었다. 그러나 다섯 번째 아미노산인 Fmoc-Lys(Boc)-OH(4eq, 0.75g)을 PyBOP(4eq, 0.83g), DIPEA(8eq, 557.2㎕)와 함께 20mL Vial bottle에 DMF로 녹이고 이것을 NH_2-Val-Ala-Arg-Pro- Rink amide AM resin에 가하여 coupling을 하였다. 2시간 반응 후 DMF와 DCM으로 3번씩 세척 후 Kaiser test하여 유리아민을 확인한 결과 푸른레진이 섞여 있어 추가로 두 번째 짝지음 반응하여 노란색이 나왔다. 반응이 완료된 Fmoc-Lys-Val-Ala-Arg-Pro- Rink amide AM resin의 Fmoc group은 20% piperidine in DMF로 30분 동안 제거하고 DMF와 DCM으로 세척하여 kaiser test 한 결과 청남색이 나왔다.

2.2.2 LA-KVARP의 합성(2a)

반응용기에 합성된 펩타이드 KVARP(1a)에 이어서 Lipoic acid(LA, 4eq, 0.22g), PyBOP(4eq, 0.83g), DIPEA(8eq, 557.2㎕)와 함께 DMF로 녹이여 짝지음 반응을 하였다. 25.0 ℃에서 2시간 반응 후 세척하고 Kaiser test하여 유리 아민을 확인한 결과 노란색이 나왔다. 건조된 중간체 (LA-KVARP)의 0.36 g당 분해용액 (Trifluoro acetic acid(TFA)/ Phenol / H_2O/ thioanisole/ 1,2-Ethanedithiol(EDT) :8.25mL/ 0.50g/ 0.50mL/ 0.50mL/ 0.25mL)을 20.00 mL 넣고 반응시켰다. 분해반응이 끝나면 여과액을 차가운 에틸에테르에 분산시킨 후 원심분리하여 얻어진 생성물은 동결건조하여 백색의 고체 상태인 화합물 LA-KVARP(2a)를 수득률 28.0 %로 얻었다.

2.2.3 Ger-KVARP의 합성(2b)

합성된 펩타이드 1a와 Geranic acid (GA, 4eq, 277.50㎕)이용하여 실험 방법2-2-1와 같은 방법을 이용하여 Ger-KVARP(2b)를 수득률 32.50 %로 얻었다.

2.2.4 CA-KVARP의 합성(2c)

합성된 펩타이드 1a와 Caffeic acid (CA, 4eq, 0.29g) 이용하여 실험방법 2.2.2.와 같은 방법을 이용하여 CA-KVARP(2c)를 수득률 25.00 %로 얻었다.

2.2.5 SA-KVARP의 합성(2d)

합성된 펩타이드 1a와 Salicylic acid(SA, 4eq, 0.29g) 이용하여 실험방법 2.2.2와 같은 방법을 이용하여

CA-KVARP(2d)를 수득률 25.00%로 얻었다.

2.2.6 KVARP의 Cleavage

반응용기에 합성된 펩타이드 2a, 2b, 2c, 2d의 0.20g 당 분해 용액 (Trifluoro acetic acid(TFA)/ Phenol/ H_2O /thioanisole /1,2-Ethanedithiol(EDT): 8.25mL/ 0.50g/ 0.50mL/ 0.50mL/ 0.25mL)을 10.00mL 넣고 반응시켰다. 분해반응이 끝나면 여과액을 차가운 에틸에테르에 분산시킨 후 HPLC를 이용하여 역상크로마토그래피법으로 분리, 정제하여 원심분리 후 동결 건조 하였다. 백색의 고체 상태인 각각의 화합물 2a, 2b, 2c, 2d를 수득률 34.7. %로 얻었다. 합성된 KVARP 유도체 4종은 분해반응 하여 동결건조한 후 HPLC(High Perfomence Liquid Chromatogarphy)를 이용하여 정제하였다. 레진이 포함된 KVAR 0.36g을 분해 반응하여 얻어진 백색의 고체 화합물은 0.02g이었으며, 백색의 고체 화합물은 증류수 5mL에 용해시켜 정제하였다. HPLC C18 Column으로 YMC-Pack ODS -A-HG (250x20.0 mml.D.S-10μm, 30nm)을 사용하여 이동상은 물(D.W)와 아세토나이트릴(ACN) 용매로 화합물2a, 화합물2b, 화합물2c, 화합물2d 를 각각 분리, 정제 하였다. 표1에 HPLC 분리 조건을 나타내었다.

Table 1. Performed Prep HPLC condition

Mobile Phase A	0.025% TFA in Distilled Water	
Mobile Phase B	0.025% TFA in 60% Acetonitrile	
Flow Rate	10mL/min	
Gradient Mode		
10min	A : 100%	B : 0%
20min	A : 80 %	B : 20%
100min	A : 0 %	B : 100%
Run Time	100min	
Wevelength	220 nm	
Injection Volume	10mL	

2.3 생리활성 효과의 측정

2.3.1 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 DMEM(with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin)배지를 이용하여 5% CO_2 배양기에 배양하였다. Confluence에 도달한 세포는 scraper를 사용하여 계대배양하여 유지하였다.

2.3.2 세포생존율 실험 (WST-1 assay)

96well cell culture plate에 1×10^4cells/well농도의 RAW264.7 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Penicillin/ Streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24시간 배양한다. 시료는 DMEM배지를 사용하여 농도별로 준비하고 이를 교체하여 24시간 배양한다. 교체는 이전 배양액을 모두 제거하고 제조한 배지를 동일하게 넣어준다. 배양이 끝난 세포에 EZ-CYTOX(EZ-1000, Daeil lab service, Korea) 10% 함유한 DMEM 배지로 교체한 후 multi-reader기로 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 구한다. 세포 생존율은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

* Cell viability = (시료 첨가군의 흡광도/무처리군 흡광도) ×100

2.3.3 Nitric Oxide(NO) 생성량 측정 실험

RAW264.7 세포에서 생성되어 배양액에 존재하는 NO수준을 Griess반응을 기본으로 하는 NO detection kit(intron)를 사용하여 측정하였다. NO가 존재한다고 추정되는 배양액을 96well plate에 100㎕씩 분주한 후 N1 buffer (sulfanilamide) 50㎕를 넣어 10분간 실온에서 반응시킨다. 이어서 N2 buffer(naphthylethylenediamine) 50㎕를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도 측정하였다. 각 NO 생성량은 nitrite standard를 이용하여 얻은 표준검량곡선을 이용하여 산출하였다.

2.3.4 DPPH scavenging assay

준비된 시료 20㎕에 0.1mM DPPH 100㎕, EtOH 80㎕를 잘 섞이도록 혼합하고 30분동안 4℃에서 반응시켰다. 96well plate에 100㎕씩 분주한 다음 multi-reader기로 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험은 총 3회 반복하였다. DPPH 소거능은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

* Inhibition(%) = 100-(b-b'/a-a')×100

a: 공시료액의 반응 후 흡광도,

b: 시료액의 반응 후 흡광도

a', b': 시료색 보정 (DPPH 대신 EtOH 측정) 흡광도

2.3.5 Elastase inhibition assay

준비된 시료 16㎕와 기질 1.6mM N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide 80㎕, 효소 porcine pancreas

elastase(0.4U) 16㎕, 10mM tris-HCl buffer(pH 8.0) 48㎕를 잘 섞이도록 혼합하고 5분 동안 실온에서 반응시켰다. 96well에 100㎕씩 분주한 다음 multi-reader기로 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험은 총 3회 반복하였다. Elastase 억제율은 2.3.4의 억제율을 구하는 식으로 계산하였다.

2.3.6 Mushroom tyrosinase inhibition assay

준비된 시료 10㎕와 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 110㎕, 1.5mM Tyrosine(in 0.1M HCL) 20㎕, Mushroom tyrosinase 1500U/ml(in 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.5)) 10㎕를 잘 섞이도록 혼합하고 37℃에서 10분간 반응시켰다. 96well에 100ul씩 분주한 다음 multi-reader기로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험은 총 3회 반복하였다. Mushroom tyrosinase 억제율은 2.3.4의 억제율과 같은 식으로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 합성된 올리고 펩타이드와 유도체의 합성

실험에 필요한 펩타이드 유도체는 scheme1과 같이 고체상합성법으로 합성하였다.

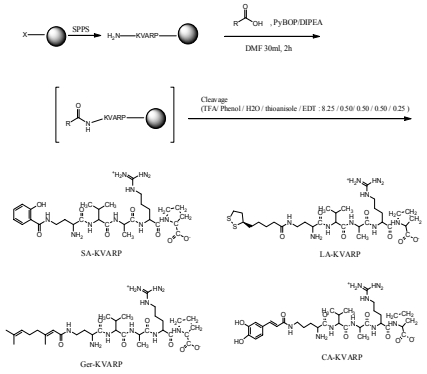

Fig. 1. Solid phase peptide synthesis of peptide derivatives.

합성된 4종의 유도체인 LA-KVARP는 28.0%, Ger-KVARP는 32.5%, CA-KVARP와 SA-KVARP는 25.0%로 합성되었다. 합성된 펩타이드 유도체에 대한 일반적인 정보를 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Information on synthesized peptide derivatives.

Sample	yield (%)	MW(g/mol)	Purify yield (%)	color
1a	34.7	569.40	84.0	white
2a	28.0	758.03	80.8	white
2b	32.5	719.94	78.0	white
2c	25.0	731.86	82.2	white
2d	25.0	689.82	83.1	white

3.2 합성된 올리고 펩타이드유도체의 생리활성 효과

3.2.1 세포독성 (WST-1 assay)

합성된 4종 화합물의 세포독성을 평가하여 피부 이상반응을 간접적으로 확인하기 위해서, 먼저 화합물 시료를 농도별로 세포 배양 배지를 이용해 희석, 처리하였다. 실험에 사용한 세포는 약 24시간 동안 37.0 ℃ CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후 세포 생존율을 측정하여 100% 세포 생존율을 나타내는 시료의 농도를 구한 후 세포독성 평가기준에 따라 판정하였다. 화합물 4종에 대한 실험 결과는 Fig.2와 같다. 그림에 나타난바와 같이, 4종류 화합물 모두 다양한 농도에서 95% 이상의 세포 생존율 나타내었다. 화장품 소재 기준인 세포생존율 80%와 비교해 본다면 본 실험에서 합성한 4종의 KVARP펩타이드 유도체는 의약품 및 화장품 소재로서 안정성에 문제가 없을 것으로 판단된다.

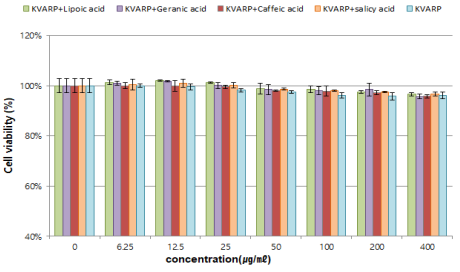

Fig. 2. Effect of peptide derivatives on the cell viability in RAW 264.7 cell.

3.2.2 항염증 효과 (Nitric Oxide)

합성된 4종의 KVARP 펩타이드 유도체에 대한 항염증효과는 nitric oxide(NO)를 감소시키는 현상을 통해 알아보았다. 합성된 물질들의 nitric oxide를 감소시킨 것이 합성된 펩타이드 유도체의 처리에 의한 세포독성으로 인한 세포 수적저하에 기인하였는지를 관찰하기 위하여 펩타이드 물질들의 WST assay를 통한 cell viability

를 측정한 결과 LPS 처리군은 대조군에 비해 세포생존율은 처리 농도 6.25-400 ㎍/㎖까지 거의 비슷하게 95 % 이상의 viability를 보였다. 따라서 합성된 펩타이드 유도체 물질을 세포에 처리시 nitric oxide 생성량이 두드러지게 줄어든 것은 세포독성으로 인한 RAW cell의 절대적 수의 감소가 아닌 항염 효과에 의한 감소이다. 4종의 합성된 펩타이드 유도체의 항염증효과는 Fig. 3과 같다. 이 그림에서 양성대조군인 Monomethyl Arginine (L-NMMA)은 50 μM에서 66.4%의 nitric oxide 억제율을 나타내었고, 대조군으로 사용한 KVARP는 실험농도 400㎍/㎖에서 18.2%로 nitric oxide를 억제하였다. 합성된 화합물 중에서 nitric oxide를 가장 효과적으로 저해한 것은 화합물 2a(LA-KVARP)이며, 400 ㎍/㎖에서 nitric oxide를 66.5%로 저해하였고 실험을 실시한 가장 낮은 농도인 50 ㎍/㎖에서도 27.3 %의 저해율을 나타내었다. 화합물 2b(Ger-KVARP)는 50~100 ㎍/㎖에서는 각각 5.9%, 7.4%로 저해율을 보였는데, 대조군인 KVARP는 각각 5.2%, 7.8%로 화합물 2b의 경우는 저농도에서는 대조군과 비슷한 저해율을 보였다. 그러나 화합물 2b는 200~400 ㎍/㎖에서는 각각 11.1%, 21.5%로 측정되었고, KVARP의 경우는 해당농도에서 8.9%, 18.2%를 보임으로 화합물 2b는 고농도에서는 대조군보다 nitric oxide를 더 효과적으로 저해하는 것으로 나타났다. 화합물 2c(CA-KVARP)는 실험된 모든 농도에서 대조군(KVARP)과 비교시 1.6~2.3배 정도 더 좋은 저해능력을 나타내었다. 화합물 2d(SA-KVARP)의 경우는 모든 농도에서 대조군인 KVARP과 비교하여 저해율이 낮게 측정되었다. 실험 최고 농도인 400 ㎍/㎖에서 조차 8.5%의 저해율을 보였다. 본 연구에서 사용된 lipoic acid는 문헌에 따르면 항산화, 항염증의 효과를 가지고 있어 실험에서는 항염증 효과가 우수하게 나타나 이는 펩타이드와 lipoic acid의 접합 과정에서 본래 가지는 기능이 활성화된 것으로 사료된다.[13] 위의 실험결과를 토대로 합성된 3종의 화합물인 2a, 2b, 2c는 항염증 효과를 가지는 화장품 소재로서 가능성이 있으며, 이 화합물들을 사용하여 화장품을 제조할 경우 피부자극 및 피부염증이 적을 것으로 예상된다.

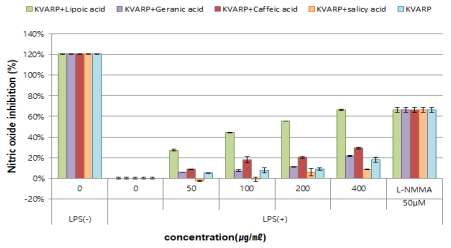

Fig. 3. Effect of peptide derivatives on the nitric oxide production.

3.2.3 항산화 효과 (DPPH)

일반적으로 널리 알려진 DPPH방법을 사용하여 합성된 4종의 KVARP 펩타이드 유도체의 항산화 효과를 확인하였다. 4종의 KVARP 펩타이드 유도체중에서 caffeic acid를 접합한 화합물 2c(KVARP-CA)가 가장 좋은 항산화 효과를 나타내었다. 본 실험에서 사용한 펩타이드인 KVARP는 실험최고 농도인 400㎍/㎖에서 25%의 DPPH 라디칼 제거능력을 나타냈는데, 화합물 2c의 경우 실험 최저농도인 25㎍/㎖에서 43%의 저해 능력을 보였으며,400㎍/㎖에서는 95%의 저해능력을 나타내었다. 화합물 2c의 경우 IC_{50} 값은 30.83㎍/㎖로 측정되었고, 양성 대조군인 ascorbic acid는 7.08㎍/㎖의 농도에서 IC_{50} 값으로 나타났다. 화합물 2a, 2b, 2d도 약간의 항산화효과를 가진 것으로 측정되었으며, 그 결과는 Fig. 4과 같다. 모든 농도에서 화합물 4종은 대조군인 KVARP 보다 항산화 효과가 높게 나타났다. 선행연구들에 따르면, caffeic acid는 폴리페놀의 한 종류로 항산화 능력이 있고, 면역조절 및 항염증활성도 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.[15] 화합물 2c의 항산화효과가 두드러지게 크게 나타난 것은 도입된 caffeic acid에 의한 것으로 판단된다.

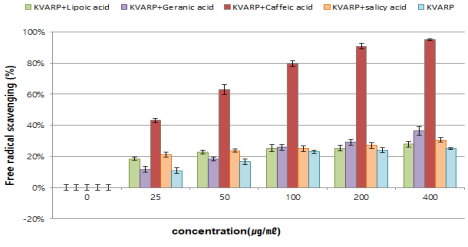

Fig. 4. DPPH free radical scavenging effect of compounds.

3.2.4 주름개선 효과 (Elastase Inhibition)

본 실험에서는 4종의 KVARP 펩타이드 유도체에 대한 elastase저해 활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5를 보면 KVARP 펩타이드 자체는 elastase 저해활성이 매우 미비하게 나타난 것을 확인 할 수 있다. 그러나 본 연구에서 합성한 4종의 KVARP의 유도체는 KVARP보다는 증가된 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 최저 농도인 25㎍/㎖에서는 KVARP는 저해활성이 0%로 나타났지만, 화합물 2a는 3%, 2b는 2%, 2c는 1% 및 2d는 3%의 저해활성을 보였으며, 50㎍/㎖에서는 펩타이드 자체는 1%의 저해활성을 나타냈다. 그러나 유도체 4종은 4~ 12%의 저해활성을 보였다. 화합물 2d의 경우 100㎍/㎖ 이상의 고농도에서 유의할만한 저해율을 나타내었는데, 100㎍/㎖ 에서는 35%, 200㎍/㎖ 에서는 42%, 400㎍/㎖ 에서는 63%의 저해율을 보이며 합성된 물질 중에서 가장 좋은 효능을 보였다. 화합물 2d의 IC_{50} 값은 252.9㎍/㎖로 측정되었다. 양성대조군으로 사용한 olenoic acid는 10.72㎍/㎖의 IC_{50} 값을 나타내었다. 화합물 2d의 elastase의 저해활성이 우수하게 나타난 것은 salicylic acid의 접합으로 인하여 나타난 특성으로 사료된다. 문헌에 의하면 salicylic acid는 피부장벽, 장벽기능 및 콜라겐 생성을 향상시키며, 피부의 각질을 제거하여 세포가 더 쉽게 나오게 하며 모공이 막히는 것을 방지하고 새로운 세포성장을 위한 공간을 마련하는 역할을 하는 것으로 알려졌다. 따라서 본 실험의 결과를 통하여 펩타이드와 salicylic acid의 접합과정이 주름개선기능을 향상 시키는 것을 알 수 있었다.[12] 이상의 결과로 4종의 화합물들은 농도 의존적으로 elastase 저해활성을 보였으며 특히, 화합물 2d는 주름개선 기능을 가지는 화장품소재로의 잠재적가능성을 확인할 수 있었다.

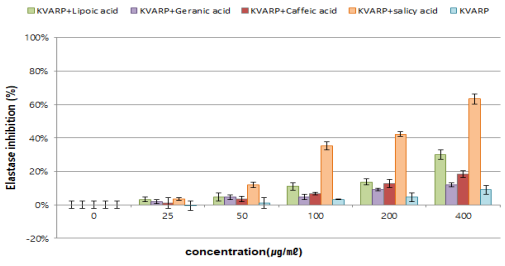

Fig. 5. Effect of peptide derivatives on the anti-wrinkle.

3.2.5 미백 개선 효과 (Tyrosinase Inhibition)

합성된 4종의 KVARP 펩타이드 유도체를 이용하여 미백효과를 평가하기 위하여 tyrosinase 효소활성 저해능력을 측정하였다. 화합물 4종과 대조군으로는 KVARP 펩타이드 및 양성대조군으로는 β-arbutin을 평가하였다. 본 실험을 통해서 합성된 화합물 4종은 미백개선 기능에서 매우 다른 양상을 보였다. 화합물 2a의 경우 50㎍/㎖에서는 tyrosinase 저해활성을 억제하는 것으로 나타났으나, 100㎍/㎖ 이상의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase저해 하는 것으로 나타났다. 특히, 500-1000㎍/㎖ 농도범위에서는 농도가 증가함에 따라 활성이 크게 증가하였으며, IC_{50} 값은 3840㎍/㎖로 측정되었다. 화합물 1c의 경우는 100㎍/㎖ 이하의 농도에서는 오히려 tyrosinase 저해활성을 억제하는 것으로 나타났으며, 500-5000 ㎍/㎖의 범위에서는 2-3%의 저해율을 보였으며 시료의 농도에는 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 화합물 2d의 경우는 50-100㎍/㎖ 농도범위에서는 활성이 크지 않았으나, 500㎍/㎖ 이상의 고농도범위에서는 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며 IC_{50} 값은 3777.5㎍/㎖로 측정 되었다. 화합물 2b의 경우는 매우 유의할만한 결과를 나타내었다. 저농도인 50㎍/㎖에서도 45%의 저해 활성을 나타냈으며, 실험 최고농도인 5000 ㎍/㎖에서는 93%의 저해율을 보였다. 양성대조군으로 쓰인 β-arbutin는 221.86㎍/㎖에서 IC_{50} 값을 나타내었는데, 화합물 2b의 IC_{50} 값은 67.6㎍/㎖로 측정되어 β-arbutin보다 화합물 2b의 tyrosinase 저해활성이 매우 뛰어남을 확인 할 수 있었다. 화합물들의 tyrosinase 저해활성의 결과는 도입된 유기 분자에 의한 것으로 판단된다. Lipoic acid와 geranic acid는 문헌에 따르면 미백활성이 있다고 알려져 있다. 특히 geranic acid는 최근 미백활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는 물질 중 하나이며, 멜라닌의 생성을 억제하고, 티로시나제 활성을 억제할 뿐만 아니라 발현을 억제함으로써 멜라닌의 생합성과정에 영향을 미쳐 미백효과를 상승시킨다고 알려져 있다.[14] 그러나 Cafferic acid와 salicylic acid의 미백에 대한 연구는 아직까지 유의할만한 연구가 보고된 적이 없으나 본 연구를 기초로 하여 미백효능에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

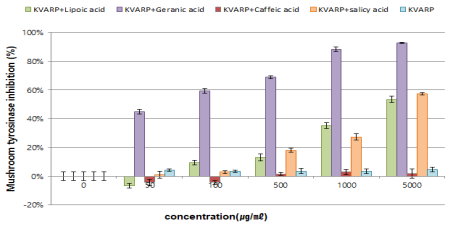

Fig. 6. Effect of peptide derivatives on the whitening.

4. 결 론

본 연구에서는 펩타이드 유도체 중에서 미백개선 효과를 가지고 있는 펩타이드(화합물 1a, KVARP)를 고체상합성법으로 합성하였다. 이 화합물을 고체상수지에서 분리되지 않은 상태로 lipoic acid, geranic acid, caffeic acid, salicylic acid를 접합하여 분리, 정제하여 78.0~84.0%의 순도로 정제하였다. 합성된 유도체들(화합물 2a, 화합물 2b, 화합물 2c 및 화합물 2d)의 생리활성효과에 관한 실험을 진행하여 4종류 화합물 모두 다양한 농도에서 95% 이상의 세포생존율 나타내었다. Caffeic-KVARP(2c)의 경우 DPPH법으로 실시한 항산화실험에서 400㎍/㎖의 농도일 때 95% 이상의 항산화효과를 보였고, IC_{50} 값은 30.83㎍/㎖로 측정되었다. 미백효과는 tyrosinase저해 실험으로 측정하였으며, Geranic-KVARP(2b)의 5000㎍/㎖에서 93%의 저해율로 가장 좋은 효과를 나타내었고, IC_{50} 값은 68㎍/㎖로 측정되었다. 주름개선 효과는 elastase 저해 실험으로 측정한 결과 Salicylic-KVARP(2d)의 400㎍/㎖에서 63%의 저해율을 보였으며, IC_{50}값은 253㎍/㎖으로 확인 되었다. Nitric Oxide 저해실험 결과 Lipoic-KVARP(2a)의 400㎍/㎖에서 67%의 저해율을 보였다. 이러한 실험결과를 토대로 추가적인 연구를 진행한다면 합성된 화합물 4종인 LA-KVARP, Ger-KVARP, CA-KVARP 및 SA-KVARP는 복합 기능성 의약품 및 화장품 소재로서 가능성을 보여주고 있다고 결론지을 수 있다.

References

[1] S. J. Kang, A. J. Kim, M. S. Lee, "The effect of enhancing eye-wrinkle applying traditional herb medicine cosmetics", *JKAIS,* Vol.12, No.1 pp. 335-340, 2011.

[2] Song, Ji Sung, Kim,,Young Ah, "A Study on the Future Market Prospect of Domestic Functional Cosmetics Industry" *J. KSDC.,*Vol.15, No.4, pp.258-271, 2009.

[3] Uday K. Tirlapur, William J. Mulholland, Brian J. Bellhouse, Mark Kendall, J. Fredrick Cornhill, Zhanfeng Cui, "Femtosecond two photon high resolution 3D imaging, spatial volume rendering and microspectral characterization of immunolocalized MHC II and mLangerin/CD207 antigens in the mouse epidermis", *Microsc. Res. Tech.* Vol.69, No.10, pp.767-772, 2006.

[4] Indu P. Kaur,, Rumjhum. Agrawal, "A New Paradigm in Cosmeceuticals, Recent Patents on Drug Delivery & Formulation", *Nanotechnology*, Vol.1, No.2, pp.171-182, 2007.

[5] Byeong-Jo. Ha, "Cosmecetucals", pp.10-11, Sinkwang, Korea, 2001.

[6] Tuerxuntayi A, Liu YQ, Tulake A, Kabas M, Eblimit A, Aisa HA, "Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells". *BMC Complement Altern Med.* Vol.22, No.14, pp.166-171, 2014.

[7] Serge A. Jabbour, "Cutaneous Manifestations of Endocrine Disorders", *Am.J.Clin.Dermatol*. Vol.4, No.5, pp.315-323, 2003.

[8] Min-Sook Kang, Hee Jeong Chae, "Biological Efficacy Assay of Chlorella hydrolysate", *JKAIS* , Vol.4, No.4, pp.366-371, 2003

[9] Kyung-Yun Kim, Na-Kyung Lee, "Herbal Extracts Research Trend that have Effects on Melanin Production and Control", *Kor JAesthet Cosmetol,* Vol.12, No.4, pp.453-461, 2014.

[10] Hyun-Soo Kim, "Anti-melanogenic effect of Eruca sativa extract", *Korean J.Food Presrev*., Vol.23, No.11 pp.74-79, 2016

[11] Min-Kyu Jeong, Chan- Uk Park, Min-Hee Park, Ju- Dong Yeo, Seung- Kwan Park, So- Hee Kim , Tae ‐Sun Shin, Hyung- Hee Baek, Jae- Hwan Lee, " Research Note : Validation of HPLC Methods for Ascorbic Acid and Its Derivatives in Foods", *Food Eng.Prog.*, Vol.15, No.1, pp.75-79, 2011.

[12] Sarika Namjoshi, "Cyclic peptides as potential therapeutic agents for skin disorders", *Peptide Science,* Vol.94, No.5, pp.673-680, 2010.

[13] Pil-Sun Kim,"Whitening Effects of Angelica dahurica Radix Ethanol Extract", *JKAIS*, Vol.12, No.9, pp.4038-4045, 2011

[14] Sang-Yoon Choi, "Inhibitory effects of geranic acid derivatives on melanin biosynthesis", *Journal of cosmetic science,* Vol.63, No.6, pp.351-358, 2012.

[15] Ho-Yeol Cha, Hee-Yeon Kim, Ki-Tae Ha, Jin-Homg Cheon, Ki Bong Kim, "A Clinical Research about Herbal Cosmetics Containing Caffeic acid phenethyl ester Isolated from Vespae Nidus on the Whitening Effects", *J Korean Med.* Vol.38, No.3, pp.86-95, 2017.

[16] Matsuzaki K, "Control of cell selectivity of antimicrobial peptides", *Biochim Biophys Acta*, Vol.8, pp.1687-1697, 2009.

[17] Sang-Sun Hur, “Evaluation of Physiological Activities of Cnidium officinale Makino Extracts with Different Solvents”, *J. of Korean Oil Chemist`s Soc.*, Vol.32, No.1, pp.170-179, 2015.

김 보 미(Bo Mi, Kim) [정회원]

- 2008년 8월 : 원광대학교 교육대학원 공통과학교육과 (교육학석사)
- 2014년 2월 : 원광대학교 일반대학원 화학과 (이학박사)
- 2017년 1월 ~ 현재 : 원광대학교 조교수

<관심분야>
정밀화학, 화장품공학