합성 펩타이드 유도체들의 황산화능

구자석 · 허남원 · 강신원

부산대학교 자연과학대학 화학과

Study of Antioxidant Activities of Synthetic Peptide Analogues

Koo, Ja-Seok · Huh, Nam-Won · Kang, Shin-Won

Dept. of Chem., Pusan National University

(Received Aug. 30, 1987)

ABSTRACT

The addition of dipeptides and 1,2-bis (aminoacyl) hydrazine derivatives a level of 250 ppm to corn oil resulted in the retardation of the oxidaitive deterioration of the oil when it was stored in the oven at 70°C during 5 days. Their antioxidant activities were investigated by UV absorbance of the corn oil at the wavelength of 234nm. 1,2-bis (aminoacyl) hydrazine derivatives showed higher antioxidant activity than normal dipeptides. Dipeptides containing phenyl ring with which is conjugable a-carbon radical showed antioxidant activity.

I. 서 론

식품중의 유지는 보존 기간중 여러 요인들에 의해 변성을 일으켜 불쾌한 냄새를 발생함과 동시에 독성을 나타내거나, 변색, 식품중의 비타민 파괴, Polymerization 등 영양상 바람직하지 못한 여러가지 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다[1]. 이와같은 유지의 변성을 일으키는 요인들로는 식품에 존재하는 lipase 등과 같은 효소, Cu, Fe 와 같은 금속, 열, UV 및 공기중의 산소나 미생물들로서[2,3], 이들은 온도를 낮추거나 빛을 차단해 주면 변성의 진행 정도를 어느 정도 막을 수 있으나, 공기에 의한 산패는 에너지 장벽이 매우 낮기[4] 때문에 위와 같은 조작으로는 산패를 막기가 어렵다.

산패에 의한 변성은 먼저 자동산화 반응이 일어난후 산화 또는 비산화적 성격을 가진 다양한 2차 반응이 일어나는 것이 보통이며 식품중에서 이와같은 산패의 원인이 되는 지방산들로는 oleic acid, linoleic acid 그리고 linolenic acid 등과 같은 불포화 지방산들이 주 원인이 된다[5]. 이와같은 식품중의 불포화 지방산의 산패에 대해 현재까지 알려진 바로는 다음과 같이 $LH \rightarrow L\cdot + H\cdot$, $L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$, $LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$, $LOOH \rightarrow LO\cdot + HO\cdot$ 즉 Lipid (LH)가 자동산화로 lipid radical (L·)이 되어 산소를 흡수해서 peroxide radical (LOO·)로 되면서 연쇄적으로 산패가 진행된다는 것이다. 이러한 불포화 지방산의 산패를 방지하기 위해 일차적으로는 저온, 암소에 보관하므로서 가능하지만, 산패의 에너지 장벽이 매우 낮은 산소에 의한 산패는 항산화제를 첨가해 주어야만 억제된다.

현재 많이 사용되고 있는 항산화제로는 토코페롤 및 phenol 계[6]로서 이들은 산화의 초기과정에서 지방산의 radical을 환원시켜 더 이상의 산패가 진행되지 않도록 한다[1]. 그러나 이들 phenol 계 항산화제들은 빛이나 열에 약하고, 인체에 주는 독성때문에 근년에는 사용이 제한되고 있는 실정이며, 따

라서 인체에 무해한 새로운 항산화제의 개발이 요청되고 있다.

한편, Bishop 등[7]은 protein hydrolyzate와 효소의 가수분해물이 phenol계 항산화제와 상승작용을 한다는 것을 밝혔고, Kawashima 등[8]은 dipeptide들의 항산화 효과를 보고한 바 있다. 현재 이들 peptide 들의 항산화 효과에 대한 정확한 기전이 밝혀져 있지 않은 상태에 있는 바, 본 실험은 항산화 효과가 예상되는 몇 가지 dipeptide와 1, 2-bis (aminoacyl)hydrizine 유도체를 합성하여, 이들 dipeptide 유도체들의 구조와 항산화 효과의 관련성을 조사하므로서 항산화의 기전을 추론해 보고자 하는데 그 의의를 두고 있다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에서 사용한 시약들은 시판용의 아미노산류(특급), Benzyloxicarbonyl chloride (Z-Cl, Fluka, 스위스), $SOCl_2$ (관동화학, 일본), Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, Sigma, 미국), Butylated-hydroxytoluene (BHT, Sigma, 미국) DL-α-Tocopherol (Tocopherol content 60%) 등을 사용하였으며, 그외 시약 및 일반 용매들은 시약용 특급 및 일급을 그대로 사용하였다.

2. Z-AA-AA-OMe의 합성

Scheme 1과 같이 2-AA (6 mmol)을 초산에틸 12 ml에 녹인 용액에 AA-OMe (6 mmol)와 Et_3N (0.84 ml)을 CH_2Cl_2 15 ml에 녹인 용액을 가하고 0℃에서 DCC (7.2 mmol)를 가하였다. 실온에서 1-2일 반응시킨 후 여과하고 여액을 감압농축하여 생긴 oil을 초산에틸에 녹여 1N HCl, 5% $NaHCO_3$, 물로 각각 씻고 무수 Na_2SO_4로 하루밤 동안 건조시킨 후 감압농축하여 결정화시켰다.

3. Z-AA-AA-OH의 합성

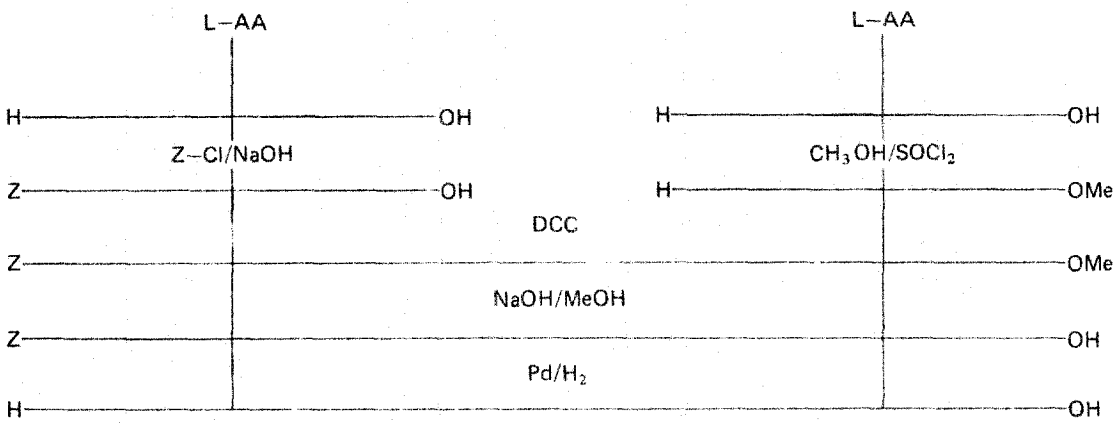
Z-AA-AA-OMe (4 mmol)을 95% 메탄올 14 ml와 1N NaOH 3.9 ml를 가한 후 실온에서 하루 방치하여 용액을 감압 농축하고 0℃에서 1N HCl로 산성화하여 초산에틸로 추출하고 추출액을 물로 씻은 뒤 무수 Na_2SO_4로 하룻밤 탈수시켜, 여액을 감압 농축하여 생성물을 결정화하였다.

4. AA-AA(dipeptide)의 합성

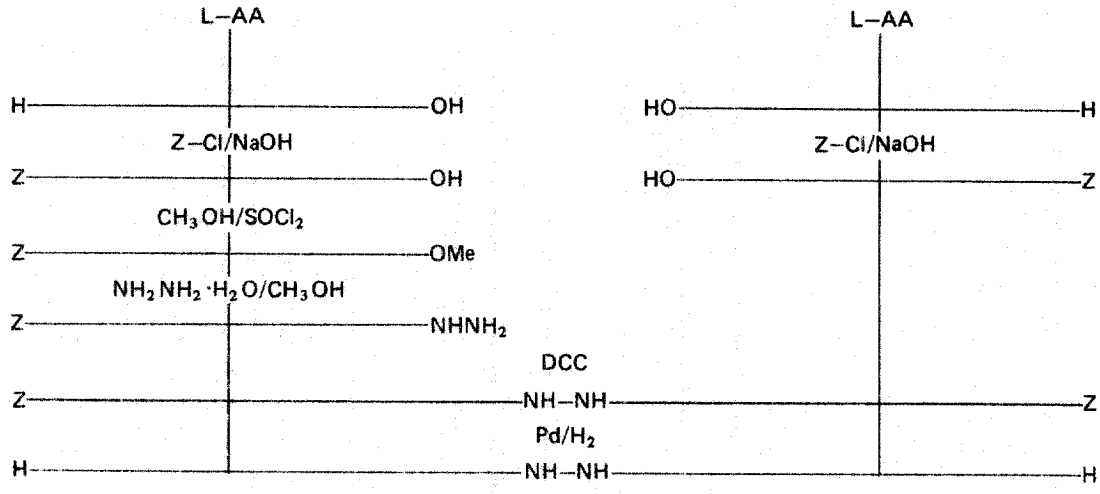
Z-AA-AA (2 mmol)을 초산에틸-메탄올 (1:1, V/V) 20 ml에 녹인 용액에 pd black 0.28 g을 가하고 수소를 6시간 통과시킨 후 여액을 감압농축하여 결정화 하였다.

5. Z-AA-Hy-AA-Z[1, 2-bis(aminoacyl) hydrazine]의 합성

Scheme Ⅱ에서와 같이 Z-AA (2 mmol)을 THF 2 ml에 녹인 용액에 Et_3N 0.28 ml와 THF 2 ml에 녹인 2-AA-Hy 용액을 가하고 0℃에서 DCC (2.4 mmol)를 가하였다. 실온에서 1-2일 반응시



Scheme 1. Synthetic route of dipeptide and intermediate.
AA: amino acid (Phe, Lys, PGly)



Scheme 2. Synthetic route of 1,2-bis(aminoacyl) hyrazine derivatives.

킨 후 II-3과 같은 방법으로 생성물을 얻었다.

6. AA-Hy-AA의 합성

Z-AA-Hy-AA-Z (2 mmol)을 초산에틸-에탄올(1:1, v/v) 28 ml에 녹인 용액에 pd black 0.56 g을 가하고 II-4와 같이 처리하여 생성물을 얻었다.

7. Corn oil의 합성

Corn oil의 추출은 Folch 방법[8]에 따라 chloroform : methanol : H_2O (2:1:1, v/v/v) 용매로 추출한 다음 이 추출물에 methanol과 물을 가하여 chloroform : methanol : H_2O가 1:1:0.9 (v/v/v)이 되도록 한후 메탄올 및 물층과 클로로폼 층을 분리하여 그중 corn oil의 가용성 부분인 클로로폼 층을 감압하에 농축하여 본 실험에 사용하였다.

8. 항산화 효과의 측정

합성한 각 peptide 유도체들을 corn oil 3 ml에 250 ppm이 되게 가한 후, 70℃로 유지한 oven에서 5일간에 걸쳐 산화를 시켰다. 항산화능은 234 nm에서 conjugated diene hydroperoxide의 상대량을 측정해서, 항산화제는 첨가하고 산화는 시키지 않은 corn oil을 대조물로 하여 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

항산화 효과가 예상되는 dipeptide 및 1,2-bis (aminoacyl) hydrazine 유도체의 항산화능은, BHT 및 DL-α-tocopherol을 비교물질로 하여 oven storage method에 의해 산화를 시킨후, 234 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 효과를 비교하여 그 결과를 Table I-IV에 나타내었다. control 로서는 항산화제를 첨가하지 않은 corn oil을 사용하였고

Table 1. Antioxidant activities of dipeptide derivatives

Peptide	A_{234}	A_{234} ratio[d]
pGly-pGly[a]	0.361	62
Phe-Phe[b]	0.478	82
Lys-Lys[c]	0.402	69
pGly-pGly-OMe	0.391	67
Phe-Phe-OMe	0.472	81
Lys-Lys-OMe	0.385	66
Z-pGly-pGly	0.571	98
Z-Phe-Phe	0.601	103
Z-Lyz(Z)-Lyz(Z)	0.612	101
Z-pGly-pGly-OMe	0.589	95
Z-Phe-Phe-OMe	0.612	105
Z-Lys(Z)-Lys(Z)-OMe	0.635	109
control	0.583	100
BHT	0.109	16
DL-α-Tocopherol	0.157	27

a) Phenylglycine b) Phenylalanine c) Lysine
d) (A_{234} of Sample/A_{234} of control) x 100

Table 2. Antioxidant activities of 1,2-bis(aminoacyl)hydrazine derivatives

Peptide	A_{234}	A_{234} ratio
pGly-Hy-pGly	0.216	37
Phe-Hy-Phe	0.456	78
Lys-Hy-Lys	0.315	54
Z-pGly-Hy-pGly-Z	0.484	83
Z-Phe-Hy-Phe-Z	0.601	103
Z-Lys(Z)-Hy-Lys(Z)	0.566	97
Control	0.583	100
BHT	0.109	16
DL-α-Tocopherol	0.157	27

항산화능의 측정은 종래 사용되는 화학적 방법인 KI-Na S_2O_3에 의한 POV 적정법 대신에 Farmor 등[10]이 불포화 지방산은 산소를 흡수하면 234 nm에서의 흡광도가 증가한다고 보고한 바 있어 234 nm에서의 흡광도로 항산화능을 비교하였다. 결과의 비교는 control의 흡광도를 100으로 두고 각 첨가물들에 의한 항산화능은 이 control의 A 234를 기준으로 한 비값으로 나타내었다.

Table 1에 나타난 바와 같이 BHT와 DL-α-tocopherol에는 미치지 못하나 세개의 peptide 모두 항산화능을 가졌으며 이중 pGly-pGly가 가장 크게 나타났으며 다음이 Lys-Lys, Phe-Phe의 순으로 나타났다. 산화과정이 free radical에 의해 개시된다는 사실을 고려하면 초기에 생성된 불포화 지방산 radical이 peptide의 α-carbon에서 유리된 proton들로 환원이 되면서 peptide는 radical이 되고 이렇게 생성된 peptide radical은 N-terminal 방향 또는 peptide bond의 carbonyl 방향으로 delocalization되어 안정화되면서 유지의 산패를 막는 mechanism으로 진행되리라 추측된다. 그리고 pGly-pGly가 Phe-Phe 보다 훨씬 큰 항산화 효과를 나타낸다는 사실로서 free radical이 dipeptide 항산화 물질의 항산화 mechanism에 기여할 것이라는 추측이 더욱 강화된다. 즉 α-carbon의 radical이 pGly의 구조상 phenylring에 resonance되는 반면 Phe-Phe는 이런 ring을 통한 안정화가 불가능하므로 pGly-pGly에 비해 보다 낮은 항산화능을 나타낸다고 생각된다. 그리고 Lys-Lys이 높은 항산화능을 가진 것은 생성된 radical의 입체장해로 활성이 높은 radical로 작용할 수 없기 때문이라고 생각되며, 또한 세개의 amino group이 proton donor로 기여한 것으로 추측된다.

한편 Table 1에서 보는 바와 같이 free한 N-terminal이 항산화능 발현에 필수적이라는 사실을 근거로 free N-terminal의 개수와 항산화능과의 관계를 알아보기 위해 두개의 아미노산을 정상적인 peptide bond로 연결하는 대신 hydrazine을 이용하여 연결시킴으로써 free한 amino group의 수를 늘려 항산화능을 비교해 보았다. 그 결과는 Table 2에서 나타낸 바와 같으며 예상한바 대로 normal peptide (Table 1)에 비해 보다 높은 항산화능을 나타내었다. 역시 이 free amino group을 차단해 버리면 전혀 활성을 나타내지 못하는 결과로서 free amino group이 항산화능의 발현과 큰 관련이 있다는 것을 알 수 있었다. 특히 1, 2-bis (aminoacyl)hydrazine 유도체들은 정상적인 peptide에 비해 훨씬 큰 항산화능을 나타내었다. 앞의 peptide 경우에서 처럼 α-carbon의 radical이 안정화 구조를 더욱 더 많이 가짐으로서 보다 큰 항산화능을 갖게 된다고 추측된다.

Ⅳ. 결 론

유지의 산패를 억제하기 위하여 항산화제로서 dipeptide와 1, 2-bis (aminoacyl) hydrazine 유도체를 합성하여 UV 흡광법으로 그들의 항산화능을 측정하였다. 이들 화합물들의 항산화 효과 발현에는 peptide bond를 중심으로 free한 N-terminal의 존재가 필수적이며, 또한 개수가 많을수록 항산화 효과가 증대하며, C-terminal은 항산화 효과 발현에는 큰 상관이 없었다. 그리고 이들 항산화능의 mechanism은 불포화 지방산의 radical이 dipeptide 및 1, 2-bis (aminoacyl) hydrazine의 α-carbon과 amino group에서 제공하는 proton으로 인해 환원됨으로서 radical의 연쇄 반응을 저해하여 산화과정의 진행을 원초적으로 억제한다고 생각되며 이렇게 생성된 이차 radical (dipeptide 및 1, 2-bis (aminoacyl)의 radical)은 공명 안정화와 입체장애로 반응성이 매우 낮은 radical화 하여 더 이상의 산화를 막아주는 것으로 추측된다.

문 헌

1. Gardner, H.W. J.: *Food. Chem.*, 27, 220

(1979)
2. Sherwin, E.R. J. Am.: *Oil. Chem. Soc.*, **55**, 809 (1978)
3. Johanson G.M.R.: *ibid*, **53**, 410 (1976)
4. Grog, J.L.: *ibid*, **53**, 410 (1976)
5. Labuza, T. CRC Crit.: *Rev. Food Technol.*, **2**, 355 (1971)
6. 川島啓助, 伊藤博, 化學と生物, **20**, 215(1982)
7. Bishov, S.J. and Henick, A.S.: *J. Food Sci.*, **40**, 345 (1975)
8. Kawashima, K. and Itoh, H.: *Chem. Pharm, Bull*, **27**, 1912 (1979)
9. Folch, J. Lees, M. and Stanley, S.: *J. Boil. Chem.*, **226**, 497 (1953)
10. Farmer E.H. and D.A. Sutton,: *J. Chem. Soc.*, **119**, (1943)