

## Adamantyl Benzamide 유도체의 미백효과

백흥수·안수미\*·우병영·조영석·최수정·노호식·변경희·신승석·박영호·주영협<sup>†</sup>

(주)아모레퍼시픽 기술연구원, \*(주)경희대학교 피부생명공학센터  
(2012년 10월 30일 접수, 2013년 1월 15일 수정, 2013년 2월 20일 채택)

### Whitening Effects of Adamantyl Benzamide Derivatives

Heung Soo Baek, Soo Mi Ahn\*, Byoung Young Woo, Young Seok Cho, Soo Jeong Choi, Ho Sik Rho,  
Kyoung Hee Byoun, Song Seok Shin, Young Ho Park, and Yung Hyup Joo<sup>†</sup>

Amorepacific Corporation R&D Center 314-1, Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-729, Korea

\*Kyung Hee University Skin Biotechnology Center

(Received October 30, 2012; Revised January 15, 2013; Accepted February 20, 2013)

**요약:** Polyhydroxylated benzamide 유도체의 구조변화에 따른 미백효과의 상관관계를 고찰하였다. Adamantyl benzamide 유도체에서 B ring 부분의 치환기가 catechol (3,4-dihydroxyphenyl)인 경우 우수한 멜라닌 생성 저해활성을 보였으나, mono-hydroxyphenyl (3-OH 또는 4-OH)이거나 3,4-dimethoxyphenyl인 경우에 그 활성이 감소하거나 없어졌다. 따라서 catechol unit이 멜라닌 생성 저해에 중요한 인자임을 알 수 있었다. 그리고 A-ring부분의 2-OH의 존재여부는 활성에 큰 영향을 주지는 않았고, A-ring과 B-ring을 연결하는 탄소사슬의 길이 역시 멜라닌 생성저해에 큰 영향을 주는 요소는 아니었다.

**Abstract:** The structure activity relationship of polyhydroxylated benzamide derivatives for whitening effects was examined. The adamantyl benzamide derivatives with catechol (3,4-dihydroxyphenyl) of B-ring part showed good anti-melanogenesis activity, but the inhibitory activity of mono-hydroxyphenyl (3-OH or 4-OH) or 3,4-dimethoxyphenyl substituted derivatives was decreased or lost. Therefore the catechol unit was appeared to be the crucial factor for the inhibition of melanogenesis. And the existence of 2-OH of A-ring part had minor influence on the activity, the length of carbon chain between A-ring and B-ring was also not the major factor for the anti-melanogenesis activity.

**Keywords:** melanogenesis, adamantyl N-benzylbenzamide, adamantyl N-phenethylbenzamide, polyhydroxypropanoid, tyrosinase

### 1. 서 론

표피층에서 다양한 외부의 자극으로부터 진피아래 피부기관을 보호하는 멜라닌은 자외선 차단이나 활성화된 자유라디칼을 흡수함으로써 그 역할을 한다. 또한 멜라닌은 피부의 색을 결정하는 중요한자로서 필요 이상으로 존재하는 경우 기미나 주근깨 또는 점 등의 색소침착의 원인이 되기도 한다. 이러한 멜라닌은

기저층에 있는 멜라노사이트로부터 생성되고 외부자극에 의해 그 생성이 촉진되는 것으로 알려져 있다. 따라서 외부의 자극을 줄이거나 그 신호의 전달을 차단하는 방법을 통해 멜라닌의 생성을 줄일 수 있다. 또한 멜라닌 생성효소인 타이로시네이즈의 합성을 억제하거나 그 활성을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소시킬 수 있다[1-3]. 많은 미백연구에서 시험관 내 실험에서 좋은 결과를 보이는 화합물들이 임상적으로 충분한 효과를 내기 위해서는 화합물의 안정성이나 피부적용시의 문제점 등을 고려한 연구가 필요하다[4].

<sup>†</sup> 주 저자 (email: yunghyupjoo@hanmail.net)

현재까지 다양한 미백활성 화합물이 알려져 있는데 대부분 타이로시네이즈(tyrosinase)의 분해를 촉진하거나 당화를 조절하여 멜라닌 생성을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 항산화 작용을 갖는 polyhydroxylated phenolic compound가 많이 알려져 있다 [5,6].

본 연구자들은 N-benzylbenzamide 유도체의 멜라닌 생성 억제효과 연구에서 adamantyl 치환기에 의한 활성 상승효과를 관찰한 바 있다[7]. 따라서 본 연구에서는 이 연구결과를 이용하여 천연물에서 발견되는 1,3-diphenylpropane 구조를 모방하여 보다 다양한 polyhydroxylated benzamide 유도체들에 대한 구조-활성관계를 연구하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 시약

시험에 사용된 시약 N-hydroxysuccinimide (HOSu), N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC), dopamine hydrochloride, tyramine, 1-adamantanol, 2,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzyl-amine hydrobromide는 Sigma-Aldrich Co.의 제품을 사용하였다.

### 2.2. 세포독성 및 멜라닌 생성량 측정방법

#### 2.2.1. 세포배양

Melan-a 세포는 C57BL/6J (black, a/a) 마우스에서 유래한 immortalized cell line으로서(Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocyte, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumor promoter for growth. Int J Cancer 1987; 39: 414-418) Dr. Dorothy C Benette (St George's Hospital, London, UK)로부터 제공받아 사용하였다. 세포는 RPMI 1640 medium에 fetal bovine serum 10%, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 200 nM phobol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 첨가한 배지로 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양한다.

#### 2.2.2. Cell Cytotoxicity 측정(Premixed WST-1 Cell Proliferation Assay)

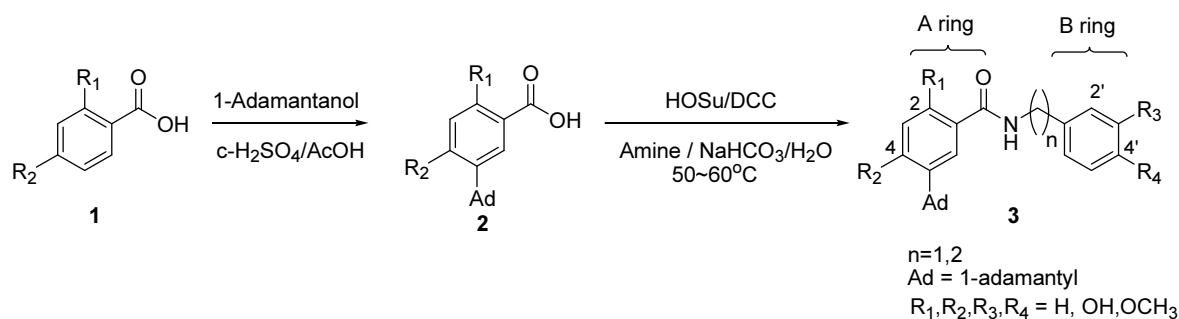
대사 작용이 왕성한 살아있는 세포는 미토콘드리아의 전자전달계(respiratory chain) 과정을 통하여 생존에 필요한 에너지를 생산한다. WST-1 실험법은 세포 증식 및 생존능력을 측정하기 위해서 이용되고 있는 방법의 한 가지로, 전자전달계에 존재하는 탈수소효소(dehydrogenase)인 succinate-tetrazolium reductase가 기질에 해당하는 tetrazolium salts (WST-1)를 분해하여 formazan이라는 발색 물질을 생성하는 원리를 적용하고 있어 살아있는 세포에서만 효과를 나타낸다. 따라서 formazan에 의한 발색 강도 증감은 살아있는 세포수와 직선적인 상관관계가 있다는 것을 의미한다. 즉, 살아있는 세포가 WST-1을 흡수하여 mitochondria에서 생성한 formazan의 양을 정량하여 세포 독성을 측정하는 방법이다. Melan-a cell 세포를 96-well plate에 well 별로 1 × 10<sup>4</sup>개를 넣어준 후, 하루 동안 세포배양기에 방치한다. 여러 시험 농도로 시험물질이 희석되어 들어있는 새 배지를 well당 100 mL로 교체 후, 48시간동안 배양시킨다. 세포배양배지에 WST-1 용액을 well 당 10 mL씩 첨가하고 2시간 동안 세포배양기에 넣고 반응을 시킨 후, plate채로 450 nm에서 formazan의 생성 정도를 측정한다.

#### 2.2.3. 멜라닌 생성 저해시험

Melan-a 세포를 3 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 24 well plate에 간 후, 24시간 동안 세포가 plate에 잘 붙도록 세포배양기에 방치한 뒤, 각 well당 다양한 농도로 희석된 시험물질이 들어있는 배지를 넣어준다. 실험 시료는 원하는 농도대로 녹여 사용한다. 위와 같은 방법으로 실험 시료를 3일에 한 번씩, 6일 동안 처리한다. 세포 내의 멜라닌은 광학 현미경(bright-field microscope)으로 확인한다. 이후 세포는 cell lysis buffer로 녹인 후 원심분리를 통해 상층액은 분리하여 단백질을 정량하고 멜라닌은 1 N NaOH를 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 측정된 단백질양에 대한 멜라닌 양으로 환산하였다.

### 2.3. Adamantylated alkanoids 유도체의 합성

Adamantylated alkanoids 유도체들은 Figure 1과 같은 방법으로 합성하였다. 우선 hydroxybenzoic acid 1을



**Figure 1.** Synthesis of adamantyl benzamide **3**.

강산성 조건에서 adamantylation하여 adamantylated hydroxybenzoic acid **2**를 좋은 수율로 얻은 다음, 화합물 **2**를 HOSu / DCC 조건에서 결합시켜 중간체를 만들고 이어서 적절한 benzylamine (또는 phenethylamine)과 반응시켜 목표화합물인 adamantyl *N*-benzyl-benzamide (또는 adamantyl *N*-phenethylbenzamide) **3**을 합성하였다.

대표화합물 **3a**, **3c**, **3e**, **3h**의 합성법에 대한 상세내용을 아래에 나타내었다.

### 2.3.1. 5-Adamantan-1-yl-*N*-(3,4-dihydroxy-benzyl)-2,4-dihydroxy-benzamide(**3a**)의 합성

2.3.1.1. 2,4-Dihydroxybenzoic acid (9.24 g)과 1-adamantanol (9.14 g)을 dichloromethane (200 mL)에 녹이고 교반하면서 초산(17.1 mL)에 진한황산(3.3 mL)을 혼합하여 적가한 후 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 교반한 혼합용액에 물(200 mL)을 넣고 용액의 pH가 6이 되도록 중탄산나트륨을 가하고, 생성된 고체를 여과하여 흰색의 5-adamantan-1-yl-2,4-dihydroxybenzoic acid 8.82 g을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.40 (brs, 1H), 10.17 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 2.00 (s, 9H), 1.70 (s, 6H).

2.3.1.2. 5-Adamantan-1-yl-2,4-dihydroxybenzoic acid (0.606 g), HOSu (0.24 g), DCC (0.43 g)을 dioxane (10 mL)에 녹여 12시간 교반하였다. 생성된 고체를 여과하여 여과액을 3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide (0.46 g), 중탄산나트륨(0.18 g), 물(2 mL)의 혼합용액에 적가하고 50 ~ 60 °C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 용액의 온도를 상온으로 내린 뒤 10% 염산수용액으로 중화하고 에틸아세테이트(50 mL)로 씻어 주었다. 유기 용액층을 무수 황산마그네슘으로

건조하고 여과하여 감압 농축한 후, 관크로마토그래피에서 분리하여 흰색 고체상의 5-adamantan-1-yl-*N*-(3,4-dihydroxy-benzyl)-2,4-dihydroxybenzamide (**3a**) 0.09 g을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12.74 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.98 (m, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.67 (m, 2H), 6.56 (d, 1H,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ ), 6.26 (s, 1H), 4.28 (d, 2H,  $J = 5.4 \text{ Hz}$ ), 2.03 (s, 9H), 1.71 (s, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  169.4, 161.0, 160.1, 145.0, 144.1, 130.3, 127.7, 125.4, 118.2, 115.3, 114.8, 105.9, 103.7, 41.7, 40.2, 36.6, 35.9, 28.3.

### 2.3.2. 3-Adamantan-1-yl-*N*-(3,4-dihydroxy-benzyl)-4-hydroxy-benzamide(**3c**)

상기의 방법과 유사한 방법으로 합성한 3-adamantan-1-yl-4-hydroxy-benzoic acid (0.286 g)에 HOSu (0.12 g), DCC (0.22 g)를 dioxane (5 mL)에 녹여 12시간 교반하고 생성된 고체를 여과하여 여과액을 3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide (0.25 g), 중탄산나트륨(0.09 g), 물(1 mL)의 혼합 용액에 적가하고 50 °C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 용액의 온도를 상온으로 내린 뒤 10% 염산수용액으로 중화하고 에틸아세테이트(30 mL)로 씻어주었다. 유기 용액층을 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 농축한 뒤 관크로마토그래피에서 분리하여 흰색 고체상의 3-adamantan-1-yl-*N*-(3,4-dihydroxy-benzyl)-4-hydroxy-benzamide (**3c**) 0.03 g을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.82 (s, 1H), 8.75 (m, 2H), 8.62 (m, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (m, 1H), 6.77 (d, 1H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ ), 6.69 (s, 1H), 6.64 (d, 1H,  $J = 8.1 \text{ Hz}$ ), 6.53 (m, 1H), 4.26 (d, 2H,  $J = 6.0 \text{ Hz}$ ), 2.07 (s, 9H),

**Table 1.** The Melanogenesis Inhibitory Activity

Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	n	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>3a</b>	OH	OH	OH	OH	1	2.50 ± 0.23
<b>3b</b>	OH	OH	OH	H	1	12.50 ± 1.19
<b>3c</b>	H	OH	OH	OH	1	2.57 ± 0.68
<b>3d</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	1	3.86 ± 0.34
<b>3e</b>	OH	OH	OH	OH	2	4.33 ± 0.12
<b>3f</b>	OH	OH	H	OH	2	-
<b>3g</b>	OH	OH	OH	H	2	-
<b>3h</b>	H	OH	OH	OH	2	2.09 ± 0.07
<b>3i</b>	H	OH	H	OH	2	-
<b>3j</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2	-
<b>Kojic Acid</b>						1,469 ± 238.89

1.72 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.1, 158.8, 144.9, 143.9, 134.9, 131.0, 126.1, 125.9, 124.9, 118.1, 115.7, 115.1, 114.8, 42.0, 39.6, 36.5, 36.2, 28.3.

화합물 **3e**, 화합물 **3h**도 상기와 유사한 방법으로 합성하였다.

2.3.3. 5-Adamantan-1-yl-*N*-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-2,4-dihydroxy-benzamide(**3e**)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.63 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.58 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 6.63 (m, 2H), 6.47 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.25 (s, 1H), 3.32 (m, 2H), 2.63 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.03 (s, 9H), 1.72 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 169.8, 161.3, 160.3, 145.5, 144.0, 130.5, 128.0, 125.8, 119.6, 116.3, 115.9, 106.5, 104.1, 41.3, 40.7, 37.1, 36.3, 35.2, 28.8.

2.3.4. 3-Adamantan-1-yl-*N*-[2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl]-4-hydroxy-benzamide(**3h**)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.78 (s, 1H), 8.71 (brs, 1H), 8.64 (brs, 1H), 8.21 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 6.76 (m, 1H), 6.62 (m, 2H), 6.45 (m, 1H), 3.34 (m, 2H), 2.62 (m, 2H), 2.07 (s, 9H), 1.73 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.2, 158.7, 145.0, 143.4, 134.9, 130.4, 126.0, 125.9, 125.1, 119.1, 115.9, 115.7, 115.4, 41.2, 39.7, 36.6, 36.2, 34.9, 28.3.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 멜라닌 생성 저해효과

천연물에 존재하는 polyhydroxypropanoid로서 미백 활성을 갖는 kazinol이나 broussonin의 구조에 근거하여 디자인된 다양한 구조의 polyhydroxy benzamide 유도체를 합성하였고, 이들 화합물에 대한 멜라닌 생성 저해효과를 측정하였다. 이들 화합물들은 참고화합물인 코지산에 비해 월등한 멜라닌 생성 저해효과를 보였으며 그 결과를 Table 1에 정리하였다.

#### 3.2. 멜라닌 생성 저해효과에 대한 고찰

Polyhydroxy benzamide 화합물에서 adamantyl기가 멜라닌 생성 저해에 미치는 영향에 대해서는 이전 연구인 adamantyl *N*-benzylbenzamide 유도체의 미백활성 연구에서 살펴보았다[7]. 이 연구에서 adamantyl기에 의해 증가된 화합물의 친유성으로 인해, 멜라닌 생성 저해효과가 개선되는 결과를 얻을 수 있었다. 이에 대한 확장연구로서 polyhydroxy-benzamide의 hydroxy 치환기의 위치 및 A ring과 B ring을 연결하는 chain의

길이가 활성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 다른 측면으로는 개발관점에서 출발물질인 2,4-dihydroxybenzoic acid를 이용하는 대신 단가 면에서 유리한 4-hydroxybenzoic acid 유도체를 디자인하고자 하였다.

우선 앞선 연구에서는 adamantyl *N*-benzylbenzamide 유도체의 구조(Figure 1 참조)가 A ring과 B ring에 각각 2,4-OH, 2',4'-OH인 제한적인 구조를 갖고 있었으나, 이를 변형한 화합물 **3a**와 같이 B ring에 catechol unit (3,4-dihydroxyphenyl기)을 갖는 경우 IC<sub>50</sub> = 2.5 μM로 코지산(Kojic acid)대비 500배 이상의 우수한 미백 활성을 보였고, 탄소사슬이 하나 늘어난 화합물 **3e**의 경우도 IC<sub>50</sub> = 4.33 μM의 활성을 유지하였다. 하지만 catechol 구조를 벗어난 화합물 **3b**나 탄소사슬이 하나 늘어난 화합물 **3f**, 화합물 **3g**들은 활성을 보이지 않은 것으로 보아, 이 부분이 pharmacophore로서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 예상되었다.

A ring에서 hydroxy기가 하나 줄어든 화합물 **3h**의 경우도 IC<sub>50</sub> = 2.09 μM로 코지산 대비 700배의 우수한 미백활성을 보였다. 이같이 B ring에 catechol 구조가 유지되는 화합물 **3h**는 좋은 미백활성을 보였으나 catechol 구조가 아니거나 free OH가 OMe로 protection된 화합물 **3i**, **3j**의 경우 활성을 보이지 않았다. 또한 catechol 구조를 갖는 화합물 **3c**는 IC<sub>50</sub> = 2.57 μM로서 좋은 활성을 보였으나 dimethoxy 화합물 **3d**의 경우는 IC<sub>50</sub> = 3.86 μM로서 활성이 상대적으로 약해지는 것으로 나타나서 catechol 구조가 활성에 중요한 역할을 하고 있음을 보여 주었다.

반면 탄소사슬이 긴 화합물 **3e**와 **3h**, 탄소사슬이 짧은 화합물 **3a**와 **3c**를 각각 비교하였을 때, A ring의 2-hydroxy기의 존재여부는 상대적으로 멜라닌 생성 저해에 미치는 영향이 거의 없는 것으로 나타났다. 그리고 전체적으로 이 화합물들은 타이로시네이스에 대한 저해활성이 없는 것으로 나타났는데 그 이유는 이 물질들이 catechol unit을 갖고 있음에도 불구하고 금속이온봉쇄제(metal chelator)로 작용하고 있지 않기 때문일 것으로 예상되었다. 이 결과는 이전의 연구[7]에서 A ring과 B ring에 각각 2,4-OH, 2',4'-OH인 구조를 갖는 adamantyl *N*-benzylbenzamide 유도체들이 타이로시네이스 저해 활성을 보이는 것과 대조되는 결과이다. 한편 catechol unit을 갖는 화합물 **3a**, **3c**, **3e**, **3h**는 세포독성 측면에서도 각각의 MTT assay IC<sub>50</sub> = 29.6

μM, 46.9 μM, 24.9 μM, 34.6 μM으로 활성범위 내에서 안전한 것으로 나타났다.

## 4. 결 론

Adamantyl기를 갖는 polyhydroxy-benzamide 화합물이 멜라닌 생성 저해에 미치는 영향을 hydroxy기 위치 및 탄소 chain 길이 변화에 따른 구조변화 측면에서 살펴보았다. 화합물의 B ring에서 catechol unit은 미백 활성에 중요한 역할을 하였으며 mono-hydroxyphenyl인 경우는 활성이 감소하거나 없어졌다. 또한 이 화합물들은 catechol unit의 존재에도 불구하고 타이로시네이스 저해 활성을 보이지 않아서 금속이온봉쇄제로서 작용하지 않을 가능성이 예상되었다. 그리고 A ring과 B ring 사이의 탄소사슬의 길이는 미백 활성에 큰 영향을 주지는 않았고, A ring에서 2-OH의 존재도 활성에 중요한 영향을 끼치지 않았다. 이상의 결과들을 종합하여 의약 또는 화장품 개발측면에서 화합물 **3h**를 candidate로 선정하여 피부적용 안전성 등의 추가적인 평가를 진행하고 있다.

## Reference

1. A. K. Gupta, M. D. Gover, K. N. Nouri, and S. Taylor, The treatment of melasma: a review of clinical trials, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **55**(6), 1048 (2006).
2. S. R. Dalton, T. L. Gardner, L. F. Libow, and D. M. Elston. Contiguous lesions in lentigo maligna , *J. Am. Acad. Dermatol.*, **52**(5), 859 (2005).
3. S. -Y. Seo, V. K. Sharma, and N. Sharma, Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects, *J. Agric. Food Chem.*, **51**(10), 2837 (2003).
4. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**(2), 101 (2003).
5. S. J. Cho, J. S. Roh, W. S. Sun, S. H. Kim, and K. D. Park, N-Benzylbenzamide: A new class of potent tyrosinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(10), 2682 (2006).
6. Y. Fang, Y. Chen, G. Feng, and L. Ma, Benzyl ben-

- zoates: New phlorizin analogs as mushroom tyrosinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**(3), 1167 (2011).
7. H. S. Baek, Y. D. Hong, C. S. Lee, H. S. Rho, S. S. Shin, Y. H. Park, and Y. H. Joo, Adamantyl *N*-benzylbenzamide: New series of depigmentation agents with tyrosinase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**(5), 2110 (2012).