

1, 2-bis(aminoacyl)hydrazine 유도체들의 합성과 항산화 효과

강신원·이상운·신희대

부산대학교 화학과

Synthesis and Antioxidant Activities of 1,2-bis(aminoacyl) hydrazine derivatives

Kang, Shin-Won · Lee, Sang-Un · Shin, Hong-Dae

Dept. of Chem. Pusan National University

(Received Feb. 28, 1986)

ABSTRACT

1,2-bis(aminoacyl)hydrazine derivatives and dipeptides were synthesized by conventional peptide synthesis procedures.

Their antioxidant activity were investigated by over-storage test using corn oil as substrate.

1,2-bis(aminoacyl)hydrazine derivatives and dipeptides containing hydrophobic side chain amino acid showed higher antioxidant activity.

A free N-terminal amino group was also found to be important for the appearance of antioxidant activity.

1,2-bis(aminoacyl)hydrazine derivatives showed higher antioxidant activity than dipeptides.

Antimicrobial activities of dipeptides and 1,2-bis(aminoacyl)hydrazine derivatives were also examined by the paper disc method. All of these compounds had shown no antimicrobial 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 바람직 하지 못한 여러가지 변화를 일으키는 것으로 알려지고 있다¹⁾.

이와같은 유지의 변성을 일으키는 요인들로는 식품에 존재하는 Lipase 등과 같은 효소, Cu, Fe 와 같은 금속, 열, UV, 공기중 산소나 미생물들로서^{2,3)} 이들은 온도를 낮추거나 빛을 차단함으로써

변성의 진행정도를 어느정도 막을 수 있으나 공기 에 의한 산패는 에너지 장벽이 매우 낮기 때문에⁴⁾ 위와 같은 조작으로서는 산패를 막기가 어렵다.

산패에 의한 변성은 먼저 자동산화 반응이 일어난 후 산화 또는 비산화적 성격을 가진 다양한 2차 반응이 일어나는 것이 보통이며 식품중에서 이와같은 산패의 원인이 되는 지방산들로서는 oleic acid, linoleic acid 와 linolenic acid 등과 같은 불포화 지방산들이 주 원인이 된다⁵⁾.

이와 같은 식품중의 불포화 지방산의 산패를 방지 하는 항산화제와 그 작용 Mechanism 등은⁶⁾ 많이 연구되어 왔다.

이들 항산화제들은 대부분 phenol 계 항산화제들로서⁷⁾ 이들은 free-radical mechanism로 작용하여 유지의 산화 초기 과정에서 더 이상의 산패가 일어나지 않도록 한다¹⁾.

그런데 이와 같은 phenol 계 항산화제들은 빛이나 열에 약하고, 인체에 주는 독성 때문에 근년에는 사용이 제한되고 있는 실정이다. 한편, 최근에는 amino acid나 peptide를 항산화제로 이용하려는 연구들이 시도되고 있다⁸⁾.

Bishov 등은 protein hydrolyzate와 효소의 가수분해물이 phenol 계 항산화제의 상승작용제로 작용함을 밝혔고⁹⁻¹⁰⁾, Kawashima 등은 dipeptide들의 항산화 효과를 측정한 바 있다¹¹⁾.

그러나 dipeptide의 구조와 항산화 효과와의 관계 및 항산화 mechanism과의 관계는 아직 규명되어 있지 않고 있으므로 본 연구에서는 이들을 규명하고 추론하는데 의의를 두고 있다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에서 사용한 시약들은 사판용인 아미노산류(특급), Z-Cl(동경화학, 일본, GGR), SOCl₂(판동화학, 일본, GR), IBCF(Sigma, 미국, GR), Ninhydrin(Merck, 독일), DCC(동경화학, 일본), BHT(Sigma, 미국), DL-α-Tocopherol(tocopherol content 60%)을 사용하였으며 그의 시약 및 일반 용매들은 시약용 특급 및 일급을 그대로 사용하였다.

2. Z-AA-AA-OMe의 합성

Scheme I과 같이 Z-AA(5mmole)을 THF 2 ml에 녹인 용액에 Et₃N 0.7ml를 가하고 -10°C 이하의 냉각하에서 IBCF 0.65ml를 가하고 2분간 반응시킨후 AA-OMe HCl(5mmole)을 THF 3 ml에 녹여 Et₃N 0.7ml를 가한 용액을 위 용액에 가하였다. -10°C에서 1시간 반응시킨 후, 다시 0°C에서 24시간 반응시키고 여액을 감압농축하여 그 액을 초산에틸에 녹여 H₂O, 1N HCl, H₂O, 5% NaHCO₃, H₂O로 각각 씻고 무수 Na₂SO₄로 하루밤 건조시킨 후 감압 농축하여 결정화 하였다.

3. Z-AA-AA의 합성

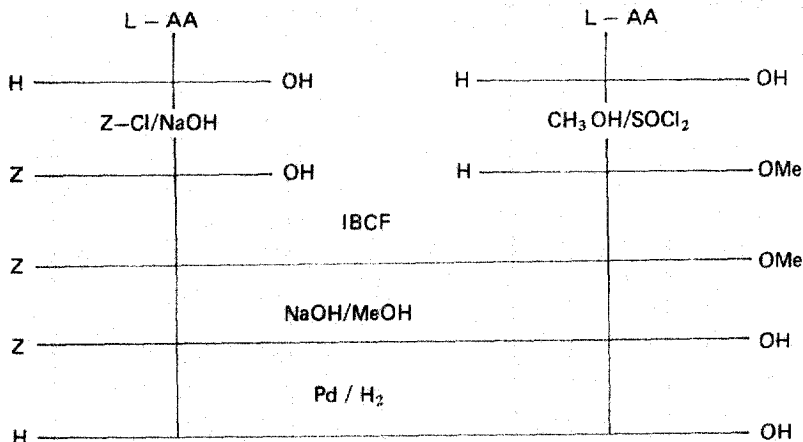
Z-AA-AA-OMe(4 mmole)을 95% 메탄올 14ml와 1N NaOH 3.9ml를 가한 후 실온에서 하루 방치하여 액을 감압 농축하고 0°C에서 1N HCl로 산성화하여 초산에틸로 추출하고 추출액을 물로 씻고 무수 Na₂SO₄로 하루밤 건조시킨 후, 여액을 감압 농축하여 생성물을 결정화 하였다.

4. AA-AA(dipeptide)의 합성

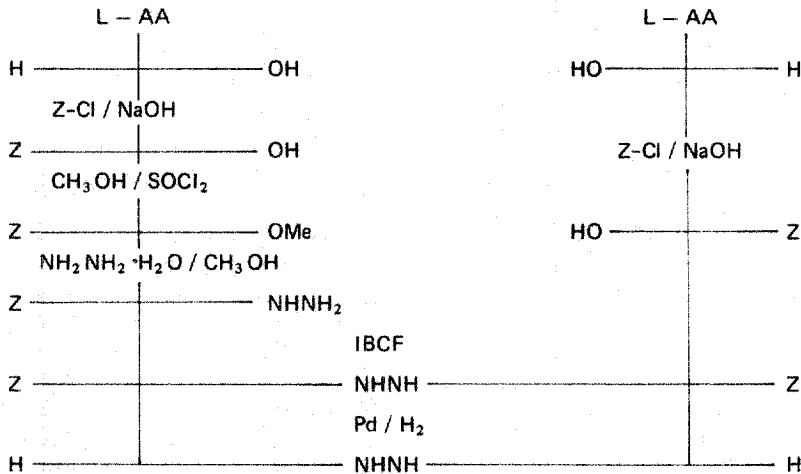
Z-AA-AA(2 mmole)을 초산에틸-메탄올(1:1, V/V) 20ml에 녹인 용액에 Pd black 0.28g을 가하고 수소를 6시간 통과시킨 후 여액을 감압 농축하여 결정화 하였다.

5. Z-AA-Hy-AA-Z의 합성

Scheme II에서의 같이 Z-AA(2mmole)을 THF



Scheme 1. Synthetic route of dipeptide and intermediate.



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

AA : Amino Acid
 Z : Benzoyloxycarbonyl
 Hy : Hydrazine

IBCF : Isobutylchloroformate
 BHT : Butylated hydroxy toluene

2ml에 녹인 용액에 Et₃N 0.28ml를 가하고 -10 °C 이하의 냉각하에서 IBCF 0.26ml를 가하고 2분간 반응시킨 후 Z-AA-Hy(2.5 mmole)을 THF 2ml에 녹여 Et₃N 0.28ml를 가한 용액을 위용액에 가했다. -10 °C 이하에서 1시간 반응시킨 후 위 실험 방법과 같이 하여 생성물을 얻었다.

Substrate로는 corn oil (POV 0.49mg/kg)을 사용하였으며, 항산화제로는 다음과 같은 합성물들을 이용하였다.

6. AA-Hy-AA의 합성

Z-AA-Hy-AA-Z(2mmole)을 초산에틸-에탄올(1:1, V/V) 28 ml에 녹인 용액에 Pd black 0.56 g을 가하고, AA-AA(dipeptide) 합성방법과 같이 하여 생성물을 얻었다.

- S₀ : Control
- S₁ : Z-AA-Hy-AA-Z
- S₂ : AA-Hy-AA
- S₃ : Z-AA-AA-OMe
- S₄ : Z-AA-AA
- S₅ : AA-AA
- S₆ : DL-α-Tocopherol
- S₇ : BHT

7. Corn Oil의 추출

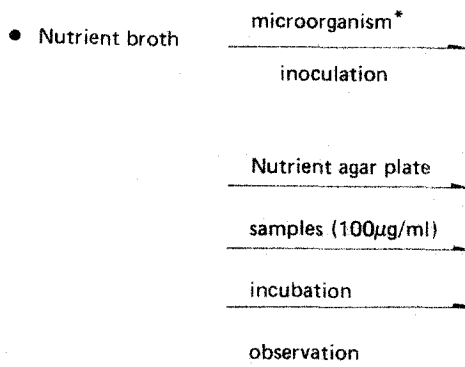
Corn oil의 추출은 Folch 방법²⁾에 따라 chloroform : methanol ; H₂O(2:1, V/V)용매로 추출한 다음 이 추출물에 methanol과 물을 가하여 chloroform : methanol : H₂O 물의 부피의 비가 1:1:0.9 (V/V/V)가 되도록 한 후 methanol : H₂O 층과 chloroform 층을 분리하여 그 중 corn oil의 가용성 부분인 chloroform 층을 감압하에 농축하였다.

이들 합성물들에 대한 POV비는 시판 항산화제인 BHT를 표준품으로 하여 oven-storage test에 의해 그들의 산패 진행정도를 POV로서 측정하였다.

8. 항산화 효과 측정

9. Antimicrobial activity 측정

합성한 각 dipeptide들과 1,2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체들의 미생물에 의한 산화의 POV값을 보정하기 위해 일반적인 5 가지 균주를 택하여 antimicrobial activity를 paper disc 법에 의해 다음과 같이 측정하였다.



* E. coli, B. Sphaeriens, B. Subtilis,
B. Ammonigens and B. Incertum

III. 결과 및 고찰

1,2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체와 dipeptide 유도체에 대한 BHT, DL- α -Tocopherol을 비교 물질로 하여 oven-storage test에 의한 항산화 효과를 Table I, II, III에 요약하였다. control(S_0)은 corn oil에 항산화제를 첨가하지 않은 상태의 POV를 측정한 값이며, 각시료의 P- OV 비는 control의 POV값을 100으로 기준 했을 때 각 합성물들을 첨가하였을 때의 POV값으로 환산한 값이다.

Table I, II, III에서 보는 바와 같이 Leu, Ile, Gly dipeptide 유도체들의 oven-storage test에 의한 항산화 효과에 있어서 N-terminal이 보호기로서 보호된 (S_1), (S_3), (S_4)들은 항산화 효과가 없었고, C-terminal이 보호기로서 보호된 (S_3)와 보호되지 않은 (S_4)의 경우 항산화 효과의 차이가 거의 없는 것으로 보아 C-terminal에의 보호기 존재 유무는 항산화 효과의 발현에 영향이 없는 것으로 보인다.

한편, N-terminal이 free한 1,2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체인 S_2 와 dipeptide인 S_5 는 좋은 항산화 효과를 보였고, 또한 1,2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체인 S_2 의 항산화 효과는 해당하는 dipeptide S_5 유도체보다 크게 나타났으며, 특히 1,2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체 S_2 들은 시판 항산화제들에 못지 않는 항산화 효과를 나타내었다. 이와 같은 사실로 N-terminal이 많을 수록 항산화 효과는 증대함을 나타낸다.

또한, 항산화 효과물 나타낸 화합물들중 side chain이 hydrophobic한 Leu, Ile 화합물들이 Gly 화합물 보다 항산화 효과가 더욱 크게 나타났다.

그리고 이들 화합물들이 유지의 산패에 작용하리라 생각되는 mechanism으로는 dipeptide 또는 1,

Table I. Antioxidant activities of isoleucine dipeptide derivatives

Peptide		POV (meg/kg)	POV
Control	(S_0)	79.8	100
Z-Ile-Hy-Ile-Z	(S_1)	72.2	90
Ile-Hy-Ile	(S_2)	18.9	24
Z-Ile-Ile-OMe	(S_3)	80.4	101
Z-Ile-Ile	(S_4)	78.0	98
Ile-Ile	(S_5)	38.4	48
DL- α -Tocopherol	(S_6)	22.4	28
BHT	(S_7)	9.9	12

Table II. Antioxidant activities of glycine dipeptide derivatives

Peptide		POV (meg/kg)	POV
Control	(S_0)	79.8	100
Z-Gly-Hy-Gly-Z	(S_1)	78.0	98
Gly-Hy-Gly	(S_2)	36.0	46
Z-Gly-Gly-OMe	(S_3)	81.7	102
Z-Gly-Gly	(S_4)	87.5	109
Gly-Gly	(S_5)	41.0	51
DL- α -Tocopherol	(S_6)	22.4	28
BHT	(S_7)	9.9	12

Table III. Antioxidant activities of leucine dipeptide derivatives

Peptide		POV (meg/kg)	POV
Control	(S_0)	79.8	100
Z-Leu-Hy-Leu-Z	(S_1)	71.8	90
Leu-Hy-Leu	(S_2)	14.5	18
Z-Leu-Leu-OMe	(S_3)	70.2	88
Z-Leu-Leu	(S_4)	75.8	95
Leu-Leu	(S_5)	33.5	42
DL- α -Tocopherol	(S_6)	22.4	28
BHT	(S_7)	9.9	12

Levels of additives were 10 μ mole for peptides.

Table IV. Antimicrobial activity of compounds

Strain Substrate	E.Coli	B.Sphaeriens	B.Ammonigenes	B.Incertum	B.Subtilis
Leu-Leu	-	-	-	-	-
Ile-Ile	-	-	-	-	-
Gly-Gly	-	-	-	-	-
Leu-Hy-Leu	-	-	-	-	-
Ile-Hy-Ile	-	-	-	-	-
Gly-Hy-Gly	-	-	-	-	-

* - : resistant

2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체들의 α proton이 유리되면서 생성되는 radical이 N-terminal 방향 또는 peptide bond의 carbonyl 방향으로 delocalization 되어 안정화 되면서 유지의 산패를 막는 mechanism으로 진행되리라 예상된다.

그리고 corn oil의 미생물에 의한 산패를 보정하기 위해 일반적인 5 가지 균주를 사용하여 paper disc 법으로 측정 한 dipeptide와 1, 2-bis(aminoacyl)hydrazine 유도체들의 antimicrobial activity를 Table IV에 나타내었다.

Table IV에서 보는 바와 같이 dipeptide와 1, 2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체들은 antimicrobial activity가 나타나지 않았으며, 이와 같은 사실로 미루어 보아 미생물에 의한 산패는 본 실험의 POV 측정치에 보정할 필요가 없었다.

IV. 결 론

유지의 산패를 억제하기 위하여 항산화제로서 dipeptide와 1, 2-bis(aminoacyl) hydrazine 유도체들을 합성하여 oven-storage test에 의해 그들의 POV를 측정하였다.

이들 화합물들의 항산화 효과의 발현에는 peptide bond를 중심으로 free한 N-terminal의 존재가 필수적이며, 또한 숫자가 많을수록 항산화 효과가 증대한다는 것을 알 수 있었고, C-terminal의 보호기 존재 여부와 항산화 효과는 상관이 없음을 알았다.

그리고 이들 화합물들의 구성 아미노산의 side-

chain의 hydrophobicity도 항산화 효과에 작용을 하는 것으로 나타났다.

문 헌

1. H.W. Gardner, J. Agric. Food. Chem., 27, 220 (1979)
2. E.R. Sherwin, J. Am. Oil. Chem. Soc., 55, 809 (1978)
3. G.M.R. Johanson, J. Am. Oil. Chem. Soc., 53, 410(1976)
4. J.J. Grog, J. Am. Oil. Chem. Soc., 55, 539 (1978)
5. Labuza, T., CRC Crit. Rev. Food. Technol., 2, 355 (1971)
6. E.H. Farrner, G.F. Bloomfield, A. Sundralingan and D.A. Sutton, Trans Faraday Soc., 38, 348 (1942)
7. 川島啓助, 伊藤博, 化學と生物, 20(4), 215 (1982)
8. S.J. Bishov and A.S. Henick., J. Food. Sci., 37, 873 (1972)
9. S.J. Bishov and A.S. Henick., ibid., 40, 345 (1975)
10. K. Kawashima, H. Itoh., Chem. Pharm. Bull., 27(8), 1912 (1979)
11. J.W. Thompson, E.R. Sherwin., J. Am. Oil Chem. Soc., 43, 683 (1966)
12. Folch, J., Lees, M. and S. Stanley, G.H., J.Biol. Chem., 226, 497 (1953)