

TỔNG HỢP TOÀN PHẦN ACETYL HEXAPEPTIDE-8 NHẪM SỬ DỤNG TRONG MỸ PHẨM

TOTAL SYNTHESIS OF ACETYL HEXAPEPTIDE-8 FOR USE IN COSMETICS

Bùi Thị Phương Hải¹, Phùng Minh Phương¹,
Đoàn Ngân Hoa², Lương Xuân Huy^{1,*}

DOI: <http://doi.org/10.57001/huiv5804.2024.280>

TÓM TẮT

Argireline là một peptid mạch ngắn có tác dụng chống lão hoá, làm giảm nếp nhăn với cơ chế tương tự như độc tố Botulium. Hiện nay, hoạt chất này được sử dụng phổ biến để làm nguyên liệu cho mỹ phẩm. Tuy nhiên, dù có tiềm năng thương mại cao, hiện chưa có công bố nào trong nước liên quan đến việc tổng hợp hoạt chất này. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào việc sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn để tạo ra Argireline, sau đó khẳng định và đánh giá độ tinh sạch của sản phẩm bằng hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS). Kết quả thu được cho thấy sản phẩm có hiệu suất tổng hợp trung bình đạt 38% với độ tinh khiết xấp xỉ 100%.

Từ khóa: Peptid mỹ phẩm; tổng hợp peptid pha rắn; argireline; acetyl hexapeptide-8; chống nhăn.

ABSTRACT

Argireline is a short-chain peptide with anti-aging properties that reduce wrinkles through a mechanism similar to Botulinum toxin. Currently, this active ingredient is widely used as a cosmetic ingredient. However, despite its high commercial potential, there have been no domestic publications related to the synthesis of this active ingredient. Therefore, this study focuses on using solid-phase peptide synthesis techniques to produce Argireline, followed by confirming and evaluating the product's purity using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results obtained show that the product has an average synthesis yield of 38% with a purity of approximately 100%.

Keywords: Cosmetic peptides; solid phase peptide synthesis; argireline; acetyl hexapeptide-8; anti-wrinkle.

¹Khoa Dược, Trường Đại học Phenikaa

²Khoa Kỹ thuật Y học, Trường Đại học Phenikaa

*Email: huy.luongxuan@phenikaa-uni.edu.vn

Ngày nhận bài: 25/6/2024

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 02/7/2024

Ngày chấp nhận đăng: 27/8/2024

1. GIỚI THIỆU

Acetyl hexapeptide-8 (AH-8) hay còn được gọi là Acetyl hexapeptide-3 là một peptid mỹ phẩm quan trọng thuộc nhóm ức chế dẫn truyền thần kinh đã được thương mại hóa với tên Argireline[®] [1]. Đây là một chuỗi peptid gồm 6 acid amin với trình tự chuỗi là Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH₂. AH-8 được tổng hợp đầu tiên năm 1995 [2, 3]. Nó được biết đến với công dụng chống lão hóa, làm giảm nếp nhăn trên khuôn mặt với cơ chế tương tự như độc tố botulium (botox). Hoạt chất này có cấu trúc gần giống với các thụ thể SNAP-25, do đó cạnh tranh vị trí gắn của các thụ thể này trên bề mặt phức hợp SNARE, làm biến đổi cấu trúc, ngăn chặn sự giải phóng acetylcholin ở các đầu dây thần kinh, từ đó làm giãn cơ [4]. Ngoài ra, nó còn ức chế bài tiết catecholamin [5, 6]. Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy hàm lượng lipid của tế bào bã nhờn giảm đáng kể sau khi điều trị bằng AH-8 [7]. Các nghiên cứu lâm sàng với AH-8 đã xác nhận tính hiệu quả và tiềm năng của hoạt chất này trong chăm sóc da [8, 9]. Năm 2002, Blanes-Mira đã mô tả một nghiên cứu có đối chứng giả dược, trong đó kem AH-8 so với giả dược được bôi hai lần mỗi ngày (10 phụ nữ, 30 ngày). Các vùng da được điều trị bằng AH-8 cho thấy sự cải thiện 30% nếp nhăn ở vùng mắt. Một nghiên cứu lâm sàng của Ruiz và cộng sự đã cho thấy lợi ích chống nhăn của nhũ tương dầu trong nước (O/W) có chứa AH-8 ở 20 người tình nguyện, trong 30 ngày, bôi tại chỗ. Kết quả nghiên cứu cho thấy những dấu hiệu tích cực đối với việc giảm độ sâu và kích thước nếp nhăn lần lượt là 59% và 41% so với nhóm đối chứng giả dược [10]. Việc sử dụng hoạt chất này cũng đã được chứng minh về độ an toàn trong nghiên cứu của Remigiusz và cộng sự năm 2021. Kết quả cho thấy peptid này an toàn trong mỹ phẩm ở nồng độ lên tới 0,005% [4]. Với nhiều bằng chứng

đã đưa ra, AH-8 được quan tâm ngày càng nhiều trong ngành công nghiệp sản xuất mỹ phẩm và được thị trường ưa chuộng.

Gần đây, nhóm tác giả Wang Huiping và cộng sự đã tổng hợp hoạt chất AH-8 sử dụng tác nhân hoạt hóa N-hydroxyphthalimide cho hiệu suất trên 83% với độ tinh sạch trên 90% [12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng tác nhân COMU là một chất hoạt hóa có độ tan tốt, ổn định, dễ theo dõi quá trình phản ứng và loại bỏ phụ phẩm [13]. Sản phẩm tổng hợp được đánh giá sơ bộ thông qua việc so sánh với chất đối chiếu từ nhà cung cấp Trung Quốc.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Các α -amino acid sử dụng là Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Met-OH (nhóm Fmoc - (9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl; nhóm Pbf - 2,2,4,6,7-pentamethyl-3H-1-benzofuran-5-yl)sulfonyl) và COMU (N-[1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy) dimethylamino (morpholino) uronium hexafluorophosphate) đều có độ tinh khiết > 98%, được mua từ hãng AK Scientific, Hoa Kỳ. Nhựa Rink Amide MBHA resin (100 - 200 mesh) (98%) được mua từ NovaBiochem, Đức. Các dung môi N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA, 99%), N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP, 99%), Dimethylformamide (DMF, 99%), Dichloromethane (DCM, 99,5%), Trifluoroacetic acid (TFA, 99%), Acetonitrile tiêu chuẩn HPLC (ACN 99,8%), Piperidin (99%) được mua từ Daejung, Hàn Quốc. Triisopropylsilane (TIS, 98%), Thioanisol (99%) được mua từ Sigma-Aldrich, Đức.

Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1260 và cột sắc ký đi kèm được mua từ Mỹ. Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ Shimadzu LC-MS/MS 8040 từ hãng Shimadzu, Nhật Bản. Ngoài ra còn sử dụng các máy ly tâm, máy lắc, bộ phản ứng Vacuum manifold, bơm chân không, máy lắc (Trung Quốc); máy lắc Vortex (Ý); máy siêu âm (Đức) và các vật tư tiêu hao như ống polypropylen, đầu tip (Trung Quốc).

Phương pháp tổng hợp

* *Nguyên tắc tổng hợp peptid pha rắn:* Quy trình tổng hợp và tinh chế hợp chất Argireline bao gồm các bước: 1. Loại bỏ nhóm Fmoc để giải phóng gốc amin tự do trên chất mang rắn Rink amide MBHA resin; 2. Gắn acid amin được bảo vệ lên chất mang rắn; 3. Loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc của acid amin vừa gắn vào chất mang rắn nhưng

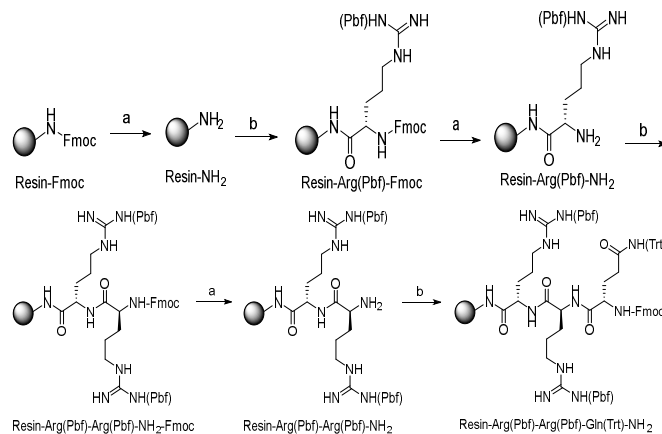
vẫn giữ nhóm bảo vệ của mạch nhánh (nếu có); 4. Tiếp tục gắn acid amin tiếp theo và quay lại bước 3 cho đến khi gắn lần lượt hết các acid amin; 5. Loại bỏ nhóm Fmoc cuối cùng, sau đó thực hiện phản ứng acetyl hoá đầu N của chuỗi peptid; và 6. Cắt đoạn peptid sản phẩm ra khỏi resin, loại bỏ nhóm bảo vệ của Arginin và tiến hành tinh chế thu hợp chất Argireline tinh sạch.

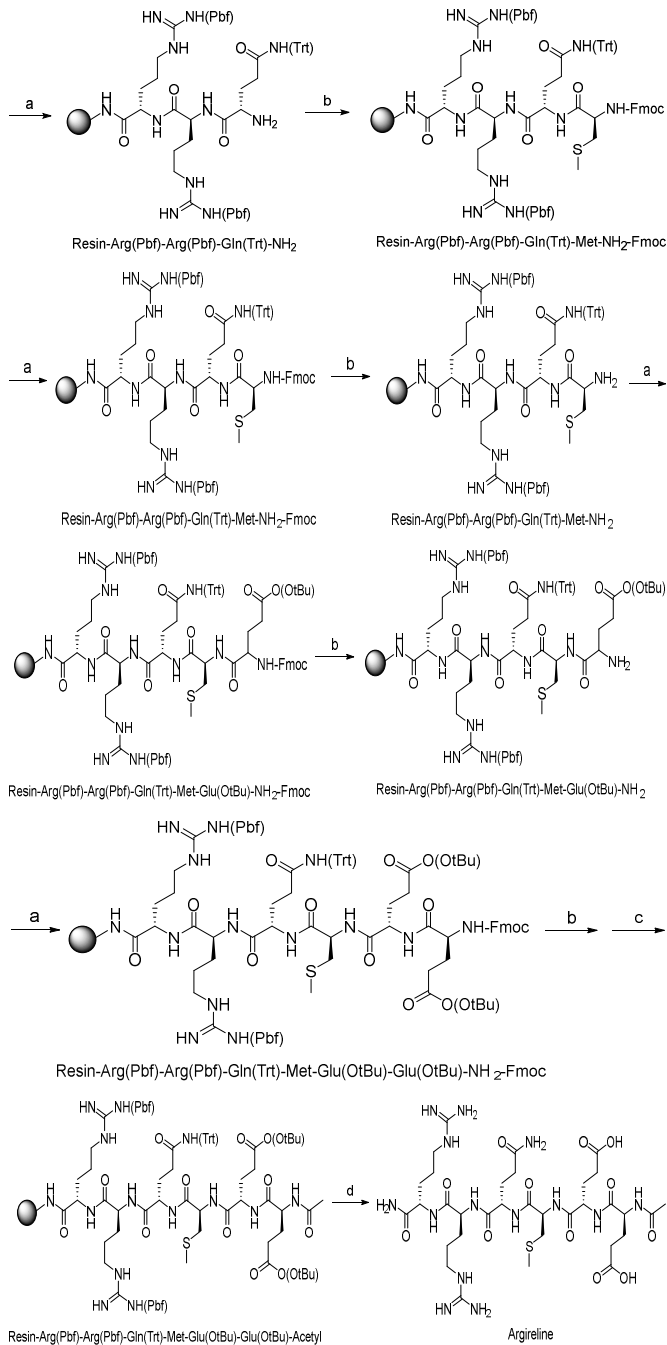
* *Thực hiện chuỗi phản ứng tổng hợp Argireline:* Resin (120 μ mol) được ngâm lắc lần lượt trong DCM (3 phút), DMF lần 1 (5 phút) và lần 2 (10 phút) trước khi dùng. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng cách sử dụng 20% piperidin/DMF. Các acid amin theo thứ tự được gắn vào bằng tác nhân COMU (tỉ lệ resin/acid amin/COMU 1/5/5) với sự có mặt của DIEA. Sau mỗi lần gắn acid amin hay loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa lần lượt bằng các dung dịch theo thứ tự DCM, DMF. Khối lượng các nguyên liệu sử dụng được trình bày cụ thể trong bảng 1. Ngoài ra, phản ứng được theo dõi bằng thuốc thử Kaiser để nhận biết sự có mặt của amin bậc 1 [11].

Bảng 1. Nguyên liệu tổng hợp Argireline

Nguyên liệu	Khối lượng mol phân tử (g/mol)	Số lần cân	Khối lượng (mg)		Thể tích DMF tương ứng (mL)	
			Mỗi lần cân	Tổng số	Mỗi lần đong	Tổng số
Resin	732,86	1	174	174		
Fmoc-Arg (Pbf)-OH	648,80	2	195	290	0,6	1,2
Fmoc-Gln (Trt)-OH	610,70	1	183	183	0,6	0,6
Fmoc-Glu-OH	425,50	2	128	256	0,6	1,2
Fmoc-Met-OH	371,45	1	111	111	0,6	0,6
COMU	428,27	5	122	610	0,6	3,0
DIEA	129,25	5	0,27mL	1,35mL		

Quy trình tổng hợp Argireline được minh họa trong hình 1.





Hình 1. Quy trình tổng hợp Argireline. Điều kiện và thuốc thử: (a) piperidin/DMF; (b) Fmoc- acid amin, COMU, DIPEA, DMF; (c) Anhydrid acetic, NMP, DIPEA; (d) TFA: TIS: Thioanisol (95:2,5:2,5).

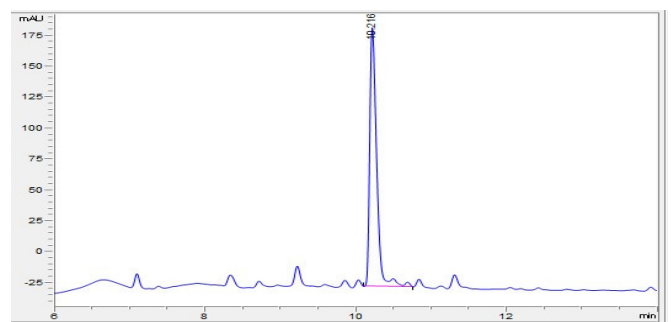
* *Tinh chế và kiểm tra độ tinh sạch:* Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa với DCM nhiều lần rồi làm khô qua đêm. Sau đó các resin được cho vào hỗn hợp TFA/TIS/Thioanisol (tỉ lệ 95/2,5/2,5) trong 2 giờ để cắt peptid ra khỏi resin và loại bỏ các nhóm bảo vệ khác rồi làm khô qua đêm. Peptid sau đó được hòa tan bằng nước và lọc để loại resin. Các peptid tiếp tục được tinh chế bằng hệ thống HPLC với cột Zorbax C₁₈ column (Agilent, 5µm, 9,4 x 250mm) với chương trình 2 - 30% B trong 11 phút,

30-100% B trong 1 phút, 100% B trong 5 phút, 100-2% B trong 2 phút, 2% B trong 2 phút; A: 0,1%TFA/H₂O, B: 0,1%TFA/Acetonitril (ACN), tốc độ dòng 3mL/min; phân tích mẫu peptid trước và sau khi tinh chế với chương trình 5-100% B trong 8 phút, 100% B trong 1 phút, 100-5% B trong 2 phút, 5% B trong 1 phút; A: 0,1%TFA/H₂O, B: 0,1%TFA/Acetonitril (ACN); tốc độ dòng 1mL/min và định tính bằng hệ thống LC-MS/MS với chương trình 30-80% B trong 2 phút, 80-30% B trong 2 phút; A: 0,1% TFA/H₂O, B: 0,1% TFA/ACN; tốc độ dòng 1mL/phút; vùng khối 50 - 2000 Dalton. Nhận biết Argireline dựa vào bước sóng đặc trưng của liên kết amid ở 220nm.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Tổng hợp và tinh chế sản phẩm

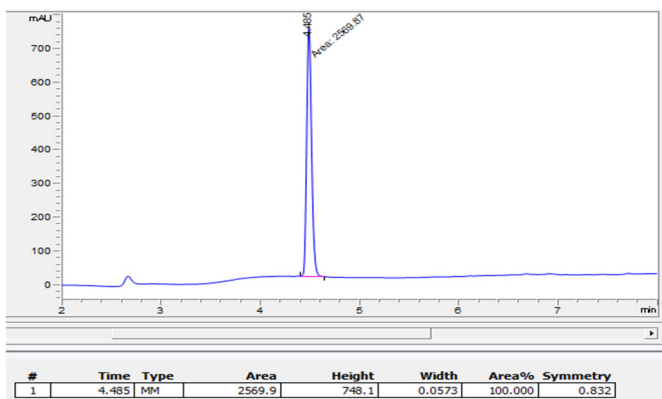
Trong quá trình gắn các acid amin theo trình tự chuỗi của Argireline, các phản ứng được theo dõi bằng thuốc thử Kaiser. Kết quả cho thấy, hỗn hợp thu được có màu vàng nhạt, chứng tỏ acid amin đã kết nối vào chuỗi trên hạt rắn, đầu amin tự do trước đó không còn nữa và bước gắn acid amin đã thành công. Tương tự, tiến hành kiểm tra mẫu peptid sau khi xử lý loại Fmoc, hỗn hợp thu được có màu xanh đậm, chứng tỏ nhóm bảo vệ Fmoc bị cắt ra khỏi chuỗi peptid để giải phóng đầu amin tự do. Trong quá trình tổng hợp, chất trung gian Argireline-3aa thu được sau khi gắn ba amino acid và vẫn còn giữ nhóm Fmoc bảo vệ (cụ thể là Fmoc-Arg-Arg-Gln-NH₂ với công thức phân tử C₃₂H₄₅N₁₁O₆) được lấy mẫu để tiến hành xác định khối lượng phân tử bằng hệ thống LC-MS. Kết quả trong bảng 2 và hình 4 cho thấy giá trị thu được phù hợp với giá trị lý thuyết, qua đó giúp khẳng định sự có mặt của sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp.



Hình 2. Sắc ký đồ quá trình chạy tinh chế Argireline. Peak có thời gian lưu 10,216 trên hình được xác nhận có số khối trùng với lý thuyết của Argireline

Sau khi quá trình tổng hợp hoàn thành, sản phẩm thô được đem đi tinh chế bằng hệ thống HPLC sử dụng cột C₁₈. Sắc ký đồ minh họa quá trình tinh chế được trình bày trong hình 2. Peak sản phẩm được xác định là peak có chỉ số thời gian lưu 10,216 phút với chỉ số khối lượng phân tử xác định bằng hệ thống LC-MS/MS trùng với giá trị lý thuyết.

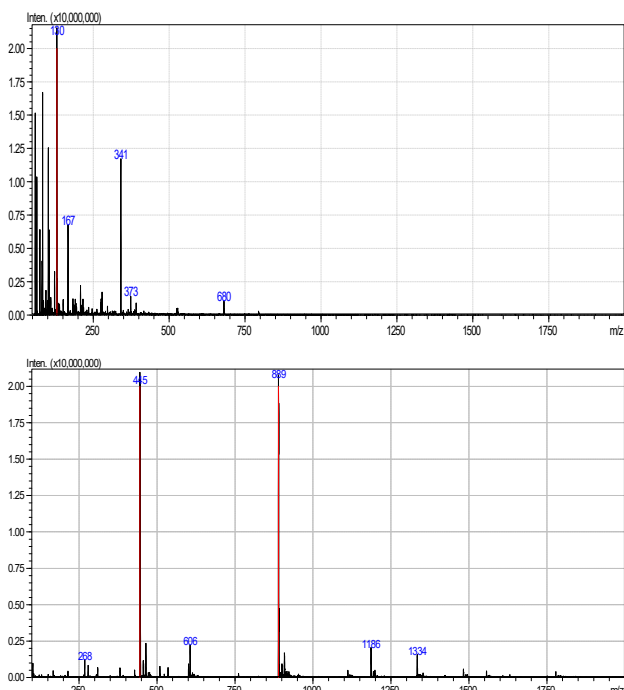
Sản phẩm sau tinh chế được kiểm tra độ tinh sạch bằng hệ thống HPLC với kết quả thể hiện trong hình 3. Độ tinh sạch là phần trăm diện tích peak sản phẩm trong tổng diện tích các peak trên sắc ký đồ (không tính các peak tạp hệ thống). Theo đó, độ tinh sạch của sản phẩm theo HPLC là xấp xỉ 100%.



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích mẫu Argireline sau tinh chế bằng hệ thống HPLC

Bảng 2. Kết quả xác định phổ khối của Argireline và chất trung gian

Sản phẩm	Công thức phân tử	Giá trị lý thuyết [M+H]	Giá trị thu được [M+H]	Sai số (%)
Argireline-3aa	C ₃₂ H ₄₅ N ₁₁ O ₆	340,6855	341,0000	0,0923
Argireline	C ₃₄ H ₆₀ N ₁₄ O ₁₂	889,4314	889,45	0,0021

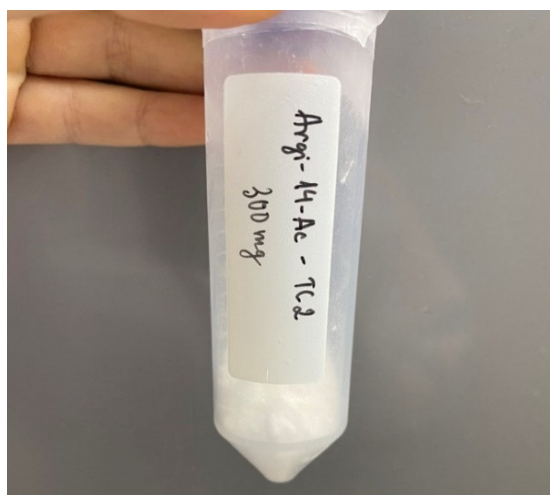


Hình 4. Phổ khối của Argireline-3aa (hình trên) và Argireline sau tinh chế (hình dưới). Kết quả được tổng hợp lại trong bảng 2

Sau đó, mẫu peptide đã được tinh chế và đánh giá độ tinh sạch bằng HPLC được đem đi xác định khối lượng

phân tử bằng hệ thống phổ khối LC-MS. Kết quả được trình bày trong hình 4 và bảng 2 cho thấy sản phẩm thu được đúng là Argireline với giá trị thu được khớp với giá trị lý thuyết.

Argireline sau tinh chế được loại bỏ bớt dung môi bằng hệ thống cất quay và tiến hành đông khô. Sản phẩm thu được ở dạng bột trắng xốp không mùi như hình 5. Kết quả thu được khoảng 350mg Argireline với hiệu suất tổng hợp trung bình đạt 38%.



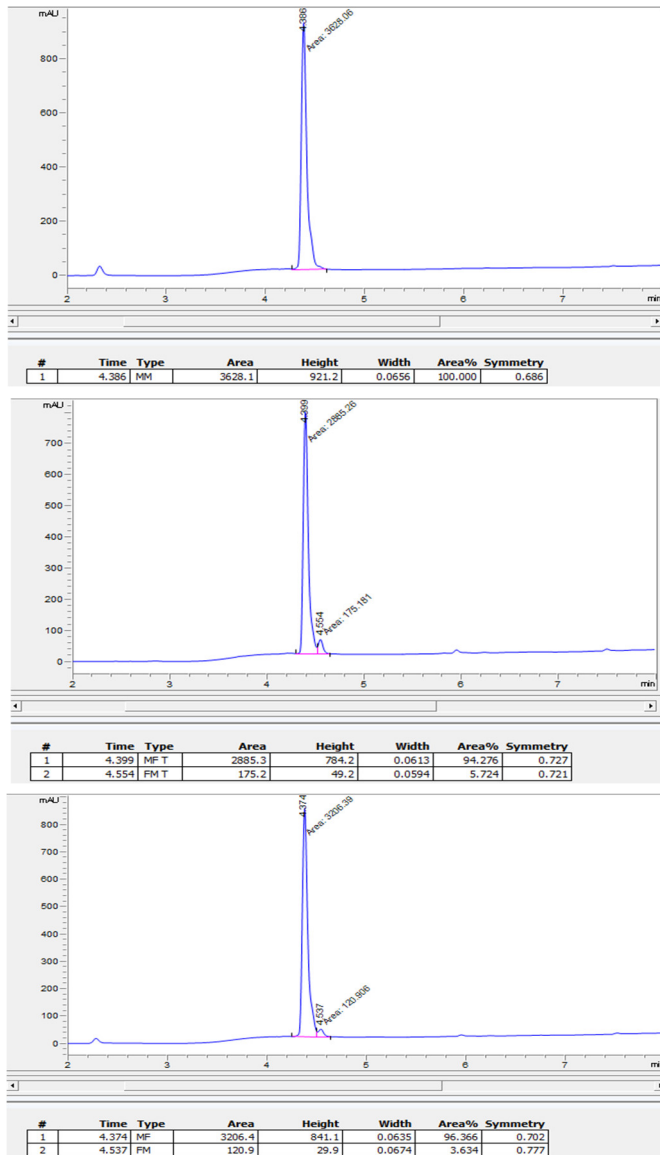
Hình 5. Argireline đông khô

So sánh sơ bộ peptide tổng hợp so với chất đối chiếu

Chất đối chiếu Argireline (kí hiệu là AH8-CN) sử dụng trong đề tài này được cung cấp bởi nhà sản xuất Trung Quốc (Spec-Chem Industry Inc.) AH8-CN nhận được có dạng bột trắng với độ tinh sạch công bố là 98,6% xác định bằng HPLC. Trước khi tiến hành phân tích, cả AH8-CN và Argireline tổng hợp được đều được pha loãng trong đệm PBS 7.4, hàm lượng 2mg/mL. Sau đó, thời gian lưu của chất đã tổng hợp và chất đối chiếu được chạy phân tích trong cùng điều kiện sắc ký. Ngoài ra dung dịch trộn giữa chất tổng hợp và chất đối chiếu (Argireline-MIX) (với tỉ lệ 1:1) cũng được phân tích. Thí nghiệm được lặp lại năm lần. Kết quả trình bày trong bảng 3 và hình 6 cho thấy, thời gian lưu trung bình của chất tổng hợp và chất đối chiếu sai lệch không quá 0,01 đơn vị. Peptide tổng hợp có độ tinh sạch cao hơn hẳn Argireline đối chiếu. Ngoài ra dung dịch trộn Argireline-MIX có độ tinh sạch cao hơn chất đối chiếu.

Bảng 3. Thời gian lưu của Argireline, AH8-CN, Argireline-MIX

Thời gian lưu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	TB
Argireline	4,386	4,383	4,378	4,377	4,379	4,381
AH8-CN	4,399	4,387	4,388	4,38	4,381	4,387
Argireline-MIX	4,374	4,373	4,375	4,371	4,371	4,373



Hình 6. Sắc ký đồ của Argireline (hình trên), AH8-CN (hình giữa) và Argireline-MIX (hình dưới) ở lần 1

4. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

Hợp chất Argireline đã được tổng hợp thành công bằng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn và tinh chế bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao. Cụ thể, sản phẩm thu được là hợp chất Argireline với độ tinh sạch xấp xỉ 100% theo HPLC, với hiệu suất tổng hợp trung bình đạt 38%. Kết quả phân tích ban đầu cho thấy sản phẩm thu được có thời gian lưu tương tự chất đối chiếu của nhà cung cấp Trung Quốc với độ tinh sạch cao hơn. Hiệu suất quá trình thấp hơn so với công bố [13] nhưng sản phẩm thu được có độ tinh sạch cao hơn. Trong thời gian tới, các nghiên cứu tối ưu hoá quy trình tổng hợp sẽ được tiến hành nhằm làm tăng hiệu suất tổng hợp. Theo tìm hiểu của nhóm nghiên cứu, đây là công bố đầu tiên trong nước về tổng hợp hoạt chất Argireline dùng trong mỹ phẩm. Vì

vậy, kết quả đạt được giúp tạo tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển các sản phẩm mỹ phẩm chống lão hoá từ các nguyên liệu peptid được sản xuất trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Errante F., et al., "Cosmeceutical Peptides in the Framework of Sustainable Wellness Economy," *Frontiers in Chemistry*, 8, 2020.
- [2]. Blanes-Mira C., J. Clemente, G. Jodas, "A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity," in *37th Annual Conference of the Australian Society of Cosmetic Chemists*, Queensland, Australia, 2003.
- [3]. Gutiérrez L.M., et al., "A peptide that mimics the carboxy-terminal domain of SNAP-25 blocks Ca(2+)-dependent exocytosis in chromaffin cells." *FEBS Lett*, 372(1): 39-43, 1995.
- [4]. Kluczyk A, Ludwiczak J, Modzel M, et al., "Chemical and biological properties of anti-wrinkle peptide Argireline," *Aesth Cosmetol Med.*, 10(3):125-133, 2021.
- [5]. Han F., et al., "Nanoliposomes codelivering bioactive peptides produce enhanced anti-aging effect in human skin," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57: 101693, 2020.
- [6]. Bucay V.W., "Cosmeceuticals using peptides, amino acids, glycosaminoglycans, and other active ingredients," in *Cosmeceuticals*, Karger Publishers, 63-72, 2021.
- [7]. Shi V.Y., et al., "The effect of synthetic acetylhexapeptide-8 (AH8) on sebaceous function," *International Journal of Cosmetic Science*, 44(4), 477-483, 2022.
- [8]. Tadini K.A., D.G. Mercurio, P.M.B.G.M. Campos, "Acetyl hexapeptide-3 in a cosmetic formulation acts on skin mechanical properties-clinical study," *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 51: 901-909, 2015.
- [9]. Raikou V., et al., "The efficacy study of the combination of tripeptide-10-citrulline and acetyl hexapeptide-3. A prospective, randomized controlled study," *Journal of Cosmetic Dermatology*, 16(2): 271-278, 2017.
- [10]. Ruiz Martínez M.A., et al., "Evaluation of the anti-wrinkle efficacy of cosmetic formulations with an anti-aging peptide (Argireline®)," *Ars Pharm*, 50, 4 168-176, 2010.
- [11]. Coin I., M. Beyermann, M. Bienert, "Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences," *Nature Protocols*, 2(12): 3247-3256, 2007.
- [12]. Wang Huiping, Liu Huimin, Ying Jiawei, Zhou Yongbing, *Solid-phase synthesis method of acetyl hexapeptide-8*. 2022.
- [13]. El-Faham A., et al., "COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents," *Chemistry - A European Journal*, 15(37): 9404-9416, 2009.

AUTHORS INFORMATION

Bui Thi Phuong Hai¹, Phung Minh Phuong¹, Doan Ngan Hoa², Luong Xuan Huy¹

¹Faculty of Pharmacy, Phenikaa University, Vietnam

²Faculty of Medical Technology, Phenikaa University, Vietnam