

## 크라이신 7-O-크로토네이트의 물성 및 육모효과

신준수 · 김연희 · 정재훈\* · 김양배 · 김박광\*

서울대학교 약학대학, \*삼육대학교 약학과

(Received February 19, 1999)

### Properties and Hair-growth Effect of Chrysin 7-O-crotonate

Joon Su Shin, Yeon Hee Kim, Jae-Hoon Cheoung\*, Yang Bae Kim and Bak-Kwang Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 152-742, Korea

\*Department of Pharmacy, Sahn Yook University, Seoul 130-650, Korea

**Abstract** — Chrysin 7-O-crotonate was synthesized by condensing crotonic acid with chrysin in organic solvent, tetrahydrofuran (THF) using dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP). Its structure was identified by NMR, MS, UV, IR etc. We also investigated the physico-chemical properties and set up the quantitative analytical method of this compound. The correlation coefficient of calibration curve measured at the isobestic point (340 nm) on this compound was approximately 0.9994 by absorption spectrophotometry. Detection limit was 1.6ng at S/N=3 by using a RP column by HPLC. The hair growth effect of chrysin 7-O-crotonate on the hair of black mouse (C57BL/6), was carried out using paste method. When its ethanol solution was administered to this black mouse by route of skin, this compound promoted the growth of hair.

**Keywords** □ chrysin 7-O-crotonate, synthesis, properties, quantitative analysis, pK, hair-growth effect.

Flavonoid는 가장 일반적인 식물 색소의 일종으로 mevalonate pathway와 shikimate pathway의 복합경로를 통해 생합성되는 화합물이다. 분자 내에 다수의 발색단을 가지기 때문에 260 nm에서 350 nm 사이의 자외선 파장을 흡수하는 성질이 강하고, 이는 자외선으로부터 식물 DNA를 보호하는 역할을 하기 때문에 식물에는 필수적인 성분으로서 藻類 이외의 모든 식물군에 분포하는 가장 많은 2차 대사산물이다. 또한 식물체 내에서 항산화작용, 식물성장에 관여하는 호르몬 조절인자로서의 역할, 효소저해제로서의 역할이 알려져 있다. Flavonoid들은 작은 구조의 차이에 따라 생리학적 활성이 다른 경우도 많이 있다. 따라서 flavonoid의 유도체를 만들어 활성을 검색하는 일은 의미 심장한 일이 될 수도 있다. 현재 flavonoid에 관한 수많은 연

구들이 진행되어 왔으나 개개 flavonoid의 유도체에 관한 연구는 상대적으로 소홀히 취급되어 왔다. Chrysin은 anti-oxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, anti-cancer, antiestrogenic 그리고 anxiolytic activities 등을 포함한 다양한 생물학적 활성을 지닌 것으로 보고되어 있으며 최근에는 HIV replication에 inhibition작용이 있으며<sup>1,2)</sup> anxiolytic effect<sup>3,4)</sup> 및 anticonvulsant effect<sup>5,6)</sup>가 있는 것으로 알려지고 있다. 최근에는 천연물의 항당뇨활성 검색,<sup>7-10)</sup> 그리고 육모제연구<sup>11-14)</sup>도 활발히 진행되고 있다.

저자 등은 이들 활성연구의 일환으로 비교적 구조가 간단한 chrysin을 택하여 연구한 바 본래 당뇨활성이 없는 물질이나 그 유도체들은 통계학적으로 유의성이 있는 활성이 나타났다. 또한 mono 치환체와 di 치환체를 역상 HPLC를 이용하여 효과적으로 분리, 확인한 바 있다. 이 활성 연구의 계속사업으로 환상구조화합물 유도체에 대한 육모활성을 검토할 목적하에 크로토닉

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-880-7481 (팩스) 02-878-1652

산을 써서 유도체를 합성한 후 그 물성 및 효능을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험방법 및 결과

### 시약 및 기기

Chrysin 및 crotonic acid 등은 시판 특급품을 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 칼럼크로마토그래프용 silica gel은 Kiesel 60(230~400 mesh ASTM Merck AA 9385), 박층크로마토그래프용 pre-coated plate는 Kiesel 60 F<sub>254</sub>(layer thickness 0.25 mm, 20×20, Merck Art.5615)을 사용하였으며, 발색은 254 nm UV lamp 및 dragendorff시약을 사용하였다. 사용한 기기로는 Gallenkamp Melting point apparatus, shimadzu UV-2100 UV-visible recording spectrophotometer, Perkin Elmer 1710 IR spectrophotometer, MS는 VG Trio-II GC/MS system, 원소분석에는 CE instrument EA 1110 등을 사용하였다. 그리고 완충액은 Shugar<sup>15)</sup>의 방법에 따라 각각 조제하였다.

### 유도체 합성

Chrysin 5.00 g[19.67 mmole], crotonic acid 2.59 g[19.67 × 1.5 mmole], dicyclohexylcarbodiimide 6.09 g[19.67 × 1.5 mmole], 4-dimethylaminopyrimidine 1.20 g을 환저플라스크에 넣고 질소가스로 치환한 후 무수 THF 150 ml를 가하고 질소가스 기류 하에서 36시간 교반하였다. 전처리 과정은 EtOAc로 희석한 다음 포화용액 NaHCO<sub>3</sub>(2 회), H<sub>2</sub>O(2 회), 5% HCl(2 회), 다시 H<sub>2</sub>O(2회), NaCl 포화용액의 순으로 세척한 다음 EtOAc층을 MgSO<sub>4</sub>로 건조하고 감압농축하여 전개용매 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(150:1)의 조건으로 silicagel column chromatography를 실시하여 얻은 미황색 분말을 MeOH로 재결정하여 침상결정 3.55 g을 얻었다.

Compound: C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>(mw: 322), 수득율: 56.04%, Rf: 0.22(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=150:1), mp: 150-155°C, Anal. cald. for C: 70.87%, H: 4.38%, Found. c: 70.05%, H: 4.29%, UV λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> nm: 270, 298, 325, IR ν<sub>max</sub> (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3200, 1748(C=O), 1651, 1622, 1450, 1351, 1241, 1189, 1131, 1037, 765, MS(EI, m/z, rel. int.): 322 [M<sup>+</sup>](7.23), 254(24.86), 224(18.91), 143

(7.80), 99 (49.13), 82(48.55), 69(100), <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 2.011~2.015 ppm(3H, m, acetyl-H), 6.034~6.077 ppm(1H, s, H<sub>a</sub>), 6.600~6.605 ppm (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 6.732 ppm(1H, s, H-3), 6.896~6.901 ppm(1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 7.214~7.261 ppm(1H, m, H<sub>b</sub>), 7.527~7.569 ppm(3H, m, H-3', 4', 5'), 7.877~7.907 ppm(2H, m, H-2',6'), 12.713~12.716 ppm(1H, s, 5OH)

### Chrysin 7-O-crotonate의 구조

합성물은 UV 스펙트럼으로부터 270, 298, 325 nm에서 공액 이중결합의 특징적인 흡수밴드를 볼 수 있었으며, 원소 분석 데이터로부터 이론치는 C 70.87%, H 4.38%이고 측정치는 C 70.05%, H 4.29%이었다. IR 스펙트럼으로부터 3200 cm<sup>-1</sup> 부근에서 OH 피크를 관찰할 수 있었고, 1748 cm<sup>-1</sup> 부근에 C=O 피크, 1651 cm<sup>-1</sup> 부근에 방향환의 C=C double bond, 1351 cm<sup>-1</sup> 부근에서 C-O 피크를 확인할 수 있었다. MS 스펙트럼으로부터 분자량 322 분자이온 피크를 확인할 수 있었다. 또한 <sup>1</sup>H-NMR로부터 2.011~2.015 ppm (3H, m)에서 acetyl-H peak, 6.034~6.077 ppm(1H, s)에서 H<sub>a</sub> peak, 6.600-6.605 ppm(1H, d, J=2.0 Hz)에서 H-6 peak, 6.732(1H, s)에서 H-3 peak, 6.896~6.901 ppm(1H, d, J=2.0 Hz)에서 H-8 peak, 7.214~7.261 ppm(1H, m)에서 H<sub>b</sub> peak, 7.527~7.569 ppm(3H, m)에서 H-3',4',5' peak, 7.877~7.907 ppm(2H, m)에서 H-2',6' peak, 12.713~12.716 ppm(1H, s)에서 5OH peak를 확인하였다. 이들 데이터로부터 chrysin의 7번 위치의 OH기가 crotonic acid와 반응하여 1분자의 H<sub>2</sub>O가 탈수된 chrysin 7-O-crotonate(C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, mw: 322)가 생성됨을 추정할 수 있었다.

### 성상

합성물은 mp 150~155°C, Rf 0.22(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 150:1), 분자식 C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>(mw: 322)인 미황색분말로서, 1 mg을 용해시키는데 필요한 용매의 량은 CHCl<sub>3</sub> 272 μl, DMF 215 μl, EtOAc 572 μl, acetone 715 μl, DMSO 215 μl이었고, EtOH, MeOH에는 거의 녹지 않으며, hexane 및 물에는 불용이었다.

### 해리 정수

화합물의 pK는 다음 식<sup>16)</sup>에 의하여 구하였다.

$$pK = pH - \log \frac{(D_{HI} - D)}{(D - D_1)}$$

상기 식에서 흡수스펙트럼 중 흡광도의 최대치를  $D_{HI}$ , 최소치를  $D_1$ 로 하고 그 중간에 있는 스펙트럼의 동일파장에 있어서의 흡광도를  $D$ 라 하였다. pH 및  $\log(D_{HI}-D)/(D-D_1)$ 를 plot하여 그 직선상의 pH축을 지나는 점으로부터 pK를 구하였다. 액성변화에 따른 화합물 메탄올용액의 흡광도는 최대흡광파장 362 nm에서 0.048(pH 6.6), 0.083(pH 7.9), 0.145(pH 8.6), 0.166(pH 8.9), 0.182(pH 10.7)였으며, 이 값들을 사용하여 계산한 pK값은 대략 8.3(상관계수 : 0.9960)이었다.

#### 액성 변화에 따른 흡수 스펙트럼

$3 \times 10^{-5} M$  chrysin 7-*O*-crotonate 메탄올 용액에 완충용액을 사용하여 pH 6.6~10.7로 액성을 변화시켜 가면서 흡수 스펙트럼 변화를 측정해 본 결과 등전점(Isobestic point)은 340 nm 였다.

#### 흡광광도법에 의한 정량

검량선 작성은  $1 \sim 10 \times 10^{-5} M$  chrysin 7-*O*-crotonate 메탄올표준액을 1 cm 셀을 사용하여 등전점 340 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선 식은  $Y=4.210 \times 10^3 X + 1 \times 10^{-4}$ (상관계수 : 0.9994)로서 양호한 직선성을 나타내었다.

#### HPLC에 의한 정량

검량선은 합성한 화합물 chrysin 7-*O*-crotonate  $1 \times 10^{-3} M$ 을  $1 \times 10^{-4} M$ 으로 희석하여 각각  $1 \sim 7 \times 10^{-5} M$ 을 이용하여 작성하였다. 칼럼은 Nova-pak  $C_{18}$  (150×3.9 mm, 4 μm)을 사용하였다. 이동상은 MeOH : 10 mM  $H_3PO_4$ (80 : 20, v/v) 이고 유속은 1.0 ml/min 이었다. UV 검출은 280 nm, 10 μl를 주입하여 측정하였다. 검량선 식은  $Y=1.3274 \times 10^{10} X + 1.1774 \times 10^4$ (상관계수 : 0.9997)로서 양호한 직선성을 나타내었고, 검출한계는 1.6 ng (S/N=3) 이었다.

#### 육모효과 실험방법

**실험동물** - 실험동물은 체중이  $20 \pm 2$  g 정도인 수컷 black mouse(C57Bl/6)를 대한실험동물에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 실험목적에 따라 3군 ; 정상대조군(30% 알코올용액), 약물처리군(2%) 및 미녹시딜

**Table I** - Hair growth effects of chrysin 7-*O*-crotonate in black mouse(C57Bl/6)

Treatment	Hair growth score (recovery ratio of the hair length × recovery ratio of the hairing area × 100)			
	16 days	20	22	24
Control	28.9 ± 6.6	52.4 ± 6.2	76.1 ± 10	82.3 ± 6.8
Minoxidil	42.1 ± 6.2	56.6 ± 9.9	89.1 ± 8.6	92.6 ± 7.2
chrysin 7- <i>O</i> -crotonate	39.6 ± 11.9	69.2 ± 8.6*	91.5 ± 10.3*	97.4 ± 5.8

Each value represents the mean ± S.D. of 6 animals.

\* indicates a significant difference from control value (\*: P<0.05).

The hair growth score was determined by recovery ratio of the hair length and the hairing area.

군(2%)으로 구분하였으며, 각 군당 실험동물은 6마리 이상을 사용하였다.

**실험재료** - 미녹시딜은 시중에서 판매되는 중외제약제품(상품명 : 볼두민)을 구입하여 사용하였고, 그 외 시약들은 Merck chemical Co.(Germany)에서 구입하였다.

**육모효과측정** - 실험동물의 등부분에 있는 털을 electric clipper(Oster #40, USA)를 이용하여 가로·세로 약 2.5 cm 넓이로 1차 제거한 후 blade shaver로 털을 깨끗하고 완전하게 2차 제거하였다. 제모 후 첫째 날로부터 24일간 처치약물을 1회/1일 실험동물의 제모된 부위에 도포하고 그 결과를 관찰하였다. 털길이의 측정은 16일, 20일, 22일, 24일(4회)에 실시하였으며, 육모정도는 털의 복원면적 % × 복원된 털길이 %를 기준으로 판정하였다. 처치약물에 의한 동물에의 기본적인 이상유무를 알기 위하여 체중의 변화를 관찰하였다.

**통계처리** - 상기 실험결과의 유의성 검정에 ANOVA test와 post hoc test로서 Newman-Keuls test를 사용하였다.

#### 결론 및 고찰

합성물인 chrysin 7-*O*-crotonate는 분자식  $C_{19}H_{14}O_5$  (mw : 322)인 미황색 분말로서, mp 150~155°C, Rf 0.22( $CHCl_3$ :MeOH=150:1), UV  $\lambda_{max}^{MeOH}$  nm: 270, 298, 325이었다. 시료는  $CHCl_3$ , DMF, EtOAc 등에는 용해되나 Hexane 및 물에는 불용이었다. 해리 정수는 Hiskey 법 즉 pH 및  $\log(D_{HI}-D)/(D-D_1)$ 를 plot하여 그 직선상의 pH축을 지나는 점으로부터 pK를 구한 결과 대략 8.3(상관계수 : 0.9960)이었다. 흡광광도법에

의한 등전점에서의 검량선 식은  $Y=4.210 \times 10^3 X + 1 \times 10^{-4}$  (상관계수 : 0.9994) 이었다. HPLC에 의한 정량에서 검량선 식은  $Y=1.3274 \times 10^{10} X + 1.1774 \times 10^4$  (상관계수 : 0.9997)로서 양호한 직선성을 나타내었고 검출한계는 1.6 ng(S/N=3)이었다. 그리고 이 물질의 육모 효과 면에 있어서는 양성대조군인 minoxidil보다 더 뚜렷한 육모효과를 나타내어, 새로운 육모제로서의 개발 가능성을 제시하는 바 급만성 독성 및 이 물질의 유도체 등에 대하여 계속 연구하고자 한다.

### 감사의 말씀

이 연구는 1998년도 복지부 기초 과제 연구비(No. 4-2-24) 및 서울대학교 종합 약학 연구소 연구비의 일부로 수행되었으며, 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

### 문헌

- Hu, C.Q., Chen, K., Shi, Q., Kikuskie, R. E., Cheng, Y.C. and Lee, K. H. : Anti-AIDS agents.10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside an anti-HIV principle from chrysanthemum-morifolium and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. of natural products-LLOYDIA*, **57**, 42 (1994).
- Critchfield, J. W., Butera, S. T. and Folks, T. M. : Inhibition fo HIV activation in latently infected-cells by flavonoid compounds. *AIDS research and human retroviruses.*, **12**, 39 (1996).
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F. and Medina, J. : Possible anxiolytic effects of chrysin. *Pharmacology biochemistry and behavior.*, **47**, 1 (1994).
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A. C., Dajas, F. and Medina, J. H. : Auxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazpin receptor ligand isolated from passiflora-coerulea. *J. of neurochemistry.*, **61**, S77 (1993).
- Medina, J. H., Paladini, A., Wolfman, C., Destein, M.L., Calvo, D., Diaz, L. E. and Pena, C. : Chrysin, a naturally occurring ligand for bensodiazepine receptors, with anticovulsant properties. *Biochemical Pharmacology.*, **40**, 2227 (1990).
- Hii, C. S. and Howell, S. L. : Effects of flavonoids on insulin secretion and  $45Ca^{2+}$  handling in rat islets of Langerhans. *J. of Endocrinol.*, **107**(1), 1 (1985).
- Kim, J. H., Kim, K. S., Park, J. H., Lee, B. J., Hur, H., Jeoung, G. H., Cheong, C. S. and Kim, B-K. : Anti-diabetic effect screening of some natural products. *J. Appl. Pharmaco.*, **4**, 291 (1996).
- Park, J. H., Kim, B-K., Park, M. K., Cho, S. Y., Lee, J. S., Han, H. K., Jeonh, G. H. and Cheong, C. S. : Anti-diabetic activity of herbal drugs, *Kor. J. Pharmacogn.*, **28**, 72 (1997).
- Shin, J. S., Kim, K. S., Jeong. G. H., Cheong, C. S., Ko, K. H., Park, J. H., Hur, H. and Kim, B-K. : Antidiabetic activity of Lycii Fructus. *Kor. J. Pharmacogn.*, **28**, 138 (1997).
- Shin, S. H., Kim, K. S., Kim, M-B., Kim, H-J., Kim, W-K., Kim, S-J. and Kim, B-K. : Properties and anti-diabetic effect of 7-O-p-fluorobenzoylchrysin. *J. Appl. Pharmaco.*, **6**, 256 (1998).
- Shin, J. S., Kim, K. S., Kang, K. H., Moon, S. J., Lee, W. Y. and Kim, B-K. : Antialopepic effect of piperidinopyrimidine derivatives. *Yakhak Hoeji.*, **40**, 340 (1996).
- Shin, J. S., Shin, Y-A., Park, J. H., Moon, D-C. and Kim, B-K. : Properties activity of the cinnamylvhloride with minoxidil., *J. Appl. Pharmaco.*, **4**, 275 (1996).
- Shin, J. S., Kim, J. H., Park, J. H., Son, E. D., Park, H-G. and Kim, B-K., Properties and analopepic effect of eugenol-cinnamic acid derivative., *SNU. J. Pharm. Sci.*, **4**, 275 (1996).
- Kim, Y. R., Shin, J. S., Kim, K. S., Kim, Y. B. and Kim, B-K. : Properties and hair-growth effect of N-Salicylamido-S-benzyl-L-cysteine., *SNU. J. Pharm. Sci.*, **22**, 10 (1997).
- Gershon J. Shugar and Jack T. Ballinger: Chemical Technician's Ready Reference Handbook, 3rd ed, McGraw-Hill, Inc., U.S.A., 655 (1990).
- Hiskey, C. F. and Downey, T. A. : The Colloid Error of Indicators, **58**, 835 (1954).