

크라이신 사이크로프로판카복실레이트의 육모효과

장지면 · 이명철 · 신준수 · 정재훈¹ · 김양배 · 김박광*
서울대학교 약학대학, ¹삼육대학교 약학과

Hair-growth Effect of Chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate

Ji Myun JANG, Myung CHUL Lee, Joon Su SHIN, Jae-Hoon CHEONG¹,
Yang Bae KIM and Bak-kwang KIM*

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

¹College of Pharmacy, Sam Yook University, Seoul 139-742, Korea

(Received March 1, 2001; accepted March 20, 2001)

Abstract – The derivative of chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate was synthesized by condensing cyclopropanecarboxylic acid with chrysin in organic solvent, and its structure was identified by NMR, MS, UV, IR etc. We also investigated the physico-chemical properties, anti-diabetic effect and set up the quantitative analytical method of this compound. The correlation coefficient of calibration curve on this compound was approximately 0.9985 by absorption spectrophotometry. And, this study was carried out to investigate the hair-growth effect of chrysin derivative to the black mouse (C57BL/6). When this derivative in ethanol solution was administered to the back of mouse by method of skin paste, this derivative promoted the hair growth of mouse.

Key words □ chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate, properties, UV, HPLC, black mouse (C57BL/6), hair-growth effect

자연계에는 생리학적 활성을 가진 많은 flavonoid 물질들이 존재하고 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 연구들이 진행되어 왔으나 개개 flavonoid의 유도체에 관한 연구는 상대적으로 소홀이 취급되어 왔다. chrysin은 최근 연구에 의해 HIV replication에 inhibition작용이 있으며(Hu, 1994; Critchfield, 1996), anxiolytic effect(Wolfman, 1994; Viola 등, 1993) 및 anticonvulsant effect(Medina, 1990)가 있는 것으로 알려지고 있다.

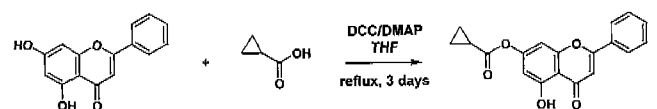
저자 등은 활성연구의 일환(Shim, 1998; Park, 1997; Shin, 1997과 1999)으로 비교적 구조가 간단한 chrysin을 택하여 연구한 바 본래 당뇨활성이 없는 물질이나 그 유도체들은 통계학적으로 유의성이 있는 활성이 나타났다. 또한 mono 치환체와 di 치환체를 역상 HPLC를 이용하여 효과적으로 분리, 확인한 바 있다. 이 활성연구의 계속사업으로 환상구조화합물 유도체에 대한 육모활성을 검토할 목적하에 사이

클로프로판카복실산을 써서 유도체를 합성한 후 그 물성 및 정량법을 검토하였으며, 또한 black mouse(C57BL/6) 피부에 도포하여 육모활성을 검색하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법 및 결과

시약 및 기기

Chrysin 및 cyclopropanecarboxylic acid 등은 시판 특급품을 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 박층크로마토그래프용 precoated plate는 Kiesel 60 F₂₅₄(layer thickness 0.25 mm, 20×20, Merck Art.5615)를 사용하였으며, 발색은 254 nm UV lamp 및 dragendorff시약을 사용하였다. 사용한 기기로는 Gallenkamp Melting point



Scheme 1. Synthesis of chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate.

*To whom correspondence should be addressed.

apparatus, shimadzu UV-2100UV-visible recording spectrophotometer, Perkin Elmer 1710 IR spectrophotometer, MS는 VG Trio-II GC/MS system, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz)은 JEOL 사 제품JMN-LA-300(Japan)을 사용하였다. 그리고 원종액은 Shugar(CTRR Handbook, 3rd ed.)의 방법에 따라 각각 조제하였다.

유도체 합성

Chrysin 5.0 g[19.67 mmole], cyclopropanecarboxylic acid 2.37 g[1.5 mmole], DCC 6.15 g[1.2 mmole], DMAP 1.32 g[1.2 mmole]을 환저플라스크에 넣고 N_2 (gas)로 치환한 후 무수THF 100 ml를 가하고 N_2 (gas) 기류하에서 36시간 교반하였다. 반응시킨 시료를 여과한 후 여과한 고체성분을 CHCl_3 에 녹인후 가열하여 다시 여과하였다. 여액을 방치하여 미황색 Product를 1.5 g을 얻었다.

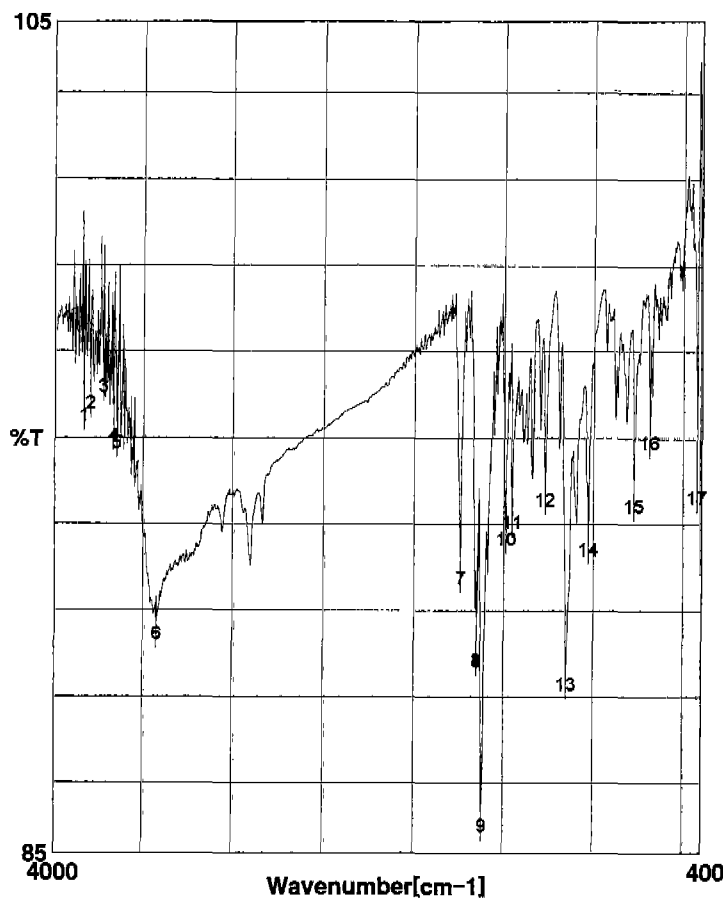
Compound

$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (mw : 322), 수득율 : 23.7%, Rf : 0.60(CHCl_3 : MeOH=50:1), mp: 166-170°C, UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm : 268, 294(sh),

328(sh), IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3443, 1740(C=O), 1650, 1620, 1486, 1452, 1267, 1145, 1024, 769, 684, MS(EI, m/z, rel.int.) : 322[M^+](77.82), 319(0.06), 293(0.87), 279(0.61), 254(100), 226(11.28), 225(8.10), 197(1.04), 169(0.39), 152(6.58), 123(16.8), 102(4.68), 69(64.74), 56(3.03), H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.080~1.128(2H, m, 3''-H), 1.215~1.255(2H, m, 3''-H), 1.872~1.911(1H, m, 2''-H), 6.608~6.612(1H, d, J=Hz, 6-H), 6.753(1H, s, 3-H), 6.897~6.901(1H, d, J=Hz, 8-H), 7.535~7.594(3H, m, 3'.4', 5'-H), 7.901~7.921(2H, d, 2', 6'-H), 12.730(1H, s, 5-OH)

화합물의 구조

합성물은 UV 스펙트럼으로부터 268, 294, 328 nm에서 공액 이중결합의 특징적인 흡수밴드를 볼 수 있었으며, IR 스펙트럼(Fig. 1)으로부터 3443 cm^{-1} 부근에서 OH 피크를 관찰할 수 있었고, 1740 cm^{-1} 부근에 C=O 피크, 1650 cm^{-1} 부근에 방향환의 C=C double bond, 1267 cm^{-1} 부근에서 C-O 피크를 확인할 수 있었다. MS 스펙트럼(Fig. 2)으로부터 분자량 322 분자이온 피크를 확인할 수 있었다. 또한



Parameter	
Accumulation	23 times
Resolution	4 cm^{-1}
Apodization	Cosine
Date/Time	00001999 1:26PM
Sample Name	CCC
Gain	1
Aperture	5.0 mm
Zero Filling	x2
Speed	4.0 mm/sec
Delay Time	0 sec
File Name	NONAME60.J1D
Light Source	Standard
Detector	1
Beam Splitter	KBr
Comment	

Copyright

Operator

Peak Information			
1	3849.22	95.8%	2 3812.58 96.1%
3	3741.23	96.4%	4 3685.30 95.3%
5	3666.02	95.1%	6 3443.28 90.7%
7	1740.44	92.0%	8 1650.77 90.0%
9	1620.88	86.2%	10 1486.85 92.9%
11	1452.14	93.3%	12 1267.00 93.8%
13	1145.51	89.5%	14 1024.02 92.6%
15	769.46	93.7%	16 684.61 95.1%
17	417.51	93.9%	

Fig. 1. IR spectrum of chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate.

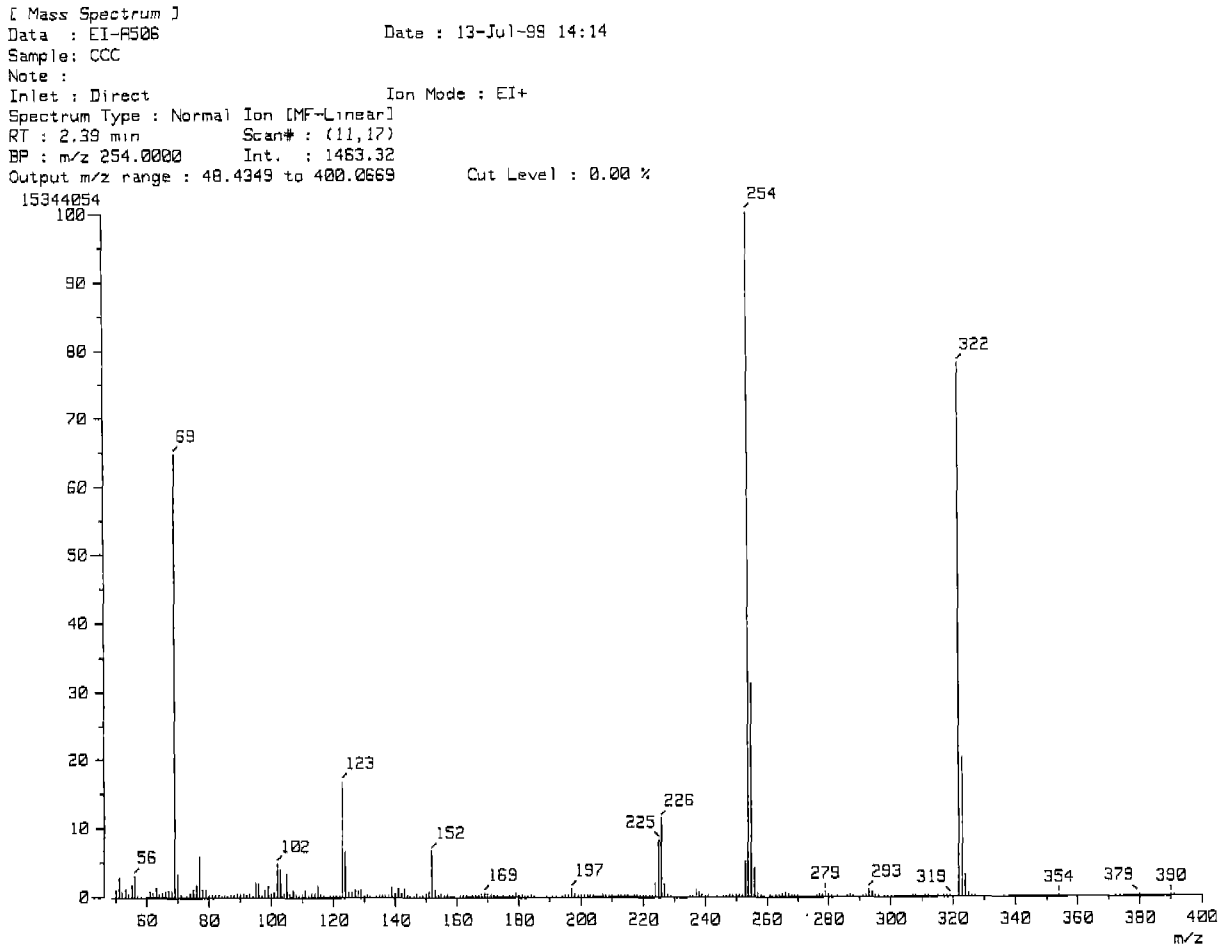


Fig. 2. MS spectrum of chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate.

¹H-NMR(Fig. 3)로부터 1.080~1.128 ppm(2H, m)에서 3"-H peak, 1.215~1.255 ppm(2H, m)에서 3"-H peak, 1.872~1.911 ppm(1H, m)에서 2"-H peak, 6.608~6.612 ppm(1H, d)에서 6-H peak, 6.753 ppm(1H, s)에서 3-H peak, 6.897~6.901 ppm(1H, d)에서 8-H peak, 7.535~7.594 ppm(3H, m)에서 3',4', 5'-H peak, 7.901~7.921 ppm(2H, d)에서 2',6'-H peak, 12.730 ppm(1H, s)에서 5-OH peak를 확인하였다. 이들 데이터로부터 크라이신의 7번 위치의 OH기가 사이클로 프로판과 반응하여 1분자의 H₂O가 탈수된 chrysin 7-O-cyclopropanecarboxylate C₁₉H₁₄O₅(mw : 322)이 생성됨을 추정할 수 있었다.

성상

합성물은 mp 166~170°C, Rf 0.60(CHCl₃:MeOH=50:1), 분자식 C₁₉H₁₄O₅(mw : 322)인 미황색분말로서, 1 mg을 용해시키는데 필요한 용매의 양은 클로로포름 100 μl, DMF 180 μl, DMSO 400 μl, 아세톤 450 μl, EtOAc 300 μl, 메탄올 30 ml, 에탄올, 헥산 및 물에는 불용이었다.

해리 점수

화합물의 pK는 다음 식(Hiskey, 1954)에 의하여 구하였다.

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

상기 식에서 흡수스펙트럼 중 흡광도의 최대치를 D_{HI}, 최소치를 D_I로 하고 그 중간에 있는 스펙트럼의 동일파장에 있어서의 흡광도를 D라 하였다. pH 및 log(D_{HI}-D)/(D-D_I)를 plot하여 그 직선상의 pH축을 지나는 점으로부터 pK를 구하였다. 즉 액성변화에 따른 화합물 메탄올용액의 흡광도는 파장 363 nm에서 0.066(pH 5.2), 0.099(pH 7), 0.114(pH 7.3), 0.192(pH 7.6), 0.192(pH 8), 0.229(pH 10) 였으며, 이 값들을 사용하여 작도법으로 계산한 pK값은 대략 7.5(corr. coeff. : 0.9890)이었다.

흡광광도법에 의한 정량

검량선 작성은 1~10×10⁻⁵M 화합물 메탄올표준액을 1 cm 셀을 사용하여 등전점(Isobestic point) 342 nm에서 흡

광도를 측정하여 작성한 검량선 식은 $Y=7.927 \times 103X+4.87 \times 10^{-3}$ (상관계수 : 0.9985)로서 양호한 직선성을 나타내었다.

액체 크로마토그래피법에 의한 정량

표준 chrysin 7-*O*-cyclopropanecarboxylate의 검량선식은 Novapak RP-18(3.9×150 mm) column을 사용하여 이동상은 MeOH : 10 mM H₃PO₄(80:20), Flow rate는 1.0 ml/min, Detection은 UV 280 nm(0.05Aufs)으로 시료 2.5 μl를 injection하여 작성하였다.

표준액조제는 합성한 chrysin 7-*O*-cyclopropanecarboxylate 1 mg을 100 ml의 메탄올에 녹인 후 1-10배 희석하여 HPLC용 표준액으로 하였다. 이 메탄올 표준액을 상기의 조건하에서 측정하여 작성한 검량선식은 $Y=1.208 \times 10^{10}X + 1.8096 \times 10^4$ (상관계수 0.9974) 이었다.

육모활성 검색

실험동물 및 시험물질

실험동물은 black mouse(C57BL/6), 생후 45~53일, 무게 23~28 g을 사용하였으며, 시험물질은 2% 에탄올시험액과 대조군으로는 minoxidil(2%), vehicle(30% alc)을 사용하였다.

검액조제 및 도포

본 화합물에 nikkol HCO 60 0.2 g(1%), glyceryl monooleate 0.2 g(0.5%)을 가한 다음 30% 에탄올을 써서 2% 시험액을 조제한 다음 제모 처리한 실험동물의 피부에 도포하여 관찰하였다. 육모효능 검색결과는 Table I과 같다.

시험방법

실험동물의 등부분에 있는 털을 electric clipper(Oster #40, USA)를 이용하여 가로·세로 약 2.5 cm의 넓이로 1차 제거한 후 blade shaver로 털을 깨끗하고 완전하게 2차 제거하였다. 제모 후 첫째날로부터 24일간 처치약물을 1회/1일 실험동물의 제모된 부위에 도포하고 그 결과를 관찰하였다. 털길이의 측정은 10일, 16일, 20일, 24일(4회)에

이루어 졌으며, 육모정도는 털의 복원면적 %×복원된 털 길이 %를 기준으로 판정하였다. 처치약물에 의한 동물에 의 기본적인 이상유무를 알기 위하여 체중의 변화를 관찰하였다. 통계처리는 상기 실험결과의 유의성 검정에 ANOVA test와 post hoc test로서 Newman-Keuls test를 사용하였다.

결론 및 고찰

합성물인 chrysin 7-*O*-cyclopropanecarboxylate은 분자식 C₂₄H₁₆O₇(mw : 416)인 미황색 분말로서, mp 166~170°C, Rf 0.60(CHCl₃ : MeOH=50:1), UV λ_{max}^{MeOH} nm : 268, 294 (sh), 328(sh)이었다. 용해성은 1 mg을 용해시키는데 필요한 용매의 양은 클로로포름 100 μl, DMF 180 μl, DMSO 400 μl, 아세톤 450 μl, EtOAc 300 μl, 메탄올 30 μl, 에탄올, 헥산 및 물에는 불용이었다. 그외 물성으로 해리정수는 Hiskey법 즉 pH 및 log(D_{H+}-D)/(D-D₁)를 plot하여 그 직선상의 pH축을 지나는 점으로부터 pK를 구한 결과 대략 7.5 이었다. 또 정량법은 1-9×10⁻⁵M 농도범위의 메탄올표준액을 등전점 342 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선 식은 $Y=7.927 \times 103X+4.87 \times 10^{-3}$ (상관계수 : 0.9985)로서 양호한 직선성을 나타내었다. 또 HPLC를 이용하여 역상칼럼과 MeOH : H₂O(80:20) 용매조건하에서 측정하여 작성한 검량선식은 $Y=1.208 \times 10^{10}X+1.8096 \times 10^4$ (상관계수 0.9974)로서 양호한 직선성을 나타내었다. 그리고 retention time은 4.9분, 검출한계는 S/N=3에서 0.1 ng 이었다.

그리고 육모시험에 있어서는 표에 표시한 바와 같이 C57BL/6 마우스의 주기인 19일을 기준으로 비교검토한 결과 크라이신의 7 위치에 사이크로푸로판카복실기가 치환될 경우에는 뚜렷한 육모현상을 나타내었다.

이상의 결과로부터 이와 유사구조인 방향환을 갖는 물질이 새로운 육모제로서의 가능성이 기대되는 바 이들 유사물질의 유도체합성 및 제반성질 등에 대하여 집중적인 연구가 필요하다고 사료된다.

Table I. Hair growth effects of CC in black mouse (C57BL/6)

Treatment		Hair growth score (recovery ratio of the hair length × recovery ratio of the hairing area × 100)			
		10	15	17	19(d)
Vehicle	(0.01N NaOH)	48.3 ± 10.8	81.2 ± 13.7	83.7 ± 9.9	91.3 ± 2.9
Minoxidil	(2%)	54.8 ± 10.6**	91.7 ± 7.6*	100 ± 0	100 ± 0
Chrysin	(2%)	47.9 ± 10.5	80.7 ± 11.7	82.8 ± 8.3	90.9 ± 3.1
CC	(2%)	55.5 ± 11.2	90.7 ± 10.9	91.3 ± 9.8	96.7 ± 4.1

Each value represents the mean ± S.D, of 6 animals. *indicates a significant difference from control value (*p<0.05, **p<0.01) by t-test. The hair growth score was determined by recovery ratio of the hair length and the hairing area. Each agent was anointed on the back of the mouse as 2% solution or suspension for 10 days. CC: chrysin 7-*O*-cyclopropanecarboxylate.

감사의 말씀

이 연구는 2000년도 BK 21 및 서울대학교 종합약학연구소 연구비의 일부로 수행되었으며, 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

참고문헌

- Critchfield, J. W., Butera, S. T. and Folks, T. M., Inhibition of HIV activation in latently infected-cells by flavonoid compounds-AIDS research and human retroviruses, **12**, iss1, p39-46 (1996).
- Gershon J. Shugar, Chemical Technician's Ready Reference Handbook, 3rd ed. 655.
- Hiskey, C. F. and Downey, T. A., The Colloid Error of Indicators, **58**, p835 (1954).
- 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**, iss 1, p42-51 (1994).
- Medina, J. H., Paladini, A., Wolfman, C., Destein, M. L., Calvo, D., Diaz, L. E. and Pena, C., chrysin, a naturally occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties-Biochemical Pharmacology, **40**, iss 10, p2227-2231 (1990).
- Park, J. H., Kim, B-K., Park, M. K., Cho, S. Y., Lee, J. S., Han, H. K., Jeong, C. S. and Jung, K. H., Anti-diabetic Activity of Herbal Drugs, *Kor. J. Pharmacogn.*, **26**, 72-74 (1997).
- Shim, S-H., Shin, J-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. Pharmacol.* **6**, 256-260 (1998).
- Shin, J. S., Kim, K. S., Jeoung, K. H., Cheong, C. S., Ko, K. H., Park, J. H., Huh, Hoon and Kim, B-K., Antidiabetic Activity of Lysii Fructus, *Kor. J. Pharmacogn.*, **28**, 138-142 (1997).
- Shin, J. S., Kim, M-B., Cheong, J. H. and Kim, B-K., Syntheses and hypoglycemic effect of chrysin derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**, 869-874 (1999).
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F. and Medina, J., Possible anxiolytic effects of chrysin, pharmacology biochemistry and behavior, **47**, Iss 1, p1-4 (1994).
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A. C., Dajas, F. and Medina, J.H., Anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from passiflora-coerulea, *J. of neurochemistry*, **61**, Iss S pS77-S77 (1993).