

고리형 알콕시기를 함유한 크리신 유도체의 합성 및 일산화질소 생성 억제작용

김성수 · 박해일*#

강원대학교 의과대학, *강원대학교 약학대학

(Received January 23, 2015; Revised February 12, 2015; Accepted February 13, 2015)

Synthesis of 8-Cycloalkoxychrysin Analogs and their Inhibitory Activity Against NO Production

Sung-Soo Kim and Haeil Park*#

School of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

*College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — Several 8-cycloalkoxychrysin analogs were synthesized from 6-benzyloxy-5,8-dihydroxyflavone and cycloalkanols in 2 steps and we evaluated their inhibitory activities against NO production from LPS-induced RAW 264.7 cells. Among tested analogs, two analogs with cyclopentyl substructure (**796** and **798**) showed strong inhibitory activity against NO production.

Keywords □ chrysin, 8-cycloalkoxychrysin, anti-inflammatory, nitric oxide (NO)

크리신(5,7-dihydroxyflavone: Fig. 1)은 항산화, 항염증 작용 등 광범위한 생리활성을 나타내는 천연 플라보노이드이다.¹⁻⁴⁾ 크리신의 항염증 작용기전은 PPAR- γ 수용체의 효능제로 작용하여 중요한 염증 전구효소인 사이클로옥시게네이스-2(COX-2) 및 체내에서 유도되는 일산화질소 합성효소(iNOS)의 기능을 억제하기 때문으로 알려져 있다.⁵⁾ 지난 몇 년간 본 실험실에서는 크리신 A-환의 구조적 변화에 따른 항염증 작용의 변화를 탐색한 결과 A-환의 6번, 8번 위치의 구조적 변화는 항염증 생리활성에 큰 영향을 미치는 연구결과를 얻었다.⁶⁻¹²⁾ 크리신 A-환의 8번 치환기의 물리화학적 및 입체적 영향이 특히 항염증 작용에 중요하다는 연구결과는 천연물로서 크리신의 8번 위치에 메톡시기를 갖는 우고닌 및 관련 합성화합물의 항염증 활성(프로스타글란딘 E₂ 생성억제력)을 비교한 아래 그림의 연구결과를 비교하면 알

수 있다(Fig. 1). 즉, 플라본의 8번 탄소에 산소가 결합된 알콕시 치환기를 갖는 화합물(OMe>OEt) 과 할로젠이 결합된 화합물의 활성이 우수한 결과(Cl=Br>I)를 보였다.¹⁰⁾ 그러나, 플라본의 8번 탄소에 탄소가 연결된 형태는 활성이 크게 저하(Me=vinylyl=allyl=Ph)되었고,⁶⁾ 전자흡인 성질의 관능기가 치환된 경우에는 극히 낮은 활성을(SO₂R=CO₂R>NO₂) 보였다.^{9,10)} 그러나 피리딜기 치환화합물은 니트로젠 위치에 따라 다른 활성을(4-Py>3-Py) 나타내었다.¹²⁾ 또한 입체적으로 큰 치환기(SMe, 4-Py)가 치환된 화합물도 활성을 보이는 점을 보면 전자적 영향이 입체적 영향에 비해 활성에 더 중요한 것으로 사료된다.^{10,12)}

염증발현의 주요 매개물질의 하나인 프로스타글란딘 E₂ 생성을 억제하는 천연물 유도체 연구는 다수가 발표되었다. 본 연구에서는 또 다른 염증발현 매개물질인 일산화질소(NO)의 생성을 억제하는 천연물 유도체 개발을 목적으로 천연 항염증 화합물인 크리신의 8번 위치에 물리화학적 성질이 다른 치환기를 도입하고, 이들 화합물의 일산화질소(NO)의 생성 억제력에 미치는 영향을 고찰하였다. 크리신 8번 위치에 비교적 입체적으로 부피가 큰 고리형 알콕시 치환기를 도입하고 이들의 일산화질소 생성억제력을 평가하여 환성 알콕시 치환기가 일산화질소

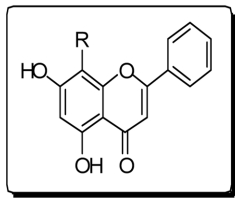
#Corresponding Author

Haeil Park

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel.: 033-250-6920 Fax.: 033-259-5630

E-mail: haeilp@kangwon.ac.kr



R=H, chrysin, 11.2%(PGE ₂); ref.7; 8.9%(NO); ref.12	R=4-Py, 92.4%(PGE ₂); 29.1%(NO); ref.12
R=OMe, wogonin, 99.2%(PGE ₂); ref.7, ref.10	R=Cl, 90.0%(PGE ₂); ref.10
R=OH, norwogonin, <10.0%(PGE ₂); ref.10	R=Br, 89.0%(PGE ₂); ref.10
R=OEt, 84.0%(PGE ₂); ref.10	R=I, 63.0%(PGE ₂); ref.10
R=Me, 44.3%(PGE ₂); 3.7%(NO); ref.12	R=NO ₂ , <10.0%(PGE ₂); ref.10
R=vinyl, 54.4%(PGE ₂); ref.6	R=SMe, 78.0%(PGE ₂); ref.10
R=allyl, 48.6%(PGE ₂); ref.6	R=CO ₂ R, <28.0%(PGE ₂); ref.9

Fig. 1 – Structures and bioactivities of reported chrysin analogs.

(NO) 생성억제력에 미치는 영향을 탐색하기 위하여 본 실험에 착수하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 시약은 시판품을 사용하였고, 추출 및 컬럼 용 용매는 국내 시약사로부터 구매한 특급용매를 별도의 정제과정을 거치지 않고 그대로 사용하였으며, 무수용매는 HPLC 등급의 해당 용매를 구입 후 별도의 건조 및 증류과정을 거쳐 얻어진 순수한 물질을 반응에 이용하였다. ¹H-NMR은 Bruker Avance 300을 사용하여 측정하였으며 내부표준 물질로 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였으며 질량분석(LRMS)은 AB SCIEX API 3200을 사용하여 측정하였다. 분석용 박층 크로마토그래피(TLC)는 Merck 제품인 실리카 젤 60F₂₅₄를 사용하였고, 일반 컬럼 크로마토그래피는 Merck 제품인 Kieselgel 60(70-200 Mesh)를, 플래시 컬럼 크로마토그래피는 Merck 제품인 Kieselgel 60(230-400 Mesh)를 사용하였다.

생리활성의 비교를 위하여 대조물질로서 사용하는 크리신은 Aldrich-Korea Chemical Co.에서 구매한 제품을 재결정 후 사용하였으며, lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Chemical Co.에서 구매하였고, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)과 FBS(fetal bovine serum)를 포함한 기타 cell culture 시약들은 Gibco(California, USA)에서 구매하여 사용하였다.

고리형 알콕시 치환 크리신 유도체(796~803)의 합성

상용의 고리형 알킬 알콜(1.0 당량)을 무수 디클로로메탄에 용해하고 트리에틸아민(1.5 당량)을 가하여 0~5°C로 냉각 후, 반응액에 메탄설포닐 클로라이드(1.2 당량)를 서서히 적하하고 실

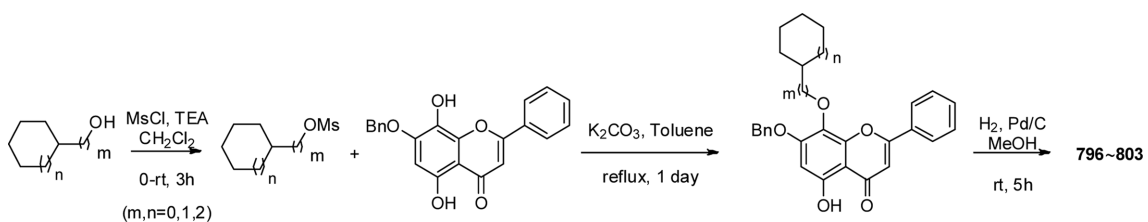
온에서 3시간 교반하였다. 박층 크로마토그래피로 반응종료 동정 후, 반응액에 디클로로메탄과 포화 식염수를 가하여 추출하고 분리된 유기층을 무수 황산마그네슘을 가하여 건조시켰다. 감압-농축 하여 얻어진 조화합물은 별도의 정제과정을 거치지 않고 다음반응에 사용하였다.

얻어진 고리형 알킬알콜의 메탄설포닐 유도체(1.3 당량)를 무수 톨루엔에 녹인 후, 기지의 합성방법에 의해 제조된 7-벤질옥시-5,8-디히드록시플라본(1.0 당량)과,¹⁰ 탄산칼륨(3.0 당량)을 가하고 24시간 가열-환류 시켰다. 반응액에 초산 에틸 에스테르를 가한 후 포화 식염수로 세척하고 무수 황산마그네슘으로 건조 후 여과하여 여액을 감압-농축하고 생성된 조화합물을 별도의 정제과정을 거치지 않고 다음 반응에 그대로 이용하였다.

고리형 알콕시가 도입된 플라본 중간체의 조화합물을 메탄올에 용해하고 10% 팔라듐(10% 몰당량)을 가한 후, 수소를 포화시킨 반응기에서 5시간 실온-교반하였다. 반응액을 여과 후 감압-농축하여 얻어지는 조화합물을 컬럼크로마토그래피(클로로포름 : 메탄올 = 200 : 1) 조건에서 분리-정제하여 목적의 8-고리형 알콕시 치환 크리신 유도체(796~803)를 31%~76% 수율로(2 단계) 8중 합성하였다(Fig. 2). 한편, 사이크로헥실메톡시 중간체의 탈벤질반응은 탈벤질 유도체 800과 탈벤질 및 플라본환의 이중결합이 환원된 유도체 802를 생성하였다.

8-(Cyclopentyloxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (796)

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 12.5(s, 1H), 7.94(m, 2H), 7.56(m, 3H), 6.68(s, 1H), 6.45(s, 1H), 6.32(s, 1H), 4.95(m, 1H), 1.84(m, 6H), 1.71(m, 2H). LRMS *m/z* calcd for C₂₀H₁₈O₅ 338.4 observed [M]⁺ 339.0.



Scheme 1 – Synthetic procedure and conditions of 8-cycloalkoxychrysin analogs (796~803).

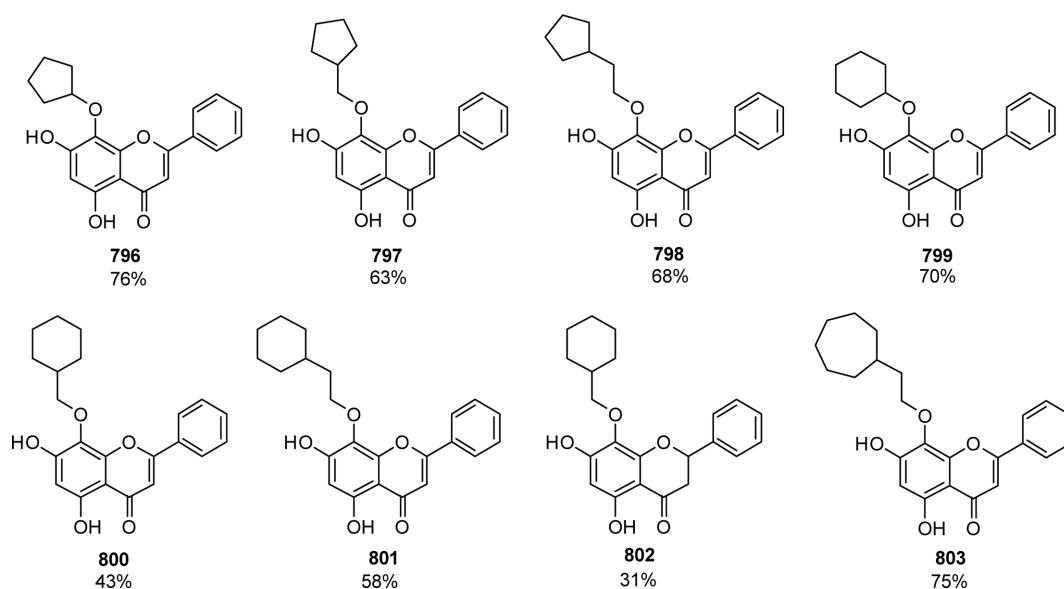


Fig. 2 – Structures of synthesized 8-cycloalkoxychrysin analogs (796–803).

8-(Cyclopentylmethoxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (797)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.53(s, 1H), 7.88(m, 2H), 7.56(m, 3H), 6.67(s, 1H), 6.45(s, 1H), 6.31(s, 1H), 4.04(d, 2H), 2.44(m, 1H), 1.91(m, 2H), 1.66(m, 4H), 1.42(m, 2H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$ 352.4 observed $[\text{M}]^+$ 352.8.

8-(2-Cyclopentylethoxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (798)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.53(s, 1H), 7.95(m, 2H), 7.55(m, 3H), 6.68(s, 1H), 6.49(s, 1H), 6.45(s, 1H), 4.18(t, 2H), 1.90(m, 5H), 1.61(m, 4H), 1.20(m, 2H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5$ 366.4 observed $[\text{M}+\text{H}]^+$ 367.7.

8-(Cyclohexyloxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (799)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.50(s, 1H), 7.89(m, 2H), 7.56(m, 3H), 6.68(s, 1H), 6.45(s, 1H), 6.31(s, 1H), 4.22(m, 1H), 2.13(m, 2H), 1.84(m, 2H), 1.59(m, 2H), 1.29(m, 4H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$ 352.4 observed $[\text{M}]^+$ 352.6.

8-(Cyclohexylmethoxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (800)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.51(s, 1H), 7.90(m, 2H), 7.56(m, 3H), 6.67(s, 1H), 6.45(s, 1H), 6.32(s, 1H), 3.93(d, 2H), 1.86(m, 6H), 1.27(m, 5H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5$ 366.4 observed $[\text{M}+\text{H}]^+$ 367.4.

8-(2-Cyclohexylethoxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (801)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.52(s, 1H), 7.89(m, 2H), 7.55(m, 3H), 6.68(s, 1H), 6.45(s, 1H), 6.36(s, 1H), 4.20(t, 2H), 1.75(m, 6H), 1.51(m, 1H), 1.25(m, 4H), 1.01(m, 2H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_5$ 380.4 observed $[\text{M}+\text{H}]^+$ 381.1.

8-(Cyclohexylmethoxy)-5,7-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one (802)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.55(s, 1H), 7.94(m, 2H), 7.55(m, 3H), 6.68(s, 1H), 6.47(s, 1H), 6.45(s, 1H), 4.19(t, 2H), 1.63(m, 10H), 1.26(m, 3H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_5$ 368.4 observed $[\text{M}+\text{H}]^+$ 369.0.

8-(2-Cycloheptylethoxy)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (803)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 12.55(s, 1H), 7.94(m, 2H), 7.55(m, 3H), 6.68(s, 1H), 6.47(s, 1H), 6.45(s, 1H), 4.19(t, 2H), 1.63(m, 12H), 1.26(m, 3H). LRMS m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_5$ 394.5 observed $[\text{M}+\text{H}]^+$ 395.7.

고리형 알록시 치환 크리신 유도체(796~803)에 대한 억제능의 측정

크리신 유도체의 NO 생성억제능 측정은 LPS로 처리한 RAW 264.7 cells을 사용하였으며, 이미 발표된 논문에 사용되었던 방법으로 측정하였다.¹³⁾ 크리신 유도체의 NO 생성 억제능을 측정

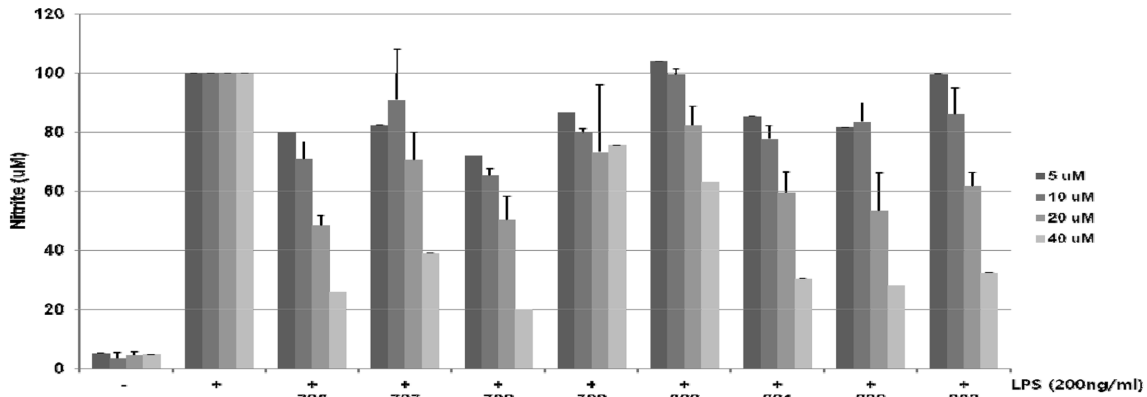


Fig. 3 – Inhibitory activity of NO production by 8-cycloalkoxychrysin analogs. Data represents arithmetic mean of triplicate experiments. % Inhibition=100×[1-NO of LPS with the chrysin analogs treated group-NO of the basal]/NO of LPS treated group-NO of the basal]. Note: Most compounds tested showed cytotoxicity at high doses (20 mM, 40 mM) on RAW cells by MTT bioassay.

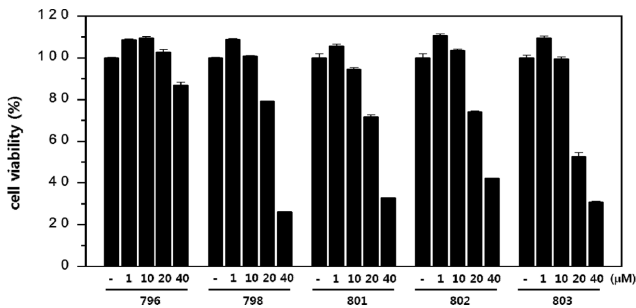


Fig. 4 – MTT bioassay results of selected 8-cycloalkoxychrysin analogs.

한 결과(Fig. 3) 및 세포독성에 관한 결과(Fig. 4)를 다음에 나타내었다.

실험결과 및 고찰

고리형 알콕시기가 8번 위치에 치환된 크리신 유도체는 구매 한 고리형성 알킬 알콜로부터 얻어진 메실 에스테르 화합물과 기지의 방법으로 제조한 7-벤질옥시-5,8-디히드록시플라본과의 축합반응 및 연속된 수소화 분해반응을 거쳐 제조하였다. 합성된 유도체들의 항염증 활성은 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 cells을 이용한 NO 생성억제능을 측정하여 평가하였다. 유도체 중 시료 **796**을 제외한 나머지 물질은 일반적으로 고농도(20 µM, 40 µM)에서 세포독성을 나타내었다. 유도체 **796**은 20%(5 mM), 30%(10 µM), 52%(20 µM), 74%(40 µM)의 매우 우수한 NO 생성억제능을 나타내었으나 40 µM 농도에서 약간의 세포독성을 보였다. 시료 **798**은 저농도(5 µM, 10 µM)에서 각각 27%, 35%의 NO 생성억제능을 보여 시료 **796**에 비해 우수하였으나, 고농도에서 세포독성을 나타내었다. 일반적으로 고리와 알콕시 산소와의 연결 알킬 사슬기의 길이가 동일할 경우 고리의 크기가 클

수록 활성은 감소하는 경향이 관찰되었다(**796**>**799**, **797**>**800**, **798**>**801**>**803**). 동일 크기의 고리일 경우 알킬 사슬의 길이(2개>0개>1개)가 활성에 미치는 경향이 관찰되었다(**798**>**796**>**797**, **801**>**799**>**800**). 또한 플라본환의 이중결합이 환원되어 플라반 화합물로 전환된 경우 활성이 증가하는 경향이 관찰되었다(**802**>**800**). 실험에서 관찰된 고리형 알콕시크리신 유도체 중에서 오각 고리형 모양을 갖는 알콕시 치환기를 8번 위치 갖는 크리신유도체의 활성은 이미 논문에 발표된 크리신의 NO 생성억제능(8.9%, 10 µM)¹²과 비교하여 매우 우수한 것으로 판명되었다.

결론

크리신 구조의 8번 위치에 고리형 알콕시기를 도입한 유도체의 NO 생성억제능을 검증한 결과, 세포독성을 나타내는 화합물 **800** 이외의 7개의 유도체는 세포독성을 보이지 않는 최고농도(10 µM)에서 15~27%의 생성억제능을 보였는데, 이는 선행 논문에서¹² 크리신이 8.9% NO 생성억제능을 갖는 데이터와 비교해 우수한 결과를 보였다. 특히, 유도체 **796**은 세포독성을 전혀 보이지 않는 최고농도(20 µM)에서 52%의 매우 강력한 NO 생성억제력을 나타내었다. 이 결과는 크리신의 8번 위치에 전자적/입체적으로 환경이 상이한 치환기를 도입하면 NO 생성억제능을 크게 변화시킬 수 있음을 암시한다. 즉, 본 연구결과는 보다 개선된 생리활성을 갖는 크리신 유도체의 개발을 위한 기초자료로서 플라본 구조 중 플라본 환의 8번 위치 구조변환이 중요함을 시사한다.

감사의 말씀

이 논문은 교육과학부 기금에 의한 한국연구재단의 기본연구(과제번호 2009-0072124: 생물활성 플라보노이드 유도체의 합성)

및 “2013년도 강원대학교 학술연구조성비(과제번호- C1009780)의 지원에 의해 수행”되었으며, 실험에 필요한 물질구조 분석 및 생리활성 검색에 사용된 기기 및 시설은 강원대학교 공동실습관 및 신약개발연구소의 도움을 받아 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

References

- 1) Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P and Brusse, R. : Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of nuclear factor kappa B and interferon regulatory factor 1. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 2178 (1996).
- 2) Pearce, F. L., Befus, A. D. and Bienenstock, J. : Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**, 819 (1984).
- 3) Fishkin, R. J. and Winslow, J. T. : Endotoxin-induced reduction of social investigation by mice: interaction with amphetamine and anti-inflammatory drugs. *Psychopharmacol.* **132**, 335 (1997).
- 4) Habtemariam, S. : Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells. *J. Nat. Prod.* **60**, 775 (1997).
- 5) Liang, Y.-C., Tsai, S. H., Tsai, D. C., Lin-Shiau, S. Y. and Lin, J. K. : Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-g by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett.* **496**, 12 (2001).
- 6) Dao, T. T., Oh, J. W., Chi, Y. S., Kim, H. P., Sin, K.-S. and Park, H. : Synthesis and PGE₂ inhibitory activities of vinylated and allylated chrysin analogues. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 581 (2003).
- 7) Dao, T. T., Kim, S. B., Sin, K.-S., Kim, S., Kim, H. P. and Park, H. : Synthesis and biological activities of 8-arylflavones. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 278 (2004).
- 8) Park, H., Dao, T. T. and Kim, H. P. : Synthesis and inhibition of PGE₂ production of 6,8-disubstituted chrysin derivatives. *European J. Med. Chem.* **40**, 943 (2005).
- 9) Jang, J., Sin, K.-S., Kim, H. P. and Park, H. : Inhibitory activity of 8-aminowogonin analogues against prostaglandin E₂ production. *Yakhak Hoeji* **52**, 85 (2008).
- 10) Gurung, S. K., Kim, H. P. and Park, H. : Inhibition of Prostaglandin E₂ production by synthetic wogonin analogs. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 1503 (2009).
- 11) Gurung, S. K., Kim, H. P. and Park, H. : Structural alteration of wogonin significantly reduce the inhibitory activity against COX-2 catalyzed PGE₂ production from LPS-induced RAW 264.7 cells. *Biomolecules & Therapeutics* **17**, 418 (2009).
- 12) Che, H., Lim, H., Kim, H. P. and Park, H. : A chrysin analog exhibited strong inhibitory activities against both PGE₂ and NO production. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4657 (2011).
- 13) Che, H., Yoon, D. H., Kim, T. W., Sung, G.-H. and Park, H. : Synthesis and biological evaluation of militarin derivatives. *Yakhak Hoeji* **56**, 372 (2012).