

## 7-O-파라플루오로벤조일크라이신의 물성 및 혈당강하효과

심상희 · 신준수 · 김명범 · 김화정<sup>1</sup> · 김원기<sup>2</sup> · 김성진<sup>3</sup> · 김박광\*

서울대학교 약학대학, <sup>1</sup>이화여자대학교 약학대학

<sup>2</sup>이화여자대학교 의과대학, <sup>3</sup>경희대학교 치과대학

### Properties and Anti-diabetic Effect of 7-O-p-Fluorobenzoylchrysin

Sang-Hee SHIM, Joon-Su SHIN, Myoung-Bum KIM, Hwa-Jeoung KIM<sup>1</sup>  
Won-Ki KIM<sup>2</sup>, Sung-Jin KIM<sup>3</sup> and Bak-Kwang KIM\*

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

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Ewha Women's University, Seoul 132-174, Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Ewha Women's University, Seoul 132-174, Korea

<sup>3</sup>College of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

(Received August 2, 1998; accepted September 3, 1998)

**Abstract** - 7-o-p-Fluorobenzoylchrysin was synthesized by condensing p-fluorobenzoic acid with chrysin in organic solvent, and its structure was identified by NMR, MS, UV, and IR. We also investigated the physico-chemical properties, hypoglycemic effect, and the quantitative analysis method of this compound. The correlation coefficient of calibration curve on this compound was approximately 0.9945 by absorption spectrophotometry and 0.9989 by high performance liquid chromatography. 7-o-p-Fluorobenzoylchrysin was resolved in 6.014 min by reversed-phase HPLC column with solvents consisting of methanol (80%) and 10mM phosphoric acid. Its blood glucose inhibition rate is 20.7%.

**Keywords** □ 7-o-p-fluorobenzoylchrysin, synthesis, properties, UV, anti-diabetic

자연계에는 생리학적 활성을 가진 많은 Flavonoid 물질들이 존재하고 있다. Flavonoid는 분자내에 다수의 발색단을 가지므로 260 nm에서 350 nm사이의 자외선을 흡수하며 분자내의 phenolic OH기가 있어 항균작용이 있다(Ryu 등, 1989). 이외에도 항산화작용, 이뇨작용, 항모세혈관투과, 항allergy 등의 역할이 알려져 있다(Ryu 등, 1989). 이러한 flavonoid들은 구조의 작은 차이에 따라 생리학적 활성이 다른 경우도 많이 있다. 따라서 flavonoid유도체를 만들어 활성을 검색하는 일은 매우 의미있는 연구가 될 수도 있다. 현재 flavonoid에 관한 수많은 연구들이 진행되어 왔으나 개개 flavonoid의 유도체에 관한 연구는 상대적으로 소홀이 취급되어 왔다. Chrysin의 이제까지 알려진 작용으로는 anti-oxidant(Hecker 등, 1996), anti-inflammatory(Fishkin 와 Winslow, 1997), anti-cancer(Habtemariam, 1997; Liu 등, 1992), anxiolytic(Wolfman 등, 1993), antiestrogenic(Kao 등, 1998) 등이 있다. 저자 등은 환상구조화합물 유도체에 대한 항 당뇨 활성을 검토할 목적으로 chrysin과 p-fluorobenzoic

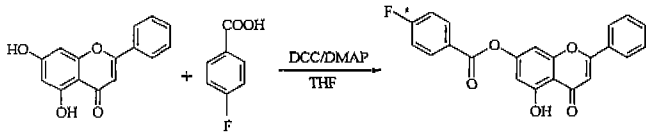
acid을 축합반응을 이용하여 유도체(7-o-p-fluorobenzoylchrysin)를 합성한 후 그 물성 및 in vivo 항당뇨 효능을 검토하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

#### 실험재료 및 방법

##### 시약 및 기기

Chrysin(Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A.) 등은 시판 특급품을 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 칼럼크로마토그래프용 silica gel은 Kiesel 60(230-400 mesh ASTM Merck AA 9385, Germany), 박층크로마토그래프용 precoated plate는 Kiesel 60 F<sub>254</sub>(layer thickness 0.25 mm, 20×20, Merck Art.5615, Germany)를 사용하였으며, 발색은 254 nm UV lamp 및 dragendorff시약을 사용하였다. 사용한 기기로는 Büchi Melting Point B-540, shimadzu UV-2100UV-visible recording spectrophotometer, Perkin Elmer 1710 IR spectrophotometer, MS는 VG Trio-II GC/MS system 등을 사용하였다. 그리고 완충액은 Shugar의 방법(Gershon 와 Jack, 1990)에 따라 각각 조제하였다.

\* To whom correspondence should be addressed.



Scheme 1. Synthesis of 7-o-p-fluorobenzoylchrysin.

### 유도체 합성

Chrysin 5 g [19.67 mmole], *p*-fluorobenzoic acid 4.22 g [19.67×1.5 mmole], *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide 6.09 g [19.67×1.5 mmole], 4-dimethylaminopyridine 1.20 g [cat.] 을 환저플라스크에 넣고  $N_2$ (gas)로 치환한 후 무수 THF 150 ml를 가하고  $N_2$ (gas) 기류하에서 36시간 교반하였다. MeOH 50 ml를 가하여 반응을 종결한 후 감압증발하고  $CHCl_3$ :MeOH(150:1)의 용매조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 얻은 미황색 분말을 MeOH로 재결정하여 product 7.2 g을 얻었다.

### 당뇨실험 물질 및 동물

본 연구실에서 합성한 7-o-p-fluorobenzoylchrysin을 실험 물질로 사용하였다. 실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐(체중 200 g내외)를 실내온도  $20 \pm 2^\circ C$ 에서 물과 고형사료(삼양사)를 공급하면서 1주일간 환경에 적응시켰다.

### 당뇨유발

실험동물을 16시간 절식시킨 후 랫트의 꼬리정맥에 streptozotocin(STZ)을 주사하여 당뇨를 유발시켰다. 이때 STZ는 citrate완충액(pH 4.5)에 녹여 사용하였고, 그 투여량은 체중에 주는 영향을 검토한 실험에서 가장 완만한 체중 감소를 보인 45 mg/kg BW로 하였으며 투여 부피는 2 ml/kg BW로 하였다. 꼬리정맥에 STZ 주사 24시간 후에 랫트의 안구정맥총에서 모세관을 이용하여 혈액을 채취하여 이를 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈장을 취하여 혈당을 측정하여 당뇨발생 여부를 확인하였다. 혈장중의 포도당 농도가 300 mg/dl 이상인 것을 당뇨가 유발된 것으로 판정하고 실험에 사용하였다.

### 혈당강하작용 검색

당뇨가 유발된 흰쥐를 1군을 7마리로 하여, 일정량의 시료를 2% tween 20에 녹여 1일 1회, 7일간 경구투여하였다. 약물의 최종투여 24시간 후 ether로 마취시키고 안구정맥총에서 채혈한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈장을 시료로 사용하였다. 고형사료 및 물은 충분히 공급하였다. 혈장내 포도당의 농도는 glucose E-kit(영동제약)를 이용하여 glucose oxidase법으로 측정하였다. 통계처리는 대조군과 실험군간의 유의성 검증은 Student's test를 사용하여 p값이 5%미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

Blood glucose inhibition rate는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{B_0 - B_7}{B_0} \times 100$$

$B_0$ =시험물질 투여 전의 blood glucose level(mg/dl)

$B_7$ =시험물질 투여 7일 후의 blood glucose level(mg/dl)

### 실험결과

#### 화합물의 구조

합성물은 UV 스펙트럼으로부터 229, 268, 327 nm에서 공액 이중결합의 특징적인 흡수밴드를 볼 수 있었으며, IR (neat) 스펙트럼으로부터  $3,448\text{ cm}^{-1}$  부근에서 OH 피크를 관찰할 수 있었고,  $1,747\text{ cm}^{-1}$  부근에 C=O peak,  $1,617\text{ cm}^{-1}$  부근에 방향환의 C=C double bond,  $1,342\text{ cm}^{-1}$  부근에서 C-O 피크를 확인할 수 있었다. 원소 분석 스펙트럼으로부터 이론치가 carbon의 경우 70.277%, proton의 경우 3.485%인데 비해 실측치가 carbon이 69.115%, proton이 3.525%로 거의 유사함을 알 수 있었다. MS 스펙트럼으로부터 분자량 376 분자이온 피크를 확인할 수 있었다. 또한  $^1\text{H-NMR}$ 로부터 6.681-6.688 ppm( $^1\text{H}, d, J=2.2\text{ Hz}$ )에서 H-6 peak, 6.743 ppm(1H, s)에서 H-3 peak, 6.970-6.978 ppm(1H, d,  $J=2.4\text{ Hz}$ )에서 H-8 peak, 7.160-7.226 ppm(2H, m)에서 H-2", H-6" peak, 7.516-7.548 ppm(3H, m)에서 H-3', H-4', H-5' peak, 7.869-7.901 ppm(2H, dd)에서 H-2', H-6' peak, 8.198-8.238 ppm(2H, dd)에서 H-3", H-5" peak, 12.756 ppm(1H, s)에서 5-OH peak를 확인하였다.  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 로부터 H-3", H-5"와 H-2", H-6"가 coupling하고, H-2', H-6'와 H-3', H-4', H-5'가 coupling하며, H-6와 H-8이 coupling함을 알 수 있었다.  $^1\text{H-}^{13}\text{C COSY}$ 로부터 6.681-6.688 ppm의 수소(H-6)가 105 ppm의 탄소와 coupling하고, 6.743 ppm의 수소(H-3)가 106 ppm의 탄소와 coupling하며, 6.907-6.978 ppm의 수소(H-8)가 101 ppm의 탄소와, 7.160-7.226 ppm의 수소(H-2", H-6")가 116 ppm의 탄소 2개와, 7.516-7.548 ppm의 수소(H-3', H-4', H-4')가 129 ppm의 탄소 3개와, 7.869-7.901 ppm의 수소(H-2', H-6')가 125 ppm의 탄소와, 8.198-8.238 ppm의 수소(H-3", H-5")가 133 ppm의 탄소 2개와 coupling함을 알 수 있었다. 이들 데이터로부터 Chrysin의 7번 위치의 OH기가 *p*-fluorobenzoic acid와 반응하여 1분자의  $\text{H}_2\text{O}$ 가 탈수된 7-o-p-fluorobenzoylchrysin( $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{FO}_5$ , mw 376)이 생성됨을 추정할 수 있었다.

Compound:  $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{FO}_5$ (mw: 376), 수득율: 97.3%, Rf: 0.18 ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH=100:1), Anal Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{FO}_5$ : C, 70.277; H, 3.485. Found: C, 69.115; H, 3.525. mp: 192-196 $^\circ\text{C}$ , UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm: 229, 268, 327, IR  $\nu_{\text{max}}$ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3448, 1747(C=O), 1655, 1617, 1489, 1453, 1342, 1296, 1256, 1190, 1141, 1061, 848, 754, 680, MS(EI, m/z, rel.int.)

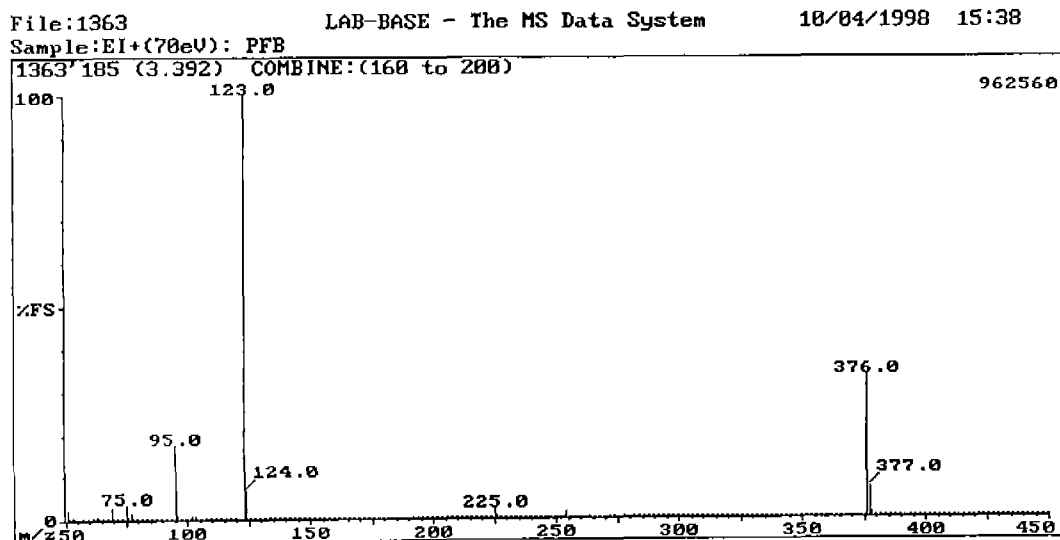


Fig. 1. Mass spectrum of 7-*o-p*-fluorobenzoylchrysin.

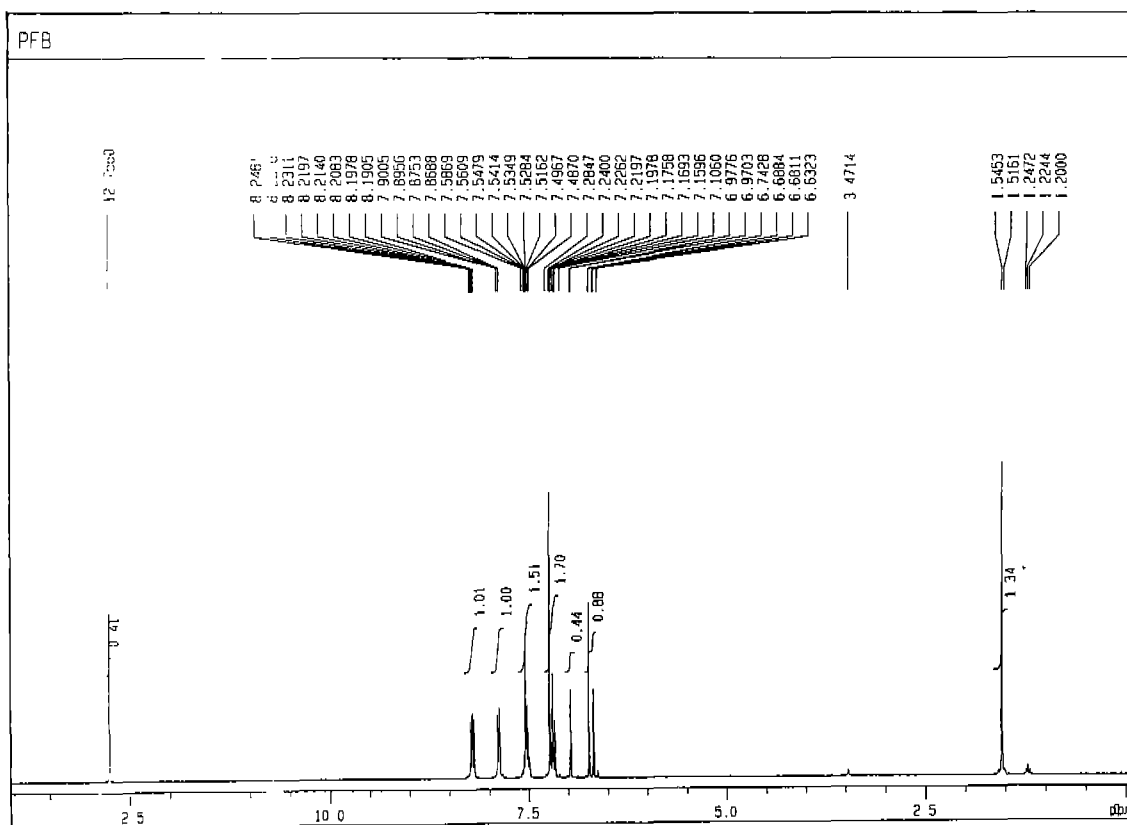


Fig. 2. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 7-*o-p*-fluorobenzoylchrysin.

: 376[M<sup>+</sup>](33.62), 254(1.43), 225(2.43), 123(100), 95(17.42), 75(3.42), <sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.681-6.688 ppm(1H, d, J=2.2, 6-H), 6.743 ppm(1H, s, 3-H), 6.970-6.978 ppm(1H, d, J=2.4, 8-H), 7.160-7.226 ppm(2H,m,2'-H,6'-H), 7.516-7.548 ppm(3H,m,3'-H,4'-H,5'-H), 7.869-7.901ppm(2H,dd,2'-

H,6"-H), 8.198-8.238 ppm(2H, dd, 3"-H, 5"-H), 12.756 ppm (1H, s, 5OH).

#### 성상

합성물은 mp 192-196°C, Rf 0.18(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=100:1), 분자식 C<sub>22</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>5</sub>(mw:376)인 미황색분말로서, 1 mg을 용

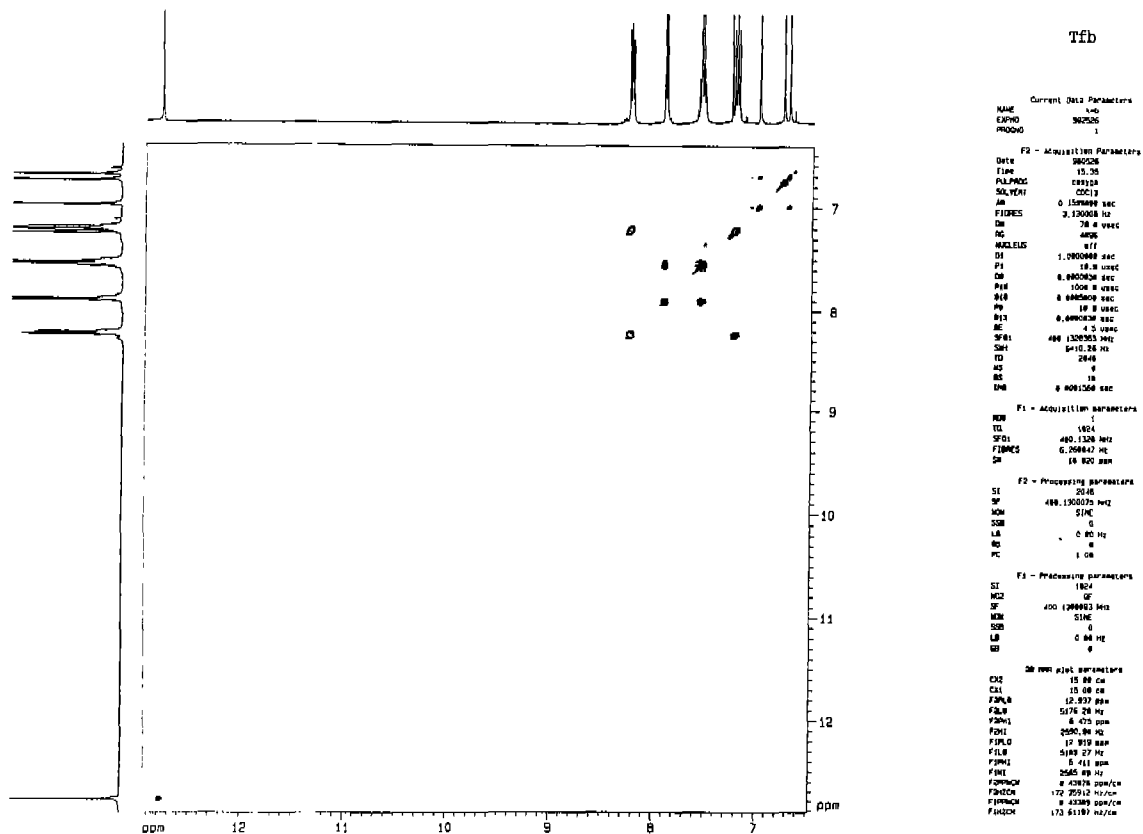


Fig. 3. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum of 7-o-p-fluorobenzoylchrysin.

해시키는데 필요한 용매의 량은 클로로포름 0.5 ml, EtOAc 1 ml, 아세톤 1.5 ml, DMF 2 ml, 메탄올 8 ml, 헥산 45 ml에 녹으며, 물, DMSO 및 에탄올에는 불용이었다.

**합성품의 정량**

**정량1.(흡광광도법)**

검량선 작성은 1-7 × 10<sup>-5</sup> M 화합물 메탄올표준액을 1 cm 석영셀을 사용하여 최대흡광파장 268 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선 식은 Y=3.166 × 10<sup>4</sup>X-5.47 × 10<sup>3</sup> (상관계수: 0.9945)로서 양호한 직선성을 나타내었다.

**정량2.(HPLC법)**

7-o-p-Flourobenzoylchrysin의 표준액 조제는 합성한 7-o-p-flourobenzoylchrysin 1 × 10<sup>-3</sup> M을 조제한 다음 0.2 μl

**Table I.** Analytical condition of HPLC.

Column	: Nova-Pak C-18 (3.9 × 290 mm 4 μm)
Mobile phase	: MeOH : 10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> =80 :
Flow rate	: 1.0 ml/min
Detection	: 280 nm
Injection volume	: 10 μl

syringe filter로 여과하고 3-9 × 10<sup>-5</sup> M로 희석하여 HPLC용 검액으로 사용하였으며 Table I과 같은 조건 하에서 정량하였다. 검량선 식은 Y=5.036 × 10<sup>9</sup>X+1.5384 × 10<sup>5</sup>(상관계수: 0.9989)로서 양호한 직선성을 나타내었고 검출한계는 3.76

**Table II.** Effect of p-fluorobenzoylchrysin on blood glucose level in diabetic rats

Group	Dose (mg/kg)	No. of animal	Blood glucose level (mg/dl)		Inhibition rate
			0 day	7 day	
Control	-	7	447.7 ± 120.5	356.2 ± 147.7	20.4
Chrysin	45	7	482.4 ± 46.4	503.5 ± 62.5	-4.4
7-O-p-Fluorobenzoyl chrysin	40	7	458.2 ± 40.6	363.5 ± 182.5	20.7
7-O-benzoyl chrysin	40	7	537.7 ± 68.8	492.5 ± 68.8	8.4

Values are mean ± S.D., Significantly different from the control (\*p<0.05).

ng이었고 회수율은 94.5%였다.

#### 당뇨실험결과

당뇨실험 결과, Table II에 보이는 바와 같이 chrysin 자체가 혈당강하 효과가 전혀 없는 것에 비해 7-*o-p*-Flourobenzoylchrysin은 0일에 비해 7일째 blood glucose level이 약 20이상 감소됨을 확인할 수 있었다.

#### 결론 및 고찰

Chrysin과 p-fluorobenzoic acid를 축합하여 합성한 7-*o-p*-fluorobenzoylchrysin은 분자식  $C_{22}H_{13}FO_5$ (mw: 376)인 미황색 분말로써 그 구조는 Mass,  $^1H$  NMR,  $^1H$ - $^1H$  COSY,  $^1H$ - $^{13}C$  COSY 등으로 확인 할 수 있었다. 그 성상에 있어 용해도는 클로로포름 0.5 ml, EtOAc 1 ml, 아세톤 1.5 ml, DMF 2 ml, 메탄올 8 ml, 헥산 45 ml에 녹으며, 물, DMSO 및 에탄올에는 불용이었다. 정량법에 있어 흡광광도법에 의한 최대흡광파장에서의 검량선 식은  $Y=3.166 \times 10^4 X - 5.47 \times 10^3$ (상관계수: 0.9945)로 양호한 직선성을 나타내었다. HPLC 법에 의해 MeOH: 10 mM  $H_3PO_4=4:1$ 의 용매 조건으로 정량한 검량선식은  $Y=5.036 \times 10^9 X + 1.5384 \times 10^5$ (상관계수: 0.9989)로 역시 양호한 직선성을 나타내었으며 retention time은 6.014 min, 검출한계는 3.67 ng, 회수율은 약 94.5%였다. 그리고 이 물질의 항 당뇨효과 측면에서 7-*o-p*-benzoylchrysin의 혈당 감소율이 8.4%인 것에 비해 7-*o-p*-fluorobenzoylchrysin의 혈당 감소율은 20.7%로 현저히 높은 것으로 보아 플루오르가 혈당 강하에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

#### 감사의 말씀

이 연구는 1997년도 과기처 G7 선도기술개발연구비의

일부로 수행되었으며, 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

#### 참고문헌

- Fishkin, R. J. and Winslow, J. T. (1997). Endotoxin-induced reduction of social investigation by mice: interaction with amphetamine and anti-inflammatory drugs. *Psychopharmacology (Berl)* **132**, 335.
- Gershon, J. S. and Jack, T. B. (1990). Chemical Technician's Ready Reference Handbook, p. 655. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Habtemariam, S. (1997). Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha in L-929 tumor cells. *J. Nat. Prod.* **60**, 775.
- Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P. and Busse R. (1996). 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.
- Kao, Y. C., Zhou, C., Sherman, M., Loughton, C. A. and Chen, S. (1998). Molecular basis of the inhibition of Human aromatase (Estrogen Synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: ASite-directed mutagenesis study. *Environ. Health Perspect.* **106**, 85.
- Liu, Y. L., Ho, D. K., Cassady, J. M., Cook, V. M. and Baird, W. M. (1992). Isolation of potential cancer chemopreventive agents from Eriodictyon californicum. *J. Nat. Prod.* **55**, 357.
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F. and Medina, J. (1994). Possible anxiolytic effects of chrysin, *pharmacology biochemistry and behavior* **47**, 1.
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A. C., Dajas, F. and Medina, J. H. (1993). Anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazpin receptor ligand isolated from passiflora-coerulea. *J. of neurochemistry*, **61(S)**, S77.
- 유경수, 한대석, 유승조, 정보섭, 성충기. (1989). 천연물화학, p.219. 영림출판사, 서울.