

헤테로 고리를 갖는 크리신 유도체의 합성 및 항염증 작용에 대한 평가

차해연 · 트루옹넉투엔[†] · 김현표 · 박해일[#]

강원대학교 약학대학

(Received September 28, 2011; Revised November 16, 2011; Accepted November 18, 2011)

Synthesis of Chrysin Analogs with a Heteroaryl Group and Evaluation for their Anti-inflammatory Activities

Haiyan Che, Ngoc Tuyen Truong[†], Hyun Pyo Kim and Haeil Park[#]

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

[†]Present address: Ho Chi Minh City University of Medicine & Pharmacy, 41-43 Dinh Tien Hoang St. Dist. 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Abstract — Chrysin analogs with 2-heteroaryl groups were synthesized and evaluated for their inhibitory activities against PGE₂ and NO production from LPS-induced RAW 264.7 cells. Chrysin analogs were synthesized from 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-acetophenone and heteroaryl aldehydes in 3 steps. The tested chrysin analogs showed decreased inhibitory activity against PGE₂ and NO production than those of chrysin.

Keywords □ chrysin, 2-heteroaryl, anti-inflammatory, PGE₂, nitric oxide

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 수 년에 걸쳐, 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.⁶⁻⁹ 이와 같은 크리신에 대한 구조-활성 상관관계 연구의 일환으로 본 연구에서는 크리신의 2번 위치에 존재하는 페닐기를 생물학적 동등기

(bioisosteric groups)에 해당하는 퓨란, 피리미딘, 티오펜을 치환시킨 유도체(Fig. 1)를 합성하고 항염증 작용을 비교하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 시약은 시판품을 사용하였고, 추출 및 컬럼용 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-NMR 및 ¹³C-NMR은 Bruker Avance 300 및 Bruker DPX 400을 사용하여 측정하였으며 내부표준 물질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. 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. 용점측정은 Fischer 제품의 microscopic melting point apparatus를 사용하여 측정하였으며 이에 대한 보정은 하지 않았다.

생리활성의 비교를 위하여 대조물질로서 사용하는 크리신은 Aldrich-Korea Chemical Co.에서 구매한 제품을 재결정 후 사용하였으며, LPS는 Sigma Chemical Co.에서 구매하였고,

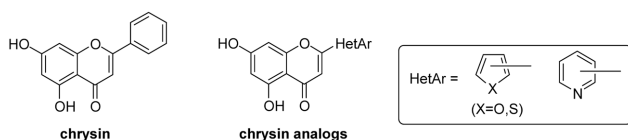


Fig. 1 – Chemical structures of chrysin and its analogs.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6920 (팩스) 033-255-7865
(E-mail) haeilp@kangwon.ac.kr

DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)과 FBS(fetal bovine serum)를 포함한 기타 cell culture 시약들은 Gibco (California, USA)에서 구매하여 사용하였다. 대조물질로 사용한 NS-398(*N*-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methanesulfonamide)은 COX-2 특이적 억제제로, AMT(2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4*H*-1,3-thiazine hydrochloride)는 iNOS 억제제로 사용하였다.

크리신 유도체(1a~1e) 합성

기지의 방법으로 제조한 2-히드록시-4,6-디메톡시아세토펜(1당량)과¹⁰⁾ KOH(4당량)을 MeOH 혹은 MeOH과 THF(2:1) 혼합용액에 녹인 후, 1당량에 해당하는 헤테로아릴 알데히드를 가하고 실온 혹은 40°C에서 철야교반 하였다. 반응종료 후 3% 염산 수용액을 가하여 중화 하고 침전되는 고체를 여과 후 MeOH을 사용하여 재결정해서 고체상의 살콘을 얻었다. 얻어진 살콘을 DMSO에 녹인 후 1당량의 요오드를 가한 후, 100°C에서 철야교반 하였다. 반응액을 냉각하고 과량의 티오황산나트륨 수용액을 가하여 잔류 요오드를 제거하고 침전된 고체를 여과하여 MeOH을 사용하여 재결정 하여 얻어진 플라본을 클로로포름에 용해하고 냉각 시킨 후, 4~5 당량에 해당하는 클로로포름에 희석 시킨 BBr₃를 서서히 적가하였다. 반응액을 가열환류 상태에서 철야교반 후 냉각 시키고 과량의 MeOH을 가하여 과량의 BBr₃를 분해 후 염기를 가하여 중화 후 감압 농축하였다. 잔사를 컬럼 크로마토그램을 수행하여 순수한 2-페닐기 위치에 다양한 헤테로환을 갖는 크리신 유도체(1a~1e)를 각각 34%~56% 수율로 합성하였다.

2-(Furan-2-yl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one(1a)의 합성

16%; yellow solid; mp 256°C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.79(s, 1H, 5-OH), 10.91(s, 1H, 7-OH), 8.05(d, 1H, J=1.3 Hz, H3'), 7.42~7.43(d, 1H, J=3.5 Hz, H5'), 6.79~6.81(dd, 1H, J=3.5 Hz, 1.8 Hz, H4'), 6.56(s, 1H, H3), 6.41~6.42(d, 1H, J=2.0 Hz, H8), 6.20(d, 1H, J=2.0 Hz, H6); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO): δ 182.0(C-4), 165.3(C-2), 162.4(C-7), 157.8(C-9), 155.9(C-5), 148.3(C-1'), 145.9(C-3'), 115.4(C-4'),

114.0(C-5'), 104.8(C-10), 103.6(C-3), 99.4(C-6), 94.9(C-8).

2-(Furan-3-yl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one(1b)의 합성

22%, yellow solid; mp 262°C; ¹H-NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ 12.77(s, 1H, 5-OH), 11.18(s, 1H, 7-OH), 8.49(s, 1H, H2'), 7.82~7.83(t, 1H, J=2.1 Hz, H4'), 7.07(m, 1H, H5'), 6.64(s, 1H, H3), 6.44(d, 1H, J=2.0 Hz, H8), 6.19~6.20(d, 1H, J=2.0 Hz, H6).

5,7-Dihydroxy-2-(thiophen-2-yl)-4*H*-chromen-4-one(1c)의 합성

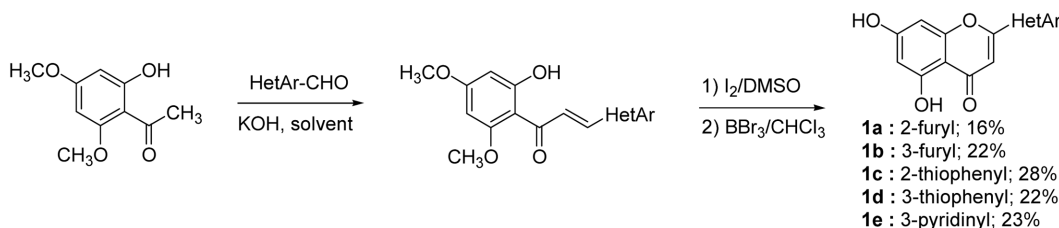
28%; yellow solid; mp 277°C; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.82(s, 1H, 5-OH), 10.87(s, 1H, 7-OH), 8.00~8.01(d, 1H, J=2.5 Hz, H3'), 7.96~7.97(d, 1H, J=4.8 Hz, H5'), 7.26~7.29(t, 1H, J=4.6 Hz, H4'), 6.80(s, 1H, H3), 6.40(d, 1H, J=1.9 Hz, H8), 6.19~6.20(d, 1H, J=1.9 Hz, H6); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO): δ 182.2(C-4), 165.2(C-2), 162.3(C-7), 160.0(C-9), 157.8(C-5), 134.6(C-1'), 133.0(C-3'), 130.8(C-4'), 129.9(C-5'), 104.7(C-10), 104.3(C-3), 99.9(C-6), 94.8(C-8).

5,7-Dihydroxy-2-(thiophen-3-yl)-4*H*-chromen-4-one(1d)의 합성

22%; yellow solid; mp 275~277°C; ¹H-NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ 12.79(s, 1H, 5-OH), 11.19(s, 1H, 7-OH), 8.39~8.41(dd, 1H, J=2.6 Hz, 1.5 Hz, H4'), 7.68~7.73(m, 2H, H2' & H5'), 6.77(s, 1H, H3), 6.48~6.49(d, 1H, J=2.1 Hz, H8), 6.19~6.21(d, 1H, J=2.1 Hz, H6).

5,7-Dihydroxy-2-(pyridin-3-yl)-4*H*-chromen-4-one(1e)의 합성

23%; yellow solid; mp 300°C; ¹H-NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ 12.79(s, 1H, 5-OH), 11.19(s, 1H, 7-OH), 9.18~9.19(d, 1H, J=1.6 Hz, H2'), 8.77~8.79(dd, 1H, J=4.6 Hz, 1.1 Hz, H4'), 8.19~8.24(m, 2H, H5 & H6'), 7.48~7.51(dd, 1H, J=8.0 Hz, 5.0 Hz, H5'), 6.85(s, 1H, H3), 6.48~6.49(d, 1H, J=2.1 Hz, H8), 6.19~6.21(d, 1H, J=2.1 Hz, H6).



Scheme 1 – Synthetic procedure for 2-heteroaryl chrysin analogs (1a~1e).

Table I – Inhibition of PGE₂ and NO production from LPS-treated RAW 264.7 cells

Compounds	mM	% inhibition of PGE ₂ production	% inhibition of NO production
NS-398	0.1	99.3 ^{a)}	NT
AMT	1.0	NT	98.7
Chrysin	10.0	74.0	8.9
1a	10.0	27.5	_{b)}
1b	10.0	60.3	7.6
1c	10.0	73.8	0.8
1d	10.0	44.9	2.2
1e	10.0	29.7	3.1

^{a)}Data represents arithmetic mean of triplicate experiments. % Inhibition = $100 \times [1 - (\text{PGE}_2(\text{NO}) \text{ of LPS with the flavones treated group} - \text{PGE}_2(\text{NO}) \text{ of the basal}) / (\text{PGE}_2(\text{NO}) \text{ of LPS treated group} - \text{PGE}_2(\text{NO}) \text{ of the basal})]$. NT: not tested, ^{b)}not active. Note: All compounds tested did not show cytotoxicity on RAW cells by MTT bioassay. LPS treatment to RAW cells increased PGE₂ and NO concentration of 202.8 ± 15.0 nM and 29.1 ± 0.5 μM from the basal levels of 0.6 ± 0.3 nM and 0.7 ± 0.2 μM, respectively (n=3, mean±SD).

크리신 유도체(1a~1e)에 대한 PGE₂ 및 NO 억제능의 측정

크리신 유도체의 COX-2 촉매에 의해 생성된 PGE₂ 생성 억제능 및 iNOS에 의한 NO 생성억제능 측정은 LPS로 처리한 RAW 264.7 cells을 사용하였으며, 이미 발표된 논문에서 사용되었던 방법으로 측정하였다.¹¹⁾ 크리신 유도체의 PGE₂ 및 NO 생성 억제능을 측정한 결과는 Table I에 나타내었다.

실험결과 및 고찰

크리신 유도체는 구매한 2-히드록시-4,6-디메톡시아세토페논과 알데히드의 축합반응을 포함하여 3단계 과정을 거쳐 제조하였다. 합성된 크리신의 유도체들의 항염증 활성은 LPS-induced RAW 264.7 cells을 이용한 COX-2 촉매 PGE₂ 생성 억제 및 iNOS 매개에 의한 NO 생성 억제능(Table I)을 측정하여 평가하였다. 3-푸라닐 유도체(**1b**) 및 2-티오페닐 유도체(**1c**)는 크리신과 거의 유사한 PGE₂ 생성억제 효과를 보였으나, 그 이외의 헤테로고리 유도체는 활성이 크게 감소된 결과를 관찰하였다. 한편, 크리신을 비롯한 모든 합성 크리신 유도체는 iNOS 매개에 의한 NO 생성 억제능이 없었다.

결 론

크리신 구조의 페닐기를 생동등 치환기인 푸란, 티오펜 및 피리딘으로 구조변환 시킨 유도체의 항염증 활성은(PGE₂ 생성 억제) 3-푸라닐기 및 2-티오페닐 치환기를 갖는 유도체에서는 (**1b**, **1c**) 유지되었으나, 그 이외의 헤테로고리 유도체는 활성이 크게 감소된 것이 관찰되었다. 이 결과는 크리신의 페닐기 위치에 전자적/입체적으로 환경이 상이한 치환기를 도입하면 항염증 활성

을 크게 변화시킬 수 있음을 암시한다. 즉, 본 연구결과는 보다 개선된 생리활성을 갖는 항염증 플라본 유도체의 개발을 위한 기초자료로서 플라본 구조 중, B환(페닐기)의 구조변환이 중요함을 시사한다. 현재 본 연구실에서는 B환(페닐기)의 위치에 다양한 전자적, 입체적 상수를 갖는 치환기를 도입시킨 크리신 유도체에 대한 구조-활성연구를 진행 중이다.

감사의 말씀

이 논문은 교육과학기술부 기금에 의한 한국연구재단의 기본연구(과제번호 2009-0072124: 생물활성 플라보노이드 유도체의 합성)의 지원에 의해 수행되었으며, 실험에 필요한 물질구조 분석 및 생리활성 검색에 사용된 기기 및 시설은 강원대학교의 공동실험관 및 강원대학교 종합약학연구소의 도움을 받아 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 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-γ by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett.* **496**, 12 (2001).
- 6) 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).
- 7) Gurung, S. K., Kim, H. P. and Park, H. : Inhibition of Prostaglandin E₂ production by synthetic wogonin analogs. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 1503 (2009).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) Chi, Y. S., Lim, H., Park, H. and Kim, H. P. : Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in LPS-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 1195 (2001).