

## 갈화의 Prolyl Endopeptidase 저해 활성 Isoflavonoid 및 이들의 <sup>13</sup>C-NMR Assignment

김경범 · 김상인 · 김종식 · 송경식\*

경북대학교 농화학과

**초 록 :** 갈화로부터 항치매 효과를 기대할 수 있는 prolyl endopeptidase(PEP) 저해제를 분리하기 위하여 갈화의 methanol 추출물을 chloroform 및 ethyl acetate로 분배추출 후 chloroform 가용성 분획에 대하여 silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography 및 RP-HPLC를 행한 결과, FeCl<sub>3</sub>에 양성 반응을 나타내는 4종의 화합물을 얻었다. 이들은 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>2</sup>D-NMR 및 MS 등을 이용하여 분석한 결과, 각각 tectorigenin, genistein, 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone, 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone으로 동정하였으며 HMBC, HMQC를 통하여 <sup>13</sup>C-NMR signal들을 assign함으로써 기 보고된 data들의 오류를 바로잡았다. PEP에 대한 이 화합물들의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 5.30 ppm(17.7 μM), 10.39 ppm(38.5 μM), 13.92 ppm(44.3 μM), 20.61 ppm(62.8 μM)이었다. (1999년 0월 0일 접수, 1999년 0월 0일 수리)

### 서 론

갈화(葛花)라 함은 *Pueraria thumbergiana*(쑤) 또는 *P. lobata*를 기원으로 하는 식물의 꽃을 말하며 해열(解熱), 발한(發汗), 견교(犬咬), 보약(補藥), 진통(鎮痛), 지혈(止血), 해독(解毒), 숙취(宿醉), 구토(嘔吐), 중풍(中風), 당뇨(糖尿), 진정(鎮靜), 감기(感氣), 편도선염(扁桃腺炎) 등에 약재로 사용한다.<sup>1,2)</sup>

한편 뇌의 퇴행성 질환의 하나인 치매는 우리 나라에서는 노망이라 하여 질병이라기 보다는 고령화(高齡化)에 따라 생겨날 수 있는 단순한 노화현상의 일종으로 생각하여 왔다. 그러나 최근 10년 동안 의료 선진화 및 생활 수준의 향상 등으로 노령화 인구가 급속히 증가하면서 치매가 사망에 이를 수 있는 심각한 질병의 하나라는 인식이 높아져 가고 있다. Alzheimer's disease(AD: 노인성치매)는 뇌 조직을 현미경 관찰을 통해서만 정확하게 검진할 수 있는데 이는 기억력 장애, 사고력 장애 등의 고등 기능에 대한 전반적 와해를 나타내며 병리학적으로는 뇌 전체가 위축되고 뇌실이 확대되며, 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle, NFT)와 노인반(senile plaque)과 같은 특징적인 구조를 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> NFT는 신경세포의 골격을 이루는 섬유상 단백질인 미소관에 과인산화된 tau protein이 축적되어 PHF(paired helical filament)를 이루게 되며,<sup>4)</sup> 또한 amyloid와 그 주변의 팽창한 변성들기로부터 유래되는 노인반은 β protein 또는 amyloid β protein (Aβ)으로 불리는 peptide에 의해 생성되는 것으로 보고되고 있다.<sup>3)</sup>

아직까지 AD의 확실한 발병 기전은 밝혀져 있지 않으나 Aβ가 세포내와 혈관에 침착되면 세포독성으로 인해 신경세포가 사멸하게 되고 따라서 뇌 기능에 광범위한 장애를 초래하게 되는 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> Aβ는 β-pleated sheet구조를 가지고

있으며, 40개의 amino acid 잔기로 구성된 Aβ<sub>40</sub>과 42 또는 43 amino acid 잔기를 가진 Aβ<sub>42/43</sub>로 이루어져 있다.<sup>3,6)</sup> Aβ는 695 개 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어진 amyloid precursor protein(APP)으로부터 형성되는데 아직 APP로부터 Aβ가 생성되는 mechanism은 확실하지 않다. 그러나 최근 Aβ생성에 중요한 역할을 할 수 있는 가장 유력한 효소의 하나로 prolyl endopeptidase(EC 3.4.21.26, PEP)가 지목되고 있다.<sup>7)</sup>

PEP는 prolyl잔기의 carboxyl site의 peptide bond를 절단하는 protease의 일종으로 1971년 Walter 등<sup>8)</sup>에 의해 인간의 자궁에서 처음 발견되었으며 oxytocin, vasopressin, bradykinin, neurotensin, angiotensin의 생리활성 peptide를 조절하는 효소이다.<sup>9,10)</sup> 1990년 Ishiura 등<sup>11)</sup>이 쥐의 뇌로부터 β amyloid를 형성하는 효소를 분리하던 중, 분리된 효소가 PEP의 기질을 효과적으로 절단하는 것을 발견하면서부터 주목받기 시작하였으며 또한 PEP 저해제들이 동물실험에서 노인반의 감소<sup>12)</sup>와 항견망증효과<sup>13)</sup>를 나타냄으로써 PEP에 특이적인 저해제가 치매에 있어 기억, 학습 장애에 대한 연구와 치료에 매우 유용할 것으로 기대하고 있다.

이와 같은 배경에 따라 천연물로부터 PEP에 대한 저해제를 탐색하는 과정에서 갈화의 methanol 추출물이 비교적 높은 활성을 나타내는 것을 발견하고 갈화로부터 활성물질을 정제, 동정하였으며 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) 및 HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)를 이용하여 각 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR을 assign하여 기 보고된 data를 수정하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

갈화는 대구 소재의 한약 견재상에서 구입하여 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(Merck사, Art. 7734), Sephadex LH-20은 Sigma사(St. Louis, USA),

찾는말 : prolyl endopeptidase, inhibitor, tectorigenin, genistein, 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone, 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone, Puerariae Flos, <sup>13</sup>C-NMR assignment

\*연락처

TLC용 plate는 precoated Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(Merck사 Art. 5715)를 사용하였고, 그 외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. Prolyl endopeptidase(*Flavobacterium meningosepticum* 유래) 및 기질로 사용한 Z-Gly-Pro-pNA는 일본 生化学工業社로부터 구입하여 사용하였으며 positive control로 사용한 Z-Pro-Prolinal은 Bakker 등<sup>14)</sup>의 방법에 준하여 합성하여 사용하였다.

### 실험 기기

ELISA auto reader는 ELX808 Bio-T을 사용하였으며, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR은 각각 Bruker Avance 400(각각 400 및 100 MHz, 표준물질로서 TMS 사용), EI-MS는 Shimadzu QP-1000A를 사용하여 70 eV에서 측정하였다. HPLC는 Waters Model 441(Waters Co., USA)을 사용하였다.

### 효소활성 측정법

PEP 효소활성 측정법은 Toda<sup>15)</sup>등이 사용한 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 200  $\mu$ l, 0.1 unit/ml PEP 20  $\mu$ l, sample 10  $\mu$ l의 mixture를 well plate에서 37°C, 10분간 전반응 후 20 mM Z-Gly-Pro-pNA(in 40% dioxane) 20  $\mu$ l를 가하여 37°C, 30분간 반응하고 410 nm에서 흡광도(A)를 측정하였다. 따로 Tris-HCl buffer(pH 7.0) 240  $\mu$ l, sample 10  $\mu$ l의 mixture를 준비하여 역시 410 nm에서 흡광도(B)를 측정한 후 다음과 같은 식을 이용하여 활성의 지표로 삼았다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{410} \text{ of control} - (A - B)}{A_{410} \text{ of control}} \times 100$$

A : enzyme + substrate + buffer + sample

B : sample + buffer

control : enzyme + substrate + buffer

### 추출, 분리 및 정제

감화 100 g을 methanol(MeOH)로 3시간씩 3회 반복 환류 추출한 후 감압 농축하고 증류수에 분산시킨 다음 chloroform(CHCl<sub>3</sub>) 및 ethyl acetate(EtOAc)로 순차적으로 분배 추출하여 각각 4.05 g과 0.92 g의 초추출물을 얻었다. 이 중 CHCl<sub>3</sub>층을 silica gel column chromatography(4.8 × 62 cm, CHCl<sub>3</sub>: MeOH = 20 : 1 → 100% MeOH)하여 I~IV의 4개의 분획으로 나누었으며 침전을 형성한 I을 원심분리하여 침전과 상정액으로 나누었다. 침전을 acetone으로 재결정화하여 무색 침상결정 1(10.1 mg)을 얻었으며, 상정액(198 mg)은 Sephadex LH-20 column(1.8 × 40 cm, 50% MeOH → 100% MeOH)으로 재정제하여 I-1 및 I-2의 두 분획으로 나누고 이 중 활성을 나타낸 I-2(45.9 mg)에 대하여 HPLC(Waters  $\mu$ -Bondapak C18, 7.8 × 300 mm, 50% MeOH, UV 254 nm, 2.5 ml/min)를 실시하여 화합물 2(9.3 mg)를 얻었다.

한편 II(430 mg)에 대하여는 Sephadex LH-20(1.8 × 40 cm, 50% MeOH → 100% MeOH)으로 분획하여 II-1 및 II-2로 나누고 II-1(112.5 mg)를 다시 Sephadex LH-20(1.4 × 28 cm, 50% MeOH → 100% MeOH)으로 정제하여 화합물 3(7.0 mg)을 얻었

으며 II-2 분획(185 mg)에 대해서도 Sephadex LH-20 chromatography(1.4 × 28 cm, 50% MeOH → 100% MeOH)를 실시하여 화합물 4(3.4 mg)를 얻었다.

## 결과 및 고찰

### 구조동정

화합물 1은 흰색 침상 결정으로 얻어졌으며 FeCl<sub>3</sub>에 양성으로 나타나 구조 중 페놀성 OH를 가지고 있는 것으로 추정되었다. EI-MS 결과 *m/z* 328에서 분자이온 피크가 나타났으며 <sup>1</sup>H-NMR(chloroform-*d*)에서  $\delta$ 7.89(1H, *s*), 6.46(1H, *s*)의 signal이 관찰되어 1은 이소플라본의 골격을 가지며 A-환에 3개의 치환기가 달린 구조일 것으로 예측하였다. 또한 *para*-치환 벤젠고리 유래의 전형적인 signal이  $\delta$ 7.46(2H, *d*, *J* = 9.0 Hz), 6.98(2H, *d*, *J* = 9.0 Hz)에서 나타났다. 한편  $\delta$ 12.83(1H, *s*)에서 비교적 sharp한 signal이 검출되어 이소플라본 구조의 5번 위치에 4번 carbonyl과 수소결합을 하고 있는 hydroxyl group의 존재를 확인할 수 있었다. 이 외에도 세 개의 methoxy resonance가 각각  $\delta$ 3.92(3H, *s*), 3.96(3H, *s*), 3.85(3H, *s*)에서 관찰되었다. 이상의 결과와 <sup>13</sup>C-NMR에서  $\delta$ 55~61 사이의 3개의 methoxy carbon resonance,  $\delta$ 181.1의 carbonyl carbon,  $\delta$ 90~159 사이에서 12개의 전형적인 이소플라본의 carbon signal이 검출된 사실 및 EI-MS의 *m/z* 132(C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O+H)의 fragment ion을 종합하여 볼 때 1은 5-hydroxy-4'-methoxyisoflavone의 골격을 갖는 것으로 판단되었다. <sup>13</sup>C-NMR signal의 assign과 나머지 두 개의 methoxy group의 치환 위치를 확인하기 위하여 HMBC 및 HMQC를 측정하였으며 그 결과  $\delta$ 132.7의 carbon과 5-OH 사이에 correlation이 나타났으며 이 carbon은  $\delta$ 3.92의 methoxy proton과도 correlation을 나타내  $\delta$ 3.92의 methoxy는 C-6에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 또한  $\delta$ 6.46의 singlet proton은 C-5의  $\delta$ 153.6 carbon과 correlation을 나타내지 않고 오히려  $\delta$ 106.9의 C-10 및 약하기는 하나  $\delta$ 181.1의 C-4 carbonyl carbon과의 4-bond correlation이 나타나  $\delta$ 3.96의 methoxy group은 C-7에 치환되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 사실과 기 보고된 Carman 등의 data<sup>16)</sup>를 바탕으로 1은 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone으로 동정되었다. 한편 이들은 C-3와 C-1'의 assign을 명확히 하지 못하였는데  $\delta$  7.46의 H-2'가  $\delta$ 123.5의 carbon과 correlation spot을 나타낸다는 사실과  $\delta$ 6.98의 H-3'가  $\delta$ 122.9의 carbon과는 correlation spot을 나타내나  $\delta$ 123.5의 carbon과는 correlation을 보이지 않는다는 점을 고려할 때  $\delta$ 123.5를 C-3로,  $\delta$ 122.9를 C-1'로 귀속시키는 것이 타당하다고 생각된다. 1의 NMR data는 Table 1과 2에, 구조 및 HMBC data는 Fig. 1에 정리하였다.

화합물 2는 흰색 분말로 얻어졌으며 FeCl<sub>3</sub>에 양성이었다. EI-MS 결과 [M+]<sup>+</sup> = *m/z* 314에서 관찰되었으며 <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>)에서  $\delta$ 8.35와 6.49의 singlet,  $\delta$ 13.01(1H, *s*)의 다소 broad한 hydroxy signal,  $\delta$ 7.50(2H, *d*, *J* = 8.5 Hz), 7.00(2H, *d*, *J* = 8.5 Hz)의 signal들은 1과 매우 유사한 양상을 나타내었다. <sup>13</sup>C-NMR에서 역시 두 개의 methoxy signal이 검출된 것을 제외하고는 1과 유사한 양상을 나타내어 1보다 methoxy group이

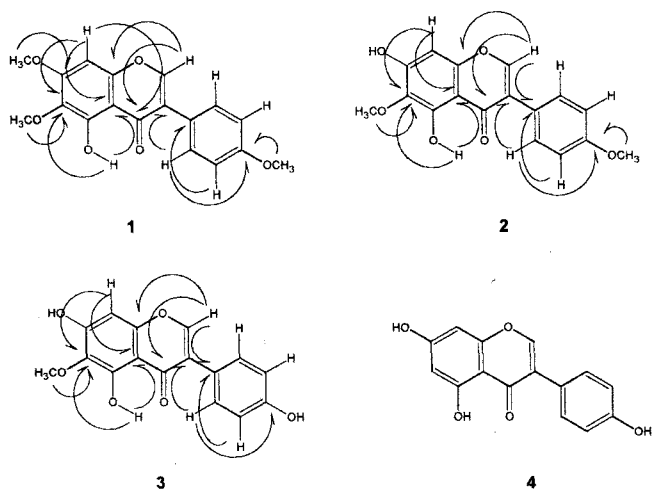


Fig. 1. Structures and summarized HMBC data of compound 1, 2, 3 and 4. (1) 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone; (2) 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone; (3) tectorigenin; (4) genistein.

하나 적은 이소플라본 화합물일 것으로 추정하였다. 또한 EI-MS의  $m/z$  132 fragment ion 및  $\delta$ 13.01의 proton signal로 미루어 1과 마찬가지로 5-hydroxy-4'-methoxyisoflavone 골격을 갖는 것으로 추정되었으며 나머지 methoxy group의 치환 위치를 확인하고 각각의 NMR signal들을 assign하기 위하여 HMBC 및 HMQC를 행하였다. 그 결과  $\delta$ 13.01의 5-OH proton은  $\delta$ 131.9 carbon과 correlation을 나타내었으며 이 carbon은  $\delta$ 3.75의 methoxy proton과 correlation을 나타내었다. 따라서  $\delta$ 3.75의 methoxy는 C-6에 치환된 것을 알 수 있었으며 1과 동일한 방법으로 HMBC를 해석한 결과 C-7 위치가 free OH group으로 치환된 것을 알 수 있었다. 이상의 결과와 기 보고된 data<sup>16)</sup>를 고려하여 2는 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone으로 동정되었다. 한편 Carman 등<sup>16)</sup>은 C-3을  $\delta$ 123.5, C-1'을  $\delta$ 123.0로 C-3가 저자장인 것으로 assign하였으나 HMBC결과 H-2'로 assign된  $\delta$ 7.50 proton은  $\delta$ 121.6 carbon과 correlation spot을 나타내는 데 반하여  $\delta$ 7.00의 H-3' proton은  $\delta$ 121.6의 carbon과는 correlation을 나타내지 못하였고  $\delta$ 123.2의 carbon과만 correlation을 나타내었다. 이러한 사실에 근거한다면 C-3가  $\delta$ 121.6, C-1'이  $\delta$ 123.2로 assign을 하는 것이 타당하다고 생각되나 일반적으로 isoflavonoid의 경우 C-3가 C-1'보다 0.5~1.5 ppm 저자장에 나온다는 사실<sup>17)</sup>과는 상치되는 결과이므로 이 부분에 대하여 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 2의 NMR data는 Table 1 및 2에, 구조 및 HMBC data는 Fig. 1에 정리하였다.

화합물 3은 흰색 분말로 얻어졌으며  $\text{FeCl}_3$ 에 양성을 나타내었다. EI-MS에서  $[M^+] = m/z$  300에서 되었으며 또한  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )에서  $\delta$ 8.23(1H, s), 6.46(1H, s), 한 개의 수소결합 hydroxy group( $\delta$ 12.99, 1H, s) 및 broad한 두 개의 singlet( $\delta$  10.97, 1H, s), ( $\delta$ 9.72, 1H, s)이 나타났으며 이외에도 한 개의 methoxy group이  $\delta$ 3.71(3H, s)에서, 그리고 para-coupling을 하고 있는 방향족 수소 유래의 signal이  $\delta$ 7.33(2H, d,  $J=8.7$  Hz)과  $\delta$ 6.80(2H, d,  $J=8.7$  Hz)에서 각각 되었다. 이러한 결과

Table 1.  $^1\text{H-NMR}$  data of compound 1, 2, 3 and 4

Position	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ in Hz)			
	1	2	3	4
2	7.89 (s)	8.35 (s)	8.23 (s)	8.30 (s)
6				6.38 (d, 2.0)
8	6.46 (s)	6.49 (s)	6.46 (s)	6.02 (d, 2.0)
2', 6'	7.46 (d, 9.0)	7.50 (d, 8.5)	7.33 (d, 8.7)	7.38 (d, 8.7)
3', 5'	6.98 (d, 9.0)	7.00 (d, 8.5)	6.80 (d, 8.7)	6.82 (d, 8.7)
5-OH	12.83 (s)	13.01 (s)	12.99 (s)	12.96 (s)
6-OCH <sub>3</sub>	3.92 (s)	3.75 (s)	3.71 (s)	
7-OH			10.97 (s)	
7-OCH <sub>3</sub>	3.96 (s)			
4'-OCH <sub>3</sub>	3.85 (s)	3.79 (s)		
4'-OH			9.72 (s)	

Recorded at 400 MHz in chloroform- $d$  (1) or DMSO- $d_6$  (2, 3, and 4).

Table 2.  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 1, 2, 3 and 4

Position	$\delta_{\text{C}}$ (mult.)			
	1	2	3	4
2	152.7 (d)	154.4 (d)	154.3 (d)	154.2 (d)
3	123.5 (s)	121.6 (s)	122.0 (s)	122.6 (s)
4	181.1 (s)	180.5 (s)	180.8 (s)	180.5 (s)
5	153.6 (s)	153.4 (s)	153.5 (s)	162.3 (s)
6	132.7 (s)	131.9 (s)	131.6 (s)	99.4 (s)
7	159.0 (s)	158.7 (s)	157.8 (s)	165.0 (s)
8	90.4 (d)	94.3 (d)	94.1 (d)	94.1 (d)
9	153.6 (s)	153.1 (s)	153.0 (s)	158.0 (s)
10	106.9 (s)	104.6 (s)	105.0 (s)	104.7 (s)
1'	122.9 (s)	123.2 (s)	121.5 (s)	121.6 (s)
2', 6'	130.1 (d)	130.4 (d)	130.5 (d)	130.5 (d)
3', 5'	114.1 (d)	113.9 (d)	115.3 (d)	115.4 (d)
4'	159.9 (s)	159.3 (s)	157.6 (s)	157.8 (s)
6-OCH <sub>3</sub>	60.9 (q)	60.0 (q)	60.2 (q)	
7-OCH <sub>3</sub>	56.3 (q)			
4'-OCH <sub>3</sub>	55.4 (q)	55.4 (q)		

Recorded at 100 MHz in chloroform- $d$  (1) or DMSO- $d_6$  (2, 3, and 4).

와 EI-MS에서 1, 또는 2에서 보인  $m/z$  132와는 달리  $\text{CH}_3+\text{H}$ 가 부족한  $m/z$  118에서 fragment ion이 검출된 점으로 미루어 B-환에 methoxy group 대신 hydroxy group이 치환되어 있으며 A-환에 hydroxy group과 methoxy group이 각각 하나씩 치환된 이소플라본 유도체임을 알 수 있었다. 또한  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서  $\delta$ 180.8의 carbonyl carbon,  $\delta$ 60.2의 methoxy carbon 외에  $\delta$ 94~158 사이에서 12개의 carbon이 나타나 3이 1, 2와 매우 유사한 화합물이라는 사실을 뒷받침하였다. 치환기의 위치 확인 및  $^{13}\text{C-NMR}$  signal assign을 위하여 HMBC 및 HMQC를 측정하였으며 그 결과  $\delta$ 12.99의 5-OH proton과  $\delta$  131.6의 carbon에서 correlation이 나타났으며 이 carbon은  $\delta$  3.71의 methoxy proton과 correlation spot을 나타냄으로써 methoxy의 위치는 C-6으로 결정할 수 있었다. 또한 1, 2에서와 마찬가지로  $\delta$ 6.46의 singlet proton은 C-6, 7, 9, 10 carbon들과 상관 관계를 나타내었다. 이러한 사실과 Cho<sup>19)</sup> 등의 결과와의 비교에 의하여 3은 4',5,7-trihydroxy-6-methoxyisoflavone (tectorigenin)으로 동정하

었다. 한편 Cho 등<sup>19)</sup>은 이 화합물의 C-7을  $\delta 153.2$ , C-9를  $\delta 157.5$ 로 C-7을 고자장으로 assign하였으나 HMBC 결과  $\delta 8.23$ 의 proton과  $\delta 153.0$ 의 carbon 사이에 correlation이 되었으므로 C-7을  $\delta 157.8$ , C-9를  $\delta 153.0$ 로 assign하여 기 보고된 data의 오류를 바로잡았다. 3의 NMR data는 Table 1 및 2에, 구조 및 HMBC data는 Fig. 1에 요약하였다.

화합물 4는 흰색 분말로 얻어졌으며  $\text{FeCl}_3$ 에 양성이었다. EI-MS 결과  $[M+]$ 가  $m/z$  270에서 검출되었으며  $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )에서  $\delta 8.30$ (1H, s),  $6.22$ (1H, d,  $J=2.0$  Hz),  $6.38$ (1H, d,  $J=2.0$  Hz),  $12.96$ (1H, s) 및 para-치환된 벤젠환 유래의 signal이  $\delta 7.38$ (2H, d,  $J=8.7$  Hz),  $6.82$ (2H, d,  $J=8.7$  Hz)에서 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 methoxy 유래의 signal이 나타나지 않은 점과 meta-coupling을 하고 있는 방향족 수소가 하나 더 있다는 것 이외에는 상기 화합물들과 매우 유사한 pattern을 나타내어 이 화합물도 isoflavone의 일종일 것으로 추정하였다. MS data와 NMR data를 면밀히 검토한 결과 이 화합물은 genistein으로 추정되었으며 기 보고된  $^{13}\text{C-NMR}$  data<sup>18)</sup> 및 표준(Sigma 제품)과의 직접적인 비교에 의하여 4를 4',5,7-trihydroxy-isoflavone(genistein)으로 동정하였다.  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C-NMR}$  data는 Table 1, 2에, 구조는 Fig. 1에 정리하였다.

#### 생물활성

화합물 1, 2, 3 및 4의 PEP에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 각각 20.61 ppm(62.8  $\mu\text{M}$ ), 13.92 ppm(44.3  $\mu\text{M}$ ), 5.30 ppm(17.7  $\mu\text{M}$ ), 10.39 ppm(38.5  $\mu\text{M}$ )이었다(Fig. 2). 이들의 활성은 전반적으로 positive control로 사용한 Z-Pro-Prolinal( $\text{IC}_{50}$ , 약 22 ppb(0.05  $\mu\text{M}$ )) 보다 매우 낮았으나 갈화가 차 등의 식품으로 이용된다는 점과 콩과(科)의 isoflavone류가 일반적으로 독성이 낮은 식품으로 사용된다는 점을 감안하면 앞으로 치매의 예방을 위한 기능성 식품 등으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

한편 현재까지 보고된 PEP 저해제는 대부분이 합성 peptide들<sup>13)</sup>이며 미생물로부터 분리된 저해제로는 staurosporine,<sup>20)</sup> poststatin,<sup>21)</sup> eurystatin<sup>22)</sup> 등이 보고된 바 있으며 최근 식물로부터는 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate<sup>23)</sup> 등 pyrogallol ring을 가

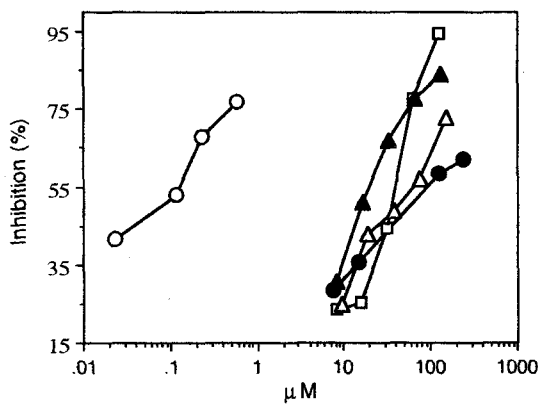


Fig. 2. Inhibitory activities of compound 1, 2, 3 and 4. ○, Positive control (Z-Pro-Prolinal); ●, 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone (1); □, 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone (2); ▲, tectorigenin (3); △, genistein (4).

지는 화합물과 luteolin, quercetin 등 catechol ring을 가지는 flavonoid들<sup>24)</sup>이 보고된 바 있다. 이들은 catechol, 또는 pyrogallol moiety가 활성에 필수적인 것으로 거론하고 있으나 저자 등의 실험 결과에 의하면 catechol 핵을 가지고 있더라도 일반적으로 flavonoid 보다 isoflavonoid의 경우가 상당히 활성이 낮다는 사실을 확인하였다(data 미제시). 이러한 사실은 phenolic OH group의 형태 뿐 아니라 phenolic OH와 carbonyl group과의 결합거리가 활성의 유무 또는 증감에 영향을 줄 수 있다는 사실을 시사해 주는 것으로 이를 해명하기 위하여 현재 다양한 시료에 대하여 구조 활성 상관관계를 검토하고 있는 중이다.

#### 감사의 글

NMR 및 EI-MS 측정에 도움을 주신 기초과학 지원센터 대 구분소에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Kim, T.-C. (1996) In 'Korean Resources Plants', Seoul National Univ., Publishing Center, Vol. 2, p. 232, Korea.
- Shogakukan (1985) In 'Encyclopedia of Chinese drugs', Shanghai Science & Tech. Publishing Co., Vol. 1, p. 0551, Japan.
- Suh, Y.-H. (1992) Molecular biology of Alzheimer's disease. *Saengwhahak nyusu* **12**, 238-241.
- Nukina, N. and Ihara, Y. (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filament is related tau protein. *J. Biochem.* **99**, 1541-1544.
- Vines, G. (1993) Alzheimer's disease; from cause to cure? *TIBTECH.* **11**, 49-55.
- Sisoda, S. S. and Price, D. L. (1995) Role of the  $\beta$ -amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **9**, 366-370.
- Ishiura, S., Nishikawa, T., Tsukahara, T., Momoi, T., Ito, H., Suzuki, K. and Sugita, H. (1990) Distribution of Alzheimer's disease amyloid A4-generating enzyme in rat brain tissues. *Neurosci. Lett.* **115**, 329-334.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J. D., Schwartz, I. L. and Kerenyi, T. D. (1971) Leucylglycinamide release from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* **173**, 827-829.
- Yoshimoto, T., Orlowski, R. C. and Walter, R. (1977) Post-proline cleaving enzyme. Identification as serine protease using active site specific inhibitors. *Biochem.* **16**, 2942-2948.
- Koida, M. and Walter, R. (1976) Post-proline cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* **251**, 7593-7599.
- Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimzu, T., Arahata, K. and Sugita, H. (1990) Identification of a putative amyloid A4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase. *FEBS Lett.* **260**, 131-134.
- Kato, A., Fukunari, A., Sakai, Y. and Nakajima, T. (1997) Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 328-335.
- Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H. and Tsuru, D. (1987) Specific inhibitors for prolyl endopep-

- tidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobio-Dyn.* **10**, 730-735.
14. Bakker, A. V., Jung, S., Spencer, R. W., Vinick, F. J. and Faraci, W. S. (1990) Slow tight-binding of prolyl endopeptidase by benzyloxy-carbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem. J.* **271**, 559-562.
  15. Toda, S., Obi, Y., Numata, K., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., Furumai, T. and Oki, T. (1992) Euristatin A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors. *J. Antibiotics* **45**, 1573-1579.
  16. Carman, R. M., Russell-Maynard, J. K. L. and Schumann, R. C. (1985) Isoflavonoid from *Podocarpus amarus*. *Aust. J. Chem.* **38**, 485-496.
  17. Agrawal, P. K. (1989) In 'Carbon-13 NMR of flavonoids' Agrawal, P. K. and Bansal, M. C. p. 183-232, Elsevier, UK.
  18. Kinjo, J., Furusawa, J., Baba, J., Takeshita, T., Yamasaki, M. and Nohara, T. (1987) Studies on the constituents of *Pueraria lobata* III. Isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4846-4850.
  19. Cho, Y. J., Son B. W., Jeong, D.-Y., Choi, H. D. and Park, J.-H. (1998) Chemical structure of bioactive isoflavonoids from the flowers of *Pueraria lobata* (Flos Puerariae) *Kor. J. Pharmaco-*
  - cogn.* **29**, 193-197.
  20. Kimura, K., Kawaguchi, N., Yoshihoma, M. and Kawanishi, G. (1990) Staurosporin, a prolyl endopeptidase inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3021-3022.
  21. Aoyagi, T., Nagai, M. and Ogawa, K., Kojima, F., Okada, M., Ikeda, T., Hamada, M. and Takeuchi, T. (1991) Poststatin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Streptomyces viridochromogenes* MH534-30F3. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiotics* **44**, 949-955.
  22. Toda, S., Kotake, C., Tsuno, T., Narita, Y., Yamasaki, T. and Konishi, M. (1992) Eurystatins A and B. new prolyl endopeptidase inhibitors. II. Physico-chemical properties and structure determination. *J. Antibiotics* **45**, 1580-1586.
  23. Fan, W., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namaba, T. and Kadota, S. (1999) Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sacra* S. H. Fu. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 157-161.
  24. Lee, K. -H., Kwak, J. -H., Lee, B. -K. and Song, K. -S. (1998) Prolyl endopeptidase inhibitors from *Caryophylli flos*. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 207-211.

---

#### Prolyl Endopeptidase-inhibiting Isoflavonoids from Puerariae Flos and Some Revision of their <sup>13</sup>C-NMR Assignment

Kyung-Bum Kim, Sang-In Kim, Jong-Sik Kim and Kyung-Sik Song\*(*Department. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, 1370, Sankyuk-Dong, Taegu, 702-701, Korea*)

**Abstract :** In order to find anti-dementia drugs from natural products, prolyl endopeptidase inhibitors were purified from Puerariae Flos by consecutive solvent partition, followed by silica gel, Sephadex LH-20, and HPLC. Four isoflavonoid inhibitors were isolated and identified as tectorigenin, genistein, 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone, and 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone by means of instrumental analyses including <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>2</sup>D-NMR and MS and IC<sub>50</sub> values against PEP were 5.30 ppm(17.7 μM), 10.39 ppm(38.5 μM), 13.92 ppm(44.3 μM), and 20.61 ppm(62.8 μM), respectively. Some previous mistakes in <sup>13</sup>C-NMR assignment were revised by careful investigation of HMBC and HMQC data.

---

Key words : prolyl endopeptidase, inhibitor, tectorigenin, genistein, 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone, 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyisoflavone, Puerariae Flos, <sup>13</sup>C-NMR assignment

\*Corresponding author