

땅콩껍질에서 항미생물 활성을 지닌 pratensein의 분리 및 동정

위지향 · 문제학 · 박근형*

전남대학교 식품공학과 및 농업과학기술연구소

Isolation and Identification of Pratensein with Antimicrobial Activity from the Peanut Shells

Ji-Hyang Wee, Jae-Hak Moon, and Keun-Hyung Park*

Department of Food Science and Technology and Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University

Natural antimicrobial substance from peanut (*Arachis hypogaea*) shells was isolated and structurally elucidated. Peanut shells were extracted with methanol (MeOH) and concentrated *in vacuo*. MeOH extract was solvent-fractionated with ethyl acetate (EtOAc) and various buffer to obtain EtOAc acidic, neutral, and phenolic fractions. EtOAc neutral fraction, which showed antimicrobial activity, was purified through silica gel adsorption column, Sephadex LH-20 column, ODS column, and high performance liquid chromatographies, and its active substance was isolated and identified as pratensein (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone) by spectroscopic methods of proton-nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, and nuclear overhauser enhancement spectroscopy.

Key words: peanut shells, antimicrobial activity, pratensein, isoflavonoid

서 론

식물은 매우 다양한 유용성분을 함유하고 있으나 과학적인 구명이 이루어지지 않은 부분이 많으며, 미이용 식물자원 또한 풍부하여 식물자원에 함유된 부가가치가 높은 기능성 소재의 개발이 요구된다. 이러한 배경에서 식물 등의 생물자원으로부터 생리활성을 갖는 기능성 소재 탐색연구를 수행하여, 이들 생물자원에 함유된 유용성분을 과학적으로 구명하고 미이용 기능성 소재를 발굴, 개발하여 보다 부가가치가 높은 기능성 식품소재 자원으로 이용하고자 하는 연구는 매우 의미 있다고 생각되며 또한 이에 관한 연구가 수행되어지고 있다(1,2).

땅콩껍질은 땅콩 중량의 35-40%정도를 차지하고 있으나 용도가 제한되어, 그 일부가 사료로 이용되고 있을 뿐 대부분이 이용되지 못하고 있다. 땅콩은 일년생 초본으로, 꽃이 피어 수정되고 시들면 자방의 밑 부분이 토양 속으로 들어가 꼬투리가 형성되고 그 속에서 종자가 자란다(3). 일반적으로 식물은 지상부에 열매를 맺고 있으나, 토양 속에 열매를 맺는 땅콩은 그 종자가 지하에서 자라는 식물로서 딱딱한 껍질을 가지고 있다. 이 껍질은 지하에서 미생물 및 곤충들로부터 땅콩종자의 보호 기능을 하고 있을 것으로 생각되어진다. 따라서 땅콩껍질에는

유용한 기능성 물질이 함유되어 있을 것으로 생각되어지나 땅콩껍질의 추출물이 항돌연변이 효과가 있다는 보고(4)가 있을 뿐 그 외의 연구는 빈약한 실정이다.

이에 저자들은 땅콩껍질의 이용성을 제고하기 위해서는 땅콩껍질에 함유된 항미생물 및 항산화 물질을 분리하여 5종의 활성물질을 보고한 바 있다(5,6). 본 연구는 땅콩껍질에 함유된 항미생물 활성물질을 추가로 구명하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 땅콩(*Arachis hypogaea*)껍질은 전라북도 고창군 성송면에서 재배된 땅콩에서 종실을 제거하고 실온에서 음건한 후 시료로 사용하였다.

활성물질의 추출 및 용매분획

땅콩껍질(건조중량 6,100 g; 수분함량 4.8±0.13%)은 homogenizer(BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki Kaiseiki LTD, Japan)로 마쇄하면서 methanol(MeOH, 30 L)로 추출하였다. 얻어진 MeOH 추출물은 G3 glass filter로 여과한 후 cooling aspirator (CA-111, Eyela, Tokyo, Japan)가 장치된 vacuum evaporator (N-2N, Eyela, Tokyo, Japan)로 35°C에서 감압농축하였다. MeOH이 제거된 추출물을 Park 등(7)의 방법에 의해 EtOAc(5 L×3)와 buffer 용액(0.2 M glycine-0.2 M HCl, pH 3.0, 3 L)으로 수용액획분과 EtOAc획분으로 분획하였다. EtOAc획분을 buffer 용액(0.2 M Na₂HPO₄-0.2 M NaH₂PO₄, pH 8.0, 3 L)으로 재분배

*Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel: 82-62-530-2143

Fax: 82-62-530-2149

E-mail: khpark@chonnam.ac.kr

하여 EtOAc 중성·페놀성획분과 수용액획분으로 분획하였다. 수용액획분은 1.0 N HCl을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 후 EtOAc(5 L×3)로 분배하여 EtOAc 산성획분을 얻었으며, EtOAc 중성·페놀성획분은 buffer 용액(0.2 M KCl-0.2 M NaOH, pH 12.0, 3 L)으로 분배하여 EtOAc 중성획분과 수용액획분으로 분획하였다. 이 수용액획분을 다시 1.0 N HCl을 이용하여 pH 6.0으로 조절한 후 EtOAc(5 L×3)로 분배하여 EtOAc 페놀성획분을 얻었다.

Silica gel adsorption column chromatography에 의한 정제

Cho 등(8)의 방법으로 silica gel adsorption column chromatography (A)는 silica gel(70-230 mesh, column chromatography 용, Merck사, Darmstadt, Germany)을 EtOAc로 slurry를 만들어 column(3.0×32.5 cm)에 충전한 후, 땅콩껍질 EtOAc 중성획분을 EtOAc/MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50% 까지 단계적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출분획하였다. 정제된 활성획분을 chloroform(CHCl₃)을 출발용매로 한 silica gel adsorption column chromatography(B)를 다시 행하였다. 즉 silica gel을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column(3.0×24.0 cm)에 충전시킨 후, CHCl₃/MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50%까지 단계적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출분획하였다. 얻어진 활성획분은 또 다른 용매계를 이용한 silica gel adsorption column chromatography(C)를 행하였다. 즉 silica gel을 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v/v) 용매계로 slurry를 만들어 column(2.0×40.0 cm)에 충전시키고 *n*-hexane/EtOAc/MeOH 용매계 8:6:1, 6:8:1, 4:10:1(v/v/v)의 순으로 용출분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 정제

Lee 등(9)의 방법으로 Sephadex LH-20(70-230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 MeOH/CHCl₃(4:1, v/v) 용매계로 24시간 팽윤시킨 후 column(3.0×80.0 cm)에 충전하고, silica gel adsorption column chromatography에 의해 정제된 활성획분을 charge하여 동 용매계로 용출분획하였다.

ODS column chromatography에 의한 정제

Yim 등(10)의 방법에 의해 octadecylsilane(ODS) column chromatography는 ODS gel(25 g, 70-230 mesh, YMC, Kyoto, Japan)을 MeOH로 slurry를 만들어 column(1.5×47.0 cm)에 충전시킨 후, 30% MeOH로 평행화 한 다음 Sephadex LH-20 column chromatography에서 얻어진 활성획분을 MeOH 농도를 30%부터 100%까지 10%씩 증가시켜가면서 용출분획하였다.

HPLC에 의한 정제

HPLC(High performance liquid chromatography)는 Senshu pak ODS column(8×250 mm, Senshu, 10 μm, Tokyo, Japan)을 장착하고 260 nm(Waters 486 tunable absorbance detector, Milford, MA, USA)에서 55% MeOH을 이동상으로 1.5 mL/min의 유속(Waters Model 510 solvent delivery system, Milford, MA, USA)으로 용출분획하였다.

MS 및 NMR 분석

MS 분석은 Waters integrity system(Milford, MA, USA)을 이용하여 직접도입방식의 electron impact-mass spectrometry(EI-MS) 분석을 실시하였고, 이때 ionizing voltage는 70 eV, ion

source의 온도는 200°C에서 행하였다.

¹H nuclear magnetic resonance(¹H-NMR)와 nuclear overhauser enhancement spectroscopy(NOESY)의 분석은 JEOL JNM-AL 400 spectrometer(400 MHz, JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 용매는 deuterium methanol(CD₃OD), 그리고 내부 표준물질로는 tetramethylsilane(TMS, δ=0)을 사용하였다.

항미생물 활성 검정에 이용한 미생물 및 배지

땅콩껍질의 항미생물 활성 검정을 위해 사용된 미생물은 gram 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, 그리고 *Lactobacillus plantarum*을 gram 음성세균으로는 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Salmonella typhi*를 효모로는 *Candida albicans*와 *Saccharomyces cerevisiae* 등을 사용하였다. 세균의 경우, *Streptococcus pyogenes*는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 젓산균은 *Lactobacilli* MRS 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 그밖의 세균은 Nutrient 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 각각 사용하였고, 효모의 경우는 YM(yeast malt) 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하였다. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, 그리고 *S. typhi*는 37°C에서 24시간 동안, *B. subtilis*, *M. luteus*, 젓산균 및 효모는 30°C에서 24시간 동안 3회 반복하여 전배양을 행한 후 접종균주로 사용하였다.

항미생물 활성 측정

항미생물 활성은 paper disc(φ 6 mm 또는 8 mm, Whatman) 방법(11)으로 측정하였다. Pour-plate method에 의해 45°C로 조절된 멸균배지 20 mL에 전배양액 0.2 mL를 무균적으로 옮겨 잘 혼합한 후, 지름이 9.0 cm인 petri dish에 넣고 응고시켰다. 응고된 배지 위에 시료를 함유한 paper disc를 적절히 배치한 후, 0.85% 식염수를 직경 8 mm의 paper disc에는 65 μL로, 그리고 직경 6 mm paper disc에는 17 μL로 시료를 diffusion시켰다. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, 그리고 *S. typhi*는 37°C에서 16시간 동안, 그리고 *B. subtilis*, *M. luteus*, 젓산균과 효모는 30°C에서 16시간 동안 각각 배양하여 paper disc 주위에 형성된 clear zone의 크기(mm)로 활성의 정도를 측정하였다. 대조구로는 benzoic acid(Hayashi Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)를 사용하여 항미생물 활성을 비교하였다.

활성물질의 정제 및 분리 과정에서 얻어진 각 획분들의 항미생물 활성 검정은 비교적 강한 활성을 보인 *S. aureus*를 활성지표(bioactive guide) 미생물로 선발하여 상기방법으로 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

땅콩껍질 MeOH 추출물 및 용매분획물의 항미생물 활성

마쇄한 땅콩껍질을 MeOH로 추출하여, 건조중량 5 g 상당량의 MeOH 추출물을 다양한 미생물에 대하여 항미생물 활성을 검정한 결과, gram 양성 및 음성세균과 효모 등의 미생물에 대해 항미생물 활성을 보였다(Table 1). 그래서 이 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc의 산성, 중성, 그리고 페놀성획분 각각의 건조중량 5 g 상당량으로 항미생물 활성을 검정하였

Table 1. Antimicrobial activities of MeOH extract of peanut shells against various microorganisms

Microorganisms	Clear zone (mm)	
	MeOH extract ¹⁾	Benzoic acid (0.5 mg)
Gram positive bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	16.3 ± 0.35	13.8 ± 0.35
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	14.3 ± 0.35	9.8 ± 0.35
<i>Micrococcus luteus</i> KCTC 3523	18.8 ± 0.35	13.8 ± 0.35
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	17.3 ± 0.35	11.8 ± 0.35
<i>Streptococcus pyogenes</i> KCTC 3096	9.3 ± 0.35	8.8 ± 0.35
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	12.8 ± 0.35	9.3 ± 0.35
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3102	12.8 ± 0.35	10.8 ± 0.35
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	12.3 ± 1.06	10.5 ± 0.70
Gram negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2593	12.5 ± 0.70	12.3 ± 0.35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2513	12.8 ± 0.35	11.5 ± 0.70
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19214	14.8 ± 1.06	14.3 ± 0.35
Yeast		
<i>Candida albicans</i> KCTC 7965	15.8 ± 1.06	15.5 ± 0.70
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7904	12.8 ± 0.35	17.2 ± 0.35

¹⁾Extract (5 g eq., dry wt.) of peanut shells was loaded on 8 mm paper disc. Values are means of triplicated determination ± standard deviation.

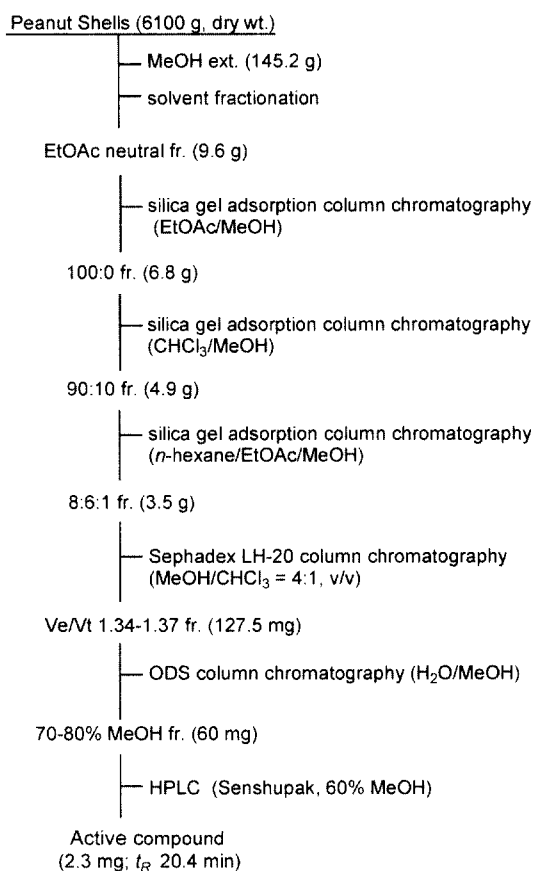


Fig. 1. The isolation procedure of antimicrobial compound from MeOH extracts of peanut shells.

다. 그 결과, EtOAc 산성과 중성획분에 활성을 보여 산성획분에 함유된 활성물질은 보고한 바 있으며(5,6), EtOAc 중성획분 또한 gram 양성 및 음성세균과 효모 등의 다양한 미생물에 대

해 항미생물 활성을 보여, EtOAc 중성획분에 함유된 항미생물 활성 본체의 구명을 시도하였다.

활성물질의 단리 · 정제

땅콩껍질 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc 중성획분(9.6 g)을 EtOAc/MeOH 용매계의 silica gel adsorption column chromatography(A)로 분획한 후, 각 획분의 항미생물 활성을 검정하였다. 그 결과 EtOAc/MeOH 용매계 100:0(v/v)의 용출획분(6.8 g)에서 강한 활성을 보여 이 획분을 대상으로 CHCl₃/MeOH 용매계의 silica gel adsorption column chromatography (B)를 실시한 결과, CHCl₃/MeOH 용매계 90:10(v/v)의 용출획분(4.9 g)에서 활성을 나타냈다. 이 활성획분을 다시 silica gel adsorption column chromatography(C)로 n-hexane/EtOAc/MeOH 을 8:6:1(v/v/v)에서 4:10:1(v/v/v)까지 용출분획하여 정제한 결과, n-hexane/EtOAc/MeOH 용매계 8:6:1(v/v/v)의 용출획분(3.5 g)에서 활성이 나타났다. 이 활성획분을 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분획하고 활성을 검정한 결과, total volume에 대한 elution volume의 비(Ve/Vt)가 1.34-1.37의 용출획분(127.5 mg)에 활성이 나타나 이 획분을 대상으로 활성물질의 정제를 행하였다. ODS column chromatography를 실시한 결과, 70-80% MeOH 용출획분(60 mg)에서 활성이 나타났다. 이 획분을 HPLC(Senshu pak ODS column, 60% MeOH)로 분획하여 얻어진 각 peak를 대상으로 항미생물 활성을 검정한 결과, retention time(t_R) 20.4 min에서 용출된 단일 peak의 화합물이 활성을 보여, 이를 반복적으로 분취하여 활성물질을 단리(2.8 mg, 황색분말)하였다. 이상의 항미생물 활성물질의 분리 및 정제과정을 Fig. 1에 제시하였다.

활성물질의 구조해석

분리된 활성물질의 구조해석을 위해 ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) 분석을 실시하였다. 그 결과(Table 2), δ 8.05-6.21에 6H분의 sp² 탄소 proton이 검출되었으며, 그 중 δ 6.21과 δ 6.32의 doublet signal이 등가(J=2.2 Hz, 각각 1H, s)를 보였고, 또

Table 2. ¹H-NMR data of the isolated compound and its reference compound

Position	δ_{H} (int., mult., J in Hz)	
	Isolated compound	Reference compound ¹⁾
2	8.05 (1H, s)	8.07 (1H, s)
6	6.21 (1H, d, 2.2)	6.24 (1H, d, 2.0)
8	6.32 (1H, d, 2.2)	6.37 (1H, d, 2.0)
6'	6.97 (1H, m, overlapped with H-5' signal)	7.05 (1H, d, 9.0)
2'	7.04 (1H, d, 2.5)	7.00 (1H, d, 2.5)
5'	6.97 (1H, m, overlapped with H-6' signal)	7.04 (1H, d, 9.0)
OCH ₃	3.88 (3H, s)	3.89 (3H, s)

¹⁾Pratensein from the root of red clover (*Trifolium pratense*)(12).

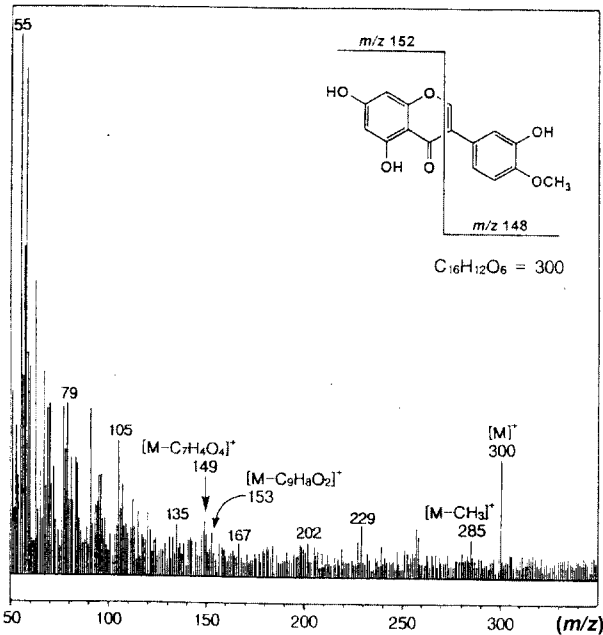


Fig. 2. EI-MS spectrum of antimicrobial compound from MeOH extracts of peanut shells.

δ 6.97에 중첩되어 검출된 2H분(d, $J=1.2$ Hz)의 signal 및 δ 8.05의 singlet(1H) signal의 존재로부터 활성물질은 flavonoid일 가능성이 시사되었다. 일반적으로 flavone류의 3위의 proton signal(1H)은 δ 7.0보다 고자장에서 검출되어짐에 비해 isoflavone류의 2위의 proton signal(1H)은 δ 8.0보다 저자장에서 검출되어진다. 즉 단리된 화합물의 ¹H-NMR spectrum 상에서 1H분의 singlet signal이 δ 8.05에 관찰되어 활성물질은 isoflavone임을 알 수 있었다. 또한, δ 3.88에서 관찰된 강한 intensity의 3H분의 signal로부터 -OCH₃(methoxyl)기의 존재가 확인되어, isoflavone에 1종의 methoxyl기가 결합된 화합물임을 알 수 있었다.

이어서, EI-MS 분석을 실시한 결과(Fig. 2), m/z 300에서 molecular ion peak가 관찰되어 활성물질의 분자량이 300으로 확인되었으며, 그 외에 m/z 285[M-CH₃]⁺, 153[M-C₇H₈O₂]⁺, 149[M-C₇H₄O₄]⁺ 등에 fragment ion이 검출되었고, 특히 Fig. 2에 제시한 구조식에 그 분열패턴을 나타낸 바와 같이 m/z 153 및 149의 fragment ion이 검출되어짐으로써 methoxyl기가 B링에 결합되어 있음을 알 수 있었다.

이 methoxyl기의 정확한 결합위치를 확인하기 위하여 NOESY 분석을 실시한 결과(Fig. 3), methoxyl기의 proton signal과 5'위

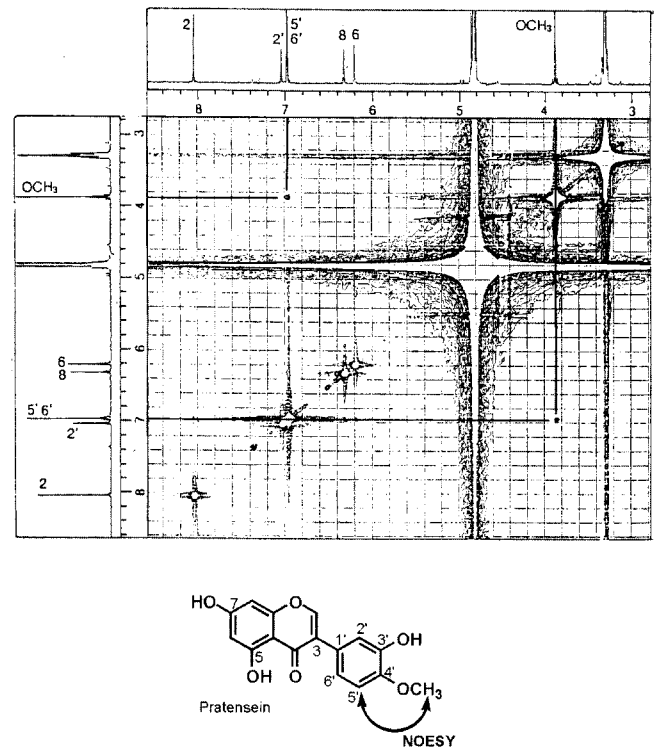


Fig. 3. NOESY spectrum (CD₃OD, 400 MHz) of antimicrobial compound from MeOH extracts of peanut shells.

치의 proton signal들 상호간에 cross peak가 관찰되어 methoxyl기가 4' 위치에 결합되어 있음을 명확히 확인할 수 있었다.

이상의 ¹H-NMR, EI-MS, NOESY 분석결과로부터 활성물질은 3',5',7-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone(pratensein)으로 동정되었으며, Fraishtat 등(12)의 ¹H-NMR data와 비교해 본 결과(Table 2), 본 화합물의 data와 일치하여 활성물질은 pratensein임이 재 확인되었다.

이상 땅콩껍질 MeOH 추출물의 EtOAc 증성획분으로부터 항미생물 활성물질 1종을 분리하여 isoflavonoid인 pratensein으로 동정하였다. Pratensein은 땅콩껍질 건조중량 1 kg당 0.5 mg이 단리되었으나, 분리과정에서의 유실을 고려한다면 땅콩껍질에 함유된 양은 이보다 더 높은 수준일 것으로 생각되어진다.

Pratensein은 감초뿌리(13)와 *Andira inermis*(14)에 함유되어 있다고 보고된 바 있으며, Sharma(15)는 pratensein이 hypolipidemic activity도 가지고 있다고 보고한 바 있으나 식물체에 항미생물 물질로 보고된 바 없었다. Pratensein이 땅콩껍질에서 항

미생물 활성물질로 분리·동정된 것은 이번이 처음으로 사료된다.

요 약

땅콩껍질에 함유된 항미생물 활성물질의 탐색을 위해 땅콩 껍질을 MeOH로 추출하고 이 MeOH 추출물을 용매분획하여 EtOAc 중성획분을 얻었다. 이 획분에 함유된 항미생물 활성물질을 silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, ODS column chromatography로 정제한 다음 HPLC를 이용하여 1종의 화합물을 단리하였다. ¹H-NMR, MS 및 NOESY 분석에 의해 땅콩껍질로부터 분리된 항미생물 활성물질은 pratensein으로 동정되었다.

감사의 글

이 연구는 2004년도 전남대학교 특별연구사업비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Moon JH, Park KH. Functional components and physiological activity of tea. J. the Korean Tea Soc. 1: 177-193 (1995)
2. Chi TH, Lee CY, Huang MT. Phenolic compounds in food and their effects on health I, ACS Symp. Series 506: 102-236 (1992)
3. Ensminger AH, Ensminger ME, Konlande JE, Robson JRK. Foods and Nutrition Encyclopedia. Vol. I. Pegus Press, CA, USA (1983)
4. Yen GC, Duh PD. Antimutagenic effects of methanolic extracts from peanut hulls. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 1678-1700 (1998)
5. Wee JH, Park KH. Identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic

- acid and 4-hydroxybenzoic acid with antioxidative and antimicrobial activity from *Arachis hypogaea* shell. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15: 464-468 (2000)
6. Wee JH, Park KH. Isolation of 4-hydroxycinnamic acid, 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid with antioxidative and antimicrobial activity from peanut (*Arachis hypogaea*) shell. Food Sci. Biotechnol. 10: 551-556 (2001)
7. Park KW, Park KH. Brassinosteroid in rice bran and polished rice. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 360-365 (1996)
8. Cho JY, Kim HK, Ma SJ, Moon JH, Park KH. Isolation and identification of azelaic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid from buckwheat hull as antimicrobial substances. Food Sci. Biotechnol. 9: 313-316 (2000)
9. Lee SJ, Cho JY, Cho JI, Moon JH, Park KD, Lee YJ, Park KH. Isolation and characterization of antimicrobial substance Macroactin A produced from *Bacillus amyloliquefaciens* CHO104 isolated from soil. J. Microbiol. Biotechnol. 14: 525-531 (2004)
10. Yim CK, Moon JH, Park KH. Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid, which exhibits antimicrobial activity, from fruits of *Gardenia jasminoides*. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1386-1392 (1999)
11. Zaika LZ. Spices and herbs. Their antimicrobial activity and its determination. J. Food Safety 9: 97-118 (1988)
12. Fraishtat PD, Popravko SA, Vulfson NS. Clover secondary metabolites VII. Isoflavones from the roots of red clover (*Trifolium pratense*). Bioorganiccheskaya Khimiya 6: 1722-1732 (1980)
13. Kobayashi M, Noguchi H, Sankawa U. Formation of charcones and isoflavones by callus culture of *Glycyrrhiza uralensis* with different production patterns. Chem. Pharm. Bull. 33: 3811-3816 (1985)
14. Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, Gupta MP, Bienzle U, Eich E. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. J. Ethnopharmacol. 73: 131-135 (2000)
15. Sharma RD. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. Atherosclerosis 33: 371-375 (1979)

(2004년 7월 5일 접수; 2004년 7월 29일 채택)