

쿠마린 유도체의 아세틸콜린 에스테라제 저해활성 연구

남승옥^{*,†} · 윤용돈^{*,†} · 박동현^{****} · 류중훈^{****} · 이용섭^{*,**,#}

*경희대학교 나노의약생명과학과, **경희대학교 약학과 ***경희대학교 한약학과
(Received September 30, 2011; Revised November 10, 2011; Accepted November 15, 2011)

Study on the Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Coumarin Derivatives

Seung Ok Nam^{*,†}, Yong Don Yun^{*,†}, Dong Hyun Park^{****}, Jong Hoon Ryu^{****} and Yong Sup Lee^{*,**,#}

^{*}Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

^{**}Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Kyung Hee University

^{***}Department of Oriental Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyung Hee University

Abstract — Alzheimer's disease (AD), one of the most common forms of dementia, is a progressive neurodegenerative disorder symptomatically characterized by the decline in memory and cognitive abilities. To date, the successful therapeutic strategy to treat AD is to maintain the levels of acetylcholine (ACh) by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) to lead five drugs in clinical use. In this study, several coumarin derivatives were designed based on the lead structure of scopoletin and evaluated for their AChE inhibitory activities.

Keywords □ acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, inhibitor, coumarin, scopoletin, memory

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 신경퇴행성 뇌질환으로, 노인성 치매라고도 알려져 있다. 치매란, 뇌기능의 손상에 의해 기억력, 판단력, 사고력, 언어 구사력 등의 지적 능력이 저하되어 일상생활이 어려운 증후군을 뜻하며 AD는 전체 치매의 50~70%를 차지한다. 치매는 심장병 · 뇌졸중 · 암 등과 더불어 사망률이 높은 질환 중 하나이며, 노령인구 증가추세에 따라 치매에 대한 사회 · 경제적인 부담이 커질 것으로 예상된다.^{1,2)} 따라서 치매의 대부분을 차지하는 AD 치료제 개발의 중요성이 증가함에 따라 많은 연구가 진행되고 있지만, 여러 노력에도 불구하고 아직까지 AD의 발병원인 조차 명확하게 밝혀지지 않았다. 최근에는 아밀로이드 단백질의 축적에 의한 뇌세포 사멸이 AD를 유발한다는 가설에 따라³⁾ 많은 약물들이 연구되었지만, 효능 및 부작용 등의 문제로 개발이 중단되어 현재 답보상태에 머물러 있다.⁴⁾ 아밀로이드 단백질과 더불어 인지기능을 담당하는 콜린성 신경계의 퇴화 또한 AD의 중요한 발병원인으로 생각되고 있다.⁵⁾ 이에 현재까지 콜린성 치료제들이 많이 개발되었으며, 이들은 초기 · 중기 AD 환자의 증상을 완화하는 것으로 알려져 있

다.⁶⁾ 콜린성 치료제들은 비록 단기적인 증상완화에 도움을 줄 뿐 질병의 진행을 조절하지는 못하는 것으로 여겨지고 있지만 현 상황에서 콜린성 치료제들은 AD 치료에 여전히 중요한 역할을 담당하고 있다.

아세틸콜린(acetylcholine, ACh)은 인체 내의 신경전달물질 중 하나로, 콜린성 신경계에 주로 분포하며 학습과 기억에 관여한다고 알려져 있다.⁷⁾ AD환자의 뇌 신경절에서는 콜린성 신경계의 퇴화에 따라 ACh의 양이 감소되는 것으로 알려져,⁵⁾ 이에 ACh의 농도의 저하를 늦추기 위하여 ACh의 가수분해효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 저해제가 많이 연구되어 왔다. 그 결과 galantamine, donepezil, rivastigmine, tacrine 등이 AChE 저해제로 FDA에서 승인을 받았지만, 대부분의 AChE 저해제는 효능이 약하거나 위장장애, 간독성 등의 부작용을 나타내기 때문에⁸⁾ 보다 나은 효능을 갖고 부작용이 개선된 새로운 약물의 개발이 요구되고 있다.

Scopoletin은 자연계에 존재하는 coumarin계 화합물로 항염증,⁹⁾ 항종식,¹⁰⁾ 항산화^{11,12)} 등의 효능이 알려져 있다. 최근 Rollinger 등에 의한 연구결과에 따르면, AChE 효소 결합부위에서 galantamine과 유사한 방식으로 결합하는 천연물 성분으로 scopoletin이 보고되었다.¹³⁾ 나아가 실제 *in vitro* 상에서 scopoletin (IC₅₀=169.5 μM)은 비록 galantamine(IC₅₀=1.07 μM)보다는 저

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-961-0370 (팩스) 02-966-3885
(E-mail) kyslee@khu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.



Fig. 1 – Structure of galantamine, scopoletin and target compounds.

해활성이 우수하지는 않지만, *ex vivo* 실험에서는 galantamine과 유사한 수준으로 ACh의 농도를 증가시키는 것이 확인되었다.¹³⁾ 따라서 scopoletin보다 AChE 저해활성이 우수한 coumarin 화합물들은 *in vivo*에서 ACh 농도의 감소를 더욱 효과적으로 낮출 수 있을 것으로 보인다.

본 연구에서는 우수한 AChE 저해활성을 가지는 화합물의 발굴에 활용하고자 scopoletin을 리드화합물로 하여 coumarin 유도체들의 구조-활성관계에 대한 자료를 확보하고자 하였다. 먼저, 효소 결합부위에서 H-bond donor로 작용할 수 있는 hydroxy가 AChE의 저해활성에 미치는 영향을 파악하고자 coumarin 구조에 hydroxy를 갖는 화합물과 hydroxy를 methylation시킨 화합물을 각각 합성하고 이들의 AChE 저해활성을 비교하였다. 또한, galantamine-효소 결합의 hydrophobic 부분과 유사하게 작용할 것이라 생각되는 3번~4번 탄소 이중결합의 중요성을 알아보기 위해 이중결합이 단일결합으로 바뀐 coumarin 화합물들을 합성한 후 AChE 저해활성을 비교하였다. 위 과정을 통해 도출된 coumarin 유도체의 구조와 이들의 활성과의 상관관계는 향후 AD 치료제 후보물질로서의 새로운 coumarin 화합물의 연구 및 발굴 과정에 활용될 것으로 보인다.

실험방법

시약 및 기기

NMR spectra는 Bruker Avance 400 spectrometers(400 MHz)를 사용하여 얻었으며, chemical shift는 tetramethylsilane (TMS)을 내부 표준물질로 사용하고 δ 값으로 표시하였다. 분석용 thin layer chromatography(TLC)는 Machery-Nagel polygram SIL/UV plates(두께 0.20 mm)를 도포한 것을 사용하였으며, 유기화합물의 확인을 위해 254 nm와 365 nm의 자외선 또는 phosphomolybdic acid(PMA) 5% ethanol 용액을 발색제로 사용하였다. 화합물의 정제를 위한 flash column chromatography는 Kiesegel 60(230~400 mesh, Merck)를 사용하였다. 실험에 사용한 대부분의 용매와 시약 및 scopoletin(2a), umbelliferone(2b), esculletin(2c), daphnetin(2d), coumarin(2e)은 Aldrich사 등에서 구입하여 사용하였으며, 정제가 필요한 용매는 기존의 알려진 방법대로 정제하여 사용하였다.

합성

7-Methoxy-2H-chromen-2-one (2f) – Umbelliferone(2b), 100 mg, 0.6 mmol)과 K_2CO_3 (258 mg, 1.8 mmol)를 DMF(5 ml)에 녹인 후 상온에서 methyl iodide(114 mg, 0.8 mmol)를 천천히 적가한다. 반응을 2시간 정도 교반하고 0°C로 냉각한 후 증류수를 넣고 ethyl acetate로 추출한다. 유기층을 분리한 후 증류수를 이용하여 여러 번 세척한다. 얻어진 유기층을 무수 $MgSO_4$ 로 건조하고 감압 하에서 용매를 제거한다. 얻어진 잔사를 column chromatography(EtOAc : *n*-hexane=1 : 1)로 정제하여 화합물 2f(95 mg, 87%)를 얻었다. 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.57(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 7.31(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-4), 6.76~6.80(2H, m, H-5, H-6), 6.19(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-2), 3.81(3H, s, $-OCH_3$).

6,7-Dimethoxy-2H-chromen-2-one (2g) – Esculetin(2c), 100 mg, 0.5 mmol)과 K_2CO_3 (232 mg, 1.6 mmol)를 DMF(5 ml)에 녹인 후 상온에서 methyl iodide(103 mg, 0.7 mmol)를 천천히 적가하고 화합물 2f의 제조방법과 유사하게 정제하여 목적 화합물 2g(67 mg, 58%)를 얻었다. 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.54(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-3), 6.79(1H, s, H-7), 6.78(1H, s, H-4), 6.22(1H, d, $J=9.6$ Hz, H-2), 3.86(3H, s, $-OCH_3$), 3.85(3H, s, $-OCH_3$).

7-Hydroxy-6-methoxychroman-2-one (2h) – Acetic acid(2 ml)에 scopoletin(2a, 50 mg, 0.3 mmol)을 녹인 후, 10% Pd/C(10 mg)을 적가한다. 반응물을 50°C에서 수소 기체 하에 3일 정도 교반시킨다. 반응 종결을 TLC로 확인한 후 촉매를 Celite를 통하여 여과하여 제거한다. 여과액을 감압 하에서 농축한 후 column chromatography(EtOAc : *n*-hexane=1 : 1)로 정제하여 화합물 2h(11 mg, 21%)를 얻었다. 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.60(1H, s, H-4), 6.57(1H, s, H-7), 2.83~2.86(2H, m, $-C-CH_2-CH_2-C-O-$), 2.67~2.70(2H, m, $-C-CH_2-CH_2-C-O-$), 3.81(3H, s, $-OCH_3$).

6,7-Dihydroxychroman-2-one (2i) – Acetic acid(2 ml)에 esculletin(2c, 50 mg, 0.28 mmol)을 녹인 후, 10% Pd/C(15 mg)를 적가하고, 화합물 2h의 제조방법과 유사한 방법으로 정제하여 목적화합물 2i(7 mg, 14%)를 얻었다. 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.61(1H, s, H-4), 6.58(1H, s, H-7), 2.92~2.96(2H, m, $-C-CH_2-CH_2-C-O-$), 2.65~2.72(2H, m, $-C-CH_2-CH_2-C-O-$).

6,7-Dimethoxychroman-2-one (2j) – Acetic acid(2 ml)에 6,7-dimethoxy-2H-chromen-2-one(2g, 40 mg, 0.19 mmol)을 녹인 후, 10% Pd/C(10 mg)를 적가하고, 화합물 2h의 제조방법과 유사한 방법으로 정제하여 목적화합물 2j(17 mg, 43%)를 얻었다. 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.67(1H, s, H-4), 6.62(1H, s, H-7), 3.86(3H, s, $-OCH_3$), 3.85(3H, s, $-OCH_3$), 2.92~2.95(2H, m, $-C-CH_2-CH_2-C-O-$), 2.77~2.81(2H, m, $-C-CH_2-CH_2-$

C-O-).

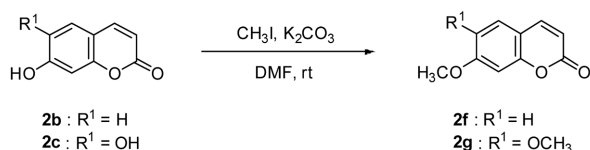
Coumarin 유도체의 AChE 저해활성 측정

Coumarin 유도체의 AChE 저해활성은 Ellman, G. L. *et al.*의 해 발표된 방법에¹⁴⁾ 기초한 colorimetric assay에 의하여 측정하였다. 효소의 추출을 위해서 수컷 ICR mice(25~30 g)의 뇌를 적출하여 질량을 측정하고, 질량의 20 mg/ml가 되는 양의 phosphate buffer(pH 8.0, 0.1 M)를 넣은 후 Teflon homogenizer(Eyela, Japan)을 이용하여 균질화시킨다. 이어 4°C에서 20분간 14,000 rpm으로 원심분리 과정을 진행한 후, 상층액을 효소 자원으로 사용한다. Coumarin 유도체는 증류수 또는 소량의 DMSO로 녹인 후, 희석하여 각 화합물마다 다양한 농도의 약물 용액을 준비하였다. 저해활성 측정반응은 tube 마다 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0, 320 µl), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB, 320 µM, 12.5 µl), 그리고 약물 용액 5 µl과 준비된 AChE 효소용액 50 µl가 포함된 용액에서 진행된다. 각 tube에 acetylthiocholine iodide(ATCh, 480 µM)를 2.5 µl 넣으면 반응이 시작되고, 실온에서 10분간 incubation 후 가역적 AChE 저해제인 neostigmine (2 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0)을 10 µl 넣어 반응을 종료시킨다. 반응 종료 후, 각각의 tube에서 반응액 200 µl를 96-well plate에 담고 UV spectrometer(Optizen 2120UV, Mecasys Co. Ltd., Korea)를 이용하여 410 nm 파장에서의 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 통해 약물이 포함된 용액과 약물이 포함되지 않은 blank 군을 비교하여 각 약물 용액의 농도마다 저해력(%)을 계산하였고, 이 값은 Graphpad Prism 5.00을 이용하여 IC₅₀을 구하는데 사용하였다.

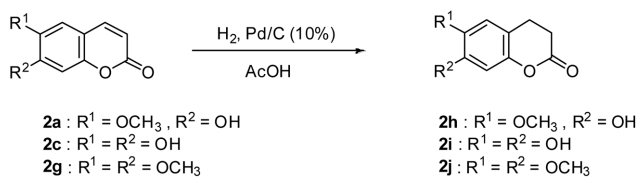
결과 및 고찰

합성

연구에 포함된 화합물 중 구입 가능한 화합물을 제외한 화합물 **2f~2j**는 합성하여 사용하였다. 목적 화합물 **2f**와 **2g**는 Scheme 1에 따라 methylation 반응을 진행하여 합성하였다.¹⁵⁾ 화합물 **2f**와 **2g**는 각각 **2b**(umbelliferone)와 **2c**(esculetin)를 K₂CO₃ 촉매 하에서 methyl iodide와 반응시켜 87% 및 58%의 수율로 얻을 수 있었다. 3번~4번 탄소위치에 단일결합을 갖는 목적 화합물 **2h~2j**는 Scheme 2에 따라 수소화 반응을 통해 환



Scheme 1 – Synthesis of compounds **2f** and **2g**.



Scheme 2 – Synthesis of compounds **2h**, **2i** and **2j**.

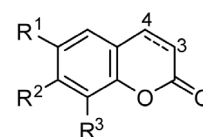
원시켜 얻을 수 있었다.¹⁶⁾ 화합물 **2h**, **2i**와 **2j**는 각각 화합물 **2a**(scopoletin), **2c**(esculetin) 및 **2g**를 acetic acid를 용매로 사용하고 Pd/C(10%) 촉매와 수소 기체 하에서 수소화 반응을 진행하여 각각 21%, 14% 및 43%의 수율로 합성할 수 있었다.

Coumarin 유도체들의 AChE 저해활성 및 구조-활성 상관관계

총 10종의 coumarin 유도체의 AChE에 대한 *in vitro* 저해활성 결과를 Table I에 정리하였다.

화합물들의 AChE 저해활성을 비교한 결과, coumarin 구조의 7번 위치(R²)의 hydroxy와 3번~4번 위치의 탄소 이중결합이 AChE 저해활성에 중요한 역할을 하고 있다고 판단되었다. Hydroxy가 methylation 되거나 혹은 없는 화합물 **2e**, **2f** 및 **2g**는 1,000 µg/ml 이하의 농도에서 AChE 저해활성을 나타내지 않은 것에 비해 hydroxy가 하나 이상 존재하는 화합물 **2a~2d**는 IC₅₀이 19~98 µg/ml의 범위에서 AChE 저해활성을 나타냈다. 이는 쿠마린 골격의 화합물들이 AChE 저해활성을 나타내기 위해서는 효소 활성부위에서 H-bond donor로 작용할 수 있는 hydroxy가 필요하기 때문으로 생각된다. 나아가 어느 위치의 hydroxy가 중요한 역할을 하는 지는 화합물 **2a**와 **2g** 및 **2b~2f**와 **2a~2c**의 경우를 비교할 때 유추할 수 있었다. 화합물 **2a~2g** 및 **2b~2f**의 경우에는 7번 위치(R²)에 hydroxy를 갖는 화합물

Table I – AChE inhibitory activities of **2a~2j**



2a~2j

Compounds	R ¹	R ²	R ³	C3-C4 bond	IC ₅₀ (µg/ml)
2a	OCH ₃	OH	H	HC=CH	19.46
2b	H	OH	H	HC=CH	98.42
2c	OH	OH	H	HC=CH	29.00
2d	H	OH	OH	HC=CH	63.16
2e	H	H	H	HC=CH	>1,000
2f	H	OCH ₃	H	HC=CH	>1,000
2g	OCH ₃	OCH ₃	H	HC=CH	>1,000
2h	OCH ₃	OH	H	H ₂ C-CH ₂	>1,000
2i	OH	OH	H	H ₂ C-CH ₂	>1,000
2j	OCH ₃	OCH ₃	H	H ₂ C-CH ₂	>1,000

2a(IC_{50} =19.46 μ g/ml) 및 **2b**(IC_{50} =98.42 μ g/ml)가 AChE 저해 활성을 나타내는 것에 비해, 동일한 구조에 7번 위치(R^2)의 hydroxy가 methylation된 화합물 **2f** 및 **2g**는 1000 μ g/ml 이하의 농도에서 저해활성을 나타내지 않기 때문에 7번 위치(R^2)의 hydroxy는 AChE 저해활성을 위해 필수적인 부분으로 판단되었다. 7번 위치(R^2)에 hydroxy를 갖는 화합물 **2a**~**2c**의 경우에는 6번 위치(R^1)에 methoxy를 갖는 화합물 **2a**(IC_{50} =19.46 μ g/ml)가 hydroxy를 갖는 화합물 **2c**(IC_{50} =29.00 μ g/ml)보다 저해활성이 우수하였다. 따라서 6번 위치(R^1)의 hydroxy는 비극성인 알킬기를 도입하면 AChE 저해활성이 증가할 것으로 보이며, 앞으로 새로운 화합물의 설계 시 변화를 줄 수 있는 부분이라고 판단된다.

3번~4번 탄소 이중결합의 중요성은 화합물 **2a**~**2h** 및 **2c**~**2i**의 경우를 비교할 때 알 수 있다. 이중결합을 갖는 화합물 **2a**(IC_{50} =19.46 μ g/ml) 및 **2c**(IC_{50} =29.00 μ g/ml)의 경우 AChE 저해활성을 나타내지만, 동일한 구조에 단일결합을 갖는 화합물 **2h** 및 **2i**는 모두 1,000 μ g/ml 이하의 농도에서 저해활성을 나타내지 않았다. 이는 AChE와의 결합 부위에서 이중결합이 galantamine의 hydrophobic한 부분과 유사하게 작용하기 때문으로 보인다. 따라서 coumarin 구조의 3번~4번 탄소 이중결합은 AChE 저해활성에 필수적인 부분이라고 판단되며, 새로운 화합물의 설계 시 반드시 유지되어야 한다고 생각된다. 전체 화합물 중에서는 AChE 저해활성에 중요한 부위를 모두 갖는 화합물 **2a**(scopoletin, IC_{50} =19.46 μ g/ml)가 가장 우수한 저해활성을 나타내었다.

결 론

본 연구에서는 coumarin 유도체의 구조 변화가 AChE 저해활성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해서 총 10종의 coumarin 유도체의 AChE 저해활성을 측정하고 구조-활성 관계를 도출하였다. 그 결과, coumarin 구조의 7번 위치(R^2)의 hydroxy는 효소 저해활성을 갖기 위해서 필수적이며 6번 위치(R^1)의 hydroxy는 효소 저해활성에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다. 그리고 coumarin 구조의 3번~4번 탄소 이중결합은 단일결합으로 바뀔 시 효소 저해활성을 잃는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 새로운 coumarin 화합물의 설계 시 7번 위치(R^2)의 hydroxy와 3번~4번 탄소 이중결합은 반드시 유지되어야 하며, 6번 위치(R^1)의 hydroxy는 변화가 가능한 부분이라고 생각된다. 이와 같은 연구결과는 앞으로 더 우수한 AChE 저해활성을 갖는 coumarin 화합물의 발굴을 위한 연구에 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1) Wimo, A., Winblad, B. and Jonsson, L. : The worldwide societal

- costs of dementia: estimates for 2009. *Alzheimers. Dement.* **6**, 98 (2010).
- 2) Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E. and Sczufca, M. : Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**, 2112 (2005).
- 3) Hardy, J. A. and Higgins, G. A. : Alzheimer's disease : The amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184 (1992).
- 4) Sabbagh, M. N. : Drug Development for Alzheimer's Disease: Where Are We Now and Where Are We Headed? *Am. J. Geriatric Pharmacother.* **7**, 167 (2009).
- 5) Bartus, R. T., Dean, R. L., Bear, B. and Lippa, A. S. : The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408 (1982).
- 6) McGleenon, B. M., Dynan, K. B. and Passmore, A. P. : Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **48**, 471 (1999).
- 7) Drachman, D. A. and Leavitt, J. : Human memory and the cholinergic system. *Arch. Neurol.* **30**, 113 (1974).
- 8) Lanctt, K. L., Herrmann, N., Yau, K. K., Khan, L. R., Liu, B. A., LouLou, M. M. and Einarson T. R. : Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Can. Med. Assoc. J.* **169**, 557 (2003).
- 9) Muschietti, L., Gorzalczy, S., Ferraro, G., Acevedo, C. and Martino, V. : Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Med.* **67**, 743 (2001).
- 10) Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M. and Mori, M. : Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcariindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 96 (1999).
- 11) Shaw, C. Y., Chen, C. H., Hsu, C. C., Chen, C. C. and Tsai, Y. C. : Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytother. Res.* **17**, 823 (2003).
- 12) Toda, S. : Inhibitory effects of phenylpropanoid metabolites on copper-induced protein oxidative modification of mice brain homogenate, *in vitro*. *Biol. Trace. Elem. Res.* **85**, 183 (2002).
- 13) Rollinger, J. M., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H. and Prast, H. : Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J. Med. Chem.* **47**, 6248 (2004).
- 14) Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. : A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- 15) Li, X., Jain, N., Russell, R. K., Ma, R., Branum, S., Xu, J. and

- Sui, Z. : Development of a scalable synthetic process for selective bromination of methyl-3,7-substituted coumarins. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 354 (2006).
- 16) Demyttenaere, J., Syngel, K. V., Markusse, A. P., Vervisch, S., Debenedetti, S and Kimpe, N. D. : Synthesis of 6-methoxy-4*H*-1-benzopyran-7-ol, a character donating component of the fragrance of *Wisteria sinensis*. *Tetrahedron* **58**, 2163 (2002).