

## Norsesquiterpenes from the Roots of White Kwao Krua (*Pueraria mirifica*)

Jung-Hwa Kwon · Jin-Gyeong Cho · Hee-Jung Park · Gyu-Won Huh ·  
Myun-Ho Bang · Min-Woo Han · Chang-Hwan Oh · Sung-Kwon Ko ·  
Soo-Yeul Cho · Kap-Yong Chai · Jin-Ho Kim · Nam-In Baek\*

### 태국췌(*Pueraria mirifica*)으로부터 norsesquiterpene의 분리 및 동정

권정화 · 조진경 · 박희정 · 허규원 · 방면호 · 한민우 · 오창환 · 고성권 ·  
조수열 · 최갑용 · 김진호 · 백남인\*

Received: 13 May 2014 / Accepted: 15 July 2014 / Published Online: 31 December 2014  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

**Abstract** The roots of *Pueraria mirifica* were extracted with 70% aqueous ethyl alcohol and partitioned into ethyl acetate (EtOAc), *n*-butyl alcohol (BuOH), and H<sub>2</sub>O fractions, successively. From the EtOAc fraction, four norsesquiterpenes were isolated through the repeated silica gel, octadecyl silica gel and Sephadex LH-20 column chromatographies. On the basis of physicochemical and spectroscopic data including nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry, and infrared spectroscopy, the chemical structures were identified as megastigm-5-en-3,9-diol (1), linarionoside B (2), 3,5,6,9-tetrahydroxymegastigm-7-ene (3) and 3,4,9-trihydroxymegastigma-5,7-diene (4). Especially, the configuration of the anomer hydroxyl group was determined as *α* from the coupling constants of the anomer proton ( $J=8.0$  Hz) in the <sup>1</sup>H-NMR spectrum. These compounds were isolated for the

first time from the roots of *P. mirifica* in this study.

**Keywords** 3,4,9-trihydroxy-megastigma-5,7-diene · 3,5,6,9-tetrahydroxy megastigm-7-ene · linarionoside B · megastigm-5-en-3,9-diol · norsesquiterpene · *Pueraria mirifica* · White Kwao Krua

### 서 론

태국에서 예로부터 약용으로 이용되는 췌(Kwao Krua)으로는 Red Kwao Krua (*Butea superba*), Black Kwao Krua (*Mucuna collettii*) 및 White Kwao Krua (*Pueraria mirifica*)가 가장 많이 알려져 있다. *P. mirifica*는 갱년기여성에게 대하여 에스트로겐 대체요법으로 사용되고 있으며, Red Kwao Krua (*B. superba*)와 Black Kwao Krua (*M. collettii*)는 남성의 성기능 증진 및 발기부전 예방 및 치료에 사용되고 있다(Suntara, 1931). 최근 위의 3종의 태국췌가 건강기능식품, 화장품 등의 제품으로 우리나라에 허가없이 수입, 유통되고 있다. 제품 중에는 그 효능에 대해 허위, 과장되어 광고되거나 안전성이 확인되지 않은 성분이 혼입되어 안전사고 발생의 우려가 증가하고 있다. 따라서 태국췌의 유효성분에 대한 과학적 효능검증과 아울러 지표성분을 확보함으로써 시료의 정확한 동정과 표준화된 원료의 규명연구가 시급한 실정이다.

*P. mirifica* (White Kwao Krua)는 콩과(Favaceae) 췌속의 덩굴식물이며, 주로 태국 북부의 첸마이 지방에서 자생한다. 잎은 손바닥 모양이며 잎자루에서 3개의 잎이 난다. 2-3월에는 푸른 빛을 띠는 보라색의 꽃이 잔가지의 끝에 30개의 무리를 이루며 피고, 4월에는 각지 안에 3-5개의 씨가 생겨난다(Malaivijitmond, 2012). *P. mirifica*로부터는 현재까지 daidzein, genistein, daidzin, genistin, puerarin, puerarin-6"-monoacetate, mirificin과 같은

J.-H. Kwon · J.-G. Cho · H.-J. Park · G.-W. Huh · M.-H. Bang · M.-W. Han · N.-I. Baek  
Graduate School of Biotechnology & Department of Oriental Medicine Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea

C.-H. Oh · S.-K. Ko  
Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University, Jecheon 390-711, Republic of Korea

S.-Y. Cho · K.-Y. Chai · J.-H. Kim  
Advanced Analysis Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Food & Drug Administration, Osong 363-951, Republic of Korea

\*Corresponding author (N.-I. Baek: nibaek@khu.ac.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

isoflavone (Chansakaow 등, 2000)과 coumestrol, mirificoumestan, mirificoumestan glycol, mirificoumestan hydrate, puerimircarpene, glyurallin A 등의 pterocarpans 화합물(Dziedzic, 1988), 그리고 miroestrol, isomiroestrol, 및 miroestrol-3-O-β-D-glucopyranoside 등의 phytoestrogen 화합물(Bang 등, 2013)이 분리 보고되어 있다. 또한 원기회복, 항노화(Cain, 1960), 폐경기 증상 완화(Urasopon 등, 2007), 에스트로겐 활성화(Chansakaow 등, 2000), 산화에 대한 신경세포 보호(Sonee 등, 2004), 유방암 억제(Lof와 Weiderpass, 2006), 항산화(Zeng 등, 2004; Wu와 Chan, 2007), 여성의 골밀도 저하 억제(Malaivijitnond 등, 2010)를 포함하는 여러 생물학적 효능이 보고되어 있다. 하지만 *P. mirifica*에는 피토에스트로젠이 다량 함유되어 있어(Chandeying과 Lamlerkittikul, 2007) 동물실험 결과 적혈구와 백혈구의 감소 및 자궁비대과 같은 부작용이 확인되었으며 (Jaroenporn 등, 2006; Manonai 등, 2007; Virojchaiwong 등, 2011), 제품을 섭취한 소비자 중 상당수가 하혈을 일으키거나 생리가 멎지 않는 부작용을 겪은 예가 있다(Jaroenporn 등, 2006). 부작용이 확인된 *P. mirifica*가 안전성이 검증되지 않은 각종 알약이나 화장품, 비누 등으로 수입, 판매되거나, 또한 일반적인 한국취 (*Pueraria thumbergiana*)을 비롯해 Red Kwao Krua (*B. superba*), Black Kwao Krua (*M. colletii*)와 같은 식물이 *P. mirifica*로 둔갑하여 판매되기도 하였다. 따라서 이에 대한 관리가 필요하며 이를 위한 지표성분 확보가 요구되어 본 실험을 진행하였다. 본 실험에서는 *P. mirifica* 뿌리로부터 추출, 농축, 분획 및 chromatography를 통해 4종의 norsesquiterpene을 분리, 정제하였으며 Nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS), infrared spectroscopy(IR) 등의 spectroscopic 데이터를 해석하여 구조를 동정하였다.

## 재료 및 방법

**재료.** 본 실험에 사용한 시료 *P. mirifica*의 뿌리 45 kg을 태국의 Hankyong대학교 농과대학 Seilsuth 교수의 도움을 받아 태국 치앙마이에서 구입 및 동정하였으며, 식품의약품안전처를 통해 확인받았다.

**시약 및 기기.** Column chromatography (c.c.)용 silica gel은 Kieselgel 60 (Merck, Germany)을 octadecyl silica (ODS) gel은 LiChroprep RP-18 (Merck)과 Waters ODS (Merck), 그리고 Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Sweden)를 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>와 RP-18 F<sub>254S</sub> (Merck)를 사용하였으며 NMR solvent는 (Merck, 순도 99 %)를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. NMR spectrum은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B (Waltham, MA)로 측정하였고, electronic ionization mass spectrometer spectrum은 JEOL JMS 505-WA (JEOL, Japan)로 측정하였으며, fast atom bombardment mass spectrometry는 JEOL JMS-700을 사용하여 측정하였다. 비선광도는 polarimeter P-1020 (Jasco, Japan)을 사용하여 측정하였고, UV lamp는 Spectroline (Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, USA)을 사용하였다.

**추출 및 분획.** *P. mirifica* 뿌리 건조분말 40 kg을 70% ethyl alcohol (EtOH) 수용액(400 L×2)으로 30°C에서 48시간 교반하

여 추출하고 농축하여 EtOH 농축물(2.8 kg)을 얻었다. 얻어진 EtOH 추출물에 물(12.5 L)을 가하여 현탁시킨 후, ethyl acetate (EtOAc) (12.5 L×3)로 추출하였고, 다시 H<sub>2</sub>O층을 *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH) (7.6 L×2)로 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 *n*-BuOH 분획(PMB, 230 g), EtOAc 분획(PME, 29 g)과 H<sub>2</sub>O 분획(PMH, 2.5 kg)을 얻었다.

**EtOAc 분획으로부터 norsesquiterpene 화합물의 분리.** EtOAc 분획(29 g)으로부터 silica (SiO<sub>2</sub>) gel c.c. (φ 10×15 cm, *n*-hexane-EtOAc = 7:1→5:1→3:1→1:1 CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 13:1→12:1→10:1→9:1→6:1→3:1→2:1→1:1, 각 10 L)를 실시하여 얻어진 용출액을 TLC로 확인하여 유사한 화합물끼리 합하여 20개의 분획물(PME-1-PME-20)을 얻었다. 그 중에서 PME-10 분획(2.2 g, elution volume/total volume (Ve/Vt) 0.278-0.324)을 Waters ODS c.c. (125Å 55-105 μm, φ 4.5×7 cm, MeOH-H<sub>2</sub>O = 1:5→1:3→1:1→2:1, 각 3.1 L)을 실시하여 25개의 분획(PME-10-1-PME-10-25)으로 나누었고, 그 중에서 PME-10-7 분획(201 mg, Ve/Vt 0.202-0.359)에 대하여 SiO<sub>2</sub> c.c. (φ 4×14 cm, CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 250:1, 810 mL)를 실시하여 12개의 분획(PME-10-7-1-PME-10-7-12)으로 나누었으며, 화합물 **1** (PME-10-7-6, 24 mg, Ve/Vt 0.156-0.205, ODS TLC R<sub>f</sub> 0.42, MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:1)을 분리하였다. PME-13 분획(5.6 g, Ve/Vt 0.534-0.580)을 SiO<sub>2</sub> c.c. (φ 5×12 cm, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 33:3:1, 19.8 L)를 실시하여 8개의 분획(PME-13-1-PME-13-8)으로 나누었고, 그 중에서 PME-13-4 (680 mg, Ve/Vt 0.375-0.511)에 대하여 ODS c.c. (φ 4×14 cm, acetone-H<sub>2</sub>O = 1:5→1:3→2:3, 각 2.2 L)를 실시하여 12개의 분획(PME-13-4-1-PME-13-4-12)으로 나누었다. 소분획 PME-13-4-3 (58 mg, Ve/Vt 0.167-0.259)에 대하여 ODS c.c. (φ 3×8 cm, acetone-H<sub>2</sub>O = 1:7, 170 mL)를 실시하여 9개의 분획(PME-13-4-3-1-PME-13-4-3-9)으로 나누었고, 화합물 **4** (PME-13-4-3-6, 8 mg, Ve/Vt 0.525-0.700, ODS TLC R<sub>f</sub> 0.55, MeOH-H<sub>2</sub>O = 1:1)를 분리하였다. PME-13-7 (425 mg, Ve/Vt 0.751-0.875)에 대하여 Waters ODS c.c. (φ 4×16 cm, acetone-H<sub>2</sub>O = 1:7, 5.2 L)를 실시하여 11개의 분획(PME-13-7-1-PME-13-7-11)으로 나누었다. 소분획 PME-13-7-2 (22.8 mg, Ve/Vt 0.074-0.155)에 대하여 Sephadex LH-20 c.c. (φ 1×60 cm, MeOH-H<sub>2</sub>O = 3:2, 126 mL)를 실시하여 5개의 분획(PME-13-7-2-1-PME-13-7-2-5)으로 나누었고, 화합물 **3** (PME-13-7-2-2, 10.9 mg, Ve/Vt 0.271-0.425, SiO<sub>2</sub> TLC R<sub>f</sub> 0.75, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 65:35:10)을 분리하였다. PME-19 분획(2.19 g, Ve/Vt 0.940-0.988)을 ODS c.c. (φ 4.5×12 cm, MeOH-H<sub>2</sub>O = 1:4→1:2→1:1, 각 3.3 L)로 14개의 분획(PME-19-1-PME-19-14)으로 나누었고, 그 중에서 PME-19-12 분획(122 mg, Ve/Vt 0.872-0.976)에 대하여 SiO<sub>2</sub> c.c. (φ 2×15 cm, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 9:3:1→65:35:10, 각 470 mL)을 실시하여 화합물 **2** (PME-19-12-4, 7.4 mg, Ve/Vt 0.204-0.316, SiO<sub>2</sub> TLC R<sub>f</sub> 0.86, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 65:35:10)를 분리하였다. 화합물 **1** (megastigm-5-en-3,9-diol): colorless oil; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -33.8° (c = 0.5, CHCl<sub>3</sub>); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3436, 1637; EI-MS (70 eV) *m/z* 212 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ<sub>H</sub>) 3.83 (1H, dddd, *J* = 12.0, 10.0, 5.6, 3.6 Hz, H-3), 3.69 (1H, m, H-9), 2.17 (1H, ddd, *J* = 16.0, 5.6, 2.0 Hz, Heq-4), 2.10 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.4 Hz, Ha-7), 1.98 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.2 Hz, Hb-7), 1.92 (1H, dd, *J* = 16.0, 10.0 Hz, Hax-4), 1.67 (1H, ddd, *J* = 12.0, 3.6, 2.0 Hz, Heq-2), 1.62 (3H, s, H-13), 1.47 (2H, m, H-8), 1.37 (1H, dd, *J* = 12.0, 12.0 Hz, Hax-2), 1.16 (3H,

d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.05 (3H, d,  $J=3.6$  Hz, H-12), 1.03 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 138.25 (C-6), 125.41 (C-5), 69.17 (C-9), 65.64 (C-3), 49.47 (C-2), 42.93 (C-4), 40.67 (C-8), 38.79 (C-1), 30.32 (C-12), 28.88 (C-11), 25.55 (C-7), 23.26 (C-10), 19.99 (C-13).

화합물 2 (linarionoside B (megastigm-5-en-3,9-diol 9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside)): white amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55.0^\circ$  ( $c=0.73$ , MeOH); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3396, 1642; negative FAB-MS  $m/z$  373 [M-H] $^-$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ) 4.33 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-1'), 3.88 (1H, dddd,  $J=12.0$ , 9.6, 6.4, 3.6 Hz, H-3), 3.83 (1H, m, H-9), 2.29 (1H, br dd,  $J=16.0$ , 6.4 Hz, Heq-4), 2.27 (1H, dd,  $J=14.0$ , 5.2 Hz, Ha-7), 2.14 (1H, dd,  $J=14.0$ , 4.8 Hz, Hb-7), 1.92 (1H, dd,  $J=16.0$ , 9.6 Hz, Hax-4), 1.66 (1H, br dd,  $J=12.0$ , 3.6 Hz, Heq-2), 1.62 (3H, s, H-13), 1.52 (2H, m, H-8), 1.36 (1H, dd,  $J=12.0$ , 12.0 Hz, Hax-2), 1.20 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-10), 1.05 (3H, s, H-12), 1.02 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 138.45 (C-6), 125.34 (C-5), 102.25 (C-1'), 78.20 (C-3'), 77.85 (C-5'), 76.18 (C-9), 75.19 (C-2'), 71.79 (C-4'), 65.69 (C-3), 62.90 (C-6'), 48.78 (C-2), 42.94 (C-4), 38.87 (C-8), 38.80 (C-1), 30.33 (C-12), 28.89 (C-11), 25.29 (C-7), 20.05 (C-13), 19.69 (C-10).

화합물 3 (3,5,6,9-tetrahydroxymegastigm-7-ene): white amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.0^\circ$  ( $c=0.5$ , MeOH); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3359, 1635; ESI-MS  $m/z$  267 [M+Na] $^+$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ) 6.05 (1H, dd,  $J=16.0$ , 1.2 Hz, H-7), 5.78 (1H, dd,  $J=16.0$ , 6.4 Hz, H-8), 4.33 (1H, dqd,  $J=6.4$ , 6.4, 1.2 Hz, H-9), 4.04 (1H, m, H-3), 1.75 (1H, m, Heq-4), 1.74 (1H, br d,  $J=12.0$  Hz, Hax-4) 1.64 (1H, dd,  $J=12.0$ , 12.0 Hz, Hax-2), 1.44 (1H, ddd,  $J=12.0$ , 4.4, 1.6 Hz, Heq-2), 1.26 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.21 (3H, s, H-11), 1.09 (3H, s, H-13), 0.86 (3H, s, H-12);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 136.10 (C-8), 131.12 (C-7), 78.96 (C-6), 77.76 (C-5), 69.56 (C-9), 65.28 (C-3), 46.49 (C-2), 45.66 (C-4), 40.70 (C-1), 27.53 (C-11), 27.06 (C-12), 26.20 (C-10), 24.10 (C-13).

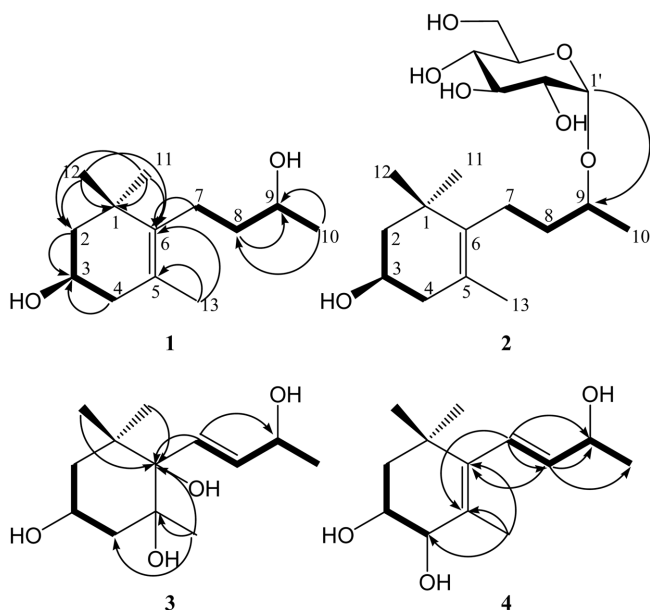
화합물 4 (3,4,9-trihydroxymegastigma-5,7-diene): white amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65.4^\circ$  ( $c=0.52$ , MeOH); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3360, 1635; positive FAB-MS  $m/z$  249 [M+Na] $^+$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ) 6.03 (1H, dd,  $J=16.0$ , 1.2 Hz, H-7), 5.52 (1H, dd,  $J=16.0$ , 6.4 Hz, H-8), 4.29 (1H, dqd,  $J=6.4$ , 6.4, 1.2 Hz, H-9), 3.83 (1H, br d,  $J=3.6$  Hz, H-4), 3.73 (1H, m, H-3), 1.83 (3H, s, H-13) 1.77 (1H, dd,  $J=12.0$ , 10.4 Hz, Hax-2), 1.43 (1H, ddd,  $J=12.0$ , 3.6, 1.6 Hz, Heq-2), 1.26 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.05 (3H, s, H-12), 1.03 (3H, s, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 142.35 (C-6), 140.49 (C-8), 128.86 (C-5), 126.74 (C-7), 72.61 (C-4), 69.37 (C-9), 67.92 (C-3), 41.66 (C-2), 37.70 (C-1), 30.30 (C-12), 27.17 (C-11), 23.85 (C-10), 19.84 (C-13).

## 결과 및 고찰

식물체에 함유되어 있는 이차대사산물의 추출 수율이 가장 높

은 것으로 알려진 70% EtOH을 이용하여 *P. mirifica*의 뿌리 건조 분말을 용매추출하였고, 얻어진 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH, 및  $\text{H}_2\text{O}$ 로 순차 분획하고 각 분획을 감압 농축하였다. 얻어진 EtOAc 분획으로부터 silica gel, ODS, 및 Sephadex LH-20 c.c.를 반복 실시하여 4종의 화합물을 분리하였다.

화합물 1 (colorless oil)은 EI-MS에서  $m/z$  212 [M] $^+$ 의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 212로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기( $3436 \text{ cm}^{-1}$ )와 이중결합 ( $1637 \text{ cm}^{-1}$ )을 갖는 것으로 확인되었다.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 2개의 oxygenated-methine proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  3.83 (1H, dddd,  $J=12.0$ , 10.0, 5.6, 3.6 Hz, H-3), 3.69 (1H, m, H-9)]이 관측되었고, geminal coupling하는 2개의 methylene proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  2.17 (1H, ddd,  $J=16.0$ , 5.6, 2.0 Hz, Heq-4), 1.92 (1H, dd,  $J=16.0$ , 10.0 Hz, Hax-4), 1.67 (1H, ddd,  $J=12.0$ , 3.6, 2.0 Hz, Heq-2), 1.37 (1H, dd,  $J=12.0$ , 12.0 Hz, Hax-2)]이 관측되어 환내에 methylene이 있는 것을 확인하였으며, 2개의 methylene proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  2.10 (1H, dd,  $J=12.0$ , 4.4 Hz, Ha-7), 1.98 (1H, dd,  $J=12.0$ , 5.2 Hz, Hb-7), 1.47 (2H, m, H-8)]이 관측되었다. 1개의 allyl methyl proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  1.62 (3H, s, H-13)]과 3개의 methyl proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  1.16 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.05 (3H, d,  $J=3.6$  Hz, H-12), 1.03 (3H, s, H-11)]이 관측되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 총 13개의 탄소 signal이 관측되었다. Olefin quaternary carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  138.25 (C-6), 125.41 (C-5)] 2개, oxygenated-methine carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  69.17 (C-9), 64.94 (C-3)] 2개, quaternary carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  38.79 (C-1)] 1개, methylene carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  49.47 (C-2), 42.93 (C-4), 40.67 (C-8), 25.55 (C-7)] 4개, methyl carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  30.32 (C-12), 28.88 (C-11), 23.26 (C-10), 19.99 (C-13)] 4개가 관측되어, 탄소 2개가 부족한 norsesquiterpene으로 추정하였다.  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.83 (H-3)의 oxygenated-methine proton signal이  $\delta_{\text{H}}$  1.37 (Hax-2)의 methylene proton signal 및  $\delta_{\text{H}}$  2.17 (Heq-4)의 methylene proton signal과 cross peak를 보여 C-2, C-3, C-4의 부분구조를 확인하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  3.69 (H-9)의 oxygenated methine proton signal이  $\delta_{\text{H}}$  1.16 (H-10)의 methyl proton signal 및  $\delta_{\text{H}}$  1.47 (H-8)의 methylene proton signal과 cross peak를 보였으며, H-8의 methylene proton signal은  $\delta_{\text{H}}$  1.98 (Hb-7)의 methylene proton signal과 cross peak를 보여 C-7, C-8, C-9, C-10의 부분구조를 확인하였다. 주요한 치환기의 결합위치를 확인하기 위하여 hetero-nuclear multiple bond connectivity (gHMBC)를 측정하였다.  $\delta_{\text{C}}$  64.94 (C-3)의 oxygenated methine carbon signal이  $\delta_{\text{H}}$  1.37 (Hax-2) 및  $\delta_{\text{H}}$  1.92 (Hax-4)의 methylene proton signal과 cross peak를 보여 C-3에 수산기가 결합한 것을 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  69.17 (C-9)의 oxygenated methine carbon signal이  $\delta_{\text{H}}$  1.16 (H-10)의 methyl proton signal 및  $\delta_{\text{H}}$  1.47 (H-8)의 methylene proton signal과 cross peak를 보여 C-9에 수산기가 결합한 것을 확인하였다.  $\delta_{\text{H}}$  1.16 (H-10)의 methyl proton signal이  $\delta_{\text{C}}$  69.17 (C-9)의 methylene carbon signal,  $\delta_{\text{C}}$  40.67 (C-8)의 methyl carbon signal과 cross peak를 보여 C-10의 결합위치를 확인하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  1.03 (H-11)과  $\delta_{\text{H}}$  1.16 (H-12)의 methyl proton signal이 각각 서로의 carbon signal인  $\delta_{\text{C}}$  28.88 (C-11),  $\delta_{\text{C}}$  30.32 (C-12)과 cross peak를 보였으며,  $\delta_{\text{C}}$  138.25 (C-6)의



**Fig. 1** Chemical structure of norsesquiterpens from the roots of *Pueraria mirifica* and key correlation of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (—) and gHMBC (→) spectrum.

olefin quaternary carbon signal,  $\delta_c$  38.79 (C-1)의 quaternary carbon signal 및  $\delta_c$  49.47 (C-2)의 methylene carbon signal과 cross peak를 보여 두 개의 methyl기인 C-11과 C-12가 C-1에 결합한 것을 확인하였다.  $\delta_H$  1.62 (H-13)의 methyl proton signal이  $\delta_c$  138.25 (C-6),  $\delta_c$  125.41 (C-5)의 olefin quaternary carbon signal 및  $\delta_c$  42.93 (C-4)의 methylene carbon signal과 cross peak를 보여 C-13가 C-5에 결합한 것을 확인하였다.  $\delta_H$  2.10 (H-7)의 methylene proton signal이  $\delta_c$  138.25 (C-6)의 olefin quaternary carbon signal과 cross peak를 보여 이중결합의 결합위치를 확인하였다. 이를 종합하여, 화합물 1을 megastigm-5-en-3,9-diol로 구조동정하였다(Achenbach 등, 1995; Lin 등, 1999).

화합물 2 (white amorphous powder)는 negative FAB-MS에서  $m/z$  373 [M-H]<sup>-</sup>의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 374로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3396  $\text{cm}^{-1}$ )와 이중결합(1642  $\text{cm}^{-1}$ )을 갖는 것으로 확인되었다.  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ -NMR data의 양상이 화합물 1과 매우 유사하였으며, 화합물 2는 당한 분자가 더 결합하고 있는 점이 달랐다.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 hemiacetal proton signal 1개 [ $\delta_H$  4.35 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-1')]가 관측되어, 당이 결합하고 있음을 확인하였고, 당으로부터 유래한 다수의 signal [ $\delta_H$  3.85–3.15]이 관측되었다. 또한,  $\delta_H$  4.35의 hemiacetal proton signal의  $J$ 값 (chemical constant)으로부터 당이  $\beta$ 로 결합한 것으로 예측하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서도 hemiacetal carbon signal [ $\delta_c$  102.25 (C-1')] 1개가 관측되었으며, 당에서 유래하는 signal의 chemical shift값으로부터 당이  $\beta$ -glucopyranoside [ $\delta_c$  75.19 (C-2'), 78.20 (C-3'), 71.79 (C-4'), 77.85 (C-5'), 62.90 (C-6')]임을 확인하였다. 당의 결합위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 측정하였다.  $\delta_H$  4.35 (H-1')의 hemiacetal proton signal이  $\delta_c$  76.18 (C-9)의 oxygenated methine proton signal과 cross peak를 보여 당의 결합위치를 확인하였다. 이를 종합하여, 화합물

물 2를 linarionolisde B (megastigm-5-en-3,9-diol 9- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside)로 구조동정하였다(Otsuka, 1994; Otsuka 등, 2001).

화합물 3 (white amorphous powder)은 ESI-MS에서  $m/z$  267 [M+Na]<sup>+</sup>의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 244로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3359  $\text{cm}^{-1}$ )와 이중결합(1635  $\text{cm}^{-1}$ )을 갖는 것으로 확인되었다.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 2개의 olefin methine proton signal [ $\delta_H$  6.05 (1H, dd,  $J=16.0, 1.2$  Hz, H-7), 5.78 (1H, dd,  $J=16.0, 2.4$  Hz, H-8)]이 관측되었으며,  $J$ 값으로부터 *trans* 이중결합인 것으로 확인되었다. 2개의 oxygenated-methine proton signal [ $\delta_H$  4.33 (1H, dqd,  $J=6.4, 6.4, 1.2$  Hz, H-9), 4.04 (1H, m, H-3)]이 관측되었고, geminal coupling하는 2개의 methylene proton signal [ $\delta_H$  1.75 (1H, m, Heq-4), 1.74 (1H, br d,  $J=12.0$  Hz, Hax-4) 1.64 (1H, dd,  $J=12.0, 12.0$  Hz, Hax-2), 1.44 (1H, ddd,  $J=12.0, 4.4, 1.6$  Hz, Heq-2)]이 관측되어 환 내에 methylene이 있는 것을 확인하였다. 4개의 methyl proton signal [ $\delta_H$  1.26 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.21 (3H, s, H-11), 1.09 (3H, s, H-13), 0.86 (3H, s, H-12)]이 또한 관측되었다. 그 중, 3개의 methyl signal이 singlet으로 관측되어 4급 탄소에 결합된 methyl이 3개(H-11, H-12, H-13)인 것으로 확인되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 총 13개의 탄소 signal이 관측되었다. Olefin methine carbon signal [ $\delta_c$  136.10 (C-8), 131.12 (C-7)] 2개가 관측되었고, oxygenated-quaternary carbon signal [ $\delta_c$  78.96 (C-6), 77.76 (C-5)] 2개, oxygenated-methine carbon signal [ $\delta_c$  69.56 (C-9), 65.28 (C-3)] 2개가 관측되었다. Quaternary carbon signal [ $\delta_c$  40.70 (C-1)] 1개, methylene carbon signal [ $\delta_c$  46.49 (C-2), 45.66 (C-4)] 2개, methyl carbon signal [ $\delta_c$  27.53 (C-11), 27.06 (C-12), 26.20 (C-10), 24.10 (C-13)] 4개가 관측되었으며, 탄소 2개가 부족한 norsesquiterpene으로 추정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum에서  $\delta_H$  6.05 (H-7),  $\delta_H$  5.78 (H-8)의 olefin methine proton signal이 cross peak를 보였으며,  $\delta_H$  4.33 (H-9)의 oxygenated-methine proton signal이 H-8 및  $\delta_H$  1.35 (H-10)의 methyl proton signal과 cross peak를 보여 C-7, C-8, C-9, C-10의 연결을 확인하였다.  $\delta_H$  4.04(H-3)의 oxygenated methine proton signal이  $\delta_H$  1.64 (Hax-2) 및  $\delta_H$  1.75 (Heq-4)의 methylene proton signal과 cross peak를 보여 C-2, C-3, C-4의 부분구조를 확인하였다. 주요 치환기의 결합위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 측정하였다.  $\delta_H$  1.26 (H-10)의 methyl proton signal이  $\delta_c$  69.56(C-9)와 cross peak를 보여 C-10의 위치를 확인하였고,  $\delta_H$  1.09 (H-13)의 methyl proton signal이  $\delta_c$  77.76 (C-5),  $\delta_c$  78.96 (C-6),  $\delta_c$  45.66 (C-4)와 cross peak를 보여 C-13의 위치를 확인하였다. 또한,  $\delta_H$  6.05 (H-7)의 olefin methine proton signal이  $\delta_c$  78.96 (C-6)의 quaternary carbon signal,  $\delta_c$  69.56 (C-9)의 oxygenated methine proton signal과 cross peak를 보여 이중결합의 위치를 확인하였고,  $\delta_c$  78.96 (C-6)이  $\delta_H$  6.05 (H-7),  $\delta_H$  1.21 (H-12),  $\delta_H$  1.09 (H-13),  $\delta_H$  0.86 (H-11)과 cross peak를 보여 C-6의 위치를 확인하였다.  $\delta_H$  1.09 (H-13)의 methyl proton signal이  $\delta_c$  78.96 (C-6),  $\delta_c$  77.76 (C-5),  $\delta_c$  45.66 (C-4)와 cross peak를 보여 C-13의 위치를 확인하였다. 이를 종합하여, 화합물 3을 megastigmane 골격에 수산기가 4개 결합한 3,5,6,9-tetrahydroxy-megastigm-7-ene으로 구조동정하였다(Yu 등, 2002; Tung 등, 2009).

화합물 4 (white amorphous powder)는 positive FAB-MS에서  $m/z$  249  $[M+Na]^+$ 의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 226으로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기( $3360\text{ cm}^{-1}$ )와 이중결합( $1635\text{ cm}^{-1}$ )을 갖는 것으로 확인되었다.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 *trans* 구조를 갖는 olefin methine proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  6.03 (1H, d,  $J=16.0, 1.2$  Hz, H-7), 5.52 (1H, dd,  $J=16.0, 6.4$  Hz, H-8)]이 관측되었고, oxygenated-methine proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  4.29 (1H, dqd,  $J=6.4, 6.4, 1.2$  Hz, H-9), 3.83 (1H, br d,  $J=3.6$  Hz, H-4), 3.73 (1H, m, H-3)] 3개와 methylene proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  1.77 (1H, dd,  $J=12.0, 10.4$  Hz, Hax-2), 1.43 (1H, ddd,  $J=12.0, 3.6, 1.6$  Hz, Heq-2)] 1개가 관측되었다. 1개의 allyl methyl proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  1.83 (3H, s, H-13)] 및 3개의 methyl proton signal [ $\delta_{\text{H}}$  1.26 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-10), 1.05 (3H, s, H-12), 1.03 (3H, s, H-11)]이 관측되었다. 그 중, 3개의 methyl signal이 singlet으로 관측되어 4급 탄소에 결합된 methyl이 3개(H-10, H-11, H-12)인 것으로 확인되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spectrum에서 총 13개의 탄소 signal이 관측되었다. Olefin quaternary carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  142.35 (C-5), 128.86 (C-6)] 2개가 관측되었고, olefin methine carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  140.49 (C-8), 126.74 (C-7)] 2개가 관측되어 이중결합이 두 쌍 존재하는 것을 확인하였다. Oxygenated-methine carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  72.61 (C-4), 69.37 (C-9), 67.92 (C-3)] 3개, quaternary carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  37.70 (C-1)] 1개, methylene carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  41.66 (C-2)] 1개와 methyl carbon signal [ $\delta_{\text{C}}$  30.30 (C-12), 27.17 (C-11), 23.85 (C-10), 19.84 (C-13)] 4개가 관측되었다.  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  3.73 (H-3)의 oxygenated-methine proton signal이  $\delta_{\text{H}}$  3.83 (H-4)의 methylene proton signal 및  $\delta_{\text{H}}$  1.77 (Hax-2)의 methylene proton signal과 cross peak를 보여 C-2, C-3, C-4의 부분구조를 확인하였다. 또한,  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (H-8)과  $\delta_{\text{H}}$  6.03 (H-7)의 olefin methine proton signal간에 cross peak가 보였으며,  $\delta_{\text{H}}$  4.29 (H-9)이  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (H-8),  $\delta_{\text{H}}$  1.26 (H-10)와 cross peak를 보여 C-7, C-8, C-9, C-10의 부분구조를 확인하였다. gHMBC 스펙트럼에서는  $\delta_{\text{H}}$  1.83 (H-13)의 methyl proton signal이  $\delta_{\text{C}}$  142.35 (C-5),  $\delta_{\text{C}}$  128.86 (C-6),  $\delta_{\text{C}}$  72.61 (C-4)와 cross peak를 보여 C-13의 위치를 확인하였다. Olefin methine proton signal  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (H-8)이  $\delta_{\text{C}}$  128.86 (C-6),  $\delta_{\text{C}}$  69.37 (C-9),  $\delta_{\text{C}}$  23.85 (C-10)과 cross peak를 보였으며,  $\delta_{\text{H}}$  6.03 (H-7)이  $\delta_{\text{C}}$  140.49 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  142.35 (C-5),  $\delta_{\text{C}}$  69.37 (C-9)와 cross peak를 보여 이중결합의 위치를 확인하였다. 이를 종합하여, 화합물 4를 megastigmane 골격에 수산기가 3개 결합하고, 이중결합이 2쌍 존재하는 3,4,9-trihydroxymegastigma-5,7-diene으로 구조 동정하였다(Cox 등, 2005).

위에서 분리한 4종의 화합물은 *Pueraria*속에서는 처음으로 분리한 것으로 식물분류학적으로 가치가 있을 것으로 생각된다. 또한 sesquiterpene보다 탄소 1개가 적은 norsesquiterpene 화합물로, 일반적으로 megastigmane 골격을 갖는 sesquiterpene은 anti-elastase 활성(Xu 등, 2010), 피부흑색종에 대한 세포독성(Panza 등, 2011), 버섯에 대한 tyrlsinase 저해 활성(Yu 등, 2011), 상추와 토마토에 대한 식물독성(Macias 등, 2008), 항염 활성을 갖는 효소 HO-1와 SIRT1의 발현을 촉진(Park 등, 2011)하는 등의 활성이 알려져 있다. 따라서 *P. mirifica*로부터 분리한 4종의 화합물 또한 이와 유사한 활성을 가질 것으로 기대된다.

## 초 록

*Pueraria mirifica* 뿌리를 실온에서 70% EtOH 수용액으로 추출하고 이 추출물을 EtOAc 분획, *n*-BuOH 분획,  $\text{H}_2\text{O}$  분획으로 나누었다. EtOAc 분획에 대하여 silica gel, octadecyl silica, 및 Sephadex LH-20 c.c.를 반복 실시하여 4종의 화합물을 분리, 정제하였다. Nuclear magnetic resonance, infrare, 및 mass spectrometry의 spectroscopic data를 해석하여, 화합물 1-4를 각각 megastigm-5-en-3,9-diol, linarionoside B, 3,5,6,9-tetrahydroxymegastigm-7-ene 및 3,4,9-trihydroxymegastigma-5,7-diene으로 구조를 결정하였다. 화합물 1-4 모두 *P. mirifica*에서는 이번이 처음으로 분리된 화합물이다.

**Keywords** 3,4,9-trihydroxymegastigma-5,7-diene · 3,5,6,9-tetrahydroxy megastigm-7-ene · linarionoside B · megastigm-5-en-3,9-diol · norsesquiterpene · *Pueraria mirifica* · White Kwao Krua

**감사의 글** 본 연구는 식품의약품안전평가원(10182KFDA595)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

## References

- Achenbach H, Lottes M, Waibel R, Karikas GA, Correa A, and Gupta MP (1995) Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. *Phytochemistry* **38**, 1537–45.
- Bang MH, Lee DK, Baek YS, Cho JG, Han MW, Choi KS et al. (2013) A new miroestrol glycoside from the roots of *Pueraria mirifica*. *Chem Nat Compd* **49**, 443–5.
- Cain JC (1960) Miroestrol: an estrogen from the plant *Pueraria mirifica*. *Nature* **188**, 774–7.
- Chandeying V and Lamlerkittikul S (2007) Challenges in the conduct of thai herbal scientific study: efficacy and safety of phytoestrogen, *Pueraria mirifica* (kwao keur kao), phase1, in the alleviation of climacteric symptoms in perimenopausal women, *J Med Assoc Thai* **90**, 1274–80.
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine T, Okada M, Higuchi Y, and Kudo M (2000) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* **66**, 572–5.
- Cox A, Skouroumounis GK, Elsey GM, Perkins MV, and Sefton MA (2005) Generation of (*E*)-1-(2,3,6-trimethylphenyl)buta-1,3-dien from  $\text{C}_{13}$ -norisoprenoid precursors. *J Agric Food Chem* **53**, 6777–83.
- Dziedzic SZ (1988) Coumestans from the roots of *Pueraria mirifica*. *J Biosci* **2**, 5–10.
- Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasiriakit K, Trisomboon H, Watanabe G, Taya K et al. (2006) Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. *Endocr J* **30**, 93–101.
- Lin TC, Fang JM, and Cheng YS (1999) Terpenes and lignans from leaves of *Chamaecyparis formosensis*. *Phytochemistry* **51**, 793–801.
- Lof M and Weiderpass E (2006) Epidemiologic evidence suggests that dietary phytoestrogen intake is associated with reduced risk of breast, endometrial, and prostate cancers. *Nutr Res* **26**, 609–19.
- Macias FA, Laret R, Varela RM, Nogueiras C, and Molinillo JMG (2008) Bioactive apocarotenoids from *Tectona grandis*. *Phytochemistry* **69**, 270815.
- Malaivijitnond S (2012) Medicinal applications of phytoestrogens from the Thai herb *Pueraria mirifica*. *Front Med* **6**, 8–21.
- Malaivijitnond S, Tungmunthum D, Gittarasanee S, Kawin K, and Limjunyawong N (2010) Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. *Fitoterapia* **81**, 569–79.
- Manonai J, Chittacharoen A, Theppisai U, and Theppisai H (2007) Effect of *Pueraria mirifica* on vaginal health. *Menopause* **14**, 811–959.

- Otsuka H (1994) Linarionosides A-C and acyclic monoterpene diglucosides from *Linaria japonica*. *Phytochemistry* **37**, 461–5.
- Otsuka H, Zhong XN, Hirata E, Shinzato T, and Takeda Y (2001) Myrsiniosides A-E: Megastigmane glycosides from the leaves of *Myrsine seguinii* LEV. *Chem Pharm Bull* **49**, 1093–7.
- Panza E, Tersigni M, Iorizzi M, Zollo F, De Marino S, Festa C et al. (2011) Lauroside B, a megastigmane glycoside from *Laurus nobilis* (bay laurel) leaves, induces apoptosis in human melanoma cell lines by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *J Nat Prod* **74**, 22833.
- Park JH, Lee DG, Yeon SW, Kwon HS, Ko JH, Shin DJ et al. (2011) Isolation of Megastigmane Sesquiterpenes from the Silkworm (*Bombyx mori* L.) Droppings and Their Promotion Activity on HO-1 and SIRT1. *Arch Pharm Res* **34**, 533–42.
- Sonee M, Sum T, Wang C, and Mukherjee SK (2004) The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *Neurotoxicology* **25**, 885–91.
- Suntara A (1931) In *The Remedy Pamphlet of Kwao Krua Tuber of Luang Anusarnsuntarakromkarnpiset*, Upatipongsa Press, Thailand.
- Tung NH, Ding Y, Choi EM, Van Kiem P, Van Minh C, and Kim YH (2009) New anthracene glycosides from *Rhodomyrtus tomentosa* stimulate osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells. *Arch Pharm Res* **32**, 515–20.
- Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, and Malaivijitmond S (2007) *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. *Maturitas* **56**, 322–31.
- Virojchaiwong P, Suvithayasiri V, and Itharat A (2011) Comparison of *Pueraria mirifica* 25 and 50 mg for menopausal symptoms. *Arch Gynecol Obstet* **284**, 411–9.
- Wu HJ and Chan WH (2007) Genistein protects methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 335–42.
- Xu GH, Kim YH, Choo SJ, Ryoo IJ, Yoo JK, Ahn JS et al. (2010) Two acetylated megastigmane glycosides from the leaves of *Ilex paraguariensis*. *Arch Pharm Res* **33**, 369–73.
- Yu LL, Hu WC, Ding G, Li RT, Wei JH, Zou ZM et al. (2011) Gusanlungiosides A-D, potential tyrosinase inhibitors from *Arcangelisia gusanlung*. *J Nat Prod* **74**, 1009–14.
- Yu Q, Otsuka H, Hirata E, Shinzato T, and Takeda Y (2002) Turpiniosides A-E: Megastigmane glucosides from leaves of *Turpinia ternata* Nakai. *Chem Pharm Bull* **50**, 640–4.
- Zeng H, Chen Q, and Zhao B (2004) Genistein ameliorates betaamyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* **36**, 180–8.