

생강 (*Zingiber officinale* R.) 근경으로부터 항산화 활성물질의 분리

방면호 · 송정춘¹ · 김선림¹ · 허한순¹ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹농촌진흥청 작물시험장 작물환경과

(2001년 4월 19일 접수, 2001년 5월 11일 수리)

건강을 80% MeOH 수용액으로 추출하고, 얻어진 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 용매 분획하였다. 그 중에서 뚜렷한 활성을 보인 EtOAc 분획으로부터 DPPH(1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 포획법으로 항산화 활성을 추적하여 항산화 활성을 갖는 화합물 2종을 분리하였다. 각각을 NMR 및 MS 데이터의 해석과 문헌 자료를 조사하여 6-shogaol 및 12-shogaol로 구조를 결정하였다. 각 화합물의 EC₅₀값은 26.4 μM과 22.5 μM로 상용항산화제인 BHA, BHT 및 α-tocopherol 보다 뚜렷이 높은 활성을 나타내었다.

Key words: 항산화물질, DPPH 라디칼 소거활성, 건강, shogaol

서 론

항산화물질은 식품 중에 첨가함으로써 유지의 산패를 억제하여 식품의 저장성을 높이는 데 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 각종 프리 라디칼이 관여하는 것으로 여겨지고 있는 노화 관련 질환들에 대하여도 유의한 작용을 할 것으로 기대되고 있다.^{1,2)}

최근 합성항산화제의 안전성문제로 그 사용이 제한되면서, 합성항산화제를 대체할만한 안전한 천연 항산화제의 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.³⁾ 식물체는 다양한 형태의 항산화 물질을 함유하고 있으며,⁴⁾ 지금까지 식물체로부터 수많은 항산화물질이 분리, 보고되었으나,^{5,6)} 본격적으로 실용화되고 있는 예는 극히 드물다.

본 실험에서는 DPPH radical에 대하여 소거 활성이 높은 것으로 확인된 건강의 MeOH 추출물로부터 활성물질을 분리, 동정하고자 하였다.

건강은 생강과에 속하는 多年生 草本식물인 생강(*Zingiber officinale* R.)의 근경을 말린 약재로, 그 精油 중에는 zingiberene, phellandrene, camphene, shogaol, zingerol, zingerone, borneol, zingiberol, 구연산 등이 함유되어 있으며, 또 樹脂 및 澱粉도 들어 있다.⁷⁾ 주요 약리 작용으로는 消化液 分泌促進, 食慾增進作用, 抗菌과 抗原蟲作用이 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 그러나 항산화활성과 관련된 건강의 성분에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 본 논문에서는 한국인의 식생활에서 매우 중요한 향신료 중의 하나인 생강으로부터 항산화물질을 분리하여 구조를 동정하고, 아울러 상용 항산화제와의 활성 비교를 한 연구결과를 기술하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 공시재료인 국내산 건강은 서

울 경동 시장 약재상에서 구입하였다.

DPPH를 이용한 전자공여능(Electron Donating Ability, EDA)측정. 시료의 추출, 농축, 용매분획 및 DPPH radical 소거능의 측정은 전보⁸⁾와 동일한 방법으로 수행하였다. EDA는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

$$EDA(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

건강의 추출 및 용매분획. 65°C에서 열풍건조한 건강(*Zingiber officinale*) 5 kg을 분쇄기로 분쇄한 후 80% MeOH 수용액(12 l×2)를 가하여 실온에서 하룻밤 추출하였다. 여과지로 여과한 후 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하였다. 농축물을 물(2.5 l)과 ethyl acetate(EtOAc, 2.5 l×2)로 분배 추출하였고, 물층은 다시 *n*-butanol(*n*-BuOH, 2.5 l×2)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc분획(60 g), *n*-BuOH(80 g) 및 물분획(1 kg)을 얻었다.

활성 물질의 분리. EtOAc 추출물에 대하여 silica gel(650 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc = 15:1→10:1→5:1→2:1→1:1)를 실시하여, 60 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC로 확인하여 9개의 소분획(ZORE-1~ZORE-9)을 얻었다. 각각의 소분획에 대하여 DPPH radical 소거활성을 측정하여 강한 활성을 나타낸 4번째 분획(ZORE-4)을 다시 silica gel(250 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc, 7:1→5:1)를 실시하여 5개의 소분획(ZORE-4-1~ZORE-4-5)을 얻었다. 그 중 활성이 확인된 2번째 소분획(ZORE-4-2)에 대하여 silica gel(220 g) column chromatography(CHCl₃-MeOH, 5:1, v/v)하여 3개의 소분획(ZORE-4-2-1~ZORE-4-2-3)을 얻었다. 그 중 활성이 확인된 2번째 소분획(ZORE-4-2-2)을 다시 silica gel(170 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc, 5:1, v/v, CHCl₃-MeOH, 7:1, v/v)하여 항산화활성을 나타낸 물질 ZORE-4-2-2(1, 12-shogaol, 120 mg)와 ZORE-4-2-2-3(2, 6-shogaol, 170 mg)을 분리하였다.

화합물 1(ZORE-4-2-2-3, 6-shogaol): Pale yellow oil; IR

*연락처자

Tel: 82-31-201-2661; Fax: 82-31-204-8116

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

결과 및 고찰

(CHCl₃, max) 3069, 1682, 1579 cm⁻¹; EI/MS *m/z*: 276(M⁺), 205, 151, 137, 119, 91, 55; ¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N) 7.14 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 6.92(1H, d, *J*=1.7 Hz, H-2), 6.87(1H, dt, *J*=15.9, 6.8 Hz, H-5'), 6.85(1H, dd, *J*=8.0, 1.7 Hz, H-6), 6.19(1H, d, *J*=15.9 Hz, H-4'), 3.34(3H, s, -OCH₃), 2.99(2H, t, *J*=6.8 Hz, H-1'), 2.94(2H, t, *J*=6.8 Hz, H-2'), 2.05(2H, dt, *J*=7.0, 6.8 Hz, H-6'), 1.32(2H, m, H-7'), 1.27(2H×2, m, H-8', H-9'), 0.81(3H, t, *J*=7.3 Hz, H-10'); ¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N) 199.35(C-3'), 148.56(C-3), 147.37(C-5'), 146.45(C-4), 132.88(C-1), 130.84(C-4'), 121.41 (C-6), 116.47(C-5), 113.00(C-2), 55.88(-OCH₃), 42.24(C-2'), 32.49(C-6'), 31.49(C-8'), 30.17(C-1'), 27.97(C-7'), 22.16(C-9'), 14.05(C-10').

화합물 2(ZORE-4-2-2-2, 12-shogaol): Pale yellow oil; IR (CHCl₃, max), 3021, 2875, 1688, 1592 cm⁻¹; EI/MS *m/z*: 360 (M⁺), 205, 151, 137, 119, 91, 55; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD) 6.76(1H, d, *J*=7.2 Hz, H-5), 6.75(1H, dt, *J*=15.8, 6.5 Hz, H-5'), 6.50(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 6.48(1H, dd, *J*=7.2, 2.0 Hz, H-6), 6.01(1H, d, *J*=15.8 Hz, H-4'), 3.69 (3H, s, -OCH₃), 2.75(2H, t, *J*=6.5 Hz, H-1'), 2.73(2H, t, *J*=6.5 Hz, H-2'), 2.05(2H, dt, *J*=6.5, 7.1 Hz, H-6'), 1.44 (2H, m, H-7'), 1.34(2H×8, m, H-8', H-9', H-10', H-11', H-12', H-13', H-14', H-15'), 0.79(3H, t, *J*=7.1 Hz, H-16'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) 202.55(C-3'), 149.89(C-5'), 148.78 (C-3), 145.76(C-4), 133.94(C-1), 131.30(C-4'), 121.70(C-6), 116.10(C-5), 113.12(C-2), 56.33(-OCH₃), 42.67(C-2'), 33.50(C-6'), 33.00(C-14'), 31.05, 30.59, 30.56, 30.47, 30.39, 30.28(C-7', C-8', C-9', C-10', C-11', C-12'), 30.19(C-1'), 29.18(C-13') 23.69(C-15'), 14.47(C-16').

6-shogaol, 12-shogaol 및 상용 항산화제의 DPPH radical 소거 활성. 6-shogaol, 12-shogaol 및 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), α-tocopherol 을 각각 1 μg/ml, 2.5 μg/ml, 5.0 μg/ml, 7.5 μg/ml, 10.0 μg/ml, 15.0 μg/ml가 되도록 시험관에 첨가한 후, MeOH 1 ml로 용해 하고 전보⁸⁾와 동일한 방법으로 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다.

건강으로부터 얻어진 MeOH 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 순차 분획하고 감압농축기(45 °C)를 사용하여 용매를 충분히 제거하여 3개의 분획을 얻었다. 얻어진 각 분획에 대하여 DPPH radical 소거법으로 전자공여 능(EDA, Electron donating ability)을 측정 한 결과는 Table 1 과 같다.

Table 1 에서 나타난 바와 같이 각 분획 중에서 EtOAc 추출 물에서만 활성이 뚜렷이 높았고, 농도가 증가함에 따라 그 효과도 상승하였다.

EtOAc추출물로부터 항산화활성 물질을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography를 이용하여 몇 개의 분획으로 나누었으며, 각 분획에 대하여 활성을 측정하였다. 활성이 확인된 분획에 대하여 다시 silica gel column chromatography를 실시 하여 활성물질을 추적하였다. 얻어진 각 분획에 대한 전자공여 능 측정결과는 Table 2와 같다.

건강에 대한 활성물질을 추적 분리한 결과 첫번째 단계에서 모두 9개의 소분획으로 나누었으며 그 중 네번째 분획(ZORE-4)에 활성이 집중되었고(2 mg/ml일 때 EDA 값이 70.6%), 다시 그 활성분획으로부터 얻어진 5개의 분획 중에서는 2번(ZORE-4-2, 78.9%)분획에서 활성이 나타났다. 세번째 단계에서 분리한 3개의 분획 중에서 2번 분획(ZORE-4-2-2, 83.3%)에 활성이 집중되었다. 네번째 단계에서 분리한 5개의 분획 중에서는 2번 (ZORE-4-2-2-2, 화합물 1, 85.8%), 3번(ZORE-4-2-2-3, 화합물 2, 90.1%) 분획에 활성이 집중되었으며, TLC로 전개하였을 때 서로 다른 단일 성분으로 확인되었다.

화합물 1은 연한 노란색 oil상 물질로서, IR spectrum에서 수

Table 1. Electron donating ability of fractions obtained from MeOH extract of *Zingiber officinale* (unit: %)

Fraction	EDA (%)		
	4 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml
ZOR-EtOAc	84.9	71.4	48.3
ZOR-BuOH	23.5	13.3	7.3
ZOR-H ₂ O	3.1	1.2	0.5

Table 2. Electron donating ability of several fractions obtained from EtOAc extract through silica gel column chromatography (unit: %)

1st fractionation		2nd fractionation		3rd fractionation		4th fractionation	
Fr ^a	EDA	Fr ^a	EDA	Fr ^a	EDA	Fr ^a	EDA
ZOR-E-1	0	ZOR-E-4-1	6.5	ZOR-E-4-2-1	46.9	ZOR-E-4-2-2-1	27.4
ZOR-E-2	8.2	ZOR-E-4-2	78.9	ZOR-E-4-2-2	83.3	ZOR-E-4-2-2-2	85.8
ZOR-E-3	52.3	ZOR-E-4-3	48.8	ZOR-E-4-2-3	71.9	ZOR-E-4-2-2-3	90.1
ZOR-E-4	70.6	ZOR-E-4-4	46.0			ZOR-E-4-2-2-4	49.9
ZOR-E-5	70.0	ZOR-E-4-5	25.1			ZOR-E-4-2-2-5	38.9
ZOR-E-6	70.1						
ZOR-E-7	68.6						
ZOR-E-8	60.4						
ZOR-E-9	61.2						

^aConcentration: 1 mg/ml

Table 3. EC₅₀ values of compounds 1(6-shogaol), 2(12-shogaol) and commercial antioxidants (BHA, BHT and α-tocopherol) in electron donating ability

Compounds	1	2	BHA	BHT	α-tocopherol
EC ₅₀ values (μM)	26.4	22.5	47.8	62.7	28.6

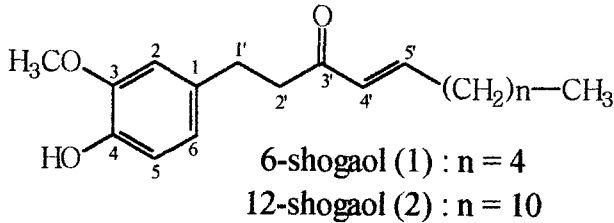


Fig. 1. Chemical structures of antioxidative compounds isolated from the root of *Zingiber officinale*.

산기(3069 cm⁻¹), allyl-ketone(1682 cm⁻¹) 및 benzene(1579 cm⁻¹)의 흡수 band가 관찰되었다. ¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N) spectrum에서는 δ7.14(1H, d, J=8.0 Hz), δ6.92 (1H, d, J=1.7 Hz), δ6.85(1H, dd, J=8.0, 1.7 Hz)의 3개의 proton signal의 chemical shift와 coupling constant 값으로부터 1,3,4-삼치환 benzene의 존재가 확인되었다. 또한 δ6.19와 δ6.87의 signal은 서로간의 vicinal coupling constant 값이 15.9 Hz로 나타나, *trans*-form의 이중결합이 존재함을 알 수 있었다. 3개의 allyl-methylene(δ2.99, 2.94, 2.05, all 2H), 1개의 methoxyl(δ3.34, 3H, s), 1개의 말단 methyl(δ0.81, 3H, t) 및 3개의 methylene [δ1.32(2H), δ1.27(4H)] signal이 관측되었다. 따라서 화합물 1은 벤젠고리에 산소와 같은 hetero 원소가 2치환 결합하고 있고, 1개의 이중결합을 가진 탄소사슬이 1치환 결합한 구조로 추정되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N) spectrum에서 2개의 4급탄소의 chemical shift(δ148.56, 146.45)와 1개의 methoxyl(δ55.88) signal로부터 벤젠환에 1개의 수산기와 methoxyl기가 각각 결합하고 있고, 다른 1개의 4급탄소의 chemical shift(δ132.88)로부터는 탄소가 결합하고 있다는 것을 추정할 수 있었다. 그리고 1개의 ketone(δ199.35), 5개의 olefine-methine(δ147.37, 130.84, 121.41, 116.47, 113.00), 6개의 methylene(δ42.24, 32.49, 31.49, 30.17, 27.97, 22.16) 및 1개의 methyl(δ14.05) signal이 더 관측되었다. 따라서 화합물 1의 benzene 고리에 결합하고 있는 탄소사슬은 1개의 ketone과 1개의 이중결합을 포함하여 모두 10개의 탄소로 이루어져 있는 것으로 판명되었다. 이 사실은 EI/MS spectrum에서 관측된 m/z 276(M⁺)의 molecular ion peak로부터도 확인할 수 있었다. 이 때 ketone의 위치는 H-1'과 H-2' signal(δ2.99, 2.94)이 서로간의 vicinal coupling(t, J=6.8 Hz)만을 하고 있는 점으로부터 3번으로 판명되었고, 이중결합의 위치는 H-4' signal(δ6.19)이 doublet(J=15.9 Hz)으로 H-5'와만 coupling하는 점으로부터 4번과 5번인 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 1의 구조를 6-shogaol로 결정하였다. 이전의 문헌⁹⁾에서는 6-shogaol에 대하여 ¹H-NMR data만이 보고되어 있으나, 본 실험에서는 HMQC를 측정하여 각각의 ¹³C-NMR signal을 정확하게 동정하였다.

화합물 2는 연한 노란색 oil상 물질로서, IR spectrum에서 수산기(3021 cm⁻¹), allyl-ketone(1688 cm⁻¹) 및 benzene(1592 cm⁻¹)의 흡수 peak가 관찰되었다. NMR data도 화합물 1과 매우 유사한 패턴을 보였으나, 다만 화합물 1에 비해 6개의 methylene이 더 관측되었다. EI/MS spectrum에서도 molecular ion peak가 m/z 360에서 관측되어 위의 사실을 확인할 수 있었다. Side chain에 있어서의 ketone, olefine, methylene 및 methyl기의 위치는 화합물 2의 H-1'(t, J=6.5 Hz), H-2'(t, J=6.5 Hz), H-4'(d, J=15.8 Hz), H-5'(dt, J=15.8, 6.5 Hz) 및 H-6'(dt, 6.5, 7.1 Hz)의 coupling pattern이 화합물 1과 유사하였으므로, Fig. 1과 같이 결정하였다. 이상의 결과로부터 화합물 2는 12-shogaol로 구조결정하였으며, ¹³C-NMR의 각 탄소 signal은 HMQC를 측정하고 화합물 1과 비교하여 동정하였다.

건강에서 분리한 항산화 활성 물질인 6-shogaol(1) 및 12-shogaol(2)을 현재 널리 사용되고 있는 천연 항산화제인 α-tocopherol과 합성항산화제인 BHT 및 BHA와 그 활성을 비교하였다. 각 물질의 EC₅₀값은 Table 3에 나타난 것 처럼, α-tocopherol이 28.6 μM, BHT가 62.7 μM, BHA가 47.8 μM인데 비해, 6-shogaol이 26.4 μM, 12-shogaol이 22.5 μM로, 다른 상용 항산화제보다 높은 활성을 나타내었다.

한편, 건강에는 shogaol과 유사한 구조를 갖는 20여종의 화합물들이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다. 기본적으로는 벤젠환에 치환되어 있는 사슬의 길이와 불포화도에 따라 구조가 달라지는데, 대부분 *para*위치에 hydroxyl기가, *meta*위치에 methoxyl기가 치환되어 있다. 이들 화합물들의 구조적 유사성으로부터 이번에 분리한 6-shogaol 및 12-shogaol 외에도 항산화 활성을 나타내는 다수의 화합물들이 더 있을 것으로 예측된다. 이번 실험은 활성이 가장 높은 분획만을 추적했는데, Table 2에서 보아 알 수 있듯이, ZOR-E-5,6,7 분획은 ZOR-E-4 분획과 거의 활성이 동등하다고 볼 수 있고, ZOR-E-4-2-3 분획도 ZOR-E-4-2-2 분획보다 약간만 낮은 활성을 나타내고 있기 때문에, 이들 분획에도 항산화물질이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 이들 분획의 TLC 결과에서도 UV 흡수특성 및 발색양상으로부터 shogaol과 유사한 구조를 갖는 화합물이 존재하는 것이 확인되었다. 다만 생각 중에 함유되어 있는 shogaol 유사화합물 중에서 gingerol로 명명되는 다수의 화합물들은 shogaol과는 달리 치환사슬에 불포화결합을 갖고 있지 않은데, 치환사슬 내의 이중결합의 존재 여부가 항산화활성에 영향을 미치는지에 대해서는 추후 계속하여 검토하고자 한다.

이상의 결과로부터 건강 중에는 상용 항산화제보다 DPPH radical 소거활성이 뛰어난 6-shogaol 및 12-shogaol을 비롯한 다수의 항산화활성물질이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 이들 화합물들에 대하여 다양한 항산화활성 검색방법을 적용하여 식품 보존제 또는 인체 생리기능 개선제로서의 이용 가능성을 검토할 필요가 있다. 특히 생강은 한국인의 식탁에 항상 오르게 되

는 항산화력이기 때문에 생강의 항산화활성 물질의 규명 및 그 활성기작의 규명은 한층 의미를 더 한다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Lettron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromenty, B., Delaforge, M., Larrey, D. and Pessayre, D. (1990) Mechanism for the protective effects of silymarin against carbontetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 2027-2034.
2. Masuda, T., Jitoe, A., Isobe, J., Nakatani, N. and Yonemori, S. (1993) Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*. *Phytochem.* **32**(6), 1557-1560.
3. Kim, D. H. (1994) In *Oxidative degradation of edible oil and fat*. 1st ed., Korea University Publishing Co., Seoul, Korea.
4. Larson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* **27**(4), 969-978.
5. Chang, S. S., Ostric-Matijasevic, B., Hsieholiver, A. I. and Hyung, C. L. (1977) Natural antioxidants from rosemary and sage. *J. Food Sci.* **42**, 1102-1110.
6. Praty, D. E. and Watts, B. W. (1964) The antioxidant activity of vegetable extracts, I. Flavone aglycones. *J. Food Sci.* **29**, 17-24.
7. Soka, T. (1985) In *Dictionary of Chinese Drugs*, 1st ed. Shanghai Science Technology (eds.), Shogakukan Press, Tokyo, Japan.
8. Bang, M.-H., Song, J.-C., Lee, S.-Y., Park, N.-K. and Baek, N.-I. (1999) Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 170-175.
9. Chen, C.-C., Rosen, R. T. and Ho, C.-T. (1986) Chromatographic analyses of isomeric shogaol compounds derived from isolated gingerol compounds of ginger. *J. Chromatogr.* **360**, 175-184.

Isolation of Natural Antioxidants from the Root of *Zingiber officinale* R.

Myun-Ho Bang, Jung-Choon Song¹, Sun-Lim Kim¹, Han-Sun Hur¹ and Nam-In Baek* (Department of Life Science & Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea; ¹Crop Environment Division, National Crop Experiment Station, Suwon 441-707, Korea)

Abstract: The root of *Zingiber officinale* R. was extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was fractionated with EtOAc, *n*-BuOH and water phases. The EtOAc fraction exhibited most potent antioxidant activity among them, and two active compounds were isolated by activity-guided separation using repetitive silica gel column chromatography. On the bases of spectral data and the chemical characteristics, the structure of the compounds were determined as 6-shogaol and 12-shogaol, respectively. The EC₅₀ values of them were evaluated as 26.4 μM and 22.5 μM, respectively, where these values were higher than the commercial antioxidants, such as, BHA, BHT and α-tocopherol.

Key words: antioxidant, DPPH radical scavenging activity, *Zingiber officinale*, shogaol

*Corresponding author