

양하의 근경에서 항균성 물질 분리 및 구조동정

장기창* · 김성철 · 송은영 · 김공호 · 권혁모 · 강상헌 · 박기훈¹ · 정용환

농촌진흥청 제주농업시험장, ¹경상대학교 환경생명식품공학부

(2003년 4월 4일 접수, 2003년 6월 5일 수리)

양하(*Zingiber mioga* Roscoe) 근경의 에탄올 추출물을 재료로 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 및 *B. cereus*에 대한 activity-guided fractionation을 실시하여 항균성 물질 세가지지를 얻었다. 항균력실험 결과, 화합물 I과 III은 세가지균주 모두에 활성이 있었고, 화합물 II에서는 *B. subtilis*과 *B. cereus*에서만 활성이 나타났다. 그 중에서 가장 활성이 강한 화합물 I을 Bioscreen C로 optical density(600 nm)를 측정하여 증식억제실험을 한 결과 10 ppm 처리시 *B. subtilis*과 *B. cereus*에서 72시간동안 강한 증식억제효과를 나타내었으며, *S. aureus*에서는 25 ppm 처리시 72시간동안 완전증식억제효과를 나타내었다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 및 IR 스펙트럼 등을 분석한 결과 화합물 I, II, III은 labdane-type diterpene인 (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial(C₂₀H₃₀O₃, MW = 318), galanolactone(C₂₀H₃₀O₃, MW = 318) 그리고 galanal A(C₂₀H₃₀O₃, MW = 318)로 각각 동정되었으며, 이들은 양하의 근경에서는 처음 분리된 것이다.

Key words: 양하, 항균성, labdane-type diterpene, (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial, galanolactone, galanal A

서 론

양하(*Zingiber mioga* Roscoe)는 생강과(Zingiberaceae)의 다년초본이며 높이 40~100 cm이고 지하경이 옆으로 뻗으며 인편엽이 있고 밑부분의 엽초가 서로 감싸면서 원줄기처럼 자란다. 잎은 피침형 또는 긴 타원형이고 길이 20~35 cm, 너비 3~6 cm로서 밑부분이 좁아져서 엽병처럼 된다. 우리나라에서는 제주도 및 남해안 일대에 자라며 관상식물로 심는 귀화식물이다. 어린 순이나 화서를 식용하며, 한방과 민간에서 근경을 진통(鎮痛), 거담(祛痰), 건위(健胃) 등에 약재로 쓰며 향료(香料)로도 쓰인다.^{1,2)}

본 실험은 양하 근경의 에탄올 추출물에 대해 activity-guided fractionation을 실시하여 항균유효성분으로 예상되는 3가지 화합물을 silica gel column chromatography 및 재결정 등을 이용하여 분리하였고, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 및 적외선 스펙트럼 등을 토대로 화학구조를 결정하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 양하(*Zingiber mioga* Roscoe)의 근경은 제주 애월읍 부근의 자생지에서 채취, 동정¹⁾하여 음건하였고, 음건된 식물체는 세절하여 분쇄한 후 실험재료로 사용하였다.

사용균주 및 재료. 실험에 사용한 균주는 gram 양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 13301, *Bacillus subtilis* ATCC

9372 그리고 *Bacillus cereus* ATCC 27348를 한국미생물 보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다. 균 생육배지로는 nutrient broth와 nutrient agar(Difco)를 사용하였고 항균활성 검색은 Bioscreen C(Labsystem, Helsinki, Finland)와 UV-Visible spectrophotometer(Varian, Cary 100, Australia)를 사용하였다.

유효성분의 분리. 양하 근경(500 g)을 75% 에탄올로 실온에서 2주 동안 2회 추출 후 여과(Whatman No. 2)한 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 농축하였다. 에탄올 추출물을 농축하여 물층만 남긴 후 분별깔때기를 이용하여 약 5배의 hexane을 가하여 hexan분획물을 얻고(2회 반복) 동일한 방법으로 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차로 가하여 각각의 순차 용매 분획물을 얻었다. 각 분획물을 rotary vacuum evaporator로 농축시킨 후 항균효과를 실험한 결과 에틸아세테이트층에서 활성이 나타나, 이 분획물(21 g)을 소량의 클로로포름에 용해시킨 후 silica gel(70~230 mesh ASTM)로 충전시킨 column(7×17 cm)에 loading하여 hexane/ethylacetate의 비율을 순차적으로 높이면서 column chromatography를 실시하여 얻어진 분획물들에 대한 항균실험을 수행하였다. 활성분획을 다시 hexane : acetone = 12 : 1을 용매로 한 2차 column chromatography(silica gel 70~230 mesh, column 2.5×20 cm)를 실시하여 활성 분획을 2 분획으로 분리하여 모았다. 첫 분획을 diethyl ether로 재결정하여 화합물 I(670 mg)을 얻었고, 두번째 분획을 다시 methylene chloride : diethyl ether = 50 : 1을 용매로 column chromatography(silica gel 70~230 mesh, column 2×20 cm)를 실시하여 두 분획으로 나누었으며, 각각을 diethyl ether로 재결정하여 화합물 II(216 mg)와 화합물 III(133 mg)을 얻었다.

사용기기. 용점 측정은 Tomas Hoover Capillary Apparatus (Electrothermal 9200, Electrothermal Engineering Co., UK)를 사용하여 측정하였으며 온도는 보정하지 않았다. Mass 스펙트

*연락처

Tel: 82-64-741-2576; Fax: 82-64-749-2066

E-mail: kcjang72@rda.go.kr

Table 1. Physico-chemical data of the compounds I, II and III isolated from the rhizome of *Zingiber mioga*

Compounds	Rf value ^a		Colorization ^b		Appearance	[α] _D ²⁰ (CHCl ₃)	M ⁺	mp (°C)	UV λ _{max} (EtOH)
	H:E=2:1	Mc:Et ₂ O	PMA	Anis					
I	0.53	0.56	Gray	Dark blue	Colorless needles	+28.1° (c 0.70)	318	89-91	240 nm
II	0.49	0.65	Gray	Dark blue	Colorless needles	+29.0° (c 0.50)	318	123-125	224 nm
III	0.30	0.23	Gray	Dark blue	Colorless needles	-45.0° (c 0.65)	318	168-170	230 nm

^a, H: n-hexane, E: ethyl acetate, Mc: CH₂Cl₂, Et₂O: diethyl ether ^b, PMA: 10% phosphomolybdic acid (in ethanol) spray, Anis: ethanol 93.0%, ρ-anisaldehyde 2.5%, acetic acid 1.0%, H₂SO₄ 3.5% spray.

럼은 JEOL JMS-700 spectrometer(Japan)를 이용하였으며, 적외선 스펙트럼은 Bruker IFS66 분광기(FT-IR)를 사용하여 얻었다. 핵자기 공명(¹H, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC) 스펙트럼은 Bruker-AW500(500 MHz, Germany)분광기를 이용하여 측정하였다. 화학적 이동값(chemical shift)은 tetramethylsilane(TMS)을 기준물질로하여 ppm으로 나타내었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 나타난 단일선, 이중선, 삼중선, 다중선을 각각 s, d, t, m으로 표시하였다.

항균력 검정. 시료의 항균력 검사는 한천배지확산법(disk-agar plate diffusion method)^{3,4)}으로 clear zone의 직경을 측정하는 것과 Bioscreen C로 optical density(O. D.)를 측정하여 증식억제효과를 검정하였다. 한천배지확산법은 시료용액을 농도별로 0.45 μm membrane filter(Milipore, USA)로 여과하여 제공하고 멸균된 filter paper disk(Toyo, 8 μm, Japan)에 20 μl 씩을 흡수시킨 후, 용매를 완전히 휘산시키고 시험용 평판배지 위에 놓아 밀착시키고 4°C 냉장고에서 1시간 방치한 후, 32°C incubator에서 12~24시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다. Bioscreen C를 이용한 증식억제효과검정은 각 균을 배양한 사면배지에서 1백금을 취해 10 ml 액체배지에 접종하여 32°C incubator에서 24시간 배양시킨 후 이 배양액 0.1 ml를 다시 10 ml 액체배지에 접종하여 32°C incubator에서 24시간 배양하여 균체 배양액을 만들었다. 분리한 화합물 중 가장 활성이 강한 화합물 I을 50, 25, 10 ppm이 되게 에탄올로 희석한 후 0.45 μm membrane filter로 제공하고 액체배지 9.8 ml에 각 농도별로 0.1 ml씩 첨가하였다. 이 각각의 배지에 균체 배양액 0.1 ml를 접종한 후 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 600 nm에서 Bioscreen C를 이용하여 600 nm에서 O. D.를 측정하여 증식억제효과를 검정하였다. 이때 시료를 녹이는데 사용한 에탄올량 만큼 대조구에 첨가하여 에탄올 자체의 항균력이 감소 되도록 하였다.

결과 및 고찰

항균물질의 분리 및 항균활성. 양하 근경의 75% 에탄올 추출물 중 에틸아세테이트층에 존재하고 있는 항균성 물질을 분리하기 위해 silica gel column chromatography를 반복적으로 실시하고, diethyl ether로 재결정을 하여 화합물 I, II, III을 각각 얻었다. 화합물 I, II 그리고 III에 대한 물리·화학적 특성은 Table 1과 같다. 세 화합물 모두 무색의 침상결정이며, phosphomolybdic acid 및 anisaldehyde에 양성반응을 보였고 세 화합물 모두 분자량이 318로 동일했다.

Table 2. Antibacterial activities of the compounds isolated from the rhizome of *Zingiber mioga* Roscoe

Compounds (μg/disc)	Diameter of inhibitory zone (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
I	100	17	16	14
	50	15	14	12
	25	13	12	10
	12.5	12	10	9
	6.25	10	-a	-
II	100	12	12	-
	50	11.5	11	-
	25	10	10	-
	12.5	9	9	-
	6.25	-	-	-
III	100	14	13	13
	50	12	11	11
	25	11	10	10
	12.5	10	9	9
	6.25	-	-	-

^a; diameter of clear zone <8.5 mm

분리된 세 화합물에 대한 한천배지확산법(disk-agar plate diffusion method) 항균활성실험결과(Table 2) 화합물 I은 *B. subtilis*에서 실험 최소농도인 6.25 μg/disc에서도 활성이 나타났으며, *B. cereus*와 *S. aureus*에서는 12.5 μg/disc 이상에서 모두 활성이 나타났다. 화합물 II는 *B. subtilis*와 *B. cereus*에서 12.5 μg/disc 이상에서 모두 활성이 나타났지만 *S. aureus*에서는 활성이 나타나지 않았다. 화합물 III은 12.5 μg/disc 이상의 농도에서 세가지 세균 모두에 활성이 나타났다. 농도별로 clear zone을 비교해 볼 때 세 화합물 중에서 화합물 I이 가장 강한 활성을 보임을 알 수 있었다. 이와 같이 가장 활성이 강한 화합물 I을 Bioscreen C로 O. D.를 측정하여 증식억제효과를 실험한 결과(Fig. 1) *B. subtilis*와 *B. cereus*에서는 실험 최소농도인 10 ppm 처리시에도 60시간까지 완전 증식억제효과를 보였지만 60시간 이후에는 10 ppm과 25 ppm에서 약간의 혼탁도 증가를 보였다. 그러나 50 ppm 처리시에는 72시간까지 완전 증식억제효과를 나타내었다. *S. aureus*에서는 25 ppm 이상의 농도에서 72시간까지 완전히 증식이 억제되는 것을 보였지만 10 ppm 처리에서는 48시간 이후에 혼탁도 증가가 나타났다.

유효성분의 구조분석. 화합물 I, II, III의 구조는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 스펙트럼 및 DEPT90, 135를 이용하여 분석하였으며, ¹H-NMR 및 ¹³C-

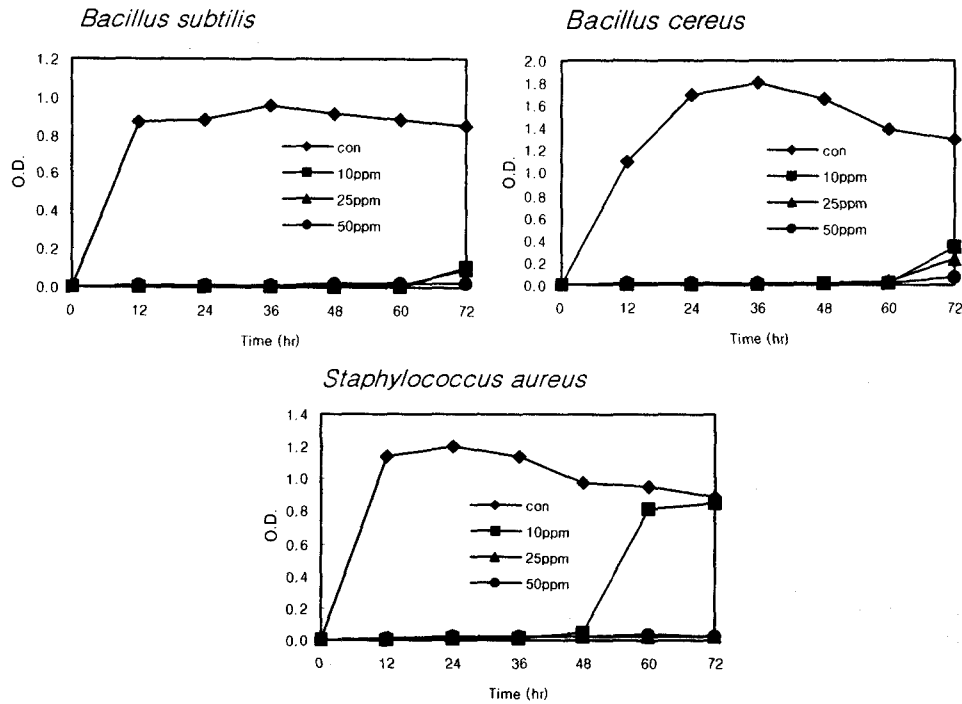


Fig. 1. Growth inhibition by compound I isolated from the rhizome of *Zingiber mioga* Roscoe on several food-borne microorganisms for 72 hrs at 32°C.

Table 3. ¹H-NMR spectral data of compounds I, II and III (in CDCl₃, 500 MHz, chemical shifts in ppm)

H	I	II	III
1	1.38(m) 1.94(m)	0.98(dt, $J=3.6, 12.8$ Hz) 1.64(m)	1.40(m) 1.77(m)
2	1.44(m) 1.60(m)	1.46(m) 1.60(m)	0.90(m, 2H)
3	1.19(dt, $J=4.0, 13.5$ Hz) 1.46(m)	1.19(dt, $J=4.0, 13.4$ Hz) 1.43(m)	1.16(dt, $J=4.1, 13.4$ Hz) 1.48(m)
5	1.71(m)	1.60(m)	1.45(m)
6	1.63(m) 1.71(m)	1.59(m) 1.70(m)	1.42(m) 1.57(m)
7	0.98(dt, $J=3.5, 13.0$ Hz) 1.71(m)	1.36(ddd, $J=2.5, 3.9, 13.9$ Hz) 1.92(m)	1.77(m) 2.27(m)
9	1.04(dd, $J=2.5, 12.0$ Hz)	1.03(dd, $J=2.8, 12.2$ Hz)	1.61(d, $J=10.4$ Hz)
11	1.91(m) 2.20(dd, $J=5.5, 18.0$ Hz)	1.76(m) 2.10(m)	2.49(dd, $J=8.3, 18.5$ Hz) 2.79(m)
12	6.67(t, $J=6.5$ Hz)	6.64(m)	6.88(dd, $J=1.6, 8.2$ Hz)
14	3.35(d, $J=17.0$ Hz) 3.44(d, $J=17.0$ Hz)	2.83(m, 2H)	2.65(m, 2H)
15	9.64(s)	4.38(m, 2H)	4.06(dd, $J=2.0, 9.3$ Hz)
16	9.41(s)	-	9.37(s)
17	2.30(d, $J=3.5$ Hz) 2.43(d, $J=3.5$ Hz)	2.30(d, $J=3.9$ Hz) 2.44(d, $J=3.9$ Hz)	10.10(s)
18(CH ₃)	0.92(s)	0.92(s)	0.80(s)
19(CH ₃)	0.88(s)	0.88(s)	0.77(s)
20(CH ₃)	0.94(s)	0.93(s)	0.88(s)

NMR data를 Table 3과 Table 4에 각각 나타내었다. 화합물 I의 ¹H-NMR spectrum에서 δ 0.92, 0.88 그리고 0.94에서 각각 18번, 19번 그리고 20번의 singlet인 methyl proton이 관측되었으며, ¹³C-NMR spectrum에서 모두 20개의 carbon signal이 관

측되었다. DEPT90, 135를 이용하여 1차 carbon이 3개, 2차 carbon이 8개, 3차 carbon이 5개 그리고 4차 carbon이 4개가 존재함을 알 수 있었고, HMQC에서 C-15(δ 196.8)와 H-15(s. δ 9.64)이 그리고 C-16(δ 193.1)와 H-16(s. δ 9.41)이 각각 상관관

Table 4. ¹³C-NMR spectral data of compounds **I**, **II** and **III** (in CDCl₃, 125 MHz, chemical shifts in ppm)

C-Atom	I	II	III
1	35.8	39.8	39.0
2	18.5	19.1	18.8
3	41.9	42.4	42.1
4	33.4	34.0	33.6
5	52.7	52.8	54.0
6	20.0	20.5	19.0
7	39.4	36.2	28.8
8	57.5	58.0	55.9
9	55.0	55.4	56.1
10	39.8	40.1	38.9
11	22.3	23.3	24.0
12	160.2	143.3	156.6
13	135.2	125.3	142.7
14	39.4	25.9	28.1
15	196.8	65.8	71.7
16	193.1	171.7	193.8
17	48.8	49.5	206.9
18	33.5	34.0	33.8
19	21.7	22.2	21.6
20	14.7	15.1	17.0

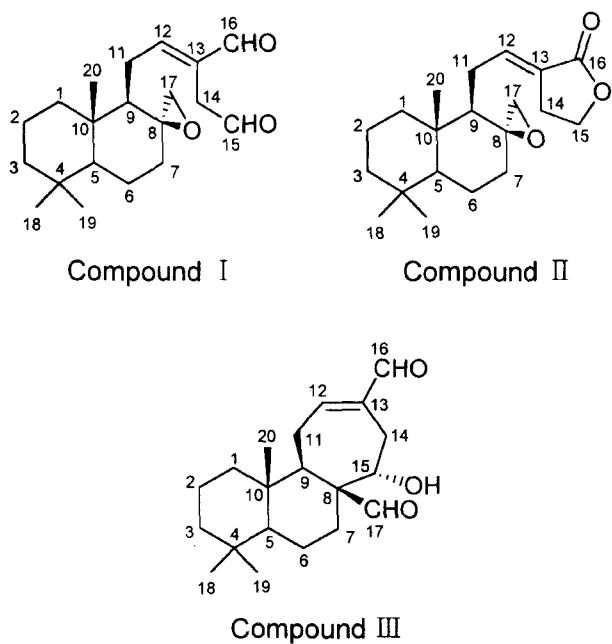


Fig. 2. Chemical structures of the three isolated compounds.

계를 보이므로 두개의 aldehyde group이 존재함을 알 수 있었다. ¹H-¹H COSY에서 proton간의 상관관계를 그리고 HMBC에서 long range coupling을 결정하였다. 화합물 **II**는 화합물 **I**과 비교해 특징적으로 두개의 aldehyde group이 없어졌으며, ¹³C-NMR spectrum에서 δ171.7의 4차 carbonyl group과 ¹H-NMR spectrum에서 2H분의 δ4.38의 proton peak에 의해 lactone group이 있음을 알 수 있었다. 화합물 **III**은 특징적으로 화합물 **I**의 ¹H-NMR spectrum에서 2개의 doublet δ2.30(J = 3.5

Hz), δ2.43(J = 3.5 Hz)이 나오지 않는 것으로 보아 epoxy group이 없어졌음을 알 수 있었다.

화합물 **I**의 적외선 스펙트럼에서 1736 cm⁻¹과 1684 cm⁻¹에서 두개의 carbonyl group 흡수띠와 1630 cm⁻¹에서 C=C의 흡수띠가 관찰되었으며, 화합물 **II**에서는 1758 cm⁻¹에서 lactone carbonyl group 흡수띠와 1676 cm⁻¹에서 C=C의 흡수띠가 관찰되었다. 그리고 화합물 **III**은 3491 cm⁻¹에서 O-H 흡수띠와 1712 cm⁻¹과 1676 cm⁻¹에서 두개의 carbonyl group 흡수띠와 1639 cm⁻¹에서 C=C의 흡수띠가 관찰되었다. 이상의 분광학적 자료와 문헌조사결과^{5,6)}를 비교할 때 화합물 **I**, **II**, **III**은 각각 (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial, galanolactone 그리고 galanal A임이 확인되었다(Fig. 2).

Itokawa 등⁵⁾이 *Alponia galanga*의 종자에서 이들 세 화합물을 분리 보고한 바 있으나, 양하의 경우에는 Ozawa 등⁶⁾이 화석에서 (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial와 galanal A를 분리 보고된 바 있으나, galanolactone의 분리에 대해서는 보고된 바가 없으며, 이들 화합물에 대한 항균활성에 대해서도 보고된 바가 없었다. 그리고 세 화합물 모두 양하의 근경에서는 처음으로 분리되었으며, (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial은 항곰팡이활성과 콜레스테롤 생합성 억제효과가 있다고 알려져 있다.^{7,8)}

참고문헌

- Kim, T. S. (1998) In *Natural Plant of Korea*, Publication Department of Seoul National University, Seoul, p. 223.
- Hiromo, I., Mori, H., Kato, K., Hosaka, S. and Aiso, S. (1982) Carcinogenicity examination of inflorescence of *Zingiber mioga* Roscoe. *Cancer Letters* **15**, 203-208.
- Piddok, L. J. V. (1990) Techniques used for the determination of antibacterial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 307-318.
- Jang, D. S., Park, K. H., Lee, J. R., Ha, T. J., Park, Y. B., Nam, S. H. and Yang, M. S. (1999) Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyreta*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 176-179.
- Morita, H. and Itokawa, H. (1988) Cytotoxic and antifungal diterpenes from the seeds of *Alpinia galanga*. *Planta Med.* **54**, 117-120.
- Abe, M., Ozawa, Y., Uda, Y., Yamada, Y., Morimitsu, Y., Nakamura, N. and Osawa, T. (2002) Labdane-type diterpene dialdehyde, pungent principle of myoga, *Zingiber mioga* Roscoe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2698-2700.
- Tanabe, M., Chen, Y. D., Saito, K. and Kano, Y. (1993) Cholesterol biosynthesis inhibitory component from *Zingiber officinale* Roscoe. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 710-713.
- Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T. (1994) Chemistry of ginger components and inhibition factors of the arachidonic acid cascade. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention* vol. II, Ho, C. T., Osawa, T., Huang, M. T. and Rosen, R. T. (eds.), American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 244-250.

Isolation and Structure Identification of Antibacterial Substances from the Rhizome of *Zingiber mioga* Roscoe

Ki-Chang Jang*, Seong-Cheol Kim, Eun-Young Song, Kong-Ho Kim, Hyeog-Mo Kwon, Sang-Heon Kang, Ki-Hun Park¹ and Yong-Hwan Jung (*National Jeju Agricultural Experiment Station, R.D.A., Jeju 690-150, Korea; ¹Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*)

Abstract: In order to isolate antibacterial substances from the rhizome of *Zingiber mioga* Roscoe, the ethanol extracts was fractionated according to the activity against *Bacillus subtilis*, *B. cereus* and *Staphylococcus aureus*. Three antibacterial substances were isolated and purified by column chromatography and recrystallization. Compounds I and III showed activity against all the tested bacterias and compound II exhibited the activity against *B. subtilis* and *B. cereus* except *S. aureus*. Compound I was examined antimicrobial activity against *B. subtilis*, *B. cereus* and *S. aureus* by optical density using Bioscreen C. Compound I showed strong growth inhibition at 10 ppm on *B. subtilis* and *B. cereus* for 72 hrs, and at 25 ppm on *S. aureus*. On the basis of spectrometric studies including ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, 1H-1H COSY, HMQC, HMBC and IR, compounds I, II and III were identified as (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial (C₂₀H₃₀O₃, MW=318), galanolactone (C₂₀H₃₀O₃, MW=318) and galanal A (C₂₀H₃₀O₃, MW=318), respectively. These results are the first reports on the isolation of (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial, galanolactone and galanal A from the rhizome of *Zingiber mioga*.

Key words: *Zingiber mioga* Roscoe, antibacterial activity, labdane-type diterpene, (E)-8β(17)-epoxylabd-12-ene-15,16-dial, galanolactone, galanal A.

*Corresponding author