

생강으로부터 6-Gingerol의 분리 및 항산화 활성

¹이 봉 수 · ¹고 명 석 · ²김 현 종 · ^{2,3}곽 인 섭 · ^{3,4}김 동 호 · † ^{2,3,5}정 봉 우
¹무주군약초조합 부설연구소, ²전북대학교 공업기술연구센터, ³전북대학교 생물공정공학과,
⁴(주)에프엔바이오, ⁵전북대학교 환경·화학공학부
(접수 : 2006. 11. 1., 게재승인 : 2006. 12. 20.)

Separation of 6-Gingerol from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and Antioxidative Activity

Bong Soo Lee¹, Meyong Seok Ko¹, Hyun Jong Kim², In Seob Kwak^{2,3}, Dong Ho Kim^{3,4}, and Bong Woo Chung^{2,3,5†}
¹MJ Health Foods Association, 452-32 Jang-dong, Jeonju, Korea
²Research Center of Industrial Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
³Department of Bioprocess Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
⁴FNbio Co. Ltd., 906-3 Hwajung-dong, Gyeonggi, Korea
⁵Division of Environmental and Chemical Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Received : 2006. 11. 1., Accepted : 2006. 12. 20.)

Ginger (*Zingiber officinale*) is widely used as a dietary condiment throughout the world. Its major constituent, 6-gingerol, exhibits diverse pharmacological activities including anti-oxidant and anti-tumor. Ginger were extracted by 0% to 95% ethanol. Maximum yield of 6-gingerol was obtained with 80% ethanol as extracting solvent at 30°C. We obtained increased yield (7%) of extraction by pretreatment with ultrasonication. Gingerols in the crude ginger extract was isolated by Sepacore preparative liquid chromatography on silica gel. We got the 6-gingerol which weight is 0.53 mg/mL, from fraction F9. Antioxidant effect of 6-gingerol were detected by DPPH method. Its radical scavenging activity was 95-99% which compared with ascorbic acid.

Key Words : Ginger, 6-gingerol, extraction with ultrasonication, antioxidative activity

서 론

생강 (生薑, *Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과 (Zingiberaceae)에 속하는 아열대, 또는 열대 원산의 다년생 초본 식물의 하나로서, 그의 근경을 칭하기도 한다(1, 2). 근경은 특유의 맛과 향기를 지니고 있어 기원전 3세기경부터 세계적으로 널리 애용되고 있는 기호성이 좋은 향신료의 하나로 생생강, 건생강, absolute, oleoresin, essential oil 등의 형태로 유통되고 있고, 식용, 약용, 또는 화장품용으로 다양하게 이용되고 있다(3). 또한, 최근 한방병원 등에서 생강의 essential oil을 이용한 향기 요법으로 감기, 두통, 설사, 요통, 관절염 및 정신적 피로에 대한 치료제로서 사용하고 있는

것으로 보고된 바 있다(4). 생강의 80-90%는 수분이며, 전체 고형분의 40-60%를 전분이 차지하고 있다(5, 6). 생강의 주요성분으로는 hydrocarbon류, ketone류, alcohol류 등의 증류성분과 zingiberene, γ -cadinene 등의 향기성분, 그리고 zingiberol, zingiberene 등의 정유성분이 확인되어져 있다. 특히, 정유성분 중 생강의 매운맛을 내게 하는 주 성분인 6-gingerol은 항산화, 항염증의 특성을 가지고 있어 많은 연구가 진행되고 있다(7-12).

6-Gingerol (1-4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl-5-hydroxy-3-decanone)은 생강에 0.1-0.3% 함유되어 있으며, 분자량이 294인 항산화물질이다. 염화철-아스코베이트 (FeCl₃-ascorbate) 시스템에 의한 인지질의 산화를 막는 항산화물질로 알려져 있고, 특히, superoxide 음이온 같은 활성산소종 (reactive oxygen species)의 발생에 영향을 미치는 물질인 잔틴 산화효소 (xanthine oxidase)의 저해효과도 가지고 있는 것으로 보고되어져 있다(13, 14).

천연물로부터 alkaloids, flavonoids, polysaccharides, proteins, 그리고 essential oils과 같은 다양한 phytochemicals를 추출하

† Corresponding Author : Division of Environmental and Chemical Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Tel : +82-63-270-2309, Fax : +82-63-270-2306
E-mail : bwchung@chonbuk.ac.kr

는데 있어서 초음파 추출법의 응용에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히, 식물의 경우 적절한 세기의 초음파는 식물 세포벽을 파괴하여 생리활성물질의 용출을 증진시켜 주며, 식물 세포내로 용출용매의 물질 전달 효율을 향상시켜 준다. 또한, 초음파는 용매 내에서 음압을 가져오며, 음압이 클수록 추출 수율이 향상된다고 알려져 있다(15-20).

따라서, 본 연구에서는 생강으로부터 6-gingerol의 추출 수율을 향상시키기 위해 초음파 추출법을 이용하였으며, 추출 주용매로 음압형성이 강하고, 식품에 사용할 수 있는 에탄올을 사용하였다. 추출물의 분리 효율을 높이기 위해 분취용 액체크로마토그래피를 이용하였으며, 정량분석을 위해 고성능 액체크로마토그래피를 사용하였다.

재료 및 방법

실험재료

생강 (*Zingiber officinale* Roscoe)은 전북 완주 봉동 지역의 산물로 완주봉상생강조합으로부터 제공받아 사용하였다. 증류수로 잘 씻어 흙이나 먼지 등의 이물질을 깨끗이 제거한 후, 껍질을 벗겨 1 mm 정도의 크기로 세절하였다. 세절된 생강은 3-4일 동안 40°C의 열풍건조를 통해 건조한 후, 100 메쉬 (149 μ m)로 분쇄한 뒤 냉암소에 저장하여 사용하였다. 추출 및 분석에 사용된 시약은 모두 특급 시약을 사용하였으며, 표준물질인 6-gingerol은 Wako사 (20 mg, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)로부터 구입하여 사용하였다.

초음파 추출장치 및 추출방법

생강으로부터 6-gingerol의 추출을 향상시키기 위해 초음파 추출을 수행하였다. 초음파 추출기는 독일 HIELSCHER사의 제품으로 모델명은 U200S이다. 이 추출기는 24 kHz의 주파수로 고정되어 있으며, 20~200 W의 범위로 그 세기를 조절할 수 있다. 초음파 추출기의 전극은 생강시료 혼합물에 충분히 잠길 수 있도록 설치하였으며, 온도가 일정하게 유지될 수 있도록 항온조와 교반이 적절히 이루어질 수 있도록 교반장치를 결합하였다. 생강시료 중량비로 10배 (w/v) 용량의 에탄올 용액 (0-95 v/v%)을 혼합하여 초음파 추출 장치의 용기에 넣고 추출하였다. 초음파 추출 조건은 초음파 세기와 시간을 달리하면서 수행하였다. 또한, 추출 온도는 최적 용매조건을 바탕으로 30-60°C에서 추출, 비교하였다.

HPLC를 이용한 추출물의 6-gingerol 분석

생강 추출물의 6-gingerol을 분석하기 위해 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, 2695 series, Waters, USA)를 이용하였다. 컬럼으로 역상컬럼인 Waters XTerra (RP18, 5 μ m, 15×0.46 cm, Ireland), 검출기로 PDA-검출기 (282 nm)를 사용하였다. 이동상의 조건은 메탄올 70%와 물 30%를 조성 변화없이 등용매 (isocratic)로 전개하였으며, 흐름속도는 1.0 ml/min였다. 압력은 1,760 psi

에서 \pm 100 psi로 일정하게 유지시켰다. 컬럼 히터의 온도는 30°C로 일정하게 하였으며, 시료는 10 μ l를 주입하여 30분간 전개시켰다. 시료는 추출물 5 ml씩 취하여 100 ml 등근 플라스크에 넣고 감압증류장치 (vacuum evaporator)를 사용하여 용매를 완전히 제거한 후, HPLC급 100% 메탄올을 10 ml 첨가하여 재용해시켰다. 용해시킨 추출물을 시린지 필터 (Syringe filter, Minisart RC15, 0.20 μ m, Sartorius, Germany)를 사용하여 여과한 후 주입하였다. 6-gingerol의 표준시료는 총 20 mg을 HPLC급 100% 메탄올에 녹인 후, 30, 50, 60, 100 ppm로 제조하여 전개시켰다. 결과 피크의 적분값을 토대로 검량곡선 (calibration curve)을 그려 정량분석에 사용하였다.

분취용 액체크로마토그래피를 이용한 6-gingerol의 분리

생강 추출물로부터 6-gingerol을 분리하기 위해 분취용 액체크로마토그래피 (Preparative Liquid Chromatography, Sepacore C-660, BÜCHI, Switzerland)를 이용하였다. 내경 40 mm, 길이 300 mm의 컬럼을 사용하였으며, 검출기로 UV-검출기 (282 nm)를 사용하였다. 충전물은 실리카겔 (Si 60, Merck)로 뷰키사의 전용 충전기 (BÜCHI cartridge C-670, Switzerland)를 사용하여 충전하였다. 시료의 흐름속도는 2.0 mL/min이었으며, 주입량은 20 ml이었다. 이동상은 헥산 30%와 에틸아세테이트 70%의 조건으로 수행하였다. 문턱값 (threshold)은 4%로 하여 검출기의 신호가 4%를 넘어갈 때 분취가 시작되도록 하였다. 최종 시료는 F1-F10까지 10단계로 분취하였다.

Table 1. Experimental design for test of antioxidative activity

Experiment number	Amount of methanol	Sample	DPPH
0	800 μ l methanol	.	DPPH 200 μ l
1	700 μ l methanol	F1 100 μ l	DPPH 200 μ l
2	700 μ l methanol	F2 100 μ l	DPPH 200 μ l
3	700 μ l methanol	F3 100 μ l	DPPH 200 μ l
4	700 μ l methanol	F4 100 μ l	DPPH 200 μ l
5	700 μ l methanol	F5 100 μ l	DPPH 200 μ l
6	700 μ l methanol	F6 100 μ l	DPPH 200 μ l
7	700 μ l methanol	F7 100 μ l	DPPH 200 μ l
8	700 μ l methanol	F8 100 μ l	DPPH 200 μ l
9	700 μ l methanol	F9 100 μ l	DPPH 200 μ l
10	700 μ l methanol	F10 100 μ l	DPPH 200 μ l
11	700 μ l methanol	ascorbic acid 2.3 mM 100 μ l	DPPH 200 μ l

6-Gingerol의 항산화 활성

분취된 시료의 항산화 활성을 비교하기 위해 라디칼소거 활성 (radical scavenging activity)법을 이용하였다. 시약인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 1898-66-4, Sigma-Aldrich, Inc., USA) 59.145 mg을 99.99% 메탄올 1,000 ml에 녹여 150 μ M DPPH 용액을 제조하였다. DPPH 200 μ l와 시료 100 μ l, 그리고 메탄올 800 μ l를 Eppendorf tube에 넣고 30°C에서 30분간 반응시킨 후, 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하였다. 상등액을 분광광도계 (spectrophotometer, mini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용해 517 nm에서 흡광도로 측정하였다. 항산화

활성을 비교하기 위해 2.3 mM 아스코르빈산 (ascorbic acid, 50-81-7, Sigma-Aldrich, Inc., USA)을 제조하여 사용하였다. 항산화 활성에 대한 실험적인 설계는 Table 1과 같다.

결과 및 고찰

정량분석을 위한 6-gingerol의 검량선 도출

Wako 사로부터 구입한 순도 98%의 6-gingerol의 표준시료를 HPLC급의 메탄올에 용해하였다. 자동주입기 (autosampler)를 이용하여 용해한 표준시료를 10 μ l 주입 (injection)하고 메탄올과 물을 70 대 30으로 섞은 이동상을 분당 1 ml씩 흘려주면서 30분간 전개하였다. PDA detector로 스캔한 결과 210 nm와 282 nm에서 최고점을 보였다. 이 중에 생강추출물을 찍었을 때 다른 성분과의 겹침이 작은 282 nm에서 측정하였다. 그 결과 3.28분에서 0.48 Au의 피크 (peak)를 보였다. 6-gingerol의 정량 분석은 282 nm에서 3.28분의 머무름값 (retention time)을 바탕으로 측정하였다. 정량분석을 위해 6-gingerol의 검량선을 도출하였다. 6-gingerol 표준물질은 메탄올에 희석하여 30, 50, 60, 100 ppm으로 만들었다. 이 시료들을 각각 HPLC로 찍었을 때 피크의 면적이 정확히 비례한다면 그 직선을 이용하여 같은 머무름값을 가진 피크의 면적으로 양을 추정할 수 있다. 희석하여 특정 농도로 만든 각각의 샘플을 HPLC를 이용하여 30분간 전개한 후 282 nm에서 피크를 얻었다. 시료의 양에 따라 피크의 면적이 커지기 때문에 각 피크의 면적을 적분하여 검량에 사용하였다 ($R^2 = 0.994$). 검량식을 바탕으로 282 nm에서 시료를 분석했을 때 머무름값이 3.28분을 나타내는 피크의 적분값으로 시료 중 6-gingerol의 양을 계산할 수 있었다.

추출조건에 따른 6-gingerol의 정량분석

생강을 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올로 추출하여 여과 등의 전처리한 시료를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 3.28분의 피크를 적분한 값을 검량식에 대입하여 샘플에 존재하는 6-gingerol의 양을 알 수 있었다. 위의 환산값을 생강 1 g 당 추출된 6-gingerol의 질량 (mg)으로 변환하였으며, 그 결과 Fig. 1과 같이 80%의 에탄올로 추출한 시료가 생강 1 g당 5.711 mg의 6-gingerol을 추출하여 가장 많은 양을 추출한 것을 알 수 있었다. 100% 물을 사용할 경우에는 1.11 mg/g으로 다른 용매들과 비교하였을 때 추출량이 가장 낮았다.

추출온도에 따른 6-gingerol의 추출량 측정을 위해 30, 45, 60°C에서 추출을 실시하였다. 전체적으로 온도가 증가함에 따라 추출량이 약간씩 떨어지는 양상을 보여, 본 실험에서는 추출온도를 30°C로 하여 실험을 수행하였다.

초음파 추출은 위에서 실험한 결과를 바탕으로 30°C에서 80% 에탄올을 사용하여 실시하였다. 가용성 고형성분과 UV 흡광도의 비례식은 $y = 2.4566x - 0.2182$ 로 나타낼 수 있었으며, 결정계수 R^2 값은 0.999, P값은 0.0001 이하였다. 따라서 이 관계식이 가용성 고형성분과 UV 흡광도의 관계를 잘 설

명해주고 있으므로, 이 관계식을 사용하여 초음파 추출시 가용성 고형성분의 양을 검량하였다. 먼저 초음파 출력에 따른 추출최적조건을 탐색한 결과 80 W에서 가용성 고형성분의 양이 0.20 mg/ml로 가장 많은 양이 추출되었다. 이 출력조건을 바탕으로 추출 시간에 따라 가용성고형성분을 측정된 결과 30분에 이르러 최고치에 수렴하였다.

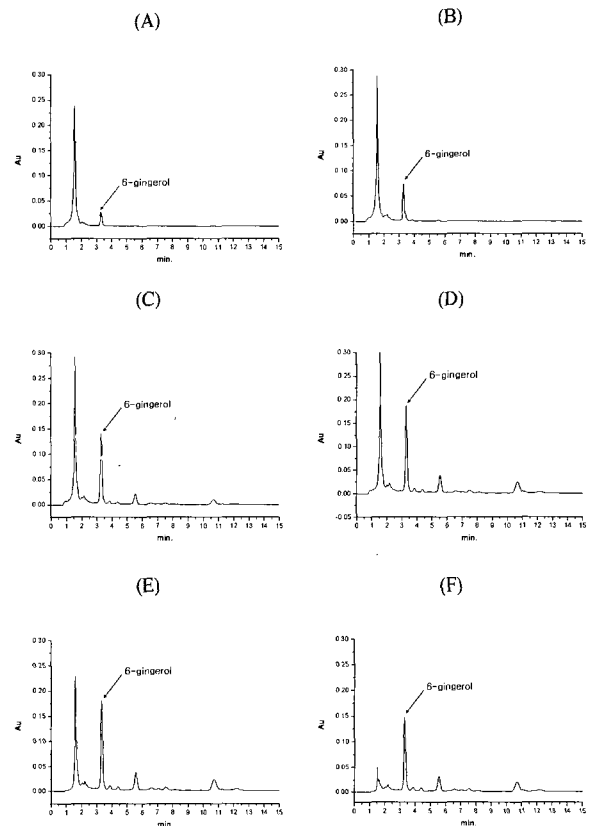


Figure 1. Chromatograms of samples which are extracted by ethanol (0-95%); water extract (A), 20% ethanol extract (B), 40% ethanol extract (C), 60% ethanol extract (D), 80% ethanol extract (E), 95% ethanol extract (F).

초음파 추출과 80% 에탄올만을 이용한 추출에서 6-gingerol 추출량을 비교하였다. 초음파 추출은 80 W의 출력조건으로 30분간 실시하였으며 그 결과를 80% 에탄올을 이용한 추출과 비교하였다. 초음파 추출물의 HPLC 분석 결과 초음파 추출에서 얻어낸 6-gingerol이 생강 1 g당 6.1 mg으로 80% 에탄올만을 이용한 추출보다 7% 정도 높게 나왔다.

김 등(21)의 실험에 의하면 생강을 말린 건강 (乾薑) 중의 6-gingerol 함량분석결과 0.335-0.382%의 6-gingerol을 얻었다고 보고하였으며, 이를 생강 1 g당 6-gingerol의 함량으로 환산하면 3.35 mg에서 3.82 mg이다. 따라서 본 실험의 80%에탄올 초음파 추출이 높은 양의 6-gingerol을 추출하였음을 알 수 있었다.

6-Gingerol의 분취 및 확인

TLC 결과를 바탕으로 분취용 크로마토그래피 (preparative

liquid chromatography)로 분리하기 위한 조건에 적용하였다. 추출물을 농축하여 용매를 제거한 후 노르말 헥산 30%, 에틸아세테이트 70% 용액에 다시 녹였다. 이 때 용매 20 ml 당 샘플의 양이 120 mg이 되도록 녹였다. 주입하는 샘플량이 너무 많으면 분리가 제대로 이루어지지 않고, 너무 적게 넣으면 검출이 안 되기 때문에 이 또한 반복실험을 통해 정하였다. 이동상에 녹인 샘플은 유리관에 실리카겔로 채운 컬럼을 1차 통과시켜서, 샘플에서 실리카에 강하게 흡착하는 물질을 제거하였다. 여기서 받은 샘플을 다시 0.45 μm 시린지 필터 (syringe filter)를 사용하여 여과하였다. 분취 크로마토그래피는 샘플주입 한 시간 전에 미리 용매를 흘려서 흐름이 정상상태를 이루도록 하였다. 흐름 속도는 20 ml/min으로 하였고, 샘플주입량은 20 ml을 주입하였다. 피크가 나오기 시작하면서부터 20 ml씩 분취하여 F1부터 F10까지 번호를 부여하였다(Fig. 2). 분취된 각 번호별로 HPLC를 사용하여 6-gingerol의 정량분석을 실시하였다. F9가 가장 많은 양의 6-gingerol이 검량되었다(Table 2). 또한 F9분획에서 6-gingerol이 비교적 순수하게 분리되었다(Fig. 3). 이 때의 6-gingerol 함량은 ml 당 0.53 mg이었다.

Table 2. Contents of 6-gingerol in each fractions

Sample	Content of 6-gingerol (mg/ml)
F1	N.D
F2	N.D
F3	N.D
F4	N.D
F5	0.003799
F6	0.005497
F7	0.016077
F8	0.201884
F9	0.528873
F10	0.201415

*N.D : not detected

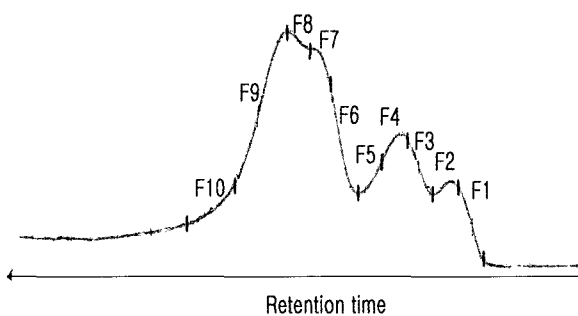


Figure 2. Chromatogram of preparative liquid chromatography and point of preparation (F1-F10).

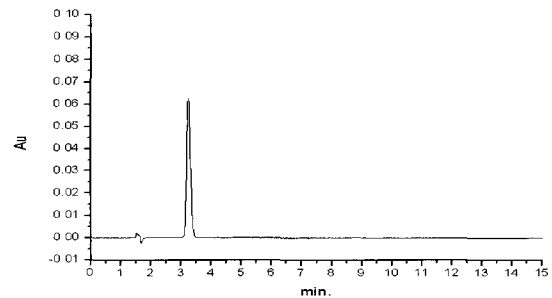
분획별 항산화 활성

F1에서 F10까지 얻은 시료를 DPPH를 이용해서 항산화 활성을 측정하였다. UV-스펙트럼미터를 이용하여 흡광도를 측정하고, 아스코르브산 (ascorbic acid)와 비교하였다. 아무것도 넣지 않고 메탄올만 넣은 DPPH는 0.276의 흡광도를 보였으며, 항산화능력이 뛰어난 것으로 알려진 아스코르브산을 넣은 실험에서는 0.011의 흡광도를 보였다

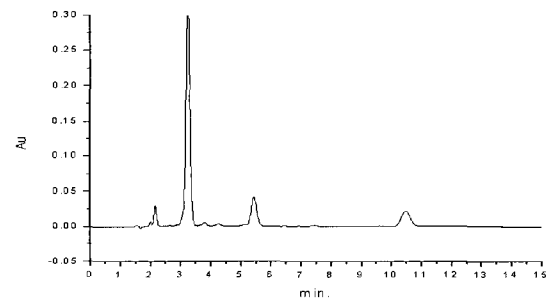
(Table 3). 항산화제에 의하여 라디칼이 제거되면 DPPH는 색깔을 잃어서 투명해진다. 시료의 항산화도 측정은 아스코르브산의 라디칼제거활성과 비교하여 측정하였으며, 아스코르브산의 항산화활성을 100으로 하여 백분율로 계산하였다. 분획한 각 시료를 농축하여 용매를 제거한 후 1 mg 당 2.5 ml의 메탄올을 첨가하여 녹인 후 측정하였다. 항산화도는 6-gingerol의 함량이 높은 F8~F10은 아스코르브산과 비교하여 99%에 달하는 높은 항산화능력을 보였다. 특이한 점은 6-gingerol이 거의 없는 F5나 F6같은 경우에도 높은 항산화능력을 보였다. 생강에서는 6-gingerol 외에도 항산화 작용을 하는 물질이 존재하며, 동일한 양일 경우 6-gingerol에 준하는 항산화특성을 가지는 것으로 보인다.

Table 3. Absorbance of samples at 517 nm

Sample number	Absorbance	Sample number	Absorbance
Blank DPPH	0.276	F6	0.027
F1	0.264	F7	0.015
F2	0.247	F8	0.013
F3	0.119	F9	0.013
F4	0.031	F10	0.021
F5	0.022	ascorbic acid	0.011



(A)



(B)

Figure 3. Chromatogram of 6-gingerol standard (A) and fraction of F9 (B).

요 약

이상의 실험결과를 종합해보면 6-gingerol의 최적추출조건은 30℃에서 80% 에탄올을 이용하여 추출함이 바람직하다고 여겨진다. 또한 용매만을 이용해서 추출하는 것보다 초음파를 도입하여 추출하는 것이 7% 정도 높은 결과를

얻는 것을 확인할 수 있었다. 6-gingerol의 경우 분취크로마토그래피를 이용했을 때 비교적 높은 순도의 gingerol을 얻을 수 있었으며, F9 분획에서 0.53 mg/mL의 6-gingerol를 얻었다. 6-gingerol의 항산화 활성은 아스코르브산의 95% 정도로 매우 높게 나타났다. 또한 항산화 활성을 나타내는 다른 물질이 포함되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Lee, Y. N. (1996), Flora of Korea, pp. 1107-1109, Kyohaksa, Seoul, Korea.
2. Lee, C. B. (1979), Illustrated Flora of Korea, pp. 231-231, Hyangmoon Publish Co., Seoul, Korea.
3. Leung, A. Y. (1980), Encyclopedia of Common Natural Ingredients, pp. 270-274, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
4. Cooksley, V. (1996), Aromatherapy: A Life Time Guide to Healing with Essential Oils, pp. 349-350, Prentice Hall Press, Englewood Cliffs, N.J., USA.
5. Connell D. W. and M. D. Sutherland (1969), A re-examination of gingerol, shogaol, and zingerone the pungent principle of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Aust J Chem.* **22**, 1033-1043.
6. Connell D. W. (1970), The chemistry of the essential oil and oleoresin of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Flavour Ind.* **1**, 677-693.
7. Chung, Y. K. (1997), Components of essential oil and antimicrobial of Garlic and Ginger, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **40**(6), 514-518.
8. Kim, M. K., M. S. Na, J. S. Hong, and S. T. Chung (1992), Components of Flavor of Ginger by the liquid CO₂ extraction, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **35**, 55-63.
9. Surh, Y. J (1999), Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances, *Mutat. Res.* **428**, 305-327.
10. Park, K. K., K. S. Chun, J. M. Lee, S. S. Lee, and Y. J. Surh (1988), Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice, *Cancer Lett.* **129**, 139-144.
11. Bode, A. M., W. Y. Ma, Y. J. Surh, and Z. Dong (2001), Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol, *Cancer Res.* **61**, 850-853.
12. Azian, M. N., M. S. Hasnah, M. S. Sazalina, and M. R. Haira (2001), Ginger oleoresin from *Zingiber officinale* Roscoe: Effect of sample preparation yield and quality, *Paper at the Congress of Science and Technology Association of Malaysia*, 1-11.
13. Aeschbach, R., J. Loliger, B. C. Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, and O. I. Aruoma (1994), Antioxidant actions of thymol, carbacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, *Food Chem. Toxicol.* **32**, 31-36.
14. Chang, W. S., Y. H. Chang, F. J. Lu, and H. C. Chiang (1994), Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase, *Anticancer Res.* **14**, 501-506.
15. Melecchi, M. I. S., V. F. Peres, C. Dariva, C. A. Zini, F. C. Abad, M. M. Martinez, and E. B. Caramao (2005), Optimization of the sonication extraction method of Hibiscus tiliaceus L. flowers, *Ultrasonics Sonochem.* **14**.
16. Tuziuti, T., K. Yasui, Y. Iida, H. Taoda, and S. Koda (2004), Effect of particle addition on sonochemical reaction, *Ultrasonics* **42**, 597.
17. Iida, Y., K. Yasui, T. Tuziuti, and M. Sivakumar (2005), Sonochemistry and its dosimetry, *Microchemical J.* **80**, 159.
18. Haizhou, L., L. Pordesimo, and J. Weiss (2004), High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, *Food Research International* **37**, 731.
19. Yasui, K., T. Tuziuti, and Y. Iida (2005), Dependence of the characteristics of bubbles on types of sonochemical reactors, *Ultrasonics Sonochem.* **12**, 347.
20. Saez, V., A. Frias-Ferrer, J. Iniesta, J. Gonzalez-Garcia, A. Aldaz, and E. Riere (2005), Characterization of a 20 KHz sonoreactor. Part I: analysis of mechanical effects by classical and numerical methods, *Ultrasonics Sonochem.* **12**, 59.
21. Kim, H. K., Y. A. Kim, S. W. Hwang, and B. S. Ko (2002), Quantitative Analysis of 6-Gingerol in the Zingiberis Rhizoma by Processing Methods, *Kor. J. Pharmacogn.* **33**(4), 291-295.