

## 강황 지상부의 항산화 성분

안달래<sup>1</sup> · 이은별<sup>1</sup> · 안민실<sup>2</sup> · 임혜원<sup>3</sup> · 형명명<sup>1</sup> · 도 초<sup>1</sup> · 양재현<sup>4</sup> · 김대근<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>우석대학교 약학대학, <sup>2</sup>전북농업기술원, <sup>3</sup>(주)세마바이오텍, <sup>4</sup>전북대학교 헬스케어사업단

## Antioxidant Constituents of the Aerial Parts of *Curcuma longa*

Dalrae Ahn<sup>1</sup>, Eun Byeol Lee<sup>1</sup>, Min-Sil Ahn<sup>2</sup>, Hye Won Lim<sup>3</sup>, Ming Ming Xing<sup>1</sup>, Chao Tao<sup>1</sup>,  
Jae Heon Yang<sup>4</sup> and Dae Keun Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

<sup>2</sup>Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Service, Iksan 570-704, Korea

<sup>3</sup>Bio Bldg. #1-406, High-Tech Venture Town, Chuncheon, 200-160, Korea

<sup>4</sup>Center for Healthcare Technology Development, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

**Abstract** – As part of ongoing study focused on the discovery of natural antioxidants from Korean plants by measuring the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging effect and superoxide quenching activity, ethanol extract of the aerial parts of *Curcuma longa* (Zingiberaceae) was found to show potent antioxidant activities. Subsequent activity-guided fractionation of the ethanol extract led to the isolation of two phenolic compounds, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (1) and gallic acid (2), as antioxidant compounds. Their structures were elucidated by spectroscopic studies. Compounds 1 and 2 were isolated for the first time from this plant. These compounds showed the significant antioxidative effects during the DPPH free radical scavenging test, and the riboflavin- and xanthine-originated superoxide quenching activity tests.

**Key words** – *Curcuma longa*, Zingiberaceae, DPPH, Superoxide quenching activity

환경오염, 음주, 흡연, 스트레스, 화학약품, 방사선, 중금속 등은 인체 내에서 활성산소를 발생시키고 체내에 축적된 활성산소는 유리기를 형성하여 인체에 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 체내에 축적된 활성산소는 인체 세포의 구성물질인 지질, 단백질 및 DNA 등을 비가역적으로 파괴하여 노인성 질환과 노화를 비롯한 많은 질환의 중요 원인으로 보고되어 있다. 기존의 합성 항산화제는 독성을 일으키는 것으로 알려져 있어 안전한 대체물질의 개발이 요구되고 있어 활성 산소종이나 유리기를 제거하기 위한 많은 항산화제의 연구가 진행되고 있다.<sup>1-6)</sup>

강황 *Curcuma longa* L.는 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 속근성 초본으로 한방에서는 뿌리줄기를 삶거나 찌서 말린 것은 강황(薑黃)으로, 덩이뿌리를 찌서 말린 것은 울금(鬱金)으로 사용하고 있다.<sup>7)</sup> 그러나 뿌리줄기와 덩이뿌리는 전통적으로 약용으로 사용하고 있으나 약용부위를 채취한 후의 150 cm 까지 자라는 지상부를 포함한 부산물은

더 이상 이용되지 못하고 밭에 버려지고 있다. 따라서 강황 재배 후의 다량으로 발생하는 부산물의 다각적인 이용이 연구되어야 할 것으로 생각된다. 그 일환으로 본 연구는 약용부위 채취 후의 강황 부산물을 ethanol로 추출하고 그 ethanol 엑스를 몇 가지 용매로 분획하여 얻은 각 분획물에 대해 DPPH free radical 소거활성 및 superoxide quenching 효과를 측정하고 ethyl acetate 가용분획에서 가장 강한 활성이 확인되어 ethyl acetate 분획에서 항산화 물질을 분리하고자 실험을 진행하였다. 그 결과 2종의 화합물을 단리하고 그 구조를 확인한 후 2종의 화합물에 대해 항산화 활성을 최종 확인하였기에 이를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에 사용한 강황의 지상부는 2011년 11월에 전라북도 농업기술원에서 채취하였으며, 정확히 감정한 후에 음건세절하여 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학대학 생약학 연구실에 보관하고 있다(WSU-11-035).

\*교신저자(E-mail): dkkim@mail.woosuk.ac.kr  
(Tel): +83-63-290-1574

**시약 및 기기** - 실험에 사용한 기기로는  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum은 Jeol JMN-EX 400 spectrometer (Japan)를 이용하여 확보하였다. 추출 및 분획용 시약은 1급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 시약 등은 1급 용매를 재증류하여 사용하거나, 특급시약을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Art. 1.07734, 230-400 mesh, Merck)이며, molecular sieve column chromatography용 packing material은 Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> precoated plate (Art. 1.07752, Merck)를 사용하였으며, HPLC용 column은 JAI GS-310 (JAI Co. Ltd.) column을 사용하였다. 발색시약으로는 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (in EtOH) 시약을 사용하였으며, UV의 검색은 254, 365 nm에서 하였다.

**추출 및 분리** - 신선한 강황 지상부를 음건 세절한 다음 건조하여 얻은 시료 약 1.9 kg을 ethanol로 가끔 진탕하면서 5시간씩 50°C에서 3회 온침 추출하였다. 그 추출액을 수욕 상에서 감압농축하여 ethanol 엑스 약 290 g을 얻었으며, 이 ethanol 엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 *n*-hexane(46 g), methylene chloride(3.8 g), ethyl acetate(2.4 g) 및 *n*-butanol(14.9 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 이들 분획물에 대해 DPPH free radical 소거 활성과 riboflavin 및 xanthin 유래 superoxide quenching 효능을 측정하여 이 중 가장 강한 항산화 활성을 보인 ethyl acetate분획에서 물질 분리를 시도하였다. Ethyl acetate분획을 Sephadex LH-20(MeOH) column chromatography를 실시한 후 TLC 양상에 따라 8개 분획(E1-E8)으로 나누었다. 이 중 주요 반점을 나타낸 E7과 E8에서 물질 분리를 시도하였다. E7과 E8을 JAI GS-310 column (MeOH)으로 정제하여 화합물 **1** (9 mg)과 화합물 **2** (15 mg)을 각각 얻었다.

**1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (1)** -  $\text{FeCl}_3$  test: positive;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.10, 7.04, 6.97, 6.94, 6.89 (each 2H, s, galloyl H), 6.22 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, glc-1), 5.88 (1H, t,  $J=8.4$ , ), 5.60 (1H, t,  $J=8.4$  Hz, glc-4), 5.57 (1H, t,  $J=8.4$  Hz, glc-2), 4.51 (1H, d,  $J=10.8$  Hz, glc-6a), 4.39 (2H, m, glc-5, 6a);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 167.92, 167.30, 167.02, 166.93, 166.22 (galloyl C=O), 146.54, 146.46, 146.43, 146.36, 146.27 (galloyl C-3, 5), 140.75, 140.35, 140.29, 140.12, 140.00 (galloyl C-4), 121.05, 120.37, 120.25, 120.21, 119.74 (galloyl C-1), 110.64, 110.48, 110.42, 110.40, 110.36 (galloyl C-2, 6), 93.83 (glc-1), 74.41 (glc-5), 74.11 (glc-3), 72.20 (glc-2), 69.82 (glc-4), 63.14 (glc-6).

**Gallic Acid (2)** -  $\text{FeCl}_3$  test: positive;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.08 (each 2H, s, H-2, 6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 170.4 (C=O), 146.3 (C-3, 5), 139.5 (C-4), 121.8 (C-1), 110.5 (C-2, 6).

**DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성<sup>8)</sup>** - 96 well plate에 시료를 EtOH로 각 농도별로 조제한 용액에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (EtOH)을 일정량씩 가하였다. 10초간 진탕한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물은 L-ascorbic acid와 BHA (butylated hydroxy anisole)를 사용하였다. 항산화효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도와 비교하여 그래프로 나타내었다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다.

**Riboflavin 유래 Superoxide 억제 활성<sup>9,10)</sup>** - 시료의 superoxide 억제능력은 methionine, riboflavin, NBT로 구성된 평가 시스템을 이용하여 광화학 작용을 측정하는 것이다. 반응 혼합액은 2.6  $\mu\text{M}$  riboflavin, 13 mM methionine, 75  $\mu\text{M}$  NBT, 0.1 mM EDTA, PBS(pH 7.4) 및 여러 농도의 시료로 이루어졌다. 혼합물은 light box에 넣은 후 5분마다 자리를 임의로 바꾸어 주면서 15분 동안 넣어두었다. light box 안의 온도는 20 $\pm$ 1°C, 빛의 밝기는 5,500 lux를 유지하였다. NBT는 빛 아래에서 blue formazan으로 환원되어지는데, 이 생성물을 560 nm에서 측정하였다. Blue formazan 형성 억제가 superoxide 억제능력이 된다.

**Xanthin 유래 Superoxide 소거 활성<sup>11)</sup>** - Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide 라디칼을 Thuong 등의 방법에 따라 측정한다. nitro blue tetrazolium (NBT, 0.48 mM), xanthine(1.6 mM)을 포함하는 phosphate buffer(pH 7.8, 20 mM)와 시료를 함께 혼합한다. 5분 후 xanthine oxidase(0.05 U/mL) 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고, 37°C에서 30분간 배양시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다. Superoxide 라디칼 소거 활성은 시료와 대조군의 NBT의 환원정도를 비교하여 나타낸다.

## 결과 및 고찰

강황 지상부로부터 얻은 ethanol 엑스를 용매로 계통분획하여 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 및 *n*-butanol엑스를 제조하였다. 이 중 가장 강한 DPPH radical 소거활성(Fig. 1)과 riboflavin 및 xanthin 유래 superoxide quenching 효능(자료 생략)을 나타낸 ethyl acetate 분획물을 몇가지 column chromatography를 반복 실시하여 2종의 페놀성 물질을 단리하였다(Fig. 2).

화합물 **1**은  $\text{FeCl}_3$  시액에 양성으로 나타났으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 aromatic 영역에서 각각 2H에 해당하는 singlet proton peak가  $\delta$  7.10, 7.04, 6.97, 6.94 및 6.89에서 5개가 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 carbonyl 영역의  $\delta$  167.92, 167.30, 167.02, 166.93 및 166.22에서 5개의 carbonyl carbon signal이 확인되었으며, 그 외의 aromatic 영

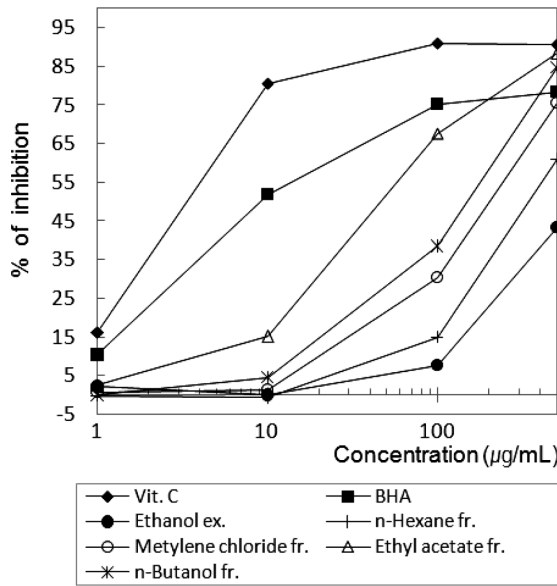


Fig. 1. DPPH radical scavenging effects of the methanol extract, and its fractions of the aerial parts of *Curcuma longa*.

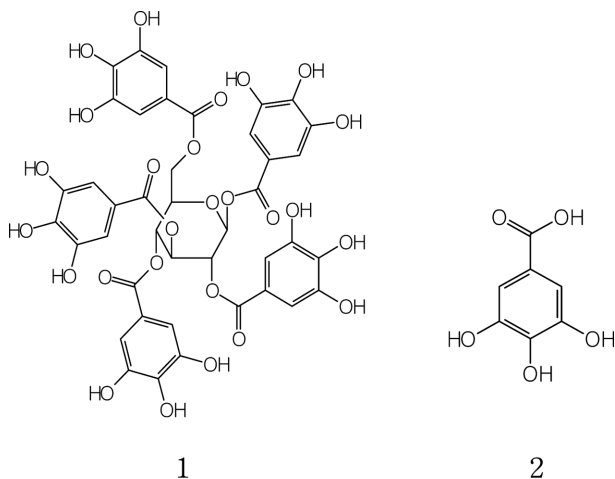


Fig. 2. Structures of compounds 1 and 2 isolated from *Curcuma longa*.

역의  $\delta$  146.54, 146.46, 146.43, 146.36 및 146.27에서 5개의 peak,  $\delta$  140.75, 140.35, 140.29, 140.12 및 140.00에서 5개의 peak,  $\delta$  121.05, 120.37, 120.25, 120.21 및 119.74에서 5개의 peak,  $\delta$  110.64, 110.48, 110.42, 110.40 및 110.36에서 5개의 peak가 관찰되어 전형적인 galloyl기의 peak 양상을 보여 주었다. 그 외에 aliphatic 영역에서는  $\delta$  93.83, 74.41, 74.11, 72.20, 69.82 및 63.14에서 glucose로 추정되는 6개의 peak signal을 확인되었다. 이상의 자료를 토대로 화합물 1은 glucose의 hydroxyl radical이 5개의 galloyl기로 치환된 화합물로 추정하였으며 기존 문헌<sup>12)</sup>의 data와 비교하여 화합물 1을 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인·동정하였다.

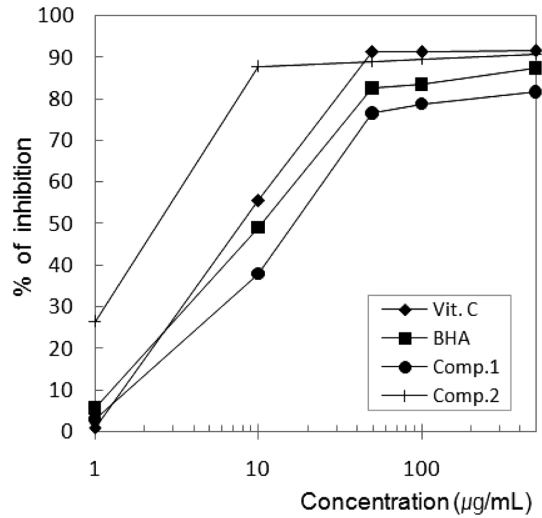


Fig. 3. Radical scavenging effects of compounds 1 and 2 on DPPH radicals.

화합물 2는  $FeCl_3$  시액에 양성으로 나타났으며,  $^1H$ -NMR spectrum에서 aromatic 영역에서 각각 2H에 해당하는 singlet proton peak가  $\delta$  7.08에서 1개가 관찰되었고,  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는 carbonyl 영역의  $\delta$  107.4에서 1개의 carbonyl carbon signal이 확인되었다. 그 외의 aromatic 영역의  $\delta$  146.3, 139.5, 121.8 및 110.5에서 4개의 peak가 관찰되어 전형적인 galloyl기의 peak 양상을 보여 주었다. 이상의 자료를 토대로 화합물 2는 gallic acid로 추정하였으며 기존 문헌<sup>13,14)</sup>의 data와 비교하여 확인·동정하였다.

이상과 같이 강황 지상부의 ethanol 추출물 분획 중 DPPH free radical 소거활성과 riboflavin 및 xanthine 유래 superoxide quenching 효능이 가장 좋은 ethyl acetate 분획으로부터 물질 2종을 분리하여 그 구조를 동정하였다. 화합물 1과 2는 본 식물에서 처음 보고되는 화합물이며, 분리된 화합물의 DPPH free radical 소거활성은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 화합물 2( $IC_{50}$ ; 2.3  $\mu$ g/ml)가 화합물 1( $IC_{50}$ ; 16.4  $\mu$ g/ml)보다 강한 DPPH free radical 소거활성을 보여 주었으며, vitamine C( $IC_{50}$ ; 7.42  $\mu$ g/ml) 보다도 강력한 효능을 보여 주었다. Riboflavin 유래 superoxide quenching 활성 또한 화합물 2( $IC_{50}$ ; 6.3  $\mu$ g/ml)가 화합물 1( $IC_{50}$ ; 38.1  $\mu$ g/ml) 보다 강한 superoxide 소거활성을 보여 주었으며, 화합물 2는 vitamine C( $IC_{50}$ ; 5.1  $\mu$ g/ml)와 유사한 소거효능을 보여 주었다(Fig. 4). Xanthine 유래 superoxide quenching 활성은 화합물 2( $IC_{50}$ ; 5.8  $\mu$ g/ml)가 화합물 1( $IC_{50}$ ; 31.0  $\mu$ g/ml) 보다 강한 superoxide 소거활성을 보여 주었으며, 화합물 2는 vitamine C( $IC_{50}$ ; 5.8  $\mu$ g/ml)와 유사한 소거효능을 보여 주었다(Fig. 5). 이상의 결과로 화합물 1과 2는 강황 지상부의 ethanol 추출물이 갖고 있는 항산화활성을 나타내는 일부 구성 물질임을 알 수 있었으며, 강황의 뿌리줄기와 덩이뿌리 등의 약

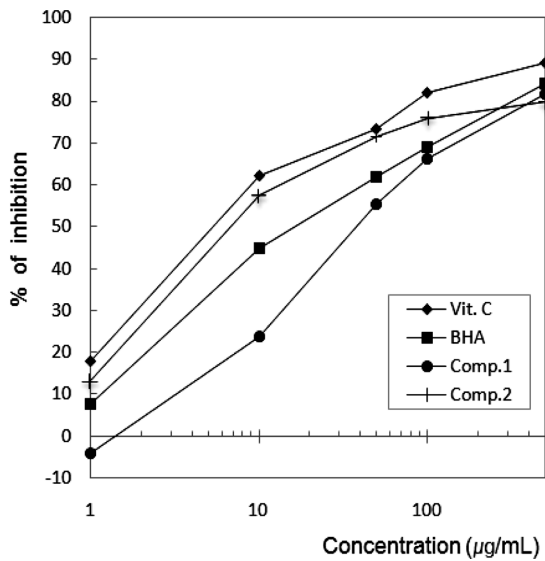


Fig. 4. Riboflavin originated superoxide quenching activities of compounds 1 and 2.

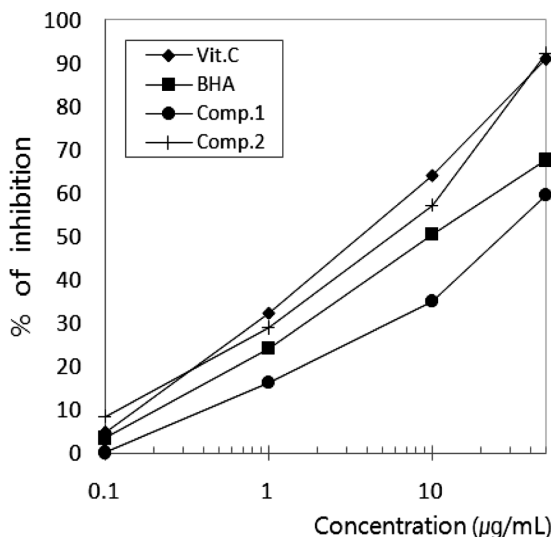


Fig. 5. Xanthine originated superoxide quenching activities of compounds 1 and 2.

용부위를 채집한 후의 부산물로 남는 지상부는 항산화활성을 갖는 기능성 자원소재로서의 이용가능성이 충분히 있을 것으로 사료된다.

### 결론

강황 지상부의 ethanol 추출물 중 ethyl acetate분획에서 항산화 활성을 갖는 2종의 화합물을 단리하였으며, 이들의 spectral data로부터 구조를 확인한 결과 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucopyranoside (1)와 gallic acid (2)로 각각 확인·동정하였다. 이 화합물 1, 2는 본 식물로부터 처음 분

리·보고되는 화합물이며, 화합물 1, 2 모두 강한 DPPH radical 소거 효능 및 riboflavin 및 xanthine 유래 superoxide quenching 활성을 보여 주었다.

### 사사

이 논문은 2012년도 농촌진흥청 어젠다 연구개발사업의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

### 인용문헌

- Steinmetz, K. A. and Potter, J. D. (1991) Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Contrl.* **2**: 427-442.
- Woo, K. S., Seo, M. C., Kang, J. R., Ko, J. Y., Song, S. B., Lee, J. S., Oh, B. G., Park, G. D., Lee, Y. H., Nam, M. H. and Jeong, H. S. (2010) Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1695-1699.
- Yu, B. P. (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* **21**: 651-668.
- Heo, C., Chung, J. H., Jo, B. K., Kim, H. P. and Heo, M. Y. (2003) Antioxidative activities of 60 plant extracts. *The Journal of Applied Pharmacology* **11**: 196-199.
- Heo, C., Chung, J. H., Jo, B. K., Kim, H. P. and Heo, M. Y. (2003) Antioxidative activities of 60 plant extracts. *The Journal of Applied Pharmacology* **11**: 196-199.
- Suk, S. H. (2006) Antioxidant effect of vitamin E on vascular endothelial cells damaged by reactive oxygen species. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* **20**: 685-689.
- 한국약학대학협회의 약전분과회 편저 (2008) 대한약전해설서(9개정) II, 1098, 1161, 도서출판 신일북스, 서울.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. (1989) Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V.- Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.
- Choi, D. S., Kim, S. J., and Jung, M. Y. (2001) Inhibitory activity of berberine on DNA strand cleavage induced by hydrogen peroxide and cytochrome c. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 452-455.
- Ginnopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**, 309-314.
- Thuong, P. T., Su, N. D., Ngoc, T. M., Hung, T. M., Dang, N. H., Thuan, N. D., Bae, K. H. and Oh, W. K. (2009) Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*. *Food Chem.* **113**: 139-145.
- Kim, J. J., Lee, J. S., Kim S. Y., Kim, J. A., Chung, S. R.,

- Jang, T. S. and Lee, S. H. (2001) Inhibitory effect of hydrolysable tannins isolated from the *Euphorbia helioscopia* on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. *Yakhak Hoeji* **45**: 214-219.
13. Park, W. Y., Lee, S. C., Ahn, B. T., Lee, S. H., Ro, J. S. and Lee, K. S. (1993) Phenolic compounds from *Acalypha australis* L. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 20-25.
14. Kim, J. K., Kwon, D. J., Lim, S. S. and Bae, Y. S. (2010) Chemical constituents of domestic *Quercus* spp. barks. *Mokchae Konghak* **38**: 359-374.  
(2012. 10. 20 접수; 2012. 11. 1 심사; 2012. 11. 6 게재확정)