

Methanol Extract of *Alpinia katsumadai* Hayata has Anti-viral Activity by Inhibition of α -glucosidase

Doseung Lee · Kyung Hwan Boo · Young Cheon Kim · Jin-Man Lee · Seong Cheol Kim · Wang Shik Lee · Key Zung Riu · Dong-Sun Lee*

초두구 추출물의 α -glucosidase 활성 억제에 의한 항바이러스 활성

이도승 · 부경환 · 김영천 · 이진만 · 김성철 · 이왕식 · 류기중 · 이동선*

Received: 26 November 2013 / Accepted: 16 December 2013 / Published Online: 30 June 2014
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

Abstract In the present study, we investigated the effects of methanol extracts from *Alpinia katsumadai* Hayata against anti-viral potential underlying mechanism in glucosidase inhibition. Syncytium formation in Newcastle disease virus (NDV)-infected baby hamster kidney (BHK) cell originates from the trafficking of viral glycoprotein into cell-surface. Methanol extracts inhibited

not only syncytium formation, but also trafficking of glycoprotein, hemagglutinin-neuraminidase (HN), onto cell-surface. *A. katsumadai* extracts showed the inhibitory activities (IC_{50} 25 μ g/mL) against α -glucosidase. These results suggested that blue chanterelle extracts inhibited the cell-surface expression of NDV-HN glycoprotein without significantly affecting HN glycoprotein synthesis in NDV-infected BHK cells.

D. Lee, K. H. Boo, and Y. C. Kim contributed equally.

D. Lee
Jeju Biodiversity Research Institute (JBRI), Jeju Technopark, Jeju 699-943, Republic of Korea

K. H. Boo · Y. C. Kim
Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

S. C. Kim
Agricultural Research Center for Climate Change, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Jeju 690-150, Republic of Korea

J.-M. Lee
Department of Food & Biotechnology, Hoseo University, Cheonan 336-795, Republic of Korea

W. S. Lee · K. Z. Riu · D.-S. Lee
College of Applied Life Science(SARI), Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea
Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

*Corresponding author (D.-S. Lee: dongsunlee@jejunu.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.

Keywords α -glucosidase inhibition · antiviral activities · methanol extract of *Alpinia katsumadai*

서론

당뇨, 암, 바이러스 감염 등과 같은 많은 질병에 관여하는 것으로 알려진 glucosidases는 세포내 glucose trimming을 통하여 당단백질 혹은 당지질의 수식에 관여한다. 그리고 α -glucosidase 저해제는 당단백질 혹은 당지질의 수식을 통하여 항당뇨, 항암, 및 항바이러스 활성을 나타낸다(Dennis 등, 1987; Goss 등, 1995; Mehta 등, 1998; van de Laar 등 2005; Lee 등, 2007). 특히, 땀기바이러스, HIV, 간염바이러스 등을 포함한 해로운 바이러스들은 glucosidase 저해에 매우 민감한 것으로 알려졌다(Courageot 등, 2000). 이러한 이유로 인하여, α -glucosidase 저해제는 관련된 많은 질병의 치료제 개발 타겟으로써 뿐만 아니라 작용기작 연구에 이용된다(Courageot 등, 2000).

Nojirimycin, N-butyldeoxynojirimycin, nectricine 및 castanospermine와 같은 α -glucosidase 저해제는 당단백질 수식의 초기단계를 저해함으로써 인간면역결핍 바이러스(HIV, human immunodeficiency virus)의 복제, 세포융합을 통한 syncytium (합포체) 형성의 저해활성을 나타낸다(Gruters 등, 1987; Johnson 등, 1989; Fischer

등, 1995; Tsujii 등, 1996; Dettenhofer와 Yu, 2001; Papandrou 등, 2002). HIV-1 envelope glycoprotein (Env)으로 알려진 outer membrane gp120와 transmembrane gp41 subunits은 precursor gp160의 절단으로부터 유래된다(Einfeld, 1996). T helper cell 표면에 위치한 HIV 수용체인 gp41와 gp120은 lymphocytes 표면의 CD4 수용체에 결합하며, 이러한 상호작용을 통하여 거대하고 비기능적인 막융합을 야기시켜 syncytium (합포체)을 형성한다(Papandrou 등, 2002; Quinn, 2008).

α -glucosidase inhibitor로써 Deoxynojirimycin와 그 유사체들은 (Papandrou 등, 2002) gp160으로부터 gp41와 gp120으로의 절단 활성을 감소시켜 정상적인 glycan processing을 저해함으로써 감염세포내에서 HIV 수용체의 형성을 방해한다. HIV 감염된 세포에서의 합포체 형성은 Newcastle disease virus (NDV) 감염된 baby hamster kidney (BHK) 세포에서도 관찰되며(Lee 등, 2011), 합포체 형성을 저해하는 저해제 탐색방법은 항 HIV 활성물질 스크리닝을 위한 훌륭한 전략으로 기대된다.

초두구는 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 식물로서 과피를 제거한 종자로 진토제(antiemetic), 건위제 (stomachic) 등의 한약제로 사용하고 있다(Zhu, 1998; Park 등, 2005). 초두구 성분으로는 diarylheptanoids (Kuroyanagi 등, 1983), flavonoids (Yushiro 등, 1968), monoterpenes, sesquiterpenoids (Lawrence 등, 1972; Saiki 등, 1978) 와 stilbenes (Yang 등, 1999)등의 성분이 알려져 있다. 최근에는 초두구 추출물을 이용한 항인플루엔자 바이러스 활성(anti-influenza virus activity) (Grienke 등, 2010; Kwon 등, 2010), 항로타바이러스 활성 (anti-rotavirus activity) (Kim 등, 2012) 에 관한 연구가 보고되었을 뿐 많은 연구가 이루어지고 있지는 않는 실정이다. 따라서, 우리는 이러한 시스템을 이용하여 초두구 추출액이 α -glucosidase 저해활성과 항바이러스 활성에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

세포주, 바이러스 및 시약. Baby hamster kidney fibroblasts clone 21 (BHK) 세포주는 37°C, humidified CO₂ incubator (5% CO₂-95% air)내에서 10% calf serum (BD)이 포함된 Eagle's minimum essential medium (BD, USA)에서 배양하였다. Newcastle disease virus (NDV; Miyadera strain)는 국립보건연구원(National Institute of Health, Korea)에서 분양 받은 BHK 세포에서 증식하였다. 증식된 바이러스 stock 들은 monolayer BHK 세포주상 plaque forming units의 assay를 통하여 적정하였다. 모든 시험에 사용된 시약들은 Sigma-Aldrich (USA) 사로부터 구입하여 사용하였다.

시료의 추출. 초두구 시료는 대구시내에 위치한 한약방으로부터 구입하여 사용하였다. 초두구 시료 10 g을 각각 메탄올(100 mL)로 상온에서 24시간 추출한 후 감압농축(40°C)하여 동결건조 하여 2.0±0.5 g을 획득한 후 4°C 혹은 -20°C에 보관하여 활성 시험의 재료로 사용하였다(Lee 등, 2011).

α -glucosidase 저해활성 검정. 초두구 추출물은 시판하는 다양한 glucosidase에 대하여 효소 활성 억제력을 보였다. glycosidase의 assay는 (Lee와 Lee, 2001; Lee 등, 2010)의 방법에 따라 수행하였다. α -glucosidase와 다른 glucosidase의 활성 분석을 위하여 기질로 *p*-nitrophenol (PNP) glycosides (1 mM)를 포함하는 50 mM phosphate 완충용액(pH 6.7)을 조제하여 사용하였다.

시료를 완충용액에 첨가하고 37°C, 5분 효소 반응 개시 후 기질을 첨가하여 37°C, 10분 간 효소 반응을 수행하였다. 효소 반응 종료는 3배 vol.의 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 종한 후 OD₄₀₅를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소저해활성을 계산하였다. 활성단위인 1 unit는 활성측정 조건에서, 1분 동안 PNP 1.0 μ mol을 생성하는데 사용된 효소 양으로 정하였다. 억제율 계산은 아래와 같이 하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}}}{\text{Activity}_{\text{control}} \times 100}$$

Syncytium 형성 및 cytopathic 효과. BHK cell의 표적 세포 단일층(monolayer)은 96 well microtiter plate에 5 multiplicity of infection 농도의 NDV를 감염시킨 후 표시된 농도의 시료를 첨가하여 배양하였다. 그런 후 NDV 감염 세포주에서 syncytium 형성여부, cytopathic 효능(CPE) 및 cytopathic units (CPU) 정량을 광학현미경하에서 실시하였다(Muroi 등, 1993; Boo 등, 2011). 96 well microtiter plate에 배양된 BHK 세포주에 2배 희석 농도가 되게 하여 VSV를 감염시킨 후 CPU 정량을 수행하였다. CPU는 세포병변효과가 일어나는 추출물 농도 이전의 최대 희석 배율로 정하며, 세포병변효과에 내성을 갖는 물질의 최대 희석농도를 의미한다.

Cell growth. 96 well plates에 BHK 세포를 분주한 후 2배 농도로 희석된 초두구 추출물을 처리하여 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. BHK 세포 성장은 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (Sigma-Aldrich Co.)를 이용한 colorimetric 방법에 준하여 결정하였다.

적혈구응집(Hemagglutination) 및 혈구흡착(hemadsorption). 바이러스 당단백질 NDV-hemagglutinin-neuraminidase (NDV-HN) 생합성은 NDV 감염 세포주 용해물에 혈구응집단위(hemagglutination units, HAU)를 결정하여 정량하였다. 세포 표면에서 NDV-HN 발현유무는 혈구흡착(hemadsorption, HAD)의 정량으로 결정하였다(Muroi 등, 1993; Lee 등, 2010). 6-well plates (Falcon; BD, USA)에 1 HAU/mL 농도의 NDV를 2 mL 처리 하여 감염시킨 후 14시간, 37°C, humidified 5% CO₂-95% air incubator에서 BHK 세포의 Confluent 배양을 수행하였다. 배양한 배지를 제거한 후 냉각된 식염수(chilled saline)에 있는 1% (v/v) 닭 적혈구(chicken red blood) 세포 2 mL를 각각의 well에 분주 한 후 4°C, 30분간 정치하였으며, 가끔씩 가볍게 흔들어 주었다. 흡착되지 않은 혈구세포를 제거 한 후, cell layer를 냉각한 식염수 2 mL로 3회 씻어주었다. 적혈구 세포는 1% 암모니아가 포함된 멸균수로 swollen 후 OD₅₅₀를 측정하여 정량하였다.

결과 및 고찰

초두구 추출물의 α -Glucosidase 억제 활성. 다수의 α -glucosidase inhibitor들은 항바이러스 활성 물질로 알려져 있다 (Goss 등, 1995; Mehta 등, 1998; Courageot 등, 2000; Dettenhofer와 Yu, 2001; van de Laar 등, 2005). Glucosidase 저해제 스크리닝 시스템을 이용하여 α -glucosidase에 대한 활성저해능을 갖는 초두구 추출물을 선별하여 조사하였다. 추출물의 저해활성을 조사하기 위하여 50% inhibition (IC₅₀) values을 결정하였으며, 효소활성 저해능은 샘플 추출액 농도의 로그 값에 대한 상

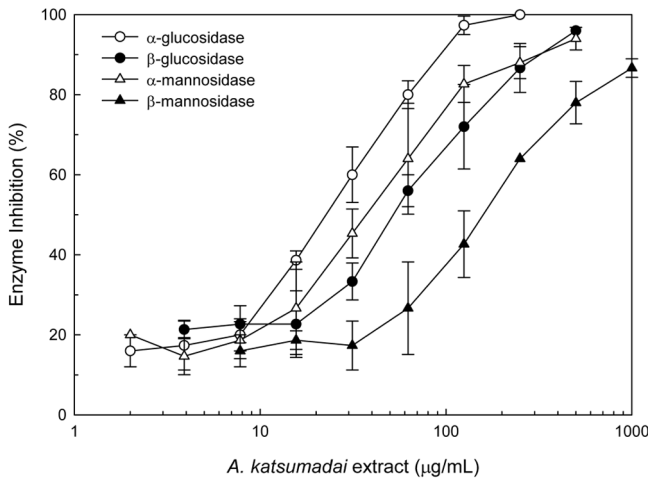


Fig. 1 Inhibition by *Alpinia katsumadai* extracts against 0.5 U/mL of various glucosidases. Mixtures of enzyme and sample were kept at room temperature for 1 h.

Table 1 Effect of *Alpinia katsumadai* extracts on syncytium formation

Concentration (µg/mL)	3.2	6.3	12.5	25	50	100
Syncytium formation	++	++	+	-	-	-
%HAU	100	96	92	83	71	56

Confluent monolayer cultures of BHK cells in 96-well titer plates were infected with NDV. Methanol extract was added at 1 h after infection and the cells were incubated for a further 18 h. The syncytium formation in NDV-infected cells was determined under an optical microscope. The degrees of syncytium formation was expressed as follows; -, none; +, moderate; ++, severe.

대활성 %을 정하여 나타내었다. Fig. 1에서와 같이, α-glucosidase에 대한 추출물의 IC₅₀ 값은 20 µg/mL이었으며, 또한 추출물에 대한 α-glucosidase 활성 억제를 3개의 다른 효소와의 IC₅₀의 비교 변화를 보았을 경우도 유사한 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 초두구 추출물이 농도 의존적으로 α-glucosidase에 대한 억제 활성이 증가하였다고 사료된다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이, 초두구 추출물은 β-type glycosidases 보다 α-type glycosidase에 대한 효소활성 저해능이 우수하였다. β-glucosidase, α-mannosidase, β-mannosidase에 대한 초두구 추출물의 IC₅₀은 각각 40, 35, 180 µg/mL로 나타났다.

보고된 연구논문에 따르면(Courageot 등, 2000; Dettenhofer와 Yu, 2001; van de Laar 등, 2005), α-glucosidase에 대한 억제 활성을 나타내는 것은 세포내에서 바이러스 단백질들의 glycosylation와 같은 당단백질 수식과정을 억제하는 것으로 보고되었다. 따라서, Fig. 1과 같이 α-glucosidase 억제 활성을 보이는 초두구 추출물이 세포내에서 바이러스 당단백질의 합성과정 및 세포표면으로의 분비과정 등을 이해하는데 유용한 재료로 이용될 수 있을 것이라 기대된다.

초두구 추출물에 의한 바이러스 당단백질의 세포내 발현 억제. 본 실험에서는 세포수준에서 초두구 추출물의 항바이러스 억제 활성을 조사하기 위하여, NDV 감염된 BHK 세포 내에서 발현되는 바이러스 당단백질(NDV-HN)의 생합성 및 세포표면으로의 분비 효능을 알아보았다.

초두구 추출물이 합포체 형성을 억제시키는 MIC (Minimum

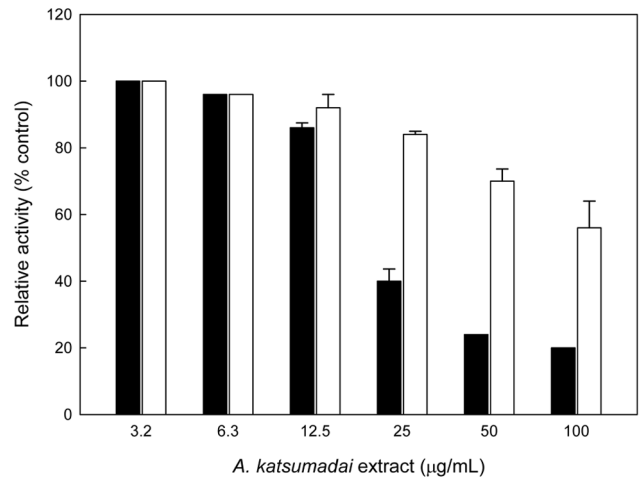


Fig. 2 Blockade of the cell surface expression of NDV-HN glycoprotein by *Alpinia katsumadai* extracts with no significant effects on its synthesis. Results are expressed as a % of the control.

inhibitory concentration) 값은 25 µg/mL로 나타났다(Table 1). 그러나, 부분적으로 합포체 형성이 지연되는 MIC 값은 12.5 µg/mL로 나타났다. 또한 NDV 감염된 BHK 세포에서의 합포체 형성은 HIV 감염시와 유사하기 때문에(Papandrou 등, 2002; Quinn, 2008; Lee 등, 2011), 초두구 추출물에 의한 α-glucosidase 활성 억제는 virus 감염 세포주에서의 glycan 형성 과정을 억제하므로 합포체 형성을 저해한다고 할 수 있다.

초두구 추출물에 의한 바이러스 당단백질의 세포표면으로의 발현 억제는 세포내에서 바이러스 당단백질의 세포내 생합성 저해에 의해 일어날 가능성이 있으므로, 추출물에 의한 당단백질 생합성 저해를 검토하였다. NDV-감염 BHK 세포에서 바이러스 당단백질 NDV-NH의 총 생합성 양은 세포 용해물(cell lysate)에서 전체 HAU 측정으로 정량화한다는 연구가 보고되었다(Muroi 등, 1993; Lee 등, 2010). NDV 감염된 세포배양액을 초음파 파쇄하여 닭 적혈구(chicken red blood cells)를 첨가한 후, 용해물에서 hemagglutination 활성을 측정하였다. HAU는 초두구 추출물의 농도가 25와 3.2 µg/mL 사이에서는 현저하게 감소하는 경향을 나타내지는 않았지만(Fig. 2, white bar), NDV 감염된 세포에 닭 적혈구 세포를 첨가하여 혈구 흡착(HAD %) 정도를 측정할 결과, 25 µg/mL 농도(Fig. 2, black bar)에서 광범위한 흡착능의 감소를 나타내었다. 즉, NDV 감염된 세포에 대하여 초두구 추출물 처리한 결과, 추출물 25 µg/mL 농도로 처리한 샘플 구에서 바이러스 당단백질의 세포내 생합성은 저해되지 않으나(Fig. 2, white bar), 당단백질의 세포표면으로의 분비가 저해되어 혈구흡착은 되지 않았다(Fig. 2, black bar). 그러므로 초두구 추출물은 NDV 감염된 BHK 세포에서 바이러스 당단백질의 분비과정을 저해함으로써 항바이러스 작용을 하는 것으로 추론된다.

초두구 추출물의 항바이러스 활성은 Rotavirus (Kim 등, 2010)와 Influenza 바이러스(Kwon 등, 2010) 감염된 인간 적혈구 세포에서 hemagglutination 저해능을 보이는 것으로 보아 항바이러스 활성이 있는 것으로 발표되었으나 정확한 작용기작에 대한 보고는 없었다. 그러나, 위에서 제시한 결과와 같이 초두구 추출물은 세포에 감염된 바이러스 당단백질의 세포표면으로의

분비과정을 저해함으로써 바이러스 증식을 억제하는 항바이러스 작용을 할 것이라는 결과를 확인되므로 향후, 정확한 작용 기작 연구가 필요하다.

초 록

α -glucosidase 활성을 저해하는 초두구 메탄을 추출물의 항바이러스 활성을 연구하였다. Newcastle disease virus (NDV) 감염된 baby hamster kidney (BHK) 세포에서 Syncytium (합포체) 형성은 세포막 표면으로의 수송된 바이러스 당단백질 hemagglutinin-neuramidase (HN)에 의해 일어난다. 초두구 추출물(IC₅₀ 25 μ g/mL) 처리된 세포에서 바이러스 당단백질의 수송과 함께 합포체 형성이 저해되었다. 또한 IC₅₀ 농도에서는 세포 내에서 당단백질 생합성은 저해되지 않으며 당단백질의 수송을 저해하는 것으로 추론된다.

Keywords 초두구 메탄을 추출물 · 항바이러스 활성 · α -glucosidase 활성저해

감사의 글 이 논문은 2013학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Boo KH, Lee DS, Woo JK, Ko SH, Jeong EH, Hong Q et al. (2011) Antibacterial and anti-viral activity of extracts from *Paeonia lactiflora* roots. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **54**, 132–5.
- Courageot MP, Frenkiel MP, Duarte Dos Santos C, Deubel V, and Despres P (2000) α -Glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **74**, 564–72.
- Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML, and Kerbel RS (1987) Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* **236**, 582–5.
- Dettenhofer M and Yu XF (2001) Characterization of the biosynthesis of human immunodeficiency virus Type 1 Env from infected T-cells and the effects of glucose trimming of Env on virion infectivity. *J Biol Chem* **276**, 5985–91.
- Einfeld D (1996) Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. *Curr Top Microbiol* **214**, 133–76.
- Fischer PB, Collin M, Karlsson GB, James W, Butters TD, Davis SJ et al. (1995) The α -glucosidase inhibitor N-butyldeoxyjirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. *J Virol* **69**, 5791–7.
- Goss PE, Baker MA, Carver JP, and Dennis JW (1995) Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clin Cancer Res* **1**, 935–44.
- Grienke U, Schmidtke M, Kirchmair J, Pfarr K, Wutzler P, Dürrwald R et al. (2010) Antiviral potential and molecular insight into neuraminidase inhibiting diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai*. *J Med Chem* **53**, 778–86.
- Gruters RA, Neefjes JJ, Tersmette M, de Goede RE, Tulp A, Huisman HG et al. (1987) Interference with HIV induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. *Nature* **330**, 74–7.
- Kim HH, Kwon HJ, Ryu YB, Chang JS, Cho KO, Hosmillo MD et al. (2012) Antiviral activity of *Alpinia katsumadai* extracts against rotaviruses. *Res Vet Sci* **92**, 320–3.
- Kuroyanagi M, Noro T, and Fukushima S (1983) Studies on the constituents of the seeds of *Alpinia katsumadai* Hayata. *Chem Pharm Bull* **31**, 1544–50.
- Kwon HJ, Kim HH, Yoon SY, Ryu YB, Chang JS, Cho KO et al. (2010) *In vitro* inhibitory activity of *Alpinia katsumadai* extracts against influenza virus infection and hemagglutination. *Virol J* **10**, 307.
- Lawrence BM, Hogg JW, Terhune SJ, and Pichitakul N (1972) Terpenoids of two *Amomum* species from Thailand. *Phytochemistry* **11**, 1534.
- Lee DS and Lee SH (2001) Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. *FEBS Lett* **501**, 84–6.
- Lee DS, Kim SC, Kim DH, Kim JH, Park SP, Riu YC et al. (2011) Screening of *Phellinus linteus*, a medicinal mushroom, for anti-viral activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **54**, 475–8.
- Lee DS, Lee JM, Kim SU, Chang KT, and Lee SH (2007) Ceftezole, a cephem antibiotic, is an α -glucosidase inhibitor with in vivo anti-diabetic activity. *Int J Mol Med* **20**, 379–83.
- Lee JM, Kim JG, Kim TH, Lee DS, Kim JH, Cho SK et al. (2010) Nonactin hinders intracellular glycosylation in virus infected baby hamster kidney cells. *Mol Med Rep* **3**, 115–9.
- Mehta A, Zitzmann N, Rudd PM, Block TM, and Dwek RA (1998) α -Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Lett* **430**, 17–22.
- Muroi M, Takasu A, Yamasaki M, and Takatsuki A (1993) Folimycin (concanamycin A), an inhibitor of V-type H(+)-ATPase, blocks cell surface expression of virus-envelope glycoproteins. *Biochem Bioph Res Co* **193**, 999–1005.
- Papandréou MJ, Barbouche R, Guieu R, Kieny MP, and Fenouillet E (2002) The α -glucosidase inhibitor 1-deoxyjirimycin blocks human immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated membrane fusion at the CXCR4 binding step. *Mol Pharmacol* **61**, 186–93.
- Park JM, Kil KJ, and Lee YJ (2005) A Study on morphological characteristics of *Alpiniae katsumadai* semen, *Tsaoko fructus* and *Alpiniae oxyphyllae fructus*. *Kor J Herbology* **20**, 93–102.
- Quinn TC (2008) HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. *AIDS* **22**(Suppl 3), 7–12.
- Saiki Y, Ishikawa Y, Uchida M, and Fukushima S (1978) Essential oil from chinese drug 'caodoukou', the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Phytochemistry* **17**, 808.
- Tsujii E, Muroi M, Shiragami N, and Takatsuki A (1996) Nectrisine is a potent inhibitor of α -glucosidases, demonstrating activities similarly at enzyme and cellular levels. *Biochem Bioph Res Co* **220**, 459–66.
- van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, van de Lisdonk EH, Rutten GE, and van Weel C (2005) Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* **28**, 154–63.
- Yang Y, Kinoshita K, and Koyama K (1999) Two novel antiemetic principles of *Alpinia katsumadai*. *J Nat Prod* **62**, 1672–4.
- Yushiro K, Shuhiti T, and Ikuo Y (1968) Studies on the constituents of the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Yakugaku Zasshi* **88**, 239–41.
- Zhu YP (1998) Chinese Materia Medica, Harwood Academic Publishers, Netherlands.