



Identification of $^1\text{H-NMR}$ characteristics for black ginger specimens from different places of origin

Hyeok Kwon[‡], Sojung Lee[‡], Sukyung Hong, Alice Nguvoko Kiyonga, Jong-Jae Yi, Kiwon Jung, and Woo Sung Son*

College of pharmacy and Institute of Pharmaceutical Sciences, CHA University, 120 Haeyong-ro, Pocheon-si, Gyeonggi-do 11160, Republic of Korea

Received Dec 08, 2019; Revised Dec 16, 2019; Accepted Dec 17, 2019

Abstract Black ginger (*Kaempferia parviflora*) is a short-lived ginger plant with dark purple colored root and is known to be effective in treating diabetes and obesity. To find out the difference in the characteristics of the black ginger according to the variety of production, 1D proton NMR experiments were performed on 4 types of black gingers from different regions. The NMR spectra of all black ginger showed the characteristic peaks of the polymethoxy flavone compounds, and the chemical shifts and intensity of peaks showed slight differences depending of the type of black ginger implying the difference in molecular environment. These initial NMR experiments can be applied to the identification of the diversity of black ginger in physiological function according to the climate of regions using SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotope Fractionation studied by NMR).

Keywords Black ginger, NMR, polymethoxy flavone, SNIF-NMR

서문

흑생강은 태국, 베트남, 라오스 등에서 주로

재배되고 짙은 보라색의 뿌리를 가지는 생강류 식물이다. 최근 흑생강의 비만, 당뇨, 대사질환 등에 대한 치료효과가 보고되고 있으며, 흑생강에 포함된 polymethoxy flavone 성분이 효능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁴ 흑생강과 같은 천연물 자원은 다양한 원산지에서 재배되고, 각 산지의 기후 등 환경 변화에 따라 성장과 효능 등의 성질이 달라질 수 있다. 이러한 환경 변화에 따른 천연물 자원의 기능 및 구성 성분 변화의 관계를 분자 수준에서 규명하는 방법으로 SNIF-NMR이 널리 사용되고 있다.⁵⁻⁹ 이 방법은 동일한 종류의 천연물에 대하여 지역의 온도 차이 등 기후 변화에 따라서 주요 성분의 수소와 중수소의 비율이 달라지게 되는 현상을 이용하는 것이다. SNIF-NMR을 활용하면 지역에 따라서 생산되는 와인 등의 식품과 천연물의 중수소 비율이 달라지는 현상에 기반하여 정확한 원산지 감별이나 불순물 함유 여부 등을 확인할 수 있다.⁵⁻⁹ 서로 다른 4 종류의 흑생강에 대하여 1D $^1\text{H-NMR}$ 실험을 수행하고 각각의 스펙트럼을 비교 분석하여, 주요 성분을 예측하고 SNIF-NMR 실험

* Address correspondence to: **Woo Sung Son**, College of Pharmacy and Institute of Pharmaceutical Sciences, CHA University, 120 Haeryong-ro, Pocheon-si, Gyeonggi-do 11160, Republic of Korea, Tel: +82-31-850-9398; Fax: +82-31-850-9398; E-mail: wson@cha.ac.kr

‡ These authors contributed equally.

분석을 위한 기초 정보를 얻고자 하였다.

실험방법

흑생강 시료 추출 및 준비- 4 종류의 흑생강을 알코올 계열의 용매로 추출하고, 최종 분획을 HPLC 장치와 hydrophobic chromatography 방법을 이용하여 확보하였다. 국내산 흑생강 1은 50% 에탄올 용매를 사용하였고, 국내산 흑생강 2는 80% 메탄올을 사용하였으며, 제주산 흑생강은 50% 에탄올을 용매로 사용하였고, 태국산 흑생강은 50% 에탄올을 용매로 사용하여 추출하였다. NMR 용매는 CHCl₃과 CDCl₃을 사용하였다.

NMR 시료- 흑생강 100 mg을 저울에 정확히 측정하고, 바이알에 넣은 후 클로로포름에 녹였다. 녹지 않는 경우 감압증류기를 사용하여 클로로포름을 제거하고, 메탄올, DMSO 등의 용매를 사용하여 균질한 상태의 액체 상태를 조성하였다. 침전물은 거름종이를 사용하여 제거하였다. 감압증류기를 사용하여 용매를 제거한 시료를 저울을 사용하여 50 mg을 칭량하고 NMR 측정을 위한 용매를 가한 후 균질하게 녹였다.

NMR 측정- NMR 측정을 위하여 4 종류의 흑생강 시료를 각각의 NMR cell에 넣고 25°C에서 1D ¹H-NMR 측정을 수행하였다. 모든 NMR 스펙트럼은 JEOL 500 MHz 핵자기공명분광계를 이용하여 획득하였고, Mestrelab MNova NMR 분석 소프트웨어로 분석하였다(<https://mestrelab.com/>).

실험결과

국내산 흑생강 1은 어두운 갈색의 중간 크기의 과립 상태로 진한 한약 냄새를 나타냈다. 또한 국내산 흑생강 2는 중간 크기 과립의 검정색 고체 가루로 달콤한 냄새를 나타냈다. 제주산 흑생강은 황토색의

분말형태로 진한 한약냄새를 나타냈으며, 태국산 흑생강은 검정색 중간크기의 과립형태로 한약냄새를 나타냈다.

측정된 1D ¹H-NMR 스펙트럼에서 태국 산을 제외한 모든 시료에서 같은 frequency에 같은 splitting을 보이는 peak들이 관측되었으며, 관측된 peak의 유형은 tetramethoxy flavone의 스펙트럼과 유사하게 나타났다 (Figure 1).¹⁰

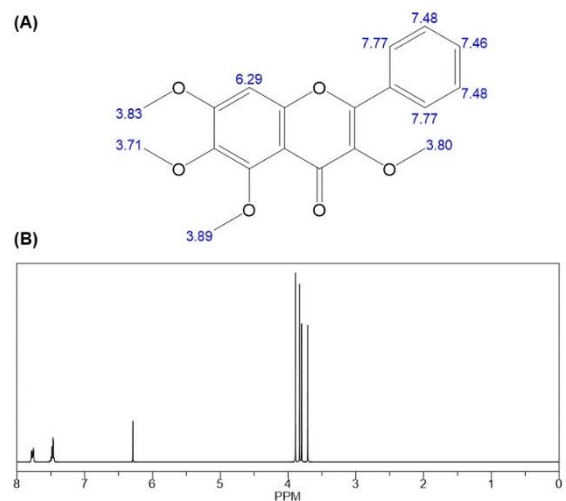


Figure 1. Structure of 3,5,6,7-tetramethoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (A) and predicted 1D ¹H NMR spectrum (B) from Mestrelab MNova NMR.

태국산 흑생강의 경우 3.47 ppm의 화학이동값(chemical shift) 부근에서 다른 시료에 비하여 강한 강도의 peak 들이 관측이 되었다. 국내산 3종류의 흑생강은 모두 유사한 화학이동값과 peak 강도를 나타냈다. 각각의 NMR 스펙트럼에서 polymethoxy flavone 이외에 불순물과 잔류 성분으로부터 유래하는 낮은 강도의 peak들이 관측되었다.

1D ¹H-NMR 측정을 통해 얻은 스펙트럼으로부터 주성분으로 tetramethoxy flavone이 있는 것으로 예측되며, 이는 3.5 ppm과 4 ppm 사이의 화학이동값에서 methoxy 작용기의 peak들 관측되기 때문이다. 또한, chromone 골격에 있는 methoxy

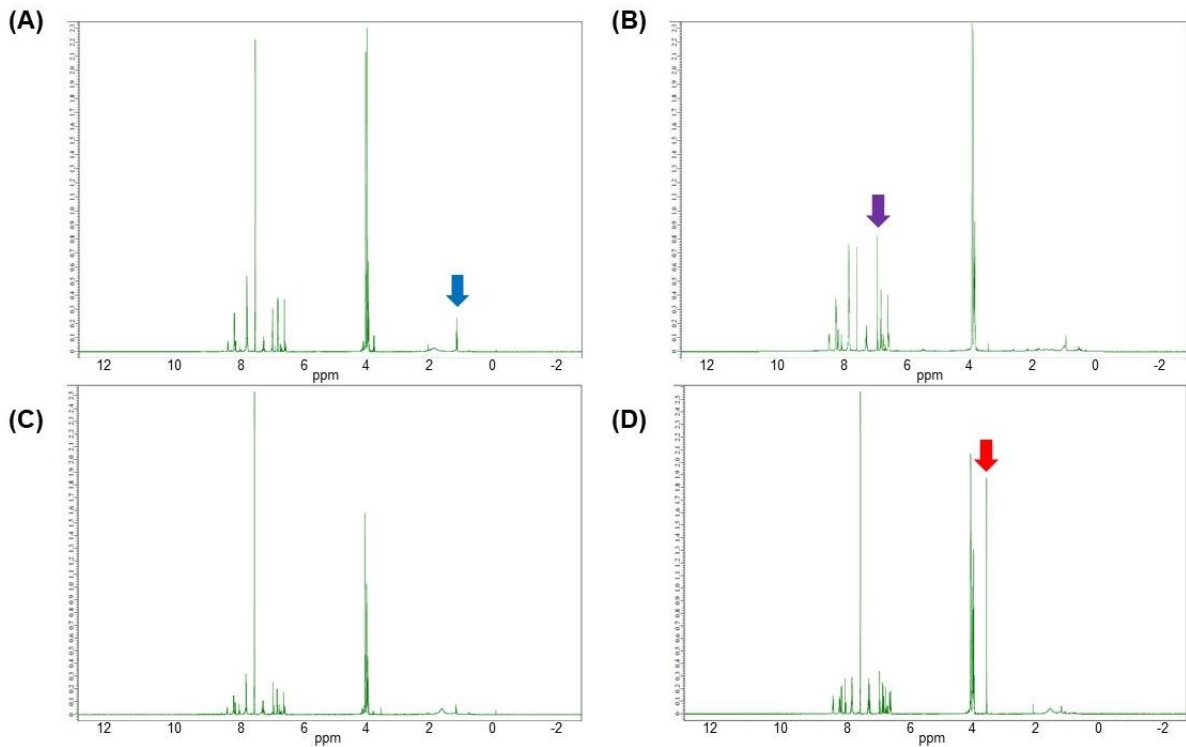


Figure 2. 1D ¹H NMR spectra of 4 types of black ginger. (A) Korean black ginger 1, (B) Korean black ginger 2, (C) Jeju black ginger, (D) Thai black ginger.

group은 phenyl group에 있는 methoxy group보다 더 큰 화학이동값을 나타낸다. 그림 1에서 예측된 tetramethoxy flavone의 수소 화학이동값에 해당하는 peak들을 4종류의 흑생강 시료로 측정한 NMR 스펙트럼에서 모두 관측이 되었다(Figure 2). 또한 tetramethoxy flavone이 가지고 있지 않은 수소의 peak도 검출되었는데 이 peak들은 모양과 크기가 모든 샘플에서 일치했다. 앞서 기술한 바와 같이, 태국산 흑생강 스펙트럼에서 3.47 ppm (빨간색 화살표) 부근에서 강한 강도의 peak가 관측이 되고 나머지 3종류의 시료에서는 상대적으로 낮은 강도의 peak들이 관측이 되었다. 이와 유사하게 국내산 흑생강 1은 1.23 ppm에서 (파란색 화살표), 국내산 흑생강 2는 7.48 ppm에서(보라색 화살표) 강한 강도의 peak가 관측되었다. 제주산 흑생강의 경우에는 대부분

약한 강도의 peak가 관측되었다.

고찰

4가지 종류의 흑생강을 1D ¹H-NMR로 측정한 결과 모든 시료에서 tetramethoxy flavone 화합물의 peak 유형이 관측되었고, 시료의 원산지에 따라서 특정한 화학이동값에서 peak의 강도의 차이가 뚜렷하게 관측되었다. 이와 같은 peak 들은 중수소 원자와 PCA (principle component analysis) 등을 활용한 SNIF-NMR 분석의 기준 자료로 활용이 가능할 것이다. 이상의 결과를 고려할 때, 흑생강 시료에 대한 SNIF-NMR 분석을 수행할 경우 methoxy 작용기를 중수소/수소 비율의 관측 대상으로 활용할 수 있을 것이다. 또한, 폐놀 골격에는

S-Adenosyl-L-Methionine (SAM)가 주로 methoxy 작용기를 도입한다(Figure 3).

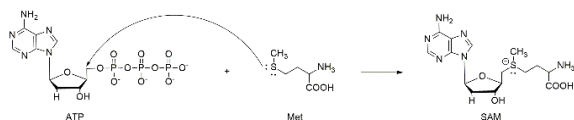


Figure 3. Biosynthesis of SAM. Sulfur of methionine attacks the carbon attached to the adenosine phosphate group to form SAM.

SAM은 ATP와 메티오닌으로부터 만들어 지는데, 흑생강을 SNIF-NMR 분석법으로 스펙트럼을 얻을 경우 측정할 중수소/수소 비율은 황과 결합하고 있는 메틸 작용기가 관측 대상이 될 것이다.

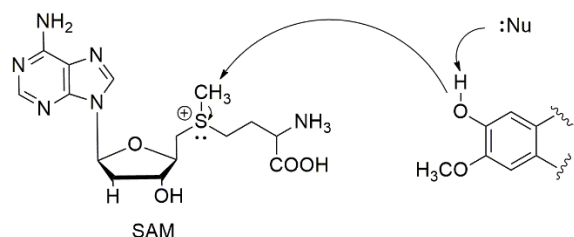


Figure 4. Mechanism for transferring methyl groups to hydroxyl groups by coenzyme SAM.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2017R1D1A1B03030723). This study also partly supported by the GRRC program of Gyeonggi province (GRRC-CHA2017-A01, Discovery and Analysis of Regional Specialized Resources and Operation of Regional Research Service Center).

References

1. K. Toda, S. Hito, S. Takeda, and H. Shimoda, *Heliyon* **2**, e00115 (2016)
2. Y. Ban, M. Baik, Y. Hahm, H. Kim, and B. Kim, *Food Eng. Prog.* **14**, 112 (2010)
3. K. Youn, J. Lee, C.-T. Ho, and M. Jun, *J. Funct. Foods* **20**, 567 (2016)
4. K. Toda, S. Takeda, S. Hito, S. Nakamura, H. Matsuda, and H. Shimoda, *J. Nat. Med.* **70**, 163 (2016)
5. M. L. Martin and G. J. Martin, Deuterium NMR in the study of site-specific natural isotope fractionation (SNIF-NMR), in "Deuterium and shift calculation", Springer, 1990

Methyl transferase에서 SAM이 methyl group을 전달할 때의 과정을 고려하면, 메티오닌의 마지막 메틸기가 polymethoxy flavone의 최종 메틸 작용기의 상태를 결정하는 요인이 될 것이다(Figure 4). 기후 변화 등 주변 환경으로부터 서로 다른 상태의 메티오닌 아미노산의 양분으로 흑생강이 성장할 것이므로 methoxy 작용기는 SNIF-NMR 측정 대상으로 적합하다고 볼 수 있다. 또한, 흑생강에 존재하는 polymethoxy flavone의 다른 작용기를 SNIF-NMR에 활용하기 위해서는 흑생강의 polymethoxy flavone에 대한 biosynthesis 과정에 대한 추가적인 정보가 필요할 것이다.

결론

흑생강에는 여러 가지 화합물이 있는데 그 중에서 polymethoxy flavone 이 주요한 화합물로 생각된다. 1D ¹H-NMR 서로 다른 원산지의 흑생강이 특징적인 화학이동값의 NMR peak 를 활용하여 SNIF-NMR 분석에 적용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

6. N. Ogrinc, I. J. Košir, M. Kocjančič, and J. Kidrič, *J. Agr. Food Chem.* **49**, 1432 (2001)
7. I. J. Košir, M. Kocjančič, N. Ogrinc, and J. Kidrič, *J. Analytica. Chimica. Acta* **429**, 195 (2001)
8. J.-M. Ha, Y. M. Woo, and A. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **22**, 82 (2018)
9. T. Sugiki and Y.-H. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **22**, 76 (2018)
10. R. Sultana, R. Hossain, A. Miah, and A. Islam, *Orient. J. Chem.* **22**, 77 (2006)