

## 충치균에 대한 생리활성 생약성분의 분리 및 약효평가(2) 호장근의 항균성분과 안전성에 대하여

배기환 · 김봉희 · 명평근 · 정경수 · 백정화

충남대학교 약학대학

(Received July 2, 1990)

### The Isolation and Evaluation of Bioactive Components from Crude Drugs Against a Cariogenic Bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176 (2)

An Antibacterial Component of *Polygoni Radix* and Its Safety

Ki Hwan Bae, Bong Hee Kim, Pyung Keun Myung, Kyeong Soo Chung  
and Jung Hwa Baek

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 302-764, Korea

**Abstract**—The isolation and identification of an antibacterial component, from *Polygoni Radix* against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176, were carried out for development of anticariogenic agents. The bioactive component was identified to be emodin. The minimal inhibitory concentration (MIC) of emodin was 100  $\mu\text{g/ml}$  against *S. mutans* OMZ 176.

The bioactive component emodin weakly inhibited  $\beta$ -lactamase activity with the inhibition ratio of 1.7, 4.3 and 7.6% at the concentration of 50, 100, and 200  $\mu\text{M}$ , respectively. Emodin exhibited slight phototoxicity when analysed by the photohemolysis method.

**Keywords** □ Emodin, *Polygoni radix*, *Streptococcus mutans* OMZ 176,  $\beta$ -lactamase activity, photohemolysis

충치(dental caries)는 구강내의 여러 세균 중 특히 구강연쇄구균(*Streptococcus mutans*, 이하 충치균이라 한다)에 의해 발생한다고 보고되어 있다.<sup>2,3)</sup> 지금까지 충치에 관한 연구가 많이 보고되어 왔으나, 대부분 충치형성에 관한 연구이고 충치치료제의 개발에 관한 것은 적다. 저자들은 비교적 독성이 적고 충치균에 대한 항균력이 우수한 물질을 개발하기 위하여 55종의 식물을 선정, 충치균에 대한 항균력을 조사하여 수종의 생약에서 유의한 결과를 얻었다.<sup>4)</sup> 이미 보고한 바와 같이<sup>1)</sup> 저자들은 가로수로서 각지에 재식되고 있는 튜립나무(*Liriodendron tulipifera* K. Koch)의 잎에서 충치균 *Streptococcus mutans* OMZ 176에 대한 항균성분으로  $\beta$ -liriodenolide를 단리하였다. 이 물질은 튜립나무의 잎에서는 처음으로 단리된 것으로, 항균력은

erythromycin이나 lincomycin 등의 기존 항생제에 비교하여 약했지만(MIC, 100  $\mu\text{g/ml}$ ), 식물성분에서 유래한 물질로 항균력이 우수하다고 알려진 berberine과 거의 같은 항균력을 나타냈다. 그리고  $\beta$ -lactamase에 대한 저해효과를 측정해본 결과 50, 100 및 200  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 각각 0.7, 3.5 및 19.7%의 저해효과를 나타내어, 식물성분으로부터도  $\beta$ -lactamase의 저해제를 개발할 수 있는 가능성을 시사하였다. 한편, 적혈구용혈 시험에 의한  $\beta$ -liriodenolide의 안전성을 조사한 결과 광독성이 없는 것으로 판명되었다.

본 연구에서는 호장근(*Polygoni Radix*)의 뿌리에서 충치균 *S. mutans* OMZ 176에 대한 항균성분을 단리, 화학구조를 동정하였다. 그리고  $\beta$ -lactamase에 대한 저해효과를 조사하고, 적혈구용혈

시험에 의한 안전성을 검토하였다.

**실험방법**

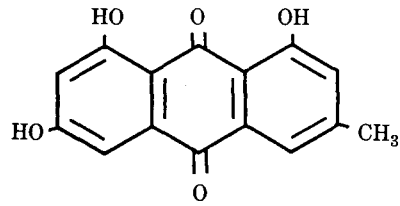
**생약재료**—호장근 (*Polygoni Radix*)은 1987년 6월 대전시내의 중도한약방에서 구입하였다.

**시약**—Cephaloridine(Sigma), Penicillinase (*Enterobacter cloacae* type 3, Sigma), Brain heart infusion(BHI, BBL), Nutrient agar (Acumedia), Mueller hinton broth(Acumedia), Magnolol (*Magnolia obovata* Thunb.의 수피에서 분리), Erythromycin(Sigma).

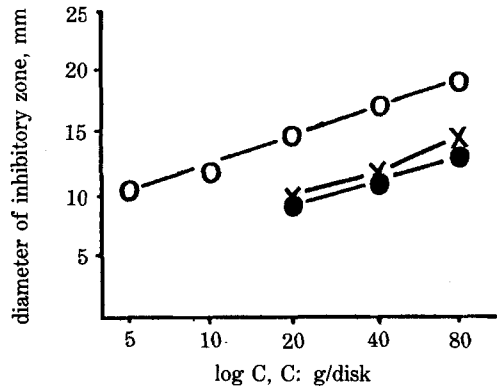
**기기**—IR spectrophotometer(Perkin Elmer model 783), NMR(Varian EM 360A), Digital grating spectrometer. 393(Cesil), UV lamp ENF-24(Spectronic), Melting point apparatus (Electrothermal).

**항균성분의 분리**—호장근 600g을 메타놀로 가운, 환류시키면서 3시간 추출, 여과, 여액을 감압농축, 메타놀 엑스를 얻고, 이것을 증류수 200 ml에 현탁, EtOAc, *n*-BuOH 순으로 분획, 각 분획물을 disk plate 법에 의거 항균력을 측정하였다. 이 때 100 µg/disk의 농도로 실험하였는데, EtOAc 분획에만 항균력이 관찰되었다. EtOAc 분획을 *n*-hexane으로 용해시켜 가용분획과 불용분획으로 나누어 항균력을 측정한 결과 불용분획에서 항균력이 나타났다. 이 항균성 분획을 ether로, ether 가용분획과 불용분획으로 분리, 항균실험을 한 결과 양분획 모두 항균력이 있었다. Ether 가용분획(2.5 g)을 silica gel column에 걸어 benzene-CHCl<sub>3</sub> (1 : 1), benzene-CHCl<sub>3</sub> (50 : 1), CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100 : 1), CHCl<sub>3</sub>-MeOH(5 : 1)로 용리, 각 분획을 항균실험한 결과 benzene-CHCl<sub>3</sub> (50 : 1)의 분획에서 항균력이 있었다. 이 분획을 농축, 조결정을 얻었다. 조결정을 다시 silica gel column에 걸어 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(100 : 1)로 용리하여, 농축, MeOH에서 재결정, 적색침상결정 comp. 1(mp. 254~5°C)을 얻었다(Scheme 1).

**항균실험**—항균실험은 Namba 등의 방법<sup>5)</sup>에 따라 항균실험은 disk plate method와 minimal inhibitory concentration(MIC)에 의해 측정하였다.



**Fig. 1**—Emodin isolated from *Polygoni Radix* as an anti-bacterial component against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176.



**Fig. 2**—Inhibitory zones against added amounts of emodin, β-liriodenolide and magnolol.

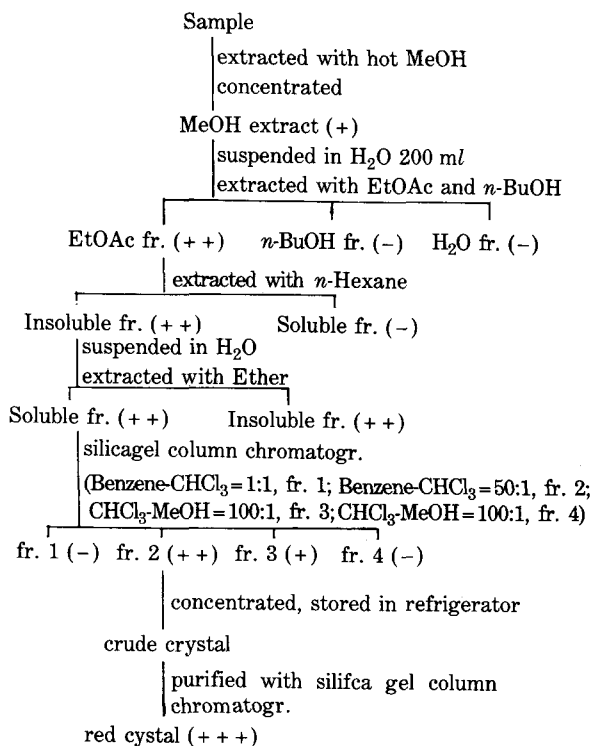
According to paper disk method, the disks (8 mm in diameter, 1.5 mm in thickness) containing various amounts of antibacterial agents were placed on Petri dishes which have been seeded with *Streptococcus mutans* OMZ 176. The incubation was then carried out 37° for 15 hours. Diameter of inhibitory zones was measured in different four directions by using a transparent scale.

●: Emodin, ×: β-Liriodenolide, ○: Magnolol

**β-lactamase에 대한 저해효과 및 적혈구용혈에 의한 안전성 실험**—전보<sup>1)</sup>에서 보고한 바와 같이, β-lactamase에 대한 저해효과 실험은 O'Callaghan 등의 방법<sup>6)</sup>에 준하였고, 적혈구용혈에 의한 안전성 실험은 Kahn 등의 방법<sup>7)</sup>에 따랐다.

**결과 및 고찰**

**항균성분의 분리 및 동정**—Fig.1에서와 같이 분리한 항균성분을 chloroform : ethylacetate (2 : 1) 혼액에서 2차례 재결정한 후 감압진조시켜, mp. 254~255°C인 적색의 침상결정을 얻었다. 이 물질



**Scheme 1** Fractionation process monitored with antibacterial activity against *Streptococcus mutans* OMZ 176.

The antibacterial activity was examined with paper disk method and each sample was prepared in 100 μg per a disk. The activity was represented as follow: No inhibitory zone was formed by adding 100 μg/disk, +: Inhibitory zone of 9-11 mm in diameter was formed, ++: 11-13 mm in diameter, +++: 13-15 mm in diameter.

은 Borträger 반응에 양성을 나타냈다.

IR 스펙트럼에서, 3400 cm<sup>-1</sup>의 free OH 를, 1630 cm<sup>-1</sup>에서 quinoline aromatic ring 의 CO 를 그리고 1470 cm<sup>-1</sup>에서 aromatic C=C 의 stretching vibration 을 확인할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 (Fig. 2)에서, 2.47 ppm 에서 3 개의 proton 이 singlet 로, 6.66 ppm 과 7.25 ppm 에서 각각 1 개의 proton 이 doublet 로 meta coupling (J=2.5 Hz) 을 하고 있으며, 7.15 ppm 과 7.57 ppm 에서 각각 1 개의 proton 이 broad singlet 로 나타났다. 이상의 물리화학적 성상은 emodin 의 data 와 일치하였고, <sup>8,9</sup> emodin 과의 혼용시험결과 융점강하가 없었

**Table I**—Minimal inhibitory concentration (MIC) of emodin, β-liriodenolide and magnolol against *Streptococcus mutans* OMZ 176

Compounds	MIC (μg/ml)
Emodin	100.0
β-Liriodenolide	100.0
Magnolol	6.3

Incubated for 15 hours at 37° in BHI liquid medium

으므로 이 물질은 emodin 으로 동정하였다 (Fig. 1).

**항균작용**—Scheme 1에서와 같이 분리한 emodin 의 항균력을 disk plate method 에 의해 측정 한 결과, 5 와 10 μg/disk 의 농도에서는 항균력이 없었고 20 과 40 μg/disk 에서, 각각 9.5 및 12.5 mm 의 inhibitory zone 을 나타냈으며, emodin 의 최소저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)는 100 μg/ml 였다 (Table I). 이러한 항균력은 전보<sup>1)</sup>에서 보고한 바와 같이 튜립나무의 항균 성분인 β-liriodenolide 와 거의 같은 값이었으나, 일본후박에서 단리한 magnolol<sup>2)</sup>의 항균력에는 미치지 못했다 (Fig. 2, Table I).

본 연구에서 분리한 emodin 의 항균성과 Kubo 등<sup>10)</sup>이 일본산 호장근 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.의 뿌리)에서 stilbene 계 물질인 resveratrol 을 단리, 수종의 진균류에 대한 항균력을 보고하였는데, 이와 같은 사실로부터 호장근이 옛부터 무좀, 방광염, 뇨도염 등의 치료에 사용되어 온 이유를 확인할 수 있었다.

**β-lactamase 에 대한 영향**—병원미생물의 베타 락탐항생제에 대한 내성은 이들이 생산하는 β-lactamase 에 의하여 가수분해되므로서 일어난다고 알려져 있다.<sup>11,12)</sup> 지금까지 β-lactamase 의 저해제로 알려진 것들은 공통적으로 베타 락탐환을 가지고 있는 것이 특징이다. 그러나, macrolide 계에 속하는 izumenolide<sup>13)</sup>는 베타 락탐환이 없는데도 불구하고 β-lactamase 에 대한 저해작용이 있다고 밝혀진 이래, 역시 화학구조 중에 베타 락탐환이 없는 panosialin 이나 sodium dodecyl sulfate<sup>14)</sup>도 β-lactamase 에 대한 저해작용이 있다고 보고되어 있다.

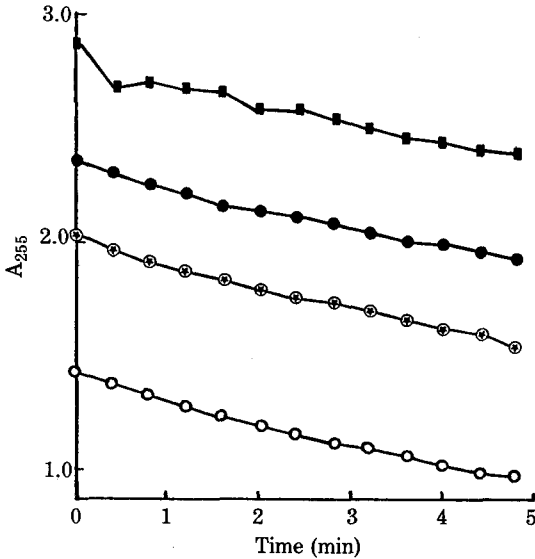


Fig. 3—Time course for the inhibition of *Enterobacter cloacae* Type III penicillinase by emodin.  
○ : no inhibitor, ● : with 50 μM emodin, ● : with 100 μM emodin, ■ : with 200 μM emodin.

Table II—Initial rates of cephaloridine hydrolysis with several concentrations of emodin

Cephaloridine conc. (mM)	Emodin conc. (μM)	Rate (μM/min)	r
0.1	0	0.118	1.000
0.1	50	0.116	0.998
0.1	100	0.113	0.985
0.1	200	0.109	0.694

r: correlation factor

전보<sup>1)</sup>에서 저자들에 의해 충치균에 대한 항균성분으로 튜립나무에서 단리한 β-liriodenolide도 베타락탐환이 없는 물질이나 β-lactamase에 대한 저해작용이 있었다. β-lactamase에 대한 emodin의 저해작용을 알아보기 위하여 *Enterobacter cloacae* type 3에서 분리한 β-lactamase (Sigma)에 대하여 cephaloridine을 대조로 실험한 결과(Fig. 3, Table II), 50, 100 및 200 μM emodin은 1.7, 4.3 및 7.6%의 활성감소를 나타냈다. 그러므로 식물성분으로부터도 β-lactamase 저해제의 개발 가능성이 있다고 생각된다.

적혈구용혈 시험에 의한 안정성—일반적으로 광에 예민한 화합물이 함유되어 있는 적혈구에 290~370

Table III—Photosensitizing activities of emodin and β-liriodenolide by photohemolysis

Compounds	Concentrations (μg/ml)	Hemolysis (%)
Emodin	25	27
β-Liriodenolide	25	3

nm의 UV를 조사하면 용혈현상이 일어난다. 이때, 용혈의 정도는 적혈구막에 대한 화합물의 파괴효과와 비례하여 결정된다. Kahn 등의 방법<sup>7)</sup>에 의거 emodin의 용혈현상에 대하여 검토한 결과(Table III), 25 μg/ml의 emodin은 27%의 용혈현상을 보였다. 그러므로, emodin은 광독성물질로 생각되며 Kahn 등<sup>7)</sup>의 보고에서 anthraquinone 유도체들 중 상당수가 광독성이 있다고 지적한 사실과 일치한다.

### 결 론

1. 호장근 (Polygoni Radix)으로부터 충치균 (*Streptococcus mutans* OMZ 176)에 대한 항균성분을 단리, emodin으로 동정하였다.
2. emodin의 최소저지농도(MIC)는 100 μg/ml로 튜립나무의 항균성분인 β-liriodenolide의 값과 같았다.
3. emodin의 β-lactamase에 대한 저해효과를 시험한 결과, 경미한 저해효과가 있었다.
4. 적혈구용혈 시험에 의한 emodin의 안전성을 검토한 결과, 적혈구용혈 현상을 나타내어 광독성물질로 판정되었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1988년도 문교부 학술조성비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드린다. 또한, 귀중한 표준품 emodin을 보내주신 지형준 교수님께 감사드린다.

### 문 헌

- 1) 제 1보, 배기환, 김봉희, 명평근, 변재화: 충치균에 대한 생리활성 생약성분의 분리 및 약효평가(1), 튜

- 립나무 잎의 항균성성분과 안전성에 대하여, 약학회지, **34**(2), 106(1990).
- 2) Inoue, M. and Koga, T.: Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*, *Infect. Immunity*, **25**, 922 (1979).
  - 3) Houte, J. van: Bacterial specificity in the etiology of dental caries, *Int. Den. J.*, **30**, 305 (1980).
  - 4) Bae, K. and Byun, J.: Screening of leaves of higher plants for antibacterial action, *Kor. J. of Pharmacogn.*, **18**(1), 1 (1987).
  - 5) Namba, T., Tsunozuka, M. and Hattori, M.: Dental caries prevention by traditional Chinese medicines (2). Potent antibacterial action of magnoliae Cortex extracts against *Streptococcus mutans*, *Planta Medica*, **44**, 100 (1982).
  - 6) O'Callaghan, C.H., Muggleton, P.W. and Ross, G.W.: "Antimicrobial agents and chemotherapy", ed. by G. Hobby, Am. Soc. Microbiol., 1968, p. 57.
  - 7) Kahn, G. and Floischaker, B.: Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds, *J. Invest. Dermatol.*, **56**, 85 (1971).
  - 8) Chi, H.J., Choi, J.R. and Yu, S.C.: Pharmacognostical studies on Hojang (3), *Kor. J. Pharmacogn.*, **13**(4), 145 (1982).
  - 9) Steglich, W. and Loesel, W.: Bestimmung der Stellung von O-Substituenten bei 1,8-dihydroxy-anthra-chinon-derivaten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, *Tetrahedron*, **25**, 4391 (1969).
  - 10) Kubo, M., Kimura, Y., Shin, H., Haneda, T., Tani, T. and Namba, K.: Studies on the antifungal substance of crude drug (II), On the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc., *Shoyakugaku Zasshi*, **35**(1), 58 (1981).
  - 11) Abraham, E.P. and Chan, E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature*, **146**, 837 (1940).
  - 12) Citri, N. and Pollock, M.R.: The biochemistry and function of  $\beta$ -lactamase, *Adv. Enzymol.*, **28**, 237 (1966).
  - 13) Liu, W., Ashe, G., Mittis Jr., J.S., Truo, W.H., Principe, P.A., Raihunum, M.I., Parker, W.L., Kocy, O.R. and Sykes, R.B.: A novel  $\beta$ -lactamase inhibitor produced by *Micromonospora*, *J. Antibiotics* (Tokyo), **33**, 1256 (1980).
  - 14) Bush, K., Freudenberger, J. and Sykes, R.B.: Inhibition of *Escherichia coli* TEM-2  $\beta$ -lactamase by the sulfated compounds, izumenolide, panosialin and sodium dodecyl sulfate, *J. Antibiotics* (Tokyo), **33**, 1560 (1980).