

관중의 항균성물질 분리 및 충치균에 대한 항균력 평가

도동선 · 민병선 · 배기환*

충남대학교 약학대학

(Received May 7, 1996)

Isolation of the Antibacterial Constituents from Crassirhizomae Rhizoma and Evaluation of Activity

Dong Sun Do, Byung Sun Min and Ki Hwan Bae*

College of Pharmacy, Chungnam National Univ., Taejon 305-764, Korea

Abstract—Two constituents were isolated as the antibacterial principles from the methanolic extract of Crassirhizomae Rhizoma against *Streptococcus mutans* OMZ176 which is known to be a strong cariogenic bacterium. They were identified as flavaspidic acid PB and flavaspidic acid AB by means of physicochemical methods. They exhibited strong antibacterial activity and the minimal inhibitory concentration (MIC) value was 6.3 µg/ml

Keywords □ Crassirhizomae Rhizoma, *Dryopteris crassirhizoma*, *Streptococcus mutans* OMZ176, antibacterial activity, MIC, flavaspidic acid PB and flavaspidic acid AB.

충치예방 및 치료약을 개발할 목적으로 수종의 생약을 메탄올로 추출하여 메탄올엑스를 만들고 *in vitro*에서 충치균의 하나인 *Streptococcus mutans* OMZ176에 대하여 스크리닝한 결과, 관중 (Crassirhizomae Rhizoma)이 항균활성을 보였다. 그러므로, 그 작용물질을 분리, 화학구조를 규명하고 항균력을 평가하고자 본 실험에 착수했다. 관중은 면마과 (Aspidiaceae)에 속하는 관중 (*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)의 뿌리줄기를 건조한 것으로 옛날 부터 촌충구제제로 널리 쓰여 왔다.¹⁾ 주성분으로는 dryocrassin, albaspidin, aspidin, flavaspidic acid류, aspidinol, filic acid, filicinic acid 등이 보고 되어있으며, 구충작용이 가장 강한 것은 albaspidin과 aspidin으로 알려져 있다.¹⁻²⁾ 본 연구에서는 관중을 95% 메탄올로 추출하여 얻은 추출물에 대해 용매분획과 항균시험을 병행하여 항균활성 물질을 분리하고 화학구조를 동정하였으며, *in vitro*시

험으로 항균력을 평가하여 그 결과를 보고한다.

실험재료 및 방법

실험재료, 시약 및 기기 - 1993년 5월, 대전시내의 중도한약방에서 구입하였고, 시약은 column chromatography용 silicagel (Kieselgel 60, 70~230 mesh ASTM, Merk Art 7734)과 Kieselgel 60 (230~400 mesh ASTM, Merk Art 9385), TLC용 plate (precoated TLC plate, silica 60 F₂₅₄, Merk), magnolol (*Magnolia obovata* Thunb. 의 수피에서 분리), 배지는 Muller-Hinton Agar (Difco), Muller Hinton Broth (Difco)을, 기타 시약 및 용매류는 국내외의 일급 또는 특급을 사용 하였다. 기기는 Melting point apparatus (Electrothermal 9100, Germany), UV/Visible Spectrophotometer PU 8800 (Pye Unicam, UK), Infrared Spectrophotometer IR Report-100 (JASCO., Japan), NMR-Spectrophotometer JNM-EX90 (JEOL,

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5925 (팩스) 042-821-5903

Japan)를 사용하였다.

항균활성 물질의 분리와 구조규명 - 관중 1 kg을 분쇄하여 95% 메탄올 3리터로 수욕상에서 환류시키면서 3시간씩 3회 추출하여 온시에 여과, 감압농축하여 메탄올엑스(150 g)를 얻었다. 메탄올엑스를 증류수 1리터에 현탁시킨 후 핵산, 에텔, 에틸아세테이트, 부탄올의 순으로 분획하여 각각 40, 37, 8, 19 g을 얻고, 남은 수층을 농축하여 물분획물 46 g을 얻었다. 이들 분획물을 disk plate method²⁾에 의해 증치균에 대하여 실험하고 항균성을 나타내는 분획물을 실리카젤 컬럼으로 항균활성 물질을 분리했다. 에틸아세테이트엑스(37 g)을 핵산-아세톤(10 : 1~1 : 5)으로 실리카젤 컬럼크로마토그래피하여 분획물을 얻고 항균활성실험을 하였다. 항균활성을 보이는 분획물을 다시 실리카젤 컬럼크로마토그래프에 걸어 핵산-아세톤(3 : 2)로 용출시켜, 최종의 항균활성물질을 분리하였다. 이들 물질은 mp와 UV, IR, NMR, MS 스펙트럼에 의하여 규명하였다.

사용균주와 배양 - 실험에 사용된 균주는 본실험실의 냉장고에 보존중인 *Streptococcus mutans* OMZ 176을 사용하였다. 본 균주는 Muller Hinton Agar slant에 이식하여 2번 활성화 시킨후, 미리 멸균한 Muller Hinton Broth에 접종하여 37°C 항온실에서 16시간동안 진탕배양했다.

Disk plate method에 의한 항균력 실험 - Namba 등의 보고³⁾에 의하였다. 즉, 시료는 실험하기 바로전에 소량의 메탄올 또는 DMSO로 녹인후 마이크로피펫로 일정농도의 시료를 디스크에 함입시켰다. 배양균액을 550 nm에서 10%의 투과도가 되도록 멸균된 Muller Hinton broth로 희석하여 희석균액을 만들고 이 희석균액을 미리 멸균하여 45°C로 유지시킨 Muller Hinton Agar에 1%로 접종하여 seed layer액을 준비한다. 이 seed layer액을 미리 갈아둔 두께 약 4 mm 정도의 basal layer위에 seed layer를 4 mm 두께가 되도록 부은후 상온에서 응고시켜 균 plate를 제조한다. 균 plate 응고표면에 일정농도의 시료가 함입된 disk를 올려 놓고 37°C에서 16시간 배양시킨뒤 억제된 직경을 0.1 mm까지 측정하였다.

최소 발육저지 농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 측정 - Namba 등의 보고³⁾에 의하였다. 먼저 550 nm에서 *S. mutans*의 투과도에 의한 세포수를 알아 보기위해 colony를 세었다. Muller

Hinton Broth 배지에서 37°C, 16시간 진탕 배양된 세균을 glass homogenizer로 균질하게 한 뒤에 멸균된 Muller Hinton broth로 20%의 투과도가 되도록 희석시킨다. 이 균액을 10^{-7} 까지 1/10씩 희석하면서 basal layer가 준비된 Petri dish에 미리 멸균하여 50°C로 유지시킨 Muller Hinton Agar 9.9 ml와 9.0 ml을 채운 cap tube에 희석된 균액 0.1 ml와 1 ml씩을 넣고 균일하게 현탁시키고 멸균된 plate에 도말한 후 37°C에서 16시간 배양하여 형성된 colony수를 센다. 이상의 결과로 20%의 투과도에서는 약 10^8 colony forming unit/ml의 결과를 얻었다. 실험에 사용된 물질들은 최소량의 메탄올에 녹여 Muller Hinton broth로 배수로 희석하였고 각 희석액과 균액을 혼합하여 총 5 ml가 되게 하였다. 이때 희석방법은 먼저 검색할 물질을 4.5 ml로 유지하면서 배수희석법으로 희석후, 20%의 투과도가 되도록 균액을 100배 희석한 뒤, 0.5 ml를 가하여 5 ml를 만들고 희석균액이 약 10^5 colony forming unit/ml가 되도록 조정한다. 각 sample의 최고 시험농도는 100 µg/ml를 사용하였고, 37°C에서 16시간 배양 시킨뒤 증식이 억제된 최소농도를 육안으로 확인하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리, 구조규명 - 핵산, 에텔, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물분획물을 *S. mutans* OMZ 176에 대한 항균성을 실험한 결과, 에텔분획물에서 나타내는 항균활성을 보였다. 본 분획물(37 g)을 실리카젤 컬럼에 걸어 핵산-아세톤의 혼합용매(10 : 1~1 : 5)로 분획하여 Fr. 1에서 Fr. 8까지를 얻었다. 이들 8개 분획으로 항균실험을 한 결과 Fr. 5와 6에서 항균력이 관찰되었으므로, Fr. 5와 6을 합쳐 다시 실리카젤 컬럼에 걸어 핵산-아세톤(3 : 2)의 혼합용매로 분리, 항균성을 보이는 분획을 모아 감압농축시켜 조절정들을 얻고, 에틸아세테이트와 아세톤으로 재결정시켜 항균활성물질 I (215 mg), II (120 mg)를 분리하였다. 항균활성물질 I은 mp 147~8°C, 황색침상결정, FeCl₃/MeOH에 의해 암갈색으로 발색되므로 페놀성화합물임을 알 수 있었고, 2, 4-dinitrophenylhydrazine에 의하여 양성반응을 나타내므로 C=O기의 존재를 확인할 수 있었다. 핵산-에틸아세테이트-초산=6 : 4 : 0.1로 전개한 TLC에서 Rf=0.34, 벤젠-아세톤=1 : 1로 전개한 TLC에서

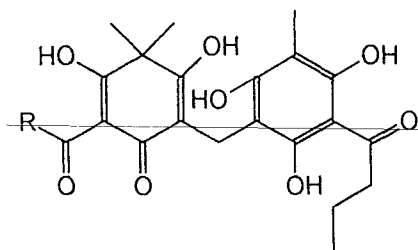


Fig. 1—Antibacterial constituents, flavaspidic acid PB (R=CH₂CH₂) and flavaspidic acid AB (R=CH₃), isolated from *Crassirhizomae Rhizoma* against *Streptococcus mutans* OMZ176.

0.52를 나타내었다. UV spectrum (MeOH)은 223, 299, 349 nm에서 흡수극대를 나타냈으며 이는 phloroglucinol계 화합물임을 시사한다.⁴⁾ IR spectrum은 3400 cm⁻¹, 3200 cm⁻¹의 hydroxyl group, 1640 cm⁻¹의 conjugated carboxyl group, 1620 cm⁻¹ 및 1580 cm⁻¹의 aromatic C=C가 확인되었다. ¹H-NMR spectrum은 0.99 ppm에서 -COCH₂CH₂CH₃의 proton이 triplet (J=7.5 Hz)로, 1.10 ppm에서 -COCH₂CH₃의 proton이 triplet (J=7.5 Hz)로, 1.40 ppm에서 gem-dimethyl의 proton들이 singlet로, 1.66 ppm에서 -COCH₂CH₂CH₃의 proton들이 multiplet로, 2.05 ppm에서 aromatic-CH₃ proton이 singlet로, 3.05 ppm에서 -COCH₂CH₂CH₃의 proton이 triplet (J=7.5 Hz)로, 3.10 ppm에서 -COCH₂CH₃의 proton이 quartet (J=7.5 Hz)로, 3.55 ppm에서 Ph-CH₂-Ph의 proton이 singlet로, 5.60, 10.10, 11.48 ppm에서 5개의 OH proton들이 확인되었다. ¹³C-NMR spectrum은 198.3, 206.3, 206.7 ppm에서 C=O들이 159.8, 156.4, 161.2 ppm에서 나타나 OH기와 결합된 carbon들을 시사한다. 이상의 물리화학적 및 spectral data와 이미 보고된 논문들⁴⁻⁸⁾의 그것과를 비교하여 flavaspidic acid PB로 동정하였다. 항균활성물질 II는 mp 147~8°C, 황색침상결정, FeCl₃/MeOH에 의해 암갈색으로 발색되어 페놀성-OH의 존재를 확인할 수 있었고, 2,4-dinitrophenylhydrazine에 의하여 양성반응을 나타내어 C=O기의 존재를 확인하였다. TLC(hexan-에틸아세테이트-초산=6:4:0.1)에서 R_f 0.34, TLC(벤젠-아세톤=1:1)에서 0.52를 나타내었다. UV spectrum (MeOH)은 225, 298, 346 nm에서 흡수극대를 나타냈으며, 이는 phloroglucinol계 화합물임을 시사한다.⁴⁾ IR spectrum은 3400 cm⁻¹, 3200 cm⁻¹의

Table I—Antibacterial activities of flavaspidic acid PB, flavaspidic acid AB and magnolol against *S. mutans* OMZ176 with disk plate method

compounds	Diameter of inhibitory zone (mm)			
	5	10	20	40
flavaspidic acid PB	12.0	13.5	14.0	16.6
flavaspidic acid AB	8.5	10.0	13.0	15.0
magnolol	8.5	10.0	12.2	13.5

- 1) Incubated for 16 hrs at 37°C on Muller Hinton Agar solid medium.
- 2) Mean values are expressed from three observations and disk is 8 mm in diameter

hydroxyl group, 1640 cm⁻¹의 conjugated C=O들이, 1620 cm⁻¹ 및 1580 cm⁻¹의 aromatic C=C가 확인되었다. ¹H-NMR spectrum은 0.99 ppm에서 -COCH₂-CH₂CH₃의 proton이 triplet (J=7.5 Hz)로, 1.10 ppm에서 -COCH₂CH₃의 proton이 triplet (J=7.5 Hz)로, 1.40 ppm에서 gem-dimethyl의 proton들이 singlet로, 1.66 ppm에서 -CO-CH₂CH₂CH₃의 proton들이 multiplet로, 2.05 ppm에서 aromatic-CH₃ proton이 singlet로, 3.05 ppm에서 -COCH₂CH₂-CH₃의 proton이 triplet (J=7.5 Hz)로, 3.10 ppm에서 -COCH₂CH₃의 proton이 quartet (J=7.5 Hz)로, 3.55 ppm에서 =CH-CH₂-CH=의 proton이 singlet, 5.60, 10.10, 11.48 ppm에서 5개의 OH proton들이 나타났다. ¹³C-NMR spectrum은 198.3, 206.3, 206.7 ppm에서 C=O들이 159.8, 156.4, 161.2 ppm에서 OH기가 결합된 carbon들을 시사한다. 이상의 물리화학적 및 spectral data와 이미 보고된 논문들⁴⁻⁸⁾의 그것과를 비교하여 flavaspidic acid AB로 동정하였다.

항균력 평가 - 항균활성물질 I (flavaspidic acid PB)과 II (flavaspidic AB)는 disk plate method에 의한 항균력실험결과는 Table I과 같다. 항균활성물질 I인 flavaspidic acid PB는 5, 10, 20, 40 μg/disk의 농도에서 inhibitory zone이 각각 12.0, 13.5, 14.0, 16.6 mm이었고, 항균활성물질 II인 flavaspidic acid AB는 위의 농도에서 각각 8.5, 10.0, 13.0, 15.0 mm로서 후박(*M. obovata*)에서 분리한 magnolol과 비슷한 inhibitory zone을 보였다. 항균력을 평가하는 지표로 생각되는 MIC (Minimal Inhibitory concentration) 값은 6.3 μg/ml로서 magnolol의 그것과 같은 것으로서 강한 항균력을 보였다(Table II).

Table II— Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of flavaspidic acid PB, flavaspidic acid AB and magnolol against *S. mutans* OMZ176

Compounds	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
flavaspidic acid PB	6.3
flavaspidic acid AB	6.3
magnolol	6.3

- 1) Inoculated for 16 hrs at 37°C in Muller Hinton Broth liquid medium.
- 2) The inoculum sizes contained 10^5 colony forming units/ml

결 론

충치원생 세균의 하나인 *Streptococcus mutans* OMZ176에 대한 관중의 항균활성 성분에 관한 연구결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 관중의 메탄올추출물에서 *S. mutans* OMZ176에 대한 항균활성 성분 2개를 분리하였으며, 물리화학적 성상에 의하여 flavaspidic acid PB, flavaspidic acid AB로 동정하였다.

2. *S. mutans* OMZ176에 대한 flavaspidic acid PB 및 flavaspidic acid AB의 최소저지농도 (MIC)는 6.3 $\mu\text{g/ml}$ 로서 강한 항균활성을 보였다.

감사의 말씀

이 논문은 1996년도 충남대학교 약학대학 부설 의약 품개발연구소의 지원에 의하여 이루어 졌다. 이에 깊이 감사드린다.

문 헌

- 1) 한대석, 생약학 : 동명사, 서울, p. 139 (1988).
- 2) Widen, C. J., Lounasmaa, M., and Sarvella, J. : Phloroglucinol derivatives of *Dryopteris crassirhizoma* from Japan. *Acta Chemica Scandinavica B* **29**, 859 (1975).
- 3) Namba, T., Tsunozuka, M., Bae, K., and Hattori, M. : Studies on dental caries prevention by Chinese medicines, Screening of crude drugs for antibacterial action against *Streptococcus mutans*, *Shoyakugaku Zasshi*, **35**, 295 (1981).
- 4) Hisada, S., Shiraishi, K., and Inagaki, I. : Pharmaceutical studies on Japanese ferns containing phloroglucinol derivatives(9), on the constituents of *Dryopteris dickinsii*. *Yakugaku Zasshi* **92**, 1124 (1972).
- 5) Hisada, S., Inoue, O., and Inagaki, I. : Isolation of flavaspidic acid-PB from *Dryopteris sieboldii*. *Phytochemistry* **12**, 1493 (1973).
- 6) Hisada, S., Nishibe, S., Inoue, O., Inagaki, I., and Ogihara, Y. : Acylphloroglucinols from the rhizomes of *Dryopteris sieboldii* and *D. gymnosora*. *Shoyakugaku Zasshi* **34**, 8 (1980).
- 7) Coskun M., Sakushima A., Nishibe S. and Hisada S. : Phloroglucinol derivatives of *Dryopteris abbreviata*. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 4102 (1982).
- 8) Widen, C. J., Vida, G., von Euw, J., und Reichsteine, T. : Die phloroglucide von *Dryopteris villarii* und anderer Farne der Gattung *Dryopteris* sowie die moegliche Abstaemmung von *D. filix-mas*. *Helv. Chim. Acta* **54**, 2824 (1976).