

고삼의 에틸 아세테이트 추출물로부터 항균물질의 분리

이현옥·박남규*·정승일*·김윤철**·백승화*#

원광보건대학 치위생과, *원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과,
*한국 한약학 연구원, **약학과

(Received August 10, 2001; Revised October 26, 2001)

Isolation of Antimicrobial Compounds from the Ethyl Acetate Extract of *Sophora flavescens*

Hyun Ok Lee, Nang Kyu Park*, Seung Il Jeong*,
Youn Chul Kim** and Seung Hwa Baek*#

Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-759, Korea.

*#Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine

**Korea Institute of Oriental Pharmacy and Department of Pharmacy,

**College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract — Two flavanones, (2S)-2'-methoxykurarinones (1) and kurarinones (2), were isolated from the ethyl acetate extract of the roots of *Sophora flavescens* Ait. Their structures were elucidated using NMR, UV, and IR spectral analysis. These compounds exhibited a moderate antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas putida* and a weak anti-fungal activity against *Candida albicans*.

Keywords □ *Sophora flavescens* Ait, Antibacterial activity, Minimal inhibitory concentration (MIC).

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물로 너삼 이라고도 부르며 우리나라 전역에 자생한다. 고삼은 본초로 성질은 차고 무독하며 강한 쓴맛을 지니고,¹⁾ 항부 정맥증에 효능이 있다고 알려져 있으며,²⁾ 한방에서 황달, 간질, 나력, 해열, 이뇨, 진통, 구충제 내복용으로 쓰이고, 또한 강정제로 민간 약제로 이용되어 왔다. 또한 흉복부의 병증에서 심복결지, 용, 정 및 적취등의 치료에 사용해왔고,^{3,4)} 고미 건위약, 소염지사약, 심한 가려움증의 피부 질환에 전액을 외용한다. 현재까지 알려진 고삼의 성분으로는 alkaloid, flavonoid, saponins⁵⁾ 등이 알려져 있다. 본 연구는 고삼 에틸아세테이트 추출물로부터 항균 및 항진균 활성을 나타내는 flavanone을 분리

동정하였기에 보고하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 고삼은 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - DMSO(dimethyl sulfoxide), 0.4% tripan blue solution, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide, silica gel(Kieselgel₆₀, 230~400 mesh)과 sand는 Aldrich 제품을 사용하였다. 추출 및 분리에 사용된 용매는 methanol, ethanol, acetone, acetonitrile, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, *n*-hexane은 증류하여 사용하였으며,

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4893

H₂O는 제3차 증류하여 사용하였다. ELISA reader (Molecular devices, spectra MAX 250, USA), spectrophotometer (HITACHI, U 1100, Tokyo, Japan), Micropipette (Gilson), 96 well (Nunclon, Denmark), thin layer chromatography (TLC)는 silica gel plate (0.25 mm, polygram sil N-HR/UV₂₅₄, E. Merck)를 사용하였으며, NMR spectrometer는 JEOL 제품을 사용하였고, chemical shift는 ppm 크기로 하였다. 기준 물질로는 CDCl₃, TMS를 사용하였으며, UV lamp는 254 nm 파장에서 확인 하였다. Flash chromatography 사용시 glass column (15 mm × 250 mm)을 사용하였으며, recycling prep-HPLC 분석에 사용되는 시약은 HPLC용 grade를 사용하였다.

균 주 - 항균력 시험용으로 사용된 균주는 gram 양성균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228을 사용하였고, gram 음성균으로는 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1636, *Pseudomonas putida* KCTC 8729를 사용하였다. 진균으로는 *Candida albicans* ATCC 1940을 사용하였다.

균주의 배양 및 배지 - 균주의 배양에 사용된 배지는 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*는 Brain heart infusion (Difco, USA)를 사용하였고, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Pseudomonas putida*는 Nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였다. *Candida albicans*는 Sabouraud dextrose broth (Difco, USA)를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 37°C 배양기에서 18시간 배양하여 사용하였다.

항균 및 항진균력 측정 - 고삼의 에틸 아세테이트 추출물에 대한 항균 및 항진균력은 액체배지희석법⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 에틸 아세테이트 추출물과 flavanone을 10% DMSO에 용해 시킨 후, 96 well plate에 각 시료의 농도를 최고농도 200 µg/ml에서 최저농도 3.125 µg/ml까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 균주는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고, 37°C 배양기에서 18시간 배양한 균주를 10⁴ CFU/ml를 접종하여, 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후, ELISA reader (Molecular devices, spectra MAX 250, USA)에 의한 흡수파장 630 nm에서 흡광도를 측정하여 배지의 탁도를 확인하였고, 순수 배양액의 흡광도값과 같

은 결과를 얻은 것을 최소억제농도 (Minimal inhibitory concentration, MIC)^{7,8)}로 결정하였으며, 최소억제농도 수치가 낮은 것을 항균효과가 높은 것으로 판정하였다.

항균물질의 분리 - 고삼의 에틸 아세테이트 추출물 3.0 g을 10 ml 등근 플라스크에 넣고, 에틸 아세테이트 (3 ml)을 넣어 녹인 후, 실리카겔 (6.0 g)을 넣어 용매를 감압증류시켜 제거시킨다. 이때 실리카 겔이 coating된 고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 실리카 겔 (30.0 g)이 충전된 컬럼 크로마토그래피에 넣어 전계용매로 용리시켜 분획을 얻었다. 이동상의 조건이 60~90% ethyl acetate/hexane, 100% ethyl acetate, MeOH로 용리된 분획을 역상 크로마토그래피법으로 분리하여 6종류의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중에 이동상 (H₂O : CH₃CN/1 : 3)의 조건으로 용리된 소분획을 실리카관 크로마토그래피법으로 4종류의 소분획을 얻었다. 이들 소분획은 MeOH : CHCl₃, MeOH의 이동상으로 구성되었으며, 이동상의 조건이 1 : 10, 3 : 10, MeOH : CHCl₃으로 용리된 양 (275 mg)을 실리카관 크로마토그래피법으로 7종류의 소분획을 분리하였다. 이동상의 조건이 1 : 5, 1 : 3, CH₃COCH₃ : CH₂Cl₂으로 용리된 양 (137 mg)을 recycling Prep-HPLC로 순수물질, (2S)-2'-Methoxy kurarinone (1)과 kurarinone (2)을 표준물질과 비교하여 확인 (TLC, NMR, IR, UV)하였다.⁹⁾

시료의 처리 - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 보관하였으며, 사용직전에 10% DMSO에 희석하여 실험에 사용하였다.

결과 및 고찰

고삼의 에틸 아세테이트 추출물에서 그람 양성세균인 *S. epidermidis*과 그람 음성세균인 *S. typhimurium*에 대한 항균력은 MIC가 25 µg/ml로 측정되었으며, 또한 *S. aureus*에 대하여 낮은 항균활성으로 항균력은 MIC가 50 µg/ml로 측정되었다. 그러나 다른 균주에서는 에틸 아세테이트 추출물 화합물에 대한 항균력은 MIC가 200 µg/ml 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다. 이와같이 에틸 아세테이트 추출물에 대하여 항균활성이 확인된 이들의 분획 중에 가장 높은 항균력이 나타난 분획을 recycling Prep-HPLC로 분리한 후, TLC, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMQC, HMBC, COSY의 분광학적인 자료와 기준물질과 직접비교하여 (2S)-

Table I – Antibacterial and antifungal activity of *Sophora flavescens* extract and flavanones^{a)}

Tested microorganism	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^{b)}		
	1	2	E
<i>Gram positive bacteria</i>			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5	12.5	25
<i>Streptococcus aureus</i>	25	12.5	50
<i>Gram negative bacteria</i>			
<i>Pseudomonas putida</i>	12.5	12.5	> 200
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	>200	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>200	>200	>200
<i>Escherichia coli</i>	-	>200	>200
<i>Fungus</i>			
<i>Candida albicans</i>	>200	100	>200

^{a)}E, ethyl acetate; 1, (2S)-2'-methoxykurarinone; 2, kurarinone; -, not determined. ^{b)}Data are the average of three experiments.

2'-methoxykurarinone (1)과 kurarinone (2)로 동정하였다.^{5,9)} (2S)-2'-Methoxykurarinone은 그람 양성세균인 *S. epidermidis*과 그람 음성세균인 *P. putida*에 대한 항균력은 MIC가 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 으로 측정되었으며, 그람 양성세균인 *S. aureus*에 대한 항균력은 MIC가 25 $\mu\text{g/ml}$ 로서 낮은 항균활성을 나타냈으며, 다른 균주에서는 항균활성을 거의 보여주지 않았다. Kurarinone은 그람 양성세균과 그람 음성세균인 *P. putida*에 대한 항균력이 MIC가 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 으로 측정되었으며, 곰팡이균인 *C. albicans*에 대한 항균력은 MIC가 100 $\mu\text{g/ml}$ 로서 약한 항진균 효과를 보여 주었다. 그러나 다른 균주에서는 두 화합물의 항균력은 MIC가 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 항균활성이 측정되지않았다(Table I).

결 론

고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 recycling prep-HPLC방법과 TLC, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR의 분광학적인 자료를 이용하여 (2S)-2'-methoxykurarinone (1)

과 kurarinone (2)로 동정하였으며, 이들 화합물 1과 2에서 항균활성이 나타났다.

감사의 말씀

이 논문은 2001년도 원광보건대학의 교비연구비와 일부 두뇌한국 21지원사업에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 신민교 : 임상본초학. 남산당. 서울, p. 314 (1986).
- 2) Kee, C. H. : The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press, Inc p. 63 (1993).
- 3) 李永魯 : 原色韓國植物圖鑑, 敎學社. 서울. p. 366 (1996).
- 4) 육창수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배 : 한약의 약리성분, 임상응용, 계축 문화사, p. 414 (1995).
- 5) Woo, E. R., Kwak, J. H., Kim, H. J and Park, H. K. : A New Prenylated Flavonol from the Roots of *Sophora flavescens*, *J. Nat. Prod.* **61**, 1552 (1998).
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. NCCLS, Wayne, Pa.
- 7) Jorgensen, J. H. and Sahn, D. F. : Antimicrobial susceptibility testing: general considerations. In Murray, P. R. et al. (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed., ASM, Washington, 1277 (1995).
- 8) Lorian, V. : *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore (1996).
- 9) Kang, T. H., Jeong, S. J., Ko, W. G., Kim, N. Y., Lee, B. H., Inagaki, T. M., Higuchi, R. and Kim, Y. C. : Cytotoxic lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*, *J. Nat. Prod.* **63**, 680 (2000).