

## 丹參의 methicillin 내성 황색포도구균에 대한 효과

서명원 · 정승일 · 신철균 · 주영승\* · 김홍준 · 고병섭\*\*

### Antibacterial Activity of *Salvia Miltiorrhiza* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Myung-won Seo · Seung-il Jeong · Chol-gyun Shin · Young-sung Ju · Hong-jun Kim · Byoung-seob Ko

**Objectives** : Gram-positive bacteria have become increasing resistant to antibacterial agents, and hence multi-drug-resistant bacterial pathogens are now a major problem in clinical medicine. There is, therefore, a need for new antibacterial agents. In the course of our screening program for potent antibacterial agent from medicinal plants, the extract of *Salvia miltiorrhiza* (*S. miltiorrhiza*) showed antibacterial activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and antibiotic-resistant *S. aureus*.

**Methods** : *S. miltiorrhiza* was extracted with 80% EtOH. The extract was suspended in H<sub>2</sub>O and fractionated successively with hexane chloroform, ethyl acetate, and n-butanol. The chloroform fraction, which showed the highest antibacterial activity(MICs, 78µg/ml) against MRSA, was chromatographed on a silica gel column and recycling prep-LC to give the pure antibacterial component.

**Results and Conclusions** : The second fraction among the chloroform soluble portion of an aqueous EtOH extract of *S. miltiorrhiza* root showed outstanding antibacterial activity against MRSA and antibiotic-resistant *S. aureus* compared to the other fraction. An active compound was isolated from the second fraction using silica gel column chromatography and recycling prep-LC. Based on these data together with the <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, mass and mp, the active compounds were identified tanshinone I, dehydrotanshinone I and cryptotanshinone. Among tanshinones, cryptotanshinone and dihydrotanshinone I MICs against MRSA and antibiotics-resistant *S. aureus* were 12.5, 12.5 and 6.3 µg/ml, respectively.

---

**Key words** : Antibacterial agents, Methicillin resistant, MRSA

---

\* 우석대학교 한의과대학 본초학교실, \*\* 한국한의학연구원 한약검사사업팀

· 교신저자 : 주영승, 우석대학교 한의과대학 본초학교실

(Tel. 063-290-1561, E-mail: jys9875@core.woosuk.ac.kr)

## 서론

인간은 생·노·병·사의 삶 속에서 병을 예방하고 다스리기 위해서 미생물과 양보할 수 없는 생존 경쟁을 하고 있다. 특히 황색포도구균(*Staphylococcus aureus*; 이하 *S. aureus*)은 그람양성균으로 아주 흔하게 인체에 부착되어 감염증-피부 및 연조직 감염, 골관절염, 균혈증, 폐렴, 식중독 등을 일으키는 감염성 병원균이다<sup>1)</sup>.

*S. aureus*에 의한 감염증 치료를 위하여 수십 년 동안 우수한 항 포도구균 항생물질이 개발되어 여러 질병들을 치료해 왔으나, 항생제에 노출이 빈번해짐에 따라 이들 균의 대부분이 여러 종류의 항생제에 대한 감수성을 상실하여 내성 및 높은 저항성을 나타내고 있다. 1961년 Jevons에 의해 methicillin 내성 황색포도구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; 이하 MRSA)이 처음 보고<sup>2)</sup>된 이후 MRSA 균주가 점점 증가되어 심각한 상황에 도달했다. 따라서 MRSA 감염증의 치료에 효과적인 새로운 약제 개발이 요구된다. 한편 항생제 내성 포도상구균에 대한 한약재들의 연구에서는 김 등<sup>3)</sup>이 甘草가 함유된 여러 한약재들의 메탄올 추출물에서 항생제 내성 황색포도구균에 효과가 있음을 보고하였고, 또한 박 등<sup>4)</sup>은 다양한 한약재의 추출물의 내성 황색포도구균 탐색이 보고되어 있을 뿐이다. 이에 본 연구에서는 다양한 효능과 약리작용을<sup>5)</sup> 나타내는 abietane-type diterpene 색소인 tanshinones을<sup>6)</sup> 주성분으로 가지고 있어 많은 임상 및 천연물 학자 등에 관심의 대상이 되어온 丹參에서 이들 성분들이 다중항생제 내성 *S. aureus*와 MRSA의 생육억제 효과가 있을 것으로 사료되어 유의한 결과를 나타내는 3종을 분리하여 보고하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 사용실험재료

본 연구에 사용된 丹參은 전주시 소재 완산 약업사를 통하여 구입한 것을 본대학 본초학교실에서 외부형태를 비교하여 조사하여 확인 후 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

세균 배양에 사용된 tryptic soy broth은 Difco Co. 제를 사용하였고, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사제를 사용하였다. 배양기는 Vision Co.,를 사용하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel(70-230 mesh, Merck)을 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F254 plate(0.2mm, Merck)을 사용하였다. 기타 시약과 용매는 1급 및 특급시약을 사용하였다. Recycling prep-LC은 JAI Korea Co., Ltd. 컬럼은 JAIGEL-1H(GPC), <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker DRX300를 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 항균활성물질 추출 및 분리

細切된 시료 1.2kg을 실온에서 80% EtOH을 사용하여 7일간씩 3회 반복 추출하고, 40℃ 이하에서 감압·농축하여 에탄올 추출물 35g을 얻었다. 추출물을 H<sub>2</sub>O에 현탁시키고 hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O로 순차적으로 용매분획을 하였다. 활성이 가장 강한 CHCl<sub>3</sub>분획물(9g)을 hexane/ethyl

acetate 혼합용액에 용해시키고, 여기에 silica gel을 가한 후 coevaporation하였다. 이것에 silica gel(200g)을 충전시킨 후 컬럼에 loading 하여 hexane-EtOAc의 용매계로 전개하였다. 첫 시료가 용출될 무렵부터 50 ml씩 용출액을 받기 시작하여 모두 180개의 분획을 받았다. 이를 TLC를 유사한 것끼리 합쳐 모두 6개의 소분획하여 순서대로 SM-31부터 SM-36까지 labelling 하였다. 그 중에서 SM-32(1.2 g)을 분리하기 위하여 Recycling prep-LC(column : JAIGEL-1H(GPC), flow rate : 3.5 ml/min., solvent : CHCl<sub>3</sub>, 254nm)를 실시하여 3종의 화합물 tanshinone I, dehydrotanshinone I, 그리고 cryptotanshinone을 순수 분리할 수 있었다.

Tanshinone I : <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ2.32(3H, d, J=1.2Hz, H-17), 2.72(3H, s, H-18), 7.31(1H, J=1.2Hz, H-16), 7.36(1H, d, J=6.9Hz, H-3), 7.56(1H, dd, J=9.1, 6.9Hz, H-2), 7.83(1H, d, J=8.7Hz, H-7), 8.32(1H, d, J=8.7Hz, H-6), 9.26(1H, d, J=9.0Hz, H-1). <sup>13</sup>C-NMR(75MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ125.2(C-1), 131.1(C-2), 129.7(C-3), 135.5(C-4), 134.1(C-5), 133.3(C-6), 119.1(C-7), 130.1(C-8), 123.7(C-9), 133.2(C-10), 183.9(C-11), 176.1(C-12), 122.2(C-13), 161.6(C-14), 120.9(C-15), 142.4(C-16), 9.2(C-17), 20.2(C-18). EIMS : (m/z), 276(M<sup>+</sup>), 248(M<sup>+</sup>-CO), 191.

Dehydrotanshinone I : <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ1.44(6H, d, J=6.6Hz, H-17), 2.74 (3H,s, H-18), 3.68(1H, m, H-16), 4.46(1H, dd, J=9.3, 6.3Hz, H-2), 4.99(1H, t, J=9.5Hz, H-7), 7.44(1H, m, H-6), 7.67(1H, m, H-1), 7.80(1H, d, J=8.7Hz), 8.35(1H, d, J=8.7Hz),

9.34(1H, d, J=8.7Hz). <sup>13</sup>C-NMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ126.7(C-1), 130.8(C-2), 128.7(C-3), 135.4(C-4), 134.1(C-5), 133.3(C-6), 120.7(C-7), 129.3(C-8), 125.5(C-9), 132.3(C-10), 184.8(C-11), 176.2(C-12), 118.8(C-13), 170.7(C-14), 35.2(C-15), 82.0(C-16), 19.2(C-17), 20.2(C-18). EIMS : (m/z), 278(M<sup>+</sup>), 250(M<sup>+</sup>-CO), 235, 178.

Cryptotanshinone : <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ1.33(6H, s, H-18 and 19), 1.38(3H, d, J=6.9Hz, H-17), 1.68(2H, m, H-3), 3.24(2H, t, J=6.4Hz, H-1), 4.38(1H, dd, J=9.3, 6.9Hz, H-16<sub>b</sub>), 4.90(1H, t, J=9.3Hz, H-16<sub>a</sub>), 7.51(1H, d, J=8.1Hz, H-6), 7.65(1H, d, J=8.1Hz, H-7). <sup>13</sup>C-NMR(75MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ29.7(C-1), 19.1(C-2), 37.9(C-3), 34.9(C-4), 143.7(C-5), 132.5(C-6), 122.5(C-7), 128.5(C-8), 126.3(C-9), 152.4(C-10), 184.3(C-11), 175.7(C-12), 118.3(C-13), 170.7(C-14), 34.7(C-15), 81.5(C-16), 18.8(C-17), 31.9(C-18 and 19). EIMS : (m/z), 296(M<sup>+</sup>), 281(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 268(M<sup>+</sup>-CO), 253.

## 2) 세균의 액체배양

제조된 액체 배지에 각각의 균주를 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종한 후 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 균액을 탁도 0.5관 (McFarland 0.5)으로 맞춘 다음 사용하였다.

## 3) Methicillin 내성 황색포도상균에 대한 항균 활성측정

TSB에 丹參에서 분리한 화합물을 0μg/ml, 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 100μg/ml, 그리고 200μg/ml의 농도로 맞춘 후 24 well

plate에 1ml씩 분주한 다음 탁도 0.5로 맞춘 각각의 균액을 100 $\mu$ l/ml/well 넣어 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 배양한 다음 ELISA reader로 630nm에서 흡광도를 측정하여 성장변화를 관찰하였다.

#### 4) 액체배지희석법

丹參의 분획물 그리고 분리된 화합물들의 최소억제농도(MIC)를 시험하기 위해 액체배지 희석법을 이용하였다. 각각의 분획물과 화합물들을 농도별로 맞춘 후 24 well plate에 1ml씩 분주한 다음 탁도 0.5로 맞춘 각각의 균액을 100 $\mu$ l/ml/well 넣어 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 배양한 다음 ELISA reader로 630nm에서 흡광도를 측정하여 성장변화를 관찰하였다.

### 실험성적 및 고찰

세균은 끊임없이 항생제의 약점을 찾아 내성을 키워왔고, 인간은 변신하는 세균을 무력화시키기 위해 우수한 항생제의 지속적인 개발로 많은 생명을 구할 수 있게 되었지만, 항생제의 과다복용에 따른 많은 부작용의 발생 및 내성균의 증가로 중증 감염의 발생빈도가 높아짐으로 여러 가지 새로운 문제점들이 대두되고 있다.

그람양성균의 대표적인 균인 *S. aureus*는 형상은 구형인데 한 쌍, 4개씩 또는 포도송이 모양으로 불규칙하게 배열되어 있어 있다. 균의 크기는 0.5-1.2 $\mu$ m이며 편모, 포자, 헤파막이 없지만 때로는 외층에 점액층을 형성하는 균도 있다. *S. aureus*는 아주 흔하게 인체에 부착되고 또는 감염증을 일으키는데 전체 인구의 10-20%에 정착되어 있고, 건강한 성인의 30-50%에 정착되어 있고, 건강한 사람의 84%가 일생 중鼻腔에 *S. aureus*의 보균을 경험한다. *S. aureus*는 인체 감염증의 흔한

원인균으로서 주로 피부 및 연부 조직 감염, 골관절 감염, 심내감염, 폐렴, 식중독 등을 일으키는데 아주 빠른 속도로 항균내성을 발달시켜 온 세균이다. 1941년 페니실린이 인체 감염증에 처음 사용된 후 10년이 채 지나지 않아,  $\beta$ -lactamase를 생성하는 *S. aureus*, 즉 페니실린에 내성을 나타내는 *S. aureus*가 임상에서 분리되는 균주의 대다수를 차지하게 되었다. Methicillin 내성 황색포도상구균(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* : 이하 MRSA)은 methicillin을 분해하는  $\beta$ -lactamase의 생산이 아닌  $\beta$ -lactam계열 항생물질과 결합력이 약한 새로운 세포벽 합성 효소(penicillin binding protein, PBP)의 생산에 의하여 내성이 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 황색포도상구균은 4종류의 PBP를 갖고 있으며, 분자량의 크기에 따라 PBP 1-4순으로 명명되어 있다. MRSA는 이들과 다른 종류의 분자량 78,000의 PBP 2'를 생성한다. PBP 2'는  $\beta$ -lactam 계열의 항생물질에 대한 친화성이 낮기 때문에, 다른 PBP가  $\beta$ -lactam 계열 항생물질에 저해를 받아도 합성이 가능하다. PBP 2' 유전자는 염색체 상에 존재하지만 본래 가지고 있는 PBP가 변화된 것이 아니고, 외래성 유전자인 것으로 알려져 있다. 최근 입원환자를 대상으로 페니실린에 대한 내성률이 96.7%, 외래환자를 대상으로 96.1%가 보고되고 있다. 1960년 methicillin, oxacillin, nafcillin 등  $\beta$ -lactamase에 한정적인 페니실린이 개발되었으나, 1961년에는 MRSA가 출현하였다. MRSA의 치료 항균제로는 vancomycin 등 glycopeptides를 최근까지 사용하여 왔는데, 1997년에는 vancomycin에 내성을 지닌 *S. aureus*까지 출현하였다. Vancomycin 외에 teicoplanin, quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, rifampin, clindamycin, aminoglycosides, fusidic acid 및 fosfomycin 등이 쓰여지고 있지만 내성균주

가 잘 발생하거나 치료율이 낮다<sup>7)</sup>.

丹參(*Salvia miltiorrhiza*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생초본으로 뿌리를 약용하는데 한방에서는 출혈, 유산, 부종의 치료제에 사용되었다. 단삼의 화학성분으로는 대부분이 abietane-type diterpenoid 색소이며, rosmarinic acid, lithospermate B, magneium lithospermate. B 같은 phenol 성 화합물도 알려져 있다. 丹參의 효능으로는 심장관상혈관계혈류량 증가, 해열, 항균, 소염, 항암, 신부전증 개선효과 등이 보고되었다<sup>5)</sup>.

이에 저자는 丹參의 효능 및 약리작용에 근거하여 다중항생제내성 *S. aureus*와 MRSA에 대한 항균효과를 관찰한 결과 에탄올 추출물의 경우 항균 활성을 나타냈다. methicillin 내성 황색포도상균에 대한 최소억제농도(MIC)에서, 丹參의 클로로포름 분획물로부터 분리된 tanshinone I, dehydrotanshinone I, 그리고 cryptotanshinone 화합물을 0 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 그리고 200 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음 ELISA reader로 630nm에서 흡광도를 측정하여 성장변화를 관찰한 결과 丹參의 분획물들에서는 클로로포름 분획물이 methicillin 황색포도상구균에서는 78 $\mu$ g/ml에서 억제효과를 나타내었다.

클로로포름 분획물에서 분리된 각각의 화합물 tanshinone I, cryptotanshinone and dihydrotanshinone I들의 methicillin 황색포도상구균에서는 25.0, 12.5, 그리고 6.3

$\mu$ g/ml에서 강한 억제효과를 나타내었다.

에탄올 추출물의 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물에서 다중 항생제 내성 *S. aureus*와 MRSA에 대해 항균 활성을 나타내었으며, 클로로포름 분획물이 가장 우수한 항균 활성을 나타내었다. 丹參의 메탄올 용해성 추출물의 다중 항생제 내성 *S. aureus*와 MRSA에 대해 최소 생성 억제 농도는 각각 625 $\mu$ g/ml 이었다. 새로운 항생제를 개발하기 위해 activity-guided screening법에 의해 가장 우수한 항균 활성을 나타낸 클로로포름 분획물을 silicagel open column과 n-hexane-ethyl acetate의 용매의 조성을 변화 이용하여 chromatography를 하였으며, 분획물을 박막크로마토그래피 (TLC)를 이용하여 spot이 비슷한 균거리 모아 6개의 분획을 얻었다. 그중 분획물 2를 recycling, prep-LC로 3개의 화합물을 분리하였다. 이들을 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, Mass 등의 이화학 장비와 문헌 등<sup>6,9)</sup>을 통하여 구조를 tanshinone I, cryptotanshinone 그리고 dihydrotanshinone I으로 동정하였으며, 이들은 다중항생제내성 *S. aureus*와 MRSA에 대한 항균효과를 관찰한 결과 methicillin 황색포도상구균에서는 25.0, 12.5 그리고 6.3 $\mu$ g/ml에서 강한 억제효과를 나타내었다. 이러한 연구결과 丹參으로 분리된 dihydrotanshinone I은 어느 정도 차세대 항생제 개발의 가능성을 암시하였다.

Table 1. Minimal Inhibition Concentration of Tanshinone I, Cryptotanshinone and Dihydrotanshinone I on the Growth of MRSA Strains.

Species	Strain	MIC( $\mu$ g/ml)					
		CHCl3	EtOAc	BuOH	tanshinone I	cryptotan-shinone	dihydrotan-shinone I
<i>S.aureus</i>	ATCC259322	78	>200	>200	12.5	12.5	6.3
<i>S.aureus</i>	ATCC33591	>100	>200	>200	25.0	25.0	12.5

### 결론

丹參의 효능 및 약리작용에 기초로 activity guided fractionation에 따라 MRSA ATCC259322 및 다중 S. aureus. ATCC33591의 생육억제에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

1. 丹參의 에탄올 추출물에서 MRSA ATCC259322 및 다중 S. aureus. ATCC33591에 대한 항균 활성을 나타내었다.

2. 丹參의 유기용매 분획에 사용한 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 그리고 부탄올(buthanol) 분획물에서 MRSA ATCC259322 및 다중 S. aureus. ATCC33591에 대한 항균 활성을 나타내었으며 클로로포름 분획물(chloroform fraction)이 가장 우수했다.

3. 클로로포름 분획물(chloroform fraction)을 silica gel과 hexane/ethyl acetate 용매로 column chromatography하여 6개의 분획 중 2분획을 recycling prep-LC로 화합물 tanshinone I, cryptotanshinone, 그리고 dihydrotanshinone I을 각각 분리하여 1H-, 13C-NMR 및 Mass와 문헌을 비교하여 동정하였다.

4. 화합물 tanshinone I, cryptotanshinone, 그리고 dihydrotanshinone I MRSA ATCC259322 및 다중 S. aureus. ATCC33591에 대한 항균 활성은 12.5, 12.5, 6.5µg/ml을 각각 나타내었다.

### 참고문헌

1. Lowy FD : Staphylococcus aureus

infection, N. Engl. L. Med, 339, 520-532, 1998.

2. Jevons MP : Celbenin-resistant Staphylococcus, BMJ, 1, 124-126, 1961.

3. 김미랑, 정병두, 신정인 등 : 甘草의 메티실린 내성 황색포도상구균에 대한 생육억제 효과, 대한한의학회지, 23(3), 223-232, 2002.

4. 박원영, 서운교, 정지천 : 항생제 내성 화농균의 생육을 억제하는 한약재 탐색에 관한 연구, 대한한방내과학회지, 19(2), 300-316, 1998.

5. Chang HM and But PP : Pharmacology and Applications of Chinese Material Medica, Singapore, World Scientific Publ. Co., 255-268, 1986.

6. Wu WL, Chang WL and Chen CF : Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines, Am. J. Chin. Med., 19(3-4), 207-216, 1991.

7. Christopher GD, Coffey T J, and Spratt BG : Origin and molecular epidemiology of penicillin binding protein mediated resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, Trends Microbiol., 2, 361-366, 1994.

8. 임상민 : Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, 소아감염, 4(2), 201-209, 1997.

9. Sato M, Sato T, Ose Y et al : Modulating effect of tanshinones on mutagenic activity of Trp-P-1 and benzo[a]pyrene in Salmonella typhimurium, Mutation Research, 265, 149-154, 1992.