

계피로부터 항진균물질 AF-001의 분리·정제 및 특성

방규호^{1,2} · 이영하^{1*} · 민병선²

¹충남대학교 미생물학과, ²코오롱제약 기술연구소

Purification and properties of an antifungal component, AF-001, from Cinnamomi Cortex

Kyu-Ho Bang^{1,2}, Young-Ha Rhee^{1*} and Byung-Sun Min²

¹Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764,

²R & D Center, KOLON Pharmaceutical INC., Taejon 306-220, Korea

ABSTRACT: Ether extract of Cinnamomi Cortex showing antifungal activity was purified and characterized. The active component from the extract was identified to be *trans*-cinnamaldehyde, which was effective in inhibiting the growth of the representative fungi of dermatomycosis with minimum inhibitory concentration of 39~78 µg/ml. The antifungal spectrum of *trans*-cinnamaldehyde was broader than that of commercial antifungal agent, Ketoconazole.

KEYWORDS: Antifungal activity, Cinnamaldehyde, Cinnamomi Cortex

새로운 항진균제의 개발방향은 기존 항진균제의 화학수식을 통한 새로운 유도체 합성, 제제기술을 통한 독성감소와 약물 delivery 증진을 위한 신제형 제조, 천연물로부터의 새로운 항진균물질의 탐색 등으로 요약할 수 있다(Georgopapakou and Walsh, 1994; Yoo, 1997). 그 중에서 천연물을 대상으로 하는 항진균제 연구는 합성화학물에 비해 독성이나 부작용이 적거나 없는 천연물을 대상으로 한다는 점에서 꾸준히 진행되고 있으며 현재까지 terpenoid 화합물(irdoids, sesquiterpenoids 등), nitrogen 및 sulphur 함유 화합물(alkaloids, amines, amides 등), aliphatic 화합물(특히 long chain alkanes 및 fatty acids), aromatic 화합물(phenolics, flavonoids, stibenes, bibenzyls, xanthenes, benzoquinones 등) 등이 각종 진균에 항진균효과가 있는 천연물 유래의 항진균활성물질로서 보고되어 있다(Grayer and Harbone, 1994). 이러한 사실은 천연물 자체 또는 천연물로부터 다

양한 구조의 새로운 항진균제의 개발가능성을 시사하는 것으로서 진균감염증의 발현을 증가와 더불어 새로운 항진균제의 요구가 전망되고 있는 현실과 부합하여 항진균활성물질의 새로운 모델화합물을 제시해 줄 수 있는 분야로 해석된다.

저자 등은 최근 새로운 계열의 항진균제 개발을 위해 한방에서 사용하고 있는 동·식물 생약과 천연에 자생하는 식물 등 231종을 대상으로 항진균활성을 검색한 결과 계피(Cinnamomi Cortex)가 우수한 항진균활성을 나타냄을 확인한 바 있다(Min 등, 1996). 이의 지속적 연구의 일환으로서 본 연구에서는 계피의 항진균물질인 AF-001을 분리·정제한 다음 물리화학적 특성을 조사하였으며, Ormsby와 Montgomery(1954)에 의해 분류된 피부진균증(dermatomycosis)에 따라서 표재성진균증(superficial dermatomycosis)의 대표균이며 임상적으로 중요한 감염균주인 백선균(Dermatophytes) 3종, 심재성진균증(deep dermatomycosis)의 유발균주 2종, 칸디다증(candidiasis)의 대표균주 1종 및 *Penicillium*속 진균 1종 등 주로 피부진균증을 일

*Corresponding author

으키는 원인진균을 대상으로 항진균활성 스펙트럼을 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 항균력검색

생약으로 쓰이고 있는 계피를 대전시 소재 한약방에서 구입하여 50 g을 잘게 썰어 에테르 및 메탄올로 추출한 후 여과하였다. 여과액은 감압농축기를 사용하여 각 용매를 회수하고 잔류하는 에테르와 메탄올 추출물을 얻었다. 각 추출물을 평량하여 20 mg/ml 용액으로 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹이고 Sabouraud dextrose broth(Difco)로 10배 희석하여(최종농도 2 mg/ml) *Candida albicans* KCTC 1940과 *Penicillium avellaneum* KCTC 1253 균주를 대상으로 스테인레스 스틸(S.S.) 원통평판법으로 항균활성을 비교한 결과 에테르추출물이 항균활성이 강한 것으로 나타나 이를 연구에 사용하였다.

항균물질의 분리 및 정제

얇게 절단한 계피 5 kg을 에테르 15 L로 40°C에서 4시간씩 3회 가열 환류시켜 추출하고 냉각 후 추출물을 여과하였다. 여과액은 감압농축기를 사용하여 에테르를 회수하고, 잔류하는 에테르 추출물은 silica gel(Merck, 0.063~0.2 µm) column(34 mm × 700 mm)으로 정제하여 항균활성성분 AF-001을 분리하였다(Fig. 1).

AF-001의 물리화학적 특성조사

Thin layer chromatography를 위하여 silica gel plate 60 F₂₅₄(Merck)를 사용하였으며 실온의 전개조에서 hexane/ethylacetate(5:1, v/v) 용액을 용매로 전개시키고 10% H₂SO₄으로 발색시켰다. UV/Vis spectrum은 AF-001을 DMSO에 용해하여 Hewlett packard 8452A spectrophotometer로 측정하였으며, IR은 Shimadzu 470을 이용하여 CCl₄를 용매로 하는 액막법으로 조사하였다. ¹H-NMR(400 MHz)과 ¹³C-NMR(100 MHz) spectrum은 AF-001을 CDCl₃에 용해하고 Varian high resolution FT-NMR spectrophoto-

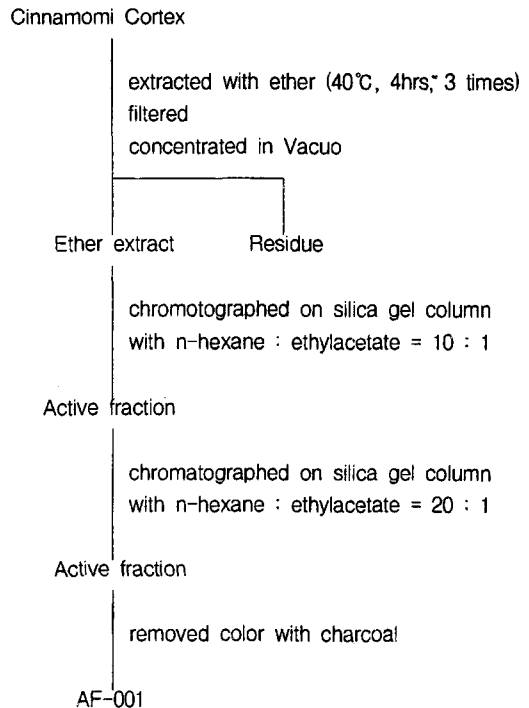


Fig. 1. Purification procedure of antifungal component produced by Cinnamomi Cortex.

meter(400 MHz)를 이용하여 조사하였다. 분리정제된 AF-001의 HPLC(Hitachi L-6000) 분석은 µ-Bondapak C₁₈ column(4.6 × 200 mm)과 acetonitrile/distilled water/acetic acid (20:30:1, v/v)을 용매로 사용하여 수행하였으며, UV 280 nm에서 순도를 확인하였다.

AF-001의 항균력 조사

AF-001의 항균력 조사를 위한 실험균주로서는 표재성진균증 유발균주인 *Tricophyton mentagrophytes* KCTC 6077, *Microsporium gypseum* KCTC 1252, *Epidermophyton floccosum* KCTC 1246, 심재성진균증 원인균주인 *Cryptococcus neoformans* KCTC 7224, *Aspergillus niger* KCTC 1700, 캔디다증의 대표균주인 *Candida albicans* KCTC 1940 및 *Penicillium avellaneum* KCTC 1253을 사용하였다.

C. albicans 및 *C. neoformans*는 28°C에서 3일간 배양한 Sabouraud dextrose agar(pH 5.6)배

지의 사면상의 집락에 Sabouraud dextrose broth(pH 5.4)를 가하여 백금으로 긁거나 흔들어 주어 포자를 수집한 후 1200 g×20분간 원심분리하고 540 nm에서 T(%)=95가 되도록 조정하여 포자현탁액을 조제하였으며, 그 밖의 진균은 28°C에서 7일간 배양하여 포자가 형성된 사면상의 집락을 얻어 *C. albicans*와 동일한 방법으로 진행하여 540 nm에서 T(%)=90이 되도록 조정하여 포자현탁액을 조제하였다(Moore and Jaciow, 1979).

최소저지농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정은 연속희석법에 따라 실시하였다. 즉, 13개의 시험관에 Sabouraud dextrose broth를 각각 1 ml씩 분주하여 멸균 후 1번 시험관에 시료용액 1 ml를 가한 후 계열희석하고 13번 시험관을 대조시험관으로 하여 균액 0.05 ml씩(포자수; $10^5 \sim 10^6$)을 접종하고 28°C에서 2주일간 배양하면서 균의 생장여부를 관찰하여 최소저지농도를 측정하였다.

결 과

계피의 항균력 검색

계피의 에테르 및 메탄올 추출물에 대한 항균활성을 비교한 결과 Fig. 2와 같이 *C. albicans* KCTC 1940 및 *P. avellaneum* KCTC 1253 모두에게 생육저지환이 관찰되었으나 에테르 추출물에서의 생육저지환이 메탄올 추출물 보다 크게 나타났다. 즉, *C. albicans*의 경우 에테르 추출물은 저지환이 45 mm였으며 메탄올 추출물은 16 mm로

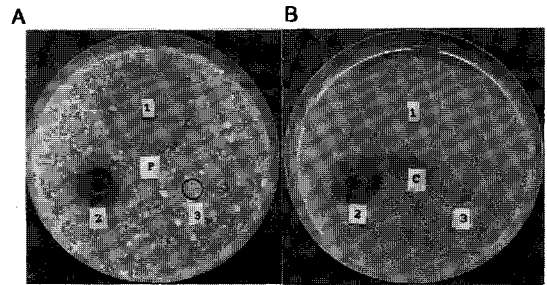


Fig. 2. Antifungal activities of the extracts from Cinnamomi Cortex against *Candida albicans* KCTC 1940 (A) and *Penicillium avellaneum* KCTC 1253 (B). 1: Ether extract, 2: Methanol extract, 3: Blank C: *Candida albicans* KCTC 1940, P: *Penicillium avellaneum* KCTC 1253.

나타났다. *P. avellaneum*의 경우 에테르 추출물은 저지환이 27 mm이었으며 메탄올 추출물은 12 mm로 나타났다. 계피의 추출시 에테르와 메탄올을 사용한 이유는 두 용매의 극성 차이가 커서 항진균 활성물질이 나타날 때 물질의 극성에 대한 정보를 얻을 수 있고 유효물질분리시 효율을 높일 수 있기 때문이다. 메탄올 추출물에서 보다 에테르 추출물에서의 생육저지환이 큰 것으로 볼 때 본 활성물질은 극성이 낮은 것으로 추측할 수 있다.

항진균물질의 분리·정제 및 특성 조사

잘게 썰은 계피 5 kg을 에테르로 추출하여 감압 농축한 결과 에테르 추출물 70 g을 얻었으며, 이 추출물은 *n*-hexane과 ethylacetate가 각각 10:1과

Table 1. Physicochemical properties of AF-001

Nature	Colorless oily liquid
Odor	Strong odor of cinnamon
Solubility	soluble
Partially soluble	Methanol, ethanol, ether, chloroform
UV λ_{max} (DMSO)	Water
IR ν_{max} (CCl ₄)	290 nm
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	1684, 1621 cm ⁻¹
	δ 9.66 (1H, d, J=7.6 Hz, CHO), 7.42 (1H, d, J=16.42 Hz, HC=CH-CHO), 6.67 (1H, dd, J =7.6 and 16.4 Hz, HC=CH-CHO), 7.38~7.4 (3H, m, 6,7,8-H), 7.51~7.53 (2H, m, 5,9-H)
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 193.3 (CHO), 152.4 (2-C), 133.6 (4-C) 130.9 (7-C), 128.7 (5,9-C), 128.1 (6,8-C) 128.05 (3-C)
Rf values on TLC	0.5
(<i>n</i> -hexane:ethylacetate = 5:1, v/v)	

20:1로 섞인 용매로 2회 연속 silica gel column chromatography를 거쳐 정제하였다. 각 분획별 활성은 S.S.원통평판법(최종농도 2 mg/ml)으로 검색하였다. 활성분획은 취합 후 활성탄을 이용하여 탈색시켰으며, 최종적으로 AF-001로 명명된 순수한 화합물 45.3 g(0.91%)을 얻었다.

AF-001은 투명한 유상의 물질로서 강한 계피향을 지니며 ethanol, methanol, ether, chloroform에 가용성인 반면에 물에는 부분적으로 용해되었다(Table 1).

AF-001의 구조 동정

AF-001의 구조 동정은 UV/Vis, IR, FT-NMR spectrophotometer를 사용하여 조사하였다. 이 물질은 UV 290 nm에서 특징적인 UV흡수 스펙트럼을 나타내었으며, IR 스펙트럼의 1684 cm^{-1} 에서 α , β -불포화 C=O기가 확인되었고 이중결합에 의한 흡수가 1621 cm^{-1} 에서 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 geminal aldehyde의 proton이 δ 9.66 ppm에서 2번 탄소의 proton과 coupling하여 doublet임을 알 수 있었고, 이때 coupling constant는 7.6 Hz이었다. 또한 6.67 ppm에서 2번 탄소의 proton이 CHO와 3번 탄소의 proton과 각각 coupling하여 두 doublet임이 확인되었고 coupling constant는 각각 7.6과 16.4 Hz이었다. 7.43 ppm에서는 3번 탄소의 proton이 2번 탄소의 proton과 coupling하여 doublet으로 확인되었으며 coupling constant는 16.4 Hz이었다. Aromatic ring의 proton peak는 6, 7, 8번의 proton이 7.38~7.4 ppm에서 multiplet, 5, 9번의 proton이 7.51~7.53 ppm에서 multiplet으로 나타났다. $^{13}\text{C-NMR}$

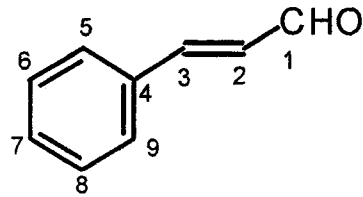


Fig. 3. Structure of trans-cinnamaldehyde.

에서 193.3 ppm에서 aldehyde의 탄소가, 128.1 ppm에서 C-2, 152.4 ppm에서 C-3가 확인되었으며 aromatic ring의 탄소들은 128.1 ppm에서 C-6, C-8, 128.7 ppm에서 C-5, C-9, 130.9 ppm에서 C-7, 133.6 ppm에서 C-4가 각각 확인되었다. 이상의 결과를 중심으로 문헌에 보고된 자료(Katsumi 등, 1984; Asahi, 1985)와 비교한 결과 AF-001은 Fig. 3의 구조를 갖는 trans-cinnamaldehyde인 것으로 동정되었다.

동정된 AF-001을 trans-cinnamaldehyde (Aldrich cat No. C8, 068-7)를 standard로 하여 HPLC로 분석한 결과 동일한 retention time에서 peak가 나타나 cinnamaldehyde임을 확인할 수 있었으며 단일 peak의 순도 99.08%로 정량되었다.

AF-001의 항균력

여러 가지 실험균주를 대상으로 AF-001의 항균력을 측정된 결과는 Table 2와 같다. *M. gypseum* KCTC 1252, *E. floccosum* KCTC 1246, *C. neoformans* KCTC 7224, *P. avellaneum* KCTC 1253에 대하여 $39\text{ }\mu\text{g/ml}$ 의 MIC를 나타내었으며 *T. mentagrophytes* KCTC 6077, *A. niger* KCTC 1700, *C. albicans* KCTC 1940에 대해서는 $78\text{ }\mu\text{g/}$

Table 2. Antifungal activities of AF-001 and Ketoconazole against various fungi ($\mu\text{g/ml}$)

	Microorganism	AF-001	Ketoconazole ^a
1	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> KCTC 6077	78	312
2	<i>Microsporium gypseum</i> KCTC 1252	39	4.9
3	<i>Epidermophyton floccosum</i> KCTC 1246	39	1.2
4	<i>Cryptococcus neoformans</i> KCTC 7224	39	<1.2
5	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 1700	78	625
6	<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	78	19.5
7	<i>Penicillium avellaneum</i> KCTC 1253	39	4.9

^aKetoconazole-NizoralR

ml의 MIC를 보여 피부진균증을 유발하는 원인균주 6종 및 cell line이 다른 진균인 *P. avellaneum* KCTC 1253 1종 등 7종의 진균 모두에 대해서 항균 활성이 관찰되었다. 대표적인 imidazole계 항진균제인 Ketoconazole과의 비교시험 결과 *T. mentagrophytes* KCTC 6077, *A. niger* KCTC 1700에서는 AF-001이 효과가 현저하게 높았으나, *M. gypseum* KCTC 1252, *E. floccosum* KCTC 1246, *C. neoformans* KCTC 7224, *C. albicans* KCTC 1940, *P. avellaneum* KCTC 1253에 대해서는 항진균력이 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나, 전체적인 항균 스펙트럼 비교시험 전 균주에 대해 동일한 항균활성을 보인 AF-001이 Ketoconazole보다 광범위한 항균 스펙트럼을 보였다.

고 찰

계피는 주로 식품의 첨가제 및 중요한 한약재로 이용되어 왔을뿐 지금까지 항미생물작용과 관련된 연구로는 항세균효과를 중심으로 진드기나 집벌레의 살충작용 및 일부 진균에 관해서만 보고되어 있다. 계피 추출물의 항균작용에 관해서는 Kurita 등(1981)이 계피의 phenol화합물이 항균력을 나타낸다고 하였으며, Lisbonne 등(1987)은 계피의 정유성분 중 carvacol이 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces faecium*의 생육을 저해한다고 하였다. 계피 열수 추출물과 메탄올 추출물은 *Toxocara canis*의 작용을 저해하는데 side chain에 있는 기능기의 oxidation 상태가 높을수록 활성이 강하고 계피의 성분인 cinnamic acid가 cinnamaldehyde나 cinnamic alcohol로 환원되면 저해작용이 감소된다고 하였다(Kiuchi 등, 1989a, 1989b; Fumiyuki 등, 1989; Nakamura 등, 1990). Watanabe 등(1989)은 계피의 정유성분이 진드기나 *Dermatophagoides pteronyssinus* 등의 집벌레에 대한 살충작용이 있다고 하였으며, Ismaiel 등(1990)은 계피의 정유성분이 *Clostridium botulinum*의 발아와 성장을 저해시킨다고 보고한 바 있다.

특히 계피의 주성분으로 알려져 있는 cinnamaldehyde의 항미생물효과에 대한 보고는 *Pseudo-*

*monas aeruginosa*의 생육저해 작용(Lisbone 등, 1987), Human KB cell과 효모인 *Saccharomyces*의 활성저해 효과(Mochida 등, 1988), *A. niger*에 대한 항진균능(Hideaki 등, 1990), cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176의 저해효과(Bae 등, 1992) 및 최근의 *A. flavus* 성장억제에 따른 aflatoxin 합성저해능(Mohmaud, 1994) 등 항세균효과와 일부 진균에 대한 항진균효과 외에는 별로 보고된 바가 없다. 더욱이 cinnamaldehyde를 대상으로 병원성진균에 관한 항균활성을 조사한 연구는 발표된 바가 없다. 따라서, 본 연구 결과에서처럼 AF-001이 피부진균증 유발균주에 대한 광범위한 활성 스펙트럼과 대상 균주에 대해 거의 동일한 최소저지농도를 나타낸다는 사실은 기존에 개발된 항진균제의 항균 스펙트럼이 제한적이라는 문제점(Kim 등, 1993) 등을 고려해 볼 때 천연물 유래의 항진균 활성물질의 새로운 모델 화합물로서 제기 될 수 있는 가능성이 높은 것으로 해석된다.

적 요

계피의 항진균활성을 검색한 결과 에테르 추출물이 우수한 활성을 나타내는 것으로 평가되어 계피 에테르의 추출물로부터 항진균물질 AF-001을 분리·정제하였으며 이를 동정한 결과 trans-cinnamaldehyde로 확인되었다. AF-001은 피부진균증의 원인 균주인 *Tricophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*와 *Penicillium avellaneum*에 대해 38~79 µg/ml의 최소저지농도를 보였으며 imidazole계의 대표적인 항진균제인 Ketoconazole보다 광범위한 항균 스펙트럼을 보였다.

참고문헌

- Asahi Research Center (ed.). 1985. Handbook of proton-NMR spectra and data, Vol. 3. P 2157. Academic Press. Tokyo.
- Bae, K. H., Ji, J. M. and Park, K. L. 1992. The antibacterial component from Cinnamomi

- Cortex against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Arch. Pharm. Res.* **15**: 239-241.
- Fumiyuki, K., Hayashi, M., Nakamura, N., Mikiage, M., Tsuda, Y., Kondo, K. and Namba, T. 1989. Screening of crude drugs used in Nepal for Nematocidal activity on the larva of *Toxocara canis*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**: 294-299.
- Georgopapakou, N. H. and Walsh, J. 1994. Human mycoses-Drug and targets for emerging pathogens. *Science* **264**: 371-373.
- Grayer, R. J. and Harbone, J. B. 1994. A survey of antifungal compounds from high plants. *Phytochemistry* **37**: 19-42.
- Hideaki, M., Yoshikazu, I., Yukihiri, T. and Tohru, T. 1990. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of single hypha. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3779-3784.
- Ismail, A. and Pierson, M. 1990. Inhibition of growth and germination of *Clostridium botulinum* 33A, 40B and 1623E by essential oil of spices. *J. Food Sci.*, **55**: 1676-1678.
- Katsumi, K., Junpei, K., Kiyoshi, K., Nobuo, I., Tsuneo, K. and Masao, N. 1984. Cinnamaldehyde-Identification of an antimutagen from crude drug, Cinnamomi Cortex. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1905-1906.
- Kim, S. H., Hyun, B. C., Suh, J. W., Kim, C. O., Yon, C. S., Lee, D. K., Kim, K. P., Jung, J. K., and Lee, C. H. 1993. Biological properties and structural analysis of novel antifungal antibiotics AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 556-563
- Kiuchi, F., Koshimaru, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Tabata, M. and Honda, G. 1989. Screening of crude drugs used in turkey for nematocidal activity on the larva of *Toxocara canis*. *Shoyakugazu Zasshi* **43**: 353-359.
- Kiuchi, F., Hioki, M., Nakamura, N., Miyashita, N., Tsuda, Y. and Kondo, K. 1989. Screening of crude drugs used in Sri Lanka for nematocidal activity on the Larva of *Toxocara canis*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**: 288-293.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R. and Takahara, Y. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 945-952.
- Lisbonne, C., Cremieux, A., Maillard, C. and Balansard, G. 1987. Methods from the evaluation of antibacterial activity of essential oils. *J. Pharm. Belg.* **42**: 297-300.
- Min, B. S., Bang, K. H., Lee, J. S., and Bae, K. H. 1996. Screening of the antifungal activity from natural products against *Candida albicans* and *Penicillium avellaneum*. *Yahak Hoeji* **40**: 582-590.
- Mochida, K., Gomyoda, M., Fujita, T. and Yamagata, K. 1988. Toxicity of allyl isothiocyanate and cinnamic aldehyde assessed using cultured Human KB cells and yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **40**: 339-342.
- Mahmoud, A.-L.E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 110-113
- Moore, G. S. and Jaciow, D. M. 1979. Mycology for the clinical laboratory. Pp 262-266. Reston Publishing. Virginia.
- Nakamura, N., Kiuchi, F., Tsuda, Y., Kondo, K. and Sato, T. 1990. Nematocidal and bursting activities of essential oils on the larva of *Toxocara canis*. *Shoyakugaku Zasshi* **44**: 183-195.
- Ormsby, O. S. and Montgomery, H. 1954. Disease of the skin. 8th ed. P 1128. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Watanabe, F., Tadaki, S., Takaoka, M., Ishino, M. and Moriya, I. 1989. Killing activities of the volatiles emitted from essential oils for Dermatophagoides pteronyssinus, *Dermatophagoides farinae* and *Tyrophagus putrescentiae*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**: 163-168.
- Yoo, C. K. 1997. The recent trends in research of new antifungal agents. *New drug news.* **5**: 14-24