

## 충치균, *Streptococcus mutans* OMZ176에 대한 황금의 항균활성성분

문용협, 이유희,<sup>1</sup> 민병선, 배기환\*

충남대학교 약학대학, <sup>1</sup>한국인삼연초연구원

## Antibacterial Constituents from *Scutellariae Radix* against *Streptococcus mutans* OMZ176

Yong Hyup Moon, You Hui Lee,<sup>1</sup> Byung Sun Min and Ki Hwan Bae\*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea; and

<sup>1</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

**Abstract** - To develop anticariogenic agents, *Scutellariae Radix* was tested for its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* OMZ176 which is known as a strong cariogenic bacterium. The antibacterial activity was evaluated with disk plate method and minimal inhibitory concentration (MIC). The ethyl acetate fraction showed significant activity. By means of activity-guided fractionation, baicalein and ganhuangenin were isolated as the active principles. The MICs of these compounds were 100 µg/ml and 200 µg/ml, respectively.

**Key words** - *Scutellaria baicalensis*; *Streptococcus mutans* OMZ176; baicalein; ganhuagenin.

충치예방 및 치료약을 개발할 목적으로 *in vitro*에서 충치균(*Streptococcus mutans* OMZ176)에 대하여 수종의 생약을 검색한 결과, 황금의 ethyl acetate 분획물에서 유의성있는 항균활성을 관찰하였다. 황금(*Scutellariae Radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 속씨온풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 제거한 뿌리를 건조한 것으로, 주성분으로서는 wogonin, baicalein, baicalin 등, 지금까지 40여 종의 flavone 및 관련화합물이 분리 보고되었으며,<sup>1)</sup> 그 약리작용으로서는 담즙배설촉진작용,<sup>2)</sup> 항염증작용,<sup>3)</sup> 항알레르기작용,<sup>4)</sup> 지질대사개선작용,<sup>5)</sup> arachidonic acid 대사계에 대한 작용<sup>6)</sup> 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 시중에서 구입한 황금으로부터 얻은 ethyl acetate 추출물을 사용하여 *Streptococcus mutans* OMZ

176에 대한 항균효과를 관찰하면서 지속적으로 크로마토그래피하여 항균활성물질을 분리하여 그의 화학구조를 동정하였으며, *in vitro*에서 항균력을 평가하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료 및 기기** - 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi; 충남대학교 약학대학 생약학교실 소장 품, CNU No. 1851)은 1993년 9월, 대전시내의 한 약전재상에서 구입하여 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(Merck)을, precoated silica gel TLC plate는 silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck)을 사용하였다. magnolol은 본 실험실에서 순수 분리한 것을 사용하였고, Muller-Hinton Agar(Difco), Muller Hinton Broth (Difco) 등의 시약 및 용매류는 국내외의 일급 또는

특급을 사용하였다. 또한 사용한 기기는 다음과 같다. Melting point apparatus: Electrothermal 9100(Electrothermal Eng. Ltd., Germany), UV/VIS Spectrophotometer: PU 8800(Pye Unicam, UK), Infrared Spectrophotometer: IR Report-100(JASCO, Japan), NMR: JNM-EX90 (JEOL, Japan).

**사용균주와 배양** - 실험에 사용된 균주는 본 실험실의 냉장고에 보존중인 *Streptococcus mutans* OMZ176을 사용하였다. 본 균주는 Muller Hinton Agar slant에 이식하여 2번 활성화 시킨 후, 미리 멸균한 Muller Hinton Broth에 접종하여 37°C 항온실에서 16시간 동안 진탕 배양했다.

**Disk plate 법에 의한 항균력 시험 및 최소 밭육 저지 농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 측정** - Namba 등의 보고<sup>7)</sup>에 준하여 실시하였다.

**항균활성 물질의 분리** - 조밀로 한 황금 1 kg을 95% 메탄올로 환류시키면서 3시간씩 3회 추출하여 온시에 여과하고 여액을 감압농축하여 메탄올추출물(120 g)를 얻었다. 메탄올추출물을 증류수 1000 ml에 혼탁시킨 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH의 순으로 분획하였다. 이들 각각의 용매분획물을 disk plate 법에 의해 *S. mutans*에 대하여 항균력을 측정하고 유의성있는 항균효과를 보이는 Et OAc분획물로부터 silica gel column chromatography(silica gel CC)하여 항균활성 물질을 분리하였다. 즉, EtOAc분획물(23 g)을 silica gel CC (benzene-acetone: 20:1 → 1:1)하여 5종의 소분획을 얻었다. 소분획 3을 benzene-acetone(4:1)을 용매로 사용한 silica gel CC하여 silica gel TLC(*n*-hexane-acetone-AcOH=10:2:0.1)에서 Rf값이 0.51인 화합물을 얻고 이를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1)을 사용하여 재결정화하여 compound I을 얻었다(100 mg). 소분획 4로부터는 benzene-acetone(3:1)을 용매로 사용, silica gel CC하여 silica gel TLC(*n*-hexane-acetone-AcOH=6:4:0.1)에서 Rf값이 0.35인 화합물을 얻고 이를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(9:1)을 사용하여 재결정화하여 compound II (80 mg)를 얻었다. 2번 소분획은 silica gel CC (*n*-hexane-EtOAc=2:1)하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(10:1), benzene-acetone(5:1), *n*-hexane-acetone

-AcOH(10:2:0.1)을 용매로 사용한 silica gel TLC에서 Rf 값이 각각 0.67, 0.56, 0.27인 화합물과 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(10:1), benzene-acetone(5:1), *n*-hexane-acetone-AcOH(10:2:0.1)을 용매로 사용한 silica gel TLC에서 Rf 값이 각각 0.64, 0.48 및 0.20인 화합물을 얻었다. 이들 각각을 MeOH을 사용하여 재결정화하여 황색침상결정 compound III (250 mg)와 compound IV (16 mg)를 얻었다.

이와같이 단리된 4종 화합물들은 FeCl<sub>3</sub>/MeOH 시약에 의해 양성반응을 보이며, 이물질들의 에탄올용액에 소량의 magnesium 분말과 염산을 첨가 후 방치시 적갈색을 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**활성물질의 분리 및 동정 - 황금 1 kg을 95% 메탄올로 환류, 추출하여 얻은 메탄올추출물(120 g)로부터 헥산분획물 3.0 g, 에틸아세테이트분획물 23.5 g, 부탄올분획물 25.2 g 및 물분획물 68.2 g을 얻었다. 이들 분획물을 disk plate 법으로 *S. mutans*에 대하여 항균력을 시험한 결과, 에틸아세테이트분획물에서 유의성있는 항균력이 나타났다. 즉, 100 µg/ml 농도에서 저지원이 10-11 mm를 나타냈다. EtOAc분획물을 silica gel CC(benzene-acetone=20:1 → 1:1) 하여 5개의 소분획을 얻었다.**

소분획 3에서 얻은 황색침상결정 compound I은 mp 264-5°C이고, FeCl<sub>3</sub>/MeOH 시약에 양성이며, Mg-HCl에 적갈색을 나타내어 flavonoid 화합물임을 예상할 수 있었다. UV spectrum은 MeOH 용액에서 flavonoid 특유의 spectrum인 B-ring에서 기인되는 320 nm(band I)과 A-ring에서 기인되는 272 nm(band II)에서 극대흡수를 나타내었다. AlCl<sub>3</sub>의 첨가 후 374 nm(band I) 272 nm (band II)에서 극대흡수가 나타나는 bathochromic shift가 일어나 5번 위치에 hydroxyl group이 존재하는 flavone계통의 화합물임을 추측할 수 있었고, 다시 HCl을 첨가시에는 364 nm(band I), 272 nm(band II)에서 극대흡수의 hypochromic shift가 일어나 ortho위치에 hydroxyl group이 존재하는 flavone계통의 화합물임을 추측할 수 있었다. IR spectrum에서 3400 cm<sup>-1</sup>의 hydroxyl group, 1650 cm<sup>-1</sup>의 conjugated carbonyl

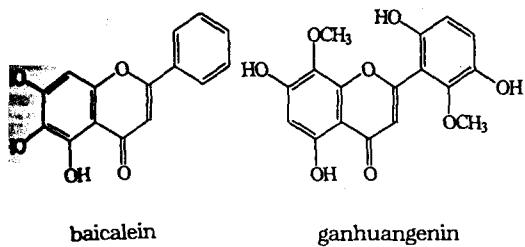


Fig. 1. The antibacterial principles, isolated from *Scutellariae Radix* against *Streptococcus mutans* OMZ176.

group<sup>o</sup>, 1620 cm<sup>-1</sup> 및 1580 cm<sup>-1</sup>의 aromatic C=C가 확인되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 H-3 및 H-8 proton이 6.69, 6.70 ppm에서 각각 singlet으로, B-ring의 phenyl기에 기인하는 5개의 proton들이 7.44-8.02 ppm에서, C-5의 chelate된 OH의 proton은 12.76 ppm에서 확인되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 전체 carbon의 수는 16개임을 확인할 수 있었고, 181.42 ppm에서 4번 위치의 C=O가, 103.00 ppm에서 C-3, 162.4 ppm에서 C-2, 125.1-130.56 ppm에서 B-ring의 phenyl기에 기인하는 6개의 carbon들이 확인되었다. 이상의 물리화학적, 분광학적 자료를 종합하여 이 물질은 baicalein<sup>8)</sup> (5,6,7-trihydroxyflavone)으로 확인하였다(Fig. 1).

소분획 4에서 얻은 황색침상결정 compound II의 mp는 251-256°C이었고, FeCl<sub>3</sub>/MeOH에 양성이며, Mg-HCl에 의해 적갈색을 나타내었다. UV 흡수는 MeOH용액에서 flavonoid특유의 spectrum인 B-ring에서 기인되는 340 nm(band I) 및 A-ring에서 기인되는 260 nm(band II)에서 극대흡수를 나타냈다. AlCl<sub>3</sub> 첨가시 273 nm(band II), 394 nm(band I)에서 극대흡수가 보였고, 다시 HCl을 첨가시에도 273 nm(band II), 394 nm(band I)에서 극대흡수가 일어나 이 물질은 5번위치에 hydroxyl group이 존재하며, ortho위치에는 hydroxyl group이 존재하지 않는 flavone계통의 화합물로 추정할 수 있었다. IR spectrum에서는 3420 cm<sup>-1</sup>의 hydroxyl group, 1650 cm<sup>-1</sup>의 conjugated carbonyl group, 1620 cm<sup>-1</sup>, 1580 cm<sup>-1</sup>의 aromatic C=C가 확인되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 3.72, 3.75 ppm에서 -OCH<sub>3</sub>에 기인하는 proton이 각각 singlet(each 3H)으

로, 6.28 ppm에서 H-3 proton의 singlet으로, 6.32 ppm에서 H-6 proton의 singlet으로, 6.53 ppm에서 H-3' proton의 doublet(*J*=9.0 Hz)으로, 6.85 ppm에서 H-4' proton의 doublet(*J*=9.0 Hz)으로 관찰되었고, 9.93 ppm에서 H-2'의 OH proton이 singlet으로, C-5의 chelate된 OH의 proton은 12.55 ppm에서 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 전체 carbon의 수는 18개임을 확인할 수 있었고, 181.78 ppm에서 C-4의 C=O의 carbon, C-3 carbon이 111.19 ppm에서, C-2 carbon이 161.79 ppm에서, C-2 carbon이 161.79 ppm에서, C-2'의 carbon이 148.30 ppm에서, B-ring의 phenyl기에 기인하는 5개의 carbon들은 114.86-148.31 ppm에서 확인되었다. 이상의 물리화학적 data를 종합한 결과 이 물질은 ganhuangenenin(2',5,5',7-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone)<sup>9)</sup>으로 확인하였다(Fig. 1).

소분획 2를 TLC 전개후 FeCl<sub>3</sub>/MeOH 용액으로 발색시 양성인 물질들을 관찰할 수 있어서 이 물질들을 분리, 동정하였다. 소분획 2를 silica gel CC (*n*-hexane-EtOAc=2:1)하여 황색침상결정인 compound III 및 IV를 얻었다. 이 물질들은 FeCl<sub>3</sub>/MeOH 용액에 의해 청녹색으로 발색되고, 에탄올 용액에 Mg-HCl 첨가 후 방치시 역시 적갈색을 나타내었다. Compound III의 mp는 203°C이었고, UV 흡수는 MeOH용액에서 flavonoid의 특징인 310 nm(band I) 및 274 nm(band I)에서 극대흡수를 나타냈다. AlCl<sub>3</sub> 첨가시 328 nm(Band I), 286 nm(band I)에서 극대흡수가 보였으나, 다시 HCl을 첨가시에도 극대흡수가 변하지 않아 이 물질은 5번 위치에 hydroxyl group이 존재하며, ortho위치에는 hydroxyl group이 존재하지 않는 flavone계열의 물질로 추정할 수 있었다. IR spectrum에서는 3350 cm<sup>-1</sup>의 hydroxyl group, 1650 cm<sup>-1</sup>의 conjugated carbonyl group, 1610 cm<sup>-1</sup>, 1580 cm<sup>-1</sup>의 aromatic C=C가 확인되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 3.95 ppm(3H, s)에서 -OCH<sub>3</sub>에 기인하는 signal, 6.38 ppm에서 H-6 proton의 singlet으로, 6.67 ppm에서 H-3 proton의 singlet으로 관찰되며, 7.50-7.58 ppm(3H, m)에서 3',4',5'의 proton signal 및 7.89-8.00 ppm(2H, m)에서 2',6'의 proton signal이

관찰되고 C-5의 chelate된 OH의 proton이 12.41 ppm에서 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 전체 carbon의 수는 17개임을 확인할 수 있었고, 60.59 ppm에서  $-\text{OCH}_3$ 의 carbon, 181.48 ppm에서 C-4, 104.38 ppm에서 C-3, 162.54 ppm에서 C-2, 125.30-131.00 ppm에서 B-ring의 phenyl기에 기인하는 6개의 carbon들이 관찰되었다. 이상의 물리화학적, 분광학적 자료를 종합한 결과 이 물질은 wogonin(5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone)으로 동정하였다.

Compound IV의 mp는 233-235°C이었고, UV spectrum은 MeOH용액에서 flavonoid특징인 334 nm(band I) 및 274 nm(band I)에서 극대흡수를 나타냈다.  $\text{AlCl}_3$  첨가시 353 nm(Band I), 284 nm(band I)에서 극대흡수가 보였고, 다시 HCl을 첨가시에는 극대흡수가 변하지 않아 이 물질은 5번 위치에 hydroxyl group이 존재하며, ortho위치에는 hydroxyl group이 존재하지 않는 flavone계열의 물질로 추정할 수 있었다. IR spectrum에서는  $3450\text{ cm}^{-1}$ 의 hydroxyl group<sup>a</sup>,  $1640\text{ cm}^{-1}$ 의 conjugated carbonyl group<sup>a</sup>,  $1620\text{ cm}^{-1}$ ,  $1580\text{ cm}^{-1}$ 의 aromatic C=C가 확인되었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 3.94, 4.00, 4.16 ppm에서  $-\text{OCH}_3$ 에 기인하는 singlet signal(each 3H)이 보이며, 7.40 ppm에서 H-3(1H, s) proton이, 7.96 ppm에서 H-6' doublet( $J=6.6\text{ Hz}$ )이, 7.06-7.36 ppm에서 B-ring의 proton에 기인하는 signal이 관찰되었고, 10.07 ppm에서 C-2'의 OH의 proton이, 12.74 ppm에서 chelate된 OH의 proton이 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 전체 carbon의 수는 18개임을 확인할 수 있었고, 59.46, 60.17, 60.62 ppm에서  $-\text{OCH}_3$ 의 carbon, 181.96 ppm에서 C-4, 160.60 ppm에서 C-2, 155.88 ppm에서 C-2', 115.96-131.51 ppm에서 B-ring의 phenyl기에 기인하는 5개의 carbon들이 확인되었다. 이상의 물리화학적, 분광학적 자료를 종합한 결과 이 물질은 tenaxin I(5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone)<sup>10)</sup>으로 확인하였다.

**항균력 평가-** 순수 분리된 compound I, II, III 및 VI를 disk plate 법에 의한 항균력시험을 한 결과 Table I에서와 같이 100  $\mu\text{g}/\text{disk}$ 에서 com-

**Table I.** Antibacterial activities of the isolated compounds from *Scutellariae Radix* against *S. mutans* OMZ176 with disk plate method

Compounds	Diameter of inhibitory zone (mm) <sup>b</sup>			
	25	50	100	200 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ )
baicalein (I)	- <sup>c</sup>	10.2	11.2	13.9
ganhuanggenin (II)	-	9.3	10.2	12.1
wogonin (III)	-	-	-	-
tenaxin I (IV)	-	-	-	-
magnolol	13.5	14.0	15.3	16.2

Incubated for 16 hours on Muller Hinton Agar solid medium. <sup>b</sup>Mean values from three observations and disk is 8 mm in diameter. <sup>c</sup>No inhibitory zone was formed.

pound I 및 II는 inhibitory zone<sup>a</sup> 각각 11.1 mm 및 10.2 mm로서, positive control로 사용한 후박에서 분리된 항균물질인 magnolol(15.3 mm) 보다는 약하나 유의성있는 항균효과를 보였다. 그러나 compound III과 VI는 compound I, II와 같은 flavone계열의 물질임에도 불구하고 전혀 효과를 보이지 않았다.

Table II에서 보듯이 baicalein의 MIC(Minimal Inhibitory concentration)값이 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, ganhuanggenin이 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 이상의 실험 결과 비교물질인 magnolol<sup>11)</sup> 보다는 항균활성이 약한 것으로 판명되었다. 그리고, 에틸아세테이트 분획물의 MIC값이 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임을 생각할 때, 에틸아세테이트 분획물은 본 실험에서 분리하지 못하였으나 항균력이 강한 소량의 물질들이 함유되어 있거나, baicalein이나 ganhuanggenin과 같은 항균성물질들의 상승작용에 기인한 것이 아닌가 생각된다.

**Table II.** Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of baicalein, ganhuanggenin and magnolol against *S. mutans* OMZ176

Compounds	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
baicalein (I)	100.00
ganhuanggenin (II)	200.00
magnolol	6.25

Incubated for 16 hours at 37°C in Muller Hinton Broth liquid medium ( $10^5$  colony forming units/ml).

## 결 론

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

1. 황금의 에틸아세테이트 분획물에서 4종의 flavone계의 물질을 단리하고, 물리화학적 자료 및 분광학적 자료에 의하여 그 구조를 각각 baicalein, ganhuangenin, wogonin 및 tenaxin I으로 동정하였으며, 그 중 baicalin과 ganhuangenin은 *S. mutans* OMZ176에 대해 항균력을 나타냈다.
2. baicalein 및 ganhuangenin의 *S. mutans* OMZ176에 대하여 100 µg/disk에서 inhibitory zone이 각각 11.1 mm, 10.2 mm이였고, 최소저지 농도(MIC)는 각각 100 µg/ml와 200 µg/ml이었다.

## 인용문헌

1. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese Drugs of Plant Origin, 919-929. Springer-Verlag.
2. Abe, K., Inoue, O. and Yumioka, E. (1990) Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 208-211.
3. Kubo, M., Matusuda, H., Kimura, Y., Okuda, H., Higashino, M., Tani, T., Namba, K. and Arichi, S. (1984) Studies on Scutellariae Radix. VII. Anti-arthritis and anti-inflammatory action of methanolic extract and flavonoid components from Scutellariae Radix. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 2411-2415.
4. Kubo, M., Matusuda, H., Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S. (1984) Scutellariae Radix. X. Inhibitory effects of various flavonoids on histamine release peritoneal mast cells *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 2724-2729.
5. Kimura, Y., Okuda, H., Tani, T. and Arichi, S. (1982) Studies on Scutellariae Radix. IV. Effects of various flavone compounds on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 1792-1795.
6. Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S. (1985) Studies on Scutellariae Radix. VII. Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism on leukocytes. *Planta Medica* 51: 132-136.
7. Namba, T., Tsunezuka, M., Bae, K. and Hattori, M. (1985) Studies on dental caries prevention by Chinese medicines. Screening of crude drugs for antibacterial action against *Streptococcus mutans*. *Shoyakugaku Zasshi* 35: 295-302.
8. Takida, M., Aimi, M., Takahashi, S., Yamanouchi, S., Torii, H. and Dohi, S. (1975) Constituents in the water extracts of crude drugs. I. Root of *Scutellaria baicalensis*. *Yakugaku Zasshi* 95: 108-113.
9. Kimura, Y., Okuda, H., Taria, Z., Shoji, N., Takemoto, T. and Arichi, S. (1984) Studies on Scutellariae Radix. IX. New component inhibiting lipid peroxidation in rat liver. *Planta Medica* 50: 290-295.
10. Tomimori, T., Miyaichi, Y., Kizu, H., Tanabe, Y. (1983) Studies on the constituents of *Scutellaria* species. II. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Yakugaku Zasshi* 103: 607-611.
11. Do, D. S., Min, B. S. and Bae, K. H. (1996) Isolation of the antibacterial constituents from *Crassihizoma Rhizoma* and evaluation of activity. *Yakhak Hoeji* 40: 478-481.

(1997년 5월 23일 접수)