紅景天(*Rhodiola sachlinensis*)에서 항균성 물질의 분리 및 동정

심창주[1] · 이규희[1] · 정재홍[1] · 이상덕[1] · 김영호[2] · 오만진[1†]
[1]충남대학교 식품공학과, [2]충남대학교 약학대학 약학부

Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substances from *Rhodiola sachlinensis*

Chang-Ju Shim[1], Gyu-Hee Lee[1], Jae-Hong Jung[1], Sang-Duk Yi[1], Young-Ho Kim[2] and Man-Jin Oh[1†]
[1]*Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea*
[2]*Division of Pharmacy, Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea*

Abstract

The antimicrobial substances from *Rhodiola sachalinensis* were extracted, isolated and identified. The highest level of antimicrobial activity and its yield were obtained in methanol extract. The minimum inhibition concentrations of the methanol extract were 500 μg/mL on agar plate and 100 μg/mL in broth media for four gram positive and four gram negative microbials. The methanol extract was fractionated by *n*-hexane, chloroform, ethyl ether, ethyl acetate, and butanol, orderly. The separate was developed on the TLC plate with different solvent system ratio of chloroform and methanol. Nine substances were isolated from chloroform and methanol mixture(9:1, v/v). Among them, three isolates showed antimicrobial activity. Three substances separated by HPLC were identified by GC/MS(EI) spectrum and ^{1}H, ^{13}C-NMR spectrum. They were gallic acid, (-)-epicatechin and kaempferol. The antimicrobial activities of each substances were shown gallic acid, (-)-epicatechin, kaempferol, orderly.

Key words : *Rhodiola sachalinensis*, antimicrobial activity, methanol extract

서 론

식품에 있어 부패는 식품의 구성성분이나 조건에 따라 다소 차이는 있지만 대부분 미생물에 의하여 일어나므로 미생물을 사멸하거나 생육을 억제하는 식품 방부 소재는 중요한 연구대상이 되어 왔다(1,2).

현재 우리나라의 식품 위생법에서는 소르빈산, 안식향산 등 화학합성품이 보존료로 사용이 허가되어 종류별로 사용기준이 설정되어 있으나, 실제로 이들 보존료의 사용기준이 제대로 지켜지지 않는 경우가 많다. 이러한 화학합성 보존료들이 지속적으로 체내에 축적될 경우에 만성독성, 돌연변이 유발성 등의 우려가 있어 소비자들은 이들 식품보존료의 사용제품을 기피하는 경향이 있어 인체에 해가 없는 천연물로서 광범위한 항균작용을 나타내는 항균제의 개발이 시급한 실정이다(3).

현재까지 천연 식용식물에서의 항균물질에 관한 연구는 녹차(4,5), 감초(*Glycyrrhiza uralensis* FISCH)(6), 목단피(*Moutan cortex*)(7), 무화과 잎(*Ficus carica*)(8), 갓(*Brassica juncea*)(9), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)(10), 고삼(*Sophora flavescens* Ait.)(11), 부추(*Allium tuberosum*)(12), 산국(*Chrysanthenum boreale*)(13) 등에 대하여 행하여 왔다.

본 연구의 실험재료로 사용한 홍경천(*Rhodiola sachlinensis* : 참돌꽃)은 한방이나 민간요법에서 신체쇠퇴 억제, 노인병, 당뇨병, 각혈, 해열, 화상 등에 유효하다고 알려져 왔고(14,15) 노화방지와 성인병예방의 소재로 연구되어 왔으며(16), 항산화작용과 항돌연변이성에 대한 연구가 있다(17).

본 연구에서는 실용적인 천연 항균제를 개발하기 위하여 홍경천을 이용하여 용매별 추출물의 항균력을 검색하고, 여러 종류의 용매로 순차분획한 후 silica-gel column chromatography, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography로 항균성 물질을 순수분리하여 GC/MS(EI), ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR로 동정하였다.

재료 및 방법

공시재료

†Corresponding author. E-mail : ohmj@cnu.ac.kr,
Phone : 82-42-821-6728, Fax : 82-42-821-6728

본 실험에 사용한 홍경천은 1999년 중국 길림성 연변에서 구입한 것을 음건 세절한 후 시료로 사용하였다.

시약 및 분석기기

항균성분 추출과 순차 분획용 유기용매(methanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol) 는 99%이상의 1급 및 특급 시약, HPLC, NMR, GC/MS(EI) 분석용매는 Fisher의 99.9%이상의 특급용매를 helium degassing하여 사용하였다. Column chromatography의 resin으로 사용한 silica gel 60과 TLC plate(silica gel 60, 20×20 cm, 0.25 mm)는 Merck사의 제품을 사용하였으며, HPLC 는 spectra system P-2000 (TSP, USA)을, gas chromatography는 JMS-SX 102A(JEOL, Japan)을, mass spectrometer (High Resolution-EI)는 DS6200 GC (Donam, Korea), NMR spectrometer는 DMX-300(300 MHz)와 DMX-600 (600 MHz, Bruker, Germany)를 사용하였다.

공시균주

항균활성 측정에 사용된 공시균주는 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자 은행에서 분양받아 사용하였으며, 항균활성 측정에 사용된 배지는 Difco의 nutrient agar를 기층용 배지로, Mueller Hinton medium을 중층용 배지로 사용하였으며, nutrient broth 배지는 계대 배양용을 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주는 Table 1 과 같다.

Table 1. List of strains used to antimicrobial experiment

	Strain
Gram positive	*Bcillus cereus* ATCC 11778
	Bacillus subtilis ATCC 6633
	Staphylococcus aureus ATCC 1320
	Strepcoccus faecalis ATCC 13301
Gram negative	*Salmonella typhimurium* ATCC 14028
	Listeria monocytogenes ATCC 7644
	Escherichia coli ATCC 10536
	Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894

항균활성 최소 저해농도 측정

항균력 과 최소 저해농도 측정은 한천배지 확산법(agar diffusion method)으로 측정하였다. 즉, 각각의 시료용액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 제균하고 멸균된 paper disk에 60 mL씩을 흡수시키고 추출용매를 완전히 증발시켜 시험용 평판배지위에 밀착시킨 후 75 mL의 멸균된 증류수를 paper disk 위에 떨어뜨려 확산시킨 다음 4℃냉장고에서 1시간 방치 후 31℃ incubator에서 24~48시간 배양 후 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다.

추출물의 제조

항균활성이 가장 좋은 추출용매를 확인하기 위해 홍경천 100 g에 각각의 acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol, chloroform, water 용매를 10배량 가하여 24시간 동안 환류추출 후 다시 용매를 10배량 가하여 24시간동안 2차 추출하고 glass filter로 여과하여 50℃에서 vacuum evaporator로 감압하에서 농축하고 50℃에서 nitrogen evaporator로 용매를 완전히 제거한 후 24시간 동결건조시켜 증류수에 100 mL로 정용하여 항균력을 측정하였다.

홍경천 methanol 추출물의 용매분획

홍경천 methanol 추출물에 극성을 달리하는 *n*-hexane, chloroform, ethyl ether, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol을 2배량 가하여 1시간 동안 funnel shaker로 shaking하여 3회 순차 분획하고 각 분획용매를 회수하여 50℃에서 감압농축 후 항균력을 측정하였다 (Fig. 1).

Silica-gel column chromatography

홍경천 methanol 추출물을 순차분획하여 얻은 각 분획물들의 항균활성을 측정 비교한 후, 활성이 가장 강한 ethyl acetate 분획물로부터 유효성분을 검색할 목적으로 silica-gel column chromatography를 행하였다. 이때 사용된 column의 크기는 4×30 cm 였고, chloroform-methanol 용매계로 0~100%까지 단계적으로 gradient하여 각각 분당 10mL씩 fraction collector로 분취하고 subfraction을 농축하여 paper disk법으로 항균활성을 측정하였다.

Thin-layer chromatography

항균성이 확인된 silica-gel 분획물을 capillary tube로 silica-gel TLC plate(10 cm×20 cm×0.5 mm, Merck))상에 점적한 후 전개용매에 의해 포화 상태가 형성된 chamber에서 전개시켰다. 전개용매는 chloroform-methanol(9:1, v/v)을 사용하였으며, UV 254 nm와 365 nm에서 관찰하였다.

High performance liquid chromatography

TLC에서 항균성이 확인된 band를 모아서 감압농축한 항균성 물질을 HPLC를 이용하여 최종 순수분리하였다. Semi preparative HPLC(Spectra System-P2000, USA), C_{18} column (Waters, μ-bondapack C_{18})을 이용하여 1차적으로 acetonitrile과 water의 용매를 사용해 gradient하여 가장 분리가 잘 되는 용매비율을 확인한 후 농축한 각 band를 HPLC로 분취하여 항균력을 확인하였다. HPLC의 분석조건은 Table 2와 같다.

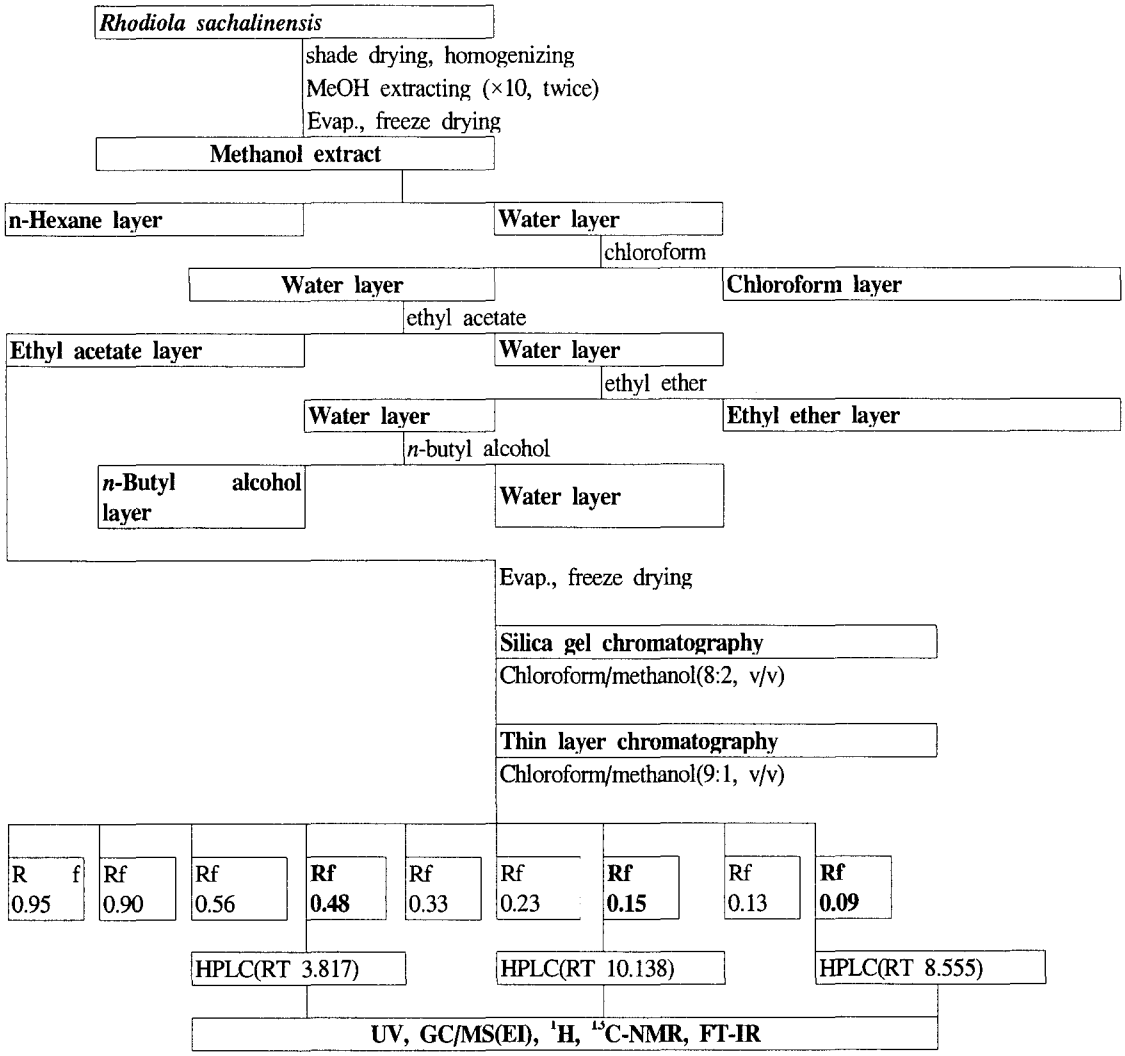

Fig. 1. Purification and isolation procedure of antimicrobial substances in Rhodiola sachalinensis.

Table 2. Operating conditions of preparative HPLC for analysis of antimicrobial component of *Rhodiola sachalinensis* extracts

Column	μ-Bondapak C_{18} (7.9×300 mm)
Mobile phase	water / acetonitrile (7:3, v/v)
Flow rate	2 mL/min
Detector	UV 254 nm
Injection volumn	500 μL

Gas Chromatography/Mass Spectrometer(EI-Mass)

순수분리된 항균성분 1 ㎎을 순수 Methanol에 녹여 JEOL SX-102A(254℃, high resolve)에 점작하여 gas chromatography에서 휘발성 성분들을 분리시키고 electron impact 이온화법을 이용하여 70 V로 이온화시킨 물질을 capillary column(DB-5)에 통과시켜 분자량을 측정하였다.

^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spectrum

순수분리된 항균성분을 tetramethylsilane 내부표준물질로 첨가하여 $CDCl_3$(^{13}C-NMR)와 D_2O(^{1}H-NMR)에 녹인 다음 여과하면서 NMR용 tube에 넣고 DMX-300(300 MHz), DMX-600(600 MHz)를 이용하여 ^{1}H-NMR와 ^{13}C-NMR spectrum을 분석하였다.

결과 및 고찰

추출물의 제조

홍경천의 항균물질 용매별 추출물의 항균력은 Table 3과 같이 각 용매별 추출물에서 전반적으로 항균력을 보였으며, 그 중에서도 methanol 추출물이 타 용매에 비해 월등히 높은

항균력을 보였다. 또한 추출물의 건조 후 수율에서도 ethyl acetate, chloroform 및 물 추출물은 3% 이하의 수율을 나타내었고, acetone 4.7%, ethanol 18.7%, methanol 19.8%의 수율을 보였다. 이와 같은 결과는 송 등(1)의 한약재 추출물의 항균력 검색, 여 등(4)의 천연 식물로부터의 항균력 검색에 대한 실험결과와 비슷하게 나타났으므로 홍경천의 항균성 물질 추출용매로는 methanol이 적절한 용매로 판단되었다.

Table 3. Antimicrobial activities of *Rhodiola sachlinensis* extracts against various microorganisms

(Dia. of inhibition zone : mm)

Strain	Solvent[1)]					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Bcillus cereus ATCC 11778	11	16	15	-	13	11
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	15	15	-	10	11
Staphylococcus aureus ATCC 1320	10	17	15	-	13	12
Strepcoccus faecalis ATCC 13301	-	18	14	-	11	-
Salmonella typhimurium ATCC 14028	11	12	12	-	10	10
Listeria monocytogenes ATCC 7644	11	15	14	-	10	-
Escherichia coli ATCC 10536	10	14	13	12	11	11
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894	11	12	12	10	11	11

[1)] S1 : Water extract, S2 : Methanol extract, S3 : Ethanol extract S4 : Chloroform extract, S5 : Acetone extract S6 : Ethyl acetate extract.

최소 저해농도 측정

홍경천 methanol 추출물을 그람음성과 양성의 대표 균주에 대해 고체배지와 액체배지에서 최소저해농도를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 그람음성균들에 비해 그람양성균들이 대체적으로 저해가 크게 나타났으며, 고체배지의 경우 최소 500 ㎍/mL 의 농도에서 전체 시험균주에 대한 저해를 나타내었고 액체배지의 경우 최소 100 ㎍/mL의 농도에서 저해를 나타내었다. 이 등(18)은 유백피 추출물이 *Bacillus subtilis* 등 그람양성균 5종과 *Escherichia coli* 등 그람음성균 5종에 대한 저해농도가 15~20 ㎎/mL이라고 보고하였고, 박 등(25)이 갓 추출물의 최소저해농도가 *Escherichia coli* 균주에 대해 35 ㎎/mL이고 다른 균주에 대해서는 40~60 ㎎/mL에서 최소저해를 나타낸 것과 비교해 볼 때 홍경천 추출물은 월등히 높은 항균활성을 나타내었다.

methanol 추출물의 순차분획

홍경천 methanol 추출물을 증류수에 100 mL로 정용한 후 극성을 달리하는 용매를 2배량 사용하여 순차분획을 한 각각의 분획물을 다시 감압 농축하여 항균력을 시험한 결과 Table 5와 같이 *n*-hexane과 chloroform분획은 특정균에 대해서만 어느 정도의 항균력을 보였으며, ethyl acetate 분획과 *n*-butyl alcohol 분획은 타 용매 분획과 비교해 월등한 항균력을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 홍경천 methanol 추출물 중의 항균물질은 특정용매에만 해당되지 않고 일부 다른 용매에도 용해되는 성분으로서 한가지 성분이라기 보다는 여러 가지 항균성 물질이 서로 복합적으로 작용하고 있는 것을 추측 할 수 있었으며, 그 중 항균물질이 ethyl acetate와 *n*-butyl alcohol 분획으로 많이 이행되었음을 알 수 있었다.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations(MIC) of *Rhodiola sachlinensis* methanol extracts against microorgarnisms in nutrient agar media

(Dia. of inhibition zone)

Strain	100 ㎍	500 ㎍	1 mg	5 mg
B. cereus ATCC 11778	±[1)]	+	++	+++
B. subtilis ATCC 6633	-	±	+	+++
S. aureus ATCC 1320	±	+	+++	+++
S. faecalis ATCC 13301	±	+	++	+++
S. typhimurium ATCC 14028	-	+	++	+++
Lt. monocytogenes ATCC 7644	±	+	+++	+++
E. coli ATCC 10536	-	±	+	+++
E. coli O157:H7 ATCC 43894	-	±	+	++

[1)] - :No inhibition, ±: Very slight inhibition(8~9 mm), +: Slight inhibition(9~11 mm), ++: Moderate inhibition(11~13 mm), +++: Heavy inhibition(>13 mm).

Table 5. Antimicrobial activities of from *Rhodiola sachlinensis* extracts in purified stage against various microorganisms

(Dia. of inhibition zone)

Strain	Fraction[1)]				
	F1	F2	F3	F4	F5
Bacillus cereus ATCC 11778	±[2)]	++	+++	-	+++
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	++	+++	-	+++
Staphylococcus aureus ATCC 1320	±	++	+++	-	+++
Strepcoccus faecalis ATCC 13301	±	++	+++	±	+++
Salmonella typhimurium ATCC 14028	-	+	++	-	++
Listeria monocytogenes ATCC 7644	-	+	+++	-	+++
Escherichia coli ATCC 10536	±	++	+++	-	+++
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894	-	-	++	-	+++

[1)] F1 : n-Hexane fraction, F2 : Chloroform fraction, F3 : Ethyl acetate fraction, F4 : Ehyl ether fraction, F5 : n-Butyl alcohol fraction.

[2)] -:No inhibition, ±:Very slight inhibition(8~9 mm), +:Sight inhibition (10~12 mm), ++:Moderate inhibition(13~15 mm), +++:Heavy inhibition(>16 mm).

이와 같은 결과는 안 등(6)의 감초 추출물의 항균활성 연구와 권 등(7)의 목단피 추출물의 항균작용, 홍 등(19)의 유백피 추출물에서 감초와 목단피, 유백피를 chloroform, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol로 각각 처리하여 얻은 분획물에서 *n*-butyl alcohol 분획물의 항균활성이 다른 분획물 보다 높았다는 보고와 일치하는 경향을 나타내었다. 또한 이 등(20)의 천연식물의 항균성 검색에서는 chloroform 분획에서만 항균효과를 보이고 있어 분획 용매별로 각 균주에 대한 항균성이 다른 것은 항균성 물질이 단일물질이 아니라는 것을 시사하는 것으로 사료되었다. 본 실험에서는 ethyl acetate와

chloroform 분획에서 항균효과를 보였으나 당이나 단백질과 같은 일반 성분들이 다량으로 추출되어지기 때문에 분리가 어려우므로 ethyl acetate 분획을 항균성 물질 분획으로 분취하였다.

Silica-gel column chromatography

극성을 달리하는 각각의 용매별 순차분획물을 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*에 대해 항균활성을 확인한 결과 Fig. 2과 같이 chloroform과 methanol의 비율이 8:2(v/v)에서 가장 우수한 항균력을 나타내었다.

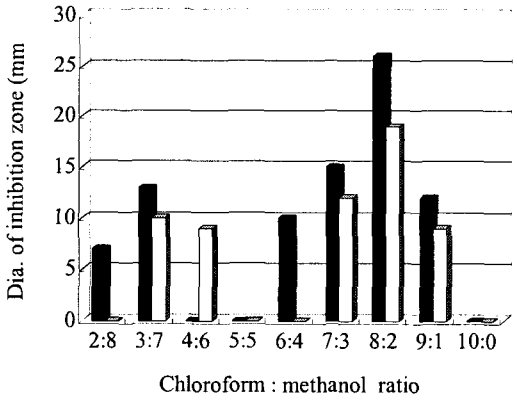

Fig. 2. Antimicrobial activities of the fraction of ethyl acetate of *Rhodiola sachlinensis* extract fractionated by silica-gel column chromatography against *Staphylococcus aureus* ATCC 13301(■) & Escherichia coli ATCC 10536 (□).

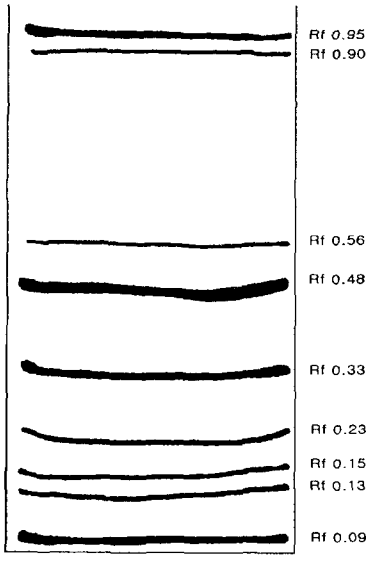

Fig. 3. Thin-layer chromatogram of subfraction $CHCl_3$: MeOH(9:1, v/v) isolated from ethyl acetate fraction of *Rhodiola sachlinensis*.

Thin-layer chromatography

Silica-gel chromatography를 행하여 chloroform-methanol(8:2, v/v)에서 나온 subfraction을 분취하여 TLC plate에 전개시킨 결과, Fig. 3와 같이 9개의 물질군을 얻을 수 있었다. Rf 0.13을 제외한 모든 band가 254 nm에서 확인되었고, 그 중 Rf 0.95의 band는 254 nm, 365 nm에서 같이 확인되었다. Rf 0.13의 band는 365 nm에서만 확인되었으며, 이들을 각각 methanol에 용출하여 항균활성을 확인한 결과 Table 6에서와 같이 Rf 0.48, Rf 0.15 및 Rf 0.09에서 항균활성이 나타남을 알 수 있었다.

Table 6. Antimicrobial activities of the subfraction of ethyl acetate extract fractionated by TLC against *Staphylococcus aureus* ATCC 13301 & *Escherichia coli* ATCC 10536

Subfraction	[1]detecting wavelength		[2]antimicrobial activity	
	254 nm	365 nm	*S. aureus*	*E. coli*
Rf 0.95	D	D	-	-
Rf 0.90	D	ND	-	-
Rf 0.56	D	ND	-	-
Rf 0.48	D	ND	+++	++
Rf 0.33	D	ND	-	-
Rf 0.23	D	ND	-	-
Rf 0.15	D	ND	++	+
Rf 0.13	ND	D	-	-
Rf 0.09	D	ND	++	+

[1] D:Detecting, ND:Not detecting [2] -:No inhibition, +:Slight inhibition(8~11 mm), ++:Moderate inhibition(11~14 mm), +++:Heavy inhibition(>14 mm).

High performance liquid chromatography

TLC에서 항균력이 확인된 Rf 0.48, Rf 0.15 및 Rf 0.09의 subfraction 각각을 모아서 감압농축 하여 용매를 제거한 후 증류수에 녹여 semi preparative HPLC를 이용해 최종적으로 순수분리하였다. 그 결과 Fig. 4, Fig. 5 및 Fig. 6의 각 물질에 대한 최종 chromatogram을 얻을 수 있었으며, 각각의 chromatogram에서 Fig.3의 TLC Rf 0.48에서 용출한 RT 3.817, 7.485, Fig. 4의 Rf 0.15에서 용출한 RT 10.138, 10.795, Fig.5의 Rf 0.09에서 용출한 RT 6.766, 8.555의 각 peak들을 분취하여 항균력을 확인한 결과 Rf 0.48 band의 RT 3.817 peak, Rf 0.15band의 10.138 peak, Rf 0.09 band의 RT 8.555 peak에서 항균력을 확인하여 prep. HPLC로 분취한 순수분리 물질들을 동결건조하여 구조를 분석하였다.

[I] peak의 구조분석

순수분리된 RT 3.187[I] peak의 항균성분 1 mg을 각각 순수 methanol에 녹여 GC/MS(EI) spectrum을 측정한 결과 각각 분자량 *m/z* 170$[M]^+$[I]으로 분석되었다.

^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spectrum을 측정한 결과 ^{1}H-NMR(300 MHz, $CDCl_3$) δ7.22(2H) ^{13}C-NMR(300 MHz, $CDCl_3$) δ 170.5(COO), 146.2(C-3), 145.7(C-5), 139.4(C-4), 121.7(C-1), 110.3(C-2), 110.7(C-6)으로 분석되어, 각 흡수 peak와 mass spectrum을 조합하고 Wiley/NBS mass library를 비교하였으며 standard 물질을 HPLC로 확인한 결과 [Ⅰ] 물질은 gallic acid(3,4,5- Trihydroxybenzoic acid)로 확인되었다.

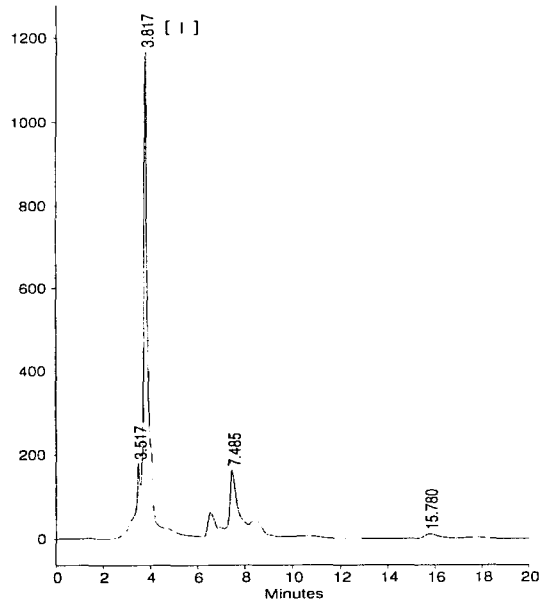

Fig. 4. HPLC chromatogram of TLC Rf 0.48 subfraction of *Rhodiola sachlinensis* extract.

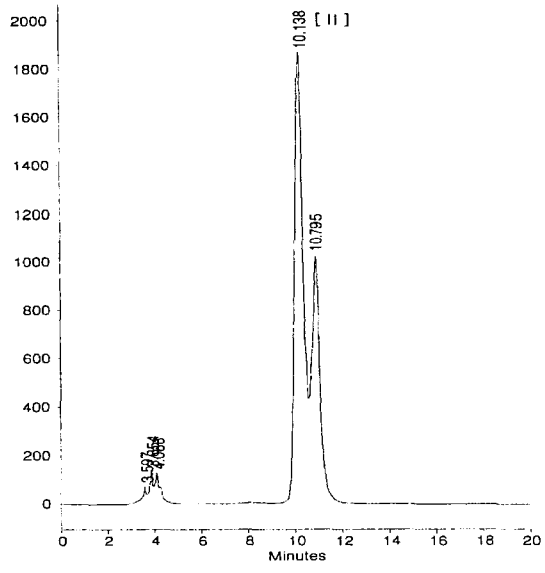

Fig. 5. HPLC chromatogram of TLC Rf 0.15 subfraction of *Rhodiola sachlinensis* extract.

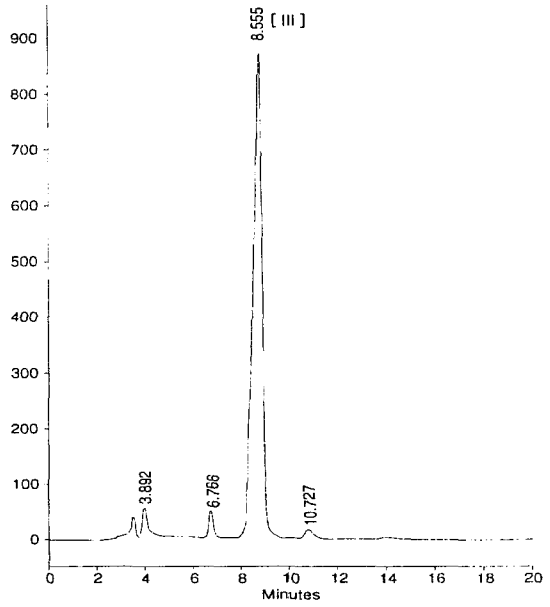

Fig. 6. HPLC chromatogram of TLC Rf 0.09 subfraction of *Rhodiola sachlinensis* extract.

〔Ⅱ〕 peak의 구조분석

순수분리된 RT 10.138[Ⅱ] peak의 항균성분 1㎎을 각각 순수 methanol에 녹여 GC/MS(EI) spectrum을 측정한 결과 각각 분자량 *m/z* 290$[M]^{+}$[Ⅱ]으로 분석되었다.

[Ⅱ] 물질은 ^{1}H-NMR(600 MHz, D_2O) δ6.79(H-2'), 6.72(H-5'), 6.65(H-6'), 6.02(H-8), 5.97(H-6), 5.25(H-2), 4.78(H-4), ^{13}C-NMR(600 MHz, D_2O) δ156.2(C-5), 155.6(C-7), 155.2(C-9), 144.8(C-4'), 130.4(C-3'), 118.3 (C-1'), 115.1(C-6'), 114.3(C-5'), 106.9(C-2'), 98.3(C-10), 96.1(C-6), 95.0(C-8), 78.1(C-2), 69.1(C-3), 27.4(C-4)로 분석되었다.

각 흡수 peak와 mass spectrum을 조합하고 Wiley/NBS mass library를 비교하였으며 standard 물질을 HPLC로 확인한 결과 [Ⅱ] 물질은 (-)-epicatechin (cis-2-[3,4-Dihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol)으로 확인되었다.

〔Ⅲ〕 peak의 구조분석

순수분리된 RT 8.555[Ⅲ]peak의 항균성분을 위와 같은 방법으로 GC/MS(EI) spectrum을 분석한 결과 *m/z* 286$[M]^{+}$[Ⅲ] 측정되었으며, ^{1}H-NMR(600 MHz, D_2O) δ8.07(H-2'), 8.06 (H-6'), 6.89(H-3'), 6.88(H-5'), 6.37(H-8), 6.1(H-6), 4.8(H-5), ^{13}C-NMR (600 MHz, D_2O) δ177.3(C-4), 165.5(C-7), 162.4(C-5), 160.5(C-4'), 158.2(C-9), 148.0(C-2), 137.0(C-3), 130.8(C-2'), 130.6(C-6'), 123.7(C-1'), 116.4(C-3'), 116.2(C-5'), 104.5(C-10), 99.2(C-6), 94.4(C-8)로 분석되었다. 각 흡수 peak와 mass

spectrum을 조합하고 Wiley/ NBS mass library를 비교하였으며, standard 물질을 HPLC로 확인한 결과 [III] 물질은 kaempferol (3,5,7-Trihydroxy-2-[4-hydroxyphenyl]-4H-1-benzopyran- 4-one)로 확인되었다.

분리 정제된 항균물질의 최소저해농도측정

홍경천의 추출, 분리 및 정제 과정을 거쳐 확인된 3가지 항균물질의 최소저해농도를 고체배지에서 확인한 결과, Table 7과 같이 균주에 따라 저해의 차이는 있지만 대체로 100~500㎍/㎖에서 저해를 나타내었다.

Table 7. Minimum inhibitory concentrations of gallic acid, (-)- epicatechin and kaempferol against microorgarnisms

(60 μL lodaing on paper disk)

Strains	Gallic acid				
	100 μg	500 μg	1 mg	5 mg	10 mg
Bacillus cereus	-[1)]	-	-	±	+
Bacillus subtilis	-	-	±	+	++
Staphylococcus aureus	-	±	+	++	+++
Streptococcus faecalis	-	-	±	+	++
Salmonella typimurium	-	-	±	+	++
Listeria monocytogenes	-	±	+	++	+++
Escherichia coli	-	-	±	+	++
Escherichia coli O157	-	-	-	+	+
	(-)-Epicatechin				
	100 μg	500 μg	1 mg	5 mg	10 mg
Bacillus cereus	-	-	-	+	++
Bacillus subtilis	-	-	-	+	++
Staphylococcus aureus	±	+	++	+++	+++
Streptococcus faecalis	-	-	-	-	+
Salmonella typimurium	-	-	-	+	++
Listeria monocytogenes	±	+	+	++	+++
Escherichia coli	-	-	-	+	++
Escherichia coli O157	-	-	-	±	+
	Kaempferol				
	100 μg	500 μg	1 mg	5 mg	10 mg
Bacillus cereus	-	-	-	±	+
Bacillus subtilis	-	-	-	±	+
Staphylococcus aureus	-	±	+	+++	+++
Streptococcus faecalis	-	-	-	-	+
Salmonella typimurium	-	-	-	-	+
Listeria monocytogenes	-	±	+	++	+++
Escherichia coli	-	-	-	-	+
Escherichia coli O157	-	-	-	-	+

[1)] -:No inhibition, ±:Very slight inhibition(8~9 mm), +:Slight inhibition(10~11 mm), ++:Moderate inhibition(12~13 mm), +++:Heavy inhibition(>14 mm).

지금까지 보고된 천연식물의 항균성 물질인 liquiritigenin(6), isorhamnetin (13), benzoic acid, salicylic acid, 3-hydrobenzoic, guaiacol, 4-vinylphenol 등의 phenolic compound(21) 등과 비교하여 월등한 저해력을 나타내었다.

여(4) 등은 녹차, 오룡차 및 홍차의 항균성분 연구의 보고에서 조 catechin 함량이 많은 녹차에서 항균효과가 강한 것으로 보고하였다. 녹차에서의 catechin류 함량은 (-)-epigallocatechin-gallate(EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin -gallate(ECG), (-)epicatechin(EC) 순의 함량으로 나타났지만 non-gallate 화합물인 EC나 EGC 보다 gallate기가 결합된 ECG나 EGCG가 강한 항균작용을 나타내며, 이들 catechin류의 항균작용의 크기는 catechin 분자 중 B-ring의 3′,4′ 및 5′의 위치에 존재하는 3개의 OH, 즉 gallic acid에서 강한 항균작용을 나타낸다 보고하였다(39).

요 약

홍경천의 천연 보존료로서의 이용성을 검토하기 위하여 각종 용매로 홍경천 추출물을 제조하고 극성에 따라 순차분획, silica-gel chromatography, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography의 분리과정을 거쳐 순수분리된 각 물질을 GC/MS(EI) spectrum, ^{1}H-NMR spectrum, ^{13}C-NMR spectrum을 이용하여 항균물질을 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

홍경천에 대해 acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol, chloroform, water의 각 용매로 추출한 결과 항균성분의 추출용매로는 methanol이 가장 우수하였다. 홍경천 methanol 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethyl ether, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol로 분획한 결과 ethyl acetate와 *n*-butyl alcohol 분획에서 우수한 항균력을 나타내었다. 홍경천 methanol 추출물은 그람양성 4균주와 그람음성 4균주에 대해 고체 배지의 경우 대체로 500 μg/mL에서 최소저해를 나타냈으며, 액체배지의 경우 100 μg/mL 내외에서 최소저해를 나타내었다.

Silica gel column chromatography에서 용매의 비율을 높여가며 용출한 결과 chloroform : methanol(8:2, v/v)의 비율에서 항균력이 가장 높게 나타났다. 분리된 항균성분을 silica-gel TLC plate에 용매의 비율을 높여가며 전개시켜 chloroform : methanol(9:1, v/v)에서 9개의 물질군을 얻을 수 있었으며, 그 중 항균력이 확인된 3개의 물질군을 HPLC와 NMR spectrum을 분석한 결과 gallic acid, (-)-epicatechin 및 kaempferol로 동정되었다. gallic acid, (-)-epicatechin, kaempferol의 항균물질 각각의 최소저해농도는 *Staphylococcus aureus*와 *Listeria monocytogenes* 에 대해 gallic acid와 kaempferol이 500 μg/mL, (-)-epicatechin이 100 μg/mL에서 저해를 나타내었다.

참고문헌

1. Song, J.H., Kwon, H.D., Lee, W.K. and Park, I.H. (1998) Antimicrobial activity and composition of extract from *Smilax china* root. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 27, 574-584
2. Kang, S.K. and Jeong, H.J. (1995) Solvent fractionation of Fig leaves and its antimicrobial activity. Agri. Chem. and Biotechn., 38, 289-292
3. Paek, W.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R. (1992) Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr., 21, 91-96
4. Yeo, S.G., Ahn, C.W., Kim, I.S., Park, Y.B., Park, Y.H. and Kim, S.B. (1995) Antimicrobial effect of tea extract from green tea, Oolong tea and Black tea. J. Korean Soc. Food Nurt., 24, 293-298
5. Roh, H.J., Shin, Y.S., Lee, K.S. and Shin, M.K. (1996) Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice. Korean J. Food Sci. Technol., 28, 61-71
6. Ahn, E.Y., Shim, D.H., Back, N.I. and Oh, J.A. (1998) Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 680-687
7. Kweon, O.G., Son, J.C., Kim, S.C., Chung, S.K. and Park, S.W. (1998) Antimicrobial and antioxidative activities from *Moutan cortex* extract. Korean J. Postharvest Sci. Technol., 5, 281-285
8. Kang, S.K., Chung, D.O. and Chung, H.J. (1995) Purification and identification of antimicrobial substances in phenolic fraction of leaves. Agri. chem. biotechn., 38, 193-296
9. Park, S.K., Park, J.R., Lee, S.W., Seo, K.I., Kang, S.K. and Shim, K.W. (1995) Antimicrobial activity and heat stability of water-pretreated extract of leaf mustard Dolsan. J. Korean Soc. Food Nutr., 24, 707-712
10. Mok, J.S., Park, W.Y., Kim, Y.M. and Chang, D.S. (1994) Effect of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae radix* extract. J. Korean Soc. Food Nutr., 23, 1001-1007
11. Ahn, E.Y., Shin, D.W, baek, N.J. and Oh, J.A. (1998) Isolation Identification of antimicrobial active substance from Sophora flavescens. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 672-679
12. Kim, S.J. and Park, K.H. (1995) Retardation of *Kimchi* fermentation by the extracts of Allium tuberosum and growth inhibition of related microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 813-818
13. 金洙哲, 安相得, 李相來 (1994) 原色白頭山資源植物, 아카데미서적, p.324
14. 文館深(1984)藥草의 成分과 利用, 日月書閣, p.261
15. Zang, Z.H., Fen, S.H., Hu, G.D., Cao, Z.K. and Wang, L.Y. (1989) Effect of *Rhodiola kirilowii* maxim on preventing high altitude reaction. Chin.J. Chin. Mater. Med., 14, 687-693
16. Petkov, V.D. and Yonkov, D. (1987) Effect of alcohol aqueous extract from Rhodiola roots on learning and memory. Acta Physiol. Pharmacol. Bulgarica., 12, 2-9
17. 최승필, 이득식, 함승시 (2003) 홍경천 추출물의 항산화성, 항돌연변이성 및 세포독성 효과. 한국식품과학회지. 32, 211-216
18. 이경행, 전은경, 유시영, 오만진 (2000) 유백피 추출물의 항산화 활성. 한국 농산 물저장유통학회지 7, 373-379
19. Hong, N.D., Rho, Y.S., Kim, N.J. and Kim, J.S.(1990) studies on the constituents of Ulmi cortex., Kor. J. Pharmacogn, 21, 201-204
20. Lee, B.W. and Shin, D.H. (1991) Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microogarnisms. Korean J. Food Sci. Technol., 23, 205-211
21. Chyen, N.V., Kurata, T., Kato, H. and Fujimaki, M. (1982) Antimicrobial activity of Kumazasa. Agric. Biol. Chem., 46, 971-974

(접수 2004년 1월 19일, 채택 2004년 2월 26일)