

## 독활 뿌리 추출물에서 항균물질의 분리 및 항균성

한 완 수\*†

\*목원대학교 테크노과학대학 생의약화학부

### Isolation of the Antimicrobial Compounds from *Aralia cordata* Thunb. Extract

Wan Soo Han\*†

\*Division of Biomedical Chemistry and Cosmetics, College of Science and Technology, Mokwon Univ, Daejeon 302-729, Korea.

**ABSTRACT :** Bioassay-guided isolation of the dried roots of *Aralia continentalis* led to the isolation of (-)-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid (continentalic acid) and (24E)-Stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (stagmasterol). Their structures were elucidated using <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, UV and mass spectra analyses. The gram-positive bacterial, including methicilline-resistant (MRSA), were more sensitive to the continentalic acid and stagmasterol than gram-negative bacterial.

**Key words :** *Aralia continentalis*, continentalic acid, stagmasterol, antibacterial activity

## 서 언

최근 소비자들은 건강 지향적 육구의 증대와 안전성에 대한 의식 고조로 합성 항균제에 대한 기피현상이 강하게 일고 있어 천연물 중에 항균력을 갖는 식품이나 한약재에 대한 선호 인식이 높아지고 있다. 일반적으로 식물체 및 한약재 중에는 미생물로부터 자신을 보호하기 위하여 항균성분을 함유하고 있으며 이들을 주로 유기산, 지방산, flavonoid 등의 phenol성 물질, 정유 등의 terpenoid, alkaloid 및 배당체 등에 기인한다고 한다. 이러한 이유로 식품, 의약 및 생물공학 산업 등의 분야에서도 항균성 소재의 연구를 위한 한약재 추출성분에 관한 연구가 수행되고 있으며 항균력이 뛰어나고 안전성이 확인된 항균물질을 분리하여 응용하는 연구가 활발하게 진행 보고 되고 있다 (Han, 2004; Park *et al.*, 2001). 이러한 목적으로 수행된 여러 생약 에탄올 추출물을 대상으로 한 예비 실험에서 독활이 항균효과가 뛰어난을 확인할 수 있었다.

독활 (*Aralia continentalis* Kitagawa)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 속근 다년생 식물로 일명 땅 두릅, 풀 두릅이라고도 하며, 한약 명으로 독활 또는 독요초라 한다. 약용부위는 뿌리로 精油 1~2%, 스테아린산 0.07%, 수지, 살리실산과 디테르펜산 I, II, 미량요소로서 구리, 망간, 니켈 등이 들어있어 鎮痛, 半身不隨, 手足痙攣, 頭痛, 眩氣症, 關節炎, 齒痛, 浮腫

과 항염증 (Han *et al.*, 1983a, b, 195c) 및 혈소판응집억제 (Kosela *et al.*, 1986; Yun-Choi *et al.*, 1986) 등에 효과가 있어 널리 쓰이는 생약재이다. 이 약은 긴 원추형 막대모양을 하고 길이 10~30 cm, 지름 5~20 mm이다. 바깥 면은 회백색, 회갈색이며 세로주름과 잔뿌리의 자국이 있다. 껍은 면은 섬유성이고 옅은 황색의 수가 있고 질이 가볍고 영성하다. 특이한 방향이 있고 맛은 처음에는 텅텅하고 약간 쓰다. 산지는 한국을 비롯한 일본, 중국 등 아시아 온대지역에 넓게 분포되어 야생 및 재배되고 있다 (Perry 1980; 대한약전, 1987). 이에 본 연구에서는 독활의 뿌리를 이용하여 항균효과를 살펴본다. 생의약품 및 화장품 소재로서 개발하기 위한 기초 자료를 확립하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 독활 뿌리는 전라북도 임실군 칠보면의 재배 농가에서 3년생을 2004년 12월에 채집하여 우석대학교 한의과 대학 본초학교실 주영승 교수로부터 정확한 감정을 받아 실험에 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 1급 시약

†Corresponding author: (Phone) +042-829-7563 (E-mail) wshan@mokwon.ac.kr  
Received May 8, 2005 / Accepted July 31, 2005

을 정제 없이 사용하였고, 나머지 시약은 1급 시약을 정제해서 사용하거나 특급시약을 사용하였다. Column packing용 silica gel은 Kieselgel 60 (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, Merck, Germany)을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60F254 precoated plate (Art. 5552, Merck)를 사용하였다. 발색시약은 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (in EtOH) 시약을 사용하였으며, UV 254, 365 nm detection을 병행하였다. 분취용 HPLC는 JAL 908 model (Japan analytical instrument)로서 detector는 UV detector와 RI detector를 동시에 사용하였고, column은 JAIGEL 1H (20×900 mm)와 2H (20×900 mm)를 연결하여 사용하였다. 용점은 Gallenkamp melting point apparatus를 사용하였으며 온도를 보정하지 않았다. <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR spectra는 Bruker의 AM-300 및 AMX-500를 사용하였고, 선광도 측정은 JASCO DIP-1000 digital polarimeter로 측정하였다.

### 3. 사용균주

항균력 시험용으로 사용된 균주는 그람 양성균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus pyogenes* ATCC 19615, *Enterococcus faecalis* ATCC 25922를 사용하였고, 그람 음성 균으로는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43717, *Escherichia coil* ATCC 25922, *Enterbacter cloacae* ATCC 23350, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27983, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Samonella typhimurium* ATCC 14028을 사용하였다.

### 4. 균주의 배양 및 배지

균주의 배양에 사용된 배지는 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*는 Brain heart infusion를 사용하였고, *Escherichia coil*, *Pseudomonas aeruginosa* 그리고 *Samonella typhimurium*은 Nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였다.

### 5. 항균력 측정

항균성물질을 검색하기 위해 본 실험에서는 paper disc method (James *et al.*, 1987)과 액체배지희석법 (Amsterdam, 1996)을 이용하여 측정하였다. Paper disc method의 항균력 측정은 즉, 독활 뿌리 추출물 및 분리된 화합물을 0.45 μm membrane filter (Millipore Co., U.S.A.)로 여과하여 제균하고, 멸균된 filter paper disc (Toyo seisakusho, 6 mm)에 일정량씩 흡수시킨 후, 추출용매를 완전히 날려 보낸 다음, 전보에서 사용한 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 냉장고 (4°C)에서 1시간 동안 방치한 후, 30°C incubator에서 24-48시간 동안 배양한 다음 disc 주변의 clear zone 직경 (mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다. 또한 액체배지의 항균력 측정은 시

료를 각각 10% DMSO에 용해시킨 후, 96 well plate에 각 시료의 농도를 최고농도 100 μg/ml에서 최저농도 3.125 μg/ml 까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 균주는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고, 37°C 배양기에서 18시간 배양한 균주 10<sup>4</sup> CFU/ml를 접종하여, 37°C 배양기에서 2시간 배양한 후, ELISA reader로 630 nm에서 배지 탁도를 확인하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제 농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)로 결정하였으며 (Amsterdam, 1996), 최소억제농도 수치가 낮은 것을 항균효과가 높은 것으로 판정하였다.

### 6. 항균물질의 분리

채집한 독활 뿌리를 음건 세절하여 건조 중량 약 3.5 kg을 에탄올을 넣어 60°C에서 5시간씩 2회 환류 추출하여 여과 후 농축하여 독활 에탄올 추출물 375.2 g을 얻었다. 얻어진 에탄올 추출물 (JSI-51)의 일부 (278 g)를 증류수에 현탁시켜 클로로포름 (51A), 에틸아세테이트 (51B) 및 부탄올 (51C) 순으로 분획 후 농축하여 분획물 클로로포름분획 67.4 g, 에틸아세테이트분획 8.9 g, 부탄올 분획 72.6 g 및 물 분획물 118.2 g를 각각 얻었다. 분획물 중 가장 우수한 생리활성 효과를 나타낸 클로로포름 62.4 g를 silica gel (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, 200 g, 3×80 cm)이 충전된 컬럼에 넣어 n-hexane : EtOAc (9 : 1 → 1 : 1) 그리고 EtOAc로 단계적으로 극성을 높인 전개용매를 이용하여 column chromatography를 실시하여 50 ml씩 94개를 얻어 TLC를 실시하여 6개의 소분획 (AC-1~6)으로 나누었다. 항균효과를 나타낸 fraction 3으로부터 활성 주성분을 규명하기 위해 계속해서 recycling prep-HPLC [JAIGEL-1H (column); 유속 3.5 ml/min, 용매 CHCl<sub>3</sub>, 220 nm]로 정제하여 화합물 1과 2를 얻었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 항균 활성물질의 구조 동정

독활 뿌리로부터 얻어진 에탄올 추출물 및 용매분획의 항균 활성은 CHCl<sub>3</sub> 분획에서 가장 높게 활성을 나타내었다. CHCl<sub>3</sub> 분획을 column chromatography 및 prep-HPLC 등을 이용하여 분리한 화합물 1은 mp가 166-167°C인 무색 침상으로 질량분석기를 이용하여 얻은 EI-MS spectrum에서 분자량이 302임을 알 수 있었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 0.67, 1.02 및 1.29에서 3개의 signal은 tertiary methyl기 들어며, δ 4.96와 4.90의 signal들은 vinyl group (ABC type으로 짝지음 상수 J<sub>AB</sub>=10.5 Hz, J<sub>AC</sub>=17.5 Hz 및 J<sub>BC</sub>=2 Hz)이고, δ 5.17의 signal은 allylic proton을 확인 할 수 있다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 δ 184.6에서 carbonyl carbon signal이 관찰 되었다. 따라서 상기의 데이터를 기존의 Han등이 보고한 문헌 데이터 와 비교 검토

한 결과 독활의 주성분인 화합물 1은 (-)-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid 즉, continentalic acid으로 동정하였다 (Han *et al.*, 1983b).

화합물 2는 분말상의 고체의 물질로써  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 olefine methine signal ( $\delta$ 5.37)이 관측되었고, 많은 methylene signal이  $\delta$  2.78~1.29에서 관측되었으며, oxygenated methine signal 여러 개의 singlet methyl signal의 존재로부터 sterol임을 예측할 수 있다. 또한  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 29 개의 탄소의 signal이 관측되었으며,  $\delta_c$  138.7 및 129.7에서 olefine methine signal로 한 쌍의 이중결합이 있는 것을 확인할 수 있었고, 또한  $\delta_c$  72.2에서 oxygenated methine signal도 관측되었다. 그리고 methyl의 signal ( $\delta_c$  14.2~19.8)과 methylene signal ( $\delta_c$  34.1~20.5)들의 주요 peak도 관측되었다. 그리고, 고 자장 영역에서, quaternary 3개, methine 11개, methylene 9개, methyl 6개의 signal이 관측되었다. 이와 같은 결과를 종합하고, 기존의 문헌의 spectral data들과 비교하여 (24E)-Stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol 즉, stigmasterol으로 동정하였다 (Kang *et al.*, 1996).

(-)-Pimara-8 (14),15-dien-19-oic acid (1): Colorless needle (hexane); mp: 166-167°C [ $\alpha$ ] $^20_{\text{D}}$  -120°C (*c* 0.8,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.72 (1H, dd, *J*=17.5, 10.5 Hz, H-15), 5.17 (1H, s, H-14), 4.96 (1H, dd, *J*=5.2, 1.5 Hz, H-16), 4.90 (1H, dd, *J*=10.5, 1.5 Hz, H-16), 1.29 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-17), 0.67 (3H, s, H-20).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  184.6 (C-19), 147.4 (C-15), 138.1 (C-8), 128.2 (C-14), 113.1 (C-16), 56.3 (C-9), 50.8 (C-5), 44.3 (C-4), 39.4 (C-13), 38.7 (C-10), 38.2 (C-1), 36.6 (C-3), 36.0 (C-7), 31.8 (C-12), 29.6 (C-21), 29.4 (C-17), 24.3 (C-6), 19.8 (C-11), 19.4 (C-2), 14.0 (C-18).

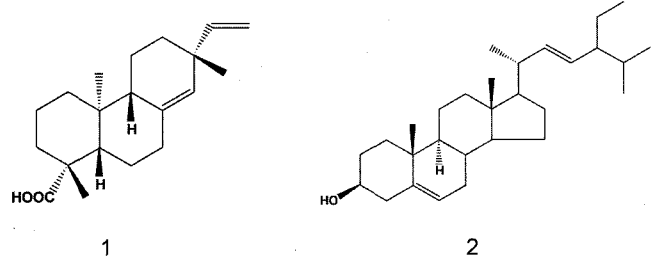


Fig. 1. The structures of compound 1 and 2 isolated from *Aralia continentalis*

Stigmasterol(2): Colorless amorphous solids, mp 164-165°C, [ $\alpha$ ] $^25_{\text{D}}$  -48.3°C (*c* 0.28,  $\text{CHCl}_3$ ),  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.53 (1H, d, *J*=5.4 Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.67 (3H, s, H-18).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  141.2 (C-5), 138.7 (C-22), 129.7 (C-23), 122.1 (C-6), 72.2 (C-3), 56.6 (C-14), 56.4 (C-17), 51.6 (C-24), 50.5 (C-9), 42.7 (C-4), 42.6 (C-13), 40.9 (C-20), 40.2 (C-12), 37.7 (C-1), 36.9 (C-10), 32.3 (C-7, 8, 25), 32.0 (C-2), 28.7 (C-16), 25.8 (C-28), 24.7 (C-15), 21.5 (C-21), 19.8 (C-11, 27), 19.4 (C-19), 19.3 (C-26), 12.4 (C-29), 12.3(C-18).

## 2. 미생물에 대한 항균활성 억제 효과

항균력이 뛰어나고 안전성이 있는 물질을 분리하여 응용을 목적으로 예비 검색 결과에서 선택된 독활을 activity-guided isolation에 따라 에탄올 추출물 및 용매 분획물들의 액체배지와 고체배지에서의 항균력은  $\text{CHCl}_3$ 분획에서 그람 양성균인 *S. aureus*에서 MIC가 31.2  $\mu\text{g/ml}$  와 6 mm로 각각 높게 측정되었다.

Table 1. Antibacterial activity of extract, fraction, continentalic acid (1) and stigmasterol (2) of Radix of *Aralia continentalis* K against Gram-positive and Gram-negative bacteria

| Strains                                    | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )/Inhibition zone (mm) <sup>a</sup> |                   |                   |                   |
|--|--|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | 51A  | 1                 | 2                 | Ampicillin        |
| Gram-positive bacterial                    |  |                   |                   |                   |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)              | 31.2 $\pm$ 0.1/6   | 7.8 $\pm$ 0.1/20  | 7.8 $\pm$ 0.2/20  | 12.5 $\pm$ 0.1/18 |
| <i>S. epidemidis</i> (ATCC 12228)          | 31.2 $\pm$ 0.1/6   | 7.8 $\pm$ 0.2/20  | 12.5 $\pm$ 0.1/16 | 7.8 $\pm$ 0.1/20  |
| <i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)            | 62.4 $\pm$ 0.1/6   | 7.8 $\pm$ 0.1/20  | 12.5 $\pm$ 0.1/16 | 7.8 $\pm$ 0.2/20  |
| <i>E. faecalis</i> (ATCC 33186)            | >100/2   | 15.6 $\pm$ 0.1/18 | 31.2 $\pm$ 0.1/8  | >100/NT           |
| Gram-negative bacterial                    |  |                   |                   |                   |
| <i>E. coil</i> ATCC 25922                  | >100/4   | >100/4            | >100/2            | 32 $\pm$ 0.1/8    |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717 | >100/NT  | >100/NT           | >100/NT           | >100/NT           |
| <i>E. cloacae</i> ATCC 23350               | >100/NT  | >100/NT           | >100/NT           | >100/NT           |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853            | >100/NT  | >100/NT           | >100/NT           | >100/NT           |
| <i>C. freundii</i> ATCC 8090               | >100/NT  | >100/NT           | >100/NT           | >100/NT           |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028           | >100/NT  | >100/NT           | >100/NT           | >100/NT           |

Plant extracts: 51A; Chloroform soluble extract of *Aralia continentalis*, 1. Continentalic acid; 2. Stigmasterol; NT: not tested, a Includes diameter of disc (6 mm)

CHCl<sub>3</sub>분획을 column chromatography 및 분취용 HPLC를 이용하여 분리한 화합물 1인 continentalic acid와 화합물 2인 stigmasterol의 미생물에 대한 항균력은 그람 양성균들에서 MIC가 7.8-31.2 µg/ml로 측정하였다. 두 물질은 모두 그람 양성균인 *S. aureus*에서 MIC가 7.8 µg/ml로 가장 높은 활성 억제 효과를 나타내었다. 분리된 화합물 1인 continentalic acid는 독활의 주요 활성성분으로 잘 알려져 있는 물질로 항염증 및 혈소판응집억제 효과가 있는 것으로 보고 되어 있다 (Han et al., 1983a, b, 195c; Kosela et al., 1986; Yun-Choi et al., 1986). 그러나 continentalic acid은 그람 음성균들에서 MIC가 100 µg/ml 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다 (Table 1). 또한 화합물 2인 sterol화합물로 stigmasterol은 박과식물 등 다양한 종류의 식물에 널리 분포되어 있는 물질로 많은 생리 활성들이 보고 되었다. stigmasterol 역시 그람 양성균들에 대한 항균 활성이 나타내었지만 그람 음성균들에는 MIC가 100 µg/ml 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다 (Table 1). 상기의 화합물 1과 2는 항균활성을 유의성 있게 억제하는 것으로 판단되며, 따라서 이들 화합물은 새로운 항균제로 개발에도 유용할 것으로 사료된다.

## 적 요

사람들의 생명연장과 각종 만성질환, 악성종양 등의 증가에 따른 우수한 항생제의 지속적인 개발로 많은 생명을 구할 수 있게 되었지만 반면 항생제를 지나치게 사용하여 이에 많은 부작용이 생기고 내성균도 많아지면서 중증감염이 증가되어 여러 가지의 새로운 문제점에 직면하게 되었다. 안전성이 있는 새로운 항균물질의 개발 목적으로 예비 검색 결과 선택된 독활을 추출하여 컬럼 크로마토그래피를 반복 수행한 결과 2종의 항균 효과를 보여주는 화합물을 분리하였다. 이들 화합물은 물리·화학적 성질 및 분광학적 분석을 통하여 화합물 1은 mp가 166-167°C인 백색침상, C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>의 분자식을 갖는 (-)-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid 즉, continentalic acid으로 동정하였으며, 화합물 2는 mp가 164-165°C인 백색침상, C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O의 분자식을 갖는 (24E)-stigmasta-5, 22-dien-3β-ol, 즉 stigmasterol으로 동정하였으며 항균효과를 측정한 결과 두 화합물 모두 유의성 있는 결과를 나타내었으며, 이 중 화합물 1인 continentalic acid이 더욱 우수한 활성을 나타내었다. 특히 그람 양성균인 *S. aureus*에서 MIC가 7.8 µg/ml, *E. faecalis*에

서는 MIC가 12.5 µg/ml에서 비교적 강한 억제 효과를 보였으며, 화합물 2에서는 *S. aureus*에서 MIC가 7.8 µg/ml, *S. epidemidis*에서는 MIC가 12.5 µg/ml에서 억제 효과를 보여 주었으나 그람 음성균에서 100 µg/ml 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다. 따라서 화합물 1과 화합물 2는 그람 양성균에 대한 새로운 항균제로 개발에 유용한 화합물이 될 것으로 기대된다.

## LITERATURE CITED

- Amsterdam D** (1996) Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media, Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed. Williams and Wilkins, MD, U.S.A. p. 52.
- Han BH, Han YN, Han KA, Park MH, Lee EO** (1983a) Studies on the Anti-inflammatory Activity of *Aralia continentalis* (I) Characterization of Continentalic Acid and its Anti-inflammatory Activity. Arch. Pharm. Res. 6(1):17-23.
- Han BH, Park MH, Han YN, Manalo JB** (1983b) Studies on the Anti-inflammatory Activity of *Aralia continentalis* (II) Isolation of Two Phenolic Acids from the Hydrolysate of Butanol Fraction. Arch. Pharm. Res. 6(2):75-77.
- Han BH, Woo ER, Park MH, Han YN** (1985c) Studies on the Anti-inflammatory Activity of *Aralia continentalis* (III). Arch. Pharm. Res. 8(2):59-65.
- Han WS** (2004) Isolation of Antimicrobial Compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Korea J. Medicinal Crop Sci. 12(3):179-182.
- James GC, Sherman J** (1987) Chemotherapeutic agent in Microbiology, A laboratory manual chemical agents of control, 2nd ed. Prentice Hall, New Jersey, U.S.A. p. 247-254.
- Kosela S, Rasad A, Achmad SA, Wicaksonon W, Baik SK, Han YN, Han BH** (1986) Effects of Diterpene Acids on Malondialdehyde Generation during Thrombin Induced Aggregation of Rat Platelets. Arch. Pharm. Res. 9(3):189-191.
- Park CG, Bang KH, Lee SE, Cha MS, Sung JS, Park HW, Seong NS** (2001) Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the *Staphylococcus aureus*. Korea J. Medicinal Crop Sci. 9(4):251- 258.
- Perry LM** (1980) Medicinal plants of east and southeast asia. Attributed properties and uses. The Press. London. p. 41.
- Yun-Choi HS, Kim JH, Lee JR** (1986) Screening of Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources (II). Kor. J. Pharmacogn. 17(1):19-22.
- Kang SS, Park JG, Hyun JW, Sung MS, Yang YM, Chang HS, Paik WH** (1996) The Cytotoxic Activity of Sterol Derivatives from *Pulsatilla Chinensis* Regal. Journal of Kor. Cancer. 28(1): 146-150.
- 대한약전 외 한약 (생약) 규격집, 1987, 보건복지부 p. 116.