

# 독활로부터 항치아우식 활성을 가진 stigmasterol 분리

유현희 · 문해달<sup>1</sup> · 황지영<sup>1</sup> · 김선영<sup>1</sup> · 정승일<sup>2</sup> · 전병훈<sup>3</sup> · 유용욱<sup>1\*</sup>

군산대학교 식품영양학과, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실, 2: 전주생물소재연구소, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

## Isolation of Anti-cariogenic Agent, Stigmasterol, from *Aralia continentalis*

Hyeon Hee Yu, Hae Dalma Moon<sup>1</sup>, Ji Young Hwang<sup>1</sup>, Seon Young Kim<sup>1</sup>,  
Seung Il Jeong<sup>2</sup>, Byung Hun Jeon<sup>3</sup>, Yong Ouk You<sup>1\*</sup>

Department of Food and Nutrition, Kunsan National University.

1: Department of Oral Biochemistry and VCRC, School of Dentistry, Wonkwang University, 2: Jeonju Biomaterials Institute,

3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In the present study, we has been isolated the anti-cariogenic component, stigmasterol, from *Aralia continentalis* (*A. continentalis*) and identified by MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR and also investigated the anti-cariogenic properties of stigmasterol. The methanol extract of *A. continentalis* showed concentration-dependent inhibitory activity against the growth and acid production of *S. mutans*. The MeOH extract was suspended in H<sub>2</sub>O and sequentially partitioned with n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, and n-BuOH. The CHCl<sub>3</sub> fraction showed remarkable antibacterial activity against *S. mutans*. The anti-cariogenic compound, stigmasterol, has been isolated successively through the screening system and various chromatography methods. Anti-cariogenic properties of stigmasterol were also investigated. From this active chloroform subfraction, isolation and identification finally gave (24E)-stigmasta-5,22-dien-3β-ol (stigmasterol) [[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -48.33°(c 0.28, CHCl<sub>3</sub>)] by spectroscopic methods (MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR) as an active principle. The compound, stigmasterol, showed significant growth, acid production, adhesion and water-insoluble glucan synthesis inhibitory effect against *S. mutans*. These results suggest that stigmasterol from *A. continentalis* may inhibit cariogenic properties of *S. mutans* and these properties may provide some scientific rationales that the local inhabitants used the extracts for treatment of dental diseases.

Key words : *Aralia continentalis*, stigmasterol, dental caries, *Streptococcus mutans*

## 서 론

사회가 발전함에 따라서 건강과 삶의 질의 향상이 중요한 사회적 관심 사항으로 대두되고 있고, 특히 구강건강향상은 삶의 질 향상과 밀접한 관련이 있다. 우식경험영구치지수 (DMFT index)는 세계 각국의 국민구강건강상태를 비교하는 대표적인 지표로 자주 사용될 정도로 중요한 의미를 지니는 지표이다. 12세 아동의 우식경험영구치지수가 1972년에 0.6개<sup>1)</sup>이었고, 1979년에는 2.2개 (도시 2.5개<sup>2,3)</sup>, 비도시 1.7개<sup>4)</sup>)이었으며, 1990년에는 3.0개 (도시 2.9개, 비도시 3.3개<sup>5)</sup>)이었고, 1995년에는 3.1개 (도시 3.0개, 비도시 3.6개<sup>6)</sup>)이었고, 2003년에는 3.25개 (대도시 3.41개,

중소도시 3.32개, 농어촌 2.57개<sup>7)</sup>)로 1970년대 이후 대다수 OECD국가들에서 12세 우식경험영구치지수가 80%까지 급감하였으나<sup>8)</sup>, 우리나라에서는 500%이상 급증하여 문제가 심각하다고 할 수 있다. 그리고, 2003년 국민구강건강실태 조사에 의하면<sup>9)</sup> 15세 청소년의 경우에는 우식경험영구치지수가 1990년에 4.09개, 1995년에 4.86개, 2000년에 4.79개, 2003년에 4.86개로 집계되었다. 또한, 장년층 (35~44세)의 경우 1990년에 4.48개, 1995년에 4.25개, 2001년에 4.64개, 2003년에 6.03개로 나타났으며, 노인층 (65~74세)의 경우 1990년에 11.71개, 1995년에 12.30개 그리고 2001년에 11.94개, 2003년 11.04개로 나타나 지난 10년사이 어린이군과 장년층에서 치아우식증이 증가하였으며, 연령이 증가함에 따라 영구치 우식율이 증가함을 알 수 있다. 실제로 2003년 영구치우식경험자율이 14세 이후부터는 80%를 넘어서고, 노인연령 (65~74세)에 이르면 93%까지 증가하였다.

\* 교신저자 : 유용욱, 익산시 신용동 344-2, 원광대 치과대학 구강생화학교실

· E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6926

· 접수 : 2006/11/14 · 수정 : 2007/01/12 · 채택 : 2007/02/02

치아우식증은 치은연상 및 치은연하 치면세균막에 의하여 주로 유발되는데, 치면세균막에는 많은 함량의 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다. 치면세균막내 미생물 중 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치면세균막형성에 가장 중요한 역할을 하는 원인균으로 알려져 있으며, *S. mutans*는 치아우식을 일으키는 주요 원인균으로 주목받고 있다<sup>9)</sup>. *S. mutans*는 치면세균막에 상주하며 당질을 대사하여 유기산 주로 젖산을 방출함으로써 치아 법랑질을 탈회시킬 뿐만 아니라 치아의 경조직을 파괴하고, 미생물에 대한 인체의 염증 반응은 치주병을 유발하는 것<sup>9,10)</sup>으로 보고된 바 있다.

독활 (*Aralia continentalis* KITAGAWA)은 동의보감에 치통, 치주병 및 치은염의 치료에 사용한다고 기록되어 있으며<sup>11,12)</sup> 본 연구실에서는 독활 메탄을 추출물<sup>13)</sup>과 이로부터 분리한 continentalic acid<sup>14)</sup>의 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, 타액으로 도말된 hydroxyapatite bead에 대한 부착억제와 비수용성 글루칸 합성 억제를 관찰하여 보고한 바 있다. 본 연구에서는 독활의 메탄을 추출물로부터 또 다른 항치아우식 활성 물질인 stigmasterol을 분리하여 이들의 화학구조를 규명하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 활성물질의 분리

#### 1) 독활 메탄을 추출물과 분획

독활 메탄을 추출과 분획 실험방법은 앞선 연구<sup>14)</sup>와 같다. 즉, 독활은 익산시 대한한약국에서 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 건조하여 세절한 독활 5 kg을 MeOH에 침지하여 상온에서 7일간 3회 추출하였다. 추출용액을 Whatman No. 2 여과지로 여과한 다음 38-45°C에서 감압농축하여 MeOH 추출물을 481.7 g (9.6%)을 얻었다. 그 후 MeOH 추출물을 250 g을 증류수에 현탁시켜 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 순으로 분획 후 농축하여 CHCl<sub>3</sub> 분획물 (65 g), EtOAc 분획물 (9 g), *n*-BuOH (75 g) 및 H<sub>2</sub>O 분획물 (120 g)을 얻었다. 이 중 가장 강한 활성을 갖는 CHCl<sub>3</sub> 분획 (60 g)을 취하여 활성물질 분리를 실시하였다(Fig. 1).

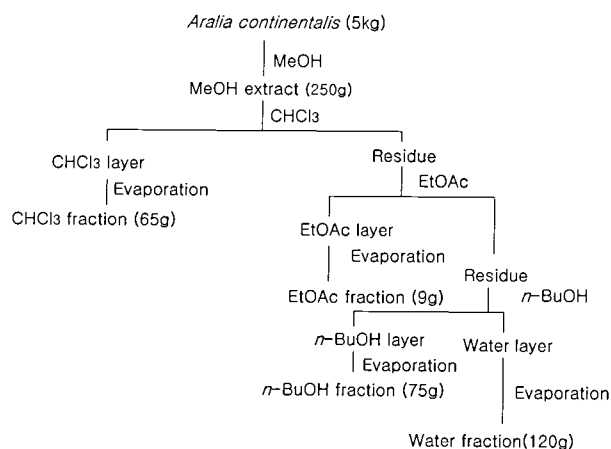
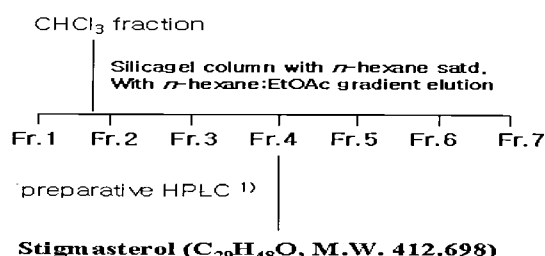


Fig. 1. Solvent fractionation flow chart of *A. continentalis*.

### 2) 활성물질의 분리 및 정제

가장 활성이 높은 CHCl<sub>3</sub> 분획물을 선택하여 silica gel (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, 200 g, 3×80 cm)이 충전된 컬럼에 넣어 *n*-hexane-EtOAc (9:1 (1 L), 5:1 (0.5 L), 2:1 (0.5 L), 1:1 (0.5 L)) 그리고 EtOAc 100%용매계로 단계적으로 극성을 높여 용출시켜 50 mL씩 94개를 얻은 TLC를 실시하여 7개의 소분획으로 나누었다. 항균효과를 나타낸 fraction 3으로부터 활성 성분을 규명하기 위해 계속해서 prep-LC (JAIJEL-1H column, 용매 CHCl<sub>3</sub>, 유속 3 ml/min, 220 nm)를 시행하여 무색 침상의 화합물을 얻었다 (Fig. 2).



**Stigmasterol (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O, M.W. 412.698)**

Fig. 2. Isolated procedure of continentalic acid from *A. continentalis*.

1) Column: JAIJEL-1H, Solvent: CHCl<sub>3</sub>, Flow rate: 3ml/min, Detector:UV(220 nm)

Stigmasterol; colorless amorphous solid, mp 164-165°C, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -48.3°C (c 0.28, CHCl<sub>3</sub>) <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.53(1H, d, J=5.4Hz, H-6), 3.53(1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.67 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 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).

#### 3) 시약 및 기기

추출 및 open column용 용매는 1급 시약을 정제 없이 사용하였고, column용 지지체인 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. 분취용 LC는 JAI 908 model (Japan Analytical Instrument)로서 UV 및 RI 검출기를 동시에 사용하였고, column은 JAIGEL 1H (20 × 900mm)와 2H (20 × 900mm)를 연결하여 사용하였다. 융점은 Gallenkamp melting point apparatus를 사용하였으며 온도는 보정하지 않았다. 구조동정을 위해 사용된 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR spectra는 Bruker의 (Germany) AVANCE 300과 500 MHz의 것을 사용하였다. 또한 선풍도 측정 은 JASCO DIP-1000 digital polarimeter로 측정 하였다.

### 2. 항치아우식 실험

#### 1) 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *Streptococcus mutans* ATCC 25175로 Brain heart infusion (BHI, Difco, USA) 액체배지에 1-2 차 계대배양 후 같은 배지에 식균하여 37°C의 항온기에서 24시

간 배양하여 사용하였다.

## 2) *S. mutans*의 성장과 산생성 억제 실험

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 시료를 첨가한 후 균을  $1 \times 10^8$  CFU/ml이 되게 접종하였다. 37°C의 항온기에서 24시간 배양한 후 BHI 액체배지를 기준으로 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, pH meter (ORIONSA 720, U.S.A.)를 이용하여 pH를 측정하여 산 생성 억제 효과를 관찰하였다. 대조군은 시료를 넣지 않고 시행하였다.

## 3) 타액준비

타액은 건강한 성인 남자로부터 파라핀왁스로 자극하여 분리된 것을 냉각된 비이커에 채취한 다음, 채취된 타액은 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 15분)하여 상청액을 취한 다음, 분해효소를 불활성화시키기 위하여 60°C에서 30분간 처리한 후, -20°C에 보관하면서 사용하였다.

## 4) 타액으로 도말된 hydroxyapatite bead (S-HA)에 부착 억제 실험

Hydroxyapatite beads (Bio-Rad Lab., U.S.A.) 30 mg을 증류수로 5회 세척하여 작은 입자를 제거한 후 37°C에서 건조시켜 사용하였다. 건조된 hydroxyapatite bead 30 mg을 1 ml의 타액으로 37°C에서 60분간 처리하여 타액을 bead에 코팅시켰다. 그 후 S-HA를 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0)로 3회 세척한 후 stigmasterol을 각각의 농도별로 넣고, *S. mutans*를  $1 \times 10^7$  CFU/ml이 되게 넣은 다음 37°C의 흔들리는 배양기에서 90분 동안 S-HA에 부착시켰다. 그 후 0.1 M KPB (pH 7.0)로 3회 세척한 후 초음파 장치 (50W, 30초)를 이용해 S-HA에 부착된 균을 떨어지도록 하였다. 그 다음 균액을 희석하여 Mitis salivarius agar plate (Difco Laboratories, U.S.A.)에 도말하여 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양시켜 집락수를 세었다. 대조군은 stigmasterol을 넣지 않고 시행하였다.

## 5) Glucosyltransferase (GTFase)의 준비

다음과 같은 방법으로 GTFase를 얻는다. *S. mutans*를 BHI 액체배지 2 L에 배양한 후, 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20분)하여 상청액을 취한 후 60~70% ammonium sulfate를 넣은 후 다시 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20분)하여 단백질을 가라앉혔다. 이 단백질에 0.1 M KPB (pH 6.0)을 4시간마다 바꾸어주며, 4°C에서 24시간동안 투석시킨 후 냉동보관 (-80 °C)하였다가 사용하였다.

## 6) GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제능 검사

0.04% sodium azide를 첨가한 0.4 M KPB (pH 6.0)을 0.25 ml 취하여, 0.25 ml의 0.4 M 자당용액, 0.25 ml의 각 농도별 stigmasterol을 넣고, GTFase를 넣어 최종 1 ml이 되게 하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 증류수로 세척한 후 글루칸을 떼어내기 위하여 초음파장치 (40W, 4초)를 이용하였다. 그 후 5% phenol을 1 ml, 진한 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 5 ml 넣어준 후 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 stigmasterol을 넣지 않은 균을 대조군으로 하였다.

## 3. 통계처리

실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험군)/대조군]×100의 식을 이용하여 계산하였다. 얻은 결과는 통계

프로그램인 SPSS (ver 10.0)을 사용하여, 평균과 표준편차로 제시하였으며,  $\alpha=0.05$  수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 independent sample t-test로 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. 구조동정

Column chromatography와 prep-HPLC로 분리한 화합물은 mp가 164-165°C인 무색 침상 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 olefine methine signal이  $\delta$  5.37에서 관찰되었고,  $\delta$  3.53에서 oxygenated methine signal이 나타났으며 또한, 많은 methylene signal proton들이  $\delta$  2.78-1.29에서 관측되어 sterol임을 예측할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 29개의 탄소의 signal이 관측되었으며,  $\delta$ c 138.7 및 129.7에서 olefine methine signal로 한 쌍의 이중 결합이 있는 것을 확인 할 수 있었고, 또한  $\delta$ c 72.2에서 oxygenated methine signal도 관측되었다. 그리고 methyl의 signal이 ( $\delta$ c 14.2 - 19.8)과 methylene signal ( $\delta$ c34.1 - 20.5)들의 주요 peak도 관찰되었다. 그리고 고 자장 영역에서 quaternary 3개, methine 11개, methylene 9개, methyl 6개의 signal이 관찰되었다. 이와 같은 결과들을 종합하고, 기존의 문헌의<sup>15)</sup> spectral data들과 비교하여 (24E)-stigmaster-5,22-diene-3 $\beta$ -ol 즉, stigmasterol으로 동정하였다.(Table 1, Fig. 3).

Table 1. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for stigmasterol

| Positions | <sup>1</sup> H-NMR   | <sup>13</sup> C-NMR | HMBC             |
|-----------|----------------------|---------------------|------------------|
| 1         |                      | 37.7                | C-2, C-3,        |
| 2         |                      | 32.0                | C-1,C-3, C-4     |
| 3         | 3.53(1H, m)          | 72.2                | C-1, C-4         |
| 4         |                      | 42.7                | C-3, C-5, C-10   |
| 5         |                      | 141.2               | -                |
| 6         | 3.53(1H, d, J=5.4Hz) | 122.1               | C-7, C-8         |
| 7         |                      | 32.2                | C-6, C-8         |
| 8         |                      | 32.2                | C-9, C-11, C-14  |
| 9         |                      | 50.5                | C-11, C-19       |
| 10        |                      | 36.9                | -                |
| 11        |                      | 19.8                | C-19, C-12,C-9   |
| 12        |                      | 40.2                | C-18, C-11, C-13 |
| 13        |                      | 42.6                | -                |
| 14        |                      | 56.6                | C-8, C-15        |
| 15        |                      | 24.7                | C-14, C-16       |
| 16        |                      | 28.7                | C-15, C-17       |
| 17        |                      | 56.4                | C-18, C-16, C-21 |
| 18        | 0.67(3H, s)          | 12.3                | C-12, C-13, C-21 |
| 19        | 1.01(3H, s)          | 19.4                | C-10, C-11, C-1  |
| 20        |                      | 40.9                | C-17, C-21, C-22 |
| 21        |                      | 21.5                | C-20, C-18       |
| 22        |                      | 138.7               | C-23, C-20       |
| 23        |                      | 129.7               | C-22, C-24, C-28 |
| 24        |                      | 51.6                | C-23, C-27       |
| 25        |                      | 32.3                | C-27, C-26       |
| 26        |                      | 19.3                | C-27             |
| 27        |                      | 19.8                | C-25, C-26       |
| 28        |                      | 25.8                | C-24, C-29       |
| 29        |                      | 12.4                | C-26, C-28       |

Coupling constant values (in parentheses) are in Hz. <sup>1</sup>H-NMR spectra data for compound (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) <sup>2</sup> <sup>13</sup>C-NMR and HMBC spectra data for compound (500MHz, CDCl<sub>3</sub>)

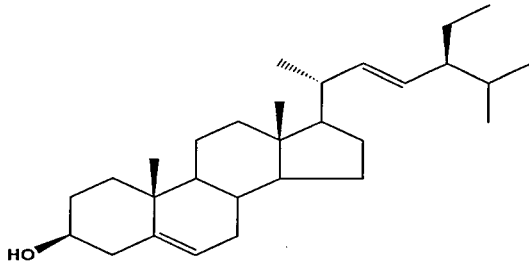


Fig. 3. Chemical structure of stigmasterol

## 2. Stigmasterol의 *S. mutans* 성장억제에 미치는 효과

Stigmasterol의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 stigmasterol을 각각 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37℃ 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Stigmasterol을 넣지 않은 대조군에서 0.223±0.003 흡광도를 나타내었다. 그런데, 1.25 µg/ml 농도에서 0.211±0.003 흡광도를 나타내고, 2.5 µg/ml 농도에서는 0.183±0.006, 5 µg/ml 농도에서는 0.052±0.005, 10 µg/ml에서는 0.0001±0.0001, 4 µg/ml에서는 0.0001±0.0001를 나타내어, 1.25 µg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ( $p<0.05$ ). 대조군에 비하여 각각 5%, 18%, 77%, 100%, 100%의 성장억제 효과를 나타내었다.

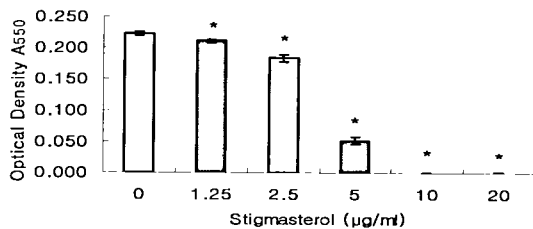


Fig. 4. The optical density of *Streptococcus mutans* by various concentrations of stigmasterol. The optical density of A550 were read by a spectrophotometer. \* $p<0.05$  was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

## 3. Stigmasterol의 *S. mutans* 산 생성 억제에 미치는 효과

Stigmasterol 첨가에 따른 *S. mutans*에 의한 유기산 생성 억제 효과를 알아보기 위해 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml 농도의 시료에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양 후에 pH meter로 pH를 측정한 결과는 Table 2와 같다. Stigmasterol을 넣지 않은 대조군에서 pH는 5.22±0.08을 나타내었다. Stigmasterol은 1.25 µg/ml 농도에서 5.22±0.07, 2.5 µg/ml 농도에서는 5.30±0.10, 5 µg/ml 농도에서는 5.94±0.04, 10 µg/ml 농도에서는 6.98±0.11, 20 µg/ml 농도에서는 7.14±0.11로 5 µg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ( $p<0.05$ ).

## 4. Stigmasterol의 S-HA 부착 억제에 미치는 효과

Stigmasterol가 S-HA에 *S. mutans* 부착 억제 효과가 있는지 알아본 결과 (Fig. 5) 대조군은 135.33±2.08 ( $\times 10^5$ ) CFU/ml이었으며, stigmasterol 1.25 µg/ml 농도에서는 131.67±1.53 ( $\times 10^5$ )

CFU/ml, 2.5 µg/ml 농도에서는 113.00±2.00 ( $\times 10^5$ ) CFU/ml, 5 µg/ml 농도에서는 93.67±4.01 ( $\times 10^5$ ) CFU/ml, 10 µg/ml 농도에서는 64.33±2.08 ( $\times 10^5$ ) CFU/ml, 20 µg/ml 농도에서 62.67±1.58 ( $\times 10^5$ ) CFU/ml로 2.5 µg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 부착하는 균수가 유의하게 낮았다 ( $p<0.05$ ).

Table 2. The pH of *Streptococcus mutans* by the various concentrations of stigmasterol

| Conc.(µg/ml) |             |
|--------------|-------------|
| Control      | 5.22±0.081) |
| 1.25         | 5.22±0.07   |
| 2.5          | 5.30±0.10   |
| 5            | 5.94±0.04*  |
| 10           | 6.98±0.11*  |
| 20           | 7.14±0.11*  |

\* Value represent the Mean±SD obtained from triplicate experiment. \* $p<0.05$  was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group

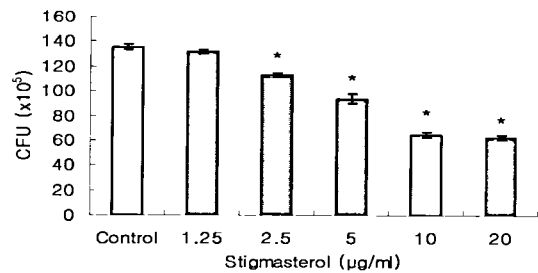


Fig. 5. The colony forming unit (CFU) of *Streptococcus mutans* to the 30 mg saliva-coated hydroxyapatite beads by various concentrations of stigmasterol. \* $p<0.05$  was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

## 5. Stigmasterol의 GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 효과

Stigmasterol가 비수용성 글루칸 합성 저해 효과가 있는지 알아본 결과는 Fig. 6과 같다. Stigmasterol는 대조군에 비해 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml 각각의 농도에서 98.00±1.00%, 90.00±1.00%, 75.67±2.08%, 67.00±2.00%, 54.00±1.00%의 생성율을 보여, 2.5 µg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ( $p<0.05$ ).

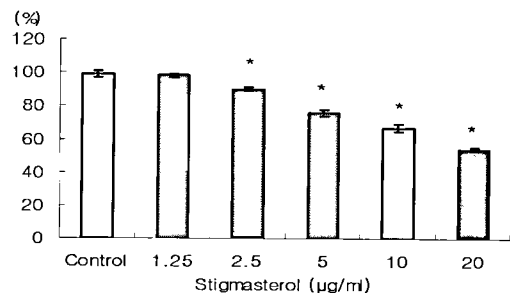


Fig. 6. Rate of loss insoluble glucan of *Streptococcus mutans* by the various concentrations of stigmasterol. \* $p<0.05$  was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

## 고찰

본 연구에서는 앞선 연구에서 발표한 독활의 메탄올 추출물의  $\text{CHCl}_3$  분획물로부터 또 다른 항균 활성이 높은 물질을 분리하여 이 단일 화합물에 대한 구조 해석을 기기분석 (MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ )을 통해서 진행한 결과 stigmasterol로 최종 동정하였다.

Stigmasterol 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 시료에 대한 *S. mutans*에 대한 성장억제율이 5%, 18%, 77%, 100%, 100%의 성장억제 효과를 나타내 1.25  $\mu\text{g/ml}$  이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었는데 ( $p<0.05$ ), 특히 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 100%의 성장억제 효과를 나타내었다. Continentalic acid가 0.25, 0.5, 1, 2, 4  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비하여 각각 36%, 40%, 50%, 81%, 93%의 유의적인 성장억제 효과를 나타낸 것<sup>14)</sup>에 비하면 낮은 항균 효과이지만 압착초로부터 분리한 1-carbomethoxy- $\beta$ -carboline, norharman, harman의 *S. mutans*에 대한 MIC 값이 각각 100  $\mu\text{g/ml}$ <sup>16)</sup>이며, propolis가 *S. mutans*에 대해 80%이상 억제율을 보이는 농도가 31.3 $\mu\text{g/ml}$ <sup>17)</sup>라고 보고되어 이들의 성장억제 효과 비하면 높은 항균활성이라 할 수 있다.

산생성 억제 실험에서도, stigmasterol를 넣지 않은 대조군에서는  $5.22\pm0.08$ 을 나타내었으나 stigmasterol는 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $5.22\pm0.07$ ,  $5.30\pm0.10$ ,  $5.94\pm0.04$ ,  $6.98\pm0.11$ ,  $7.14\pm0.11$ 을 나타내어 *S. mutans*에 의한 유기산 생성을 농도 의존적으로 억제하였음을 보여주었다. 특히 5  $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서는 대조군에 비해 유의적으로 유기산 생성을 억제하였으며 ( $p<0.05$ ), 우식 임계 pH를 넘어 효과적이었다.

각 농도별 stigmasterol가 치아표면의 세균 부착을 억제하는지 알아보기 위해 S-HA에 대한 부착 억제 효과를 확인한 결과 대조군에서는  $135.33\pm2.08$  ( $\times 10^5$ ) CFU/ml이 부착한 반면, 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  각각의 농도에서는  $131.67\pm1.53$  ( $\times 10^5$ ) CFU/ml,  $113.00\pm2.00$  ( $\times 10^5$ ) CFU/ml,  $93.67\pm4.01$  ( $\times 10^5$ ) CFU/ml,  $64.33\pm2.08$  ( $\times 10^5$ ) CFU/ml,  $62.67\pm1.58$  ( $\times 10^5$ ) CFU/ml의 부착을 보여, 대조군에 비해 각각 3%, 17%, 31%, 52%, 54%의 부착 억제율을 보였으며, 그리고 비수용성 글루칸 합성 실험을 한 결과를 보면 stigmasterol는 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 각각  $98.00\pm1.00\%$ ,  $90.00\pm1.00\%$ ,  $75.67\pm2.08\%$ ,  $67.00\pm2.00\%$ ,  $54.00\pm1.00\%$ 의 생성율을 보여, S-HA 부착억제와, 비수용성 글루칸 합성은 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 대조군에 비하여 유의한 차이가 있었다 ( $p<0.05$ ).

이상의 결과를 종합해 보면, 독활로부터 분리한 stigmasterol은 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, S-HA에 대한 부착억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있음을 알 수 있었다. 이에, stigmasterol의 의학적, 산업적으로 유용한 소재로의 연구와 독활의 다른 구성성분의 항치아우식 효과에 대해서 순수정제 과정을 거쳐 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

독활에서 항치아우식 활성 물질을 분리하기 위해 독활을 메탄올로 추출하고 계통분획을 실시하여 하여  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc,

*n*-BuOH 및  $\text{H}_2\text{O}$ 의 4가지 분획으로 나누어 항균 활성을 측정하고 결과  $\text{CHCl}_3$  분획의 활성이 가장 높아 silica gel column chromatography, recycling preparative HPLC를 이용한 결과 단일 화합물을 얻었다. 이 화합물에 대한 구조 해석을 기기분석 (MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ )을 통해 stigmasterol로 동정하였다. Stigmasterol에 대한 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, S-HA에 대한 부착억제와 비수용성 글루칸 합성 억제를 측정하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

*S. mutans*의 성장억제율이 stigmasterol를 넣지 않은 대조군에 비해 stigmasterol는 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비하여 5%, 18%, 77%, 100%, 100%의 성장억제율을 보여 1.25  $\mu\text{g/ml}$  이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ( $p<0.05$ ). *S. mutans*의 산 생성량은 대조군에서 pH는  $5.22\pm0.08$ 이었고, stigmasterol 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서, 각각  $5.22\pm0.07$ ,  $5.30\pm0.10$ ,  $5.94\pm0.04$ ,  $6.98\pm0.11$ ,  $7.14\pm0.11$ 으로 5  $\mu\text{g/ml}$  이상 농도에서 우식 임계 pH 5.5보다 높았으며, 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ( $p<0.05$ ). S-HA에 *S. mutans* 부착율이 stigmasterol 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 각각 3%, 17%, 31%, 52%, 54%의 부착억제율을 보여 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 대조군에 비하여 유의한 차이가 있었다 ( $p<0.05$ ). GTFase에 의한 비수용성 글루칸 정량 실험을 한 결과 대조군에 비해 stigmasterol 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $98.00\pm1.00\%$ ,  $90.00\pm1.00\%$ ,  $75.67\pm2.08\%$ ,  $67.00\pm2.00\%$ ,  $54.00\pm1.00\%$ 의 생성율을 보여, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 대조군에 비하여 유의한 차이가 있었다 ( $p<0.05$ ).

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, 독활로부터 추출한 stigmasterol는 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, S-HA에 대한 부착억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있으므로, 앞으로 의학적, 산업적으로 유용한 개발 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

1. 한국구강보건협회. 한국인 구강질환 실태조사 결과보고, 1976.
2. 김무길. 대도시인의 구강보건실태 및 상대구강보건의료수요 조사연구. 대한구강보건학회지, 4(1):19-44, 1980.
3. 박종만. 소도시인의 구강보건실태 및 상대구강보건의료수요 조사연구. 대한구강보건학회지, 5(1):7-33, 1981.
4. 오상일, 김종배. 비도시인의 구강보건실태 및 상대구강보건의료수요 조사연구. 대한구강보건학회지, 5(1):55-82, 1981.
5. 김종배 외. 국민구강건강조사 보고서, 1991.
6. 국민구강보건연구소. 1995년 국민구강건강조사보고서, 1995.
7. 보건복지부. 2003년 국민구강건강실태조사보고서. 2004.

8. <http://www.who.int/세계보건기구>, 2001.
9. Tsuneno, N., Masa, T., Masao, H. Dental caries prevention by traditional chinese medicines. *Plant Med* 44:100-106, 1982.
10. 김종배, 최유진. 공중구강보건학. 서울, 고문사, pp 68-84, 1990.
11. 허준 편. 원저 동의학 연구소 역. 동의보감. 서울, 여강출판사, p 773, 1994.
12. 허준 편. 동의보감 국역 위원회 역. 동의보감. 서울, 법인문화사, p 1632, 1999.
13. 유현희, 서세정, 김연화, 이혜연, 금기천, 나종찬, 전병훈, 유용욱. 독활 메탄올 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 성장, 산생성, 부착 및 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*, 19(1):87-91, 2003.
14. 유현희, 정승일, 정수영, 문해답아, 황지영, 정한솔, 유용욱. 독활로부터 분리한 continentalic acid의 향치아우식 활성. *동의생리병리학회지*, 20(3):617-622, 2006.
15. Kang, S.S., Park, J.G., Hyun, J.W., Sung, M.S., Yang, Y.M., Chang, H.S., Paik, W.H. The cytotoxic activity of sterol derivatives from *Pulsatilla Chinensis* Regal, *J Kor Cancer* 28(1):146-150, 1996.
16. Bae, K.H., Sco, W.J., Kwon, T.H., Baek, S.H., Lee, S.W., Jin, K.D. Anticariogenic  $\beta$ -carboline alkaloids from *Commelina communis*. *Arch Pharm Res* 15(3):220-223, 1992.
17. Koo, H., Gomes, B.P., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M., Park, Y.K., Cury, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 45(2):141-148. 2000.