

Thalictrum uchiyamai Nakai 의 抗菌作用에 관한 研究

李仁蘭 · 李芝英
梨花女子大學校 藥學大學

(Received December 8, 1981)

Ihn Rhan Lee and Gee Young Lee

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea

Study on the Antimicrobial Activity of *Thalictrum uchiyamai* Nakai

Abstract—The methanol extract of *Thalictrum uchiyamai* Nakai was fractionated into four parts; (1) ether soluble nonphenolic fraction (2) phenolic tertiary bases fraction, (3) chloroform soluble tertiary bases fraction and (4) aqueous quaternary bases fraction. The fractions of this plant showed a total of twenty-four spots on the silica gel TLC. Ether soluble nonphenolic fraction and ether soluble phenolic fraction showed nine alkaloid spots respectively, chloroform soluble fraction showed three alkaloid spots and quaternary bases fraction showed three alkaloid spots. The antimicrobial activity of the four extracts was shown as follows: nonphenolic tertiary bases inhibited the growth of *Micrococcus dutievi* at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, in phenolic tertiary bases 500, $\mu\text{g/ml}$ concentration was inhibitory to *Micrococcus dutievi* and to *Staphylococcus aureus*. In aqueous quaternary bases, 500 $\mu\text{g/ml}$ concentration was inhibitory to *Klebsiella pneumoniae*. Chloroform soluble tertiary fraction showed slight activity. All of bases showed reproducible activity against tested microorganisms.

Thalictrum 속 식물중 돈잎과 연잎평의다리등은 우리나라의 일부지역에서 음양곽과 같이 삼지구엽초로 혼용되고 있으며¹⁾, 일본에서는 *Thalictrum* 속 식물의 근부를 민간약으로써 북통과 하리에 煎服하며, 또 뿌리의 분말을 棘刺傷에, 잎은 打撲傷에 유효하다고 한다²⁾. 구미에서는 1967년 Kupchan 등이 이 속식물에 항종양작용이 있다고 보고한 이래 이 속 식물의 생리활성물질에 대한 흥미가 높아져^{3,4)}, 많은 연구가 이루어지고 있어, 100여종 이상의 alkaloid 물질이 단리되었으며, *T. rugosum*의 지하부에서는 30여종의 alkaloid가 함유되어 있음이 보고되었다⁵⁾.

그중 많은수의 alkaloid의 항균작용이 인정되었으며^{3,6~13)} 특히 thalidasine, obamegine, thalicar-pine은 항종양성물질로 보고되었다^{4,14,15)}. obaberine, homoaromoline, obamegine, thalrugosine, thaliglucinone 등은 혈압강화작용이 있다고 하였다^{8,9,11)}. *T. minus* L. race B.에서 분리한 talirabine은 실험동물에 따라 혈압강화 또는 상승작용을 나타내며, 또한, 혈압강화작용은 투여량의 증가에 비례하지 않는다고 하였다^{9,11)}.

Thalictrum 속 식물에서 흥미있는 것은 항균작용이 지속적이고, 재생산적인 점이며^{6,16)}, 특히, *Mycobacterium smegmatis*에 대해서 작용매의 분획 ext와 여러종류의 단리물질이 강한 抗菌力

을 나타내는 것이다^{3,6~13,16)}. 이는 곧, 抗結核作用이 있음을 類推할수 있으며, 나아가서 抗腫瘍 藥物의 탐지에도 관심을 가질수있게 한다.

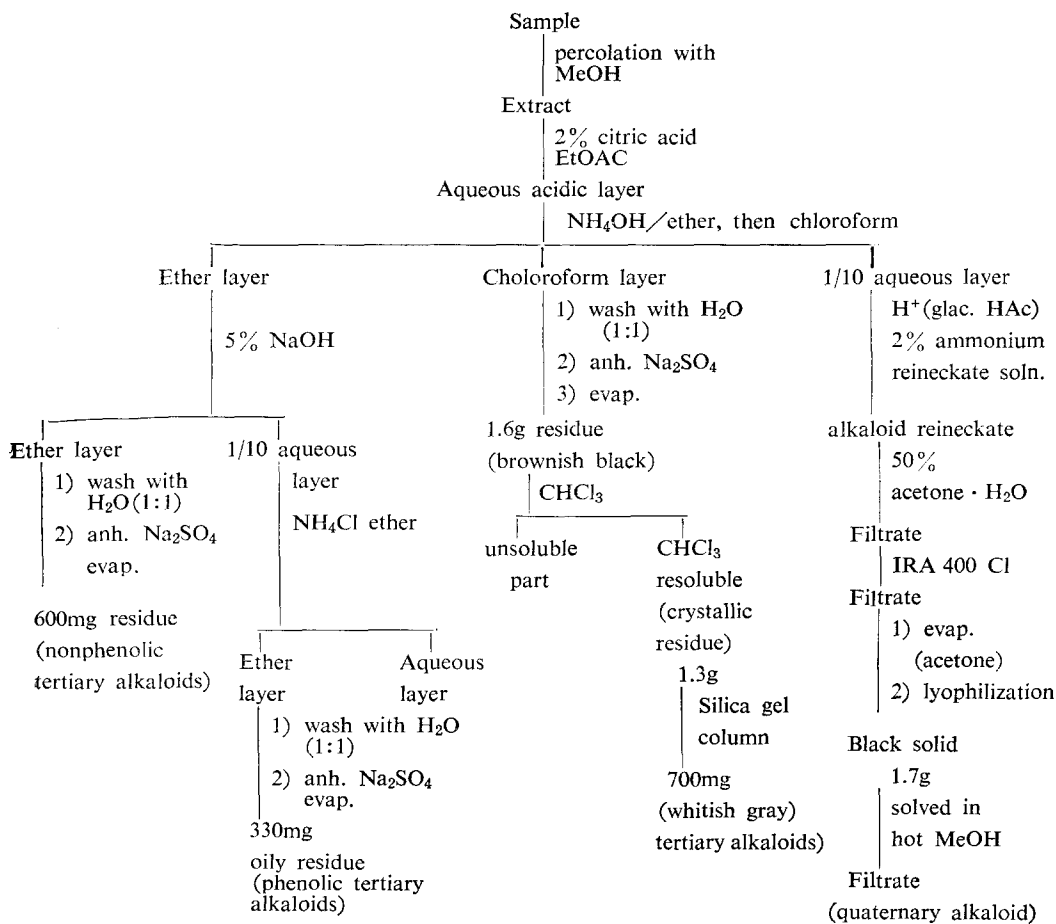
이들 alkaloid의 대부분이 bis-benzylisoquinoline과 aporphine인데, 다른 종류의 식물에서 이미 알려진 이 계통의 물질에도 이러한 생리활성에 관한 관심을 가질 수 있을 것이다.

그리하여 研究者는 우리나라 특산인 자주평의다리(*Thalictrum uchiyamai* Nakai)의 生理活性物質에 흥미가 있어, 全草에서 kaempferol를 분리 보고한데 이어¹⁷⁾, alkaloid의 분획과 이 염기성 물질의 抗菌作用에 관한 연구를 시도하였다.

實驗 方法

Alkaloid의 추출 및 분획—실험재료(2kg)는 1981년 경기도 백운대에서 채집하여, 그의 지하부를 40°C에 건조하였다. percolation에 의하여 MeOH(55.3l)로 Valser 시액에 반응이 나타나지 않을 때까지 추출한 후, 50°C에서 감압농축 하였다(Ext. 220g).

MeOH ext.를 2% citric acid(2l)에 녹혀 동량의 EtOAc를 소량씩 수회 가하여, 산성 및 중성 물질을 분리 제거한 뒤, Scheme I과 같이 처리하여 염기성 물질을 분획하였다.



Scheme I— Fractionation of tertiary and quaternary alkaloids from *Thalictrum uchiyamai*.

Citric acid 액에 NH_4OH 를 pH 9~10이 될 때까지 가한 후 Valser 시액에 반응이 나타나지 않을 때까지 ether(4.5l), CHCl_3 (4kg)순으로 각각 분리 추출하였다.

Ether 층은 동량의 5% NaOH (16l)로 5회 분할 처리한 뒤 동량의 물로 씻은 다음, 무수 Na_2SO_4 로 탈수하고 농축하여 갈색 결정상의 non-phenolic tertiary alkaloid 600mg을 얻었으며,

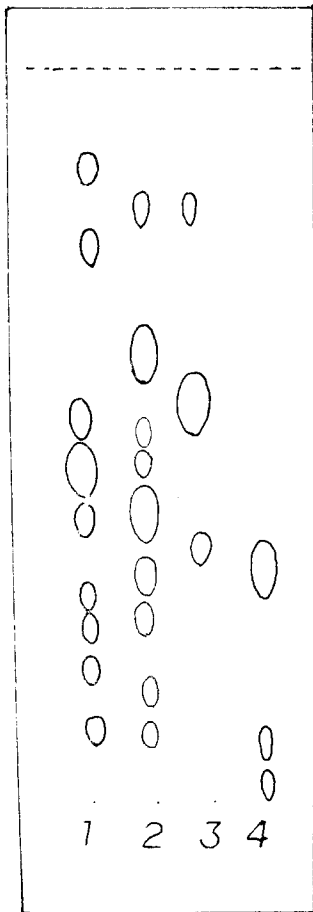


Fig. 1- Thin layer chromatogram of the alkaloidal fractions.(Developing solvents)

1. Ether soluble nonphenolic tertiary bases (benzene: acetone: NH_4OH , 10:10: 0.1)
2. Ether soluble phenolic tertiary bases (benzene : acetone : NH_4OH , 20:20:0.8)
3. Chloroform soleble tertiary bases (benzene: chlorofo rm: NH_4OH 10:10:1 drop)
4. Aqueous quaternary bases (MeOH : H_2O : NH_4OH , 7:2:1)

Absorbent: Silicage 1G

Coloring reagent: Dragendorff T. S.

benzene: acetone: NH_4OH (10: 10: 0.1) 용매계로 silica gel TLC에서 9개의 반점 (Fig. 1)을 Dragendorff 시액으로 확인하였다.

Ether 층을 분리해낸 alkali 성 수용액 (16l) 의 1l 를 NH_4Cl 의 과포화액으로 한후 Valser 시액에 음성이 될 때까지 ether (2l)로 재차 추출하고 동량의 물로 수회 씻고 무수 Na_2SO_4 로 탈수 처리한 다음 농축하여 油狀의 phenolic tertiary alkaloid 330 mg을 얻었 으며, benzene: acetone: NH_4OH (20: 20: 0.8)용매계로 silica gel TLC에서 9개의 반 점 (Fig. 1)을 Dragendorff 시액으로 확인하였 다.

CHCl_3 추출액을 동량의 물로 씻고 무수 Na_2SO_4 로 탈수시킨 뒤 감압농축하여, CHCl_3 Ext. 1.6g을 얻었다. 이것을 CHCl_3 에 재용 해시켰을 때 난용성인 흑갈색 피상물질은 제거하고, 다시 감압농축하여 tertiary alka-loid 1.3g을 얻었으며, silica gel TLC에서 benzene : CHCl_3 : NH_4OH (10ml : 10ml : 1drop)용매계로 3개의 반점 (Fig. 1)을 10 % H_2SO_4 시액으로 확인하였고, 그 중 Dr-agendorff 시액으로는 Rf. 0.53 만이 강하게 정색되어, silica gel column chrom.에 의하 여 tertiary alkaloid 60mg을 분리하였다.

quaternary alkaloid 가용부인 aqueous 분 획을 빙초산으로 약산성이 되도록 하여, 그 의 300ml 를 2% ammonium reineckate 과포 화액으로 하여 reineckate 염으로 침전시켰다 (20g). 이것을 50% acetone에 녹힌 뒤 IRA -400 Cl^- form 500 ml에 통과시켜 냉동건 조하여 4급 염기성물질 1.7g을 얻었으며, hot-MeOH 가용부를 silica gel TLC에서 Me OH : H_2O : NH_4OH (7 : 2 : 1)로 3개의 반점 (Fig. 1)을 Dragendorff 시액으로 확인하였

다.

抗菌實驗—국립보건원에서 분양받은 4개균주 즉 *Staphylococcus aureus* ATCC 65389, *Micrococcus dutica* ATCC 9341, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 및 *Escherichia coli* ATCC 9637에 대해 평판도말법을 써서 항균력을 검사하였다.

Positive control로 SM(항독약품 streptomycin·H₂SO₄ 1g vial) 13μg/ml와 negative control을 만들어 대조하고 37°C에서 24시간 배양한 다음 관찰하였고(Table I), 한편 24시간 배양시에는 항균성을 볼 수 없었던 것이, 이 배지를 1주일간 두었다가 관찰한 결과, negative control의 균주는 생육되는 반면에 Table II와 같이 검체들은 항균성을 나타내 여기에 함유된 물질은 지속적으로 재생산적인 항균작용이 있음을 인정할 수 있었다.

結果 및 考察

Thalictrum uchiyamai Nakai에 함유된 염기성 물질은 silica gel TLC에서 24개의 반점이 확인되었다.

항균작용은 3급 염기의 ether 가용성 non-phenol 성화합물과 phenol 성화합물 및 CHCl₃가용성 물질 그리고, 수용성 염기 4가지 중 non-phenol성 염기 fraction이 가장 활성이 크게 나타나 50 μg/ml에서도 *Micrococcus dutica*에 양성을 나타내었고, 100 μg/ml에는 *Staphylococcus aureus*와 *M. dutica*에 강력한 항균작용을 보였다(Table I).

Table-I Antimicrobial activity of the extracts within 24 hours' incubation.

Fractions Concentrations (μg/ml)	ENP				EP			CT	AQ			MeOH ex.
	1000	500	100	50	1000	500	100	1000	1000	500	100	1000
Strains												
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. dutica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	+	±	+	+	-	-	-	-	-	-

ENP: Ether soluble nonphenolic tertiary alkaloids.

EP: Ether soluble phenolic tertiary alkaloids

CT: Chloroform soluble tertiary alkaloids.

AQ: Aqueous quaternary alkaloids.

또한 non-phenol성 염기의 fraction은 silica gel TLC에서 9개의 반점(R_f 0.09, 0.17, 0.23, 0.27, 0.38, 0.45, 0.5, 0.75, 0.85)(Fig. 1)을 관찰할 수 있었는데, 이 분획부의 강한 생리활성과 R_f값으로 미루어 볼때, thalidasine, thalrugosine, thaliglucione이 있을 것으로 예측된다⁸⁾, 그러나, 이 분획부의 양은 4가지 분획부에 비해 가장 적으며, *T. lucidum*에 비해 1/2량도 못되었다.

phenol성 염기 분획은 TLC결과 9개의 반점(R_f 0.09, 0.12, 0.24, 0.3, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.8)을 확인할 수 있었으며, 용매계의 비율을 변화시켰을 때에도, 반점수의 증감을 볼 수 없었으며, 비교적 강하게 나타난 3가지 물질은 obamegine, oxyacanthine, pensylvanine이 있을 것으로 추정된다^{13~14)}. 이 분획부의 항균작용은 500μg/ml 농도에서는 *M. dutica*와 *S. aureus*에 강한

양성을 나타내었으며, 100 μ g/ml 농도에는 실험에 사용된 모든 균에 음성이었다(Table I). 이 분획부의 양은 *T. uchiyamai* Nakai 가 *T. lucidum* 에 비하여, non-phenol 성 염기물질이 적은데 비하여 3 배 정도 많은 양이 함유되어 있었다.

CHCl₃ 가용성 삼급염기성물질은 TLC 상에서 3 개의 반점(Rf. 0.33, 0.53, 0.83) (Fig. 1) 중 Rf 0.53 물질만 Dragendorff 시액에 강하게 정색되어 silica gel column 을 통하여 70 mg 을 얻었다.

본 실험에서는 Table I 과 같이 이 물질의 항균력은 1000 μ g/ml 농도에서도 음성으로 나타났으나, Wu-Nan Wu 등의 보고에 의하면⁸⁾ 이 분획의 ext. 가 *S. aureus* 에 100 μ g/ml 의 희석된 농도에서 항균력을 나타낸 것과는 다르므로 앞으로 CHCl₃ 가용성 Ext. 의 항균력의 재검토가 요한 다고 본다.

4 급염기성 alkaloid chloride 염의 TLC 에서는 3 개의 반점(Rf. 0.3, 0.07, 0.02)을 볼 수 있었으며, 이 분획의 항균력은 500 μ g/ml 농도에서도 특이하게 *K. pneumoniae* 10031 에 양성을 나타내었음을 확인할 수 있었다(Table I).

Table II에서 나타난 바와 같이 각 fraction 의 뚜렷한 reproducible activity 에 관한 설명은 아마도 이 물질의 二次的 modification 이 일어나 antimicrobial activity 의 양상이 달라진다고 간주 된다. 화학요법제에서 흔히 나타나는 것과는 달리 이러한 천연 의약품은 내성이 극히 적고 지속적인 그의 항균작용은 현대 의약품의 문제점으로 대두되는 부작용 및 내성을 배제할 수 있다는 점에서 앞으로 이에 관한 연구가 매우 주목된다.

한편 *Thalictrum* 속 식물의 약을 일본에서는 민간약으로 타박상에 쓰기도 하여 앞으로 *T. uchiyamai* 의 지상부의 성분연구와 생리활성연구도 또한 이루어져야 하리라 고 본다.

Table II- Antimicrobial activity of the extracts in seven days' incubation.

Fractions Concentrations(μ g/ml) Strains	ENP				EP		CT	AQ			
	1000	500	100	50	500	100	1000	1000	500	100	
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	±	±	*±	-	±	-	-	+	-	-	
<i>M. dutica</i>	+	+	+	+	+	-	±	±	±	-	
<i>S. aureus</i>	+	+	+	-	+	*±	±	-	-	±	

*: slight and faint growth

본 연구는 1981년도 문교부 연구비로 이루어진 것이며, 이에 당국에 깊이 감사하는 바이다.

文 獻

1. Lee, I. R., *J. Korea Research Institution for Better Living*, **15**, 301 (1975).
2. 村越三千男原, 原色植物大圖鑑 3 卷, 誠文堂新光社, 東京 84(1961).
3. L. A. Mischer, W.-N. Wu, R. W. Doskotch, and J. L. Beal, *Lloydia*, **35**, 167(1972).
4. T. Tomimatsu, M. Hashimoto, and J. L. Beal, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 2070(1968).
5. W.-N. Wu, J. L. Beal, E. H. Fairchild, and R. W. Doskotch, *J. Org. Chem.* **32**, 580(1978).
6. W.-N. Wu, J. L. Beal., and R. W. Doskotch, *J. Nat. Pro.*, **43**, 143(1980).

7. W.-N. Wu, J. L. Beal, G. W. Clark, and L. A. Mitscher, *Lloydia*, **39**, 65(1976).
8. *ibid*, **40**, 508(1977).
9. *ibid*, **39**, 204(1976).
10. W.-N. Wu, *Health Sciences Pharmacy*, 5371-B (1972).
11. W.-T., Liao, *Chemistry Pharmaceutical*, 3262(1976).
12. W.-N. Wu, J. L. Beal, and R. W. Doskotch, *Lloydia*, **39**, 378(1976).
13. S. A. Gharbo, J. L. Beal, Raymond W. Doskotch, and L. A. Mitscher, *ibid*, **36**, 349 (1973).
14. K. M. Kupchan, T-H. Yang, G. S. Vasilikiotis, H. Barnes, M. L. King, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3075 (1967).
15. W. H. Lewis, and E. Lewis, *Medical Botany*, A Wiley-Interscience Pubrication 135(1977).
16. L. A. Mitscher, R.-P. Leu, M. S. Bathala, W.-N. Wu, and J. L. Beal, *Lloydia*, **35**, 157 (1972).
17. I. R., Lee, and B. H. Lee., *J. Korea Research Institution for Better Living*, **19**, 251(1972).