

한국전통생약의 약리작용과 활성물질에 관한 연구(V)

사매(蛇莓)의 항균성분획의 페놀성물질

이인란 · 이윤실 · 한용남*

이화여자대학교 약학대학 · *서울대학교 생약연구소

(Received October 4, 1988)

Studies on the Pharmacological Actions and Biological Active Components of Korean Traditional Medicine (V)

Isolation of an Antimicrobial Phenolic Compound from *Duchesnea indica*

Ihn Rhan Lee, Yun Sil Lee and Yong Nam Han*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, and

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—A phenolic compound isolated from the ethylacetate extract of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke (Rosaceae) showed antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* and *Pseudomonas aeruginosa*. This compound was identified as ellagic acid by spectral analysis.

蛇莓는 한방에서 淸血, 解毒, 消炎, 止血, 抗腫痛, 外科瘡瘍, 通月經作用이 있다고^{1~5)}하며 민간에서 胎熱, 齒痛⁶⁾에 사용하며 임상적으로는 白喉, 細菌性痢疾,⁸⁾ 急性穿孔性 闌尾炎⁹⁾에 치유효과를 나타낸다고 보고 되었다. 그런 용도로 주로 民間에서 많이 쓰는 蛇莓는 뱀딸기의 전초로 식물기원은 장미과(Rosaceae)에 속하는 *Duchesnea indica*(Andr.) Focke, *D. wallichiana* (Seringe) Nakai, *D. chrysantha*(Zoll. et. Morr) Mi., *Fragaria indica* (Andr.) Focke로 나라에 따라 다르게 기록되어 있다.^{10~14)} 이 식물의 성분연구는 蛇莓의 種子油에서 oleic, linolic acid, 탄수화물, 알콜류 및 β -sitosterol¹⁵⁾, 그리고 전초에서 1-triacontanol, β -amyrin, friedelin, lupeol 등¹⁶⁾이 분리보고된 바 있고, 최근에 연자는 estrogen 및 histamine 효능,¹⁷⁾ Sarcoma-180 세포에 대한 항암효과¹⁸⁾가 있는 것을 알아내었고 특히 항암효과와 분획은 다당체물질임을 검색, 그 구성 단당류를 보고한바 있다.¹⁹⁾

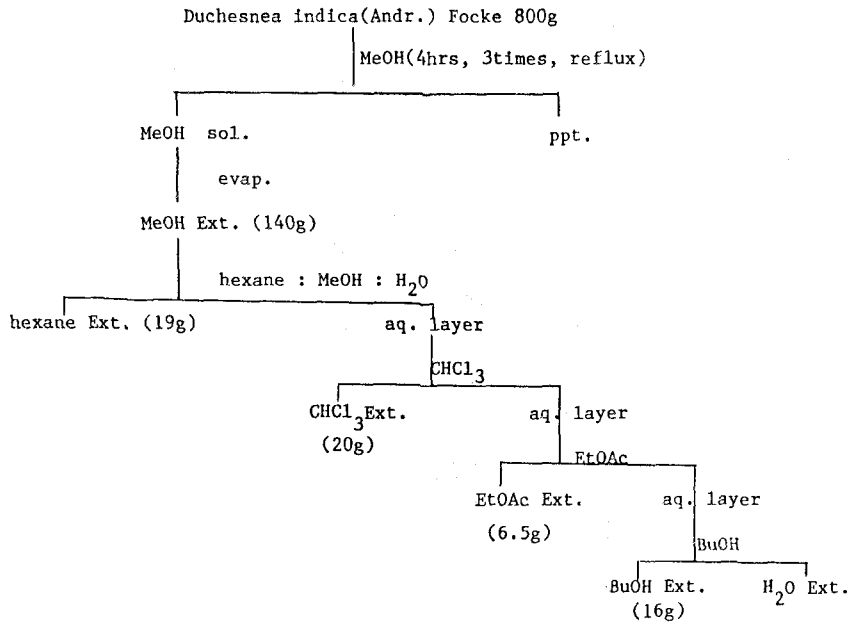
한편, hexane 및 ether Ext.가 *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus niger*에 대한 항균효과,²⁰⁾ 수용성과 acetone 분획의 *S. aureus*, *Samonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*에 대한 현저한 항균성을 보고한바 있다. 금번연구는 항균성물질을 밝혔기에 본보에 보고코져 한다.

실 험 방 법

實驗材料 및 抽出分劃—蛇莓 [*Duchesnea indica*(Andr.) Focke 이하 DI로 약함. (Rosaceae)]는 1987년 7~8월 서울근교 및 충청도지역에서 채집하여 풍건절단한 후 실험재료로 하였다. 세 절한 DI 800g을 MeOH로 4시간씩 3회 수욕상에서 추출농축하여 MeOH Ext. 140g을 얻었으며 항균력 검색을 위하여 Scheme 1과 같이 각 분획을 분리하였다.

사용균주—사용균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Bacillus*



Scheme I. Fractionation and isolation of antimicrobial compounds from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke (DI).

subtilis 4종이며, 보존배지로는 trypton soya agar (Trypton 15.0 g, soya peptone 5.0 g, Sodium chloride 5.0 g, agar No. 3 15.0 g)의 배지를 사용하였다.

균주배양—상법에 의하여 trypton soya agar slant에 사용균주 1 loop를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 것을 종균으로 사용하였다.

실험용균주의 조제—배양시킨 종균 1 loop를 10 ml의 trypton soya broth (pancreatic digest of casein 17.0 g, papaic digest of soybean meal 3.0 g, sodium chloride 5.0 g, dibasic potassium phosphate 2.5 g, dextrose 2.5 g)에 현탁시켜 24시간 incubation에서 배양한 다음 이 균이 든 배양액 1 ml를 취하여 생리식염수로 100배 희석하여 사용하였다.

검체의 조제—MeOH, CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O Ext.의 각 1g/10ml 멸균증류수액이 되게 하여 항균력의 유무를 관찰하였다. 또 MIC를 측정하기 위해서 각 분획 500 mg/10ml 멸균증류수액을 조제한후 그의 1ml를 멸균증류수 1, 3, 5, 7, 9 ml에 넣어 그 농도가 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 8.3 mg/ml, 6.25 mg/ml, 5 mg/ml이 되게 하였다.

이때 detergent로 tween 80은 1ml씩 첨가시켰다.

항균 실험 방법—항균력 실험은 무균적으로 disk 방법을 시행하였다. 즉 미리 가압멸균시킨 disk (filter paper)에 검체를 묻혀 petri dish 중앙부위에 놓고 petri dish 뚜껑을 아래으로하여 37°C에서 24시간 배양시켜 세균의 생육도를 관찰하였다. 지름 9 cm의 petri dish에 trypton soya agar 배지 7 ml를 부어 굳히고, 따로이 trypton soya broth 배지 9 ml에 희석한 4종의 균주, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* 1ml를 넣은 다음 미리 굳힌 agar 배지에 부었다. 한편, compound I의 항균시험은 사매의 각 Ext.와 같은 방법으로, 1.5 mg/ml 농도에서 관찰하였으며, 또한 4균종에 대한 MIC는 compound I의 농도를 1.25, 1.0, 0.75, 0.5 mg/ml로 하여 측정하였다.

활성물질의 단리—항균실험 분획중 가장 항균력이 강한 EtOAc Ext. 6.5 g에 MeOH 100 ml를 가해 완전용해시킨후 하룻밤 방치하여 얻은 황색침전에 MeOH/H₂O(=3:1) 50ml를 넣고 2시간 환류시켜 정제하여 compound I (250 mg)을

얻었다. compound I 은 HPLC(Hewlett packard 1090, Column: NOVAPAK C₁₈, 3.9×150 mm, 3 μm, mobile phase: CH₃CN/H₂O with K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH=6.7, gradient elution: initial CH₃CN/H₂O=4/96, 4 min CH₃CN/H₂O=10/90, 13 min CH₃CN/H₂O=40/60, 15 min CH₃CN/H₂O=60/40) 下 Rt=18.054에서 단일 Peak가 확인되었고 silicagel TLC(CHCl₃/MeOH/H₂O=25 : 6 : 0.3 ; CHCl₃/CH₃COCH₃/HCOOH=75 : 16.5 : 8.5 ; CHCl₃/MeOH/HAc=5 : 2 : 2 ; ethylacetate/HCOOH/HAc/H₂O=100 : 11 : 11 : 27 ; benzene/ethylacetate/HCOOH=2 : 7 : 1)을 실시한 결과 tailing이 심하게 나타났으며 따라서 paper chromatography(HAc : BuOH : H₂O=2 : 5 : 2)를 실시하여 R_f=0.56을 확인하였다.

Compound I의 이화학적 성질 및 분석—Compound I은 담황색 결정성 분말로 FeCl₃에 청색, Pb(Ac)₂에 황색침전, gelatin에 백색침전, (NH₄)₂S에 황색침전, Na₂SO₃/Na₂CO₃/H₂O(=15 : 3.5 : 350) (NSSC)에 황색, Vanillin HCl, HCl-Formalin 및 Br₂수에 음성, 그리고 Pauly 반응에 적색을 나타내었다. 기기는 UV(Hewlett Packard 1090), IR(Perkin-Elementer 283 B), NMR(Varian FT-300A, Bruker FT-80A), MS(Hewlett Packard 5890, Gas chromatography 5970-MSD)를 사용하여 Spectrum을 측정하였다. UV λ_{max} [CH₃CN/H₂O with K₂HPO₄/KH₂PO₄(pH=6.7)] : 220.4, 283.3 nm. IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹) : 3330 (OH), 3300~2500(dimer of gallic acid, strong, broad), 1700(C=C-COO), 1580, 1490(aro C=C) 1000~1100(C-O-C).

¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS) : δ 7.29 (2H, S, H-1 & H-9), 2.7~3.5(4H, m, -OH).

이때 D₂O를 넣어 8 Peak 소실을 확인하였다.

Compound I의 methylation—Compound I 100 mg에 diazomethane 소량을 가한후 농축하여 column chromatography(CHCl₃ → CHCl₃ : MeOH=100 : 1, gradient)하여 황색결정 (Ia)(R_f=0.51, CHCl₃/MeOH=100 : 1)을 얻었다. ¹H-

Table I-MIC values of various fractions obtained from *Duchesnea indica*

Strains	Fraction				
	MeOH	CHCl ₃	EtOAc	BuOH	H ₂ O
<i>S. aureus</i>	12.5 ~25*	6.25 ~8.3	6.25 ~8.3	—	25 ~50
<i>S. dysenteriae</i>	12.5 ~25	8.3 ~12.5	6.25 ~8.3	6.25 ~8.3	12.5 ~25
<i>Ps. aeruginosa</i>	8.3 ~12.5	12.5 ~25	12.5 ~25	—	—

* MIC(minimum inhibitory concentration): mg/ml

NMR(DMSO-d₆, TMS) : δ 7.70 (2H, S, H-1 & H-9) 3.30 (12H, S, 4×OCH₃). MS(m/z) : 358(M⁺), 344(M⁺-CH₂).

Compound I의 acetylation—Compound I 100mg에 acetic anhydride 충분량을 넣고 수일 방치후 acetic anhydride를 제거했다. column chromatography (CHCl₃)하여 거의 백색의 결정 (Ib) (R_f=0.53, CHCl₃/EtOAc=5/1)을 얻었다. ¹H-NMR(CDCl₃, TMS) : δ 7.26(2H, S, H-1 & H-9), 2.06(12H, S, 4×OCOCH₃).

실험결과 및 고찰

抗菌實驗—사매의 각분획 즉 Scheme I의 MeOH(M), CHCl₃(C), EtOAc(E), BuOH(B), H₂O(H) Ext. 100 mg/ml *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* 4균주에 생육억제작용을 관찰한 결과 *Bacillus Subtilis* 균주를 제외한 3균주는 모두 생육억제 작용을 관찰하였다. 그리하여 각 Ext.의 MIC를 측정하기 위해 생육억제 작용을 나타내는 3균주에 대한 각 Ext.의 농도를 25, 12.5, 8.3, 6.25, 5 mg/ml로 높여 항균력을 검토한 결과는 Table I과 같다.

Table I에서 보는 바와 같이 *S. dysenteriae* 균주는 M, C, E, B, H Ext. 등 모두가 항균성을 나타내었고, *S. aureus* 균은 B Ext.의 100 mg/ml에는 양성이나 25 mg/ml에서, 또한 *Ps. aeruginosa*는 B 및 H Ext. 25 mg/ml 등에 음성을 나타내 사매의 *S. dysenteriae*에 가장 강하게 항균

Table II—The antimicrobial activity of Compound I

Strains	Compound I(1.5mg/ml)
<i>S. aureus</i>	##*
<i>S. dysenteriae</i>	##
<i>Ps. aeruginosa</i>	+
<i>B. subtilis</i>	—

* —, negative; +, weak positive; ##, positive; ##, strong positive

Table III—MIC of Compound I

Strains	MIC (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	1.25~1.50
<i>S. dysenteriae</i>	0.75~1.0
<i>Ps. aeruginosa</i>	1.25~1.50

성을 나타내는 것을 알았다. 또 문헌에서 瘡腫, 外科瘡瘍에 효과가 있다고 한 것과 병원성을 일으키는 1차 침입균인 *Ps. aeruginosa*에 대한 항균성과 일치되기도 하다.

Compound I의 항균실험 및 MIC측정—Compound I 1.5 mg/ml로 *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* 4균주에 생육억제 작용을 관찰한 결과는 Table II와 같다.

Table II에서 보는 바와 같이 compound I은 *S. aureus*, *S. dysenteriae* 및 *Ps. aeruginosa*의 3균주에 대해서는 생육억제작용을 나타내나 *B. subtilis* 균주에는 억제작용이 없음을 알았다. compound I의 MIC를 측정기 위하여 1.5, 1.25, 1.0, 0.75, 0.5 mg/ml의 농도로 하여 항균력을 검토한 결과는 Table III와 같다.

Compound I도 역시 사매의 각종 용매 분획의 항균력과 같이 *S. dysenteriae*에 가장 항균력이 컸다.

Compound I의 화학구조 동정—Compound I은 m.p. 360° 이상의 담황색 결정성 분말로 물, alcohol, acetone에 난용이며 FeCl₃에 청색, gelatin 시액에 백침²⁰⁾을 나타내어 Polyphenol성 물질로 추정하였으며 Pb(Ac)₂, (NH₄)₂S에는 침전을 형성했고 Br₂수 HCl-formalin, vanillin-HCl¹⁹⁾에 음성을, Pauly 시액에 적색, NSSC 시

액에 황색을 나타내었다. 또 PPC(HAc/BuOH/H₂O=2:5:2)에서 Rf=0.56의 단일 반점과 HPLC에서 Rt=18.054의 단일 Peak를 나타내면서도 silicagel TLC에서 tailing이 심하게 나타나는 것으로 보아 pyrogallol형 polyphenol성 화합물임을 알 수 있었다.

Compound I은 FAB-MS 스펙트럼에서 M⁺ peak를 보여주지 못하였으나 ¹H-NMR 스펙트럼에서는 δ 7.29(s)의 단일 peak만을 나타내었다. IR스펙트럼에서는 3330cm⁻¹의 OH흡수대, 1700 cm⁻¹의 CO흡수대를 나타내었으며 이 IR 스펙트럼은 ellagic acid의 그것과²²⁾ 일치하는 것으로 보아 Compound I은 ellagic acid로 추정하였다. Compound I을 diazomethane으로 처리하여 만든 methyl ether(Ia)는 MS 스펙트럼에서 m/z 358의 M⁺ peak 및 344의 M⁺-CH₂ peak를 나타내었고, Ia의 ¹H-NMR 스펙트럼은 δ 7.70(aromatic proton)과 3.30(OCH₃)에서 각각 singlet peak를 나타내었다. 이 두 peak의 비는 1:6이었다. 또한 Compound I을 acetic anhydride로 처리하여 만든 acetate (Ib)는 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 7.20 및 2.06(OCOCH₃)에서 각각 singlet peak를 나타내었고 이 두 peak의 비는 1:6이었다. 위의 모든 이화학적 성상으로부터 Compound I은 ellagic acid임을 확인하였다.

Ellagic acid의 생리활성에 관해서는 aromatic hydrocarbone체의 발암성 대사산물에 대한 강한 억제작용²³⁾과 암 예방작용²⁴⁾ 등이 이미 보고되어 있다. 저자들은 사매가 항암작용이 있음을 이미 보고한 바 있으며 그 유효성분중의 하나는 ellagic acid일 것으로 사료되며 이 물질은 *S. dysenteriae*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*에 대해 항균작용이 있음을 이 논문에서 밝혔다.

결 론

蛇莓를 MeOH로 수회 추출한 후 MeOH, CHCl₃, EtOAc, BuOH, H₂O 순으로 분획하여 각분획에 대해 *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* 3균을 대상으로 MIC를 측정하였으며, 그중 생리활성이 높

은 EtOAc 분획으로부터 column chromatography 법 등을 이용하여 polyphenol성 물질을 분리하였다. 이 물질은 분광학적 분석방법을 통하여 ellagic acid로 동정하였고 위의 3군에 대해 생육억제작용을 확인하였다(*Ps. aeruginosa*, 1.5 mg/ml~1.25 mg/ml; *S. aureus*, 1.25mg/ml~1.5mg/ml; *S. dysenteriae*, 0.75mg/ml~1.0mg/ml) 따라서 ellagic acid가 사메의 항균성생리작용을 나타내는 물질임을 알 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 산학재단 연구비 지원에 의하여 이루어졌음을 밝히며 이에 감사드리는 바이다.

문헌

- 1) 白井光太郎, 鈴木眞海, 譯, 頭註國譯 本草綱目 草部, 第六冊, 春陽堂, 東京 p.175-8 (1931).
- 2) 赤松金芳, 訴訂 和漢藥, 醫齒藥出版, 東京 p.378 (1970).
- 3) 中藥大辭典, 江蘇新醫學院(編), p.2116-7 (1978).
- 4) 中醫病方治毛, Chinese Medical Plant, p.877 (1974).
- 5) 陳在仁, 圖說 漢方醫藥大事典, 第四卷, 講談社, 東京, p.219-232 (1982).
- 6) Sun Ju Lee, Korean Folk Medicine, monographs Series, No. 3, 동명사, 서울, p.68 (1970).
- 7) 金展造編, 傳染病, 第二分冊, p.11 (1970).
- 8) 南通醫學院附屬醫院, 醫療教學參考資料, p.17-20 (1972).
- 9) 新醫藥學染志 2, p.24-25 (1975).
- 10) 이창복, 대한식물도감, 향문사, 서울, p.432 (1982).
- 11) 村越三千男, 原色植物大圖鑑, 誠文堂光社, p.262 (1958).
- 12) 대만식물지, 대만식물지편집위원회, 대만, p.63 (1977).
- 13) 寺山奇, 日本植物圖譜, 平凡社, 東京, p.338-40 (1977).
- 14) 中國科學原植物研究所(編), Iconographia Cormophytorum Sinicorum II. 科學出版社, 北京, p.287 (1972).
- 15) Mitsuhashi Totsuo, Shibuya Yuichi. Endo. Setsuko, Compositions of the seed oils from the New Summer Orange, *Viburnum phlebotrichum*, *Viburnum dilatatum*, *Rubus Provifolius* and *Duchesnea indica*. Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo 23, p.77 (1971).
- 16) Mukjee, K.S., Bhattacharya, M.K.: Phytochemical Investigations of *Aesculus indica* L. and *Fragaria indica* Andr., J. Indian Chem. Soc., LX, p.507 (1985).
- 17) Ihn Rhan Lee: Biological Active Components of *Duchesnea indicae* Herba, Kor. J. of Pharmacognosy 15, p.2 (1984).
- 18) Ihn Rhan Lee and Young Hee Kim: Studies on the Antitumor Activity of *Duchesnea indica* Herba, Arch. Pharm. Res., 9(1) p.1-4 (1986).
- 19) Ihn Rhan Lee, Young Hee Kim and Gwang Ja Jeong: Studies on the pharmacological Actions and Biological Active Components of Korean Traditional Medicine, Yakahak, Hoeji, 31(4), p.230-235 (1987).
- 20) Ihn Rhan Lee, Young Hee Kim: Studies on Pharmacological Active Constituents of *Duchesnea indicae* Herba, J. Kor. Research Institute for Better Living 35, 129 (1985).
- 21) W. Edwin Hillis and Yoshikazu Yazaki: Wood Polyphenols of *Eucalyptus polyantatem*, Phytochemistry, Vol. 21, p.2969-2977 (1973).
- 22) Charles J. Pouchert, The Aldrich Library of Infrared Spectra (ed. III), p.914-H (1983).
- 23) A.W. Wood et al.: Inhibition of the mutagenicity of the ultimate carcinogenic metabolite of benzo [α]pyrene, Nat. Acad. Sci. USA 79, 5513 (1982).
- 24) J. Fox: Brief discussion of ellagic acid as a prototype of a new class of cancer-preventing drugs, Chem. & Eng. News 60, 26 (Oct. 25, 1982).