

충치균에 대한 생리활성 생약성분의 분리 및 약효평가(1)

튜립나무잎의 항균성 성분과 안전성에 대하여

배기환 · 김봉희 · 명평근 · 변재화

충남대학교 약학대학

(Received January 12, 1990)

The Isolation and Evaluation of Bioactive Components from Crude Drugs against a Cariogenic Bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176 (1) On the Antibacterial Component of the Leaves of *Liriodendron tulipifera* and Its Safety

Kihwan Bae, Bonghee Kim, Pyungkeun Myung
and Jaehwa Byun

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 302-764, Korea

Abstract—The isolation and identification of an antibacterial component, from the leaves of *Liriodendron tulipifera*. K. Kotch against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176, were carried out for developing of anticariogenic agents. The bioactive component was elucidated as β -liriodenolide, which was isolated newly from the leaves of *L. tulipifera*. The minimal inhibitory concentration (MIC) of β -liriodenolide was 100 $\mu\text{g/ml}$ and the antibacterial activity was stronger than that of berberine.

β -Liriodenolide inhibited β -lactamase activity, 50, 100 and 200 μM β -liriodenolide did β -lactamase activity as 0.7, 3.5 and 19.7%, respectively. The toxicity of β -liriodenolide was not found with the method of photohemolysis.

Keywords— β -Liriodenolide, *Liriodendron tulipifera*, *Streptococcus mutans*, β -lactamase, photohemolysis.

충치(dental caries)는 세균에 의해 음식물 중의 탄수화물이 발효되어 국소적으로 산생한 유기산의 작용에 의해 치아의 표면(에나멜질 또는 세멘트질)이 파괴되므로 발병한다고 알려져 있다.^{1,2)} 그리하여, 치아의 유기질이 또다시 세균에 의해 침습되어 심화되어 가는데 어떤 치료도 하지 않을 경우, 치아의 손상은 경조직에 이르고, 치수에 나아가서 근관을 거쳐 치조골의 파괴에까지 이른다. 현재 충치는 구강내의 세균 중 특히 구강연쇄구균(이하 충치균이라 함, *Streptococcus mutans*)에 의해 발생한다고 보고되어 있다.^{3,4)}

충치를 치료하기 위하여 구강내의 충치균을 제거하기 위한 연구가 발표되어 있는데, 요약해 보면 (1) 페니실린, 에리스로마이신, 테트라사이클린과

같은 항생제는 생체내 실험이나 생체의 실험에서 효과적이었으나, 장내 세균총에 영향을 주는 등 부작용이 크고,⁵⁾ (2) 클로로헥시딘은 충치형성을 저지하는 효과가 있으나,⁶⁾ 구강점막의 궤양이나 박리, 치아에 실리콘을 부착시키는 등의 부작용이 있고,⁷⁾ (3) 새로운 예방법의 하나로 백신이나 덱스트라나제⁸⁾ 등의 효소로 시도해 보았으나 효과가 없어 임상에 응용하지 못하고 있다. 그러므로, 현재 충치 예방에는 불소혼입 치약으로, 충치치료에는 sealant 법에 의존하나 충치의 예방 및 치료약은 아직도 개발되어 있지 않다.

본 연구자들은 천연물로부터 충치균에 대항 항균성 물질을 분리하여 충치예방 및 치료제로 개발하기 위한 연구를 해오고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 본 연구에서는 튜립

나무 (*Liriodendron tulipifera*) 잎에서 항균성 물질을 분리, 화학구조를 동정하였다. 그리고 베타락탐 항생제를 분해하므로써 약효를 감소시키는 β -lactamase에 대한 저해효과를 검토하고 아울러 안전성 평가를 위하여 광에 의한 적혈구 용혈현상에 대한 실험을 하였다.

실험방법

1. 생약재료

튤립나무 (*Liriodendron tulipifera* K. Koch)의 잎은 1988년 6월 충남대학교내에서 재식하는 것으로부터 채취하였다.

2. 시 약

Erythromycin (Sigma), Cephaloridine (Sigma), Penicillinase (*Enterobacter cloacae* Type 3, Sigma), Magnolol (*Magnolia obovata* 수피에서 분리), Brain heart infusion (BHI, BBL), Nutrient agar (Acumedia), Mueller hinton broth (Acumedia)

3. 기 기

IR spectrophotometer (Perkin Elmer model 783), NMR (Varian EM 360 A), Digital grating spectrophotometer 393 (Cecil), UV lamp ENF-24 (Spectronic), Melting point apparatus (Electrothermal),

4. 항균성 성분의 분리

잎 4 kg을 수욕상에서 methanol로 환류시키면서 3시간씩 3번 추출, 온시에 여과하였다. 추출액을 상온에서 냉각시키면서 방치하면 다량의 황색침전이 떨어지는데, 감압여과하에 분리하였다. 여액을 35°C 수욕에서 감압농축, 용매를 제거한 뒤, 300 ml의 증류수에 현탁시켜 petroleum ether, ether, ethylacetate, n-butanol 순으로 용매분획, 각 분획물과 침전을 disk plate method¹²⁾로 항균력을 측정하였다. 이 때 500 µg/disk의 농도로 실험하였는데, ether 분획에서 항균력을 나타냈다. ether 농축물에서 50g을 취해 silica gel 컬럼크로마토그래피를 행하여 항균성 물질을 분리하였다 (Fig.1).

5. 항균실험

Disk plate method¹²⁾-*Streptococcus mutans* OMZ 176을 실험전 BHI agar slant를 사용하여

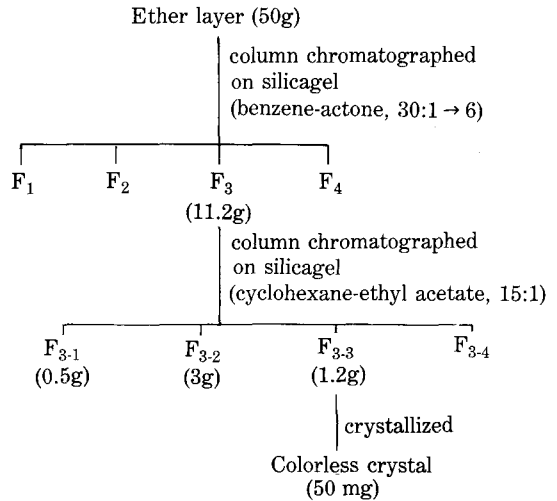


Fig. 1—Isolation of active compound from leaves of *L. tulipifera*.

37°C에서 24 시간 배양시킨 후, 생리식염수로 희석, 600 nm에서 transmittance가 10%되도록 조절한 것을 seed layer로 사용하였다. 두께 4 mm 정도의 BHI agar 층에 seed layer를 4~5 mm 되도록 부은 뒤 응고시키고, 응고된 표면에 약물이 함입된 disk를 올려놓고 37°C, 16시간 배양, 여제된 부분의 직경을 측정했다.

최소 발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)—배수희석법¹²⁾에 의해 측정하였다. 즉, 10 mg의 물질을 dimethyl sulfone oxide 1 ml에 녹인 뒤, 배수로 희석하였다. 시험관에 550 nm에서 O.D.가 absorbance로 0.07인 BHI broth 4.9 ml를 넣고 약물용액 0.1 ml를 넣은 후, 배수희석을 하여 37°C에서 16시간 배양시킨 뒤 증식을 억제한 최소농도를 육안으로 확인하였다.

6. β -lactamase에 대한 저해효과

O'Callaghan 등의 방법¹³⁾에 준하였다. 즉, β -lactam 고리의 가수분해 속도는 β -lactam 고리에 회합된 최대 흡수파장에서 cephalosporin의 흡광도 감소속도를 측정한다. 기질로서 cephaloridine을 사용하고, 효소농도는 1 cm 큐벳에 37°C, pH 7.0인 0.1 M phosphate 완충용액에서 0.1 mM (41.5 µg/mg)인 cerpaloridine 용액 3 ml와 혼합하여 10-15 µl의 효소용액이 기질을 5~10분안에 완전히 가수분해하도록 조정하였다. 이 때 첨가된 시료는 50, 100 및 200 µM 이었고 Beckman

DU-65를 이용하여 255 nm에서 흡광도의 감소속도를 측정하였다.

7. 적혈구 용혈에 의한 안전성실험

Kahn 등의 방법¹⁴⁾에 준하였다. 즉, 일정량의 시료원충용액 5 ml에 20 v/v% RBC 생리식염용액 50 μ l를 넣어 시료-RBC 현탁액(500:1)을 만든 다음 일정기간 UV-A를 조사(암실, 10 cm 거리)하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리, 상정액 3 ml를 취해서 Drabkin 용액($K_4Fe(CN)_6$ 20 mg, KCN 50 mg, KH_2PO_4 140 mg, Tritonx 100 0.5 ml)를 가하여 생성된 cyanomethemoglobin을 540 nm에서 흡광도를 측정하고 대조치와 비교하여 photohemolysis(%)를 구한다. 이 때 0.09% NH_4OH 용액 10 ml에 적혈구 0.02 ml를 가해 상기방법으로 얻은 측정치를 100% 용혈용액으로 한다.

결과 및 고찰

항균성 성분의 분리 및 동정—Fig.1에서와 같이 F_3 를 silica gel 컬럼으로 분획하여 결정성물질이 함유된 F_{3-3} 을 얻고, acetone-ethanol=9:1로 재결정하여 무색침상결정을 얻었다. 이 결정을 cyclohexane-ethylacetate=1:1로 silica gel plate 상에서 전개, 2,4-dinitrophenylhydrazine 시약에 의해 양성반응을 나타내어 $\text{—}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{—}$ 를, $NH_2OH \cdot FeCl_3$ 시약에 의해 양성반응을 나타내어 lactone이 존재함을 예측했다.

mp.=119-120°; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400 (free OH), 1765 (α, β -unsaturated lactone $\text{—}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{—}$), 1683 (esteric-C-); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.18 (1H, d, J 3.3 H-13), 5.74 (1H, m, H-8), 5.47 (1H, d, J 3.0, H-13), 5.04 (1H, bs, H-14), 4.97 (1H, bs, H-14), 4.55 (1H, t, J 11.0, H-6), 3.53 (1H, dd, J 10.2 and 5.2, H-1), 2.81 (1H, dq, J 11.0, 3.3, 3.0 and 3, H-7), 2.07 (3H, s, Ac), 1.67 (1H, s, OH) and 0.98 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) S (Fig.2); 170.1 (lactonic-C-), 168.7 (C- CH_3), 141.2 (C-11), 134.5 (C-4), 121.2 (C-13), 120.8 (C-14), 91.2 (C-8), 75.6 (C-1), 66.1 (C-6), 64.0 (C-7), 60.3 (C-10), 46.0 (C-5), 33.4 (C-3), 30.8 (C-2), 25.4 (C-9), 20.8 (C- CH_3), 18.5 (C-15).

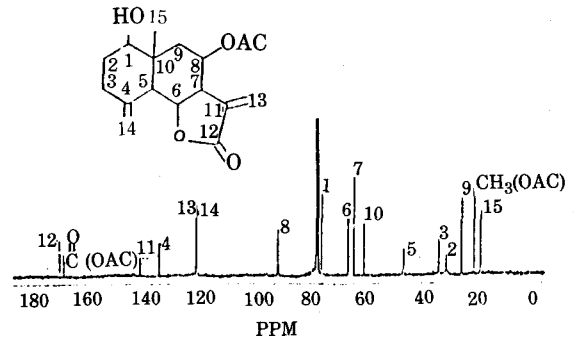


Fig. 2—CMR spectrum of β -liriodenolide isolated from the leaves of *L. tulipifera*.

Table 1—Antibacterial activities of β -liriodenolide, berberine, magnolol and erythromycin against *Streptococcus mutants* OMZ 176.

Compounds	Diameter of inhibitory zone (mm)			
	10 ¹⁾	20	60	100
β -liriodenolide	— ²⁾	—	9.5	10.5
berberine	—	—	—	10.2
magnolol	9.0	11.0	14.0	15.0
erythromycin	18.0	19.0	22.0	24.0

1) Added amounts (μ g) per a disk

2) No inhibitory zone was formed

이상과 같이 물리화학적 성상으로부터 이 물질은 Doskotsch 등¹⁵⁾에 의해 *L. tulipifera*의 근피에서 분리한 β -liriodenolide와 일치하였다(Fig.2). 그러나 이 식물의 잎에서는 처음으로 분리된 것이다.

항균작용—Disk plate method¹²⁾에 의해 β -liriodenolide의 항균력을 측정해 본 결과(Table I), 10과 20 μ g/disk에서는 항균력이 없었고, 60과 100 μ g/disk에서는 항균력이 있었다. erythromycin과 magnolol의 항균력보다는 떨어졌으나, 천연물에서 항균성 성분의 하나로 알려진 berberine보다는 항균력이 컸다. 그리고 β -liriodenolide의 최소 발육저지농도(MIC)는 100 μ g/ml로서 erythromycin이나 magnolol보다 항균력이 약했다(Table II).

β -lactamase에 대한 영향—병원미생물의 베타락탐항생제에 대한 내성은 β -lactamase에 의하여 가수분해되므로써 일어난다고 한다.^{16,17)} 지금까지 β -lactamase의 저해제가 많이 개발되어 있는데, 이런 물질들은 공통적으로 베타락탐환을 가지고 있

Table 2—Minimal inhibitory concentration (MIC) of β -liriodenolide, magnolol and erythromycin against *S. mutans*

Compounds	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
β -liriodenolide	100.0
magnolol	6.3
erythromycin	0.063

Induction for 16 hours at 37°C in BHI liquid medium

Table 3—Initial rates cephaloridine with several concentrations of β -liriodenolide

Cephaloridine Conc. (mM)	β -liriodenolide Conc. (μM)	Rate ($\mu\text{M}/\text{min}$)	r
0.1	0	0.142	1.000
0.1	50	0.141	0.997
0.1	100	0.137	0.998
0.1	200	0.114	0.996

r: Correlation factor

는 것이 특징이며 β -lactamase와 결합하여 acyl-enzyme을 형성한 뒤 더욱 안정한 모양으로 바뀌어 불활성화되는 것으로 밝혀졌다.¹⁸⁾ 1980년 *Micromonospora* 균의 배양액에 β -lactamase의 저해작용이 있는 물질로서 izumenolide가 분리되었는데,¹⁹⁾ 이 물질은 베타락탐환이 없는 macrolide이다. panosialin 및 sodium dodecyl sulfate²⁰⁾도 베타락탐환을 가지고 있지 않음에도 불구하고 β -lactamase의 저해작용이 있음을 감안할 때, β -lactamase의 저해제가 반드시 베타락탐환을 가지고 있어야 한다는 주장²¹⁾에서 벗어나게 한다. 그러므로 베타락탐환을 가지고 있지 않는 β -lactamase의 저해제들은 이 효소의 작용부위가 베타락탐항생제보다 넓거나,²⁰⁾ 다른 작용부위를 가진다고 생각된다. 이런 점에 착안하여 β -lactamase에 대한 β -liriodenolide의 저해효과를 실험한 결과(Table III, Fig.3), 50 μM 에서 0.7%의 저해효과를 나타냈으며, 100과 200 μM 에서 3.5% 및 19.7%의 저해효과를 나타냈다. 즉, β -lactamase에 대한 β -liriodenolide의 저해효과가 농도의존성이 있다고 하겠다. β -liriodenolide의 β -lactamase에 대한 저해효과는 기존의 저해제들 보다 효과가

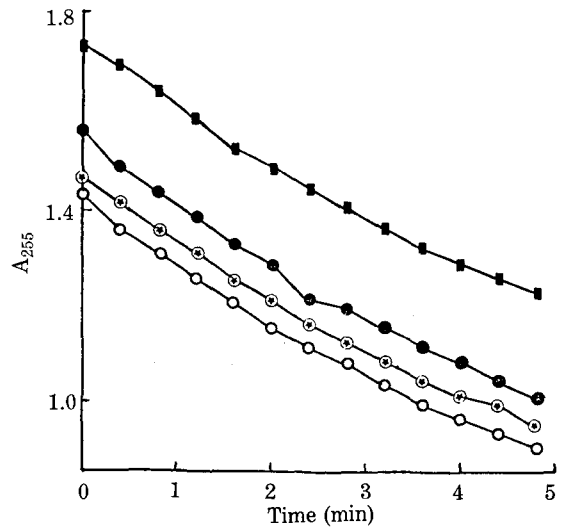


Fig. 3—Time course for the inhibition of *Enterobacter cloacae* Type III penicillinase by β -liriodenolide. \circ ; no inhibitor, \star ; with 50 μM β -liriodenolide, \bullet ; with 100 μM β -liriodenolide, \blacksquare ; with 200 μM β -liriodenolide.

Table 4—Photosensitizing activities of β -liriodenolide and Emodin by photohemolysis

Compounds	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Hemolysis (%)
β -liriodenolide	25	3
emodin	25	27

떨어지나, 식물성분으로부터도 새로운 저해제를 개발할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다.

4. 적혈구 용혈시험에 의한 안전성—광에 예민한 화합물이 들어 있는 적혈구에 290~370nm의 UV를 조사하면 용혈현상이 일어난다. 용혈의 정도는 적혈구막에 대한 화합물의 효과와 비례되어 결정되며, 광에 예민하지 않는 화합물은 용혈현상이 일어나지 않는다. Kahn 등의 방법¹⁴⁾에 의하여 실험한 결과(Table IV), β -liriodenolide의 용혈작용은 3%였다. 이러한 실험치는 원충용액으로 사용한 Veronal 원충용액 자체에 약간의 용혈작용이 있는 것으로 보고된 바 있으므로,¹⁴⁾ β -liriodenolide는 광독성 물질이 아니라고 생각된다. 참고로, 호장근 (root of *Reynoutria elliptica*)에서 단리한 항균성

분 emodin 은 27%의 용혈작용이 있었다.

결 론

1. 튜립나무 (*Liriodendron tulipifera*)의 잎에서 충치균 (*Streptococcus mutans* OMZ 176)에 대한 항균성분을 단리, 물리화학적인 성상에 의거 β -liriodenolide로 동정하였으며, 이 식물의 잎에서 처음으로 분리한 것이다.

2. β -liriodenolide의 최소저지농도 (MIC)는 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 기존의 항균성물질로 알려진 berberine 보다는 항균력이 강했다.

3. β -lactamase에 대한 저해효과를 조사해본 결과, 50, 100 μM 및 200 μM 의 β -liriodenolide는 0.7, 3.5% 및 19.7%의 저해효과를 나타내어, 식물 성분으로부터도 β -lactamase의 저해제를 개발할 수 있는 가능성을 시사한다.

4. 적혈구 용혈시험에 의하여 β -liriodenolide의 안전성을 검토한 결과, 이 물질은 광독성이 없는 것으로 판명되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1988년도 문교부 학술연구조성비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 깊이 감사드린다.

문 헌

- 1) Dewar, M.D., Walker, G.J.: Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque, *Caries Res.*, **9**, 21 (1975).
- 2) Fitzgerald, R.J. and Keyes, P.H.: *J. Am. Dent. Ass.*, **61**, 9 (1960).
- 3) Ellwood, D.C., Baird, J.K., Hunter, J.R., Longyear, V.M.C.: Variations in surface polymers of *Streptococcus mutans*, *J. Dent. Res.*, **55**, 42 (1976).
- 4) Inoue, M. and Koga, T.: Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*, *Infect. Immunity*, **25**, 922 (1979).
- 5) Fitzgerald, R.J.: *J. Am. Dent. Ass.*, **87**, 1006 (1973).
- 6) Takemura, K.: *Nippon Shika Hozongaku Zasshi*, **18**, 35 (1975).
- 7) Koenig, K.G. and Guggenheim, B.: *Helv. Odontol.*

Acta, **12**, 48 (1968).

- 8) Staat, R.H. and Schatele, C.F.: Evaluation of dextranase production by the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*, *Infect. Immunity*, **9**, 467 (1974).
- 9) Bae, K. and Byun, J.: Screening of higher plants for antibacterial action, *J. Kor. Pharmacogn.*, **18**(1), 1 (1987).
- 10) Seo, W., Koo, S. and Bae, K.: Antimicrobial activities of hydroxybiphenyl allylhydroxybiphenyl compounds against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176, *Arch. Pharm. Res.*, **9**(3), 127 (1986).
- 11) Bae, K. and Oh, H.: Synergistic effect of lysozyme on bactericidal activity of magnolol and honokiol against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176, *Arch. Pharm. Res.*, **13**(1), 1990, in press.
- 12) Namba, T., Tsunozuka, M. and Hattori, M.: Dental caries prevention by traditional chinese medicines (part II), Potent antibacterial action of Magnoliae Cortex Extracts against *Streptococcus mutans*, *Planta Medica*, **44**, 100 (1982).
- 13) O'Callaghan, C.H., Muggleton, P.W. and Ross, G.W.: Antimicrobial agents and chemotherapy (G. Hobby ed.), *Am. Soc. Microbiol.*, 1968, p. 57.
- 14) Kahn, G. and Flcischaker, B.: Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds, *J. Invest. Dermatol.*, **56**, 85 (1971).
- 15) Doskotch, R.W., Wilton, J.H., Harraz, F.M., Fairchild, E.H., Huang, C. and El-Ferally, F.S.: Six additional sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera*, *J. Nat. Prod.*, **46**(6), 923 (1983).
- 16) Abraham, E.P. and Chain, E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature*, **146**, 837 (1940).
- 17) Citri, N. and Pollock, M.R.: The biochemistry and function of β -lactamase, *Adv. Enzymol.*, **28**, 237 (1966).
- 18) Sykes, R.B. and Matthew, M.: The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**, 115 (1976).
- 19) Liu, W., Ashe, G., Mittis, Jr., J.S., Truo, W.H., Principe, P.A., Raihunum, M.I., Parker, W.L., Kocy, O.R. and Sykeys, R.B.: A novel β -lactamase inhibitor produced by *Micromonospora*, *J. Antibiot.* (Tokyo),

- 33, 1256 (1980).
- 20) Bush, K., Freudenberg, J. and Sykes, R.B.: Inhibition of *Escherchia coli* TEM-2 β -lactamase by the sulfate compounds, izumenolide, panosialin and sodium dodecyl sulfate, *J. Antibiot.* (Tokyo), **33**, 1560 (1980).
- 21) Knowles, J.R.: The biochemistry of β -lactamase, The Sym. Proc. of Enz. Inhibitors, Verlag Chemie, 1980, p. 165.