

## 후박피(*Magnoliae* bark)로부터 항충치활성을 갖는 물질의 분리

이운수 · 박헌주 · 유재선 · 박형환 · 권익부 · 이현용\*  
롯데그룹중앙연구소, \*강원대학교 식품생물공학부

### Isolation of an Anticariogenic Compound from *Magnoliae* Bark

Youn-Soo Lee, Hun-Joo Park, Jae-Sun You, Hyung-Hwan Park,  
Ik-Boo Kwon and Hyeon-Yong Lee\*

Lotte Group R&D Center, Seoul, Korea

\*Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

#### Abstract

We have screened total 32 herbal drugs to find the highest activity against human cariogenic enzyme, glucosyltransferase (GTase) from the extracts of *Magnoliae* bark. The extracts were separated into three phases, i. e. water, *n*-butanol and ethylacetate according to their solvent polarity. Among them, ethylacetate fraction had approximately more than 70% of total activities, and the active principle was further isolated by prep. HPLC following silicagel column chromatography to yield single compound as white powder. The chemical structure of the compound was finally elucidated to be 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxylygnan from the spectral data of FAB-MS, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectrometries. The compound was also shown to have relatively strong antibacterial activity against ten types of cariogenic oral bacteria and one kind of *Actinomyces* sp.

Key words: *Magnoliae* bark, *Streptococcus mutans*, glucosyltransferase, 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxylygnan

#### 서 론

충치(dental caries; 치아우식증)는 인류가 오래전부터 고민해 온 질환중의 하나로 설량이 일상적인 감미료로서 세계 각국에서 이용되게 되면서 충치의 발병율은 증가하고 있다. 또한 이 질환은 한때 문명의 척도가 되기도 하였으나, 현재 전세계적으로 가장 널리 만연되고 있는 문화병의 하나로 선진국은 물론 우리나라의 경우도 발병율이 점진적으로 증가하고 있는 추세에 있다<sup>(1-4)</sup>. 충치는 치아의 파괴를 동반한 감염성 질환으로 치석(plaque)내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의해 유발되는 다인성 질환이다. 치석내 세균중에서도 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)가 주 원인균이며, 치면에 부착, 증식 및 산생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다<sup>(5)</sup>. 즉, *S. mutans*는 치면의 피막에 부착한 후 자신이 생산하는 glucosyltransferase (GTase)에 의하여 음식물중의 sucrose로부터 glucose polymer인 불용성 glucan을 합성한다. 이 불용성 glucan은 거

의 대부분이  $\alpha$ -1,3 결합으로 구성되어 있다고 보고되고 있다. 합성된 glucan은 치면에서 증식하는 세균간의 결합을 증가시키며, 이렇게 치면에 부착한 *S. mutans*는 치면에 자리잡고 당질 대사과정에서 lactic acid 등 유기산을 생성하여 치아의 enamel질을 탈회(decalcification)시켜 충치를 유발한다<sup>(6,7)</sup>.

최근 치면 세균막 형성 저해제의 개발 즉, *S. mutans*의 GTase활성 저해제를 탐색하는 것이 충치를 예방하는 가장 유효한 수단으로 인정되고 있으며, 또한 효율적인 assay법이 개발되면서 충치를 해결할 수 있는 새로운 전략으로 주변에서 쉽게 접할 수 있는 천연물로부터 항충치물질을 분리하고자 하는 노력이 시도되고 있다<sup>(8-15)</sup>. Kwon<sup>(16)</sup> 및 Ahn<sup>(17)</sup> 등은 cacao bean 및 감잎 등으로부터 GTase 저해활성을 지니는 수종의 tannin 화합물을 분리한 바 있으나 이들 tannin계 화합물은 GTase 뿐만 아니라 거의 모든 효소작용을 비특이적으로 저해한다는 보고가 있어 실제 산업적 응용면에서 많은 제약을 가지고 있다. 또한 녹차 및 우롱차 중의 catechin 등 polyphenol화합물<sup>(9)</sup>이 GTase에 대해 강력한 저해활성을 갖는 것으로 확인되었으며, 토양에서 분리한 곰팡이인 *Aspergillus terreus*의 배양액으로부터

Corresponding author: Hyung-Hwan Park, Lotte Group R&D Center, 4-23 Yangpyong-dong, Youngdeungpo-ku, Seoul 150-104, Korea

터 mutastein<sup>(18)</sup>이라는 당단백질이 분리되어 GTase 저해제로서 상품화되기도 하였다. 그러나 그 외에 상품화에 이르는 물질은 아직까지 개발되지 않고 있는 실정므로, 보다 산업적 응용가치를 지닌 천연물 유래의 GTase 저해물질의 탐색에 대한 필요성이 대두되고 있는 것이다.

따라서 본 연구에서는 부작용없이 식품이나 의약품 용으로도 이용가능한 충치 예방물질의 탐색을 목적으로 국내에서 유통되고 있는 생약재 등 천연 식물자원에서부터 새로운 GTase 저해활성을 갖는 물질을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

후박피 등 각 생약재는 경동시장(서울)에서 구입하여 사용하였다. Crude GTase는 Fukushima 등<sup>(19)</sup>의 방법을 약간 변형하여 조제하였다. GTase 생산균주인 *S. mutans* ATCC 27351을 37°C에서 24시간 정치배양한 것을 종배양액으로 하여 동일한 조건으로 BHI (Brain Heart Infusion) 배지 4.5L에 2% (v/v) 접종하여 본배양하였다. 실온에서 6,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액에 미리 냉각시킨 에탄올을 3 L 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 4°C에서 overnight시킨 후 4°C, 8,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 10 mL의 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 현탁하고 이것을 crude GTase로 하고 -20°C에 냉동보관하였다. GTase는 필요시 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 적당량 희석하여 이 후 실험에 사용하였다.

### 생약재의 추출, 농축 및 용매분획

잘 건조된 각 생약재는 1 g씩 정확히 달아 20 mL 삼각플라스크에 옮기고 10 mL의 70% acetone으로 상온에서 1시간 초음파 추출을 행하였다. 추출액은 여과지 (Toyo No. 2)로 여과하여 모으고 잔사에 다시 10 mL의 70% acetone을 가하여 1시간 동안 반복 추출한 후 여과하였다. 모여진 추출액은 rotary evaporator로 40°C 이하에서 감압농축하고 진공건조시킨 후 1 mL의 70% acetone에 녹여 이것을 GTase 활성 저해시험에 사용하였다.

대량추출을 위하여 잘 건조된 후박피 1 kg을 1.6 L의 70% acetone으로 상온에서 3시간 초음파 추출하고 여과지 (Toyo No. 2)로 여과하여 그 추출액을 모았다. 잔사에 대하여 동일한 조작을 3회 반복하여 얻은 추출

액을 rotary evaporator로 40°C 이하에서 감압농축하고 진공하에서 건조시켜 조추출물 200 g을 얻었다. 여기에 500 mL의 증류수를 넣고 분산시킨 후 다시 500 mL의 ethylacetate를 가하여 추출하였다. 이 조작을 3회 반복하여 ethylacetate 추출액을 취하고 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>상에서 건조시켜 여과한 후 이 여액은 다시 rotary evaporator로 농축·건조하여 ethylacetate층 분획물로서 21 g을 얻었다. 남은 H<sub>2</sub>O phase에 다시 500 mL의 *n*-butanol을 가하여 추출하였다. 이 조작을 3회 반복하여 회수한 butanol 추출액은 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>상에서 건조하고 rotary evaporator로 농축·건조하여 butanol층 분획물로서 15.5 g을 얻었다. 나머지 H<sub>2</sub>O층은 농축·건조하여 H<sub>2</sub>O층 분획물로서 약 130 g을 얻었다.

### GTase의 역가 및 저해능 측정

GTase의 활성은 sucrose를 기질로 하여 생성된 불용성 glucan을 spectrophotometer로 측정하였다. 시험관 (13×100 mm)에 기질용액(0.0625 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 1 L중 sucrose 12.5 g, NaN<sub>3</sub> 0.25 g 함유) 0.8 mL, crude GTase 0.025 mL 및 시료 0.175 mL을 첨가하여 최종용량이 1 mL가 되도록 조정하였다. 대조군으로는 시료용액 대신 증류수 0.175 mL을 첨가하였다. 시험관을 수평에 대해 약 30° 각도가 되도록 세워 경사를 이루게 한 후, 37°C에서 16시간 반응을 시켰다. 반응후 상층액을 버리고 3 mL의 증류수를 가하여 5초간 초음파처리(Ultrasonic Generator US-300, Nissei Co., Japan)를 한 후 형성되어 있는 glucan을 분산시켰다. 분산 직후 spectrophotometer (UV/Vis Spectrophotometer UV-260, Shimadzu Co., Japan)로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 각시료의 GTase에 대한 저해율은 다음식에 따라 계산하였다.

$$\text{불용성 부착성 glucan 합성 저해율(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

여기서 A는 대조군에서 형성된 불용성 부착성 glucan의 OD<sub>550</sub>이고, B는 시료 첨가군에서 형성된 불용성 부착성 glucan의 OD<sub>550</sub>이다. 또한 GTase 저해물질의 활성 단위는 통상적인 반응 결과 대조군과 시료 첨가군의 흡광도 차이(OD<sub>550</sub>)가 0.01일 때를 1 unit로 정하였다.

### 구강미생물에 대한 항균활성 측정

구강미생물의 공시균주는 일본 로테 중앙연구소에서 분양받았다. 공시균주로는 충치 유발세균인 *Streptococcus cricetus* E49 (serotype a), *S. rattus* BHT (serotype b), *S. mutans* Inghritt (serotype c), *S. mutans* MT

8148R (serotype c), *S. sobrinus* B13 (serotype d), *S. mutans* LM7 (serotype e), *S. mutans* DMZ175 (serotype f), *S. sobrinus* 6715 (serotype g), *S. sanguis* ATCC 10556, *S. mitis* ATCC9811 등 10균주와 치욕염 유발 세균인 *Actinomyces viscosus* ATCC15987을 이용하였다. *Streptococci*는 MS (Mitis-Salivarius) agar배지(Difco) 상에서, *Actinomyces*는 BHI agar배지(Difco)상에서 각각 37°C, anaerobic chamber (FA-9, Hirayama Manufacturing Co., Japan)에서 1~3일간 혐기적으로 배양하였다. 이들 각 배양액은 다시 BHI broth에 접종하여 37°C에서 1일간 정치 배양하고 이들을 본 배양에 앞선 전배양액으로 사용하였다.

항균성 시험은 활성물질을 70% acetone에 적당한 농도로 녹인 후 membrane filter (0.45 µm)로 여과하여 멸균하고, autoclaving이 끝난 직후의 BHI agar배지에 일정량 첨가하여 잘 섞은 후 무균적으로 건조시켰다. 여기에 전배양액을 각각 1.5 ml씩 NI식 연속접종기 (Ikeda Rikka Co., Japan)의 소시험관에 옮기고 건조시킨 agar배지에 일정량씩 배양하였다. 후박피로부터 분리한 활성물질의 대비물질로서 녹차 catechin, cinnamic aldehyde, 합성 항균제인 chlorhexidine을 이용하여 항균활성을 비교 검토하였다.

#### GTase저해물질의 분리 및 정제

후박피 추출물을 용매분획하여 얻은 ethylacetate층 분획물(21 g)은 silicagel (Kieselgel 60, Merck Art. 9358) column (5×35 cm)에 loading한 후 chloroform : methanol(10:0→0:10)으로 elution하고 200 mL/fr. 씩 분취하였다. 각각의 fr.은 농축·건조한 후 1 mL의 70% acetone에 녹여 상법에 따라 GTase 저해 활성을 측정하고, 가장 활성이 높은 fraction은 다시 회수하고 농축·건조하여 조활성 획분으로 3.6 g을 얻었다. 이것을 다시 2차 silicagel column (3×50 cm)에 loading하고 chloroform : methanol (10:0→0:10)로 elution하여 50 mL/fr. 씩 분취하고 상기한 방법에 따라 GTase 저해활성을 측정하여 활성 획분으로 1.5 g을 얻었다.

Column chromatography에 의해 분리된 GTase 활성 저해물질의 조정제물을 소량 취해 N<sub>2</sub> gas하에서 건조시킨 후 소량의 methanol에 녹여 HPLC로 분석하였다. Solid phase로는 Nucleosil-ODS column (4.6×150 mm)을, mobile phase로는 methanol-H<sub>2</sub>O/1% acetic acid를 linear gradient에 의해 분석하였다. 이때 검출은 UV<sub>254</sub>에서 행하였다. 각 peak를 수차례에 걸쳐 반복 회수하고 건조시킨 후 상법에 따라 GTase 저해활성을 조사하여 활성의 분포 및 주요 활성물질 peak를 확인

하였다.

확인된 활성 peak를 분취하기 위하여 활성획분 1.5 g에 대하여 prep. HPLC로 활성물질을 분리·정제하였다. 이때 solid phase로서는 TSK-Gel ODS-80<sub>TM</sub> (7.8×300 mm)을, mobile phase로서는 65% methanol/1% acetic acid (isocratic)을 사용하여 UV<sub>254</sub>에서 검출하였다.

#### 기기분석에 의한 구조 해석

앞에서 정제된 저해물질의 분자량은 negative ion FAB-MS (VG Quattro Co., Great Britain)에 의해 측정하였고 내부 matrix로는 glycerol을 사용하였다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum은 300 MHz로, <sup>13</sup>C-(100 MHz), direct COSY 및 HMBC (Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity) NMR spectrum은 400 MHz에서 측정하였으며, 사용기종은 Bruker사(U.S.A) 제품이었다.

## 결과 및 고찰

#### 생약재 추출물들의 GTase 저해 활성

각종 식물성 생약재 32종의 70% acetone 추출물로부터 GTase 저해활성을 조사하였다. 그 결과 이들 생약 추출물은 전반적으로 total glucan 생성에는 큰 영향을 주지 않았으며, 총치의 직접적인 원인을 제공하는 불용성 부착성 glucan의 생성 저해효과는 후박피, 골쇄보 및 월하향 등에서 발견되었다. 특히 후박피 추출물의 경우 대조군에 비해 불용성 부착성 glucan의 생성을 74% 억제하여 가장 높은 저해활성을 나타냈다(Table 1).

#### 대량추출 및 용매에 의한 분획

후박피 추출물중의 활성물질의 특성을 조사하기 위하여 용매들로 분획하여 얻은 fraction들의 GTase 저해활성을 측정한 결과 저해 활성의 70% 이상이 ethylacetate층에 존재하는 것을 확인하였다(Table 2). 따라서 이후 GTase 활성 저해물질의 분리 및 정제는 ethylacetate층에서 얻어진 분획물을 대상으로 실시하였다.

#### Silicagel column chromatography 및 HPLC에 의한 분리·정제

Ethylacetate 추출물 21 g에 대하여 silicagel column chromatography를 수행하여 얻은 각 분획물(200 mL/fraction)에 대해 GTase 저해능을 측정한 결과 4~6번 분획에서 가장 높은 활성을 보였다(data not shown). 따라서 4~6번 분획을 회수하여 얻은 활성 분획물 3.6

**Table 1. The results of screening of GTase inhibitory activities from crude herbal drugs**

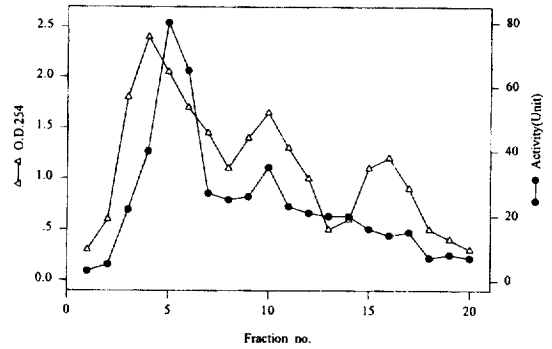
Herbal drugs		Inhibition ratio (%)
General name	Scientific name	
厚朴	<i>Magnolia officinalis</i>	73.9
骨碎補	<i>Drynaria hortunei</i>	55.7
月下香	<i>Oenathera odorata</i>	44.9
釣鈎藤	<i>Uncaria sinensis</i>	39.9
良姜	<i>Alpinia officinarum</i>	38.9
丁香	<i>Eugenia caryophyllata</i>	33.7
葛根	<i>Pueraria lobata</i>	19.2
覆盆子	<i>Rubus coreanus</i>	18.7
人蔘	<i>Panax ginseng</i>	13.7
知母	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	10.3
黃精	<i>Polygonatum sibiricum</i>	10.2
益母草	<i>Leonurus sibiricus</i>	8.4
五加皮	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	5.1
蒼耳	<i>Xanthium strumarium</i>	4.7
陳皮	<i>Citrus unshiu</i>	2.9
五味子	<i>Schizandra chinensis</i>	1.8
天南星	<i>Arisaema amurense</i>	1.2
山楂	<i>Crataegus pinnatifida</i>	0.9
茵陳	<i>Artemisia capillaris</i>	0.0
甘松	<i>Nardostachys chinensis</i>	0.0
牡丹皮	<i>Paeonia moutan</i>	0.0
細辛	<i>Asiasarum sieboldi</i>	0.0
淫羊藿	<i>Epimedium koreanum</i>	0.0
金銀花	<i>Lonicera japonica</i>	0.0
銀杏葉	<i>Ginkgo biloba</i>	0.0
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i>	0.0
蒼朮	<i>Atractylodes lancea</i>	0.0
沙蔘	<i>Adenophora triphylla</i>	0.0
車前子	<i>Plantago asiatica</i>	0.0
英莖葎	<i>Cirsium japonicum</i>	0.0
五倍子	<i>Rhus galls</i>	0.0
枳實	<i>Poncirus trifoliata</i>	0.0

**Table 2. Distribution of GTase inhibitory activities from *Magnoliae* bark extracts after solvent fractionation**

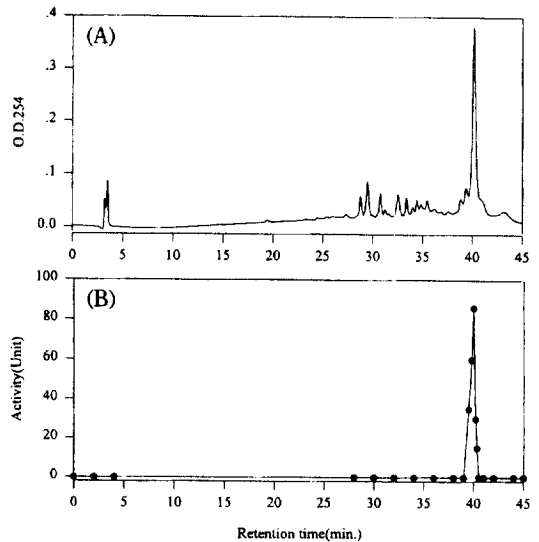
Solvent phase	Inhibition ratio (%)	Activity (Unit)
Water	12.0	11
<i>n</i> -Butanol	34.8	32
Ethylacetate	91.3	84

g은 다시 2차 silicagel column chromatography로 분획하고 각 분획물(50 mL/fraction)에 대해 GTase 저해능을 측정하고 결과 3~4번 분획에서 가장 높은 활성이 나타났다(Fig. 1). 이들 분획물을 회수하여 1.5 g의 조정제물을 얻었다.

후박피 추출물로부터 용매분획 및 2차에 걸친 silicagel column chromatography로 분리된 조정제물을 HPLC로 확인하였을 때 Fig. 2-A와 같은 chromatogram이 얻어졌다. 1분 간격으로 용출액을 분취하여



**Fig. 1. Fractionation of ethylacetate phase of *Magnoliae* bark extract by 2nd silicagel column chromatography.**



**Fig. 2. HPLC elution profile and activity distribution of GTase inhibitor for active fractions from 2nd silicagel column chromatography. (A) HPLC chromatogram, (B) Distribution of GTase inhibitory activities**

각각에 대해 GTase 저해활성을 확인한 결과 Rt 40 min 부근의 peak에 가장 높은 활성이 분포하였다(Fig. 2-B). 따라서 활성 peak는 prep. column을 사용하여 순수 정제를 실시한 결과 GTase 저해물질(ME-1) 128 mg을 얻었다.

ME-1의 전체 분리·정제과정은 Fig. 3에 정리하였으며, 이 과정을 통하여 얻은 각 분획물의 수율 및 GTase 저해 활성은 Table 3과 같다.

**충치 원인균에 대한 항균성**

후박피로부터 GTase 활성 저해물질로서 분리한 ME-1이 구강내 충치 원인균에 대해서 항균작용을 지

니고 있는가를 확인하기 위하여 *S. cricetus* E49 (serotype a) 등 *Streptococci* 10주 및 구강내 치육염을 일으키는 병원성 세균인 *Actinomyces viscosus* ATCC15987 등 공시균주를 이용하여 시험하였다. 비교 물질로는 녹차에서 분리한 tannin계 화합물인 catechin, 그리고

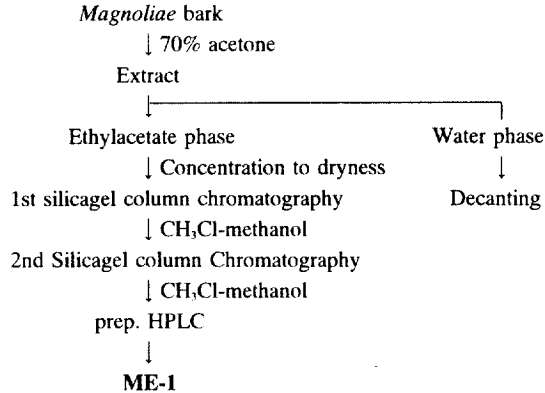


Fig. 3. Isolation procedure of ME-1 from *Magnoliae* bark.

Table 3. Yield and GTase inhibitory activity of each fraction obtained through the isolation procedure

Isolation step	Yield (% w/w)	Specific activity (Unit) <sup>1)</sup>
Raw materials	100	-
70% acetone	20	78
Ethylacetate phase	2.1	84
1st silicagel column chromatography	0.36	89
2nd silicagel column chromatography	0.15	92
HPLC	0.013	98

<sup>1)</sup>These values are the average of at least triplicated experiments.

phenol성 물질인 cinnamic aldehyde 및 강력한 합성 항균물질 chlorhexidine을 이용하였다. 그 결과 Table 4와 같이 후박피로부터 분리한 ME-1은 각 균주에 대하여 비교적 높은 항균활성을 나타냈으며, 최소저지농도 (MIC)는 각 균주에 대해 31.3 µg/ml로 동일하였다.

한편 녹차 catechin과 cinnamic aldehyde의 MIC가 각각 312.5 µg/ml, 62.5 µg/ml로 나타났으며 chlorhexidine의 경우에는 4.9 µg/ml로 매우 높았다. 따라서 ME-1은 천연물 유래의 화합물로서 충치 원인균에 대해 비교적 높은 항균활성을 나타내어 충치 유발효소인 GTase의 강력한 저해제일 뿐만 아니라 충치 원인균에 대한 항균제로서도 개발 가능한 것으로 입증되었다.

#### 정제된 활성물질의 구조해석

앞에서와 같이 순수분리된 백색 분말형태의 화합물 ME-1을 methanol중에서 UV scanning한 결과 230 및 282 nm에서 최대흡광치(λ<sub>max</sub>)를 나타내 이 화합물은 phenol계 물질로 추정되었으며, negative ion FAB-MS를 측정된 결과 분자량은 330 (관측치 *m/z*; 331.2 [M+H]<sup>-</sup>)인 것으로 확인되었다.

또한 ME-1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum상에서 δ 2.25 (2H, dd, *J*=9.0, 13.5 Hz) 및 2.68 (2H, dd, *J*=5.4, 13.5 Hz)가 나타나 2개의 aliphatic methylene기가 존재하는 것으로 추정되었다. 그리고 6.57~6.69의 signal로 이 화합물은 benzene ring을 지니고 있으며, δ 3.77 (6H, s)의 signal은 2개의 methoxy기를, 그리고 δ 0.80 (6H, d, *J*=6.6 Hz)은 2개의 methyl기가 존재한다는 것을 시사하였다. 이것은 <sup>13</sup>C-NMR spectral data에서 methoxy기를 나타내는 signal인 δ 56.2(t)가, 또한 methylene기를 나타내는 signal인 δ 39.61(t)이 나타남으로써 명백히 확인되

Table 4. Minimum inhibitory concentration(MIC) against oral microorganisms of ME-1 isolated from *Magnoliae* bark (unit: g/ml)

Strains (serotype)	ME-1	Control		
		Catechin (green tea)	Cinnamic aldehyde	Chlorhexidine
<i>Streptococcus cricetus</i> E49(a)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus rattus</i> BHT(b)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt(c)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus mutans</i> MT8148R(c)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus sobrinus</i> B13(d)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus mutans</i> LM7(e)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus mutans</i> OMZ175(f)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus sobrinus</i> 6715(g)	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC10556	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC9811	31.3	312.5	62.5	4.9
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC15987	31.3	312.5	62.5	4.9

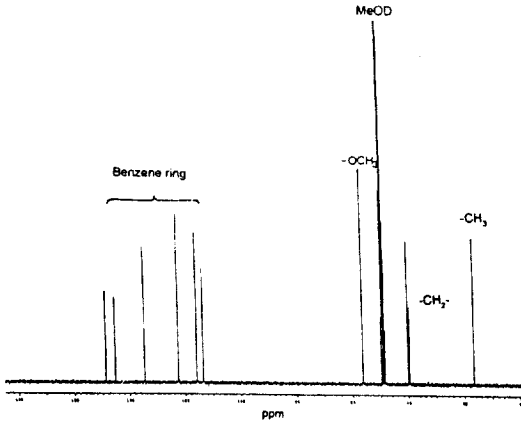


Fig. 4. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of ME-1. The spectrum was measured in CD<sub>3</sub>OD at 100 MHz.

었으며(Fig. 4), 이들은 proton-proton, proton-carbon direct COSY 분석에 의해서도 확인할 수 있었다.

한편, methylene 및 methyl기 등의 결합위치를 확인하기 위하여 HMBC를 측정된 결과 8, 9번 탄소와 2개의 methyl기가 강한 상관관계를 나타내었으며 3, 3'번 탄소와 methoxy기의 수소가 상관관계에 있어 이들이 서로 결합하고 있는 것으로 확인되었다. FAB-MS에 의해 얻어진 분자량이 330인 것을 감안하면 이 물질은 coniferyl alcohol이 산화된 형태의 화합물로서, 4, 4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- lignan으로 최종 동정하였다(Table 5 및 Fig. 5).

이 화합물은 *Larrea divaricata*<sup>(20)</sup>, *Sargentodoxa cuneata*<sup>(21)</sup> 등 식물에서 단리된 바 있으나 그 생리적 활성은 알려져 있지 않았다. 따라서 후박피로부터는 최초로 분리된 이 화합물은 그 신규성에 있어서 뿐만 아니라, 충치 유발효소인 GTase 저해활성과 같은 생리적 기능이 밝혀지게 된 데 그 의미가 크다고 할 수 있다.

Table 5. Assignment for <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectral data of ME-1

No.	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1,1'	134.67(s)	
2,2'	113.53(d)	6.63 (2H, d, J=1.8 Hz)
3,3'	148.72(s)	
4,4'	145.37(s)	
5,5'	115.84(d)	6.69 (2H, d, J=8.1 Hz)
6,6'	122.55(d)	6.57 (2H, d d, J=1.8, 8.1 Hz)
7	39.61(t)	2.68 (2H, d, J=5.4, 13.5 Hz)
8,9'	40.14(d)	1.72 (2H, m)
10	39.61(t)	2.25 (2H, dd, J=9.0, 13.5 Hz)
11,12	16.64(q)	0.80 (6H, d, J=6.6 Hz)
-OCH <sub>3</sub>	56.32(q)	3.77 (6H, s)

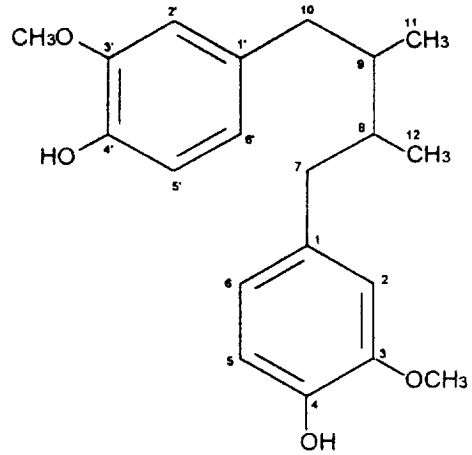


Fig. 5. Chemical structure of ME-1.

### 요 약

충치 원인균인 *S. mutans*가 생산하는 불용성, 부착성 glucan 합성효소인 GTase의 활성을 저해하는 물질을 생약재로부터 탐색, 개발하여 기능성 식품 또는 의약품의 소재로 응용하는 것을 목적으로 연구를 수행하였다. 32종의 생약재 추출물에 대하여 GTase 저해활성을 측정된 결과, 후박피에서 가장 높은 활성이 관찰되었다. 후박피 추출물에 대하여 용매분획을 행한 결과 ethylacetate층에 대부분의 활성이 존재하였으므로, 이 획분을 silicagel column chromatography, prep. HPLC 등을 이용하여 더욱 분리, 정제하여 순수한 GTase 저해물질을 분리하였다. 이 물질의 분리수율은 0.013% (w/w)였다. 이 화합물을 UV, FAB-MS 및 NMR spectrometry 등을 이용하여 화학구조의 해석을 실시한 결과 이 물질은 coniferyl alcohol의 중합체로 lignan계 화합물인 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-lignan (분자량 330)으로 확인되었다. 이 화합물은 후박피에서는 최초로 확인된 물질이다. 또한 충치 원인균인 *S. mutans*를 포함한 11종의 구강 미생물에 대한 항균성을 검토한 결과 비교 화합물에 비해 비교적 강력한 활성(MIC; 31.3 µg/ml)이 나타났다.

지금까지 후박피는 반하후박탕, 후박삼물탕 등 한방 약재의 중요한 원료로 이용되어 왔으며, 복통의 치료 효과 및 건위 작용 등이 알려져 있다. 또한 후박피 중에는 diphenyl계 화합물인 magnolol 및 honokiol 등이 함유되어 있어 이들 물질이 건위작용을 돕는 것으로 알려져 있을 뿐이다. 따라서 이번에 새롭게 확인된 4, 4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxylignan이 충치 예방효과를

지니고 있다는 사실은 금후 산업적 응용면에서도 매우 중요한 결과로 여겨져 지속적인 연구가 기대된다.

## 문 헌

1. Newbrun, E.: Cariology, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p.34 (1978)
2. Menaker, L.: The Biologic Basis of Dental Caries, Harper and Row, Hagerstown, Md., p.68 (1980)
3. Silverstone, L.M., Johnson, N.W., Haride J.M. and Williams R.A.D.: Dental Caries, The Macmillan Press, London, p.6 (1981)
4. Hamada, S. and Slade H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384 (1980)
5. Mosci, F., Perito, S., Bassa, S., Capuano, A.: The role of *Streptococcus mutans* in human caries. *Minerva Stomatol.*, **39**, 413-429 (1990)
6. Gibbons, R.J. and Van Houte, J. : On the formation of dental plaques. *J. Periodontol.*, **44**, 347-360 (1973)
7. McGhee, J.R., Michalek, S.M.: Immunology of dental caries: microbial aspects and local immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, **135**, 595-638 (1981)
8. Van Loveren, C., Lammens, A.J., Ten Cate, J.M.: In vitro induced fluoride resistance of *Streptococcus mutans* and dental caries in rats. *Caries Res.*, **23**, 358-364 (1989)
9. Oshima, T., Minami, T., Aono, W., Izumitani, A., Sobue, S., Fujiwara, T., Kawabata, S., and Hamada, S.: Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.*, **27**, 124-129 (1993)
10. Beckers, H.J.: Influence of xylitol on growth, establishment, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of rats. *Caries Res.*, **22**, 166-173 (1988)
11. Van Loveren, C.: The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition. *J. Dent. Res.*, **69**, 676-681 (1990)
12. Trahan, L.: Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int. Dent. J.*, **45**, 77-92 (1995)
13. Uezono, Y., Tsumori, H., Shimamura, A., Mukasa, H.: Purification and properties of extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus bovis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **11**, 115-120 (1996)
14. Smith, D.J. and Taubman, M.: Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. *Infect. Immunol.*, **61**, 2899-2905 (1993)
15. Spatafora, G., Rohrer, K. and Barnard, D.: A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic *in vivo*. *Infect. Immunol.*, **63**, 2556-2563 (1995)
16. Kwon, I.B.: Studies on glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Ph. D. Thesis*, Kangwon National Univ., Seoul, Korea (1990)
17. Ahn, B.J.: Structural studying of glucosyltransferase and tyrosinase inhibitors isolated from *Diospyros kaki* folium, *Artocarpus heterophyllus* folium. *Ph. D. Thesis*, Yeungnam Univ., Seoul, Korea (1991)
18. Endo, A., Hayashida, O. and Murakawa, S.: Mutastein, a new inhibitor of adhesive-insoluble glucan synthesis by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *J. Antibiot.*, **36**, 203-207 (1983)
19. Fukushima, K., Motoda, R., Takada, K., and Ikeda, T.: Resolution of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase into two components essential to water-insoluble glucan synthesis. *FEBS Lett.*, **128**, 213-216 (1981)
20. Anesini, C. and Perez, C.: Screening of plants used in Argentine folk medicine for anti-microbial activity. *J. Ethnopharmacol.*, **39**, 119-128 (1993)
21. Rucker, G., Mayer, R. and Shin-Kim, J.S.: Triterpene saponins from the Chinese drug 'Daxueteng'. *Planta Med.*, **57**(5), 468-470 (1991)

(1997년 11월 26일 접수)