

Aloe vera peel에서 항균활성 물질의 분리·정제(II)

박정순·신용서*·류일환*·이갑상*

원광보건대학 치위생과, *원광대학교 생명자원과학대학

Isolation and Purification of Antimicrobial Active Substances from *Aloe vera* peel(II)

Chung-Soon Park, Yong-Seo Shin*, Il-Whan Ryu* and Kap-Sang Lee*

Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College

*Department of Life Science & Natural Resource, Wonkwang University

Abstract

To evaluate anticaries and antiinflammation of *Aloe vera* peel, antimicrobial substances were extracted from *Aloe vera* peel and identified. The antimicrobial active substances of water extract were successfully purified with solvent fractionation, silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography and UV spectrophotometer. Two purified active substances were identified as aloe-emodin and barbaloin by Mass Spectrometer, ¹H-NMR and FT-IR.

Key words : *Aloe vera* peel, isolation, purification, antimicrobial.

서 론

치아 우식증은 전 세계적으로 널리 만연되고 있는 흔한 질환 중의 하나로 그 예방 및 치료제 개발에 많은 관심을 보이고 있다¹⁾. 치아우식증은 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로서 치태내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)가 주 원인균으로 치면에 부착, 증식 및 산 생성과정을 거쳐 치아 중 무기질이 탈회되고 상아질이 파괴되어 치아조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직질환이다^{2~6)}. 최근에는 *S. mutans*에 대한 항균활성을 갖는 물질의 개발과 그 효과에 관한 연구들이 최근 들어 국내외에서 상당수 진행되어 왔으며^{5,7~9)} 치아우식증 유발을 억제하는 데 있어서 부작용이 없이 지속적으로 작용할 수 있는 자연산물에 대한 관심이 높아지고 있다¹⁰⁾. 그러나 이러한 것들은 반점치, 내성균 출현, 구강점막 세포의 궤양이나 박리¹¹⁾ 등이 발생되고 있어 실용화된 예는 거의 없다.

*Aloe vera*는 아프리카가 원산지인 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생의 식물로 외국의 민간 약초로

써 오랫동안 이용되어 왔으며 그 첫 기록은 기원전 1552년 독일의 이집트 학자 Ebers가 고대 이집트의 무덤속 미이라 관에서 발견한 papyrus에서 찾아볼 수 있으며 그리이스 본초, 중국의 개보본초, 우리나라의 동의보감과 대한약전에도 사용 기록이 있다¹²⁾. 이러한 *Aloe vera*의 성분으로는 aloin, anthraquinone, aloe-emodin, aloe-ulcin, 고분자 다당체, 당단백질 및 아미노산과 미네랄 등이 밝혀져 있으며, 그 약리 효과로는 통증의 완화, 항allergy 작용, 항균 작용, 강장 작용, 항염증 작용, 항종양 작용, 혈당 강하 작용, 카드뮴 독성 완화효과 등이 있는 것으로 보고되고 있다^{13~16)}. 그러나 aloe 성분의 치아우식억제 효과와 결합조직 분해효소 억제에 대한 효과는 아직 보고된 바 없다. 또한, *Aloe vera*의 효능에 관한 연구들은 주로 껍질을 제거한 내부의 겔 성분을 중심으로 이루어져 왔을 뿐 껍질에 대한 약리효과는 거의 연구되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *Aloe vera* 가공 산업에서 산업 폐기물로 생성되는 *Aloe vera* 껍질에서 항균 활성이 있는 물질을 분리, 정제하였다.

* Corresponding author : Chung-Soon Park

재료 및 방법

1. *Aloe vera* peel의 전처리

Aloe vera peel(구입처 : 김정문 알로에)을 1~2cm 정도의 크기로 절단하여 70°C에서 8시간 열풍 건조한 후 상온에 보관하였다. 실험에 사용한 column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh ASTM, Merck Art 7743)을 사용하였으며, Preparative TLC로는 Kieselgel 60(Merck Art 5745)를 사용하였다. TLC spot 확인은 UV 365 nm 파장에서 5% ethonolic-KOH를 발색시약으로 사용하여 확인하였다.

2. 항균성분의 추출·분리 및 항균활성 측정

Aloe vera 껍질로부터 항균성 물질을 분리함에 있어서 최적 추출조건을 설정하기 위하여 *Aloe vera* 껍

질 1 kg을 15배 용량의 증류수, 메탄올로 각각 환류 추출하였고, 또한 증류수 또는 메탄올을 추출 용매로 하여 60°C에서 8시간 추출하여 감압 농축한 증류수 extract(fr.1)를 적정량의 물에 용해시키고 ethyl acetate, ether, chloroform, butanol, isopropanol 등의 용매를 순차적으로 사용하여 Fig. 1과 같이 분획한 각 추출물(fr. 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6)을 감압 농축한 후 paper disk method에 의해 항균활성을 측정하였다¹⁷⁾. 항균활성은 전보¹⁸⁾의 결과로 확인하였고 그 중 활성이 가장 우수한 ethyl acetate(fr. 1-1) 분획물을 확인하기 위해 *Aloe vera* 껍질 추출물을 silica gel column chromatography를 이용하여 유효 성분을 Fig. 2와 같이 분획하였다.

3. 추출·분리한 물질의 구조 분석 및 동정

정제된 물질 fr. A와 fr. b에 대한 UV spectrum은

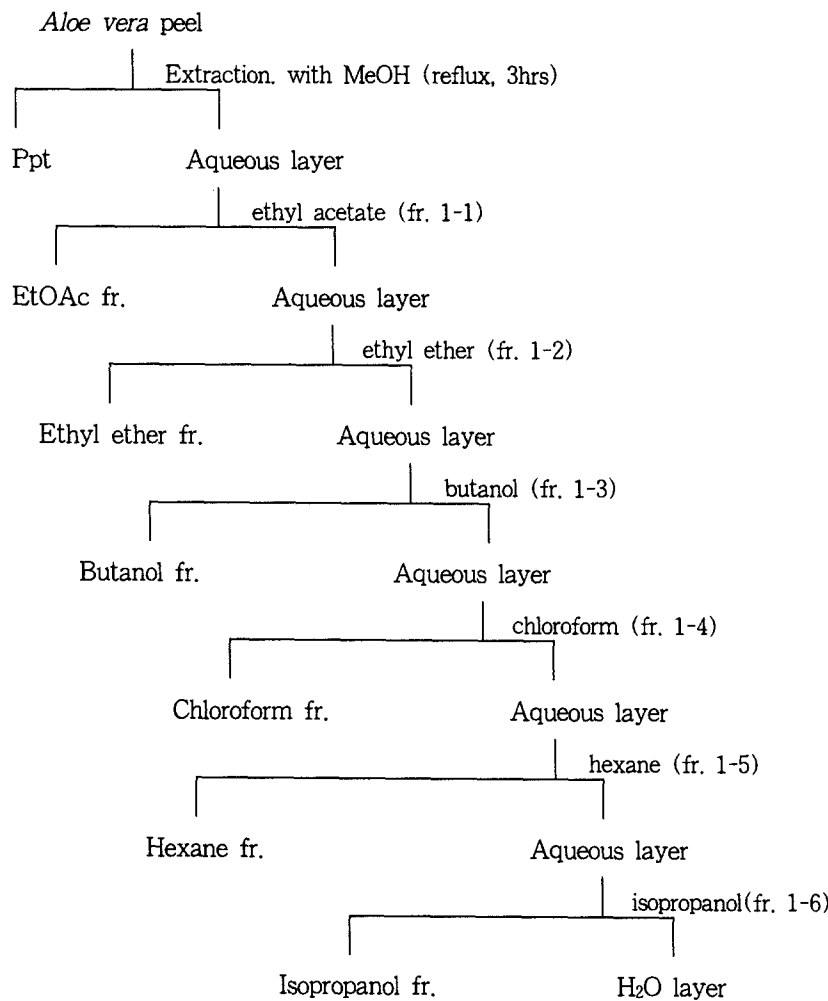


Fig. 1. Procedure for isolation of antimicrobial and antiinflammatory substances from *Aloe vera* peel.

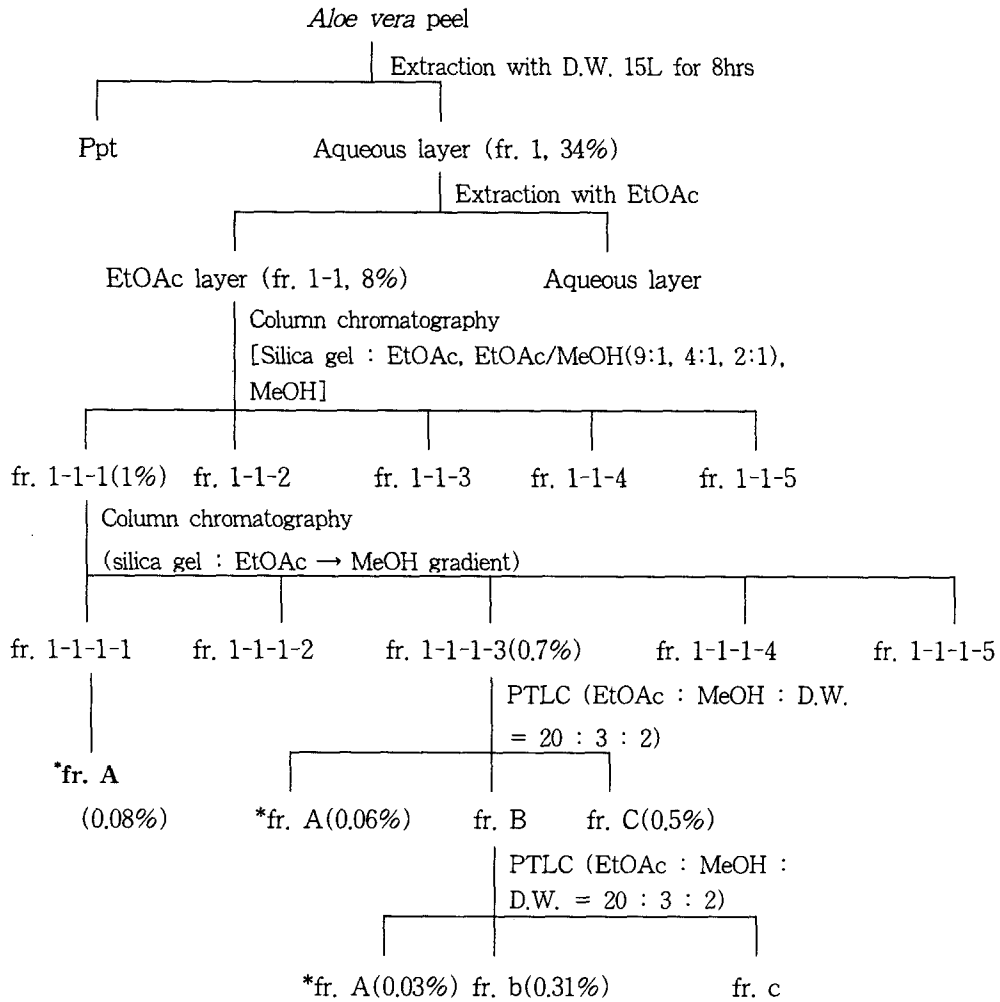


Fig. 2. Procedure for isolation of antimicrobial and antiinflammatory substances from *Aloe vera* peel.
 Extraction yield : fr. A; 0.17%. fr. b; 0.31%

UV/VIS 분광광도계(Secomam S1000, USA)를 이용하여 190~550nm 파장 범위에서 MeOH를 용매를 사용하여 측정하였다. 질량분석은 Mass Spectrometer (JEOL JMS-DX 303, USA)로 분석하였으며 분석조건은 EI mode, 70eV, 200°C의 이온화 온도에서 수행하였다. ¹H-NMR분석은 Bruker AM 300 MHz Spectrometer(USA)를 사용하여 측정하였다. IR Spectrum은 Digilab Division FTS-165 FT-IR spectrometer를 이용하여 aloe-emodin과 barbaloin (Sigma Chemical Co., USA)을 측정하여 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 항염증 성분의 분리

치아우식증과 치주염 치료제 개발의 가능성을 연구

하고자 *Aloe vera* 가공산업에서 산업 폐기물로 생성되는 *Aloe vera* peel 중 항균 및 항염증 활성이 있는 물질을 분획하여 분리·정제한 결과 Fig. 2의 과정에서 thin layer chromatography에 의해 적색형광을 나타내는 fr. A와 녹색형광의 형광을 나타내는 fr. 1-1-1-3을 분리하였다. 그 후 fr. 1-1-1-3을 preparative thin layer chromatography를 행하여 적색 형광을 나타내는 fr. A와 녹색형광의 형광을 나타내는 fr. C로 분리하고, fr. C를 다시 preparative thin layer chromatography에 의해 적색형광을 나타내는 fr. a와 녹색형광을 나타내는 fr. b로 분리하였으며 TLC의 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, fr. A의 TLC chromatogram는 Rf 0.92의 적색 형광을 띠었고 fr. b의 TLC chromatogram는 Rf 0.7~0.5 부근의 녹색 형광을 나타내었으며, 이때 추출 수율은 fr. A가 0.17%, fr. b가 0.31% 이었다.

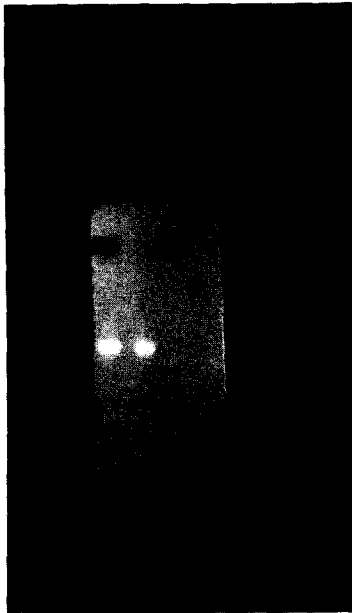


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of fr. A(●: red fluorescence) and fr. b(○: green fluorescence) fractionated from extractes of *Aloe vera* peel.

2. UV spectrum 측정

정제된 물질 fr. A와 fr. b에 대한 UV spectrum을 측정된 결과는 Fig. 4 및 5와 같다. 즉, 분획 A의 UV spectrum은 222.7, 255.4, 286.4, 432.2nm에서 강한 흡수대를 나타내어 표준물질의 aloe-emodin 결과와 유사한 pattern을 나타내었고, 분획 b의 UV spectrum은 217, 252.6, 269.6, 295, 358.1nm에서 강한 흡수대를 나타내어 표준물질 barbaloin UV spectrum 값인 269, 295, 354nm와 유사하게 나타났다. 이상의 결과로 보아 항균 활성이 있는 분획 A의 적색물질은 aloe-emo-

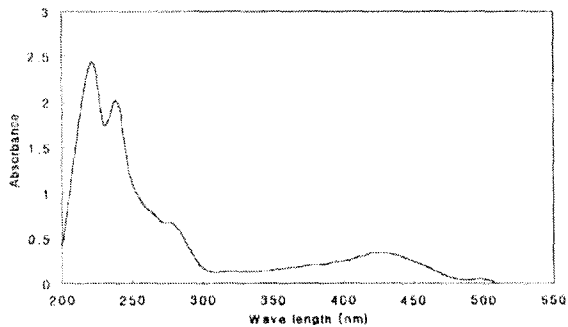


Fig. 4. UV spectrum of fraction A separated from *Aloe vera* peel.

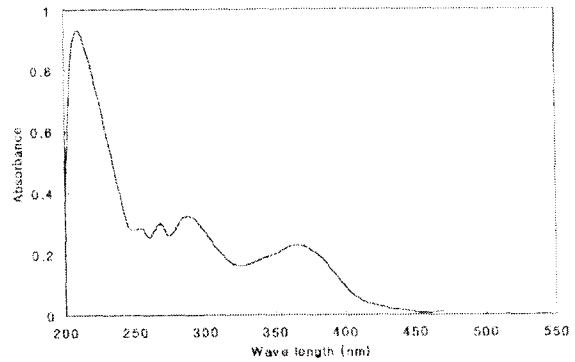


Fig. 5. UV spectrum of fraction b separated from *Aloe vera* peel.

din으로 추정되며, 분획 b의 녹색 물질은 barbaloin으로 추정되었으며 염증 활성이 있는 fr. A와 fr. a는 TLC 및 UV spectrum상에서 동일 물질로 판명되었다.

3. FT-IR에 의한 분석

정제된 물질 fr. A와 fr. b의 FT-IR spectrum을 표준물질과 비교 분석한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 즉, FT-IR spectrum 결과 fr. A는 3300cm⁻¹에서 OH group, 1600cm⁻¹ 대의 aromatic C=C가 확인되었으며, 1028, 1084cm⁻¹에서 C-O group이 확인되었고, 지문영역에서 흡수양상 또한 표준물질과 일치하여

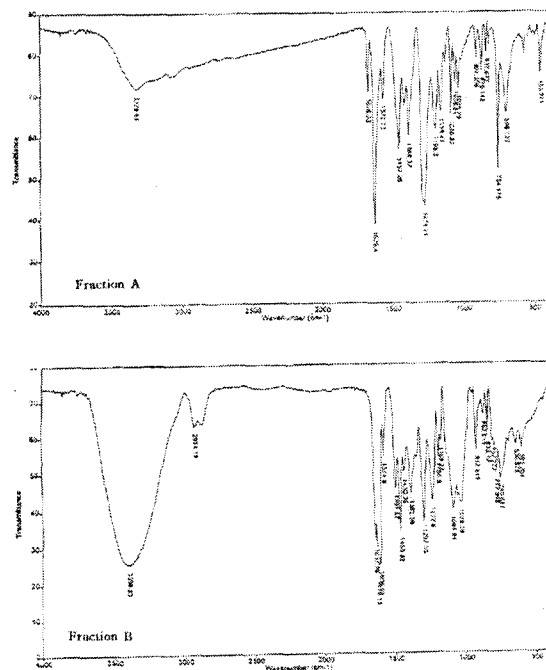


Fig. 6. FT-IR spectra of fraction A and B separated from *Aloe vera* peel.

aloe-emodin으로 평가하였다. 또한 fr. b는 3300cm^{-1} 에서 OH group, 1675cm^{-1} 에서 C=O와 1600cm^{-1} 대의 aromatic C=C가 확인되었으며 1036, 1059, 1084 cm^{-1} 에서 C-O group이 확인되어 표준물질과 매우 흡사한 spectrum양상을 보여 barbaloin으로 평가하였다.

4. $^1\text{H-NMR}$ 에 의한 분석

정제된 물질 fr. A와 fr. b의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 표준물질의 spectrum과 비교 분석한 결과는 Fig. 7과 같다. 즉, fr. A는 7~8ppm 사이에 나타나고 있는 aromatic protons들의 피크 패턴과 또 12ppm 근처에 나타나고 있는 피크로부터 anthracene 모핵의 1, 8번이 -OH기로 치환되고, 3번에 치환된 -CH₂-의 proton은 4.62ppm에서 확인할 수 있었으며, 7.80ppm의 triplet은 6번 proton으로, 2개의 doublet 중 더 저자장에서 나타나고 있는 7.70ppm 피크는 이웃 ring의 carbonyl group과의 conjugation을 받고 있는 5번 proton으로 확인되었다. 11.94ppm의 broad singlet은 1,8 번의 hydroxy기의 proton으로 확인하였으며, 양상 또한 표준물질과 일치하여 aloe-emodin으로 동정하였다. 또한 fr. b는 3.53ppm에서 나타나는 doublet을 11번 -CH₂의 proton으로, 4.56ppm에서 나타나는 singlet은

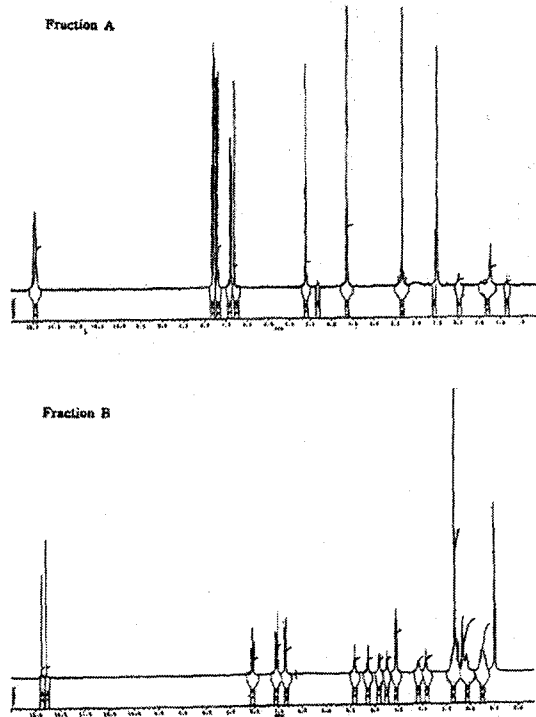


Fig. 7. $^1\text{H-NMR}$ spectra of fraction A and B separated from *Aloe vera* peel.

10번 proton으로 확인되었다. 6~8사이에 aromatic ring proton들이 나타나고 11.8ppm 근처의 피크들은 C-glucosylated aloe-emodin anthracene nucleus에서 나타나는 유사한 proton series 때문인 것으로 보인다. 이것은 10번 탄소가 β -glucose와 conjugation으로 결합되어 있는 것으로 보여지며, 표준물질과의 비교에서도 일치하는 양상을 보여 barbaloin으로 동정하였다.

5. Mass spectrum에 의한 분석

정제된 물질 fr. A와 fr. b의 mass spectrum을 표준물질과 비교 분석한 결과는 Fig. 8과 같으며 그 구조식은 Fig. 9 및 10에서 보는 바와 같다.

즉, fr. A는 분자이온 피크로부터 분자량이 270임을 확인하였고 benzylic alcohol에서 CO가 떨어져 나가고 생긴 $[\text{M}-29]^+$ 피크를 $m/z=241$ 에서 확인하였다. fr. b

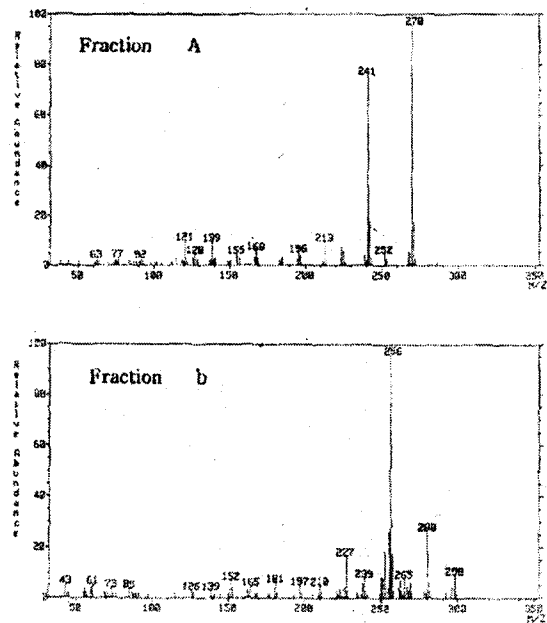


Fig. 8. Mass spectra of fraction A and B separated from *Aloe vera* peel.

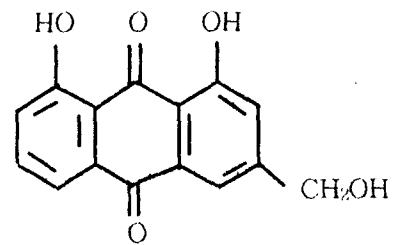


Fig. 9. Structure of Aloe-emodin.

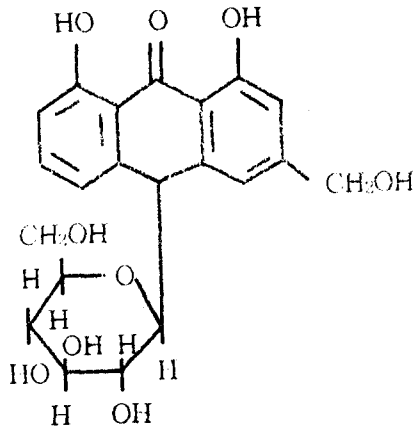


Fig. 10. Structure of barbaloin.

는 분자량이 418임을 확인하였으며 anthrone류에서 강하게 나타나는 $[C_{15}H_{12}O_4]^+$ 의 피크가 $m/z=256$ 에서 base peak로 나타났다. 이상의 분석결과를 기초로 정제된 물질 fr. A는 aloe-emodin으로, fr. b는 barbaloin으로 확인하였으며 향후 Aloe vera 껍질에서 추출된 aloe-emodin과 barbaloin을 이용한 항우식 및 항염증 활성에 관한 연구를 하고자 한다.

요 약

Aloe vera 껍질에서 항우식 및 항염증제재를 개발하기 위해 항우식 및 항염증 활성이 있는 물질을 분리, 정제하였고, 활성이 우수한 ethylacetate층을 silica gel column chromatography 및 preparative thin layer chromatography를 통해 두 가지 활성물질을 정제하였다. 정제된 두 가지 물질은 UV spectrum과 FT-IR, 1H -NMR 및 Mass spectrum 분석을 통해 aloe-emodin과 barbaloin으로 동정하였다.

참고문헌

1. Smith, D. J., Taubman, M. A. and Ebersole, J. L.: Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization hamsters by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 37, 656~661 (1982).
2. Hamada, S., Koga, T. and Ooshima, T.: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.*, 63, 407~411 (1984).

3. 김종배, 최유진 : 공중구강보건학(개정판), 고문사, P. 43~68 (1998).
4. 김선숙 : 탄닌 및 비타민 B₆가 *Streptococcus mutans* 10449의 성장 및 시험관 부착에 미치는 영향, 원광대학교 석사학위논문 (1991).
5. 유영선, 박기문, 김영배 : 생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식억제효과, *한국산업미생물학회지*, 21, 187~191 (1993).
6. Inoue, M. and Koga, T.: Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*, *Infect. Immunity*, 25, 922~929 (1979).
7. Wu-Yuan, C. D. : Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans streptococci, *J. Dent. Res.*, 67, 51~55 (1988).
8. Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T. and Hamada, S.: Inhibitory effect of Oolong tea polyphenols on glucosyltransferase of mutans streptococci, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 968~973 (1993).
9. 배기환 : 생약으로부터 충치예방 및 치료제 개발, 제3회 산학연학술 심포지엄, 27~35 (1993).
10. Marsh, P. D: Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries, *Caries Res.* 27(suppl 1), 72~76(1993).
11. Goldschmidt, P., Cogen, R. and Taubman, S.: Cytopathic effects of chlorhexidine on human cells, *J. Periodontol.* 48, 212~215 (1977).
12. 신용서, 이갑상, 이정성, 이철호 : Aloe vera가 첨가된 요구르트의 제조와 그 품질 특성, *한국영양식량학회지*, 24, 254~260 (1995).
13. 김성철 : Aloe 첨가식이 환위의 체내 수는 축적에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 석사학위논문 (1999).
14. 이정성 : 장내 유해세균에 대한 Aloe vera 추출물의 항균활성, 고려대학교 석사학위논문 (1995).
15. 김혜선 : Alloxan 당뇨 흰쥐의 혈당량 및 insulin량에 미치는 Aloe vera Linne의 효과에 관한 연구, 이화여자대학교 석사학위논문 (1982).
16. 김운성 : 알로에 첨가식이 환위의 카드뮴 독성에 미치는 영향, 고려대학교 석사학위논문 (1994).
17. Conner, D. E. and Beuchat, L. R.: Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts, *J. Food Sci.*, 49, 429~434 (1984).
18. 박정순, 신용서, 류일환, 이갑상 : Aloe vera peel 추출물에 대한 *Streptococcus mutans* JC-2의 항균활성(I), *한국식품영양학회지* 13(2), 139~145 (2000).