

고삼으로부터 항우식활성 물질의 분리

이현옥* · 한동민¹ · 백승화²

원광보건대학 치위생과, ¹원광대학교 자연과학 기술학부, ²원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Isolation and Identification of Anticariotic Compound from *Sophora flavescens* Ait. Lee, Hyun-Ok*, Dong-Min Han¹, and Seung-Hwa Baek². Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan, Chonbuk 570-750, Korea, ¹Division of Natural Science & Technology, Wonkwang University, ²Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea – The purpose of this study is to investigate anticariotic activity of the ethyl acetate soluble extract of *Sophora flavescens* Ait. for the prevention of dental caries and glucosyltransferase activity caused by *Streptococcus mutans*. The fraction 5-4-3 showed strong growth inhibition activity against *Streptococcus mutans* (MIC, 3.13 µg/ml). The glucosyltransferase activity of the active fraction 5-4-3 inhibited the formation of glucan and showed 77% of the antiproliferative effect at 100 µg/ml (P<0.05). Two flavanones, (2S)-2'-methoxy kurarinone (1) and (+)-kurarinone (2), were isolated from the active fraction 5-4-3 of the ethyl acetate soluble extract of *S. flavescens* Ait. Their structures were elucidated using spectroscopic methods.

Key words: *Streptococcus mutans*, glucosyltransferase, *Sophora flavescens* Ait., (2S)-2'-methoxykurarinone, (+)-kurarinone

치아우식증은 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 발생하는 질환으로서 치태내 세균 중 특히 *Streptococcus mutans*가 주요 원인이 되어, 치아 중 무기질이 탈회되고 상아질이 파괴되어 치아조직의 결손을 초래하는 세균성 치아 경조직 질환이다[2,5]. 또한 *S. mutans*는 세포의 다당류를 생성하는 효소인 glucosyltransferase(GTase)를 가지고 있어 자당으로부터 수용성 또는 불용성 glucan을 형성한다. 이중 비수용성 glucan이 치아 표면에 부착하여 초기평활면 우식을 야기한다[4,19]. 이렇게 치아우식증은 세균에 의한 질환이므로 *S. mutans*의 성장 억제나 GTase 활성 저해제를 탐색하는 것이 치아우식증을 예방하는 수단으로 인정되고 있으며, 그 방법의 일환으로 천연물로부터 항우식 물질을 개발하고자 하는 노력이 시도되고 있다[3,10,17,18,20,22]. 그 예로 Namba 등[12]은 중국 한약재 추출물로부터 분리한 flavanone, flavanol성 물질이 GTase 저해효과가 우수하다고 보고하였으며, 권[6]은 cacao bean 및 감잎 등으로부터 GTase 저해활성을 지니는 수종의 tannin 화합물을 분리한 바 있다. 이 외에도 *S. mutans*의 성장을 억제하는 물질로 보고된 천연물은 죽염[15], flavonoid[1], funoran[13,14], 참썩정유[8] 단삼[11] 등이 있으며, 이들 천연물로부터 항균성물질

을 분리하여 치아우식증예방 및 치료제로 개발을 위한 연구를 해오고 있으나, 인체에 대한 독성이나 경제성 등의 문제점이 있어 실용화된 예는 적다.

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 콩과에 속한 다년생 본초로 성질은 차고 무독하여 강한 쓴맛을 지니고 있으며[16], 한방에서 민간 약재로 이용되어 왔다. 현재까지 알려진 고삼의 성분으로는 alkaloid, flavonoid, saponins[21] 등이 알려져 있다.

본 연구는 고삼 추출물로 항우식효과를 파악하기 위하여 *S. mutans*에 대한 항세균효과와 GTase 활성억제를 파악한 후 항우식활성을 나타내는 물질을 분리하고 구조를 동정하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 고삼(*S. flavescens* Ait.)은 원광대학교 한의과대학 한방병원에서 구입하여, 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다.

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 원광대학교 치과대학 구강미생물실험실에 보관 중인 *S. mutans* JC-2를 분양 받아 사용하였으며, 배지는 BHI(brain heart infusion, Difco, USA)를 이용하였다.

*Corresponding author
Tel. 063-840-1265, Fax. 063-840-1269
E-mail: holee@wkhc.ac.kr

항우식물질의 분획

고삼의 에틸 아세테이트추출물 3.0 g을 10 ml 둥근 플라스크에 넣고, 에틸 아세테이트(3 ml)을 넣어 녹인 후, 실리카 겔(6.0 g)을 넣어 용매를 감압증류시켜 제거시킨다. 이때 실리카 겔이 coating된 고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 실리카 겔(30.0 g)이 충전된 컬럼 크로마토그래피에 넣어 전개용매로 용리시켜 분획을 얻었다. 이동상의 조건이 60~90% ethyl acetate/hexane, 100% ethyl acetate, MeOH로 용리된 분획을 역상 크로마토그래피법으로 분리하여 6종류의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중에 이동상(H₂O:CH₃CN/1:3)의 조건으로 용리된 소분획을 실리카관 크로마토그래피법으로 4종류의 소분획을 얻었다. 이들 소분획은 MeOH:CHCl₃, MeOH의 이동상으로 구성되었으며, 이동상의 조건이 1:10, 3:10, MeOH:CHCl₃으로 용리된 양(275 mg)을 실리카관 크로마토그래피법으로 7종류의 소분획을 분리하였다. 이동상의 조건이 1:5, 1:3, CH₃COCH₃:CH₂Cl₂로 용리된 양(137 mg)을 recycling Prep-HPLC로 순수물질, (2S)-2'-methoxy kurarinone (1)과 (+)-kurarinone (2)을 표준물질과 비교하여 확인(TLC, NMR, IR, UV)하였다[7,9].

시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였고, 사용직전에 10% DMSO에 희석하여 실험에 사용하였다.

*S. mutans*에 대한 항세균효과

*S. mutans*에 대한 항세균효과를 파악하기 위하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 액체배지 희석법을 이용하였으며, 96-microwell plate (Nunc, Denmark)에 각 추출물의 농도를 최고 200 µg/ml에서 최저농도 3.13 µg/ml까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. *S. mutans*는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고 다시 37°C배양기에서 18시간 동안 배양하여 균주의 활력을 높인 후 접종하였다. *S. mutans*가 접종된 배지에 고삼 추출물 농도별로 첨가하여 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 ELISA(Spectra Max 250, Molecula Devecos)에 의한 흡광도(optical density, OD) 600 nm에서 배지의 탁도를 확인하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 MIC로 결정하였으며, MIC의 수치가 낮은 것을 항세균효과가 높은 것으로 판정하였다.

Glucosyltransferase 활성 저해효과

GTase의 활성은 이 등[10]의 방법을 사용하여 측정하였다. *S. mutans*를 37°C에서 24시간 동안 정치 배양한 것을 배양액으로 하여 동일한 조건으로 BHI 배지 4.5 L에 2% 접종하여 배양하였다. 실온에서 6,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소로 사용하였으며, 조효소에 의해 sucrose로부터 생성된 불용성 glucan을 spectrophotometer로

측정하였다. 즉, 시험관에 0.065 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 1 L에 sucrose 12.5 g, sodium azide 0.25 g을 함유한 기질용액 0.8 ml에 GTase 0.025 ml 및 고삼의 에틸 아세테이트 소분획 5-4-3(대조군은 증류수)을 0.175 ml 첨가하여 최종용량이 1 ml이 되도록 조정하였다. 시험관을 수평에 대해 약 30° 각도로 세워 경사를 이루게 한 후, 37°C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 상등액을 버리고 3 ml의 증류수를 가하여 5초간 초음파처리(Ultrasonic Generator US-300, Nissei, Japan)를 한 후 형성되어 있는 glucan을 분산시켰다. 분산 직후 spectrophotometer(HITACHI, U 1100, Tokyo, Japan) 600 nm에서 흡광도로 평가하였다.

고삼 에틸 아세테이트 추출물 분획의 항세균활성에 미치는 pH 및 온도의 영향측정

pH에 대한 안정성은 BHI 액체배지에 pH를 각각 5.0-9.0까지 조정된 후, 항세균효과가 나타난 고삼 에틸 아세테이트추출물의 소분획 5-4-3을 첨가하고 *S. mutans*를 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 ELISA(Spectra Max 250, Molecula Devecos) 630 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다. 열에 대한 안정성은 고삼 에틸 아세테이트추출물의 소분획 5-4-3을 120°C에서 15분간 열 처리하여 각 농도의 시료를 첨가하고, *S. mutans*를 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, ELISA(Spectra Max 250, Molecula Devecos) 630 nm에서 흡광도로 평가하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 시료의 농도별 차이를 규명하기 위하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였고, 유의한 차이가 있을 때 Duncan 다중범위 검정으로 사후검정을 하였으며, 유의수준은 0.05로 하였다. 모든 통계분석은 SPSS Win을 사용하였다.

결과 및 고찰

고삼 에틸 아세테이트 추출물의 *S. mutans*에 대한 항세균효과

고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 silica gel이 충전된 컬럼(1.5 cm×25 cm)으로, ethyl acetate : hexane(gradient)을 용매로 1차 분획 하여 5종류의 분획을 얻었다. 각각의 분획은 short and long wavelength에서 TLC(spots)의 수로 나누었다. 고삼 에틸 아세테이트추출물의 1차 분획 5종류로 *S. mutans*에 대하여 최소억제농도를 측정하였다. 분획 3에 대하여 12.5 µg/ml에서 항세균효과가 나타났고, 분획 4는 50 µg/ml에서, 분획 5는 25 µg/ml에서 항세균효과가 나타났으나, 분획 1과 2에서는 항세균효과가 200 µg/ml 이상이였다. 따라서, *S. mutans*에 대한 항세균효과는 분획 3에서 가장 효과가 높은 것으로 나타났다.

고삼의 에틸 아세테이트 추출물 분획 3이 5보다 항세균력은 다소 높게 나타났으나, 분획 5가 가장 수율이 높게 나타나, 분획 5를 C18 실리카관 reverse flash chromatography

방법으로 분리하여 6가지의 소분획을 얻었다. 고삼 에틸 아세테이트 추출물의 2차 소분획의 *S. mutans*에 대한 최소억제농도를 측정하였다. 소분획 5-4는 12.5 µg/ml에서 소분획

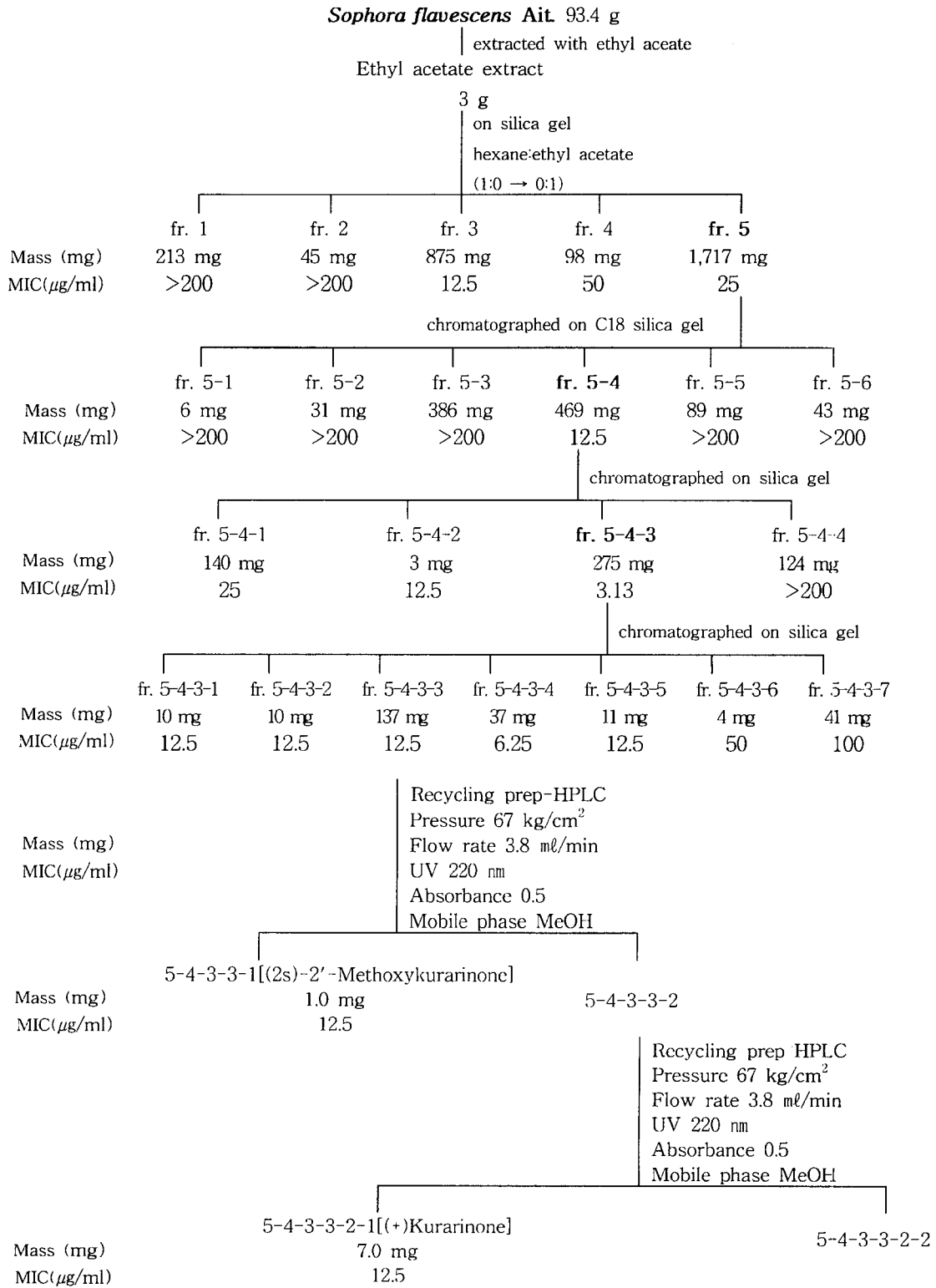


Fig. 1. Isolation of flavanones from *S. flavescens* Ait. by antibacterial effects.

인 5-1, 5-2, 5-3, 5-5와 5-6에서는 항세균효과가 200 µg/ml 이상으로 관찰되었다.

2차 분획에서 *S. mutans*에 대하여 항세균효과가 높게 나타난 소분획 5-4를 사용하여, 실리카관 flash chromatography 방법으로 분리하여 4종류의 3차 소분획을 얻었으며, *S. mutans*에 대한 최소억제농도를 측정하였다. 소분획 5-4-1의 *S. mutans*에 대한 항세균효과는 25 µg/ml로 나타났으며, 소분획 5-4-2는 12.5 µg/ml, 소분획 5-4-3은 3.13 µg/ml로 나타나, 가장 높은 항세균효과를 관찰 할 수 있었다. 그러나 소분획 5-4-4는 항세균효과가 200 µg/ml 이상으로 관찰되었다. Namba 등[12]은 생약제 60 종류의 추출물을 이용하여 치아우식 원인 균의 생육억제 실험 결과, *Magnolia cortices*의 성분인 magnolol과 hinokiol에서 MIC가 6.25 µg/ml로 나타났으며, 목 등[11]은 *S. mutans*에 대한 단삼 추출물의 MIC가 12.5 µg/ml이었다고 보고한 바 있다[19]. 이와 비교할 때 고삼 추출물의 항세균력이 더 우수한 것으로 나타났다.

3차 분획에서 *S. mutans*에 대하여 항세균효과가 가장 높게 나타난 소분획 5-4-3을 사용하여 실리카관 flash chromatography 방법으로 분리하여 7종류의 4차 소분획을 얻었으며, *S. mutans*에 대한 최소억제농도를 측정하였다. 소분획 5-4-3-1~5-4-3-3은 12.5 µg/ml, 소분획 5-4-3-7은 100 µg/ml로 나타났다. 4차 소분획은 소분획 5-4-3-4에서 항세균효과가 6.25 µg/ml로 가장 높은 항세균효과가 나타났고 3차 소분획 5-4-3의 3.13 µg/ml 보다는 낮게 나타났지만, 4차 소분획은 7종류 모두에서 항세균효과가 나타났다.

이와 같이 에틸 아세테이트 추출물에 대하여 항세균활성 확인된 4차 소분획 중 수율이 높은 소분획 5-4-3-3을 cyclic prep-HPLC로 분리한 후 TLC, IR, ¹H-NMR, DEPT, IMBC, HMBC, COSY의 분광화학적 자료와 기준물질과 비교[7,9]하여 (2S)-2'-methoxy kurarinone(1)과 (+)-kurarinone(2)을 동정하였다. (2S)-2'-methoxy kurarinone(1)과 (+)-kurarinone(2)은 flavanone 화합물로서 *S. mutans*에 대한 항세균효과는 MIC가 12.5 µg/ml로 같은 효과가 나타났다(Fig. 1). 동정된 화합물인 (2S)-2'-methoxy kurarinone과 (+)-kurarinone의 MIC가 12.5 µg/ml로 3차 소분획 5-4-3의 MIC인 3.13 µg/ml 보다 낮게 나타난 것은 3차 소분획 5-4-3에는 여러 가지 화합물질이 포함되어 있어 항세균효과가 높게 나타난 것으로 추정된다.

고삼 에틸 아세테이트 추출물 분획의 glucosyltransferase (GTase) 활성 저해효과

GTase 활성을 저해하는 것이 치아우식증을 예방하는 방법이 될 수 있으므로, *S. mutans*에서 항세균효과가 가장 우수하게 나타난 고삼의 에틸 아세테이트 추출물의 소분획 5-4-3을 GTase에 적용하여 활성 저해도를 측정하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. 소분획 5-4-3의 농도가 증가될수록

GTase 활성이 저해되어 불용성 glucan의 합성량이 감소되는 것으로 나타났다. 즉, 고삼 에틸 아세테이트 소분획 5-4-3의 첨가량이 0.0, 20, 40, 60, 80과 100 µg/ml일 때, 불용성 glucan의 저해율은 농도에 따라 각각 0.0, 18, 48, 62, 73과 77%로 통계학적으로 유의하게 증가하였다(p<0.05). 이 등[6]은 후박피 추출물이 대조군에 비해 불용성 부착성 glucan의 생성을 74% 억제하였다고 보고하였는데, GTase에 대한 활성 저해효과는 후박피보다 고삼 추출물의 효과가 더 우수한 것으로 나타났다.

고삼 에틸 아세테이트 추출물 분획의 항세균활성에 미치는 pH 및 온도의 영향

고삼의 에틸 아세테이트 추출 분획은 천연물로서 pH 및 열에 안정해야 치아우식증예방제로 산업적 적용 가능성이 높아질 것이다. 따라서, *S. mutans*에 대하여 항세균력이 3.13 µg/ml로 나타난 고삼의 에틸 아세테이트 추출물 소분획 5-4-3에 대한 pH 안정성을 측정하기 위하여, BHI 액체배지의 pH를 5.0~9.0까지 조정한 후, 소분획 5-4-3을 첨가하고 항세균력을 측정한 결과는 Table 2와 같다. *S. mutans*에 대하여 항세균력이 나타난 농도는 각 실험시 3.13 µg/ml로서 고삼 에틸 아세테이트소분획은 pH의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 온도에 대한 안정성을 측정하기 위하여 고삼의 에틸 아세테이트 추출물의 소분획 5-4-3을 120°C에서 15분간 열처리를 한 후, *S. mutans*에 대하여 항세균력을 측

Table 1. Inhibitory effects of the ethyl acetate soluble subfraction 5-4-3 of *S. flavescens* Ait. on glucosyltransferase secreted by *Streptococcus mutans*.

Concentration (µg/ml)	GTase activity (O.D. 600 nm)	Inhibition rate (%)
Control	0.532 ± 0.011	0
20	0.426 ± 0.064	18
40	0.263 ± 0.050	48
60	0.199 ± 0.063	62
80	0.142 ± 0.100	73
100	0.119 ± 0.004	77
F	55.731	
p	0.000	

[†]The values represent the mean ± standard deviations for four times experiments. Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. F : F ratio, p : probability.

Table 2. Antibacterial activities(MIC) of ethyl acetate soluble subfraction 5-4-3 for *S. mutans*.

pH	5	6	7	8	9
MIC(µg) ^a	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13

^aAll values are the mean of at least three determinations.

정한 결과 6.25 µg/ml 농도에서 항세균효과가 관찰되어 열에 대하여 약간 불안정한 것으로 나타나 산업적으로 응용될 경우 높은 온도변화에 대한 추가 실험이 필요하다고 사료되었다.

요 약

고삼으로부터 항우식활성물질을 탐색하기 위하여 고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 이용하여 치아우식의 주요한 원인 균인 *Streptococcus mutans*에 대한 항세균효과와 Glucosyltransferase 활성억제효과를 파악하였다. *S. mutans*에 대한 항세균효과는 3차분획의 소분획에서 *S. mutans*에 대한 최소억제농도가 3.13 µg/ml로 나타나 높은 항세균효과를 관찰할 수 있었다. 또한 고삼의 에틸 아세테이트추출물은 glucan의 형성을 저해하였으며 100 µg/ml의 농도에서 77%의 저해율이 나타났고, 통계학적으로 유의성이 인정되었다 ($p < 0.05$). 항우식활성물질을 나타내는 성분을 찾기위하여 고삼의 에틸 아세테이트 추출물을 recycling prep-HPLC 방법과 TCL, LR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 의 분광화학적 자료를 이용하여 (2S)-2'-methoxy kurarinone와(+)-kurarinone을 동정하였다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 원광보건대학의 연구비와 일부 두뇌한국 21지원사업에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Chung, D. I., J. S. RO, and K. W. Chang. 1996. Antibacterial effect of some flavonoids against cariogenic bacteria. *J Korea Acad of Dent Health*. **20**: 189-202.
- Ellwood, D. C., J. K. Baird, J. R. Hunter, and V. M. C. Longyear. 1976. Variations in surface polymers of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **55**: 42.
- Fukui, K., T. Moriyama, Y. Miyake, K. Mizutani, and O. Tanaka. 1982. Purification and properties of glucosyltransferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **37**: 1-9.
- Hamada, S., T. Koga, and T. Ooshima. 1984. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* **63**: 407-411.
- Inoue, M. and T. Koga. 1979. Fraction properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **25**: 922-929.
- Kwon, I. B. 1991. Studies on Glucosyltransferase Inhibitors from Cacao bean husk. Ph. D. thesis, Kangweon National Univ.
- Kang, T. H., S. J. Jeong, W. K. Ko, N. Y. Kim, B. H. Lee, T. M. Inagaki, R. Higuchi, and Y. C. Kim. 2000. Cytotoxic lavanduly from *Sophora flavanones*. *J. Nat. Prod.* **63**: 680.
- Lee, H. O., K. Y. Han, and D. M. Han. 1999. Antibacterial and antifungal effect by *Artemisia lavandulaefolia* essential oil. *Korean J. Food & Nutr.* **12**: 559-563.
- Lee, H. O, N. K. Park, S. I. Jeong, Y. C. Kim, and S. H. Back. 2001. Isolation of antimicrobial compound from the ethyl acetate extract of *Sophora flavescens*. *Yakhak Hoeji.* **45**: 588-590.
- Lee, Y. S., H. J. Park, J. S. You, H. H. Park, I. B. Kwon, and H. Y. Lee. 1998. Isolation of on anticariogenic compound from Magnoliae Bark. *Korea J. Food Sci. Technol.* **30**: 230-236.
- Mok, J. S., U. Y. Park, Y. M. Kim, and D. S. Chang. 1994. Effects of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae Radix (Salvia miltiorrhiza)* extract. *Korean J. Food & Nutr.* **23**: 1101-1107.
- Namba, T, M. Tsunozuka, and H. Hattori. 1982. Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. Part II. Potent antibacterial action of *Magnoliae cortex* extracts against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* **44**: 100-106.
- Saeki, Y. 1994. Effect of seaweed extracts on *Streptococcus sobrinus* adsorption to saliva-coated hydroxyapatite. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **35**: 9-15.
- Saeki, Y, T. Kato, Y. Naito, I. Takazoe, and K. Okuda. 1996. Inhibitory effects of funoran on the adherence and colonization of mutans streptococci. *Caries. Res.* **30**: 119-125.
- Shon, W. S, Y. C. Yoo, and C. Y. Kim. 1991. The effect of NaCl and bamboo salt on the growth of various oral bacteria. *J. Kor. Aca. Dental Health.* **15**: 252-265.
- Shin Min Kyo. 1986. *Clinical Traditional Herbalogy*. pp. 314-316. Namsandang.
- Smith, D. J. and M. Taubman. 1993. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucanbinding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. *Infect. Immunol.* **61**: 2899-2905.
- Spatafora, G, K. Rocher, and D. A. Barnard. 1995. Streptococcus mutans mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic *in vivo*. *Infect. Immunol.* **63**: 2556-2563.
- Stoppelaar, D. E., J. D. Konig, and K. G. Plasschaert. 1974. Decrease in cariogenicity of a mutans of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **53**: 1355-1360.
- Uezono, Y., H. Tsumori, A. Shimamura, and H. Mukasa. 1996. Purification and properties of extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus bovis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **11**: 115-120.
- Woo, E. R., J. H. Kwak, H. J. Kim, and H. K. Park. 1998. A new prenylated flavonoid from the root of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **61**: 1552.
- Yamashita, Y., N. Hanada, M. Itoh-Andoh, and T. Takehara. 1989. Evidence for the presence of two distinct sites of sucrose hydrolysis and glucosyltransferase activities on 1,3-alpha-D-glucan synthase of *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.* **30**: 343-346.

(Received June 11, 2002/Accepted Sep. 11, 2002)