

단삼으로부터 식품부패미생물에 대한 항균성 물질의 분리 및 동정

최해연 · 한영실[†]

숙명여자대학교 식품영양학과

Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Dansam (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)

Hae-Yeon Choi and Young-Sil Han[†]

Dept. of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract

Antimicrobial effect of Dansham (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) was investigated. Methanol extract of dried Dansham was fractionated to hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and aqueous fraction. Chloroform fraction showed the highest inhibitory effect on the microorganisms such as *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* at 250 µg/disc. Chloroform fraction was further fractionated by silica gel column and thin layer chromatography (TLC). The antimicrobial compound was isolated from their fractions and its chemical structure was identified as a cryptotanshinone by GC-MS and ¹H-NMR, ¹³C-NMR.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, antimicrobial effect

서 론

근래 식품 산업의 발달로 식품이 대량생산, 유통되면서 장기간 안전하게 보존하기 위하여 합성 보존제의 사용이 크게 증가하고 있다. 그러나, 합성 보존제의 안전성에 대한 우려가 높아지면서 천연물에 존재하는 항균성물질의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1).

허브류와 향신료의 항균성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 최근 우리 나라에서도 구황식품 추출물 또는 그대로 식품에 첨가하여 항균성을 검색하는 연구가 진행되고 있다(2).

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과에 속하며 중국이 원산지로서 다년생 초본이고 굵은 뿌리의 표피에 적색 색소가 침착되어 있으며 말린 근경(rhizomae)을 한약재로도 쓰며 혈관확장작용, 진정진통작용, 항균작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 단삼의 화학성분에 관한 연구를 보면 diethyl ether 추출물에서 quinone-type 화합물인 tanshinone I, dihydrotanshinone I, tanshinone II A, tanshinone II B, cryptotanshinone 그리고 danshenxinkun B 같은 유색물질이 밝혀졌고 이들 중 tanshinone II A를 제외한 모든 quinone류가 BHA와 BHT의 항산화력과 비교되는 효과가 있다고 보고되었다(3). 특히 cryptotanshinone은 관상동맥혈관확장에 효과가 커서 심근경색증을 예방하며, 협심증 치료에 사용됨이 밝혀졌다(4). 본 연구에서는 천연식품보존제 개발의 일환으로

단삼을 메탄올로 추출하여 항균성을 살펴보고, 항균성을 나타내는 물질을 분리, 동정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 중국산으로 서울 경동시장에서 구입하여 blender(FM-680w, HANIL Co., Won Joo, Korea)로 분쇄(50 mesh)하고 폴리에틸렌백에 넣어 -40°C deep freezer에 보관하면서 사용하였다.

단삼 추출물의 항균성 검색

분말화한 단삼을 Fig. 1과 같이 80°C에서 3시간동안 메탄올로 3회반복 추출하여 여과, 농축 후 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물의 항균성 검색은 Fig. 2와 같은 방법으로 균주를 24시간동안 37°C incubator에서 배양시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

본 연구에 사용한 균주는 자연계에 널리 분포하여 식품을 변질시키는 유포자세균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, 저온에서도 생육하여 냉동, 냉장 식품에서 감염형 식중독의 원인이 되는 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, enterotoxin을 생성하여 식중독의 원인이 되는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, gram 음성균으로 오염의 지표균이면서 부패세균인 *Escherichia coli* KCTC 2441, 그리고 호흡성 gram 음성균으로 장염의 원인균이며 감염형 식중독을 일으키는 *Vibrio*

[†]Corresponding author. E-mail: yshan@sookmyung.ac.kr
Phone: 82-2-710-9764. Fax: 82-2-701-9471

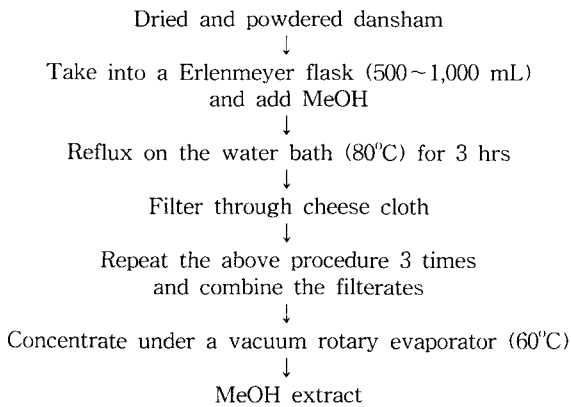


Fig. 1. Preparation procedure of methanol extracts from *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

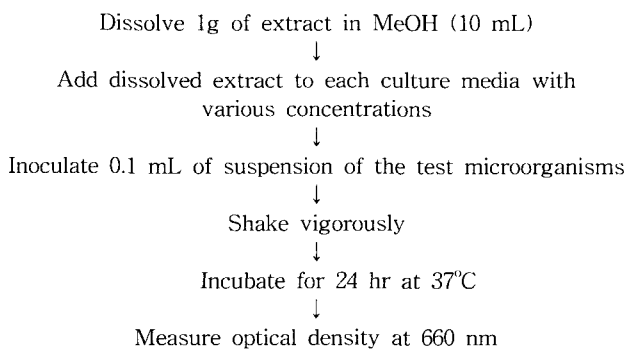


Fig. 2. Antimicrobial activity assay.

parahaemolyticus KCTC 2471을 사용하였다. 배지는 tryptic soy broth(Difco)와 nutrient agar(Difco)를 사용하였고 *V. parahaemolyticus*는 위와 같은 배지에 식염(NaCl)을 3%가 되도록 첨가하여 사용하였다.

단삼 추출물의 분획

시료(8 kg)로부터 얻은 메탄올 추출물을 증류수에 현탁한 후 Fig. 3과 같이 *n*-hexane 을 가하여 분획한 후 여과, 감압 농축하여 분획물 73 g을 얻었다. 이와 같은 방법으로 chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획하여 chloroform 분획물 130 g, ethylacetate 분획물 183 g, *n*-butanol 분획물 156 g 그리고 물 분획물 2160 g을 얻었다.

단삼 추출물의 용매 분획별 항균성 검색

각 계통 분획물의 항균성 검색은 paper disc법으로 하였다. 시험용 평판배지는 nutrient agar를 멸균 후 직경 9 cm인 petri dish에 15 mL씩 분주하여 clean bench에서 하룻밤 건조시키고 그 위에 각 균주의 배양액 100 μ L를 도말하였다. 각 용매 분획별 분획물의 농도는 500~2000 μ g/disc로 하였다. 이를 멸균된 disc(직경 8 mm, Toyo Seisakusho Co.)에 흡수, 건조시켜 균주가 도말된 plate 표면에 올려놓은 후 37°C의 incubator에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone

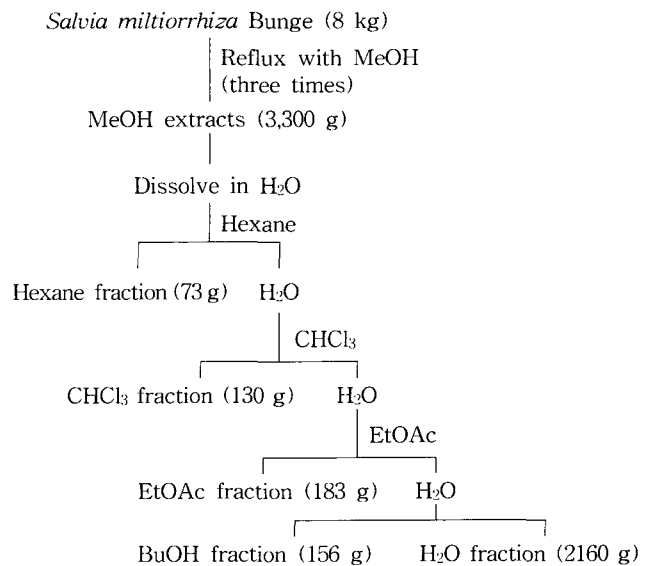


Fig. 3. Fractionation of the methanol extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

의 직경(mm)으로 항균활성을 측정하였다.

항균성 물질의 분리

단삼의 chloroform fraction을 Fig. 4와 같이 silica gel column chromatography(10×120 cm)를 이용하여 hexane→hexane : ethylacetate 순으로 단계적으로 극성을 높여가며 column chromatography를 실시하였고 TLC로 monitoring 하면서 14개의 소분획을 얻었다. 14개의 fraction을 다시 5개의 시험균주를 이용하여 항균활성 시험 결과 항균성이 높게 나타난 sub fraction 6을 다시 silica gel column chromatography와 TLC를 이용하여 hexane : ethylacetate = 2 : 1 용매로 시작하여 극성을 높여가며 분리하여 5개의 분획을 얻었고, 이를 다시 항균활성 시험 결과 항균성이 높게 나타난 2nd fraction 3을 hexane : ethylacetate = 7 : 1 용매로 시작하여 반복 분리하여 항균성물질을 얻었다. 추출과 silica gel column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였고 column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70-230 mesh, Merck art. 7734)을, TLC plate는 Kiesel gel 6060 F254(Merck art. 5715)를 사용하였다.

항균성 물질의 동정

항균성이 높게 나타난 물질은 GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR등을 통하여 물질을 구명하였다.

Mass spectrum(MS)는 Hewlett-Packard 6890 gas chromatography와 Hewlett-Packard 5973 MSD를 사용하였다. Column은 HP5-MS(30 m×250 μ m×0.25 μ m), column 온도는 100°C에서 2분간 유지시킨 후 10°C/min으로 승온하여 280°C, 10°C/min 조건으로 분석하였다. Injector 온도는 280°C, detector 온도는 280°C, carrier gas는 He(1.0 mL/min)을 사용하였다.

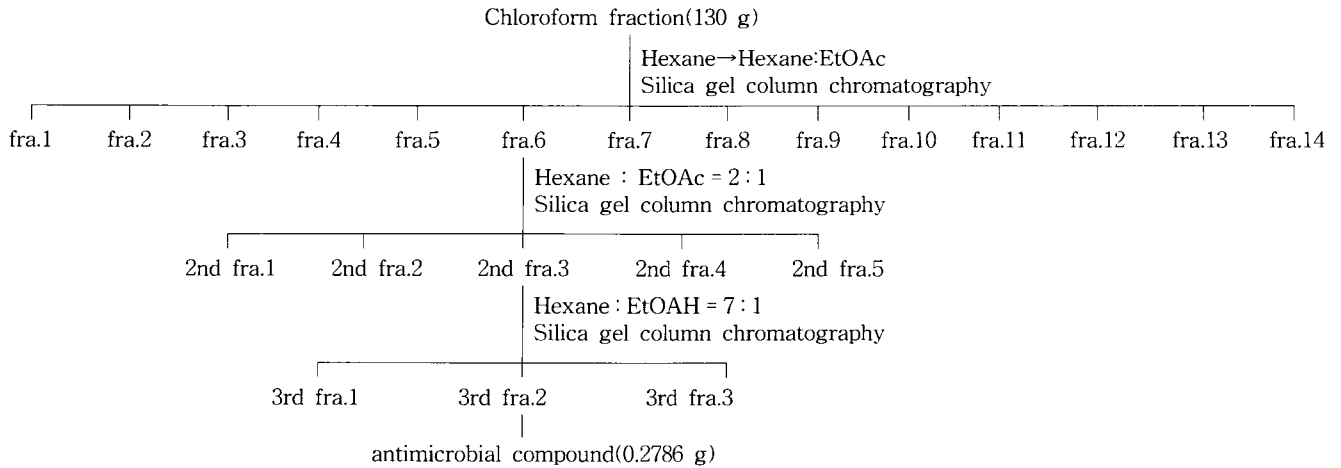


Fig. 4. Fractionation of chloroform extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by passing through a silica gel column chromatography.

결과 및 고찰

단삼추출물의 항균성

단삼을 건조시켜 분쇄한 후 methanol로 추출한 것을 10% 농도로 희석하여 500, 1000, 1500, 2000 µg/mL씩 첨가하여 식품부패미생물의 증식억제 효과를 검색한 결과는 Table 1과 같다.

단삼의 methanol 추출물은 1,000 µg/mL 농도에서 *E. coli*, *V. parahaemolyticus*의 증식을 100% 억제하였으며 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*는 각각 96.85%, 89.97%와 70.13%의 억제 효과를 보였다. 또한 2000 µg/mL 농도에서 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*의 증식을 100% 억제하였으며 *S. aureus*는 97.46%의 억제 효과를 보였다.

단삼 추출물의 분획별 항균성

단삼을 methanol로 추출한 것을 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 비극성에서 극성으로 용매를 바꾸어 순차적으로 분획, paper disc법으로 항균성을 검색한 결과는 Table 2와 같다. 단삼의 ethylacetate, hexane, chloroform 분획물은 공시균주 5종 모두에 대하여 clear zone을 나타내었고, 그 중에서 hexane층은 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대하여 1000

µg/disc 농도에서 9, 9, 12, 19 mm의 clear zone을 나타내었다. Chloroform층은 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서 가장 낮은 농도인 500 µg/disc 농도에서 각각 14, 12, 15 및 14 mm의 clear zone을 나타내었고 1000 µg/disc 농도에서는 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대하여 각각 9.5, 19, 18, 19, 18 mm의 clear zone을 나타내었다. Ethylacetate 층은 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서 1500 µg/disc 농도에서 각각 10, 9, 11, 12 mm의 clear zone을 나타내었다.

Kim과 Han(5)은 산초의 methanol 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*에 대하여 1000 µg/mL 농도에서 완전히 증식을 억제하였고, Hwang 등(6)은 백작약의 ethylacetate 분획에서 낮은 농도인 1000 µg/disc의 농도에서 식품부패미생물 5종에 대하여 clear zone을 형성하여 항균력을 나타내었는데 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 균에 대해서는 가장 낮은 농도인 500 µg/disc에서 clear zone을 나타내었다고 보고하였다(6).

단삼 추출물의 용매 분획별 항균성은 chloroform 분획이 가장 우수하고 *n*-hexane, ethylacetate 순으로 항균성을 보이는 것으로 보아 각 용매 분획시 용매에 따라 항균성 물질이 용해되어 나타나는 것으로 생각되어 항균물질은 단일성분이기보다 여러 성분이 혼합되어 있는 것으로 생각된다.

Chloroform 분획물의 항균성

Chloroform 추출물을 silica gel column chromatography (10×120 cm)한 후 TLC에 전개하여 Fig. 4와 같이 14개의 분획을 얻었고 그에 대한 항균성은 Table 3과 같다. 각 fraction의 농도가 250, 500, 750, 1000 µg/disc가 되도록 paper disc에 첨가한 후 5종의 공시 균주를 대상으로 항균력을 검색하였다. 14개의 fraction 중 fra.6과 fra.7이 모든 공시 균주에 대하여 clear zone이 12~24 mm를 형성하여 항균성이 우수

Table 1. Antimicrobial activity of methanol extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against various microorganisms

Conc. (µg/disc)	Antimicrobial activity (%)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
500	95.41	20.19	13.42	99.64	100
1000	96.85	89.97	70.13	100	100
1500	97	93.05	87.86	100	100
2000	100	97.46	100	100	100

Table 2. Antimicrobial activity of solvent fractions from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against various microorganisms

Solvent fractions	Conc. (µg/disc)	Clear zone (mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Methanol	500	17	12	11	11	13
	1000	20	13	14	12	17
	1500	21	14	14	13	17.5
	2000	22	15	15	14	19
Hexane	500	- ¹⁾	-	-	-	13
	1000	-	9	9	12	19
	1500	9	10	10	13	20
	2000	10	12	12	15	21
Chloroform	500	-	14	12	15	14
	1000	9.5	19	18	19	18
	1500	11	19	19	20	19
	2000	12	20	20	21	20
Ethylacetate	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	10	9
	1500	10	9	-	11	12
	2000	11	10	10	12	13
Butanol	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	10	-
	2000	-	-	-	11	-
Water	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-

¹⁾-: No activity.

하게 나타났다. 250 µg/disc 농도에서 *B. subtilis*의 경우 fra.6 과 fra.7에서 각각 18, 16 mm, *S. aureus*의 경우 각각 17, 13 mm, *L. monocytogenes*의 경우 각각 13, 12 mm의 clear zone을 나타내었다. 또한 *E. coli*의 경우에는 각각 16, 14 mm의 clear zone을 보였고, *V. parahaemolyticus*의 경우 각각 18, 18 mm 크기의 clear zone을 보였다. 따라서 어떤 fraction 보다 높은 항균력을 보인 fra. 6을 다시 silica gel column chromatography(5×75 cm)와 TLC monitoring을 이용하여 5개의 분획을 얻었다.

5개의 분획에 대한 항균성 실험을 한 결과는 Table 4와 같다. 이 중에서 항균력이 우수한 2nd fra.3을 얻었는데 250 µg/disc 농도에서 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해 각각 15, 17, 16, 18, 20 mm의 clear zone을 보였다. 2nd fra.3을 다시 silica gel column chromatography(2×60 cm)와 TLC monitoring을 이용하여 항균성물질을 분리하였다.

분리된 항균성물질의 구조결정

단삼의 methanol 추출물로부터 용매별로 계통 분획하여 분리한 chloroform 분획으로부터 silica gel column chromatography와 TLC monitoring 하여 항균성을 보인 붉은색 결정의 항균성 물질을 얻었고 이를 GC/MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등으로 구조분석한 결과 화학식이 C₁₉H₂₀O₃이며 분자량이 296.141의 cryptotanshinone으로 동정되었다(Fig. 5, 6, 7).

Yasumasa 등이 단삼으로부터 분리, 동정된 화합물의 spectral data와 직접 비교함으로써 확인할 수 있었다(7-9). Cryptotanshinone은 본 연구에서 밝혀진 항균성 외에도 관상동맥 혈관확장에 효과가 커 심근경색증을 예방하며, 협심증 치료에 사용되고 있다는 연구도 보고되었다(4).

RF : 0.21(EtOAc : Hexan = 1 : 7)

¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz)

δ 7.64(d, 1H, J=8.1Hz), 7.49(d, 1H, J=8.1Hz), 4.88(t, 1H, J=9.3Hz), 4.35(m, 1H), 3.61(m, 2H), 3.21(t, 1H, J=6.3Hz), 1.89(m, 2H), 1.76(m, 2H), 1.40(m, 2H) and others

¹³C-NMR(CDCl₃, 75.5MHz)

184.26, 175.69, 170.71, 152.39, 143.66, 132.52, 128.36, 126.32, 122.50, 118.32, 81.46, 37.77, 34.66, 34.50, 31.94, 31.89, 29.63, 19.03, 18.80

요 약

단삼을 건조시켜 분쇄한 후 methanol로 추출하여 여러 용매로 분획하여 식품부패미생물의 증식억제 효과를 검색하고 그 항균성 물질을 분리하였다. 단삼의 chloroform 분획 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서 가장 낮은 농도인 250 µg/disc 농도에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 단삼의 chloroform 추출물을 silica gel column chromatography와

Table 3. Antimicrobial activity of the first chloroform fractions from methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* against the growth of various microorganisms

Fraction No.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Clear zone (mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogens</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
1	250	- ¹⁾	-	-	-	-
	500	9	-	-	-	-
	750	10	-	-	9	9
	1000	12	9	8.5	9	10
2	250	-	-	-	-	-
	500	10	-	-	-	9
	750	11	-	-	9	9.5
	1000	12	9	9	10	10
3	250	10	-	-	-	9
	500	12	-	9	9	10
	750	13	9	9.5	10	11
	1000	14	10	10	11	12
4	250	12	9	9	9	10
	500	14	10	10	10	13
	750	14	10.5	10.5	11	14
	1000	15	11	12	13	15
5	250	16	10	9	9.5	14
	500	17	12	10	11	16
	750	17.5	13	10.5	13	17
	1000	18	14	12	15	19
6	250	18	17	13	16	18
	500	20	19	14	18	20
	750	21	20	15	21	22
	1000	22	21	17	22	24
7	250	16	13	12	14	18
	500	19	16	14	16	20
	750	20	17	15	18	22
	1000	22	19	16	20	24
8	250	11	10	-	10	13
	500	14	12	-	12	15
	750	15	13	8.5	13	15.5
	1000	16	14	9	14	16
9	250	10	-	-	10	11
	500	13	10	9.5	13	13
	750	14	11	10	13.5	14
	1000	15	12	10	14	15
10	250	9	-	8.5	-	9
	500	12	10	11	9	11
	750	13	11	11	9.5	13
	1000	13	12	12	10	15
11	250	11	-	-	9	10
	500	13	10	-	11	13
	750	14	10.5	8.5	12	14
	1000	15	11	9	13	15
12	250	10	-	-	-	11
	500	12	-	-	9	13
	750	13	9.5	8.5	10	14
	1000	14	10	9	12	15
13	250	10	8.5	-	-	12
	500	13	10	8.5	10	14
	750	15	10.5	8.5	10.5	14.5
	1000	16	11	9	11	15
14	250	12	9	-	-	10
	500	14	11	8.5	10	13
	750	15	11	9	11	15
	1000	16	12	11	13	16

¹⁾-: No activity.

Table 4. Antimicrobial activity of the second chloroform fractions from methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* against the growth of various microorganisms

Fraction No.	Conc. (µg/disc)	Clear zone (mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogens</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
1	250	10	11	12	13	13
	500	13	13	14	15	15
	750	14	14	15	16	17
	1000	16	15	17	17	18
2	250	9	10	11	10	14
	500	12	11	12	12	16
	750	14	12	14	15	17
	1000	16	13	16	16	18
3	250	15	17	16	18	20
	500	17	19	18	20	22
	750	19	20	20	24	23
	1000	21	23	22	26	24
4	250	10	12	9	9	9
	500	11	13	9.5	10	11
	750	14	15	10	11	12
	1000	16	17	11	13	14
5	250	12	13	9	9	12
	500	14	15	10	10	14
	750	15	16	11	11	14
	1000	17	17	12	12	15

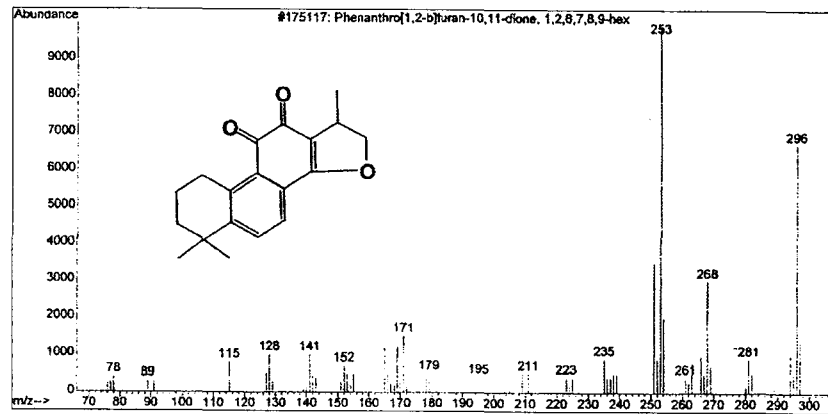


Fig. 5. Scan mass spectrum of antimicrobial compound from *Salvia miltiorrhiza* Bunge in GC/MS.

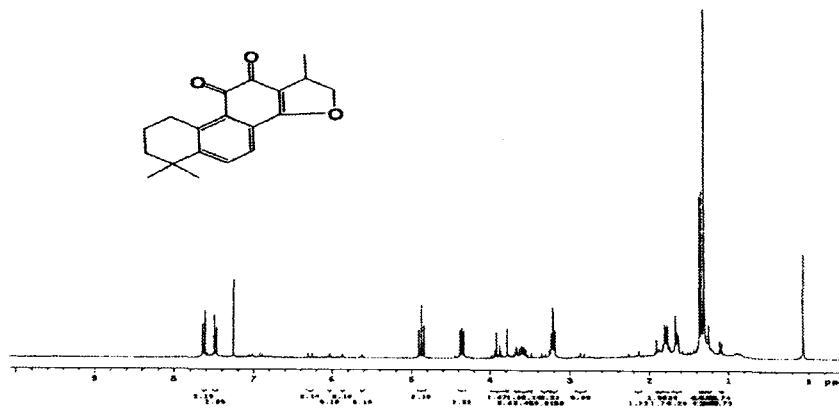


Fig. 6. ¹H NMR spectrum of antimicrobial compound from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (CDCl₃, 300MHz).

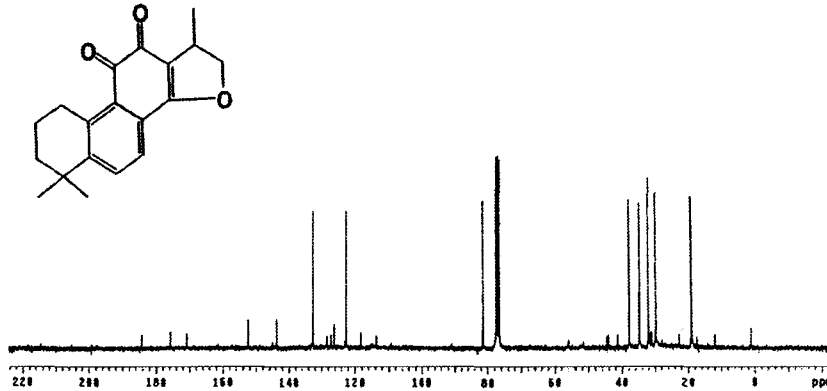


Fig. 7. ^{13}C NMR spectrum of antimicrobial compound from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (CDCl_3 , 75.5MHz).

TLC로 monitoring 하여 항균성을 실험하였다. 이 결과 우수한 항균성을 보인 sub fraction을 재차 분리하여 붉은색 결정의 항균성물질을 얻었고 이를 GC/MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR로 구조분석한 결과 화학식이 $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$ 이며 분자량이 296.141의 cryptotanshinone으로 동정되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 여자대학교 연구기반 확충사업 연구비의 지원에 의하여 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

문헌

- Stringer D, 1990. Chilled food in the 1990s. *Food Manufacture* April: 39-46.
- Kim IH. 1990. The status of Korean food additives production usage and foreign countries. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 519-528.
- Zhang KQ, Bao Y, Wu P, Robert TR, Ho C. 1990. Antioxidative components of tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J Agric Food Chem* 38: 1194-1197.
- Honda G, Kozuka Y, Tabata M. 1988. Isolation of an anti-dermatophytic substance from the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem Pharm Bull* 36: 408-412.
- Kim SI, Han YS. 1997. Isolation and identification of antimicrobial compound from Sancho. *Korean J Soc Food Sci* 13: 56-63.
- Hwang JS, Cheun HJ, Han YS. 2000. Isolation and identification of antimicrobial compound from Jakyak. *Korean J Soc Food Sci* 16: 445-452.
- Yasumasa I, Izumi M, Yutaka T. 1989. Abietane type diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 28: 3139-3141.
- Lee AR, Wu WL, Chang WL, Lin HC, King ML. 1987. Isolation and bioactivity of new tanshinines. *J Natural Products* 50: 157-160.
- Lou HW, Wu BJ, Wu MY, Yong ZG, Masatake N, Yoshimasa H. 1985. Pigments from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 24: 815-817.

(2002년 11월 25일 접수; 2003년 2월 8일 채택)