

丹蔘으로부터 항균물질의 분리

한 완 수*†

*목원대학교 자연과학대학 생의약화학과

Isolation of Antimicrobial Compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Wan Soo Han*†

*Dept. of Bio & Medicinal Chemistry, Natural Science College, Mokwon Univ., Daejeon 302-729, Korea.

ABSTRACT : Bioassay-directed fractionation of the dried roots of *Salvia miltiorrhiza* led to the isolation of abietane tanshinones, cryptotanshinone and dihydrotanshinone I. Their structures were elucidated using ¹H- and ¹³C-NMR, UV, IR and mass spectral analyses. These compounds exhibited a moderate antimicrobial activities against *Staphylococcus epidemidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus pyogene*.

Key words : *Salvia miltiorrhiza*, antibacterial activity, cryptotanshinone, dihydrotanshinone I.

서 언

인간의 삶 속에서 미생물들은 감염증-피부 및 연조직 감염, 골관절염, 균혈증, 폐렴, 식중독 등을 일으켜 생명을 위협해왔다. 때문에 이러한 병원성 미생물들을 무력화시키기 위해 양보할 수 없는 생존 경쟁을 하고 있으며, 최근 우수한 항생제의 계속적인 개발로 많은 생명을 구할 수 있게 되었지만, 한편으로는 항생제 오남용으로 숙주의 변화와 새로운 균주의 출현, 또한 균주의 항생제에 대한 내성은 또 다른 새로운 항생제의 출현을 요구하게 되었다. 근래에 국내의 다양한 생약재 또는 식물성분이 미생물에 대한 자기방어 수단으로 항균성물질을 생산한다고 발표한 바 있는데 Oh *et al.* (1998)은 산사, 황련, 측백, 창출, 석창포의 ethanol 추출물이 그람양성 및 음성세균 모두에 강한 항균성을 나타내고 있음을 보고하였다.

단삼 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 다년생 약용식물로 적삼, 자단삼, 대홍포, 활혈근이라고도 불리며 뿌리가 붉기 때문에 단삼이라고 한다. 뿌리는 특이한 냄새가 나고 약간 쓴맛이 나며 한방에서 약재로 쓰이는데 부인의 생리불순·생리통·산후 복통에 쓰이고, 어혈성의 심복부동통과 타박상을 치료하며, 불면

증·피부 발진 등에 사용한다 (Kim, 1989). 단삼의 주요 화학성분으로는 abietane-type diterpenoid이며, rosemarinic acid, lithospermate B, magnesium lithospermate B 같은 phenol성 화합물과 tanshinone I, tanshinone II 등이 알려져 있다. 그리고 밝혀진 생리활성으로는 심장관상 혈관계혈류량 증가, 해열, 항균, 소염, 항암, 신부전증 개선 효과 등이 있다 (Yagi *et al.*, 1989; Okamura *et al.*, 1992).

본 연구에서는 단삼에 함유된 성분들이 다양한 약리효능을 나타내는 것에 주목하여, 항생제 개발차원에서 단삼의 에탄올 추출물에 항균효과를 지닌 물질이 함유되어 있는지의 여부를 검토하고자 하였다. 이를 위해 단삼의 EtOH 추출물로부터 2종의 tanshinones을 분리하고 이화학적 성상 및 기기 분석적 방법으로 구조를 규명하여 항균효과를 검색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 단삼은 대전시내 소재 약재상에서 구입한 것을 우석대학교 한의과대학 주영승 교수로부터 정

† Corresponding author: (Phone) +82-42-829-7563 (E-mail) wshan@mokwon.ac.kr
Received September 30, 2003 / Accepted April 19, 2004

확한 감정을 받았고, 표본은 본 대학의 자연과학대학 생·의약화학과에 보관중이다.

시약 및 기기

추출 및 분리에 사용된 시약은 일급 시약을, column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (230~400 mesh, ASTM, Art. 9385, Merck, Germany)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate (layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Art 5715, Merck)를 사용하였다. 구조동정에 사용된 UV 스펙트럼은 UV-2550 UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu)를, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석에 사용된 spectrometer는 Bruker DRX300 (Germany)를 사용하였고, chemical shift는 ppm으로 나타내었다. 시료를 녹인 용매는 CDCl₃를 사용하였으며, UV lamp는 254 nm 파장에서 확인하였다.

시용균주

항균력 시험용으로 사용된 균주는 gram 양성균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus pyogenes* ATCC 19615, *Enterococcus faecalis* ATCC 25922를 사용하였고, gram 음성균으로는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43717 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 23350, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27983, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Samonella typhimurium* ATCC 14028을 사용하였다.

균주의 배양 및 배지

균주의 배양에 사용된 배지는 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidemidis*는 Brain heart infusion (Difco, USA)를 사용하였고, *Escherichia coil*, *Samonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*는 Nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였다.

항균력 측정

항균활성의 측정은 액체배지희석법을 이용하여 측정하였다. 시료를 각각 10% DMSO에 용해시킨 후, 96 well plate에 각 시료의 농도를 최고농도 100 µg/ml에서 최저농도 3.125 µg/ml까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 균주는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고, 37°C 배양기에서 18시간 배양한 균주 10⁴ CFU/ml를 접종하여, 37°C 배양기에서 2시간 배양한 후, ELISA reader로 630 nm에서 배지의 탁도를 확인하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 같

은 결과를 얻은 것을 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)로 결정하였으며, 최소억제농도 수치가 낮은 것을 항균효과가 높은 것으로 판정하였다.

항균물질의 분리

세절된 시료 1.2 kg을 실온에서 80% EtOH로 7일간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 감압·농축하여 EtOH 엑스 35 g을 얻었다. EtOH 엑스를 증류수에 현탁한 후 분액 여두에 옮겨 CHCl₃로 분획한 후 CHCl₃층을 농축하여 얻어진 분획물(9 g)을 silica gel (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, 200 g, 6×80 cm)이 충전된 컬럼에 넣어 *n*-hexane-CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO (9:1), Me₂CO 그리고 MeOH을 순차적으로 이용하여 6개의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중에 생리활성이 강한 CHCl₃-Me₂CO (9:1) 용출액에 대하여 recycling preperative-HPLC [컬럼, JAIGEL-1H (GPC); 유속, 3.5 ml/min.; 용매, CHCl₃, 254 nm]를 실시하여 순수물질 2개를 분리하였다.

결과 및 고찰

항균활성물질의 구조동정

화합물 (1)은 황색 침상으로 EI-MS에서 분자량이 296임을 확인 할 수 있었으며 IR spectrum에서 1713 cm⁻¹와 1621 cm⁻¹에서 각각 C=O의 흡수로 추정되는 band가 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.51 (1H, *d*, *J*=8.1 Hz, H-6)과 7.65 (1H, *d*, *J*=8.1 Hz, H-7)에서 2개의 signal은 *ortho*-aromatic proton로 추정되며, δ 1.33 (6H, *s*, Me-18 and Me-19)에서 geminal dimethyl proton의 signal이 관찰되었다. 또한 δ 1.68 (2H, *m*, H-3), δ 1.82 (2H, *m*, H-2) 그리고 δ 3.24 (2H, *t*, *J*=6.4 Hz, H-1)는 3개의 methylene proton들의 signal임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR에서 δ 184.3과 δ 175.7에서 2개의 carbonyl carbon signal를 관찰 할 수 있으며, δ 143.7, 132.5, 122.5, 128.5, 126.3, 152.4의 signal들은 aromatic carbon들로 δ 81.5은 oxygenated carbon (CH₂)으로 확인 할 수 있다. 이상의 분광학적 결과를 문헌 (Ikeshiro *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1992)과 비교하여 화합물 (1)은 cryptotanshinone으로 동정하였다.

화합물 (2)는 red 침상으로 EI-MS에서 분자량이 278임을 확인 할 수 있으며 IR spectrum에서 1719 cm⁻¹와 1641 cm⁻¹에서 각각 C=O의 흡수로 추정되는 band가 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.43 (1H, *d*, *J*=6.9 Hz, H-3), δ 7.60 (1H, *dd*, *J*=8.9, 6.9 Hz, H-2), δ 9.34 (1H, *d*, *J*=8.9 Hz, H-1), δ 7.80 (1H, *d*, *J*=8.7 Hz, H-7) 그리고 δ 8.35 (1H, *d*, *J*=8.7 Hz, H-6)의 5개

의 signal은 aromatic proton으로 coupling constant를 비교해보면 δ 7.80 (1H, d, $J=8.7$ Hz) 그리고 δ 8.35 (1H, d, $J=8.7$ Hz)은 *ortho*-aromatic proton임을 예측할 수 있고 δ 9.34 (1H, d, $J=8.9$ Hz), δ 7.60 (1H, dd, $J=8.9, 6.9$ Hz) 그리고 δ 7.43 (1H, d, $J=6.9$ Hz)의 3개의 signal은 aromatic proton으로 coupling constant δ 7.60 (1H, dd, $J=8.9, 6.9$ Hz)을 사이에 놓고 δ 9.34 (1H, d, $J=8.7$ Hz)와 δ 7.43 (1H, d, $J=6.9$ Hz)의 proton들이 coupling을 하고 있음을 추정할 수 있다. ^{13}C -NMR에서 184.8과 176.2에서 2개의 carbonyl carbon signal이 관찰되었으며, δ 126.7, 130.8, 128.7, 135.4, 134.1, 133.3, 120.7, 129.3, 125.5, 132.3의 10개의 signal들은 aromatic carbon들임을 확인 할 수 있었다. 또한 δ 82.0 ppm에서 oxygenated carbon (CH_2)을 확인 할 수 있다. 이상의 분광학적 결과를 문헌 (Onitsuka *et al.*, 1983; Sato *et al.*, 1992)과의 비교하여 화합물 (2)는 dihydrotanshinone으로 동정하였다.

Cryptotanshinone : ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.33 (6H, s, H-18 and 19), 1.38 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-17), 1.68 (2H, m, H-3), 1.82 (2H, m, H-2), 3.24 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-1), 4.38 (1H, dd, $J=9.3, 6.9$ Hz, H-16), 4.90 (1H, t, $J=9.3$ Hz, H-16), 7.51 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-6), 7.65 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-7). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ 29.7 (C-1), 19.1 (C-2), 37.9 (C-3), 34.9 (C-4), 143.7 (C-5), 132.5 (C-6),

122.5 (C-7), 128.5 (C-8), 126.3 (C-9), 152.4 (C-10), 184.3 (C-11), 175.7 (C-12), 118.3 (C-13), 170.7 (C-14), 34.7 (C-15), 81.5 (C-16), 18.8 (C-17), 31.9 (C-18 and 19). EI-MS : (m/z), 296 [M^+], 281 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 268 [$\text{M}^+ - \text{CO}$], 253.

Dihydrotanshinone I : ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) : 1.44 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-17), 2.74 (3H, s, H-18), 3.68 (1H, m, H-15), 4.46 (1H, dd, $J=9.3, 6.3$ Hz, H-16), 4.99 (1H, t, $J=9.6$ Hz, H-16), 7.43 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-3), 7.60 (1H, dd, $J=8.9, 6.9$ Hz, H-2), 7.80 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-7), 8.35 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-6), 9.34 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-1). ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) : δ 126.7 (C-1), 130.8 (C-2), 128.7 (C-3), 135.4 (C-4), 134.1 (C-5), 133.3 (C-6), 120.7 (C-7), 129.3 (C-8), 125.5 (C-9), 132.3 (C-10), 184.8 (C-11), 176.2 (C-12), 118.8 (C-13), 170.7 (C-14), 35.2 (C-15), 82.0 (C-16), 19.2 (C-

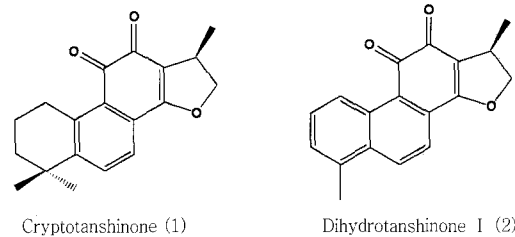


Fig. 1. Structure of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MIC's) of *Salvia miltiorrhiza* extracted with different solvents, cryptotanshinone and dihydrotanshinone against various microorganisms.

Strains	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) [†]				
	1	2	CHSM	EASM	ETSM
Gram (+)					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12.5	6.3	25	100	50
<i>S. epidemidis</i> ATCC 12228	6.3	3.1	12.5	50	50
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	6.3	6.3	25	50	50
<i>E. faecalis</i> ATCC 25922	50	25	50	100	100
Gram (-)					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>100	>100	>100	>100	>100
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	>100	>100	>100	>100	>100
<i>E. cloacae</i> ATCC 23350	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27983	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	>100	>100	>100	>100	>100

[†]Data are average of three experiments.

1. cryptotanshinone; 2. dihydrotanshinone.

Plant extracts: CHSM; Chloroform soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*. EASM; Ethyl acetate soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*. ETSM; Ethanol soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*.

17), 20.2 (C-18). EI-MS : (m/z), 278 [M⁺], 250 [M⁺-CO], 235, 178.

항균력

단삼의 클로로포름 분획물에서 그람 양성세균인 *S. epidermidis*에 대한 항균력은 MIC가 12.5 µg/ml, *S. aureus*와 *S. pyogenes*에 대한 항균력 MIC가 25 µg/ml로 측정되었으며, 또한 *E. faecalis*에 대하여는 MIC가 50 µg/ml로 활성이 낮았다. 다른 그람 음성세균에서는 클로로포름 분획물에 대한 항균력은 MIC가 100 µg/ml 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다. 이와 같이 항균활성이 확인된 클로로포름 분획물중에 가장 높은 항균력을 나타내는 분획을 recycling preparative-HPLC로 분리한 후 동정된 cryptotanshinone과 dihydrotanshinone I을 실험한 결과 cryptotanshinone은 그람양성세균인 *S. epidermidis*와 *S. pyogenes*에 대한 항균력이 MIC 6.3 µg/ml로 측정되었으며, *S. aureus*에 대해서는 MIC가 12.5 µg/ml로 측정되었다. 한편, *E. faecalis*에 대한 MIC가 50 µg/ml로서 낮은 항균력을 나타냈으며, 다른 균주에 대해서는 항균활성을 거의 나타내지 않았다.

Dihydrotanshinone I은 그람양성세균인 *S. epidermidis*에 대한 항균력 MIC이 3.1 µg/ml로 가장 높았으며, *E. faecalis*에 대한 MIC는 25 µg/ml로서 낮은 항균력을 나타냈고, 다른 균주에서는 cryptotanshinone처럼 MIC 100 µg/ml 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다 (Table 1).

적 요

丹蔘을 bioassay-directed fractionation에 의한 에탄올 추출물의 클로로포름 분획물을 silica gel column

chromatography, recycling preparative-HPLC 등을 실시하여 항균활성을 나타내는 2개의 화합물을 분리하여 이화학적 성상 및 spectra data (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 Mass)에 의해 각각 cryptotanshinone과 dihydrotanshinone I으로 동정하였으며, 이들 화합물의 항균성 (MIC)은 각각 *S. epidermidis*에 대하여 6.3, 3.1 µg/ml와 *S. pyogenes*에 대해 6.3 µg/ml로 비교적 높은 활성을 나타내어 항생제로서 개발 가능성을 보여주었다.

LITERATURE CITED

- Ikeshiro Y, Mase I, Tomita Y (1989) Abietane type diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 28:3139-3141.
- Kim JK (1989) Illustrated natural drugs encyclopedia. Seoul. Namsandang Pubilshers, p. 160.
- Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY (1998) Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 30:957-963.
- Okamura N, Sato M, Yagi A (1992) An application of HPLC for identification of abietane-type pigments from *Salvia miltiorrhiza* and their effects on post-hypoxic cardiac contractile force in rats. *Planta Medica* 58:571-573.
- Onitsuka M, Fujiu M, Shinma N, Maruyama HB (1983) New platelet aggregation inhibitors from Tan-Shen ; Radix of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Chem. Pharm. Bull.* 31:1670-1675.
- Sato M, Sato T, Ose Y, Nagase H, Kito H, Sakai Y (1992) Modulating effect of tanshinones on mutagenic activity of Trp-P-1 and benzo[a]pyrene in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 265:149-154.
- Yagi A, Fujimoto K, Tanonaka K, Hirai K, Takeo S (1989) Possible active components of tan-shen (*Salvia miltiorrhiza*) for protection of the myocardium against ischemia-induced derangements. *Planta Medica* 55:51-54.