

## 丹參 추출물로부터 항균물질의 분리와 항균효과

송경송 · 정승일 · 주영승<sup>1)</sup> · 문광현<sup>2)</sup>

우석대학교 한의과대학 본초학교실<sup>1)</sup>, 전라북도 생물벤처기업지원센터 전북바이오연구소<sup>2)</sup>

### Isolation and Effect of Antimicrobial Compounds from Extracts of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge

*Kyoung-song Song · Seung-il Jeong · Young-sung Ju · Kwang-hyun Moon*

**Objectives** : Bioassay-directed fractionation of the dried roots of *Salvia miltiorrhiza* led to the isolation of abietane tanshinones, cryptotanshinone and dihydrotanshinone.

**Methods** : Their structures were elucidated using <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR, UV, IR and mass spectral analysis.

**Result and Conclusions** : These compounds exhibited a moderate antimicrobial activities against *Staphylococcus epidemidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogene*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Enterbacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, and *Samonella typhimurium*.

**Key words** : *Salvia miltiorrhiza*, Antimicrobial activity, cryptotanshinone, dihydrotanshinone

### 서론

자연계에 널리 존재하는 미생물들은 사람들에게 감염, 균혈증, 폐렴, 식중독 등을 일으켜 생명을 위협해왔다. 이러한 병원성 미생물들을 무력화시키기 위해 인류는 양보할 수 없는 생존 경쟁을 하고 있으며, 최근 우수한 항생제의 지속적인 개발로 많은 생명을 구할 수 있게 되었다. 그러나 항생제 오남용

인한 숙주의 변화와 새로운 균주의 출현, 또한 균주의 항생제에 대한 내성은 또 다른 새로운 항생제의 출현을 요구하게 되었다. 또한 합성 의약품의 부작용과 독성에 대한 임상 예들이 자주 보고 됨에 따라 천연물로부터 보다 안전한 새로운 형태의 의약품의 개발을 위한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다<sup>1)</sup>. 이 중 많은 식물들은 다양한 종류의 이차 대사산물을 체내에 축적하고 있어 이들 이차 대사산물 성분들이 미생물에 대한 자기방어 수단으로 항균성물질을 생산한다고 발표한 바 있는데, 오<sup>2)</sup>은 山楂, 黃連, 側柏, 蒼朮, 石菖蒲의 ethanol 추출물이 그람양성 및 음성세균 모두에 강한 항균성을 나타내고 있음을 보고한 바 있다.

교신저자 : 주영승, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490

우석대학교 한의과대학 본초학교실

(TEL : 063-290-1561, FAX : 063-290-1558

E-mail : jys9875@core.woosuk.ac.kr)

丹蔘(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 약용식물로 赤蔘, 紫丹蔘, 大紅袍, 活血根이라고도 불리면서 뿌리가 붉기 때문에 단삼이라고 한다. 뿌리는 특이한 냄새가 나고 약간 쓴맛이 나며 부인의 생리불순·생리통·産後腹痛에 쓰이고, 瘀血性의 心腹部疼痛과 타박상을 치료하며, 불면증·피부 발진 등에 사용한다<sup>3)</sup>.

丹蔘의 주요화합성분으로는 abietane-type diterpenoid 이며, rosmarinic acid, lithospermate B, magnesium lithospermate B 같은 phenol성 화합물과 tanshinone I, tanshinone II 등도 알려져 있다. 밝혀진 생리활성으로는 心臟冠狀血管系血流量 증가, 解熱, 抗菌, 消炎, 抗癌, 腎不全症 개선효과 등이 보고되었다<sup>4,5)</sup>.

본 연구에서는 丹蔘의 함유 성분들이 다양한 약리효능을 나타내는 것을 주목하여, 새로운 항균 활성을 나타내는 항생제 개발차원에서 丹蔘의 에탄올 추출물에 항균효과를 지닌 물질이 함유되어 있는지의 여부를 검토하기로 하였다. 이를 위해 丹蔘의 EtOH 추출물로부터 2종의 tanshinones을 분리하여 이화학적 성상 및 기기분석적 방법으로 구조를 규명하고 항균효과를 검색하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

#### 1) 사용실험재료

본 실험에 사용된 丹蔘은 전주시내 소재 약업사에서 구입한 것을 우석대학교 한의과대학 본초학교실실에서 외부형태를 비교하여 조사하였으며, 표본은 한의과대학 본초학교실에 보관하였다.

#### 2) 시약 및 기기

추출 및 분리에 사용된 시약은 일급 시약을,

column chromatography용 silicagel은 Kieselgel 60 (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silicagel 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 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR은 spectrometer는 Bruker DRX300를 사용하였고, chemical shift는 ppm크기로 하였다. 기준물질로는 CDCl<sub>3</sub>를 사용하였으며, UV lamp는 254 nm 파장에서 확인하였다.

### 실험방법

#### 1) 사용균주

항균력 시험용으로 사용된 균주는 gram 양성균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus pyogenes* ATCC 19615, *Enterococcus faecalis* ATCC 25922을 사용하였고, gram 음성균으로는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43717, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* ATCC 23350, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27963, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Samonella typhimurium* ATCC 14028을 사용하였다.

#### 2) 균주의 배양 및 배지

균주의 배양에 사용된 배지로는 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*는 Brain heart infusion(Difco, USA)를 사용하였고, *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*는 Nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였다. 배지에 균을 이식하여 37℃ 배양기에서 18시간 배양하여 사용하였다.

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

#### 4) 항균물질의 분리

세절된 시료 1.2 kg을 실온에서 80% EtOH로 7일 간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 감압·농축하여 EtOH 엑스 35 g을 얻었다. EtOH 엑스를 증류수에 현탁한 후 분액 여두에 옮겨 CHCl<sub>3</sub>로 분획한 후 CHCl<sub>3</sub>층을 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-CHCl<sub>3</sub> (1:1), CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (9:1), Me<sub>2</sub>CO 그리고 MeOH을 순차적으로 이용하여 6개의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중에 생리활성이 강한 CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (9:1) 용출액에 대하여 recycling preparative-HPLC [컬럼 ; JAIGEL-1H (GPC), 유속 ; 3.5 mL/min., 용매 ; CHCl<sub>3</sub>, 254 nm]를 실시하여 순수물질을 분리하였다.

**Cryptotanshinone** : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 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-16β), 4.90 (1H, t, J=9.3 Hz, H-16α), 7.51 (1H, d, J=8.1 Hz, H-6), 7.65 (1H, d, J=8.1 Hz, H-7). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 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). EIMS : (m/z), 296 [M<sup>+</sup>], 281 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>], 268 [M<sup>+</sup>-CO], 253.

**Dihydratanshinone I** : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 1.44 (3H, d, J=6.6 Hz, H-17), 2.74 (3H, s, H-18), 3.68 (1H, m, H-15α), 4.46 (1H, dd, J=9.3, 6.3 Hz, H-16β), 4.99 (1H, t, J=9.6 Hz, H-16α), 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). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 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-17), 20.2 (C-18). EIMS : (m/z), 278 [M<sup>+</sup>], 250 [M<sup>+</sup>-CO], 235, 178.

## 결과 및 고찰

### 항균활성물질의 구조동정

화합물 1은 황색 침상으로 EIMS에서 분자량이 296임을 확인할 수 있었으며 IR spectrum에서 1713 cm<sup>-1</sup> 와 1621 cm<sup>-1</sup>에서 각각 C=O의 흡수로 추정되는 band가 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 7.51 (1H, d, J=8.1 Hz, H-6)과 δ 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. <sup>13</sup>C-NMR에서 δ 184.3과 δ 175.7에서 2개의 carbonyl carbon signal를 관찰할 수 있으며 그리고 δ 143.7, 132.5, 122.5, 128.5, 126.3, 152.4의 signal들은 aromatic carbon들을 확인할 수 있

었다.  $\delta$  81.5은 oxygenated carbon(CH<sub>2</sub>)을 확인할 수 있다. 이상의 분광학적 결과 및 문헌(6,7)과의 비교에 의해 화합물 1은 cryptotanshinone으로 동정하였다.

화합물 2는 red 침상으로 EIMS에서 분자량이 278임을 확인할 수 있으며 IR spectrum에서 1719 cm<sup>-1</sup>와 1641 cm<sup>-1</sup>에서 각각 C=O의 흡수로 추정되는 band가 관찰되었다. 1H-NMR spectrum에서  $\delta$  7.43 (1H, d, J=6.9 Hz, H-3),  $\delta$  7.60 (1H, dd, J=8.9, 6.9 Hz, H-2),  $\delta$  9.34 (1H, d, J=8.9 Hz, H-1),  $\delta$  7.80 (1H, d, J=8.7 Hz, H-7) 그리고  $\delta$  8.35 (1H, d, J=8.7 Hz, H-6)의 5개의 signal은 aromatic proton으로 coupling constant를 비교해보면  $\delta$  7.80 (1H, d, J=8.7 Hz) 그리고  $\delta$  8.35 (1H, d, J=8.7 Hz)은 ortho-aromatic proton임을 예측할 수 있고  $\delta$  9.34 (1H, d, J=8.9 Hz),  $\delta$  7.60 (1H, dd, J=8.9, 6.9 Hz) 그리고  $\delta$  7.43 (1H, d, J=6.9 Hz)의 3개의 signal은 aromatic proton으로 coupling constant를  $\delta$  7.60 (1H, dd, J=8.9, 6.9 Hz)을 사이에 놓고  $\delta$  9.34 (1H, d, J=8.7 Hz)과  $\delta$  7.43 (1H, d, J=6.9 Hz)의 proton들이 coupling을 하고 있음을 추정할 수 있다. 13C-NMR에서  $\delta$  184.8과 176.2에서 2개의 carbonyl carbon signal이 관찰되었으며 그리고  $\delta$  126.7, 130.8, 128.7, 135.4, 134.1, 133.3, 120.7, 129.3, 125.5, 132.3의 10개의 signal들은 aromatic carbon들을 확인할 수 있었다. 또한  $\delta$  82.0 ppm에서 oxygenated carbon (CH<sub>2</sub>)을 확인할 수 있다. 이상의 분광학적 결과 및 문헌(7,8)과의 비교에 화합물 2은 dihydrotanshinone으로 동정하였다(Fig. 1).

### 항균력

丹蔘의 클로로포름 추출물에서 그람 양성세균인 *S. epidermidis*에 대한 항균력은 MIC가 12.5  $\mu$ g/mL, *S. aureus*와 *S. pyogenes*에 대한 항균력 MIC가 25  $\mu$ g/mL으로 측정되었으며, 또한 *E. faecalis*에 대하여는 MIC가 50  $\mu$ g/mL으로 활성이 낮았다. 다른 그람 음성세균에서는 클로로포름 추출물에 대한 항균력은 MIC가 100  $\mu$ g/mL 이상으로 항균활성이 측정되지 않았다. 이와 같이 클로로포름 추출물에 대하여 항균활성이 확인된 이들의 분획중에 가장 높은 항균력을 나타내는 분획을 recycling preparative-HPLC로 분리한 cryptotanshinone과 dihydrotanshinone I을 실험한 결과 cryptotanshinone은 그람양성세균인 *S. epidermidis*와 *S. pyogenes*에 대한 항균력이 MIC 6.3  $\mu$ g/mL으로 측정되었으며, *S. aureus*에 대한 항균력은 MIC가 12.5  $\mu$ g/mL으로 측정되었다. *E. faecalis*에 대한 MIC가 50  $\mu$ g/mL로서 낮은 항균력을 나타냈으며, 다른 균주에 대해서는 항균활성을 거의 보여 주지 못했다.

Dihydrotanshinone I은 그람양성균인 *S. epidermidis*에 대한 항균력 MIC이 3.1  $\mu$ g/mL로 가장 높았으며, *E. faecalis*에 대한 MIC가 25  $\mu$ g/mL로서 낮은 항균력을 나타냈고, 다른 균주에서는 cryptotanshinone 처럼 항균활성의 MIC 100  $\mu$ g/mL이상으로 항균활성이 측정되지 못했다(Table 1).

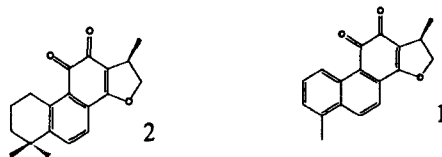


Fig. 1. Structure of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza*.

1. Cryptotanshinone, 2. Dihydrotanshinone I

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

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

<sup>†</sup> Data are average of three experiments.

1. cryptotanshinone; 2. dihydrotanshinone.

Plant extracts: CHSM; Chloroform soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*,

ETSM; Ethanol soluble extract of *Salvia miltiorrhiza*.

## 결론

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, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 Mass에 의해 각각 cryptotanshinone과 dihydrotanshinone I으로 동정하였으며, 이들 화합물은 항균성은 각각 *S. epidermidis*에 대하여 MIC 6.3, 3.1  $\mu\text{g/mL}$  와 *S. pyogenes*의 MIC 6.3  $\mu\text{g/mL}$ 으로 비교적 높은 활성을 나타내어 항생제로서 개발 가능성을 보여주었다.

## 참고문헌

1. 정해영 ; 천연 민간 생약으로부터 항암물질의 분리 동정 및 그 작용기전에 관한 연구-천연물로부터 항암제 개발에 관한 연구보고서, 성균관대학 약학대

학, 서울, 53-88, 1993.

2. Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY ; Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms (in Korean), Korean J Food Sci Technol, 30:957-963, 1998.
3. Kim JK ; Illustrated natural drugs encyclopedia, Namsandang Publishers, Seoul, 160, 1989.
4. Yagi A, Fujimoto K, Tanonaka K, Hirai K, Takeo S ; Possible active components of tan-shen (*Salvia miltiorrhiza*) for protection of the myocardium against ischemia-induced derangements, Planta Medica, 55:51-4, 1989.
5. Okamura N, Sato M, Yagi A ; 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, 58:571-3, 1992.
6. Ikeshiro Y, Mase I, Tomita Y ; Abietane type diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*, Phytochemistry, 28(11):3139-4, 1989.
7. Sato M, Sato T, Ose Y, Nagase H, Kito H, Sakai Y ; Modulating effect of tanshinones on mutagenic activity of Trp-P-1 and benzo[a]pyrene in *Salmonella typhimurium*. Mutation Res, 265:149-54, 1992.
8. Onitsuka M, Fujiu M, Shinma N, Maruyama HB ; New platelet aggregation inhibitors from Tan-Shen ; Radix of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Chem Pharm Bull, 31(5):1670-5, 1983.