

## 고삼에서 항균물질의 분리

김윤경<sup>1)</sup> · 한완수<sup>2)</sup> · 정승일<sup>2)</sup> · 이기남<sup>3)</sup> · 김현주<sup>1)</sup> · 이정호<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>원광대학교 약학대학 한약학과, <sup>2)</sup>목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부,

<sup>3)</sup>원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과

## Isolation of Antimicrobial Active Substances from *Sophorae Radix*

Yun Gyoung Kim,<sup>1)</sup> Wan Soo Han,<sup>2)</sup> Seung Il Jeong,<sup>2)</sup> Ki Nam Lee,<sup>3)</sup>

Hyun Ju Kim<sup>1)</sup> & Jeong Ho Lee<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea.

<sup>2)</sup>Division of Biomedicine & Cosmetics, College of Science and Technology,  
Mokwon University., Daejeon 302-729, Korean

<sup>3)</sup>Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,  
Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea.

### Abstract

Bioassay-directed fractionation of the dried roots of *Sophorae Radix* led to the isolation of Sophoraflavanone G. Their structures were elucidated using <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, UV, IR and mass spectral analyses. These compounds exhibited a moderate antimicrobial activities against *Streptococcus gordonii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*.

---

**Key words** : *Sophorae Radix*, Sophoraflavanone G, antibacterial activity,

---

---

\* Corresponding author : Ki Nam Lee, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea. Tel : 82-11-670-9641. E-Mail : Wooju0717@yahoo.co.kr

## I. 서론

미생물은 인체내에서 피부감염, 골관절염, 폐렴, 식중독 등을 일으키고 있으며 인체의 병원성 미생물을 무력화시키기 위하여 많은 항생제가 개발되어 사용되고 있으나 항생제의 오남용으로 인하여 숙주가 변화되거나, 새로운 균주의 출현, 항생제에 대한 균주의 내성 등으로 인하여 새로운 항생물질의 개발이 초래되고 있다. 식물에는 미생물에 대한 자기방어 수단으로 항균성물질을 함유하고 있다는 연구결과가 발표되고 있다.<sup>1,2)</sup>

고삼은 전국의 산과 들에 자라며 일본, 중국, 대만, 시베리아에 분포되어 있으며, 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본인 도둑놈의지팡이(*Sophora flavescens* Arr)의 뿌리이며, 길이는 5~50cm, 지름 2~3cm로 표면은 황갈색으로 봄과 가을에 캐어 여두와 수근을 제거하고 깨끗이 씻어 건조한 것으로 인삼과 같은 효과가 있다고 하여 고삼이라 한다. 고삼의 성미는 차고 무독하며 강한 쓴맛을 지니고 있어 심장, 간, 위 대장, 방광경에 작용하며, 청열조습, 살충, 이뇨의 효능이 있고, 열리, 변혈, 황달, 노폐, 적백대하, 음중, 음양, 습진, 습창, 피부소양, 개선, 마풍, 진통등을 치료하며, 뿌리로 만든 고약은 트리코모나스 질염, 습진, 신경성 피부염등의 병증을 치료한다. 고삼의 주성분은 alkaloid의 *d*-matrine, *d*-oxymatrine, *d*-sophoranol, *l*-anagyrene, *l*-methylcytisine, *l*-baptifoline, *l*-sophocarpine, flavonoid류의 xanthohumol, isoxanthohumol, 3,4',5-trihydroxy-7-methoxy-8-isopentenyl-flavone, 8-isopentenyl-kaempferol, saponin 등을 함유하고 있다.<sup>3-6)</sup>

본 연구에서는 인체에 부작용이 적은 천연 항균제를 개발하기 위하여 고삼 추출물에서

분리한 Sophoraflavanone G를 기기분석방법으로 물질의 구조를 구명하고 항균력을 측정하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에서 사용한 고삼은 전주시내 소재 약재상에서 구입하여 외부형태를 비교 조사한 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 약학대학 한약학과 방제학교실에 보관되어있다.

### 2. 실험기기

CO<sub>2</sub> incubator(NUAIRE), Deep freezer (Ishin), Nitrogen freezer(MVE, XC34/ 14), Elisa reader(Molecular devices, spectra MAX 340), Microscope(Olimpus, CK2), Micropipette (Gilson), 96 well(Falcon), Conical tube(Falcon), recycling prep-HPLC(JAIGEL W252 column)

### 3. 시약

FBS(Fetal bovin serum), RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, hepes, L-glutamine, nutrient broth(Difco), nutrient agar (Difco), brain heart infusion broth(Difco), brain heart infusion agar(Difco), sabouraud dextrose broth(Difco), sabouraud dextrose agar(Difco), D-PBS(Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS (Hanks' balanced salt solution)등은 Gibco 제품을 사용하였으며, 0.4% Tripan blue solution, dimethylsulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate(SDS) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, 추출용매는 시약급

을 재증류하여 사용하였다.

#### 4. 사용균주

항균력	측정에	사용한	구강균은
<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	ATCC	25175,
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	ATCC	10556,
<i>Streptococcus</i>	<i>sobrinus</i>	ATCC	27607,
<i>Streptococcus</i>	<i>ratti</i>	KCTC	3294,
<i>Streptococcus</i>	<i>criceti</i>	KCTC	3292,
<i>Streptococcus</i>	<i>cniginosus</i>	ATCC	31412,
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	ATCC	10558,
<i>Actinobacillus</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>	ATCC	43717,
<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>	ATCC	10953,
<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>	ATCC	25611,
<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>	ATCC	33277을 사

용하였고, Ampicillin, Gentamicine을 대조균으로 사용하였다.

#### 5. 항균력 측정

각 추출물을 10% DMSO 생리식염수에 용해시킨 후 추출물의 농도를 최고농도 100 µg/ml에서 최저농도 0.01 µg/ml까지 2배 연속희석하였다. 각균주는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고 37°C 배양기에서 18시간(facultative bacteria), 24시간(microaerophilic bacteria), 1~2일(obligate anaerobic bacteria) 동안 배양하여 ELISA reader로 630 nm에서 배제의 탁도를 확인하고, 순수 배양액의 흡광도와 Sophoraflavanone G를 처리한 흡광도를 비교하여 최소억제농도(Minimum inhibitory concentrations, MICs)로 결정하였으며, essential oil을 처리하여 최소살균농도(Minimum bactericidal concentrations, MBCs)를 측정하였으며, MICs와 MBCs의 농도를 측정하기 위한 대조균은 ampicillin과 gentamicine를 사용하였다.

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 항균물질의 분리

건조된 고삼 1.2 kg을 MeOH 10ℓ에 7일 동안 실온에서 추출하였다. 추출액을 감압농축한 후 그 중 일부를 증류수에 현탁시키고 동량의 용매의 극성에 따라 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 각각 용매 분획하였다. 이 중에서 에틸아세테이트 분획물(6.3g)을 silica gel이 충전된 컬럼(Merck Kieselgel 60; 0.063-0.04 mm particle size; 3×50cm)에서 CHCl<sub>3</sub>-MeOH {9:1(700ml), 8:2(500ml), 7:3(300ml), 1:1(500ml)}의 혼합용매를 이용하여 50ml씩 87개로 분획한 후 TLC로 같은 균으로 분리하여 6개의 fraction을 얻었다. 이 중 Fr 3(1.4g)을 다시 silica gel과 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(8:2 → 1:1) 용매 조건으로 컬럼 크로마토를 실시하여 5개의 소분획물을 얻었으며, 소분획(275mg)을 재분리하기 위해 recycling prep-HPLC(JAIGEL W252 column)에 용매 MeOH, 유속 3.5 ml/min, UV Detector 254nm로 분리하였다

#### 2. Sophoraflavanone G의 분리 및 구조동정

Pale yellow 침상으로 얻은 화합물의 mp는 173-175 °C. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 1.58, 1.57, 1.65에서 3개의 methyl과 δ 2.06~3.33 (5H, m), 4.56(2H, brs) 및 5.00 등의 signal들로 보아 하나의 lavanduly group을 확인할 수 있었다. 또한 δ 6.47(1H, dd, J=8.1, 2.2Hz, H-5'), 6.49(1H, d, J=2.2 Hz, H-3') 및 7.40 (1H, d, J=8.1Hz, H-6')들의 signal은 aromatic ring에 ABC type으로 서로 coupling 되어 있는 수소들이다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 δ199.2

(C-4)에서  $\alpha$ ,  $\beta$  불포화 탄소와  $\delta$  166.6~156.8에서 aromatic ring에 산소가 결합된 5개의 signal 들이 관찰되었다. 이상의 결과에 문헌 등을 비교한 결과 화합물 5,7,2',4'-tetrahydroxy flavanone 즉, Sophoraflavanone G로 동정하였다.<sup>7-9)</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD);  $\delta$  1.58 (3H, s, H-10''), 1.57 (3H, s, H-7''), 1.65 (3H, s, H-10''), 2.06 (2H, m, H-3''), 2.53 (2H, m, H-2''), 2.62 (2H, m, H-1''), 2.75 (1H, dd, J=17.2, 2.9 Hz, H<sub>a</sub>-3), 3.06 (1H, dd, J=17.2, 13.2 Hz, H<sub>b</sub>-3), 4.54 (1H, s, H<sub>a</sub>-9''), 4.58 (1H, s, H<sub>b</sub>-9''), 5.00 (1H, m, H-4''), 5.66 (1H, d, J=12.9 Hz, H-2), 6.02 (1H, s, H-6), 6.47 (1H, dd, J=8.1, 2.2 Hz, H-5'), 6.49 (1H, d, J=2.2 Hz, H-3'), 7.40 (1H, d, J=8.1 Hz, H-6'), 12.18 (1H, s, C<sub>5</sub>-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD);  $\delta$  17.9 (C-2), 43.3 (C-3), 199.2 (C-4), 163.3 (C-5), 96.4 (C-6), 166.6 (C-7), 108.7 (C-8), 162.8 (C-9), 103.4 (C-10), 118.5 (C-1'), 156.8 (C-2'), 103.5 (C-3'), 159.7 (C-4'), 107.9 (C-5'), 128.9 (C-6'), 28.1 (C-1''), 49.2 (C-2''), 32.5 (C-3''), 124.9 (C-4''), 132.2 (C-5''), 26.0 (C-6''), 17.9 (C-7''), 149.9 (C-8''), 111.3 (C-9''), 19.3 (C-10'').

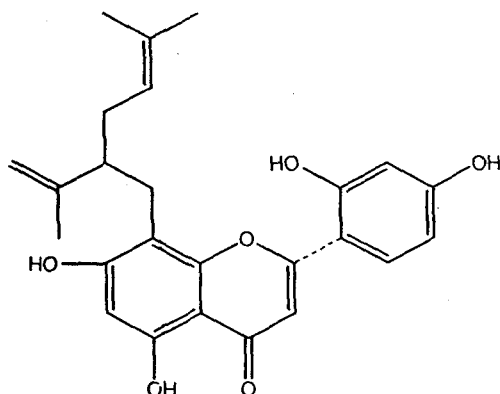


Fig 1. Structure of Sophoraflavanone G

### 3. Sophoraflavanone G의 항균효과

고삼에서 분리한 Sophoraflavanone G를 이용하여 항균력을 측정된 결과 *P. gingivalis*에서 MICs가 0.39  $\mu$ g/ml, 대조균인 ampicillin은 0.5  $\mu$ g/ml, gentamicine은 256  $\mu$ g/ml의 항균력이 측정되어 대조균보다 높은 항균력이 나타났다. *S. sobrinus*와 *S. gordonii*, *A. actinomycetemcomitans*에서 MICs 0.78  $\mu$ g/ml와 *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. ratti*, *S. criceti*, *S. anginosus*, *F. nucleatum*에서 MICs 1.56  $\mu$ g/ml으로 나타나 대조균인 Ampicillin Gentamicine 보다 높은 항균력이 나타났다.<sup>10-13)</sup> 항세균력은 *S. gordonii*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*에서 MBCs가 0.78  $\mu$ g/ml와 *S. sobrinus*, *F. nucleatum*에서는 MBCs가 1.56  $\mu$ g/ml으로 대조균인 ampicillin은 0.5  $\mu$ g/ml, gentamicine (MBCs 0.25~64.0  $\mu$ g/ml)보다 높은 항세균력이 나타났다. 반면 *P. intermedia*은 대조균인 gentamicine(MBCs 1.0  $\mu$ g/ml) 보다 낮은 항세균력(MBCs 12.5  $\mu$ g/ml)이 나타났다.<sup>11-14)</sup> 지금까지 보고된 천연 항균성 물질인 benzoic acid, salicylic acid, liquiritigenin, isorhamnetin 등과 고삼에서 분리한 kushenol, 가자나무에서 분리한 tannin류, 홍경천에서 분리한 gallic acid, kaempferol, 녹차에서 분리한 catechin류 보다 높은 항균력이 나타났다.<sup>5,12-16)</sup>

### IV. 결 론

고삼 메탄을 추출물을 이용하여 silica gel column chromatography와 recycling preparative-HPLC 등을 실시하여 화합물을 분리하여 이화학적 성상과 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR의 spectra data를 이용하여 화합물 Sophoraflavanone G를 동정하였다. 화합물 Sophorafla-

vanone G의 항균력을 측정한 결과 *P. gingivalis*에서 MICs가 0.39  $\mu\text{g/ml}$ , *S. sobrinus*와 *S. gordonii*, *A. actinomycetemcomitans*에서 0.78  $\mu\text{g/ml}$ 의 MICs가 나타났으며, *S. gordonii*,

*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*에서 MBCs가 0.78  $\mu\text{g/ml}$ 의 항세균력을 나타내어 천연항생제로서 개발 가능성을 나타냈다.

Table 1. Minimum inhibitory concentrations(MICs,  $\mu\text{g/ml}$ ) of Sophoraflavanone G for some oral bacteria.

Strains	Sophoraflavanone G	Ampicillin	Gentamicine
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	1.56	4	8
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	1.56	32	8
<i>S. sobrinus</i> ATCC 27607	0.78	2	4
<i>S. ratti</i> KCTC 3294	1.56	4	4
<i>S. criceti</i> KCTC 3292	1.56	4	8
<i>S. anginosus</i> ATCC 31412	1.56	4	16
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	0.78	1	2
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	0.78	64	2
<i>F. nucleatum</i> ATCC 10953	1.56	0.25	16
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	6.25	32	0.5
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	0.39	0.5	256

Table 2. Minimum bactericidal concentrations (MBCs,  $\mu\text{g/ml}$ ) of Sophoraflavanone G for some oral bacteria.

Strains	Sophoraflavanone G	Ampicillin	Gentamicine
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	3.125	4	8
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	3.125	32	16
<i>S. sobrinus</i> ATCC 27607	1.56	2	8
<i>S. ratti</i> KCTC 3294	3.125	4	8
<i>S. criceti</i> KCTC 3292	3.125	4	8
<i>S. anginosus</i> ATCC 31412	3.125	4	16
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	0.78	2	4
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	0.78	64	2
<i>F. nucleatum</i> ATCC 10953	1.56	0.25	32
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	12.5	32	1
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	0.78	1	512

### 참고문헌

1. Han, W. S. : Isolation of antimicrobial compounds from *Salvia miltiorrhiza bunge*. Korean J. Medicinal Crop Sci, 2004 ; 12(3) ; 179-182.
2. Oh, D. H., Han, S. S., Park, B. K., Ahn, C., Yu, J. Y. : Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease micro-organisms(in korean). Korean J. Food Sci, Technol. 1998 ; 30(4) ; 957-963
3. Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kwon, G. S., Kang, S. S. : Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica schneider*, *Broussonetia papyrifera*(L.) vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. 2004 ; 11 ; 666-672.
4. Yoshikawa, M., Wang, H. K., Taniyama, T. : Saponin and saponin XI, structure of *Sophora flavoside* I, a bisdemolide of *Soyasapogenol* B, from *Sophora ridea*, the root of *Sophora flavescens* Aiton. Chem Pharm Bull. 1985 ; 33 ; 4267-4274.
5. Ahn, E. Y., Shin, D. H., Baek, N. I., Oh, J. A. : Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescens* Ait. Korean J. Food Sci, Technol. 1988 ; 30(3) ; 672-679.
6. Woo, E. R., Kwak, J. H., Kim, H. J., Park, H. K. : A new prenylated flavonol from the roots of *Sophora flavescens*. J. Nat. Prod. 1998 ; 61 ; 1552-1554.
7. Manki, K., Frank A. L. : Two flavanones in *Sophora leachiano* and some related structures, *Phytochemistry*, 1990 ; 29(8) ; 2667-2669.
8. Kim, D. W., Chi, Y. S., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, H. P. : Effects of *Sophoraflavanone* G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and in vivo inflammatory response. 2002 ; 25(3) ; 329-335.
9. Kim, S. J., Son, K. H., Chang, H. w., Kang, S. S., Kim, H. P. : Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*, *Biol. Pharm. Bull.* 2003 ; 26(9) ; 1348-1350.
10. Lee, B. W., Kang, N. S., Park, K. H. : Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 2004 ; 47(2) ; 270-273.
11. Park, C. S., Kwon, C. J., Choi, M. A., Park, G. S., Choi, K. H. : Antibacterial activities of *Cordyceps* Spp., and *Mugwort* and *Pine needle* extracts. Korean J. Food Preservation. 2002 ; 9(1) ; 102-108.
12. Koh, M. S. : Antimicrobial activity of *Saururus chinensis* Baill extract. J. Korean Soc Food Sci. Nutr. 2004 ; 33(7) ; 1098-1105.
13. Lee, J. Y., Min, Y. K., Kim, H. Y. : Isolation of antimicrobial substance from *Schizandra chinensis* Baillon and antimicrobial effect. Korean J. Food Food Sci. Nutr. 2001 ; 33(2) ; 389-394.
14. Shin, C. J., Lee, G. H., Jung, J. H., Yi, S. D., Kim, Y. H., Oh, M. J. : Isolation and

- identification of antimicrobial active substances from *Rhodiola sachinensis*. Korean J. Food Preservation. 2004 ; 11(1) ; 63-70.
15. Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I., Michel, G. : Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Med.* 1996 ; 62 ; 275-277