

독활로부터 분리한 continentalic acid의 항치아우식 활성

유현희 · 정승일¹ · 정수영¹ · 문해닮아¹ · 황지영¹ · 정한솔² · 유용욱^{1*}

군산대학교 식품영양학과, 1:원광대학교 치과대학 구강생화학교실, 2:우석대학교 한의과대학 병리학교실

Continentalic acid, isolated from *Aralia continentalis*, inhibits cariogenic properties

Hyeon Hee Yu, Seung Il Jeong¹, Su Young Jung¹, Hae Dalma Moon¹, Ji Young Hwang¹, Han Sol Jeong², Yong Ouk You^{1*}

Department of Food and Nutrition, Kunsan National University,

1:Department of Oral Biochemistry and VCRC, School of Dentistry, Wonkwang University,

2:Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University

In the present study, we investigated the anticariogenic compounds from *Aralia continentalis* (*A. continentalis*) has been isolated and identified by MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The MeOH extract was suspended in H₂O and sequentially partitioned with CHCl₃, EtOAc, and n-BuOH. The CHCl₃ fraction showed remarkable antibacterial activity against *S. mutans*. The antibacterial activity compounds against *S. mutans* by MIC was isolated successively through the screening system and various chromatography methods. From this active chloroform subfraction, isolation and identification finally gave continentalic acid by spectroscopic methods (MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR) as an active principle. The compound, continentalic acid, showed significant growth, acid production, adhesion and water-insoluble glucan synthesis inhibitory effect against *S. mutans*. These results suggest that continentalic acid from *A. continentalis* may inhibit cariogenic properties of *S. mutans* and these properties may provide some scientific rationales that the local inhabitants used the extracts for treatment of dental diseases.

Key words : *Aralia continentalis*, continentalic acid, dental caries, *Streptococcus mutans*

서 론

한국인의 평균수명은 1973년에 63세였으며 1983년에 67세, 1993년 73세였다가 2003년에는 77세였다¹⁾. 그러나, 건강수명은 2001년 66세로서 실제로 전 생애의 약 10%를 질병과 장애 가운데에서 살고 있으며, OECD국가들의 평균건강수명이 70.2세²⁾인 것을 생각할 때, 우리나라는 최하위 수준이다. 건강수명을 연장하기 위해서는 구강건강이 필수적인데, 한국인 영구치 발거 원인 1위가 치아우식증으로 치아우식증은 한국인의 구강건강을 악화시키는 중대구강병으로 지적되고 있다³⁾. 우리나라 12세 아동의 우식경험영구치수가 1972년에 0.6개⁴⁾이었고, 1979년에는 2.2개 (도시 2.5개^{5,6)}, 비도시 1.7개⁷⁾)이었으며, 1990년에는 3.0개 (도시

2.9개, 비도시 3.3개⁸⁾)이었고, 1995년에는 3.1개 (도시 3.0개, 비도시 3.6개⁹⁾)이었고, 2003년에는 3.25개 (대도시 3.41개, 중소도시 3.32개, 농어촌 2.57개¹⁰⁾)로 1972년에 비해 5-6배나 증가하였다.

치아우식증은 치은연상 및 치은연하 치면세균막에 의하여 주로 유발되는데, 치면세균막에는 많은 함량의 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다. 치면세균막내 미생물 중 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치면세균막형성에 가장 중요한 역할을 하는 원인균으로 알려져 있으며, *S. mutans*는 치아우식을 일으키는 주요 원인균으로 주목받고 있다¹¹⁾. *S. mutans*는 치면세균막에 상주하며 당질을 대사하여 유기산 주로 젖산을 방출함으로써 치아법랑질을 탈회시킬 뿐만 아니라 치아의 경조직을 파괴하고, 미생물에 대한 인체의 염증 반응은 치주병을 유발하는 것^{11,12)}으로 보고된 바 있다.

선행 연구에 의하면 황련, 황백이 *S. mutans*의 성장과 산성을 억제하였으며^{13,14)}, 으름덩굴과 황연과 후박 및 구연산 혼합

* 교신저자 : 유용욱, 의산시 신용동 344-2, 원광대학교 치과대학

· E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6926

· 접수 : 2006/03/30 · 수정 : 2006/05/08 · 채택 : 2006/06/14

제재물은 *S. mutans*, *S. rattus*, *S. sobrinus*, *S. gordonii*의 성장을 억제하며, saliva-coated hydroxyapatite bead에 대한 부착을 감소시키는 것^{15,16}으로 알려져 있고, 광성이모자반¹⁷, camomile, sage oil, rhatany, 및 myrrh도 *S. mutans*에 대한 항균작용이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁸⁻²⁰. 차의 잎에서 추출한 polyphenol은 *S. mutans*에 의한 비수용성 글루칸 합성을 억제하고²¹, 우롱차잎의 추출물은 수용성 글루칸을 합성하는 *S. mutans*의 cell-free GTFase와 비수용성 글루칸을 합성하는 *S. sobrinus*의 GTFase-I의 활성을 억제하고²², propolis용액은 *S. mutans*와 구강에서 분리한 다른 세균에 대해 항균효과를 나타내어²³ 치아우식을 억제한다고 연구되고 있다. 그러나 아직까지 이들 천연물의 어떤 특정 물질이 이러한 효과가 있는지에 대한 연구는 미비하다.

독활 (*Aralia continentalis* KITAGAWA)은 동의보감에 치통, 치주병 및 치은염의 치료에 사용한다고 기록되어 있으며^{24,25} 본 연구실에서 독활의 메탄올 추출물이 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, S-HA에 대한 부착억제와 비수용성 글루칸 합성 억제를 관찰하여²⁶ 보고한바 있다. 따라서 본 연구에서는 독활의 메탄올 추출물로부터 *S. mutans*의 성장을 억제하는 활성물질, continentalic acid를 분리하여 이들의 화학구조를 규명하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 활성물질의 분리

1) 독활 메탄올 추출물과 분획

독활은 익산시 대학한약국에서 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 건조하여 세밀한 독활 5 kg을 MeOH에 침지하여 상온에서 7일간 3회 추출하였다. 추출용액은 Whatman No. 2 여과지로 여과한 다음 38-45°C에서 감압농축하여 MeOH 추출물을 481.7 g (9.6%)을 얻었다. 그 후 MeOH 추출물을 250 g을 증류수에 혼탁시켜 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 순으로 분획 후 농축하여 CHCl₃ 분획물 (65 g), EtOAc 분획물 (9 g), n-BuOH (75 g) 및 H₂O 분획물 (120 g)을 얻었다. 이 중 가장 강한 활성을 갖는 CHCl₃ 분획 (60 g)을 취하여 활성물질 분리를 실시하였다(Fig. 1).

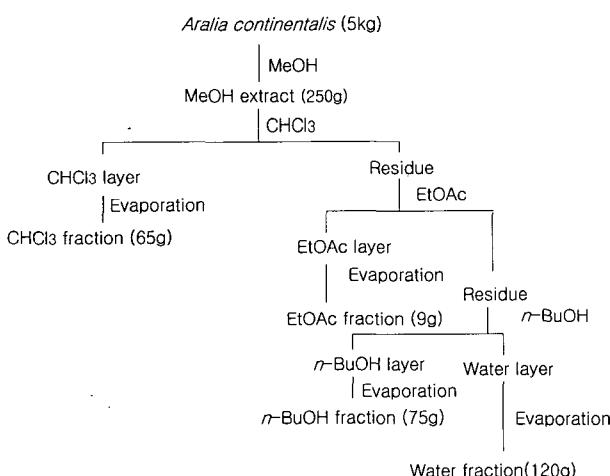


Fig. 1. Solvent fractionation flow chart of *A. continentalis*.

2) 활성물질의 분리 및 정제

가장 활성이 높은 CHCl₃ 분획을 선택하여 silica gel (230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, 200 g, 3×80 cm)이 충진된 컬럼에 넣어 n-hexane-EtOAc (9:1 (1 L), 5:1 (0.5 L), 2:1 (0.5 L), 1:1 (0.5 L))용매계로 단계적으로 극성을 높여 용출시켜 84 fraction과 EtOAc 100%로 용출시킨 10 fraction을 얻었다. 이때 각 분획을 TLC를 시행한 후 TLC의 양상에 따라 7개 분획으로 나누고 항균 활성을 측정한 후, 가장 항균활성이 큰 소분획 2에 대하여 preparative HPLC (1H column, 용매 CHCl₃, 유속 3 ml/min, 254 nm)를 시행하여 백색 침상의 화합물을 얻었다(Fig. 2).

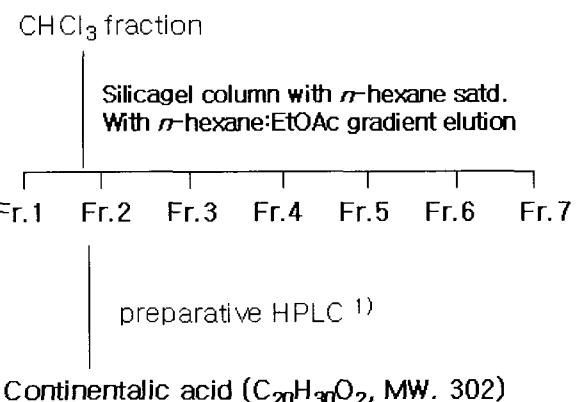


Fig. 2. Isolated procedure of continentalic acid from *A. continentalis*.

¹⁾ Column:JAIGEL-W253, Solvent: CHCl₃, Flow rate:3ml/min, Detector:UV(254 nm)

Continentalic acid (=(-)-Pimara-8(14),15-dien-19-oic acid): Colorless needle (hexane); mp: 166-167° [α]_D²⁰ -120°(c 0.8, CHCl₃); ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ: 5.72 (1H, dd, J=17.5, 10.5 Hz, H-15), 5.17 (1H, s, H-14), 4.96 (1H, dd, J=5.2, 1.5Hz, H-16 β), 4.90 (1H, dd, J=10.5, 1.5Hz, H-16), 1.29 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-17), 0.67 (3H, s, H-20). ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) δ 184.6 (C-19), 147.4 (C-15), 138.1 (C-8), 128.2 (C-14), 113.1 (C-16), 56.3 (C-9), 50.8 (C-5), 44.3 (C-4), 39.4 (C-13), 38.7 (C-10), 38.2 (C-1), 36.6 (C-3), 36.0 (C-7), 31.8 (C-12), 29.6 (C-218), 29.4 (C-17), 24.3 (C-6), 19.8 (C-11), 19.4 (C-2), 14.0 (C-18).

3) 기기분석

Continentalic acid의 분자 구조 해석을 위해 사용된 ESI mass 스펙스럼은 Macro Mass Quattro LC를 사용하였으며, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR의 스펙스럼은 Bruker사 (Germany) AVANCE 300과 500 MHz의 것을 사용하였다.

2. 항치아우식 실험

1) 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *Streptococcus mutans* ATCC 25175로 Brain heart infusion (BHI, Difco, USA) 액체배지에 1-2차 계대배양 후 같은 배지에 식균하여 37°C의 항온기에서 24시간 배양하여 사용하였다.

2) *S. mutans*의 성장과 산생성 억제 실험

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 시료를 첨가한 후 균을 1×10^8 CFU/ml이 되게 접종하였다. 37°C의 항온기에서 24시간 배양한 후 BHI 액체배지를 기준으로 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, pH meter (ORIONSA 720, U.S.A.)를 이용하여 pH를 측정하여 산 생성 억제 효과를 관찰하였다. 대조군은 시료를 넣지 않고 시행하였다.

3) 타액준비

타액은 건강한 성인 남자로부터 파라핀왁스로 자극하여 분비된 것을 냉각된 비이커에 채취한 다음, 채취된 타액은 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 15분)하여 상청액을 취한 다음, 분해효소를 불활성화시키기 위하여 60°C에서 30분간 처리한 후, -20°C에 보관하면서 사용하였다.

4) 타액으로 도말된 hydroxyapatite bead (S-HA)에 부착 억제 실험

Hydroxyapatite beads (Bio-Rad Lab., U.S.A.) 30 mg을 증류수로 5회 세척하여 작은 입자를 제거한 후 37°C에서 건조시켜 사용하였다. 건조된 hydroxyapatite bead 30 mg을 1 ml의 타액으로 37°C에서 60분간 처리하여 타액을 bead에 코팅시켰다. 그 후 S-HA를 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0)로 3회 세척한 후 continentalic acid를 각각의 농도별로 넣고, *S. mutans*를 1×10^7 CFU/ml이 되게 넣은 다음 37°C의 흔들리는 배양기에 서 90분 동안 S-HA에 부착시켰다. 그 후 0.1 M KPB (pH 7.0)로 3회 세척한 후 초음파 장치 (50W, 30초)를 이용해 S-HA에 부착된 균을 떨어지도록 하였다. 그 다음 균액을 희석하여 *Mitis salivarius* agar plate (Difco Laboratories, U.S.A.)에 도말하여 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양시켜 집락수를 세었다. 대조군은 continentalic acid를 넣지 않고 시행하였다.

5) Glucosyltransferases (GTFase)의 준비

다음과 같은 방법으로 GTFase를 얻는다. *S. mutans*를 BHI 액체배지 2 L에 배양한 후, 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20분)하여 상청액을 취한 후 60~70% ammonium sulfate를 넣은 후 다시 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20분)하여 단백질을 가리앉혔다. 이 단백질에 0.1 M KPB (pH 6.0)을 4시간마다 바꾸어주며, 4°C에서 24시간 동안 투석시킨 후 냉동보관 (-80 °C)하였다가 사용하였다.

6) GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제능 검사

0.04% sodium azide를 첨가한 0.4 M KPB (pH 6.0)을 0.25 ml 취하여, 0.25 ml의 0.4 M 자당용액, 0.25 ml의 각 농도별 continentalic acid를 넣고, GTFase를 넣어 최종 1 ml이 되게 하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 증류수로 세척한 후 글루칸을 떼어내기 위하여 초음파장치 (40W, 4초)를 이용하였다. 그 후 5% phenol을 1 ml, 진한 H₂SO₄를 5 ml 넣어준 후 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 continentalic acid를 넣지 않은 군을 대조군으로 하였다.

3. 통계처리

실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험

군)/대조군]×100의 식을 이용하여 계산하였다. 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여 평균과 표준편차로 제시하였으며, $\alpha=0.05$ 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 independent sample t-test로 유의성을 검증하였다.

결과

1. 구조동정

Column chromatography와 prep-HPLC로 분리한 화합물은 mp가 166-167°C인 무색 침상으로 질량분석기에서 얻은 ESI-MS spectrum은 [M-H]⁺ m/z 301로 분자량이 302임을 알 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 0.67, 1.02 및 1.29에서 3개의 signal은 tertiary methyl기 들이며, δ 4.96과 4.90의 signal들은 vinyl group (ABC type으로 짹지음 상수 JAB=10.5Hz, JAC=17.5Hz 및 JBC=2Hz)이고, δ 5.17의 signal은 allylic proton을 확인 할 수 있다. ¹³C-NMR spectrum에서 δ 184.6의 carbonyl carbon signal이 관찰 되었으며, 이상과 같은 결과들로부터 compound를 (-)-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid의 구조를 갖는 continentalic acid로 확인하였다(Table 1, Fig. 3).

Table 1. ¹H and ¹³C NMR data for continentalic acid

Position	¹ H-NMR ¹⁾	¹³ C-NMR ²⁾	HMBC ²⁾
1	1.06(2H, m)	39.45	C-2, C-3
2	1.55(2H, m)	19.8	C-1, C-3
3	2.19(2H, m)	38.1	C-2, C-5,C-19
4	-	44.4	-
5	1.30(1H, m)	56.3	C.4, C-6, C-19
6	1.84(2H, m)	24.3	C-5, C-7, C-8
7	1.55(2H, m)	36.0	C-6, C-8, C-14
8	-	138.1	-
9	1.71(1H, m)	50.7	C-8, C-11, C-14, C-20
10	-	38.7	-
11	1.82(2H, m)	19.4	C-9, C-12
12	2.00(2H, m)	36.6	C-12, C-14, C-17
13	-	39.42	-
14	5.15(1H, s)	128.2	C-7,C-8,C-9, C-12, C-13
15	5.72(1H, dd, J=17.5, 10.5Hz)	147.3	C-12, C-13,C-14,C-16, C-17
16	4.96(1H,dd,J=5.2, 2.1Hz) 4.91(1H,dd,J=10.5, 2.1Hz)	113.0	C-13, C-15
17	1.02(3H, s)	29.9	C-12, C-13, C-14, C-15
18	-	184.6	-
19	1.29(3H, s)	29.5	C-3, C-4, C-5
20	0.67(3H, s)	14.0	C-1, C-9

Coupling constant values (in parentheses) are in Hz. ¹H-NMR spectra data for compound (600MHz, CDCl₃). ²¹³C-NMR and HMBC spectra data for compound (125MHz, CDCl₃)

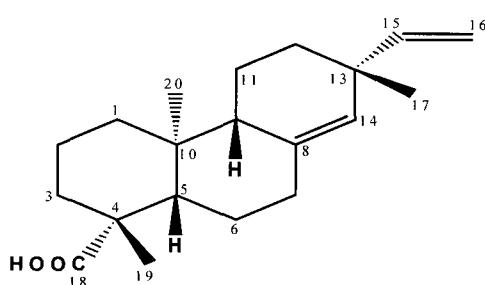


Fig. 3. Chemical structure of continentalic acid.

2. 독활 분획별의 *S. mutans* 성장억제에 미치는 효과

독활의 분획별 즉, 독활의 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 및 물총의 농도별 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 시료를 각각 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 MIC를 측정한 결과 CHCl₃ 분획이 *S. mutans*에 대한 MIC가 0.25 mg/ml 이하였다(Table 2).

Table 2. Antibacterial activity (MIC) of extracts from *A. continentalis* against *S. mutans*

Strain	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)				
	MeOH extract	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction	n-BuOH fraction	H ₂ O fraction
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<0.25	<0.25	>2	>2	>2

3. Continentalic acid의 *S. mutans* 성장억제에 미치는 효과

Continentalic acid의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 continentalic acid를 각각 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Continentalic acid를 넣지 않은 대조군에서 0.183±0.004 흡광도를 나타내었다. 그런데, 0.25 µg/ml 농도에서 0.117±0.005 흡광도를 나타내고, 0.5 µg/ml 농도에서는 0.111±0.006, 1 µg/ml 농도에서는 0.092±0.010, 2 µg/ml 에서는 0.034±0.003, 4 µg/ml 에서는 0.013±0.005를 나타내어, 0.25 µg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($p<0.05$). 대조군에 비하여 각각 36%, 40%, 50%, 81%, 93%의 성장억제 효과를 나타내었다.

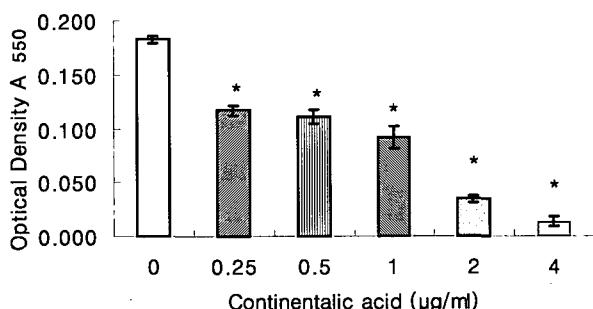


Fig. 4. The optical density of *Streptococcus mutans* by various concentrations of continentalic acid. The optical density of A₅₅₀ were read by a spectrophotometer. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

4. Continentalic acid의 *S. mutans* 산 생성 억제에 미치는 효과

Continentalic acid 첨가에 따른 *S. mutans*에 의한 유기산 생성 억제 효과를 알아보기 위해 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml 농도의 시료에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양 후에 pH meter로 pH를 측정한 결과는 Table 3과 같다. Continentalic acid를 넣지 않은

대조군에서 pH는 5.32±0.36을 나타내었다. Continentalic acid는 0.25 µg/ml 농도에서 5.89±0.19, 0.5 µg/ml 농도에서는 5.93±0.33, 1 µg/ml 농도에서는 5.97±0.11, 2 µg/ml 농도에서는 6.58±0.48, 4 µg/ml 농도에서는 7.64±0.10로, 1 µg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($p<0.05$).

Table 3. The pH of *Streptococcus mutans* by the various concentrations of continentalic acid

Conc.(µg/ml)	
Control	5.32±0.36 ^b
0.25	5.89±0.19
0.5	5.93±0.33
1	5.97±0.11*
2	6.58±0.48*
4	7.64±0.10*

^b Value represent the Mean±SD obtained from triplicate experiment. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group

5. Continentalic acid의 S-HA 부착 억제에 미치는 효과

Continentalic acid가 S-HA에 *S. mutans* 부착 억제 효과가 있는지 알아본 결과(Fig. 5) 대조군은 133.33±7.64 ($\times 10^4$) CFU/ml 이었으며, continentalic acid 0.25 µg/ml 농도에서는 92.33±8.74 ($\times 10^4$) CFU/ml, 0.5 µg/ml 농도에서는 70.67±6.03 ($\times 10^4$) CFU/ml, 1 µg/ml 농도에서는 60.33±2.52 ($\times 10^4$) CFU/ml, 2 µg/ml 농도에서는 53.00±4.58 ($\times 10^4$) CFU/ml, 4 µg/ml 농도에서 39.00±6.08 ($\times 10^4$) CFU/ml로 대조군에 비하여 부착하는 균수가 유의하게 적어졌으며 ($p<0.05$), 대조군에 비해 각각 31%, 47%, 55%, 60%, 71%의 부착억제율을 보였다.

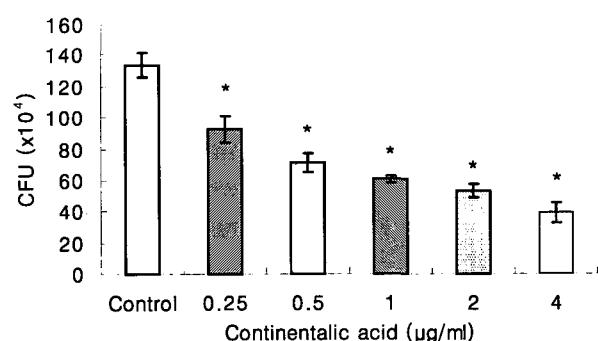


Fig. 5. The colony forming unit (CFU) of *Streptococcus mutans* to the 30 mg saliva-coated hydroxyapatite beads by various concentrations of continentalic acid. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

6. Continentalic acid의 GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 효과

Continentalic acid가 비수용성 글루칸 합성 저해 효과가 있는지 알아본 결과는 Fig. 6과 같다. Continentalic acid는 대조군에 비해 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml 각각의 농도에서 22.33±5.51%, 13.00±3.61%, 7.33±2.08%, 3.33±1.53%, 1.67±0.58%의 생성율을 보

여, 대조군 보다 모두 유의하게 적었다 ($p<0.05$).

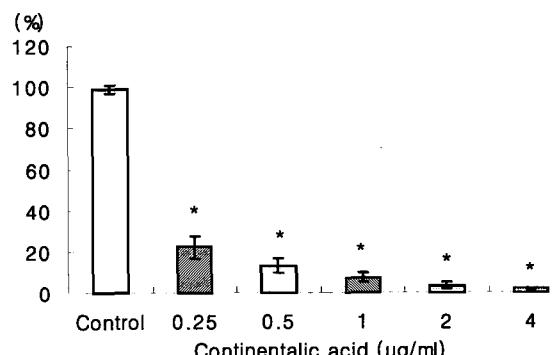


Fig. 6. Rate of loss insoluble glucan of *Streptococcus mutans* by the various concentrations of continentalic acid. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

고 찰

본 연구에서는 독활로부터 항치아우식 활성 물질을 분리하고자 독활을 메탄올로 추출하고 추출물에 대한 계통 분획을 실시하였다. CHCl_3 , EtOAc , $n\text{-BuOH}$ 및 H_2O 의 4가지 분획으로 나누어 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 측정한 결과 CHCl_3 분획이 *S. mutans*에 대한 MIC가 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이하로 항균 활성이 가장 높았다. 이에 CHCl_3 분획물을 silica gel column chromatography를 시행하였는데 $n\text{-hexane-EtOAc}$ 의 용매 조건을 점차적으로 변경하면서 소분획으로 나누고 항균 활성이 가장 높은 분획에서 recycling preparative HPLC를 이용하여 항균 활성이 높은 단일 화합물을 획득하였다. 이 단일 화합물에 대한 구조 해석을 기기분석 (MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)을 통해서 진행한 결과 continentalic acid로 최종 동정하였다.

Continentalic acid 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별 시료에 대한 *S. mutans*에 대한 성장억제 효과를 관찰한 결과 *S. mutans*의 성장률이 대조군에 비해 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서도 모두 유의적인 성장억제 효과를 나타내었다. 특히 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 50% 이상의 높은 성장억제 효과를 나타내었다. 그리고 산생성 억제 실험에서도 continentalic acid를 넣지 않은 대조군에서는 5.32 ± 0.36 을 나타내었으나 continentalic acid는 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 5.89 ± 0.19 , 5.93 ± 0.33 , 5.97 ± 0.11 , 6.58 ± 0.48 , 7.64 ± 0.10 을 나타내어 *S. mutans*에 의한 유기산 생성을 억제하였음을 보여주었다.

각 농도별 continentalic acid가 치아표면의 세균 부착을 억제하는지 알아보기 위해 S-HA에 대한 부착 억제 효과를 확인한 결과 대조군에서는 133.33 ± 7.64 ($\times10^4$) CFU/ml이 부착한 반면, 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 각각의 농도에서는 92.33 ± 8.74 ($\times10^4$) CFU/ml, 70.67 ± 6.03 ($\times10^4$) CFU/ml, 60.33 ± 2.52 ($\times10^4$) CFU/ml, 53.00 ± 4.58 ($\times10^4$) CFU/ml, 39.00 ± 6.08 ($\times10^4$) CFU/ml의 부착을 보여, 대조군에 비해 각각 31%, 47%, 55%, 60%, 71%의 부착 억제율을 보였다. 그리고 비수용성 글루칸 합성 실험을 한 결과를

보면 continentalic acid는 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 각각 22.33 ± 5.51 %, 13.00 ± 3.61 %, 7.33 ± 2.08 %, 3.33 ± 1.53 %, 1.67 ± 0.58 %의 생성율을 보여, 대조군 보다 모두 유의하게 적었다 ($p<0.05$).

이상의 결과를 종합해 보면, 독활로부터 분리한 continentalic acid는 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서도 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, S-HA에 대한 부착억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 탁월함을 알 수 있었다. 이에, continentalic acid의 의학적, 산업적으로 유용한 소재로의 연구와 독활의 다른 구성성분의 항치아우식 효과에 대해서 순수정제 과정을 거쳐 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

독활에서 항치아우식 활성 물질을 분리하기 위해 독활을 메탄올로 추출하고 계통분획을 실시하여 하여 CHCl_3 , EtOAc , $n\text{-BuOH}$ 및 H_2O 의 4가지 분획으로 나누어 항균 활성을 측정한 결과 CHCl_3 분획의 활성이 가장 높아 silica gel column chromatography, recycling preparative HPLC를 이용한 결과 단일 화합물을 얻었다. 이 화합물에 대한 구조 해석을 기기분석 (MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)을 통해 continentalic acid로 동정하였다. Continentalic acid에 대한 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, S-HA에 대한 부착억제와 비수용성 글루칸 합성 억제를 측정하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

*S. mutans*의 성장억제율이 continentalic acid를 넣지 않은 대조군에 비해 continentalic acid는 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 각각 36%, 40%, 50%, 81%, 93%로 매우 뛰어난 성장억제 효과를 나타내었다.

*S. mutans*의 산 생성량은 대조군에서 pH는 5.32 ± 0.36 이었고, continentalic acid 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서, 각각 5.89 ± 0.19 , 5.93 ± 0.33 , 5.97 ± 0.11 , 6.58 ± 0.48 , 7.64 ± 0.10 으로 모든 농도에서 우식 임계 pH 5.5보다 높아 산 생성 억제 효과가 뛰어났다.

S-HA에 *S. mutans* 부착율이 continentalic acid 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 각각 31%, 47%, 55%, 60%, 71%의 부착억제율을 보였다.

GTFase에 의한 비수용성 글루칸 정량 실험을 한 결과 대조군에 비해 0.25 , 0.5 , 1 , 2 , $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 22.33 ± 5.51 %, 13.00 ± 3.61 %, 7.33 ± 2.08 %, 3.33 ± 1.53 %, 1.67 ± 0.58 %의 생성율을 보여, 비수용성 글루칸 형성이 유의하게 감소하였다.

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, 독활로부터 추출한 continentalic acid는 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 정도의 낮은 농도에서도 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, S-HA에 대한 부착억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있으므로, 앞으로 의학적, 산업적으로 유용한 개발 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국과학재단의 지원에 의하여 연구되

었음 (R08-2004-000-10287-0).

참고문헌

1. <http://www.nso.go.kr/> 통계청, 완전생명표, 2005.
2. 정동형, 김수근. 디지털시대의 건강관리. 서울, 대경북스. p 27, 2003.
3. 최원철. 수도권 일차구강진료수령자의 영구치아 발거원인 비중에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문. 1999.
4. 한국구강보건협회. 한국인 구강질환 실태조사 결과보고, 1976.
5. 김무길. 대도시인의 구강보건실태 및 상대구강보건의료수요 조사연구. 대한구강보건학회지 4(1):19-44, 1980.
6. 박종만. 소도시인의 구강보건실태 및 상대구강보건의료수요 조사연구. 대한구강보건학회지 5(1):7-33, 1981.
7. 오상일, 김종배. 비도시인의 구강보건실태 및 상대구강보건 의료수요 조사연구. 대한구강보건학회지 5(1):55-82, 1981.
8. 김종배 외. 국민구강건강조사 보고서, 1991.
9. 국민구강보건연구소. 1995년 국민구강건강조사보고서, 1995.
10. 보건복지부. 2006년 구강보건사업계획. 2006.
11. Tsuneno, N., Masa, T., Masao, H. Dental caries prevention by traditional chinese medicines. Plant Med 44, 100-106, 1982.
12. 김종배, 최유진. 공중구강보건학. 서울, 고문사. pp 68-84, 1990.
13. 김강주, 전병훈, 우원홍. 黃連의 *Streptococcus mutans* 10449의 성장 및 pH 변화에 미치는 영향. 원광생체재료매식 연구소지 233-237, 1992.
14. 박정순, 김선숙, 김성효, 신용서, 이갑상, 김강주. 황백물추출 물이 *Streptococcus mutans* JC-2의 생육과 산생성에 미치는 억제효과. 대한구강보건학회지 19(4):439-446, 1995.
15. 장기완, 오인숙, 이정환. Mutans streptococci의 성장에 미치는 Erythritol과 Chitosan, 으름덩굴 및 패 추출물의 병용효과. 대한구강보건학회지 21(3):545-552, 1997.
16. 장기완, 강동오, 김환규. 수종 우식원인균에 대한 으름덩굴 (Akebia quinata) 추출물의 항세균 및 saliva-coated hydroxyapatite beads에 의한 부착억제 효과. 대한구강보건학회지 21(4):675-684, 1997.
17. 장기완, 김환규, 조철호. 광생이 모자반 (*Sargassum horneri*) 추출물의 *Streptococcus mutans*와 *S. sobrinus* strains에 대한 항세균효과. 대한구강보건학회지 21(2):379-388, 1997.
18. 장기완, 고광준, 유영관. Berberine의 *mutans streptococci*에 대한 항세균효과. 대한구강보건학회지 21(3):537-544, 1997.
19. Sun, D., Abraham, S.N., Beachey, E.H. Influence of berberine sulfate on synthesis and expression of Pap fimbrial adhesin in uropathogenic Escherichia coli. Atimicrobial Agents & Chemotherapy 32, 1274-1277, 1988.
20. Sun, D., Courtney, H.S., Beachey, E.H. Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane. Atimicrobial Agents & Chemotherapy 32, 1370-1374, 1988.
21. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y. Hirasawa-M Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 25, 438-443, 1991.
22. Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., et al. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans Streptococci. Appl Environ Microbiol 59, 968-973, 1993.
23. Steinberg, D., Kaine, G., Gedalia I Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. Am J Dent 9, 236-239, 1996.
24. 허 준 편. 원저 동의학 연구소 역. 동의보감. 서울, 여강 출판사. p 773, 1994.
25. 허 준 편. 동의보감 국역 위원회 역. 동의보감. 서울, 범인 문화사. p 1632, 1999.
26. 유현희, 서세정, 김연화, 이해연, 금기천, 나종찬, 전병훈, 유용욱. 독활 메단을 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 성장, 산생성, 부착 및 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(1):87-91, 2003.