백작약 추출물의 *Candida albicans*에 대한 항진균 활성

고려대학교 의과대학 미생물학교실

성 인 화

= Abstract =

Antifungal Activity of the Extract from *Paeonia japonica* against *Candida albicans*

Inwha Seong

Department of Microbiology, College of Medicine, Korea University

Background: *Candida albicans* is one of the normal flora of the skin, mucous membranes and gastrointestinal tract. Vaginal candidiasis remains a significant problem in women of childbearing age, majority of the cases are caused by *C. albicans* and recurrence is common in spite of topical treatment.

Objective: The purpose of this study is to develop the antifungal agent from the medicinal herbs traditionally used in Korea.

Methods: In this study, extracts from roots of *Paeonia japonica* were examined for antifungal activities against *C. albicans*. Dried roots of *Paeonia japonica* were extracted with dichloromethane, methanol, water respectively and serially. Liquid column chromatography and thin layer chromatography were used to separate the fractions with antifungal activity, and mass spectrometric analysis was done to determine the mass.

Results: Dichloromethane extract showed the highest antifungal activity aginst *C. albicans*. Result of fractionation and mass spectrometric analysis revealed that there were six materials: propanal, cytidine, hexadecanoic acid, cholesterol, octadecanoic acid and a unidentified material.

Conclusion: Dichloromethane extract from *Paeonia japonica* could be a candidate for a new antifungal agent against *C. albicans*. **[Kor J Med Mycol 2006; 11(1): 19-26]**

Key Words: *Paeonia japonica*, Dichloromethane extract, Antifungal activity, *Candida albicans*

서 론

항생제는 1940년대 초기부터 널리 사용되기 시작되었지만 첫 항진균제로 1949년에 등장한 nystatin은 *Streptomyces noursei*에서 분리되었고 독성이 상당히 강하여 경구적으로 전신 진균증의 치료에 사용되지 못하고 피부점막에 발생하는 진균증에 사용되었다. 그 이후 polyene계 항진균제로 amphotericin, flavadin, trichomycin, candicidin, tolnaftate 등의 항진균제들이 개발되었고 경구 투여가 가능한 griseofulvin이 개발되었다. 근래에 와서는 새로운 항진균제로 독성이 비교적 적고 항진균력이 우수한 azole계 항진균제들로 clotrimazole, miconazole, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole 등이 있다. Terbinafine은 독성이 거의 없는 항진균제로 알려져 현재까지 여러 가지 진균질환 치료에 사용되고 있다.

국외에서는 식물들에서 항균, 항바이러스 및 항진균 활성을 나타내는 물질을 분리해 내고자 하는 연구들이 활발하게 진행되어 왔으나 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못한 실정이다.

본 연구는 식물로부터 항진균 활성을 가지고 있는 물질을 찾아내기 위한 연구의 일환으로 우리나

†별책 요청 저자: 성인화, 136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 의과대학 미생물학교실
전화: (02) 920-6167, Fax: (02) 923-3645

라에서 오랫동안 사용되어 인체에 큰 해가 없는 것으로 알려진 한약 재료 중의 하나인 백작약을 여러 가지 용매로 추출한 추출물이 항진균 활성이 있는지 특히 가임기의 여성들에게 흔하게 올 수 있는 진균 질환인 재발성 질 캔디다증 환자에서 분리한 *Candida albicans*에 대하여 항진균 활성이 있는지 여부를 규명하기 위하여 시행되었다.

대상 및 방법

1. 실험재료

백작약은 서울시 제기동에 있는 약령시 내 한약 재상에서 구입하여 분쇄기로 분쇄하였다.

2. 추 출

백작약 분말 650 g을 teflon stopper가 부착된 separatory funnel에 넣고 dichloromethane, methanol, 물의 순서로 각각 2리터의 용매를 넣어 추출하되, dichloromethane과 methanol을 넣은 것은 실온에서 24시간 방치하였고, 물추출은 80℃에서 2시간 동안 가온하여 추출하였다. 동일하게 2차 추출한 것을 합하여 각각 여과지로 여과한 다음 rotary evaporator를 사용하여 40℃에서 가온 농축하였다.

3. 항균 활성 검사

1) 배 지

Sabouraud's dextrose agar와 broth를 사용하였다.

2) 균 주

재발성 질 칸디다증 환자들에서 분리된 *Candida albicans* 중 10주와 *Candida albicans* 표준 균주 (ATCC 10231)를 사용하였다.

4. 항진균 활성 검사

항진균 활성 검사는 디스크 확산법을 사용하였는데 그 이유는 추출물의 희석에 사용한 용매인 dichloromethane과 methanol이 그 자체 항균성이 있어 일반적인 방법인 tube dilution 방법이나 agar dilution 방법으로 할 수 없기 때문이었다.

최종 추출물들을 각각의 용매로 용해한 용액 (20 mg/ml)을 각각의 용매로 2배 계단 희석한 희석액 20 μl를 직경 6 mm의 여과지 (Advantec N0. 26) 디스크에 가하고 음압에서 건조시켜 용매를 제거한 디스크들을 사용하였다. 균들은 Sabouraud broth에 부유하여 37℃ 배양기에 24시간 배양한 후 *Saboraud's* dextrose agar에 다시 배양한 다음 각 균의 집락을 하나씩 broth에 넣어 배양하고 농도를 McFarland nephelometer standard # 0.5에 맞춘 균부유액 0.1 ml를 agar 표면에 도말한 다음 디스크들을 올려놓고 37℃에서 18시간 방치한 후 형성된 성장 억제대의 직경을 측정하였다.

5. 추출물의 분획

각 추출물들의 항진균 활성 보유 여부를 검사하고 활성이 가장 높은 추출물을 Silica gel column chromatography (Merck silica gel 60)와 Thin layer chromatography (Merck glass TLC plate)를 이용하여 얻은 각 분획들의 항진균 활성을 검사한 다음 활성이 가장 높은 분획의 질량분석을 고려대학교 기초과학 지원 연구소에 의뢰하였다.

결 과

1. 추출물들의 항진균 활성

Dichloromethane 추출물은 *C. albicans* 10주에 대하여 14~18 mm의 성장 억제대를 보였고 methanol 추출물은 11~15 mm로 dichloromethane 추출물보다 낮았고 물 추출물은 항진균 활성이 없었다. *C. albicans* 표준 균주에 대하여 dichloromethane 추출물과 methanol 추출물의 성장 억제대는 각각 15 mm와 13 mm였다 (Table 1).

2. Dichloromethane 추출물 분획의 항진균 활성과 MIC

추출물 가운데 가장 높은 활성을 보인 dichloromethane 추출물을 silica gel column chromatography로 분획하여 얻은 분획들 중에서 선택한 3분회 (DCM-1, 2, 3)의 활성을 검사한 결과 DCM-3 분획만이 항진균 활성이 있었다 (Table 2, 3).

3. Mass spectrometry 분석

DCM-3 분획을 ethyl acetate : methanol (4:1) 전개용매를 사용하여 다시 분획한 결과 Rf치가 각각

Table 1. Antimicrobial activities of the extracts from *Paeonia japonica* against *C. albicans*

Microorganism	Growth Inhibition Zone (mm) / Extract		
	Dichloromethane	Methanol	Water
C. albicans-1	16	11	<7
C. albicans-2	15	12	<7
C. albicans-3	15	12	<7
C. albicans-4	18	15	<7
C. albicans-5	15	14	<7
C. albicans-6	17	13	<7
C. albicans-7	14	14	<7
C. albicans-8	15	11	<7
C. albicans-9	16	13	<7
C. albicans-10	16	12	<7
*C. albicans**	15	13	<7

*: Standard strain

Table 2. Antimicrobial activities of fractions from dichloromethaneextract against *C. albicans*

Microorganism	Growth Inhibition / Fraction		
	DCM-1	DCM-2	DCM-3
C. albicans-1	−	−	+
C. albicans-2	−	−	+
C. albicans-3	−	−	+
C. albicans-4	−	−	+
C. albicans-5	−	−	+
C. albicans-6	−	−	+
C. albicans-7	−	−	+
C. albicans-8	−	−	+
C. albicans-9	−	−	+
C. albicans-10	−	−	+
*C. albicans**	−	−	+

*: Standard strain

Table 3. Minimal inhibitory concentration of DCM-3

Microorganism	Growth Inhibition / Concentration (mg/ml)			
	100	50	25	12.5
C. albicans-1	+	+	−	−
C. albicans-2	+	+	−	−
C. albicans-3	+	+	−	−
C. albicans-4	+	+	−	−
C. albicans-5	+	+	−	−
C. albicans-6	+	+	−	−
C. albicans-7	+	+	−	−
C. albicans-8	+	+	−	−
C. albicans-9	+	+	−	−
C. albicans-10	+	+	−	−
*C. albicans**	+	+	−	−

*: Standard strain

0.97 (fraction-1), 0.5 (fraction-2), 0.2 (fraction-3)인 분획들을 얻을 수 있었으며 이중 Rf 0.5인 분획이 가장 양이 많고 거의 투명한 결정체를 이루었다. 이 분획을 한국기초과학지원 연구소 서울 분소 (고려대학 내)에 질량분석을 의뢰한 결과 이 분획 내에 5가지 물질이 있었으며 retention time이 3.45분인 물질은 propanal, 15.73분인 것은 cytidine, 26.08분인 것은 hexadecanoic acid, 26.69분인 것은 cholest-5-en-3-ol, 27.7분인 것은 octadecanoic acid로 확인되었다 (Table 4, Fig. 1-6).

Table 4. Area percent report of mass spectrometry

Area Percent Report									
Peak #	R. T. min	First Scan	Max Scan	Last Scan	PK TY	Peak Height	Corr. Area	Corr. % Max.	% of Total
1	3.450	21	26	84	M	94853	14649886	4.33%	2.911%
2	4.722	109	113	181	M5	62907	13540065	4.00%	2.690%
3	15.729	820	866	883	M4	301973	65804073	19.45%	13.074%
4	26.077	1566	1574	1591	M2	743433	19139901	5.66%	3.803%
5	26.691	1601	1616	1642	M	5249569	338359329	100.00%	67.227%
6	27.700	1677	1685	1705	M	1732517	51815618	15.31%	10.295%

Sun of corrected areas: 503308871

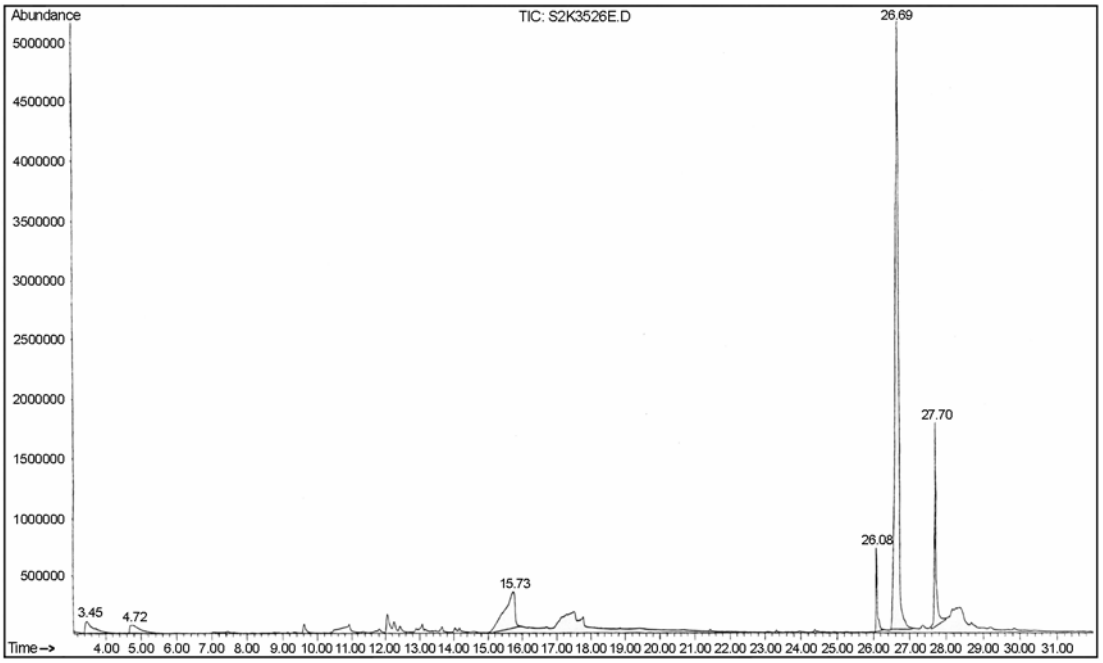

Fig. 1. Mass spectrometry of fraction-2 (Rf 0.5).

고 찰

세균 감염 질환을 치료하는데 사용되어온 항생제들은 다양하고 종류들이 많지만 진균은 세균과 많은 차이가 있어 세균처럼 진균에게만 선택 독성을 나타내는 항진균제들이 많지 않고 현재까지 개발되어 사용되고 있는 항진균제들도 대부분 한 가지 이상의 한계성을 가지고 있는데 심한 부작용, 좁은 항진균 스펙트럼, 일부조직에의 낮은 침투성, 내성 등이며 상당한 수준의 독성을 나타내므로 간기능 검사 등 여러 가지 검사를 하면서 조심스럽게 사용되고 있다. 진균은 사람 세포와 같이 진정핵 세포로 되어 있어 세포 수준과 분자 수준에서 수많은 상동성이 있기 때문에 진균에 대해서만 선택 독성을 가진 항진균제의 개발이 쉽지 않다. 항진균제는 1970년대 azole계의 ketoconazole이 개발되면서 획기적인 발전을 이루었고 계속해서 clotrimazole, econazole, miconazole

Library Searched: D:\Database\wiley7n.1
Quality : 83
ID : Propanal, 2,3-dihydroxy- $$ .alpha., .beta. -Dihydroxypropionaldehyde $$ DL-GLYC $$ DLG $$ Glyceraldehyde $$ Glyceric aldehyde $$ Glycerinaldehyde $$ Glycerinformal $$ Glycerose $$ Propionaldehyde, 2,3-dihydroxy- $$ U 1188 $$ 2,3-Dihydroxypropanal $$ 2,3-Di

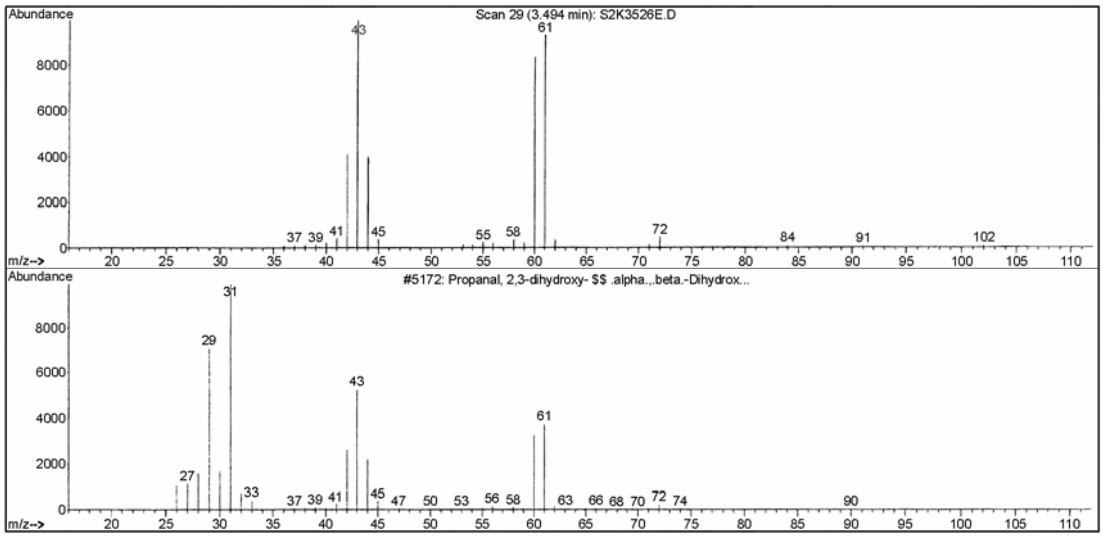

Fig. 2. Mass spectrometry-2.

Library Searched: D:\Database\wiley7n.1
Quality : 47
ID : Cytidine (CAS) $$ Cyd $$ Cytosine riboside $$ 1- .beta. -D-Ribofuranosylcytosine $$ .beta. -D-Ribofuranoside, cytosine-1 $$ Cytosine, 1- .beta. -D-ribofuranosyl- $$ 2(1H) -Pyrimidinone, 4-amino-1- .beta. -D-ribofuranosyl- $$ 4-amino-1- .beta. -D-ribofuranosyl-2 (1H)

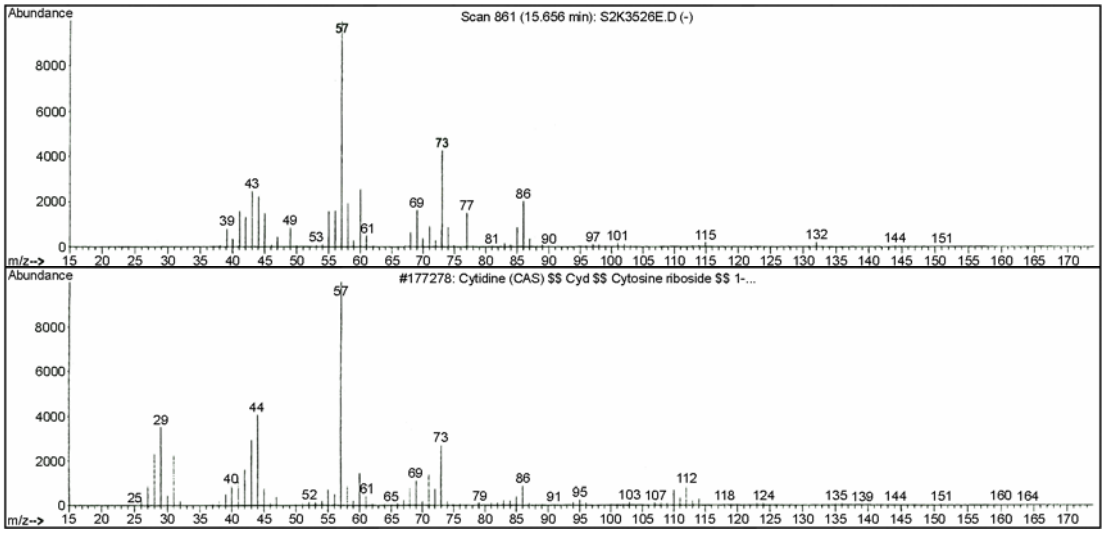

Fig. 3. Mass spectrometry-3.

등 imidazole계 항진균제의 개발에 이어 triazole계의 fluconazole, itraconazole, terconazole, voriconazole 등의 약들이 개발되었다[1,2]. 최근에는 allylamine계에 속하는 terbinafine이 등장하여 독성이 거의 없다고

Library Searched: D:\Database\wiley7n.1
Quality : 91
ID : Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1- (hydroxymethyl) ethyl ester $$ Palmitin, 2-mono- $$ Palmitic acid .beta. -monoglyceride $$ 2-Hexadecanoyl glycerol $$ 2-Monopalmitin $$ 2-Monopalmitoyl-sn-glycerol $$ 1, 2, 3-Propanetriol 2-hexandecanoyl ester $$ Glycerol .beta.

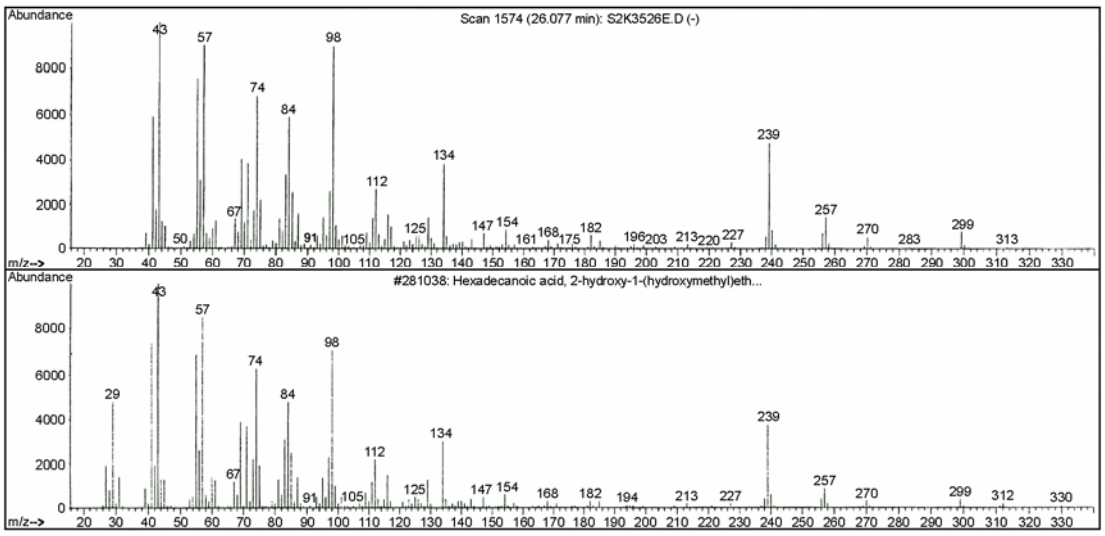

Fig. 4. Mass spectrometry-4.

Library Searched: D:\Database\wiley7n.1
Quality : 99
ID : Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)- (CAS) $$ Lanol $$ Dythol $$ Kathro $$ Dusoran $$ Cordulan $$ Dusoline $$ Hydrocerin $$ Cholesterin $$ Cholesterol $$ Tegolan $$ (−) -Cholesterol $$ Provitamin D $$ Cholesterol base H $$ Wool alcohols B. P. $$ Cholesteryl alcohol

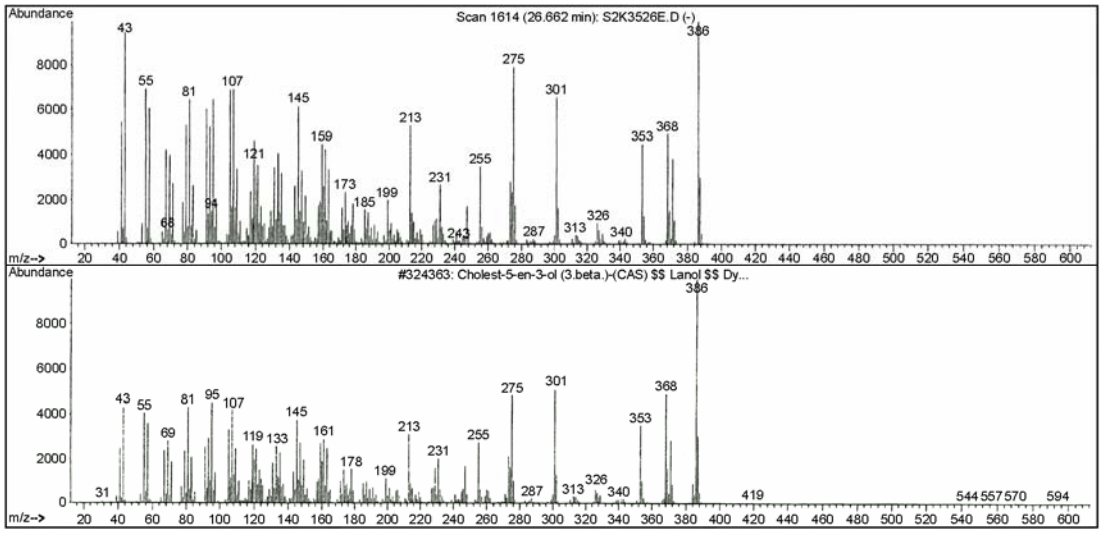

Fig. 5. Mass spectrometry-5.

알려져 여러 가지 진균질환의 치료에 널리 사용되고 있으나 오심, 설사, 복통, 미후각 장애, 현훈, 간기능 장애, 백혈구 수 감소, 피부 색소침착, 전신성 발진, 급성간염 등 여러 가지 부작용이 보고되었다[3~7].

Library Searched: D:\Database\wiley7n.1
Quality : 90
ID : Octadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester $$ Stearin, 2-mono- $$ .beta. -Glyceryl monostearate $$ .beta. -Monostearin $$ Glycerol- .beta. -monostearate $$ Stearic acid .beta. -monoglyceride $$ 2-Monostearin $$ 2-Monostearoylglycerol $$ 1, 2, 3-Pr

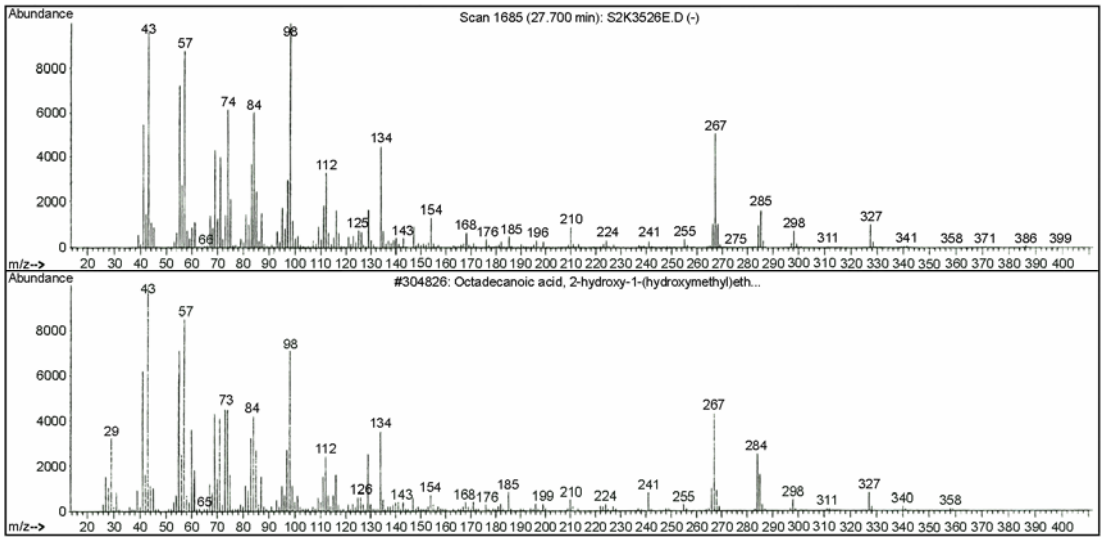

Fig. 6. Mass spectrometry-6.

세계보건기구는 개발도상국에 살고 있는 사람의 80%가 전통의학에 의지하고 있다고 추산하였으며 그 대부분이 오래전부터 효과가 있다고 알려진 식물들을 사용하는 것이라고 하였다[8].

식물에서 항균 활성이 있는 물질을 추출해 내고자 하는 연구는 전 세계적으로 오래전부터 진행되어 왔으며 수 많은 식물들이 특히 항균, 항진균 활성이 있는 물질을 생산하고 있음을 규명하였고 지금 그러한 연구는 활발하게 진행되고 있으나 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못하다[9,10].

본 연구에 사용된 작약은 작약과 (Family Paeoniaceae, 전에는 미나리아제비과)의 식물로 작약과에는 적작약 (*Paeonia latiflora* PALLAS), 참작약 (*P. latiflora* var. *trichocarpa* BUNGE), 백작약 (*P. japonica* MIYABE et TAKEDA), 털백작약 (*P. japonica* var. *pilosa* NAKAI), 산작약 (*P. japonica* var. *obovate* MAX), 호백작약 (*P. srbiflora* PALL var. *hirsuta* REGEL)과 모란 (*P. suffruticosa* ANDR)이 있는데 적작약과 참작약의 뿌리는 생약명이 적작약 (Rubra Paeoniae Radix)이고, 백작약, 털작약, 산작약 및 호백작약의 뿌리는 백작약 (Paeoniae Radix)이란 생약명으로 부르고 있다. 백작약은 감기, 부인병, 소아마비, 이질, 중이염, 창종, 폐결핵 및 홍역의 치료를 위하여 처방되어 왔는데 모두 달이거나 산제로 하여 복용토록 처방되었다[11,12]. 본 연구에서 물 추출물은 달이지 않고 80℃에서 2시간 동안 추출하였는데 항균 활성이 전혀 없었다. Dichloromethane 추출물의 항균 활성은 전반적으로 methanol 추출물보다 약간 높았는데 그 차이가 물질의 차이에 의한 것인지 여부는 확인할 수 없었다.

Dichloromethane 추출물을 silica gel chromatography로 분획하여 얻은 3분획 중 항균 활성이 있는 DCM-3 분획을 ethyl acetate : methanol (4:1)을 전개용매로 하여 극성이 낮은 쪽에서 높은 쪽으로 이행하면서 재분획한 결과 Rf치가 0.98 (fraction-1), 0.5 (fraction-2) 및 0.2 (fraction-3)인 분획을 얻었는데 3분획 모두 단독으로는 항균 활성이 없었으나 3분획을 모두 혼합하면 항균 활성을 나타내었는데 이러한 패턴은 식물 추출물들의 특징으로 보인다. Rf치가 0.5인 fraction-2는 거의 투명한 옅은 분홍색의 결정체를 이루고 있어 순수한 물질일 것으로 생각하고 질량분석을 의뢰한 결과 확인된 물질이 propanal,

cytidine, hexadecanoic acid, cholesterol 및 octadecanoic acid로 다섯 가지였으며 어떤 물질인지 확인되지 않은 peak가 하나 있었다. 가장 많은 물질은 cholesterol이고 그 다음은 octadecanoic acid, hexadecanoic acid 순이었다. Fraction-1, 2, 3이 각각 단독으로는 항균 활성이 없으나 혼합하면 *C. albicans*에 대하여 상당한 수준의 항진균 활성을 나타내므로 우선적으로 외용 항진균제로 사용할 수 있을 것이며 앞으로의 연구를 통하여 독성 여부와 전신 투여 가능성 여부가 규명된다면 새로운 항진균제로써 사용될 가능성이 있다고 판단된다.

결 론

전통한약재 중 하나인 백작약 추출물의 항진균 활성 유무를 규명하기 위한 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Dichloromethane 추출물과 methanol 추출물은 *C. albicans*에 대하여 높은 수준의 항진균 활성을 나타내었으나 물 추출물은 항균 활성이 없었으며 methanol 추출물보다 dichloromethane 추출물의 항균활성이 높았다. Dichloromethane 추출물의 분획 중 항진균 활성이 있는 분획의 MIC는 50 mg/ml이었다. 항균활성이 높은 dichloromethane 분획을 재분획하여 얻은 Rf 0.5의 분획을 기초과학 지원연구소에 질량분석을 의뢰한 결과 propanal, cytidine, hexadecanoic acid, cholesterol 및 octadecanoic acid가 있음이 확인되었다. Dichloromethane 추출물은 *C. albicans*에 의한 감염질환을 치료할 수 있는 새로운 항진균제의 candidate로서 개발할 가치가 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Smith EB. History of antifungals. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 776-778
2. Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C, Natarajan-Ame. Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. J Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56, suppl.S1, i139-i148
3. Gupta AK, Sibbald RG, Knowels SR, et al. Terbinafine therapy may be associated with the development of psoriasis de novo or its exacerbation; four case reports and a review of drug-induced psoriais. J Am Acad Dermatol 1997; 36: 858-862
4. Wach F, Stolz W, Hein R, et al. Severe erythema annulare centrifugum-like psoriatic drug eruption induced by terbinafine. Arch Dermatol 1995; 131: 960-961
5. Gupta AK, Kopstein JB, Shear NH. Hypersensitivity reaction to terbinafine. J Am Acad Dermatol 1997; 36: 1018-1019
6. Duoin N, Gorin L, Djien V, et al. Acute generalized erythematous pustulosis induced by terbinafine. Arch Dermatol 1996; 132: 123-1254
7. Bennet ML, Jorizzo JL, White WL. General pustular eruptions associated with oral terbinafine. Int J Dermatol 1999; 38: 596-600
8. Vivas S, Rodriguez M, Palacid MA, et al. Acute hepatitis associated with terbinafine. Gastroenterol Hepatol 1997; 20: 456-458
9. Cox PA. The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations, pp25-41 *In*: G.T. Prance. Ethnobotany and the search for new drugs. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185), 1994
10. Grayer RJ, Harborne JB. Review article No.92. A survey of antifungal compounds from higher plants. Phytochem 1994; 37: 19-42
11. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microl Rev. 1999; 12: 564-582
12. Renata VS, Hosana MDN, Massuo JK, et al. Antifungal amides from Piper arboreum and Piper tuberculum. Phytochem 2002; 59: 521-527
13. 김재길. 원색천연약물대사전, 초판(4쇄), 상권, 서울, 도서출판 남산당, 1997, p73
14. 권혁세. 익생양술. 초판, 서울. 도서출판 하나로, 1998, p311