

자초뿌리의 成分 및 抗菌力에 關한 研究

藥品化學科

尹 廣 在

Studies on the constituents and their antibacterial effect of the root of *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.

Pharmaceutical Chemistry Division

Yun Kwang Jai

=Abstract=

The compounds were isolated and identified from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. Assay of pigment components was performed. Antibacterial test was also performed. HPLC analyses of CHCl_3 extracts showed that the major component of *Lithospermi Radix* is not shikonin but acetylshikonin. The total pigment content was found 0.764% in *Lithospermi Radix* and 0.436% in "Jaungo". Compound I, II and III inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* but not that of *Escherichia coli*. "Jaungo" inhibited a little the growth of *Staphylococcus aureus*.

I. 緒 論

지치 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 는 지치과 Boraginaceae에 속하는 多年生 草本으로 우리 나라 전역의 野生하고 있다.

이 植物은 높이 30~70cm로 剛毛가 밀포하고 줄기는 곧게 서며 위쪽은 가지가 갈라진다. 잎은 호생하고 두꺼우며 피침형이다. 꽃은 총상화서로 頂生하고 꽃받침(萼)과 화관은 5열된다. 작은 견과(堅果)는 단단하고 난원형으로 엷은 갈색이다. 뿌리는 땅 속에 곧게 내리나 더리는 갈라지고 비후하여 보라색을 띤다. 꽃은 백색이고 5~6월에 핀다.¹⁻³⁾

이 식물은 naphthoquinone 유도체인 색소 배당체가 함유되어 있으며 보라색 뿌리(紫根)를 예로부터 청열, 해독, 소염제로 사용하여 왔다.^{1,4)} 또 紫根을 참기름 100g, 당귀 10g, 밀랍 38g, 돈지 2.5g 등으로 함께 처방하여 紫靈膏라는 피부연고로 사용하여 왔는데 주로 동상, 화상, 탈항, 치질, 습진 등에 효과가 있다.^{1,4)} 한편 紫根으로 쓰이고 있는 식물의 기원은 東洋各國에서는 약간의 차이가 있는데 「日本藥局方」(1981)에서는

Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc. (*Lithospermum officinale* L. var. *erythrorhizon* Max.)의 根이라고 규정되어 있고 「中國藥典」(1977)은 新疆紫草 *Macrotomia euchroma* Pauls의 根을 軟紫根이라 하고 지치 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.의 뿌리를 硬紫根이라 한다. 또 「中藥大辭典」(1977)에서는 紫草의 原植物로서 前述한 種以外에도 滇紫根 *Onosma paniculatum* Bur. et Franch도 덧붙이고 이를 硬紫草라고도 칭하고 있다.⁵⁻⁷⁾

紫根의 성분연구로는 黑田 등⁸⁻¹²⁾이 *Lithospermum officinale* L. var. *erythrorhizon* Maxim.에서 shikonin과 acetylshikonin을 분리하였고, 森本 등⁸⁻¹²⁾은 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.에서 isobutylshikonin, β , β -dimethylacrylshikonin 및 β -hydroxyisovalerylshikonin을 분리하였으며, *Macrotomia euchroma* Pauls에서 teracrylshikonin을 분리한 바 있다.

한편 naphthoquinone계 색소 이외의 성분으로는 allantoin, cyanoglucoside fumaric acid, succinic anhydride 등이 보고되고 있다.¹³⁻¹⁶⁾

著者は 國產 식물자원 개발연구의 일환으로 자근의 有效성분을 분리하여 抗菌력 시험을 행하였으며 HPLC

를 利用하여 各 赤色 色素成分을 定量하고 또 흡광도 측정법을 사용하여 한국산 자근과 자운고의 품질 평가를 한 바, 그 知見을 얻었기에 보고코져 한다.

II. 材料 및 方法

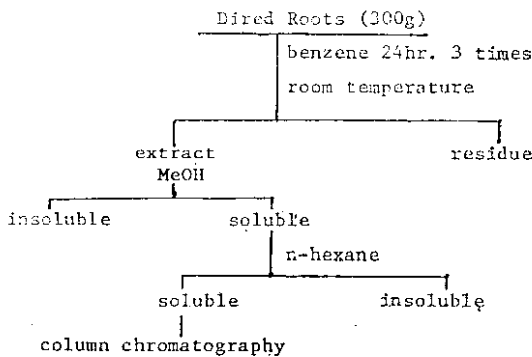
1. 實驗材料

本 實驗에 使用한 材料는 1987年 5월에 채취한 지치 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.의 뿌리를 粗切 음진하여 사용하였고, 紫雲膏는 동일신약의 제품이었다.

2. 實驗方法

1) 紫根에서 naphthoquinone系 色素의 抽出 및 分離 粗切한 紫根 300g에 benzene 2l를 넣어 室溫에서 1주일 放置했다. 3回 抽出하고 減壓濃縮해서 benzene 엑기스 16.5g을 얻었다. 이 엑기스에 MeOH를 加해 可溶部와 不溶部로 나누었다.

MeOH可溶部를 減壓濃縮해서 MeOH를 留去한 다음 이 엑기스에 n-hexane을 加해 可溶部와 不溶部로 分離하고 n-hexane 可溶部를 減壓濃縮 그 중 4g을 取해 CHCl₃를 전개용매로 하여 silicagel column chromatography를 한 바 5개의 fraction을 얻었다. 각 fraction을 MeOH로 再結晶하여 精製하였다(Scheme I).



Scheme I. Fractionation of the colouring compounds from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*.

2) 紫根 및 紫雲膏中의 shikonin類의 定量

紫根의 분말 2g 및 紫雲膏 20g을 精밀히 달아 三角 flask에 各各 넣고 CHCl₃ 70ml를 加해 때때로 진탕하며 24時間 冷浸하였다. 溶媒濾過後 flask 및 잔부물은 濾液이 100ml가 될 때까지 CHCl₃로 洗滌하였다. 이 2.5ml를 正確히 取한 후 CHCl₃를 加해 50ml로 希釋하여 試驗溶液으로 하였다.

표준용액은 shikonin 표준품 約 25mg을 精密히 取

해 CHCl₃ 50ml에 용해시키고, 이 2.0ml를 50ml에 希釋시켜 使用하였다. 測定은 可親部 領域에서 行하고 520nm 附近의 吸光度를 測定하여 檢량선으로부터 shikonin류의 含量을 산출하였다.

3) 紫根中의 各 色素의 抗菌力 檢定

① 實驗菌株

實驗菌株는 다음과 같다.

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	14456
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC	27549
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC	9199

② 使用培地

• Heart Infusion Agar

Beef Heart Infusion from	500g
Bacto Tryptose	10g
Sodium Chloride	5g
Bacto Agar	15g
Distilled water to make	1,000ml

• Müller Hinton Broth(DIFCO제)

Beef Infusion from	300g
Casamino Acids Technical	17.5g
Bacto Soluble Starch	1.5g

• Müller Hinton Agar

Müller Hinton Broth에 Bacto Agar 17.0g을 첨가 final pH 7.4

③ 實驗菌液의 調製

菌株를 Heart Infusion Agar plate에 培養하여 잘 分離된 colony를 4~5개 選擇하여 Müller Hinton Broth에 接種하였으며 37°C Incubator에서 3~4時間 培養한 後 實驗菌液의 濁度를 標準濁度液과 맞춘 다음 實驗菌液으로 使用하였다.

④ 實驗方法

i) 最少發育抑制濃度(Minimum Inhibitory Concentration) 測定

各 色素를 acetone에 溶解하고 各기 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0.8mg/ml, 0.4mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml의 檢液으로 하였다. 各 檢液 1ml와 Müller Hinton agar 24ml를 진탕하여 잘 混合하고 121°C 15 Lb에서 15분간 滅菌하였다.

滅菌된 各 檢液과 Müller Hinton agar의 混合培地를 44~50°C로 식힌 후 직경 90mm의 petri dish에 分注하였다. 40°C Incubator에 약 30分間 넣어 表面에 묻은 습기를 없앤 후 實驗菌液을 1 loop씩 取하여 接種하고 37°C Incubator에서 18~24時間 培養시켰다.

菌의 發育程度를 肉眼으로 判定하였다.

ii) 디스크 擴散法(Disc diffusion method)

직경 90mm의 Petri dish에 Müller Hinton Agar를 basal layer로 하고, Müller Hinton Agar에 실험균액(*S. aureus*, *E. coli*)을 섞은 배지를 plating하여 평판균액배지를 만들었다. 실험액은 acetylshikonin, shikonin, β -hydroxyisovalerylshikonin, 紫雲膏를 Tween 80과 증류수의 比率이 1:5인 溶液으로 800 μ g/ml의 농도가 되게 溶解시킨 후 disc에 각각 포화용량을 吸收시켰다. 한편 control로는 lactose를 同一한 濃度로 溶解시켜 使用했으며 이때 使用된 paper disc는 直徑 8mm Toyo Seisakusho Co. LTD제를 사용하였다. 다음 disc를 평판균액배지에 놓고 滅菌된 pincette로 가볍게 누른 後 plate를 뒤집어 37°C Incubator에서 18~24時間 培養한 後 發育抑制帝의 크기를 測定하였다. 發育抑制帝의 크기가 control과 유사한 것은 \pm , control보다 약간 큰 것은 +, 아주 큰 것은 \pm 로 표시하였다.

4) 各 赤色 色素成分의 確認 및 定量

HPLC를 使用하여 紫根末의 $CHCl_3$ 抽出液中の 各 色素成分을 同定하였다. 이 때 使用한 기기 및 조건은 다음과 같다.

- 기 기 : Waters HPLC
 Column : Lichrosorb RP 18(Merck Co.)
 Mobile phase : $CH_3CN : H_2O : (Et)_3N : AcOH = 70 : 30 : 0.3 : 0.3$
 Flow rate : 1.5ml/min
 Detector : 548nm
 Injection volume : 20 μ l

한편 各 色素成分의 組成比率은 548nm에 있어서의 各 유도체의 HPLC peak 면적으로부터 算出했다.

III. 實驗 結果

1. 紫根에서 naphthoquinone系 色素의 抽出 및 分離

紫根을 Scheme 1에 따라 分離 精製한 결과 각기 單一한 3種의 化合物을 얻었다(Fig. 1).

1) 化合物 II의 單離

MeOH로 再結晶하여 赤色針狀結晶을 얻었다.

m.p. : 93~95°C

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 1741, 1615, 1575, 1230, 1201, 856, 764(Fig. 2)

UV λ_{max}^{EtOH} nm : 275, 487, 518, 559

NMR($CDCl_3$) : 1.56, 1.68(6H, each s., =C< $\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CH_3 \end{matrix}$)

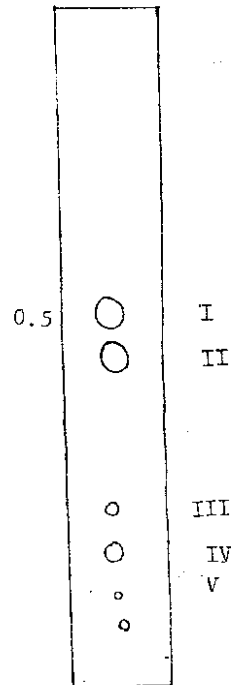


Fig. 1. TLC of Benzene extract of *Lithospermum erythrorhizon*

2.12(3H, s., -COCH₃)
 2.52(2H, t., J=7.0Hz, Ar-CH-CH₂-) 5.10(1H, t, J=7.0Hz-CH=C< $\begin{matrix} O \\ | \end{matrix}$) 6.00(1H, t., J=7.0Hz Ar-CH-), 6.96(1H, S., aromatic, H), 7.14(2H, s., aromatic H) 12.35, 12.50(2H, each s., aromatic OH) (Fig. 3).

本品은 文獻에 기재된 acetylshikonin의 IR, UV, NMR과 一致하므로 acetylshikonin으로 同定하였다.

2) 化合物 III의 單離

MeOH로 再結晶하여 赤色針狀結晶을 얻었다.

m.p. : 145~147°C

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 1605, 1570, 1200, 755(Fig. 4).

UV λ_{max}^{EtOH} : 276, 485, 516, 554.

本品은 文獻에 기재된 shikonin의 용점, IR, UV와 一致하므로 shikonin으로 同定하였다.

3) 化合物 IV의 單離

結晶化할 수 없어서 暗紫色 油狀物質을 얻었다.

IR. ν_{max}^{Nujol} cm^{-1} : 3470, 1730, 1605, 1455, 1115, 780 (Fig. 5)

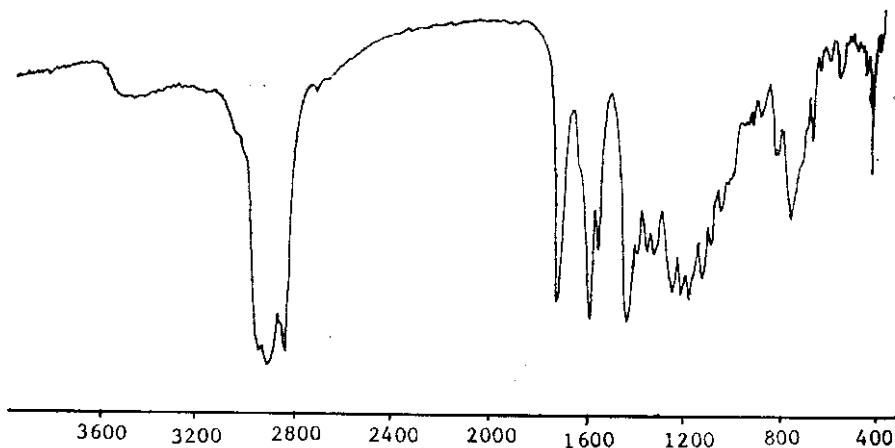


Fig. 2. IR spectrum of compound I

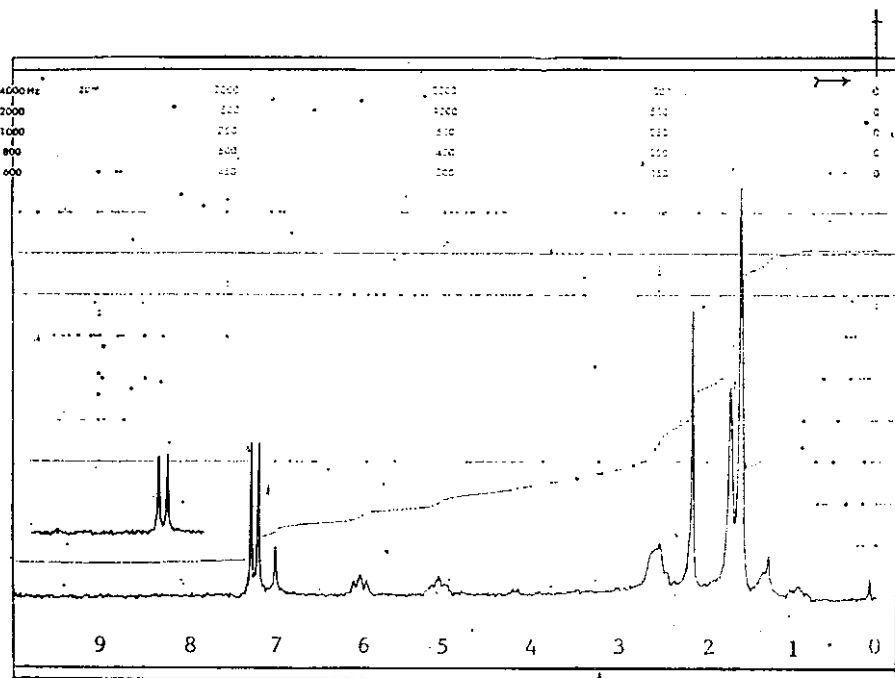


Fig. 3. NMR spectrum of compound II

UV. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm : 485, 515, 553

NMR(CDCl₃) : 1.30(6H, s., $-\text{C} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$)

1.59, 1.69 (6H, each S=C $\begin{matrix} \text{OH} \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$)

2.57 (2H, s., CO·CH₂·C<)

2.59 (2H, t., Ar-CH-CH₂-), 5.10 (1H, t.,

-CH=C<), 6.07 (1H, t., J=7.0Hz, Ar-CH-),

6.99 (1H, s., aromatic H), 7.13 (2H, s., aromatic H), 12.30, 12.50 (2H, each s., aromatic H) (Fig. 6).

本品은 文獻에 기재된 β -hydroxyisovalerylshikonin의 IR, UV, NMR과 一致하므로 β -hydroxyisovalerylshikonin으로 同定하였다.

2. 紫根 및 紫雲膏中の shikonin類의 定量

紫根 및 紫雲膏의 品質平價의 한 방법으로 吸光度測

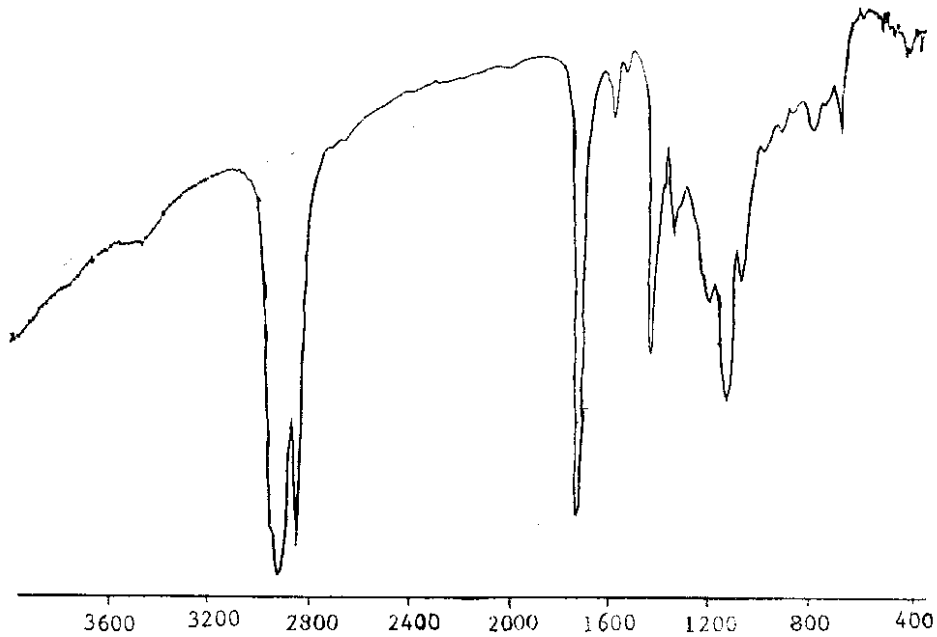


Fig. 4. IR spectrum of compound III

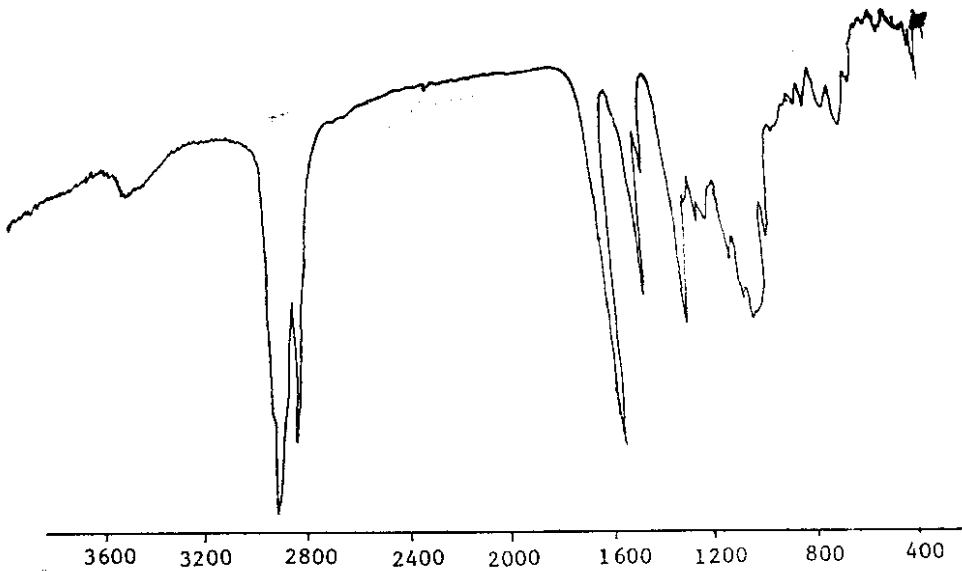


Fig. 5. IR spectrum of compound IV

定法을 사용하여 shikonin類를 定量하였다.
shikonin을 標品으로 使用하여 作成한 calibration curve이다.

Fig. 7은 $y=0.824x$ 라는 식을 使用하여 紫雲膏와 紫根中의 shikonin類를 定量한 結果 紫根은 0.764%를 나타냈고 紫雲膏는 0.436%를 나타냈다.

이는 京極 등이 報告한 1.05%와 木島 등이 報告한 1.14%에 약간 未達되는 量이었다.

3. 紫根中의 各 色素의 抗菌力 檢定

Scheme I에 따라 單離한 5種의 色素成分에 대하여 抗菌力試驗을 行하였다. 被檢菌은 Gram 陽性菌과 Gram 陰性菌으로 하였으며, 固體培地에 의한 MIC

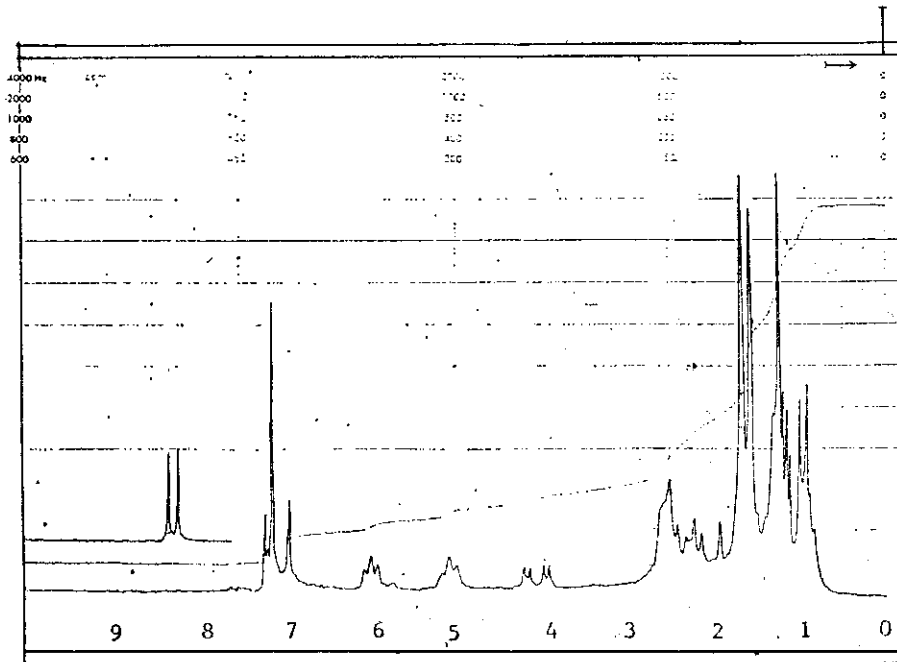


Fig. 6. NMR spectrum of compound IV

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration

Bacteria	Compounds ($\mu\text{g/ml}$)				
	I	II	III	IV	V
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14456	400	400	200	200	400
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 27549	800	>4000	800	400	>4000
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000

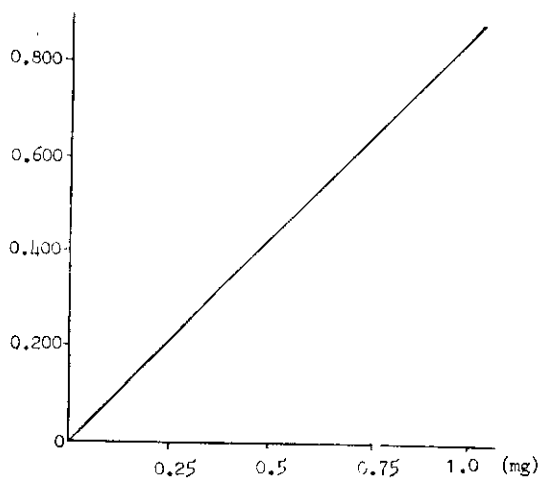


Fig. 7. Calibration curve of shikonin

Table 2. Antibacterial test by paper disc method

Sample Strains	Comp. II	Comp. III	Comp. IV	Jaungo
<i>S. aureus</i>	++	++	+	±
<i>E. coli</i>	±	±	±	±

test에서는 Gram 양성균인 *S. aureus*에서만 약간의 항균력이 인정되었을 뿐, Gram 음성균에서는 거의 항균력을 나타내지 않았다(Table 1).

한편 disc 확산법으로는各色素成分의 상대적인 항균력을 주로測定하였는데 shikonin과 acetylshikonin이 가장強力한 항균력을 나타냈고, 그러나 그것은高濃度에서 뿐이고 우리가 기대하는濃度에서는 거의 항균력을 나타내지 못했다(Table 1).

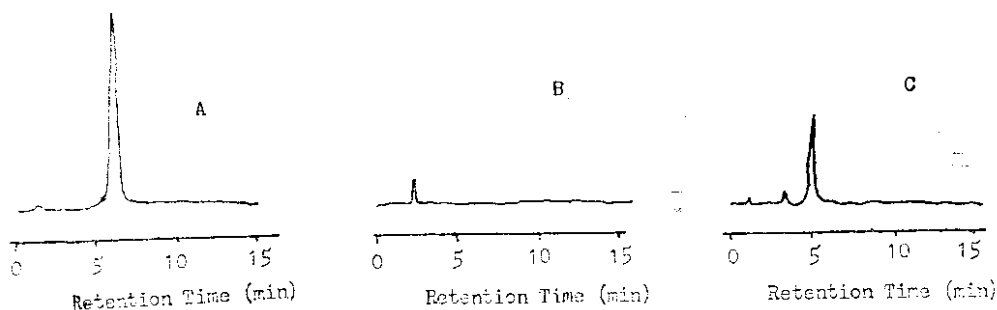


Fig. 8. High Performance Liquid Chromatogram of standard solution A, B, C

A: Acetylshikonin B: Shikonin C: β -Hydroxyisovalerylshikonin

4. 各 赤色 色素成分의 確認 및 定量

앞에서 분리 확인한 3種의 化合物 즉, acetylshikonin, shikonin, β -hydroxyisovalerylshikonin을 標品으로 使用하여 HPLC를 行한 結果 peak b, d, f는 각각 shikonin, β -hydroxyisovalerylshikonin, acetylshikonin으로 확인할 수 있었다(Fig. 8, Fig. 9). 各 色素成分의 組成比率는 다음과 같다.

Table 3. Compound ratio of each derivatives.

	Comp. II	Comp. III	Comp. IV
Retention time(min)	6.290	2.710	5.052
Ratio (%)	30.65	5.40	10.21

위의 Table에 나타난 바와 같이 紫根의 主成分은 shikonin이 아니고 acetylshikonin이다.

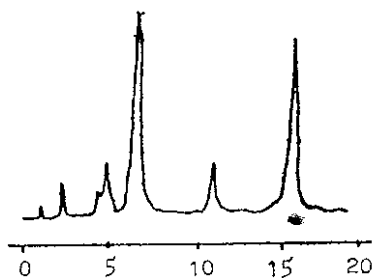


Fig. 9. Retention Time (min) High Performance Liquid Chromatogram of CHCl_3 extract of *Lithospermum erythrorhizon*.

IV. 結 論

紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.의 根은 漢方에서 清熱, 解毒, 消炎劑로 使用되는 重要한

生藥의 하나로서, 그의 成分分離 및 定量, 抗菌力試驗을 行하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 赤色針狀結晶인 化合物 II는 m.p. $93\sim 94^\circ$, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 의 分子式을 갖는 acetylshikonin으로 確認하였다.

2. 赤色針狀結晶인 化合物 III는 m.p. $145\sim 147^\circ$, $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}$ 의 分子式을 갖고 있으며 기기분석 結果 기저물질인 shikonin으로 同定하였다.

3. 暗紫色油狀物質인 化合物 IV는 IR, UV, NMR spectra 등으로 同定한 結果 β -hydroxyisovalerylshikonin으로 추정하였다.

4. 吸光度測定法을 使用하여 測定한 紫根의 shikonin類의 總含量은 0.764%이고 紫雲膏은 0.436%이었다.

5. 抗菌力試驗에 있어서는 모든 色素化合物이 抗菌力을 나타냈지만 高濃度에서 抗菌力을 나타냈고 低濃度에서는 認定하기가 어려웠다.

6. HPLC를 使用하여 各 色素成分의 組成比率를 調査한 結果 紫草의 主成分은 acetylshikonin(30.65%)로서, shikonin(5.40%)보다 그 含量이 매우 높다.

參 考 文 獻

1. 藥毒植物學 연구회: 藥毒植物學 各論, 한국 藥毒 學會 叢書 332-333 (1983).
2. 鄭台鉉: 한국식물도감, 최진출판사, 529 (1962).
3. 陸昌洙: 한국약물식물자원도감, 진명출판사, 332 (1981).
4. 보건사회부: 대한약전 제 4 개정판, 문성사, 816 (1985).
5. 中國醫學科學院藥務研究所等: 中藥志(第 1 冊), 人民衛生出版社, 569(1979).
6. 江蘇新醫學院: 中藥大辭典, 上海科學技術出版社,

- 2342(1977).
7. 羽原千里等：生藥學잡지, 37(4), 299-306 (1983).
 8. 小谷等：약학잡지, 92(5), 525-530 (1972).
 9. 京極等：생약학잡지 27(1), 24-30 (1973).
 10. 京極等：생약학잡지 27(1), 31-36 (1973).
 11. 紫田承二等：藥用天然物質 南山堂 456-457 (1982).
 12. 刈米達夫：和漢生藥, 廣川書店, 61-62 (1971).
 13. 系川秀治等：天然物醫藥品學, 朝倉書店, 54 (1987).
 14. 高木敬次郎等：和漢藥物學, 南山堂, 194-195(1982).
 15. 赤松金芳：和漢藥, 醫齒藥出版社, 120-121 (1980).
 16. 三橋等：天然物化學, 南山堂, 191-192 (1985).