

백작약 추출물의 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* 에 대한 항균활성

신선희¹ · 성인화*

¹한림대학교 의과대학 소아과학교실, *고려대학교 의과대학 미생물학교실

항생제 내성균에 대처 할 수 있는 새로운 항생제의 개발에는 많은 시간과 인력 및 개발비가 필요하며 새로운 항생제들이 생산되어도 균들은 빠르면 수개월내에 내성을 획득한다. 이 문제의 해결방법의 하나로 전통적으로 감염질환의 치료에 사용되어온 백작약 추출물의 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)에 대한 항균활성 보유여부를 조사한 결과 백작약의 dichloromethane 추출물이 MRSA에 대하여 높은 항균활성을 나타내어 앞으로 새로운 항균제로서의 개발 및 사용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

Key words □ antimicrobial activity, dichloromethane extract, MRSA, *Paeonia japonica*

Penicillin에 내성을 나타내는 포도구균이 나타나 beta-lactamase에 영향을 받지 않는 methicillin이 1960년 개발되었으나 그 다음 해인 1961년에 이에 내성을 갖는 황색포도구균인 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)가 등장하였고 그 분리율은 계속 증가하였다. 1988년에는 vancomycin에 고도의 내성을 보이는 장구균이(31), 1997년에는 vancomycin에 대한 감수성이 저하된 황색포도구균이 일본에서 발견되어 전 세계를 놀라게 하였는데(29) 그 이후 세계 여러 나라에서 vancomycin에 내성을 가진 황색포도구균이 분리되었다. 항생제 내성균에 효과적으로 대처할 수 있는 항생제들이 개발되었지만 세균들은 새로운 항생제에 대한 내성을 빠르면 수개월 내에 획득하여 새로운 항생제를 무력화시키고 있는 실정이다. 따라서 새로운 항생제의 개발은 계속되고 있고, 새로운 항생제의 개발 수단으로 기존 항생제의 side chain을 변화시키는 방법을 사용하기도 하지만 새로운 항생제를 개발하는 과정은 긴 시간과 많은 인력과 경비를 필요로 한다.

이 문제를 해결하기 위한 방법의 하나로 여러 나라에서 전통적으로 감염질환의 치료에 사용되어 온 식물로부터 항균물질을 분리하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있어 최근에는 'herbal antibiotics'라는 용어가 사용되고 있지만 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못하다(34).

본 연구는 식물로부터 항균물질을 찾아내기 위한 연구의 일환으로 우리나라에서 오래 동안 사용되어 인체에 큰 해가 없는 것으로 알려진 한약 재료 중의 하나인 백작약을 여러 가지 용매로 추출하여 항균활성이 있는 추출물을 감염성 질환의 치료에 사용할 수 있게 함을 목표로 시행되었다.

재료 및 방법

실험재료

백작약은 서울시 제기동에 있는 약령시 내 한약재상(동명약재)에서 구입하여 분쇄기로 분쇄하였다.

추출

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

항균활성 검사

MRSA의 배양에 Mueller Hinton agar (beef infusion 300 g, casamino acids 17.5 g, starch 1.5 g, agar 17 g, 증류수 1,000 ml)와 broth를 사용하였고 균주는 2001년 고려대학교 안암병원에 입원한 환자와 외래 환자들에서 분리된 MRSA 중 10주와 황색포도구균 표준균주(ATCC 65389)를 사용하였다. 항균활성검사는 디스크 확산법을 사용하였는데 그 이유는 추출물의 희석에 사용한 용매인 dichloromethane 과 methanol 이 그 자체 항균성이 있어 이반적인 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 Mueller Hinton broth

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-920-6167, Fax: 02-923-3645
E-mail: inwha@korea.ac.kr

에 부유하고 37°C 배양기에 24시간 배양한 후 Mueller Hinton agar에 다시 배양한 다음 각 균의 집락을 하나씩 broth에 넣어 배양하고 농도를 McFarland nephelometer standard # 0.5에 맞춘 균부유액 0.1 ml를 agar표면에 도말한 다음 디스크들을 올려놓고 37°C에서 18시간 방치한 후 형성된 성장억지대의 직경을 측정하였다.

추출물의 분획과 추출물의 MIC

각 추출물들의 항균활성 보유여부를 검사하고 활성이 가장 높은 추출물을 silica gel column chromatography (직경 10 cm의 column에 Merck silica gel 60을 시료 100 ml 당 1 g 충전)와 thin layer chromatography (Merck glass TLC plate)를 이용하여 얻은 각 분획들의 항균활성을 검사한 다음 활성이 가장 높은 분획의 MIC를 결정하였다. 분획을 용매로 희석한 희석액을 항균활성 검사와 동일하게 디스크 확산법을 사용하여 MIC를 측정하였다.

항균활성이 가장 높은 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 얻었으며 각 분획과 3가지 분획을 합한 것의 항균활성을 조사하였다.

결 과

백작약의 용매 추출과 추출물들의 항균활성

백작약을 각각의 용매로 추출한 결과 dichloromethane 추출에서는 2.3 g, methanol 추출에서는 3.1 g, 물추출에서는 4.1 g의 추출물을 얻을 수 있었다. 각 추출물의 MRSA에 대한 항균활성을 조사한 결과는 다음과 같았다. Dichloromethane 추출물은 MRSA 10주에 대하여 17-20 mm(평균 18.2 mm)의 성장 저지대를 보였고 methanol 추출물은 15-18 mm(평균 16.3 mm)로 dichloromethane 추출물보다 낮았고 물 추출물은 항균활성이 없었다. *S. aureus* 표준 균주에 대하여 dichloromethane 추출물과 methanol 추출물의 저지대는 각각 18 mm와 16 mm로 MRSA에 대한 항균활성과 비슷하였다(Table 1).

Dichloromethane 추출물 분획의 항균활성

추출물 가운데 가장 높은 활성을 보인 dichloromethane 추출물을 silica gel column chromatography로 분획하여 얻은 분획들 중에서 선택한 3개의 분획(DCM-1,2,3)의 활성을 검사한 결과 DCM-3 분획만이 항균활성이 있었다.(Table 2) 다시 이 DCM-3 분획의 MIC를 측정한 결과 MRSA에 대한 MIC는 50 mg/ml 이었다 (Table 3).

DCM-3 분획의 재분획 및 항균활성검사

DCM-3 분획을 재분획하여 얻은 3개의 분획은 모두 항균활성이 없었으나 이 3개의 분획을 합한 것은 항균활성이 있었다 (Table 4).

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

Microorganism	Growth Inhibition Zone(mm) / Extract		
	Dichloromethane	Methanol	Water
MRSA-1	17	15	<7
MRSA-2	20	18	<7
MRSA-3	20	18	<7
MRSA-4	18	16	<7
MRSA-5	16	15	<7
MRSA-6	19	17	<7
MRSA-7	20	18	<7
MRSA-8	18	16	<7
MRSA-9	17	15	<7
MRSA-10	17	15	<7
<i>S. aureus</i> *	18	16	<7

* : Standard strain

Table 2. Antimicrobial activities of fractions from dichloromethane extract against MRSA

Microorganism	Growth Inhibition / Fraction		
	DCM-1	DCM-2	DCM-3
MRSA-1	-	-	+
MRSA-2	-	-	+
MRSA-3	-	-	+
MRSA-4	-	-	+
MRSA-5	-	-	+
MRSA-6	-	-	+
MRSA-7	-	-	+
MRSA-8	-	-	+
MRSA-9	-	-	+
MRSA-10	-	-	+
<i>S. aureus</i> *	-	-	+

* : Standard strain

고 찰

페니실린이 1928년에 발견되었고 그 이후 여러 종류의 항생제들이 개발되면서 많은 사람들은 항생제 사용으로 감염질환이 없어질 것으로 생각하였으나 항생제 남용을 우려하는 사람들도 있었다. 페니실린을 발견한 Alexander Fleming도 그 중 한 사람으로 1945년 페니실린을 부적절하게 사용하면 필연적으로 내성균이 출현하게 될 것을 경고하였는데 그의 말대로 황색 포도구균 중 페니실린에 내성을 나타내는 비율이 14%이었으나 1950년도에 와서는 59%, 1995년에는 95%로 급격히 증가하였다. 처음에는 병원에 입원한 환자들에게 국한되었던 것이 현재는 전 세계에서 내성균들이 흔하게 발견되고 있다(35).

1988년에는 그람양성균에 대한 가장 강력한 항생제로 알려진 vancomycin에 고도의 내성을 나타내는 장구균이 등장하여 세계를 놀라게 하였고(31) 1997년에는 vancomycin에 대하여 저하된 감수성을 나타내는 황색 포도구균이 일본에서 발견되었고(29), 그 이후 여러 나라에서 vancomycin내성 황색 포도구균이 나타나

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration of DCM-3

Microorganism	Growth Inhibition / Concentration(mg/ml)			
	100	50	25	12.5
MRSA-1	+	+	-	-
MRSA-2	+	+	-	-
MRSA-3	+	+	-	-
MRSA-4	+	+	-	-
MRSA-5	+	+	-	-
MRSA-6	+	+	-	-
MRSA-7	+	+	-	-
MRSA-8	+	+	-	-
MRSA-9	+	+	-	-
MRSA-10	+	+	-	-
<i>S. aureus</i> *	+	+	-	-

*: Standard strain

Table 4. Antimicrobial activity of fractions of DCM-3

Microorganism	Growth inhibition / fraction			
	fraction-1	fraction-2	fraction-3	fraction 1+2+3
MRSA-1	-	-	-	+
MRSA-2	-	-	-	+
MRSA-3	-	-	-	+
MRSA-4	-	-	-	+
MRSA-5	-	-	-	+
MRSA-6	-	-	-	+
MRSA-7	-	-	-	+
MRSA-8	-	-	-	+
MRSA-9	-	-	-	+
MRSA-10	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> *	-	-	-	+

*: standard strain

세계의 의료계는 앞으로의 감염질환 치료에 큰 어려움이 있지 않을까 걱정하게 되었으며 현재와 같은 속도로 균들이 내성을 갖게 된다면 내성균에 의한 감염질환을 치료할 수 없어 작은 상처를 인하여 사람이 사망하는 시대가 도래 할 수 있을 것으로 보고 우려하고 있다.

세계보건기구는 개발도상국에 살고 있는 사람의 80%가 전통 의학에만 의지하고 있다고 추산하였으며 그 대부분이 오래전부터 약효가 있다고 알려진 식물들을 사용하는 것이라고 하였다(25). 감염질환의 치료에도 이런 식물성 약제들이 사용되었고 현재에도 널리 사용되고 있다. 가장 오래된 것은 마늘로 기원전부터 감염질환의 치료에 사용되었고 현재에도 이에 대한 연구논문들이 많이 나오고 있다(20-24, 26, 27, 32, 33).

식물에서 항균 활성이 있는 물질을 추출해 내고 자 하는 연구는 전 세계적으로 오래전부터 진행되어 왔으며 항생제 내성균들이 등장하여 새로운 항생제에 대한 개발요구가 증대됨에 따라 최근 이에 대한 연구는 더욱 활발하게 진행되고 있다. 일본에서는 표고버섯에서 세 가지의 항균활성이 있는 물질을 분리하였다는 보고가 있었고(30), 나이지리아에서는 고염나무 잎과 줄기에서(19), 이집트에서는 꿀에서(35), 짐바브웨에서는 강향단이란 식

물에서(28), 영국에서는 홍차에서(37), 네덜란드에서는 쑥 종류에서 항균물질을 분리하였다는 보고가 있었다(37). 현재에도 수많은 제약회사들과 연구소들은 전 세계로, 특히 다양한 식물들이 자라고 있는 열대지역으로 사람들을 보내어 그곳 사람들이 전통적으로 질병의 치료에 사용되어온 식물들과 그 종자들을 채집하여 연구하고 있으며 한국에 분포되어 있는 식물들과 종자들도 수십 년 전에 이미 채집해 갔다고 한다.

국내에서도 식물성 항균제의 개발연구가 진행되고 있지만 극히 소수이며 대부분 식품보존이나 영양학적, 농화학적 또는 산림 환경학적 차원에서 수행되고 있다. 현재까지 두릅 수피(10), 무화과 잎(1), 유근피(14), 도꼬마리(9), 갯(2), 솔잎(17), 부추(5), 참비름(15), 톨립나무 잎(13), 봉선화(3), 의성개나리 과피(18)등에서 항균물질의 분리가 시도되었고 백두웅(11)과 황금과 황백(7, 8, 16) grapefruit 종자(6) 등 식물 추출물에 항균활성이 있음이 알려져 있다.

본 연구에 사용된 작약은 작약과(Family Paeoniaceae, 전에는 미나리아재비과)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. albiflora* 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(4).

백작약은 감기, 부인병, 소아마비, 이질, 중이염, 창종, 폐결핵 및 홍역의 치료를 위하여 처방되어 왔는데 모두 달이거나 산재로 하여 복용토록 처방되었다. 본 연구에서 물 추출물은 달이지 않고 80°C에서 2시간 동안 추출하였는데 항균활성이 전혀 없었다. Dichloromethane 추출물의 항균활성은 전반적으로 methanol 추출물보다 약간 높았는데 그 차이가 물질의 차이에 의한 것인지 여부는 확인할 수 없었다.

Dichloromethane 추출물을 silica gel chromatography로 분획하여 얻은 3분획 중 항균활성이 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 항균활성이 없었으나 3분획을 모두 혼합하면 항균활성을 나타내었는데 이러한 패턴은 식물추출물들의 특징으로 보인다. Fraction-1, 2, 3이 각각 단독으로는 항균활성이 없으나 혼합하면 MRSA에 대하여 높은 항균활성을 내므로 우선적으로 외용 항균제로 사용할 수 있을 것이며 앞으로의 연구를 통하여 독성 여부와 전신 투여 가능성 여부가 규명된다면 새로운 항균제로서 사용될 가능성이 있다고 판단된다.

참고문헌

1. 강성국, 정희중. 1995. 무화과 잎의 용매분획 및 항미생

- 물 활성. 한국농학회지 38, 289-292.
2. 강성규, 김용두, 박석규. 1995. 갯(*Brassia juncea*) 추출물의 항균물질이 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*의 균체성분의 조성 및 누출에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 24, 280-285.
3. 강수철, 문영희. 1992. 봉선화의 항균활성성분과 항균력에 관한 연구. 생약학회지 23, 240-247.
4. 권혁세. 1998. 작약. p.311, 익생양술, 도서출판 하나로, 서울.
5. 김선재, 박근형. 1996. 부추의 향미생물 활성물질. 한국식품과학회지 28, 604-608.
6. 김영호, 성인화. 2001. Grapefruit 종자 추출물의 MRSA에 대한 항균활성과 안전 성. 대한화학요법학회지 20, 383-394.
7. 김재길. 1997. 황금. p.181, 이주성, 원색천연약물대사전, 하권, 도서출판 남산당, 서울.
8. 김재길. 1997. 황백. p.362, 이주성, 원색천연약물대사전, 상권, 도서출판 남산당, 서울.
9. 김현수, 신재옥. 1997. 한국산 도꼬마리 추출물의 항균효과 및 분리 정제. 한국산업미생물학회지 25, 183-188.
10. 마승진, 고병섭, 박근형. 1995. 두릅수피에서 향미생물 활성을 갖는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 분리. 한국식품과학회지 27, 807-812.
11. 박수현, 성인화. 2000. 백두옹 추출물의 항균활성에 관한 연구. 대한화학요법학회지 19, 383-394.
12. 박주성, 심창주, 정재홍, 이규희, 성창근, 오만진. 1999. 유백피(Ulmi cortex)의 항균활성. 식품영양과학회지 28, 1022-1028.
13. 배기환, 김봉희, 명평근, 변재하. 1990. 충치균에 대한 생리활성 생약성분의 분리 및 약효 평가 (1) 튜우립 나뭇잎의 항균성 성분과 안정성. 약학회지 34, 106-111.
14. 이홍용, 김치경, 성태경, 문태규, 임치주. 1992. 유근피 추출물의 항세균 작용. 한국산업미생물학회지 20, 1-5.
15. 조강진, 이승인, 김영태, 황영수. 1995. 참비름(*Amaranthus mangostinus*)에서 항바이러스성 단백질(AAp29)의 분리 및 특성. 한국농화학회지 38, 528-533.
16. 조성환, 김영록. 2001. *Listeria monocytogenes*에 대한 황금추출물의 항균효과. 한국식품영양과학회지 30, 959-963.
17. 최무영, 최은정, 이은, 임태진, 차배천, 박희준. 1997. 솔잎 추출물의 항균성 검색. 한국산업미생물학회지 25, 293-297.
18. 하형수, 문영희. 1975. 의성개나리 과피 성분의 항진균 작용에 관한 연구(1). 생약학회지 6, 143-147.
19. Adeniyi, B.A., H.A. Odelola, and B.A. Oso. 1996. Antimicrobial potentials of *Diospyros mespiliformis* (Ebenaceae). *Afr. J. Med. Sci.* 25, 221-224.
20. Adetumbi M.A., and B.H. Lau. 1983. *Allium sativum*(garlic)-a natural antibiotic. *Med. Hypothesis* 12, 227-237.
21. Ankri, S., and D. Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of alliin from garlic. *Microbes Infect.* 1, 125-129.
23. Aydin, A., G. Ersoz, O. Tekesin, E. Akcicek, and M. Tuncyurek. 2000. Garlic oil and *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1200-1202.
24. Chen, G.W., J.G. Chung, H.C. Ho, and J.G. Lin. 1999. Effects of the garlic compound diallyl sulphide and diallyl disulphide on arylamine N-acetyltransferase activity in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Appl. Toxicol.* 19, 75-81.
25. Cox, P.A. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations, p. 25-41. In G.T. Prance(ed.), *Ethnobotany and the search for new drugs*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185)
26. Didry, N., M. Pinkas, and L. Dubreuil. 1987. Antibacterial activity of species of the genus *Allium*. *Pharmazie* 42, 687-688.
27. Elnima, E.L., S.A. Ahmed, A.G. Mekki, and J.S. Mossa. 1983. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* 38, 747-748.
28. Grundicz, M., and N. Gaza. 1993. Antimicrobial activity of *Dalergia melanoxylon*. *J. Ethnopharmacol.* 40, 127-130.
29. Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, and S. Hori. 1997. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: Dissemination of heterogeneously resistant strains in Japanese hospital. *Lancet* 350, 1670-1673.
30. Hirasawa, M., N. Shouji, T. Neta, K. Fukushima, and K. Tanaka. 1999. Three kinds of antimicrobial substances from *Lentinus edodes* (Berk) Sing(Shitake, an edible mushroom). *Int. J. Antimicro. Agents.* 11, 151-157.
31. Moellering, R.C. Jr. 1991. The *enterococcus*: A clinical example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother.* 18, 1-12.
32. O'Gara, E.A., D.J. Hill, D.J. and Maslin. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2269-2273.
33. Ross, Z.M., E.A. O'Gara, D.J. Hill, H.V. Sleightholme, and D.J. Maslin. 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 475-480.
34. Stephen, H. B. 1999. Herbal Antibiotics. 1st ed. p. 1-17, Vermont, Storey Book.
35. Wahdan, H.A. 1998. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 26, 26-31.
36. Wallaart, T.E., N. Pras, and W.J. Quax. 2000. Isolation and identification of dihydroartemetic acid hydroperoxide from *Artemisia annula*: A novel biosynthetic precursor of artemisinin. *J. Nat. Prod.* 62, 1160-1162.
37. Yam, T.S., S. Shah, and J.M. Hamilton-Miller. 1997. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea(*Camellia sinensis*) and of tea components. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 169-174.

(Received November 1, 2005/Accepted March 16, 2006)

ABSTRACT : Antimicrobial Activity of the Extracts from *Paeonia japonica* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Sun Hee Shin¹ and Inwha Seong* (¹Department of Pediatrics, College of Medicine, Hallym University, *Department of microbiology, College of Medicine, Korea University)

Dried roots of *Paeonia japonica* were extracted with dichloromethane, methanol and water serially. Silica gel column chromatography and thin layer chromatography were used to separate the fractions with antimicrobial activities, and mass spectrometry was used to determine the mass. Dichloromethane extract showed the highest antimicrobial activity. Dichloromethane extract from *Paeonia japonica* could be a candidate for a new antimicrobial agent against MRSA.