

원 저

Vibrio parahemolyticus에 대한 한방처방『方藥合編』 및 그 단미제의 항균활성에 관한 연구

마진열*, 김진숙*, 신순식*, 정규용**, 박갑주***

*한국한의학연구원, **원광대학교 의과대학 약리학교실, ***건국대학교 유전공학연구소

Abstract

Antimicrobial Activity of Korea Traditional Prescription(Bangyak-Happyon) and Herb Simplexes Extracts to Vibrio parahemolyticus

Jin-Yeul Ma*, Jin-Sook Kim*, Soon-Shik Shin*, Kyu-Yong Jung**, Kap-Joo Park***

*Korea Institute of Oriental Medicine,

**Wonkwang University Medical school Pharmacology, and

***Institute of Genetic Engineering, Konkuk University

Vibrio are become prevailing if superficial temperature of ocean is raised and their activities of area are expanded and most of ocean creatures(fishes, oysters etc) are polluted with vibrio. The one who has taken these polluted fishes and aysters uncooked caused foodpoisoning and diarrhea from Vibrio. Frequencies of these diseases breakout is disposed in westsea shore of Korea. According to ancient and traditional Korean medical book -『Bangyak Happyeon』(Collection of Local Medicines, 1884) - and their single prescribes, we carried out experiment check the activities of natural medicinal effects on Vibrio parahemolyticus.

The prescriptions of trial materials are processed from extraction boiling water and 80% methanol and followed freeze dried and adsorbed to every discs in dosage of 10mg. Gentamycin of 10mg were used for control. The result of compound prescription displayed special diseases in antimicrobial activities of boiling water and MeOH extraction compared with control. In compound prescription, extraction MeOH of Sashinhwan(clear zone : 17mm) presented extraordinaire antimicrobial activity. In single prescription, extraction of boiling water(clear zone : 16mm) and MeOH(clear zone : 18mm) of Fructus Chebulae presented extraordinaire antimicrobial activity. The MBC of Fructus Chebulae extracts was expressed in boiling water(1.28mg/ml) and MeOH(0.64mg/ml).

Keywords : Vibrio parahemolyticus; Diarrhea; 『Bangyak Happyeon』(Collection of Local Medicines); Antimicrobial Activity; Fructus Chebulae; Sashinhwan; MBC(Minimum bactericidal concentration)

1. 서론

비브리오(Vibrio)균은 여름철 해수면의 온도가 상

승했을 때 심해에서 표면까지 그 활동 반경이 넓어 지며 어패류 등에 오염되어 그것을 생식한 사람이

식중독 및 설사 증상에 의해 심한 탈수 현상을 일으키는 질병으로 적절한 치료를 할 때 치사율이 1%이상이며 그 발생 지역이 한국에는 전국적으로 분포되어 있다.^{7,11,12)} 비브리오는 인도 지역에서 수세기 동안 산재했던 질환이며 1997년 여름 강화도 및 서해안 지역에서 비브리오 환자가 발생보고 되었으며, 가을에는 미국산 수입 쇠고기 및 아이스크림류에 이르기까지 설사증을 유발하는 다양한 식중독균이 검출되었다.¹²⁰⁾

장염비브리오(*Vibrio Parahemolyticus*)는 소화 기관의 이상으로 단순한 설사를 일으키기도 하고 혈변이 나타나기도 하며, 장독소를 생성하여 대장염이 유발된다. 또한 상피 세포를 뚫고 조직 내에 침투하여 염증을 유발하며 자궁 수축 및 혈압 강하 호르몬의 일종인 프로스타글라딘(Prostaglandin)에 의하여 발열과 수분의 유출을 촉진한다. 1950년 일본에서 식중독 환자로부터 처음으로 병원균이 분리되었으며, 지금은 장염균의 감염이 세계적인 분포를 이루고 있는 질환이다. 특히 여행을 자주하게 되고 교통수단이 발달되면서 여행지에서 감염되어 목적지에 이르렀을 때 식중독 증세를 나타내는 경우도 적지 않으며, 1996년 일본 열도를 휩쓴 O-157균 역시 설사균의 일종이다.

한의학에서는 임상증상이 서로 다른 설사증을, 다양한 한약 처방들로 치료하여 왔으며, 후대에 걸쳐 널리 보급 발전되어 왔다.^{5,8,10,16)} 한의학의 고유한 처방법은 오랜 기간 안전성 및 그 효능에 대하여 수대에 걸쳐 입증되어 왔으나, 근대에 들어 산업 기술의 발달로 강력한 항생제가 출현하게 되었다.^{14,17,19)} 새로운 항생제의 합성 및 개발에 의하여, 천연약물의 보급과 항살균제 개발에 막대한 영향을 주어 기본적인 연구가 활발히 진행되지 못하였다. 새롭게 개발된 항생제는 우수한 살균 효과 및 생산비 절감으로 인하여 대량 생산 및 대중화가 가능하였으며 인류의 질병 퇴치에 크게 공헌하였다.³⁴⁾ 그러나 근대에 들어 감기, 복통, 두통, 설사, 염증 및 수술후 세균 감염증과 같은 질병 치료 및 일부 음식에 이르기까

지 다양한 항생제의 무분별한 남용으로 인하여 항생제에 대한 세균의 내성이 점차 높아져 질병에 대한 치료 기간이 연장되었으며 질병 치료를 위해 많은 용량의 항생제 복용이 요구되었다.

그 결과 약효 이외의 많은 부작용으로 인하여 기형 유발(Thalidomide, Trimethadione 등), 소아 백혈병(Disappear), 재생불량성 빈혈(Indomethacin), 오심과 구토(Tolmetin), 조기 유산(Trimethadione) 등에 의해 인류에 큰 불행을 남겼으며, 최근에 항살균제의 부작용을 극복하기 위하여 천연 약물 중에서 항 살균 효과가 뛰어난 새로운 신물질을 찾고자 활발히 연구가 진행 중이다.^{6,9,13,18,21)}

이에 본 연구자는 천연 약물의 항생제 개발의 한 부분으로 한의서(방약합편:41처방)에서 내려온 설사증 치료에 대한 처방 및 그 처방에 포함된 단미제를 기본으로 하여 장염비브리오 균을 이용하여 그 치료 가능성을 검토 연구하였다.²⁾

1. 재료 및 방법

가. 재료

본 실험에 사용한 항균성 물질의 추출용 복합 처방은 『방약합편』(Table 1)에 나타난 설사에 관한 처방으로 체설(滯泄) 4처방, 습설(濕泄) 5처방, 한설(寒泄) 4처방, 서설(暑泄) 7처방, 풍설(風泄) 1처방, 허설(虛泄) 6처방, 담설(痰泄) 2처방, 활설(滑泄) 2처방, 주상신설(酒傷農泄) 1처방, 손설(譴泄) 2처방, 비신설(脾腎泄) 7처방 및 그 처방에 포함된 단미제(Table 2-1, 2-2)를 중심으로 항균성을 검색하였으며, 그 실험 재료는 서울 특별시 소재 경동시장에서 한약재를 구입하여 한국한의학 연구원의 본초전공자가 감별하였으며 『방약합편』 처방대로 탕액 및 80% 메탄올 추출하여 시험에 사용하였다.

나. 사용 균주 및 배지

균주는 그람 음성 간균으로 한쪽 끝에 flagella를 가지고 있으며 운동성인 *Vibrio* 속의 *Parahemolyticus*를 국립보건원 세균과에서 분양 받아 실험하였으며

(Table 3), 균 생육 배지는 3% NaCl의 알칼리성 (pH=8.3) 조건의 Nutrient broth(Difco co.)와 agar(Difco co.)를 각각 사용하였고, 항균 활성 배지는 3% NaCl의 알칼리성(pH=8.3) 조건의 Nutrient agar를 사용하였다

Table 3. List of used microorganisms

Gram negative bacillus	Vibrio Parahemolyticus(ATCC17802)
------------------------	-----------------------------------

다. 표준실험균수

표준실험균은 37°C에서 100rpm으로 배양한 것을 일정한 간격으로 채취하여 Elisa reader(Molecular Devices, Spectra MAX340)를 이용하여 Vibrio Parahemolyticus 균의 최대 성장기의 O. D값(550nm, 0.412)을 기준으로 하여 균수를 설정(Fig. 1)하였으며, 사용시 충분히 Mixer한 후 균을 접종하였다.

Table1. List of Korean Traditional Prescription herb complexes introduced to Bang Yak Hap Pyon with the object of treating for diarrhoea.

List of Prescription herb complexes	
1. 체설(滯泄) 인삼양위탕(人蔘養胃湯) 위령(胃苓湯) 평위산(平胃散) 곽향정기산(藿香正氣散)	6. 허설(虛泄) 승양제습탕(升陽除濕湯) 군령탕(君苓湯) 사군자탕(四君子湯) 전씨이공산(錢氏異功散) 전씨백출산(錢氏白朮散) 삼령백출산(參苓白朮散)
2. 습설(濕泄) 위풍탕(胃風湯) 사습탕(瀉濕湯) 삼백탕(三白湯) 만병오령산(萬病五苓散) 오령산(五苓散)	7. 담설(痰泄) 이진탕(二陳湯) 육군자탕(六君子湯)
3. 한설(寒泄) 이중탕(理中湯) 춘택탕(春澤湯) 육주산(六柱散) 치중탕(治中湯)	8. 활설(滑泄) 팔주산(八柱散) 보중익기탕(補中益氣湯)
4. 서설(暑泄) 유령탕(濡苓湯) 향유산(香薷散) 승마갈근탕(升麻葛根湯) 시령탕(柴苓湯) 청서육화탕(淸暑六和湯) 익원산(益元散) 청서익기탕(淸暑益氣湯)	9. 주상신설(酒傷晨泄) 주증황연탕(酒蒸黃連湯)
5. 풍설(風泄) 사청환(瀉靑丸)	10. 손설(飧泄) 창출방풍탕(蒼朮防風湯) 오덕환(五德丸)
	11. 비신설(脾腎泄) 사신환(四神丸) 신기환(腎氣丸) 오적산(五積散) 이신환(二神丸) 삼신환(三神丸) 관전(胃關煎) 황기건중탕(黃芪建中湯)

Table 2-1. List of their single prescribes used for antimicrobial experiment.

Botanical name	Korean name	Frequency	Abbreviation
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	가자(訶子)	3	Tcr
<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.	갈근(葛根)	2	Ptb
<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.	건갈(乾葛)	2	Ptb
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	감초(甘草)	34	Guf
<i>Angelica koreana</i> Max.	강활(羌活)	2	Akm
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	계지(桂枝)	1	Ccb
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	계지(官桂)	7	Ccb
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	육계(肉桂)	3	Ccb
<i>Agastache rugosa</i> Kuntze	곽향(藿香)	4	Akr
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	귤피(橘皮)	2	Cum
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A.	길경(桔梗)	3	Pga
<i>Angelica gigas</i> Nakai	당귀(當歸)	6	Agn
<i>Angelica gigas</i> Nakai	당귀신(當歸身)	1	Agn
<i>Areca catechu</i> L.	대복피(大腹皮)	1	Acl
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	대조(大棗)	2	Zjm
<i>Rheum palmatum</i> L.	대황(大黃)	1	Rpl
<i>Juncus effusus</i> L.	등심(燈心)	2	Jel
<i>Ephedra sinica</i> Stapf	마황(麻黃)	2	Ess
<i>Prunus mume</i> Sieb.	매실(梅實)	2	Pms
<i>Liriope platyphylla</i> Wang	맥문동(麥門冬)	1	Lpw
<i>Hordeum vulgare</i> L.	맥아(麥芽)	1	Hvl
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehn.	모과(木瓜)	1	Cse
<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.	목단피(牡丹皮)	1	Psa
<i>Saussurea lappa</i> Clarke	목향(木香)	5	Slc
<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit	반하(半夏)	7	Ptb
<i>Ledebouriella seseloides</i> Wolff	방풍(防風)	4	Lsw
<i>Poria cocos</i> Wolf	백복령(白茯苓)	11	Pcw
<i>Poria cocos</i> Wolf	적복령(赤茯苓)	14	Pcw
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	백작약(白芍藥)	10	Plp
<i>Angelica dahurica</i> Benth.	백지(白芷)	2	Adb
<i>Atractylodes japonica</i> Koidz	백출(白朮)	2	Ajk
<i>Dolichos lablab</i> L.	백편두(白扁豆)	5	Dll
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx	부자(附子)	2	Acd
<i>Psoralea corylifolia</i> L.	보골지(補骨脂)	1	Pcl
<i>Amomum xanthioides</i> Wall.	사인(砂仁)	3	Axw
<i>Cornus officinalis</i> Sieb.	산수유(山茱萸)	1	Cos

Table 2-2. List of their single prescribes used for antimicrobial experiment.

Botanical name	Korean name	Frequency	Abbreviation
<i>Dioscorea batatas</i> Decne.	산약(山藥)	4	Dbd
<i>Zingiber officinale</i> Rosc	생강(生薑)	6	Zor
<i>Zingiber officinale</i> Rosc	건강(乾薑)	7	Zor
<i>Perilla sikokiana</i> Nakai	소엽(蘇葉)	1	Psn
<i>Rehmannia glutinosa</i> var.	숙지황(熟地黃)	2	Rgv
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom.	승마(升麻)	5	Chk
<i>Bupleurum falcatum</i> L.	시호(柴胡)	2	Bfl
<i>Bupleurum falcatum</i> L.	시호주세(柴胡酒洗)	1	Bfl
<i>Massa medicata</i> Fermentata	신곡(神麴)	2	Bfl
<i>Papaver somniferum</i> L.	앵속각(罌粟殼)	1	Psl
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	연육(蓮肉)	1	Nng
<i>Schisandra sphenanthera</i> Rehd	오미자(五味子)	5	Ssr
<i>Euodia rutaecarpa</i> Benth.	오수유(吳茱萸)	5	Erb
<i>Myristica fragrans</i> Houltt.	육두구(肉豆蔻)	6	Mfh
<i>Coix lachryma-jobi</i> var.	의이인(薏苡仁)	1	Clv
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	인삼(人蔘)	20	Pgm
<i>Polyporus umbellatus</i> Fr.	저령(猪苓)	9	Puf
<i>Aurantii fructus</i>	지각(枳殼)	1	Af
<i>Fraxinus rhyncophylla</i> Hance	진피(陳皮)	14	Frh
<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.	창출(蒼朮)	10	Ajk
<i>Cnidium officinale</i> Makino	천궁(川芎)	5	Com
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	청피(靑皮)	2	Cum
<i>Amomum tsao-ko</i> Crev.	초과(草果)	1	Atc
<i>Gentiana scabra</i>	초롱담(草龍膽)	1	Gs
<i>Allium fistulosum</i> L.	총백(蔥白)	1	Afl
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis.	차자(梔子)	1	Gje
<i>Alisma orientale</i> Juz.	택사(澤瀉)	11	Aoj
<i>Psoralea corylifolia</i> L.	파고지(破故紙)	3	Pcl
<i>Prunus armeniaca</i> var.	행인(杏仁)	1	Pav
<i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hylander	향유(香薷)	3	Ech
Talc	활석(滑石)	2	Tal
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	황금(黃芩)	1	Sbg
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	황기(黃芪)	3	Amb
<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	황백(黃柏)	1	Par
<i>Coptis japonica</i> Makino	황연(黃連)	3	Cjm
<i>Magnolia obovata</i> Thunb.	후박(厚朴)	10	Mot

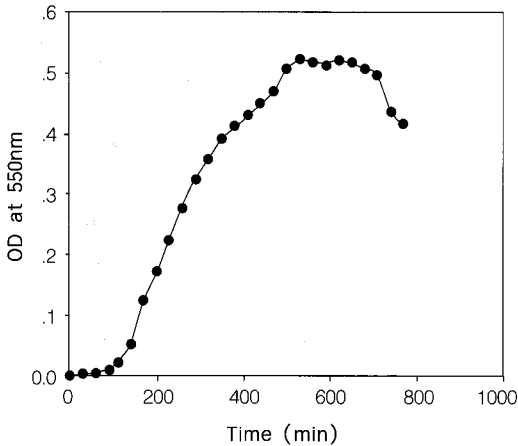


Fig.1. Growth curve of *Vibrio Parahaemolyticus* (ATCC17802)

2. 추출 법

가. 탱액 추출물

탕액추출은 한약 처방 시료에 3차증류수 1,300ml을 넣고 2시간, 30분 동안 약탕기(대응약탕기: DWO-1800T)에서 끓인 후, 표준망체(No.100)를 이용하여 1차 여과하고 고속 원심분리기(Beckman, avanti30)를 이용하여 8,000g에서 15분간 원심 분리하여 2차 여과한 후, 추출액을 감압회전농축기(Buchi RE 121, Switzerland)로 60°C 수욕상에서 감압 농축한 후, 동결건조(Labconco, Preezone 12)하여 사용하였다.

나. 메탄올 추출물

Methanol 추출은 한약 처방 시료에 80% methanol 500ml을 넣고 60도 항온기에서 18시간 침적하여 추출액을 1차 여과(Whatman No.2)하여 8,000g에서 15분간 원심 분리 한 후, 상층액을 감압회전농축기로 60°C 수욕상에서 감압 농축시킨후, 동결건조하여 사용하였다.

다. 추출물의 항균력 측정 방법

(Table 4, Table 5-1, 5-2)

항균력 검색에 사용한 균주는 3% NaCl의 알칼리성 (pH= 8.3) 조건의 Nutrient broth에서 순수 배양된

균을 1ml씩 보관용 tube에 분주하여 deep freezer(-70 °C)에 동결 보관하였으며, 실험시 균을 녹인후 Nutrient broth에 접종후 Shaking incubator(Jeio Tech Co.)내에서 표준실험균이 550nm에서 흡광도가 0.412 될 때까지 배양하여 실험에 사용하였다. 시료의 항균력 활성 검색은 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 측정하였으며 탱액 및 메탄올로 추출하여 동결 건조한 각 시료 고형물 100mg를 칭량하여, 0.8% MeOH용액 1ml에 완전히 녹인 후 0.45µm membrane filter(Sartorius Minisart)로 여과 멸균하여 멸균된 paper disc(6mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)에 100µl씩 흡수 및 건조시킨다. 멸균된 면봉으로 균주배양액을 Nutrient agar에 도말한 후, 충분히 건조된 한약 시료(disc)를 올려놓고 항균력을 측정한다.

배양기내에서 18시간 배양한 후, 디스크 직경(6mm)을 포함한 균성장억제대(clear zone; mm)를 측정하여(Fig.2, Fig.3) 항균력을 비교하였으며 양성 대조군(Positive control)으로 Gentamicin 10mg를 사용하였다.

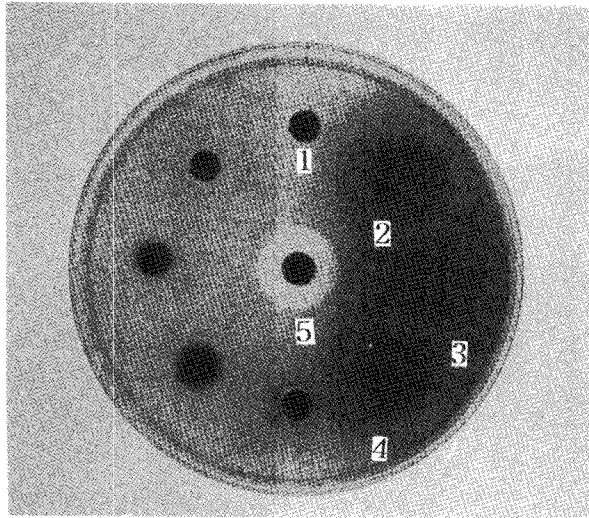


Fig. 2. Antimicrobial activities of Herb simples 80% Methanol extract against *V. parahemolyticus*.

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1: Negative control(Non-treatment) | 2: Fructus Chebulae extract(10mg) |
| 3: Fructus Chebulae(櫻) extract(10mg) | 4: Fructus Chebulae(暑) extract(10mg) |
| 5: Positive control(Gentamicin 10mg) | |

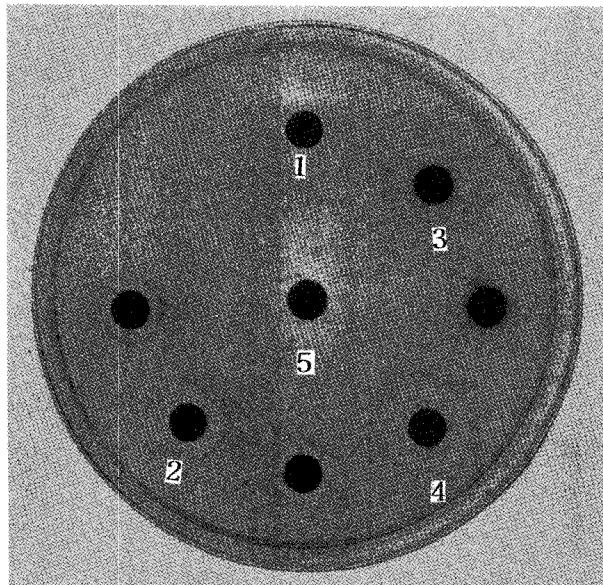


Fig. 3. Antimicrobial activities of Bangyak Happyon prescription 80% Methanol extract against *V. parahemolyticus*.

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1: Negative control(Non-treatment) | 2: Paljusan extract(10mg) |
| 3: Wudochwan extract(10mg) | 4: Sashinhwan extract(10mg) |
| 5: Positive control(Gentamicin 10mg) | |

Table 4. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of the herb complexes (Bang Yak Hap Pyon).

Herb complexes	V. parahemolyticus (Clear zone)	
	CW(mm)	CM(mm)
인삼양위탕(人蔘養胃湯)	-	9
위령탕(胃零湯)	-	10
평위산(平胃散)	8	9
곽향정기산(藿香正氣散)	7	9
위풍탕(胃風湯)	8	10
사습탕(瀉濕湯)	8	11
삼백탕(三白湯)	8	11
만병오령산(萬病五零散)	10	12
오령산(五零散)	-	7
이중탕(理中湯)	-	8
춘택탕(春澤湯)	-	7
육주산(六柱散)	9	8.5
치중탕(治中湯)	8	8
유령탕(薷苓湯)	8	7.5
향유산(香薷散)	7	9
승마갈근탕(升麻葛根湯)	±	9
시령탕(柴零湯)	7	8.5
청서육화탕(淸暑六和湯)	8	8
익원산(益元散)	-	7
청서익기탕(淸暑益氣湯)	7	11
사청환(瀉靑丸)	7.5	-
승양제습탕(升陽除濕湯)	±	8
군령탕(君零湯)	-	7
사군자탕(四君子湯)	±	7
전씨이공산(錢氏異功散)	7	7
전씨백출산(錢氏白朮散)	7	7
삼령백출산(蔘零白朮散)	8	7
이진탕(二陳湯)	8	8
육군자탕(六君子湯)	-	-
팔주산(八柱散)	-	13
보중익기탕(補中益氣湯)	7	8
주증황연탕(酒蒸黃連湯)	9	9
창출방풍탕(蒼朮防風湯)	8	8
오덕환(五德丸)	11	14
사신환(四神丸)	15	17
신기환(腎氣丸)	15	12
오적산(五積散)	-	9
이신환(二神丸)	12	15
삼신환(三神丸)	14	9
위관전(胃關煎)	11	11
황기건중탕(黃芪建中湯)	-	12
Gentamicin:10mg	15mm	15mm

CM : Complexes methanol extract ; CW: Complexes boiling water extract. -: negative ; ±: Trace

Table 5-1. Antimicrobial activities of water and methanol extract of the herb simplexes.

Herb complexes	V. parahemolyticus	
	SW(mm)	SM(mm)
Terminalia chebula Retz.	15	16
Terminalia chebula Retz(煨)	16	18
Terminalia chebula Retz(暑)	15	16
Pueraria thunbergiana Benth.(葛根)	-	-
Pueraria thunbergiana Benth.(乾葛)	-	-
Glycyrrhiza uralensis Fisch.	-	-
Glycyrrhiza uralensis Fisch.(煨)	-	-
Glycyrrhiza uralensis Fisch.(炙)	-	-
Angelica koreana Max.	-	-
Cinnamomum cassia Blume	8	8
Cinnamomum cassia Blume(官桂)	7	-
Cinnamomum cassia Blume(肉桂)	-	±
Agastache rugosa Kuntze	7	7
Agastache rugosa Kuntze(暑)	9	9
Citrus unshiu Markovich	-	-
Platycodon grandiflorum A.	-	-
Angelica gigas Nakai	-	-
Angelica gigas Nakai(身)	-	-
Areca catechu L.	-	7
Zizyphus jujuba Miller	-	-
Rheum palmatum L.	7	9
Juncus effusus L.	7.5	9
Ephedra sinica Stapf	±	-
Prunus mume Sieb.	15	15
Liriope platyphylla Wang	-	-
Hordeum vulgare L.	±	±
Chaenomeles sinensis Koehn.	7	-
Paeonia suffruticosa Andr.	7	7
Saussurea lappa Clarke	-	-
Pinellia ternata Breit	-	-
Ledebouriella seseloides Wolff	-	-
Poria cocos Wolf(白)	-	-
Poria cocos Wolf(赤)	-	-
Paeonia lactiflora Pall	9	13
Paeonia lactiflora Pall(炒)	9	12
Angelica dahurica Benth.	±	-
Atractylodes japonica Koidz	-	-
Atractylodes japonica Koidz(炒)	-	-
Dolichos lablab L.	-	-
Dolichos lablab L.(炒)	-	-
Dolichos lablab L.(暑)	-	-
Aconitum carmichaeli Debx	10	±
Psoralea corylifolia L.	-	-
Amomum xanthioides Wall	-	8
Cornus officinalis Sieb.	7	7
Dioscorea batatas Decne	-	-
Zingiber officinale Rosc(生薑)	-	-

CM: Complexes methanol extract ; CW: Complexes boiling water extract. -: negative ; ±: Trace

Table 5-2. Antimicrobial activities of water and methanol extract of the herb.

Herb complexes	V. parahemolyticus	
	SW(mm)	SM(mm)
Zingiber officinale Rosc(乾薑)	-	-
Zingiber officinale Rosc(炒)	-	-
Zingiber officinale Rosc(炒煨)	-	-
Zingiber officinale Rosc(暑)	-	-
Perilla sikokiana Nakai	-	-
Rehmannia glutinosa var.	-	-
Cimicifuga heracleifolia Kom.	-	-
Bupleurum falcatum L.	-	-
Bupleurum falcatum L.(酒洗)	-	-
Massa medicata Fermentata	-	7
Papaver somniferum L.	-	-
Nelumbo nucifera Gaertn.	-	-
Schisandra sphenanthera Rehd	15	15
Schisandra sphenanthera Rehd(暑)	15	15
Euodia rutaecarpa Benth.	-	8
Euodia rutaecarpa Benth.(暑)	±	8
Myristica fragrans Houtt.	-	-
Myristica fragrans Houtt.(煨)	7.5	-
Coix lachryma-jobi var.	7	7
Panax ginseng Meyer	-	-
Polyporus umbellatus Fr.	±	7
Aurantii fructus	-	-
Fraxinus rhynchophylla Hance	-	-
Fraxinus rhynchophylla Hance(炒)	±	-
Atractylodes japonica Koidz.	-	-
Cnidium officinale Makino	-	-
Citrus unshiu Markovich	-	±
Amomum tsao-ko Crev.	±	8
Gentiana scabra	-	-
Allium fistulosum L.	-	-
Gardenia jasminoides Ellis.	±	-
Alisma orientale Juz.	-	-
Psoralea corylifolia L.	-	7
Psoralea corylifolia L.(酒炒)	-	-
Prunus armeniaca var.	-	-
Elsholtzia ciliata Hylander	±	8
Talc	-	-
Scutellaria baicalensis Georgi	-	8
Astragalus membranaceus Bunge	±	-
Phellodendron amurense Rupr.	±	7.5
Phellodendron amurense Rupr.(酒炒)	-	8
Coptis japonica Makino	7	7.5
Coptis japonica Makino(薑炒)	9	8
Magnolia obovata Thunb.	7	9

CM: Complexes methanol extract ; CW: Complexes boiling water extract. -: negative ; ±: Trace

II. 최소저해농도(MIC) 및 최저살균 농도(MBC) 측정

최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration; Table 6)는 액체배지 희석법으로 균 증식이 없는 농도로 결정하였다. Nutrient broth 액체 배지를 0.5ml씩 분주한 후, 동결 건조한 고형물을 0.8% MeOH용액에 녹인 후 0.5ml을 취하여 각 액체 배지에 2배 계단 희석한다. 균주는 표준실험균

(550nm, 0.412)이 될 때까지 배양한 후, 100배 희석하여 0.5ml씩 시료가 희석된 시험관에 넣은 후 배양기에서 18시간 배양한다. 550nm에서 흡광도를 측정하여 균의 증식이 완전히 억제된 농도를 MIC값으로 결정하였다. 최저살균농도(MBC, minimum bactericidal concentration; Table 7)는 MIC후 Nutrient agar 배지에 백금으로 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 균의 Colony count를 실시하였다.

Table 6. MIC(Minimum inhibitory concentration) of the water and methanol extracts against Vibrio parahemolyticus

Prescription/Dose(mg/ml)	10.24	5.12	2.56	1.28	0.64	0.32
Schisandra sphenanthera Rehd(W)	-	-	-	+	+	+
Schisandra sphenanthera Rehd(M)	-	-	-	+	+	+
Schisandra sphenanthera Rehd(暑:W)-	-	-	-	+	+	+
Schisandra sphenanthera Rehd(暑:M)	-	-	-	+	+	+
Terminalia chebula Retz.(:W)	-	-	-	-	+	+
Terminalia chebula Retz.(:M)	-	-	-	-	-	+
Prunus mume Sieb.(W)	-	-	-	-	+	+
Prunus mume Sieb.(M)	-	-	-	-	+	+
Paeonia lactiflora Pall(W)	-	+	+	+	+	+
Paeonia lactiflora Pall(M)	-	-	+	+	+	+
Sashinhwan(W)	-	-	+	+	+	+
Sashinhwan(M)	-	-	-	+	+	+
Lishinhwan(W)	-	+	+	+	+	+
Wudochwan(M)	-	-	-	+	+	+

+: Turbid ; -: Clear ; M : Methanol extract ; W : Boiling water extract

Table 7. MBC(Minimum bactericidal concentrations) of the water and methanol extracts against Vibrio parahemolyticus.

Prescription/Dose(mg/ml)	10.24	5.12	2.56	1.28	0.64	0.32
Schisandra sphenanthera Rehd(W)	-	-	-	+	+	+
Schisandra sphenanthera Rehd(M)	-	-	-	+	+	+
Schisandra sphenanthera Rehd(暑:W)	-	-	-	+	+	+
Schisandra sphenanthera Rehd(暑:M)	-	-	-	+	+	+
Terminalia chebula Retz.(煨:W)	-	-	-	-	+	+
Terminalia chebula Retz.(煨:M)	-	-	-	-	-	+
Prunus mume Sieb.(W)	-	-	-	-	+	+
Prunus mume Sieb.(M)	-	-	-	-	+	+
Paeonia lactiflora Pall(W)	1*	+	+	+	+	+
Paeonia lactiflora Pall(M)	-	-	+	+	+	+
Sashinhwan(W)	-	-	+	+	+	+
Sashinhwan(M)	-	1*	2*	+	+	+
Lishinhwan(W)	-	+	+	+	+	+
Wudochwan(M)	-	-	3*	+	+	+

+: Positive(many colony) ; -: negative(colony number below 10) ; M: Methanol extract ; W: Boiling water extract ; *: number of colony.

III. 결과 및 고찰

『방약합편』의 복합 처방 41개 및 그 처방에 포함된 단미제 91종에 대하여 *Vibrio parahemolyticus*균을 사용하여 항균활성을 검색하기 위해 디스크 확산 법으로 실험하였다. 복합처방 41개를 탱액 추출한 후 항균활성 측정 결과 30개 처방에서 항균성이 검증되었으며 11개 처방에서 항균력이 나타나지 않았다. 항균력이 측정된 30개 처방 중에서 양성대조구인 Gentamicin 10mg 억제대 15mm보다 큰 항균효과는 2개의 처방에서 나타났다. 단미제의 탱액 추출 항균활성 측정 결과는 91종 중에서 34개에서 항균성이 측정되었고 57개의 한약제에서 항균력이 나타나지 않았다. 항균력이 측정된 34개중 억제대 크기가 15mm 이상의 결과는 6개의 한약제에서 나타났으며 나머지는 15mm이하로 관찰되었다.

80% Methanol로 추출된 한약처방 41개 항미생물활성을 검색한 결과 41개 처방 중에서 39개 처방에서 항균성이 검증되었으며, 대조구보다 뛰어난 항균효과는 신기환 및 이신환 처방에서 측정되었다. 단미제 항미생물 활성 측정결과 91개 한약제 중에서 35개 한약제에서 항균성이 측정되었고 56개의 한약제에서 항균력이 나타나지 않았다. 장염비브리오균에 항균력이 측정된 35개 단미제 중에서 억제대 크기가 15mm 이상은 가자, 매실 및 오미자에서 발견되었으며 나머지 한약제는 15mm이하로 관찰되었다.

*Vibrio parahemolyticus*의 최저살균농도는 탱액 및 메탄올 추출에서 항균력이 높게 측정된 사신환, 오덕환 및 이신환을 colony count로 측정하였으며, 그 결과 사신환 탱액 5.12mg/ml, 메탄올 2.56mg/ml로 나타났으며, 이신환 탱액 추출에서 10.24mg/ml, 오덕환 메탄올 5.12mg/ml에서 살균 효과가 나타났다. 단미제에서는 항균력이 높게 측정된 가자, 매실, 오미자를 colony count로 측정하였으며, 오미자는 탱액 및 메탄올 추출에서 각각 2.56mg/ml로 나타났으며 매실은 1.28mg/ml로 관찰되었다. 가자는 탱액추출에서 1.28mg/ml이며, 메탄올 추출에서는 0.64mg/ml로

각각 다르게 측정되었다. 이 결과로 보아 탱액 추출보다 메탄올 추출에서 더 낮은 농도에서 최저살균농도가 측정되었으며 항균력이 증가된 것을 알 수 있었다.

『방약합편』에서 가자는 맛이 쓴데 창자를 수렴하여 이질을 멈추며 기침 가래 숨찬증을 멎게 한다 하였으며, 오미자는 맛이 쓰고 성질이 따뜻하여 갈증을 멈추고 오랜 기침을 낮게 하고 폐와 신을 보호하며 껍질은 시고 살은 달며 씨는 맵고 쓰다 이것들을 모두 합하면 짠맛을 낸다고 한다. 또한 매실(오매)은 시고 따뜻해 폐기를 잘 수렴하며 갈증을 멎게 하고 진액을 나게 하여 설사 이질을 낮게 한다고 하였다. 따라서 한의학적 처방이란 질병의 종류와 증상에 따라 다양한 생약으로 치료 방법이 서로 달라서 실용적이고 과학적이라 말할 수 있다. 그러므로 고유한 천연 약물 처방법을 토대로 연구 발전하여 신물질 창조 및 다양한 처방법의 개발이 기대된다.

IV. 결 론

비브리오균은 어패류의 표면 등에 오염되어 어패류를 생식한 사람이 식중독 및 설사 증상을 일으키는 질병으로 그 발생 빈도가 한국에는 전국적으로 분포되어 있다. 설사증 치료에 의한 항생제 남용으로 인한 세균의 저항성 증가로 새로운 천연 약물의 신약 개발이 절실히 요구된다. 그에 대한 방편으로 약 116년전인 1884년 해암 황도연선생이 서술한 『방약합편』중 41처방 및 그 처방에 이용된 단미제를 이용하여 장염비브리오균에 대한 항성제 내성 검사를 실시하였으며, 시험 물질 조제 방법은 탱액 및 80% 메탄올로 각각 추출하여 동결 건조한 후, 각 디스크에 10mg으로 흡착하여 사용하였으며 대조 물질로 겐타마이신 10mg을 비교하였다.

그 결과 복합처방은 탱액 및 80%메탄올 추출에서 사신환, 신기환 및 오덕환의 항균활성이 높게 관찰되었으며 단미제는 가자, 오미자, 매실(오매)이 현저

한 항균 효과를 나타내었다.

최저살균농도는 복합처방 사신헌에서 탕액은 5.12mg/ml이고 메탄을 추출에서 2.56mg/ml로 각각 다르게 나타났으며, 가자는 탕액 1.28mg/ml이고, 메탄을 추출에서 0.64mg/ml로 추출방법에 있어서 탕액보다 메탄을 추출에서 항균 효과가 더 높게 관찰되었다. 장염비브리오균에 대한 사신헌, 신기환, 오덕환의 복합처방 및 단미제 가자, 오매(매실), 오미자에서 어떤 성분이 항균 활성을 나타내는 물질인지 앞으로 검토 연구하여야 할 것이다.

색인어 유사장염 비브리오, 설사, 『방약합편』, 항균활성, 오미자, 사신헌, 최저살균농도

참고문헌

- Aihara M., Sakai M., Iwasaki M., Shimakawa K., Kozaki S., Kubo M., Takahashi H. 1991. Isolation of enteropathogenic microorganism from patients with infection of the digestive tract during 1976 to 1988 in Tenri Hospital. Journal of the Japanese Association for Infectious Disease. 65: 864-874.
- Akinsinde KA., Olukoya DK. 1995. Vibriocidal activities of some local herbs. Journal of Diseases Research. 13: 127-129.
- Carlson JR., Thornton SA., DuPont HL., West AH., Mathewson JJ. 1983. Comparative in vitro activities of ten antimicrobial agents against bacterial enteropathogens. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 24: 509-513.
- Clark RB. 1992. Antibiotic susceptibilities of the Vibrionaceae to meropenem and other antimicrobial agents. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 16: 352.
- D. Y. Hwang. 1993. Bangyak-happyon. yo-gang publishment Co. 514.
- Dastidar SG., Jairaj J., Mookerjee M., Chakrabarty AN. 1997. Studies on antimicrobial effects of the antihistaminic phenothiazine trimetazone tartrate. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 44: 241-247.
- Fuchs TM. 1998. Molecular mechanism of bacterial pathogenicity. Naturwissenschaften. 85: 99-108.
- H. J. Jong, I. H. Kim. 1983. Microbiological study of Sochongyong-tang. Seng Yakhak Haeji. 14: 119
- Horiuchi S., Inagaki Y., Yamamoto N., Ogawa M., Nakaya R. 1992. In vitro antimicrobial activity of DR-3355, a new quinolone antibacterial agent, against clinical isolates of enteritis-causing bacteria. Journal of the Japanese Association for Infectious Disease. 66: 51-58
- Joseon medical center. 1992. Dongyi-chobanghak. yo-gang publishment Co. 182
- Kaneko M., Iwashita M. 1987. Antimicrobial susceptibility of Vibrio parahemolyticus and Vibrio alginolyticus isolated from human feces and foods. Journal of the Japanese Association for Infectious Disease. 61: 9-16.
- Korea National Institute of Health. 1996. Dignosis of infectious Disease. 59-63, 141-154. NCCLS. 1993. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 24:13
- O' Hare MD., Felmingham D., Ridgway GL., Gruneberg RN. 1985. The comparative in vitro activity of twelve 4-quinolone antimicrobials against enteric pathogens. Drugs Under Experimental & Clinical Research. 11: 253-257.
- S. C. Hwang. 1983. Clinical microbiology. Shin-gwang publishment Co. 2: 178-182. Sack RB., Rahman M., Yunus M., Khan EH. 1997. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. Clinical Infectious Disease. 24: 102-105.
- Sathiyamurthy K., Purushothaman A., Ramaiyan V. 1997. Antibiotic-resistant Vibrio cholerae in Parangipettai coastal environs, south east India. Microbial Drug Resistance. 3: 267-270.
- Seoul national university, Natural Products Research Institute. 1993. Study of new product from traditional herbs. 9-15.
- Seoul university Medical center, department of pharmacology. 1994. Pharmacology. Koryoyihak. 608.
- Silva O., Duarte A., Pimentel M., Viegas S., Barroso H., Machado J., Pires I., Cabrita J., Gomes E. 1997. Antimicrobial activity of Terminalia macroptera root. Journal of Ethnopharmacology. 57: 203-207.
- Urassa W., Lyamuya E., Mihalu F. 1997. Recent trends on bacterial resistance to antibiotics. East African Medical Journal. 74: 129-133.

20. Y. M. Kim. 1991. Study on Vibrio causing enteritis. Dongyi university. Shikpukwahak-youngui. 141-154.
21. Y. Y. Park, D. S. Jang, H. R. Jo. 1992. Study of antimicrobial activity from traditional herbs. Hankuk yongyang-shikyonghak Hoeji. 91.
22. Yamamoto T., Nair GB., Albert MJ., Parodi CC., Takeda Y. 1995. Survey of in vitro susceptibilities of Vibrio cholerae O1 and O139 to antimicrobial agents. Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 39: 241-244.