

## *Leptospermum scoparium* 추출물중 케톤체 분획물의 항균력 및 항생제와의 병용효과

김은희 · 이계주<sup>#</sup>

충남대학교 약학대학

(Received August 31, 1999)

### Activities of Ketonic Fraction from *Leptospermum scoparium* alone and Synergism in Combination with Some Antibiotics Against Various Bacterial Strains and Fungi

Eun Hee Kim and Gye Ju Rhee<sup>#</sup>

College of Pharmacy Chungnam National University

**Abstract** — Whole oil and ketonic fraction (KF) of *Leptospermum scoparium* have been tested for their antimicrobial activity and combination effect with several antibiotics against various bacterial strains and fungi by using microbiological assay methods. Antibacterial activities of KF against a number of test strains were 2-3 fold stronger than those of whole oil. MICs of the KF were 65~125 µg/ml against seven gram positive bacterial strains, 65~250 µg/ml against 19 methicillin resistance *Staphylococcus aureus* strains, and 65~50 µg/ml against 14 quinolone resistance strains. However, KF showed little or no activity against gram negative bacteria. MICs of the KF were 16~250 µg/ml against more than 50% of the anaerobic bacterial strains tested. KF showed the higher antibacterial activity than bacitracin against 10 strains of *Bacteroides thetaiotaomicron*, or three strains of *Bacteroides ovatus*, and the more active than ciprofloxacin against one strain of *Bacteroides thetaiotaomicron* and three strains of *Bacteroides ovatus*. The MICs of KF was 63 and 250 µg/ml against *Aspergillus niger* and *Candida albicans*, respectively. Antibacterial activities of KF in combination with 19 antibiotics against 14 strains and with four antifungal agents against one fungal strain were determined by paper strip diffusion method. While most of combination showed additivity, KF showed synergism with bacitracin, cefadroxil, cephradine, and meropenem for 29~57% of the strains tested. However, ofloxacin, enoxacin, sparflaxacin showed antagonism with KF for 43~71% of the strains. KF alone and in combination with bacitracin, gentamycin, neomycin, itraconazole, fluconazole, terfenadine and ketoconazole against five bacterial strains or one fungus strain synergistic effect was demonstrated against 33% of strains examined with FIC index value below 0.5 by checkerboard study. Synergistic effect of KF with gentamicin against *Staphylococcus epidermidis* 329 (QRS) was found by time-kill study.

**Keywords** □ *Leptospermum scoparium*, MIC, antifungal activity, synergism.

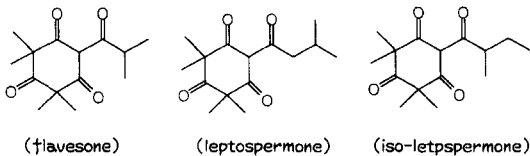
수많은 항생제가 발견되었지만, 기존 항생물질에 대한 다양한 내성균주들의 발현으로 인하여 계속 새로운 항생물질의 개발이 요구되고 있다. 특히, 천연 식물에서의 항생물질 추출에 대한 노력은 주목할 만하다. 최근 20년간 식물을 기초로 한 연구 및 생산품 등이 흥

미를 끌기 시작하였고, 민간요법으로 항균력이 있다고 추정되는 식물들에 대하여 항균력을 검색하고 성분을 추출하거나 구조를 결정하여 새로운 항균물질을 개발하려는 연구가 활발하며, 특히 식물 중의 essential oil의 항균력에 대하여 유럽, 서아시아, 동남아시아, 호주 등에서 활발히 이루어지고 있다. Yousef 등<sup>1)</sup>은 22가지의 volatile oil에 대한 MIC값을 측정하였고, Janssen 등<sup>2)</sup>은 53가지의 essential oil에 대하여 agar

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-821-5932 E-mail: girhee@hanbat.chungram.ac.kr

overlay technique로 5가지 균주에 대한 항균력 실험을 하고, essential oil은 그 휘발성, 수불용성, 구성성분의 복잡성 등으로 인하여 항균력 실험 및 평가의 객관성에 어려움이 많이 수반된다고 전제하고, 실험방법 및 조건 등의 차이에 따라 결과에 차이가 많음을 review 형식으로 보고하였다.<sup>3)</sup> 1980년대 후반부터는 essential oil 성분의 분리 및 이에 대한 항균력 실험이 시도되기 시작하여,<sup>7,8,9,10)</sup> 1996년 Pattnaik 등<sup>4)</sup>은 eucalyptus, lemongrass, palmarosa, peppermint 등의 oil에 대한 항균력을 측정하여 보고하였다. 식물 essential oil의 항균력을 이용한 제품으로 성공한 대표적인 예로는, *Melaleuca alternifolia*에서 추출한 essential oil을 들 수 있다.<sup>5,6,7)</sup> 이 oil은 1949년에 British Pharmacopoeia Codex에 수재 되었다. *Melaleuca alternifolia* oil은 시판 합성 항생제나 살균제에 비하여 항균력이 떨어지지만 천연식물의 추출물이고, oily한 성질로 인하여 피부의 외피층으로의 침투력이 용이한 장점이 있어 매우 유용하고 효과적이어서, 이 제품 산업은 계속 성장하고 있는 상황이다.<sup>8)</sup>

*Leptospermum scoparium*은 정향나무과(Myrtaceae), *Leptospermum*속에 속하는 관목으로 오래 전부터 뉴질랜드의 원주민에 의하여 단독 혹은 다른 약재와의 병용으로 피부질환 혹은 내과질환의 염증치료에 사용되어온 식물로써, 잎과 가지를 수증기 증류하여 추출한 essential oil 안에는 수십 성분이 혼재되어 있다. 성분은 크게 monoterpenes(pinene, myrcene, 1,8-cineole 등), sesquiterpenes, polyketones(flavosone, leptospermone, iso-leptospermone)으로 구성되어 있고, 산지에 따라 성분의 분포에 상당한 차이가 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>9,11,12,13)</sup> 특히, 뉴질랜드의 East Cape에서 수집한 oil에는 polyketones 성분이 다른 지역의 oil에 비하여 다량 함유되어 있고 항균력이 높아서, polyketones 성분이 항균력과 상관성이 있을 것으로 추정된다.<sup>9)</sup>



*Leptospermum scoparium* oil의 성분에 관한 연구는 1940년대부터 시도되었고, 이의 항균력 및 앞으로의 응용 가능성에 대하여 제시한 몇몇 보고들<sup>9~14)</sup>이

있으나, 그 실험균주의 자료가 지극히 한정적이고, 그 중, polyketones에 대한 항균력 실험 자료나 다른 항생제와의 병용효과 등에 관한 체계적 연구는 아직 없다. 이에, 저자 등은 이 oil의 항균력에 관한 전 보고<sup>15)</sup>에 이어, 이 실험에서는 추출한 oil(whole oil)의 분획물, 즉 ketonic fraction(KF)을 가지고 기본균주, 내성균주, 혐기성균주 및 곰팡이균주 등 수십종의 다양한 균주에 대한 항균력을 검색하고, 몇 가지 종류의 항생제와의 병용효과를 paper strip method, checkerboard method, time-kill method 및 well diffusion method 등으로 상승작용 유무를 실험하여, 이의 항균제제로서의 개발가능성을 검토하였다.

**실험방법**

**실험재료** - whole oil 및 ketonic fraction(이 후 KF로 약함) (Tairawhiti Pharm. Ltd., New Zealand), HCO 40 [polyoxyethylene(40E.O) hydrogenated castor oil] (Niccol, Japan), 기타 배지성분 및 시약은 특급 또는 1급시약을 사용하였다.

**항균제 및 항진균제** - *Antibacterial agents*: asiaticoside(Dong-kuk Pharm. Co., Korea), bacitracin (NIH, Korea), cefadroxil, cephalixin, cephradine, ciprofloxacin, enoxacin, imipenem(KRICT, Korea), cefixime, meropenem, sulbactam(KIST, Korea), gentamicin, nalidixic acid, penicillin G, streptomycin, tetracycline, vancomycin(Sigma Chemical Co., USA), Neomycin, ofloxacin(Cheil Pharm. Co., Korea), sparfloxacin(Choong-Oe Chemical Co., Korea), *Antifungal agents*: itraconazole, ketoconazole(Choong-Oe Chemical Co, Korea), fluconazole(Hanmi Jungmil Chemical Co., Korea), terbinafine(Dr. Reddy's Laboratories, India)

**KF의 분석** - HPLC(Waters)에 capillary LC upgrade kit(LC Packings, Netherland)를 장착하고 다음의 조건으로 분리하였다.

< HPLC condition >  
 Column: 300 μm × 25 cm, 5 μm amino(FUS-25-05-NH), Sample: 1:5 dilution of the KF in 80/20 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH, Mobile phase: 50/50 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH  
 Flow rate: 3 μl/min, Injection volume: 0.1 μl, UV detection: 278 nm

### 항균력 실험

**검액제조** - *Leptospermum scoparium*에서 수증기 추출한 essential oil과 그 케톤체 분획물을 가용화 하기 위하여, 시료 1%(w/w), HCO 40을 10%, ethanol 5% 및 증류수로 완전히 투명한 상태를 유지하는 안정한 수 증유형 마이크로에멀전을 제조하여 검액으로 하였다.<sup>16)</sup>

**Whole oil과 KF의 일반균주 및 내성균주에 대한 항균력** - 독일의 Hechst사에서 분양 받은 것을, 한국 화학연구소에서 보존중인 균주를 사용하였다. Table I 과 같이 그람양성균 8개 균주, 그람음성균 14개 균주를 사용하였고, 내성균주는 MRSA 19개, QRS 14개 균주를 사용하였다. 실험방법은 NCCLS에서 정한 방법<sup>17)</sup>에 준하여 실시하였다. 즉, 대상균주를 실험 전담 FEB(Fleisch extract broth)에 접종하여 37°C에서 정치배양하였다. *Streptococcus* 균주에 대하여서는 10% horse serum을 첨가하였다. 충분히 배양된 균주를 희석하여 농도를  $1\sim 5 \times 10^6$  CFU/ml로 조절하였고, broth dilution method를 사용하여 실험하였다. Control, 1%(w/w) whole oil 과 1% KF의 마이크로에멀전을 8번 double dilution을 하였다. 96 well plate에 broth를 80  $\mu$ l씩 multipipette로 분주하고 double dilution 해놓은 실험액을 10  $\mu$ l씩 넣은 후, 준비한 균주액을 10  $\mu$ l씩 접종하여 최종 검액의 농도가 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.63, 7.81( $\mu$ /ml)가 되도록 제조하였다. 37°C에서 18 시간 또는 48 시간 배양 후 육안으로 관찰하여 균주성장을 억제시킨 약물의 최저농도를 MIC로 판정하였다. 이때, 활성성분을 함유하지 않은 마이크로에멀전을 넣은 균액을 대조군으로 하였다.

**KF의 혐기성균주에 대한 항균력 실험<sup>18~20)</sup>** - 혐기성균주로 *Bacteroides* 속 41개 균주(연세대학교 의과대학)를 사용하였고, 배양시 혈액이나 혈청첨가 배지를 사용하였고, broth microdilution method법으로 실험하였다. 각 균주의 agar plate에서 약 5 colonies를 취하여 10% horse serum을 함유한 brucella broth에서 24 시간 배양하였고, 배양한 균액의 균수를  $1\sim 5 \times 10^6$  CFU/ml로 조절하였다. 0.1% KF 마이크로에멀전을 96 well plate에 17 단계로 double dilution 하고 각 균액을 같은 농도로 접종한 후, bactron anaerobic chamber 내에서 48 시간 동안 배양한 후 육안으로 관찰하여 MIC를 확정지었다.

**KF의 항진균력 실험<sup>21,22)</sup>** - *Candida albicans* ATCC

10231, *Aspergillus niger* KCTC 6077, *Trichophyton mentagrophytes* KCTC 6085 등 세 가지 진균에 대하여 적합한 배지에 접종하여 배양한 후, 다시 계대하였다. 그 자란 형태가 유사한 균액을 취하여 멸균증류수로 희석한 후, 균액을 균질화 하였다. 530 nm에서 흡광도가 0.2가 되도록 희석하여 균의 농도를  $1\sim 5 \times 10^5$  CFU/ml로 조절하였다. 농도 구배별로 희석된 검액(0.9 ml)이 담긴 시험관에 균현탁액을 0.1 ml씩 분주한 후 가볍게 vortex mixer로 균일하게 혼합하였다. 35°C에서 1~7일간 배양한 후 육안으로 관찰하여 균이 자라지 않은 농도를 MIC로 판정하였다.

**Paper strip diffusion method<sup>23,24)</sup>에 의한 병용**

**효과** - KF와 기존 항생제와의 상호작용을 관찰하기 위하여 Table IV와 같이 aminoglycosides 3종,  $\beta$ -lactam계 6종 penicillin계 2종, quinolone계 3종, tetracyclin, bacitracin, vancomycin, asiaticoside(*Centella asiatica*의 에탄올 추출물)을 선정하고,<sup>25)</sup> 증류수로 희석하여 1 mg/ml의 농도로 각 항생제 용액을 제조하였고(asiaticoside는 PEG 400으로 희석), 검액은 10 mg/ml 농도를 사용하였다. MIC 실험결과 검액에 대하여 높은 감수성을 보인 균주(MIC 250  $\mu$ g/ml 이하)를 선정하여 1차균주 22종 중에서 4가지, MRSA 19종 중에서 6가지, QRS 14종 중에서 4가지를 사용하였다. 선정 균주를 30°C에서 24 시간 배양한 후 Mueller Hinton(MH) agar에 접종하여  $3\sim 5 \times 10^5$  CFU/ml가 되도록 한 후 실온에서 굳혀 agar plate를 준비하였다. 고압멸균한 두께 0.9 mm, 길이 3 cm, 폭 0.5 cm의 여지를 하나는 기존 항생제 용액에, 또 다른 하나는 검액용액에 충분히 적신 후 45°C dry oven에 약 2 시간 정치하여 완전히 건조시키고, 멸균한 핀셋으로 paper를 집어 균주가 포함된 상기 agar plate 위에 양 filter paper를 90도 각도로 올려놓고, 37°C에서 24 시간 배양 후 나타나는 양상을 통해 두 항생물질간의 병용효과를 판정하였다. KF 용액을 적신 여지와 비교 항생제를 적신 여지가 만나는 부근에 각각의 균주 저지 직경보다 더 큰 저지력을 보이면 그 두 가지 항생제는 상승작용, 단독의 저지력보다 낮은 저지력을 보이면 길항작용, 서로 영향을 미치지 않고 일정한 저지력을 보이면 상가작용으로 판정하였다.

**Checkerboard method에 의한 병용효과<sup>23,26~28)</sup>** -

Paper strip method에서 실험한 항균제들 중 피부의 용연고로 사용되는 neomycin, gentamicin 및 baci-

tracin을 선정하였다(Table V). Paper strip method 실험결과 위에서 선택한 항생제와 상승 혹은 상가작용을 보인 균주로, 일차검색 균주 중 *Staphylococcus aureus* 285 1종, MRSA 중 *Sta. aureus* 694E 1종, QRS 중 *Sta. aureus* 293, *Sta. epidermidis* 329, *Sta. species* 245 3종을 선택하였다. 실험에 공시할 균주의 균락을 FEB에 접종하여 37°C incubator 에서 18 시간 정치 배양한 후 균액 농도를 조절하였다. 실험 균주에 대한 항생제의 MIC를 측정하여 그 결과를 근거로하여 96 well plate 의 8줄의 3 번째나 4 번째 또는 그 사이에 MIC 값이 오도록 2배 단계로 농도를 희석 제조하였다. 검액과 병용 항생제 8단계씩 조제한 각 농도액을 96 well plate 에 직각으로 분주하여 64 가지 다양한 농도 조합이 이루어 지도록 90 µl씩 분주하고, 균액을 모든 well에 20 µl씩 넣어 주었다. 37°C 에서 18 시간 배양 후 나타난 양상을 토대로 하여 병용효과를 예측하였다. 또한, 두 약물의 최적 농도조건을 알아내고 그 때의 농도를 이용하여 FIC(Fractional inhibitory concentration) index를 계산하여 상승효과의 유무를 관찰하였다. FIC는 antimicrobial combination 연구결과 해석시 가장 일반적으로 사용되는 방법으로 가장 효과적인 조합에서의 FIC 값의 합이다.

$$FIC = \frac{(A)}{MIC_A}$$

(A): the concentration of drug A in a well that is the lowest inhibiting concentration in its row.

$MIC_A$ : the MIC of organism to drug A alone.

$$FIC_{index} = FIC_A + FIC_B = \frac{(A)}{MIC_A} + \frac{(B)}{MIC_B}$$

이 때, FIC index가 0.5이하이면 상승작용, 2.0이상이면 길항작용, 그 사이 값이면 상가작용으로 판정하였다.

항진균제와의 병용효과 실험<sup>29-30)</sup>에서는 Table VII 과 같이, 현재 많이 사용되고 있는 itraconazole, ketoconazole, fluconazole, terbinafine 등 4가지 항진균제를 선정하고, 실험 진균은 *Candida albicans* ATCC 10231 을 사용하였다. 배지로는 Azole 환을 포함하는 진균제에 적합한 casein yeast-extract

glucose medium(CYG broth)을 사용하였다. 4가지 항진균제를 물과 DMSO의 비율을 적당히 조절하여 용해시킨 후 CYG broth로 2배 농도 구배로 희석하여 최종 약물농도가 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 µg/ml이 되도록 제조하였다. KF 검액의 최종 농도는 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.25, 0.13, 0.06 µg/ml로 하여 앞의 broth dilution method와 동일한 방법으로 실험하였다.

**Time kill method에 의한 병용효과<sup>28,31,32)</sup>** - 항균제가 없는 용액을 control로하고, 검액, gentamicin, bacitracin, neomycin을 각 균주에 대해 결정된 MIC의 40배가 되도록 각각 준비하여, 배지, 균액과 섞이면 최종농도는 MIC의 4배가 되도록 하였다. *Sta. aureus* 285(1차검색균주), *Sta. aureus* 694(MRSA), *Sta. aureus* 293(MRSA), *Sta. epidermidis* 329 (QRS), *Sta. species* 245(QRS)균주를 MH broth에서 1일밤 배양한 후 0.1 ml를 취하여 10 ml FEB에 넣고 shaking water bath 내에서 37°C를 유지하면서 2~3 시간 정도 배양하여 log phase 상태가 되도록 하였다. 이 균액을 취해 농도  $1 \sim 5 \times 10^7$  CFU/ml가 되도록 제조하였다. FEB 1.7 ml에 MIC의 40배 농도의 각 항진균제 용액 0.2 ml, 균액 0.1 ml을 test tube에서 혼합하여 잘 섞이도록 15초간 vortex-mixer 상에서 섞어주었다. 총 부피가 2 ml가 되므로 항생제는 MIC의 4배가 된다(실험용액). 이 용액을 바로 100 µl 취한 뒤, 잔여 항생제의 영향을 받지 않도록 적절히 희석하여, 미리 제조하여 굳혀놓은 agar plate에 도말하여 37°C 에서 24 시간 배양 후 colony 개수를 ml당 CFU로 환산하여 0 시간에서의 균의 농도로 하였다. 이 실험 용액은 계속 shaking water bath에서 37°C 상태로 유지시켜 주면서 2, 4, 6, 24 시간 후에 100 µl씩 취하여 희석한 후 plate에 접종시켜 24 시간 배양 후 균의 농도를 측정하였다. 100 µl씩 취하여 plate에 도말할 때 각 sample당 plate를 5 개 준비하여  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 와 같이 10 배 구배로 희석하고 도말하여 잔여 항생제의 영향을 줄이고, 또한 24 시간 배양 후 읽기에 적당한 plate를 취하여 colony 개수를 세어 결과를 환산하였다.

항진균제와의 병용실험시에는 항진균액은 fluconazole, 곰팡이 균주는 *Candida albicans* ATCC

10231에 대하여 동일한 방법으로 실험하였다.

**저지원 형성 실험 (Inhibition zone test)에 의한 병용효과** - 일차 검색균주인 *St. aureus* 285, MRSA인 *S. aureus* 694, QRS 균주인 *S. aureus* 293 3가지 균주에 대하여 실험하였다. Bacitracin, gentamicin 및 neomycin을 각 실험 균주에 대하여 MIC의 4배 용액을 제조하여 사용하였다. KF는 625, 1250, 2500, 5000 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도의 용액을 만들었다. 또한 위의 3가지 항생제 및 4가지 KF용액의 2배 높은 농도의 용액을 제조한 후, 각 항생제와 KF용액을 1:1로 혼합하여 한 균주에 대하여 4가지 농도의 혼합용액을 제조하고 MH agar 150 ml에 균주 1.5 ml를 첨가한 후 plate에 분주하여 굳혔다. 이때 평판의 고체배지 두께는 FAO(Food and Agriculture Organization)방법에 따라 4 mm로 하였다. 약 30 분 굳힌 후 suction을 이용하여 직경 4 mm의 구멍을 일정 간격을 두고 한 plate 당 9개씩 뚫어 주었다. 각 구멍에 항생제 용액, 4가지 농도의 KF용액, 항생제와 4가지 농도의 KF 용액의 각각 혼합용액을 10  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 주었다. 약물이 배지로 퍼지도록 1 시간 동안 4°C에서 정지시킨 후 37°C incubator에서 24 시간 배양 후 균주 성장저지 직경을 측정하였다. 균저지 직경을 microcaliper로 측정하고, 항생제와 KF용액을 단독처리한 경우의 균저지 직경중 더 큰 저지력을 보인 경우의 직경과 두 가지 혼합용액 처리시 나타난 균저지 직경을 비교하여 혼합용액의 경

우 단독용액에 비하여 증가된 직경을 백분율 (%)로 나타내었다.

## 실험결과 및 고찰

**KF의 HPLC 분석결과** - 3가지 peak(retention time : 15, 17, and 22 min)로 분리 되는 결과를 보여 구입한 시료가 세 가지 성분의 혼합물임을 확인하였다.

**일반균주 및 내성균주에 대한 KF와 whole oil의 항균력 비교** - 그람 음성 및 양성 기본균주에 대하여 감수성 실험을 실시한 결과(Table I) whole oil 보다는 ketonic fraction의 경우가 한 단계 혹은 두단계 정도 낮은 MIC 값을 보였다. 그람 양성균에는 효과가 거의 없었고, 그람 양성균에서 65~500  $\mu\text{g/ml}$ 의 효과를 나타내었으며, 대조 항생제 gentamicin 보다 높은 MIC 결과를 보였다. MRSA 및 QRS에 대한 결과도 KF가 whole oil 보다 높은 감수성을 나타내었고, MIC는 65~500  $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

**혐기성 균주에 대한 KF의 항균력** - 20개의 *Bacteroides fragilis* 분리균주에 대하여 KF는 ciprofloxacin (6.25~100  $\mu\text{g/ml}$ ), gentamicin(50~100  $\mu\text{g/ml}$ ) 보다는 높은 MIC 값(32~1000  $\mu\text{g/ml}$ )을 나타내었으나, 10개의 *B. thetaiotaomicron* 분리균주에 대하여는 16~63  $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC 값을 나타내어 gentamicin의 MIC 값인 100  $\mu\text{g/ml}$  보다 낮았으며, 이 중 3개 균주에 대

**Table I** - Antibiotic activities of whole oil and KF from *Leptospermum scoparium* and gentamicin against primary strains, MRSA, and QRS

	Strains (no. of isolates)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		Whole oil	KF <sup>c</sup>	Gentamicin	
primary strains	G(+)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (2)	250	125	3.13
		<i>Streptococcus faecium</i> (1)	125	65	12.50
		<i>Streptococcus mutans</i> (1)	250	125	50
		<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	125~250	125	0.10~0.39
		<i>Actinomyces viscosus</i> (1)	500	500	25
	G(-)	<i>Escherichia coli</i> (5)	>1000	>1000	0.39~0.78
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	>1000	>1000	0.39~1.56
		<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	>1000	>1000	0.39
		<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	>1000	>1000	0.78
		<i>Klebsiella aerogenes</i> (1)	>1000	>1000	0.78
	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	>1000	>1000	0.39	
MRSA <sup>a</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> (19)	125~500	65~250	0.39~1.56	
QRS <sup>b</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> (9)	500	250~500	>100	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (4)	125~500	65~250	12.5~>100	
	<i>Staphylococcus species</i> (1)	500	250	3.1	

MIC of the control (microemulsion without KF) was >1000  $\mu\text{g/ml}$  in every case.

<sup>a)</sup>methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. <sup>b)</sup>quinolone resistant strain. <sup>c)</sup>ketonic fraction.

**Table II** – Antibiotic activities of KF from *Leptospermum scoparium*, gentamicin, and ciprofloxacin against anaerobic bacteria<sup>a)</sup>

Strains (no. of isolates)	MIC (µg/ml)		
	KF <sup>b)</sup>	Gentamicin	CPF <sup>c)</sup>
<i>Bacteroides fragilis</i> (20)	32~1000	100	6.25~100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (10)	16~63	100	12.5~100
<i>Bacteroides ovatus</i> (4)	32~250	100	25~>100
<i>Bacteroides vulgatus</i> (4)	250~500	100	50~>100
<i>Bacteroides distasonis</i> (3)	500~1000	50~100	6.25

MIC of the control (microemulsion without KF) was >1000 µg/ml in every case. <sup>a)</sup>The test organism was cultured in brucella broth containing 10% horse serum. <sup>b)</sup>ketonic fraction. <sup>c)</sup>ciprofloxacin.

해서는 ciprofloxacin보다 높은 항균력을 보였다 (Table II). KF는 *B. ovatus* 4가지 분리균주에 대하여 32~250 µg/ml의 MIC 값을 보였고, 그 중 3 가지 분리균주에 대해서는 gentamicin(100 µg/ml) 이나 ciprofloxacin(50~>100 µg/ml) 보다 낮은 결과를 보여, KF가 더 높은 항균력을 나타내었다. 그 외, *B. vulgatus* 4 가지 분리균주에는 250~500 µg/ml, *B. distance* 3가지 분리균주에는 500~1000 µg/ml의 범위를 갖는 MIC 값을 나타내었다.

**KF의 항진균력** - 3가지 진균에 대한 MIC 실험결과를 Table III에서 보는데와 같이 진균에 대한 항균력 역시 whole oil 보다 KF가 더 높았다. *Candida albicans*에 대하여 KF의 MIC는 250 µg/ml 이었고, *Aspergillus niger*에 대하여 63 µg/ml인 반면에 피부 사상균인 *Trichophyton mentagrophytes*에 대하여 실험한 농도범위에서는 효과가 관찰되지 않았다.

**Table III** – Antibiotic activities of whole oil and KF from *Leptospermum scoparium* against fungi

Strains	MIC (µg/ml)	
	Whole oil	KF <sup>c)</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <sup>a)</sup>	500	250
<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6077 <sup>b)</sup>	125	63
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> KCTC 6085 <sup>b)</sup>	>1000	>1000

MIC of the control (microemulsion without KF) was >1000 µg/ml in every case.

<sup>a)</sup>Sabouraud dextrose media was used. <sup>b)</sup>potato dextrose media was used. <sup>c)</sup>ketonic fraction.

**Paper strip diffusion method에 의한 항생제와의 병용 효과** – Table IV의 결과와 같이, 상승작용 또는 상가작용을 가장 많이 볼 수 있었다. 그 판단이 애매한 경우는 모두 상가작용으로 결정하였다. KF와 bacitracin과의 병용 시에 14가지 균주 중 *St. aureus* 503 등 8가지에 대하여 상승작용이 있었고,

**Table IV** – Representative results of combination effect of KF<sup>a)</sup> and several antibiotics using paper strip diffusion method

strains	Antibiotics <sup>b)</sup>	Gentamicin	Neomycin	Streptomycin	Cephadroxil	Cefalexin	Cephradin	Cefixime
G(+)	<i>Streptococcus pyogenes</i> 308A	A <sup>c)</sup> 6 <sup>d)</sup> · 6 <sup>e)</sup>	A 5 · 12	A 4 · 4	A 5 · 12	A 5 · 13	A 4 · 12	A 4 · 12
	<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 10449	A 5 · 10	A 8 · 8	A 6 · 5	A 5 · 15	A 6 · 20	A 6 · 20	A 7 · 15
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285	A 9 · 10	S 7 · 1	A 7 · 2	A 9 · 10	S 9 · 9	A 9 · 8	A 8 · 7
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503	A 5 · 11	A 5 · 1	S 5 · 3	A 5 · 13	A 5 · 13	A 6 · 9	A 5 · 8
MRSA <sup>d)</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 265E	A 6 · 8	A 4 · 5	A 5 · 0	S 5 · 11	S 6 · 10	S 6 · 11	A 6 · 11
	<i>Staphylococcus aureus</i> 694E	S 6 · 9	A 6 · 1	A 6 · 0	A 6 · 10	A 6 · 10	A 6 · 9	S 6 · 4
	<i>Staphylococcus aureus</i> 701E	A 7 · 10	A 7 · 2	A 6 · 0	S 7 · 3	A 7 · 18	A 6 · 4	A 6 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 703E	A 6 · 11	A 6 · 3	A 7 · 0	S 7 · 3	A 6 · 19	A 7 · 2	A 8 · 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> 705E	A 6 · 10	A 6 · 4	A 6 · 3	A 7 · 12	A 4 · 23	A 6 · 11	A 5 · 6
	<i>Staphylococcus aureus</i> 708E	A 5 · 8	A 5 · 1	A 5 · 0	S 5 · 2	A 4 · 16	A 6 · 3	S 5 · 0
QRS <sup>e)</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 293	S 5 · 2	A 5 · 1	A 4 · 0	A 4 · 5	A 4 · 15	A 4 · 5	S 4 · 1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 319	A 4 · 4	A 4 · 0	A 4 · 0	S 5 · 0	A 4 · 4	S 5 · 3	A 6 · 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 329	A 6 · 2	A 5 · 0	A 5 · 5	S 5 · 5	S 6 · 7	S 5 · 7	A 7 · 2
	<i>Staphylococcus species</i> 245	S 5 · 5	S 5 · 0	A 4 · 0	S 5 · 0	A 3 · 15	S 4 · 5	S 4 · 1

All experiments were carried out triplicate and the same patterns were obtained.

<sup>a)</sup>ketonic fraction. <sup>b)</sup>1%(w/w) KF and 1 µg/ml antibiotics were used in this study.

<sup>c)</sup>'A', 'S' and 'An' mean additivity, synergism, and antagonism, respectively.

<sup>d)</sup>Inhibition diameter(mm) of KF. <sup>e)</sup>Inhibition diameter(mm) of antibiotics.

<sup>f)</sup>methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. <sup>g)</sup>quinolone resistant strains(continued on following page)

Table IV - Continued

strains	Antibiotics <sup>a)</sup>						
	Imipenem	Meropenem	PenicillinG	Sulbactam	Tetracyclin	Bacitracin	
G(+)	<i>Streptococcus pyogenes</i> 308A	A <sup>b</sup> 5 <sup>c</sup> · 18 <sup>d</sup>	A 513	A 4 · 18	S 5 · 1	A 5 · 1	A 5 · 6
	<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 10449	A 6 · 20	A 6 · 9	An 6 · 6	A 4 · 5	A 7 · 7	A 7 · 7
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285	A 8 · 21	A 8 · 11	A 8 · 5	A 8 · 1	A 8 · 8	A 9 · 6
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503	A 6 · 22	A 5 · 8	A 6 · 5	A 6 · 1	A 5 · 9	S 5 · 5
MRSA <sup>e</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 265E	A 5 · 25	S 5 · 13	A 5 · 15	S 5 · 1	A 6 · 7	S 6 · 7
	<i>Staphylococcus aureus</i> 694E	A 6 · 19	An 6 · 10	A 6 · 10	A 6 · 0	A 6 · 7	S 6 · 4
	<i>Staphylococcus aureus</i> 701E	A 7 · 18	A 6 · 6	A 6 · 2	A 6 · 0	A 6 · 8	A 8 · 10
	<i>Staphylococcus aureus</i> 703E	A 6 · 19	A 7 · 4	A 7 · 3	A 7 · 0	A 7 · 8	A 7 · 6
	<i>Staphylococcus aureus</i> 705E	A 4 · 23	An 6 · 12	A 7 · 14	A 6 · 3	A 6 · 8	A 5 · 10
	<i>Staphylococcus aureus</i> 708E	A 4 · 16	A 6 · 5	A 5 · 2	A 5 · 1	A 5 · 7	S 4 · 5
QRS <sup>f</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 293	A 4 · 15	A 4 · 7	A 4 · 4	A 4 · 0	A 5 · 2	S 6 · 5
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 319	A 4 · 4	S 5 · 0	S 6 · 1	S 5 · 0	An 4 · 4	S 4 · 5
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 329	S 6 · 7	S 7 · 2	A 6 · 6	A 5 · 5	A 5 · 3	S 5 · 4
	<i>Staphylococcus species</i> 245	A 3 · 15	S 4 · 1	S 4 · 1	A 4 · 0	An 4 · 4	S 5 · 6

All experiments were carried out triplicate and the same patterns were obtained.

<sup>a)</sup>1% (w/w) KF and 1 mg/ml antibiotics were used in this study.

<sup>b)</sup>'A', 'S' and 'An' mean additivity, synergism, and antagonism, respectively.

<sup>c)</sup>Inhibition diameter (mm) of KF. <sup>d)</sup>Inhibition diameter (mm) of antibiotics.

<sup>e)</sup>methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. <sup>f)</sup>quinolone resistant strains.

Table IV - Continued

strains	Antibiotics <sup>a)</sup>						
	Vancomycin	Ofloxacin	Nalidixic acid	Enoxacin	Sparfloxacin	Asiaticoside	
G (+)	<i>Streptococcus pyogenes</i> 308A	A <sup>b)</sup> 5 <sup>c)</sup> · 8 <sup>d)</sup>	A 6 · 9	S 5 · 0	A 5 · 5	A 4 · 10	A 5 · 0
	<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 10449	A 7 · 12	An 7 · 15	A 5 · 0	A 5 · 8	A 6 · 5	A 7 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285	A 7 · 7	An 7 · 15	A 7 · 5	An 5 · 11	A 8 · 15	A 8 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503	A 5 · 8	An 5 · 14	A 5 · 5	An 5 · 11	A 5 · 14	A 6 · 0
MRSA <sup>e)</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 265E	S 6 · 7	An 5 · 15	A 6 · 3	An 5 · 9	A 6 · 16	A 6 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 694E	A 7 · 7	A 6 · 13	A 7 · 4	An 5 · 9	A 6 · 14	A 7 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 701E	A 7 · 8	An 7 · 9	A 7 · 3	An 6 · 7	An 7 · 14	A 6 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 703E	A 7 · 8	An 6 · 12	A 7 · 4	An 6 · 8	A 7 · 15	A 6 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 705E	A 7 · 8	An 5 · 13	A 7 · 4	An 6 · 8	An 6 · 15	A 7 · 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> 708E	A 5 · 7	An 5 · 7	A 6 · 2	An 4 · 8	An 5 · 14	A 6 · 0
QRS <sup>f)</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> 293	A 4 · 6	An 5 · 4	A 6 · 5	A 4 · 2	An 4 · 6	A 4 · 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 319	S 5 · 7	A 4 · 2	S 6 · 0	A 5 · 3	An 5 · 7	A 4 · 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 329	A 5 · 7	An 5 · 2	S 6 · 0	A 5 · 2	A 6 · 6	A 5 · 0
	<i>Staphylococcus species</i> 245	S 4 · 8	A 4 · 1	A 6 · 0	A 4 · 0	An 4 · 5	A 5 · 0

All experiments were carried out triplicate and the same patterns were obtained.

<sup>a)</sup>1% (w/w) KF and 1 mg/ml antibiotics were used in this study.

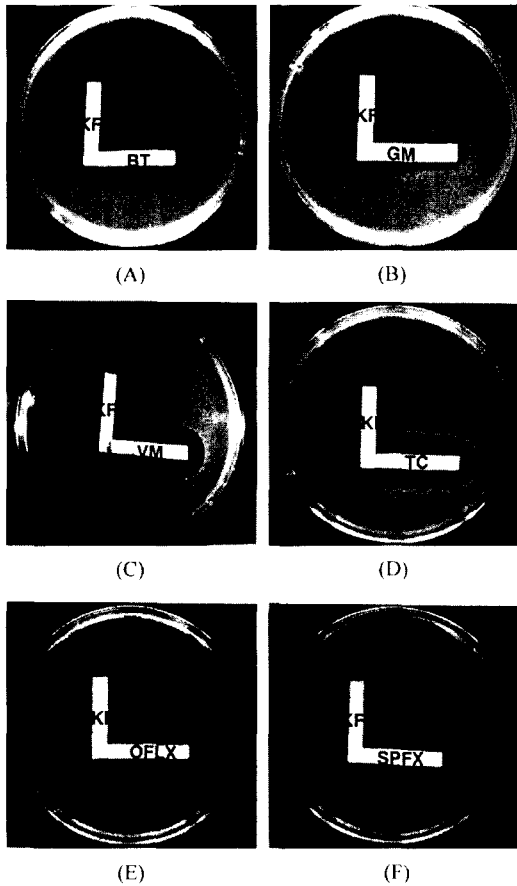
<sup>b)</sup>'A', 'S' and 'An' mean additivity, synergism, and antagonism respectively.

<sup>c)</sup>Inhibition diameter (mm) of KF. <sup>d)</sup>Inhibition diameter (mm) of antibiotics.

<sup>e)</sup>methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. <sup>f)</sup>quinolone resistant strains.

cephadroxil, cefixime, ceftazidime, meropenem 등과 병용 시에는 *Sta. species* 245(QRS) 등 4가지 이상의 균주에 대하여 상승작용을 나타내었다. KF와 ofloxacin, enoxacin, sparfloxacin의 항생제와의 병용에서는, *Sta. aureus* 701E(MRSA)등 각각 10가지, 8가지 및 6가지의 균주에 대하여 길항작용을 나타내었

다. Gentamicin, neomycin, streptomycin, vancomycin과의 병용시에는 대부분의 균주에 대하여 상승작용의 양상을 나타내었다. Imipenem이 전반적으로 모든 실험균주에 대하여 가장 큰 저지력을 보였으며, asiaticoside의 경우는 실험농도에서 균주저지 능력이 나타나지 않았다. 상승작용, 상승작용, 길항작용은 대



**Fig. 1** - Representative plates showing synergism (A, B), additivity (C, D) and antagonism (E, F) by paper strip diffusion method. (A); *Staphylococcus* species 245 (QRS) exposed to KF (10 mg/ml) and bacitracin (BT, 1 mg/ml). (B); *Staphylococcus aureus* 293 (QRS) exposed to KF (10 mg/ml) and gentamicin (GM, 1 mg/ml). (C); *Staphylococcus aureus* 265 (MRSA) exposed to KF (10 mg/ml) and of vancomycin (VM, 1 mg/ml). (D); *Staphylococcus aureus* 694 (MRSA) exposed to KF (10 mg/ml) and tetracyclin (TC, 1 mg/ml). (E); *Staphylococcus epidermidis* 329 (QRS) exposed to KF (10 mg/ml) and ofloxacin (OFLX, 1 mg/ml). (F); *Staphylococcus* species 245 (QRS) exposed to KF (10 mg/ml) and sparfloxacin (SPFX, 1 mg/ml).

표적인 결과(plate)에서 보는바와 같이 명확하게 구분되었다(Fig. 1).

**Checkerboard method에 의한 항생제와의 병용효과** - 선택한 균주 5가지에 대한 세가지 항생제와 KF의 MIC는 Table V와 같다. KF와 bacitracin을 농도별로 조합하여 실험한 결과(Table VI), MRSA인 *Sta.*

**Table V** - MICs of KF and other antibiotics against selected strains for checkerboard method

Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a)</sup>			
	KF <sup>b)</sup>	BT <sup>c)</sup>	GM <sup>d)</sup>	NM <sup>e)</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> 285 <sup>f)</sup>	125	25	0.391	100
<i>Staphylococcus aureus</i> 694 E <sup>g)</sup>	125	25	0.391	100
<i>Staphylococcus aureus</i> 293 <sup>h)</sup>	250	12.5	>200	200
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 329 <sup>h)</sup>	250	25	12.5	100
<i>Staphylococcus</i> species 245 <sup>h)</sup>	250	100	3.13	200

<sup>a)</sup>The MICs were determined by the broth dilution method using Muller-Hinton medium. <sup>b)</sup>ketonic fraction. <sup>c)</sup>bacitracin. <sup>d)</sup>gentamicin. <sup>e)</sup>neomycin. <sup>f)</sup>gram positive strain. <sup>g)</sup>methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. <sup>h)</sup>quinolone resistant strain.

*aureus* 694 E와 QRS인 *Sta. species* 245에 대하여 FIC index 0.5, KF와 gentamicin 병용시 *Sta. aureus* 694 E와 *Sta. species* 245에 대하여 0.5, KF와 neomycin과의 병용시 *Sta. species* 245에 대하여 0.38로 상승작용이 관찰되었다. *Sta. aureus* 293은 실험시 사용한 gentamicin의 최고농도인 800  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 감수성을 보이지 않아 정확한 FIC index를 구할 수 없었으나, 실험농도 범위내에서는 FIC index 값이 0.5~0.52로 계산되어 상가작용으로 판단되었다. 그 이외의 균주 들에 대한 결과도 모두 FIC index가 1.0 이하로 상가작용을 나타내었다.

실험결과 중에서 80%(12/15)의 경우 paper strip 실험결과와 일치하였고(Table VI), 나머지(3/15)는 paper strip에서는 상승작용을 보였으나 checkerboard 실험결과는 상가작용을 나타내었다. Checkerboard method가 농도조합별로 병용효과를 볼 수 있어서 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있었다.

**Checkerboard method에 의한 항진균제와의 병용효과** - 네가지 항진균제와 KF의 *Candida albicans* ATCC 10231에 대한 MIC는 Table VII과 같았다. 병용효과 실험결과 FIC index 값과 가장 효과적인 조합을 보인 well에서의 KF와 항진균제의 농도를 구하면 Table VIII과 같다. Itraconazole의 경우 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상의 실험이 불가하였으나 10  $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도는, 상가작용으로 판단되었다. KF와 terbinafine의 병용시 FIC index가 0.38, KF와 fluconazole의 병용시 FIC index 는 0.5로 상승작용을 나타내었다.

**Time-kill method에 의한 항균력 및 항균제와의 병용효과** - 그람 양성균주인 *Sta. aureus* 285에 대하여 세가지 항생제와 KF 단독액, 그리고 세가지 항생제와 KF를 각각 병용시 모든 경우 24시간까지 항균



**Table VI** – Results of checkerboard studies against five Staphylococcal strains and comparison with that of paper strip method

Strains	KF <sup>a)</sup> +bacitracin			KF+gentamicin			KF+neomycin		
	PS <sup>b)</sup>	FIC index	LC <sup>c)</sup>	PS	FIC index	LC	PS	FIC index	LC
<i>Staphylococcus aureus</i> 285 <sup>d)</sup>	A	0.63 (A)	78/3.13	A	0.63 (A)	20/0.195	S	0.75 (A)	39/50
<i>Staphylococcus aureus</i> 694 <sup>e)</sup>	S	0.50 (S)	39/25	S	0.50 (A)	39/0.195	A	1.00 (A)	78/50
<i>Staphylococcus aureus</i> 293 <sup>d)</sup>	S	0.56 (A)	20/3.13	S	0.50~0.52 (S-A)	157/12.5	A	1.00 (A)	157/50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 329 <sup>d)</sup>	S	0.63 (A)	157/3.13	A	0.75 (A)	157/6.25	A	1.00 (A)	157/100
<i>Staphylococcus species</i> 245 <sup>d)</sup>	S	0.50 (A)	78/25	S	0.50 (S)	157/3.13	S	0.38 (A)	78/25

<sup>a)</sup>ketonic fraction. <sup>b)</sup>results of paper strip method (A; additivity, S; synergism)

<sup>c)</sup>the lowest concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) of each compound in the best combination (concentration of KF/antibiotic). <sup>d)</sup>gram positive strain.

<sup>e)</sup>methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. <sup>f)</sup>quinolone resistant strains.

**Table VII** – Antifungal activities of KF and four well-known antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 in CYG medium

Antifungal agents	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
Itraconazole	>10 <sup>b)</sup>
Fluconazole	200
Ketokonazole	100
Terbinafine	50
KF <sup>c)</sup>	50

<sup>a)</sup>casein yeast-extract glucose medium. <sup>b)</sup>the exact MIC value can not be measured because of its low aqueous solubility. <sup>c)</sup>ketonic fraction.

**Table VIII** - Effect of combination of KF with four well-known antifungal agents *Candida albicans* ATCC 10231

Combination of KF <sup>a)</sup> & antifungal agents	FIC index	LC <sup>b)</sup>
KF+Itraconazole	0.5~1.00	25.0/5.0
KF+Fluconazole	0.50	12.5/125
KF+Ketoconazole	0.56	3.1/125
KF+Terbinafine	0.38	6.3/15.6

<sup>a)</sup>ketonic fraction. <sup>b)</sup>the concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) of each compound in the best combination (conc. of KF/antifungal agent).

력을 보였고, KF와 각 항생제와의 병용시 항생제나 KF 단독 사용시 보다 효과가 더 좋았다(Fig. 2a). 그 중에서 neomycin과 KF의 병용효과가 가장 컸으며 6 시간 경과 후, 약 15배 이상의 병용 효과를 관찰할 수 있었다.

MRSA인 *Sta. aureus* 694에 대하여 세가지 항생제 및 KF 단독, KF와 각 항생제 병용 사용 모든 경우 24시간까지 항균력이 지속되었고, 병용 조합시의 효과가 단독액보다 더 컸다(Fig. 2b). KF 또는 항생제 단일액에 비하여 24 시간 후에 6~15배 정도 적은 균수(CFU/ml)를 나타내었다.

QRS인 *Sta. aureus* 293의 경우, bacitracin 처리시에 6 시간 경과 후 그 균수가 약 1000배 정도 감소

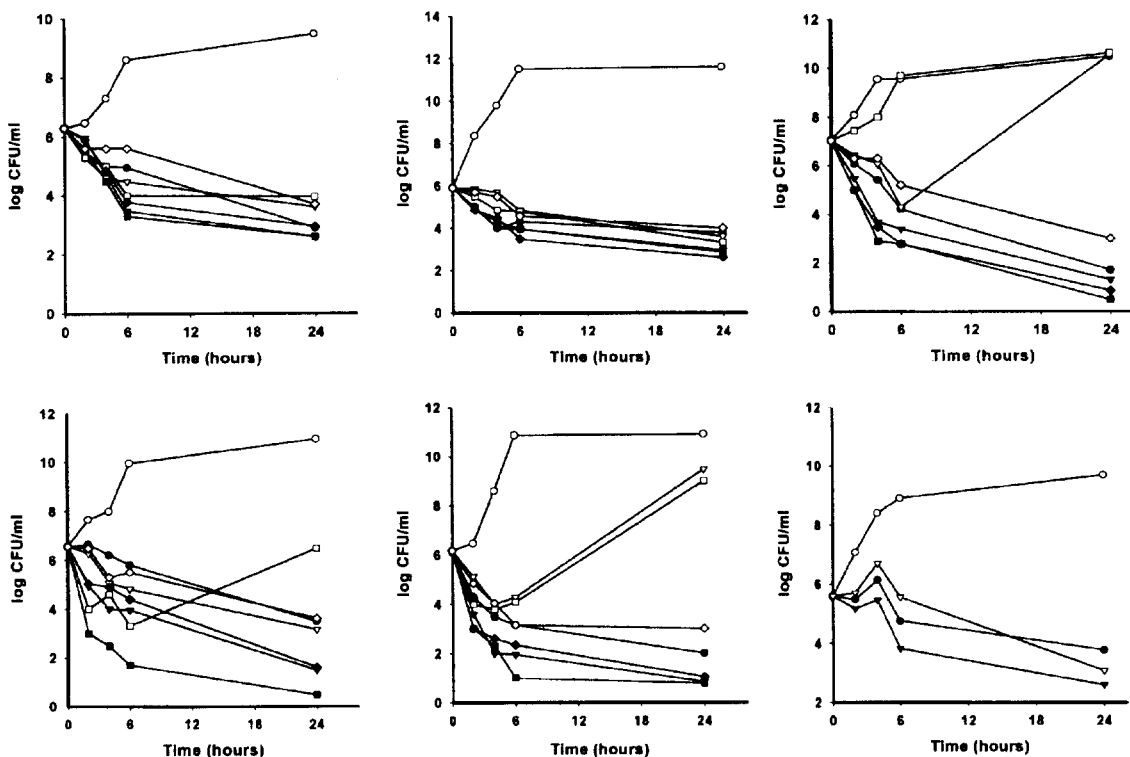
하였으나, 24 시간째에는 균수가 회복되어, 대조군(no antibiotics)과 유사한 정도가 되었다(Fig. 2c). 이 현상은 3회의 반복실험 모두 관찰되었다. 이는, shaking water bath 내에서 균과 항생제가 계속 접촉하는 동안 bacitracin에 대한 감수성이 감소되면서 균의 재생장(regrowth)이 이루어진 것으로 판단된다.

QRS인 *Sta. epidermidis* 329에 대하여 모든 시간대에서 각 병용액이 단독액보다 우수한 항균력을 나타내었고(Fig. 2d), 병용액 사용시 24 시간 후의 균수는 단일액 사용시에 비하여 50~1000배 감소되었다. KF와 gentamicin의 혼합액의 경우 24 시간 후에 KF 단일액(gentamicin 단일 용액보다 큰 항균력을 보임) 사용시의 균수(CFU/ml)에 비하여 1000배 이상 감소된 결과를 보여, 상승효과가 나타났다.

QRS인 *Sta. species* 245에 대하여 24 시간 후의 균수 비교시 각 항생제 용액보다 KF의 항균력이 우수하였으며, 각 항생제와 KF의 병용액 사용시 단독액 사용시보다 7~17배 균수(CFU/ml)가 감소되는 결과를 보여 상가작용을 나타내었다(Fig. 2e). Bacitracin과 gentamicin의 경우 4시간째에 가장 큰 항균활성을 나타내었고, 그 후 균수가 증가되는 양상이 나타났다.

*Candida albicans* ATCC 10231에 대하여서는, 6 시간까지는 KF가 fluconazole보다 큰 항균력을 보였고, 24 시간 후의 항균력은 fluconazole과 KF의 혼합액이 가장 컸고, fluconazole, KF순으로 나타났다(Fig. 2f). Time-kill method는 시간대별로 항균력을 알 수 있으므로 항균력의 지속시간 및 최대의 항균력을 나타내는 시간 등을 관찰할 수 있었다.

**저지원 형성실험에 의한 병용효과** – Table IX와 같은 조합으로 실험한 결과 모든 경우에서 혼합액의 항균력이 단독액보다 크게 나타났다. 그람양성균주인 *Sta. aureus* 285균주에 대한 실험에서, neomycin 400 mg/



**Fig. 2a** – Representative time-kill curves of *Staphylococcus aureus* 285 exposed to ketonic fraction (KF), Bacitracin (BT), Gentamicin (GM), Neomycin (NM), KF+BT, KF+GM, and KF+NM at a concentration of four times the MIC in FEB. ○ ; control, ● ; KF (500 μg/ml), ▽ ; BT (100 μg/ml), ▼ ; KF (500 μg/ml)+BT (100 μg/ml), □ ; GM (1.56 μg/ml), ■ ; KF (500 μg/ml)+GM (1.56 μg/ml), ◇ ; NM (400 μg/ml), ◆ ; KF (500 μg/ml)+NM (400 μg/ml). **2b**– Representative time-kill curves of *Staphylococcus aureus* 694 exposed to ketonic fraction (KF), Bacitracin (BT), Gentamicin (GM), Neomycin (NM), KF+BT, KF+GM, and KF+NM at a concentration of four times the MIC in FEB. ○ ; control, ● ; KF (500 μg/ml), ▽ ; BT (100 μg/ml), ▼ ; KF (500 μg/ml)+BT (100 μg/ml), □ ; GM (1.56 μg/ml), ■ ; KF (500 μg/ml)+GM (1.56 μg/ml), ◇ ; NM (400 μg/ml), ◆ ; KF (500 μg/ml)+NM (400 μg/ml). **2c**– Representative time-kill curves of *Staphylococcus aureus* 293 exposed to ketonic fraction (KF), Bacitracin (BT), Gentamicin (GM), Neomycin (NM), KF+BT, KF+GM, and KF+NM at a concentration of four times the MIC in FEB. ○ ; control, ● ; KF (1 μg/ml), ▽ ; BT (50 μg/ml), ▼ ; KF (1 μg/ml)+BT (50 μg/ml), □ ; GM (800 μg/ml), ■ ; KF (1 μg/ml)+GM (800 μg/ml), ◇ ; NM (800 μg/ml), ◆ ; KF (1 μg/ml)+NM (800 μg/ml). **2d**– Representative time-kill curves of *Staphylococcus epidermidis* 329 exposed to ketonic fraction (KF), bacitracin (BT), gentamicin (GM), neomycin (NM), KF+BT, KF+GM, and KF+NM at a concentration of four times the MIC in FEB. ○ ; control, ● ; KF (1 μg/ml), ▽ ; BT (100 μg/ml), ▼ ; KF (1 μg/ml)+BT (100 μg/ml), □ ; GM (50 μg/ml), ■ ; KF (1 μg/ml)+GM (50 μg/ml), ◇ ; NM (400 μg/ml), ◆ ; KF (1 μg/ml)+NM (400 μg/ml). **2e**– Representative time-kill curves of *Staphylococcus* species 245 exposed to ketonic fraction (KF), bacitracin (BT), gentamicin (GM), neomycin (NM), KF+BT, KF+GM, and KF+NM at a concentration of four times the MIC in FEB. ○ ; control, ● ; KF (1 μg/ml), ▽ ; BT (400 μg/ml), ▼ ; KF (1 μg/ml)+BT (400 μg/ml), □ ; GM (12.5 μg/ml), ■ ; KF (1 μg/ml)+GM (12.5 μg/ml), ◇ ; NM (800 μg/ml), ◆ ; KF (1 μg/ml)+NM (800 μg/ml). **2f**– Representative time-kill curves of *Candida albicans* ATCC 10231 exposed to ketonic fraction (KF), fluconazole and KF+fluconazole at a concentration of four times the MIC in CYG medium. ○ ; control, ● ; KF (200 μg/ml), ▽ ; fluconazole (800 μg/ml), ▼ ; KF (200 μg/ml)+fluconazole (800 μg/ml)

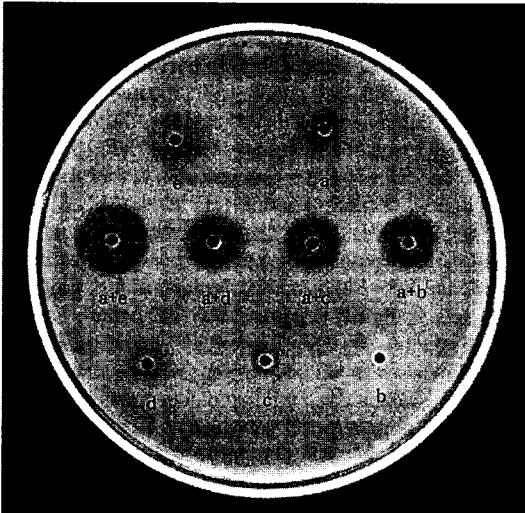
m과 KF 5 mg/ml 혼합용액의 경우, 각각 단독 투여 시의 4.6 mm, 16.9 mm를 더한 값보다도 더 큰 저지력인 24.5 mm의 결과를 나타내었다. Bacitracin 100

μg/ml 과 KF 625 μg/ml의 경우에도 bacitracine 단독액은 7.8 mm, KF 단독액은 저지력을 보이지 않았는데, 혼합액의 경우는 13.7 mm로 큰 병용효과를 나타내

**Table IX** – Effect of combination of KF with bacitracin, gentamicin, and neomycin against *Staphylococcus aureus* 285, *Staphylococcus aureus* 694, and *Staphylococcus aureus* 293

Strains	Anti-biotics	Conc. (µg/ml)	Inhibition diameter <sup>a)</sup> (mm)			
			alone	BT+KF	GM+KF	NM+KF
Staphylococcus aureus 285	BT <sup>b)</sup>	100 <sup>f)</sup>	7.80.9	-	-	-
	GM <sup>c)</sup>	1.6 <sup>f)</sup>	13.71.3	-	-	-
	NM <sup>d)</sup>	400 <sup>f)</sup>	4.60.8	-	-	-
	KF <sup>e)</sup>	625	NF <sup>g)</sup>	13.7 ± 1.2 (75.6) <sup>h)</sup>	15.9 ± 0.9 (16.1)	6.1±0.8 (32.6)
		1250	7.10.9	14.1 ± 1.6 (80.8)	16.4 ± 1.3 (19.7)	9.1±0.6 (28.2)
		2500	11.61.1	16.8 ± 1.9 (44.8)	17.0 ± 0.7 (24.1)	15.6±1.6 (34.5)
	5000	16.91.4	21.4 ± 1.8 (26.6)	18.3 ± 1.6 ( 8.3)	24.5 ± 2.2 (45.0)	
Staphylococcus aureus 694 (MRSA)	BT	100 <sup>f)</sup>	8.21.0	-	-	-
	GM	1.6 <sup>f)</sup>	5.90.9	-	-	-
	NM	400 <sup>f)</sup>	4.61.1	-	-	-
	KF	625	6.60.6	12.7 ± 1.1 (54.9)	12.3 ± 1.4 (86.4)	8.3±0.6 (25.8)
		1250	9.11.3	15.1 ± 1.0 (65.9)	13.6 ± 0.9 (49.5)	9.9±0.5 ( 8.8)
		2500	10.31.0	16.3 ± 0.7 (58.3)	14.5 ± 1.1 (40.8)	11.3±1.3 ( 9.7)
	5000	12.70.6	18.1 ± 1.3 (42.5)	15.7 ± 1.1 (23.6)	14.8 ± 1.8 (16.6)	
Staphylococcus aureus 293 (QRS)	BT	50 <sup>b)</sup>	7.91.2	-	-	-
	GM	800 <sup>f)</sup>	5.90.7	-	-	-
	NM	400 <sup>f)</sup>	6.40.9	-	-	-
	KF	625	NF <sup>g)</sup>	10.1 ± 1.0 (27.8)	7.9 ± 0.5 (33.9)	8.5±1.1 (32.8)
		1250	8.40.8	11.6 ± 0.8 (38.1)	9.8 ± 0.2 (16.7)	10.1±0.5 (17.9)
		2500	10.61.2	12.9 ± 0.6 (21.7)	11.7 ± 0.4 (10.4)	12.1±1.4 (14.2)
	5000	12.11.5	14.5 ± 1.2 (20.7)	14.8 ± 1.1 (22.3)	13.6 ± 0.9 (12.4)	

<sup>a)</sup> Results indicate mean ± SD from three separate experiments. <sup>b)</sup> bacitracin. <sup>c)</sup> gentamicin. <sup>d)</sup> neomycin. <sup>e)</sup> ketonic fraction. <sup>f)</sup> x4 MIC of each antibiotic against *Staphylococcus aureus* 285, 694, or 293. <sup>g)</sup> no inhibition was observed. <sup>h)</sup> increasing diameter percent in comparison with that from the more active single drug.



**Fig. 3** – Representative result of antimicrobial combination with the well diffusion technique. Each single drug and combinations of bacitracin(BT) and ketonic fraction(KF) were tested against *Staphylococcus aureus* 285. a; BT (100 µg/ml), b; KF(62 µg/ml), c; KF (1250 µg/ml), d; KF (2500 µg/ml), e; KF (5000 µg/ml).

어 새로운 항균제 개발의 가능성을 보여주었다(Fig. 3).

MRSA 균주인 *Sta. aureus* 694에 대한 실험에서, KF와 bacitracin, KF와 gentamicin 병용 실험결과 모든 경우 높은 상승력을 보였다(24~86%증가). 특히, gentamicin 1.56 µg/ml와 KF 625 µg/ml 혼합 투여시 각각 단독 투여시의 저지직경의 합보다 더 큰 저지력을 나타내었다.

QRS 균주인 *Sta. aureus* 293에 대해서도 세가지 항생제 모두 KF와 혼합하여 사용한 경우에 강한 항균력을 보였다(Table X). 40%이상정도의 상승효과는 없었으나 모든 혼합액의 경우에 있어서 단독 사용할 때 더 큰 활성을 보인 저지직경보다 최소한 10% 이상의 증가율을 나타내었다.

이 실험에서는, 한 항생제에 4가지 농도로 4가지 각각 병용 실험하였으므로, 가장 큰 병용효과를 나타내는 KF의 농도를 관찰할 수 있었다.

## 결 론

*Leptospermum scoparium*의 추출물 중 케톤체 분획

물(KF)이 whole oil보다 2~4배 항균력이 높은 결과를 나타내었다.

KF의 성분은 flavesone, leptospermum 및 iso-leptospermum의 3가지 케톤체의 혼합물이며, 이의 항균력은 그람음성균에 대하여는 실험농도에서 별무하였으나, 그람양성균, 내성균주 등 기타 실험균주 들에 대하여서는 MIC 범위가 65~500 µg/ml으로 관찰 되었다.

KF는 혐기성균주 41가지 중 22가지 균주에 대하여 250 µg/ml 이하의 MIC를 나타내었고, 그 중10여개 균주에 대하여서는 gentamicin이나 ciprofloxacin보다 더 큰 항균력을 나타내었으며, *Aspergillus niger*나 *Candida albicans* 등 진균에 대해서는 63 µg/ml 및 250 µg/ml의 항균력을 각각 나타내었다.

Paper strip 실험결과 bacitracin, cephalosporin계 항생제 들과 14가지 균주 중 4-8가지 균주에 대하여 상승작용을 나타내었고, ofloxacin, sparfloxacin 등과는 길항작용의 경향이 많았고, Checkerboard 실험에서 5가지 균주에 대한 3가지 항생제와의 병용효과에서, 상승작용이 33%, 나머지는 상가작용을 나타내었다. 또한 항진균제와의 병용에서는, fluconazole과 terbinafine이 상승효과를 나타내었다.

KF와 bacitracin, gentamicin, neomycin과의 병용액을 Time-kill법으로 *St. aureus* 285 등 5가지 균주에 대하여 실험한 항균력은 24 시간대에서 각 단독액의 항균력보다 우수하였고, 특히, QRS 균주인 *Staphylococcus epidermidis* 329에 대하여 gentamicin과의 혼합액은 KF 단일액 보다 1000배의 균수 감소를 보이는 상승효과를 나타내었으며, 이 방법은 시간대별로 항균력을 파악할 수 있어서 항균력의 지속성과 최대 항균시간을 알 수 있었다.

이상의 결과에서, *Leptospermum scoparium* 추출물중 KF의 항균력은 매우 우수하였으며, bacitracin 등 항생제와의 병용에서 상승작용을 기대할 수 있어서 새로운 항균제로서 개발 가능성이 크다고 생각된다.

## 문 헌

- 1) Yousef, R. T. and Tawil, G. G. : Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie.*, **35**, 698 (1980).
- 2) Janssen, A. M., Chin, N. L., Scheffer, J. J. and Baerheim, S. A. : Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharm. Weekbl [Sci.]*, **12**, 289 (1986).
- 3) Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C. and Svendsen, A. B. : antimicrobial activity of essential oils; a 1976-1986 literature review. *Planta. Med.*, **53**, 395 (1987).
- 4) Pattnaik, S., Subramanyam, V. R. and Kole, C. R. : Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios.*, **86**, 237 (1996).
- 5) Carson, C. F. and Riley, T. V. : Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 264 (1995).
- 6) Penolope, A. and Doran, J. : Intraspecific variation in leaf oils of *Melaleuca alternifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **22**, 419 (1994).
- 7) Williams, L. and Lusunz, I. : Essential oil from *Melaleuca dissitiflora*. *Ind. Crops. Prod.*, **2**, 211 (1994).
- 8) Cooper, R. C. and Cambie, R. C. : New Zealand's economic native plants, Auckland. *Oxford University Press*, p. 137 (1991).
- 9) Perry, N. B., Brennan, N. J., Klink, van J. W., Harris, W., Douglas, M. H., McGimpsey, J. A., Smallfield, B. M. and Anderson, R. E. : Essential oil from New Zealand Manuka and Kanuka; Chemotaxonomy of *Leptospermum*. *Phytochemistry*, **8**, 1485 (1997)
- 10) Recio, M. C., Rias, J. L. and Villar, A. : A review of some anti microbial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother. Res.*, **3**, 117 (1988).
- 11) Boase, I. and Williams, T. : Crop & food research and maori in the food industry. *The food technologist*, p. 24 (1994).
- 12) Perry, N. B., Douglas, M. H. and Porter, N. G. : Essential oils and extracts from New Zealand. *Perfumer & Flavorist*, **18**, 25 (1993).
- 13) Porter, N. G. and Wilkins, A. L. : Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. *Phytochemistry*, **50**, 407 (1999).
- 14) Joulain, D. : Investigating new essential oil; Rationale, Result and limitations. *Perfumer & Flavorist*, **21**, 1 (1996).
- 15) Rhee, G. J., Chung, K. S., Kim, E.H., Suh, H. J. and Hong, N. D. : Antimicrobial Activities of a steam distillate of *Leptospermum scoparium*. Yakhak Hoeji,

- 41, 132 (1997).
- 16) Martin, A., Swarbrick, J., Cammarata, A. : *Physical Pharmacy* 3rd ed., p. 565.
- 17) National Committee for Clinical Laboratory Standard. : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3rd ed.: Approved standard M7-A3. NCCLS, Villanova, Pa. (1993).
- 18) Ednie, L. M., Jacobs, M. R. and Appelbaum, P. C. : Activities of gatifloxacin compared to those of seven other agents against anaerobic organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2459 (1998).
- 19) Barry, A. L., Fuchs, P. C., Citron, D. M., Allen, S. D. and Wexler, H. M. : Methods for testing the susceptibility of anaerobic bacteria to two fluoroquinolone compounds, PD131628 and clinafloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.*, **31**, 893 (1993).
- 20) Chin, N. X., and Neu, H. C. : Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**, 319 (1984).
- 21) National Committee for Clinical Laboratory Standard. : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : tentative standard. NCCLS M27-T, Villanova, Pa. (1995).
- 22) Pfaller, M. A., Messer S. A. and Coffman, S. : *In vitro* susceptibilities of clinical yeast isolates to a new echinocandin derivative, LY303366 and other antifungal agents, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 763 (1997).
- 23) Eliopoulos, G. M. and Moellering, R. C. : Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*, Williams & Wilkins (1996).
- 24) V, Lorian, G., Fodor: Technique for determining the bactericidal effect of drug combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**, 630 (1974).
- 25) *Drug Information*, **1**, pp. 56-407. 574-614. & **2**, 2662-2676, 2714-2728, American Hospital Formulary Service (1997).
- 26) Paton, J. H., and Williams, E. W. : Interaction between ciprofloxacin and vancomycin against Staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, **20**, 251 (1987).
- 27) King, T. C., Schlessinger, D. and Krogstad, D. J. : The assessment of drug combination. *Rev. Infect. Dis.*, **3**, 627 (1981).
- 28) Bajaksouzian, S., Visalli, M. A., Jacobs, M. R. and Appelbaum, P. C. : Activities of levofloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters determined by checkerboard and time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1073 (1997).
- 29) Atlas, R. M. : *Handbook of Microbiological Media*, CRC Press Inc., **196**, p. 471 (1993).
- 30) Marks, M. I., Steer, P. and Eickhoff, T. C. : *In vitro* sensitivity of *Torulopsis glabrata* to amphotericin B, 5-fluorocytosine and clotrimazole. *Appl. Microbiol.*, **22**, 93 (1971).
- 31) Moellering, R. C. Jr., Wennersten, C. and Weinberg, A. N. : Synergy of penicillin and gentamicin against enterococci, *J. Infect. Dis.*, **124**, 207 (1971).
- 32) Moellering, R. C. Jr., Wennersten, C., and Weinberg, A. N. : Studies on antibiotic synergism against enterococci; I. Bacteriologic studies. *J. Lab. Clin. Med.*, **77**, 821 (1971).