생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
31(4) : 407 ~ 411 (2000)

Magnolol 및 Honokiol의 항생제와의 병용 효과

정경수 · 이수나 · 김영호 · 배기환*
충남대학교 약학대학

Antibacterial Activity of Magnolol and Honokiol in Combination with Antibiotics

Kyeong-Soo Chung, Soo-Na Lee, Young Ho Kim and KiHwan Bae*
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract – Antibacterial activities of magnolol (MGL) and honokiol (HKL) in combination with four representative antibiotics-amoxicillin (AMPC), oxytetracyclin (OTC), gentamicin (GM) and chloramphenicol (CAP)-were evaluated against four bacterial strains. When tested by disk-plate method, five out of eight combinations such as HKL-AMPC, HKL-CAP, MGL-AMPC, MGL-OTC, and MGL-CAP showed additive to synergistic interaction against gram-negative bacterium *Salmonella typhimureum*. Of these, MGL-AMPC combination turned out to be antagonistic against *Sarcina lutea* and *Bacillus thurungiensis*. Against these two gram-positive bacteria, only HKL-GM combination showed additivity to synergism. All the other combinations showed no interactions. Despite these results, however, no synergism was observed in checkerboard titration assay.

Key words – antibacterial activity, magnolol, honokiol, additivity, synergism

구강내의 여러 세균 중 *Streptococcus mutans*(이하 충치균이라 함)가 충치를 일으키는 주 원인균으로 밝혀졌다. Namba 등[1]은 수십종의 생약을 선택하여 충치균에 대한 스크리닝을 행한 결과 일본후박(*Magnolia obovata*)의 수피에서 강한 항균성을 발견하고 hydroxybiphenyl 유도체인 magnolol과 honokiol을 항균 활성 성분으로 단리하였다. 이중 magnolol은 Sugii[2]에 의해, honokiol은 Fujita 등[3]에 의해 분리, 화학 구조가 규명되었다. 본 연구자들은 품질평가를 위하여 후박류 생약에 함유되어 있는 이 성분들의 정량법을 확립한 바 있다.[4]

독성이 적고 충치균에 대해 항균력이 우수한 물질을 개발하기 위하여 55종의 식물을 선정하여 충치균에 대해 항균력을 검색하여 수종의 생약에서 유의한 결과를 얻었다.[6] 튜립 나무(*Liriodendron tulipifera*)의 잎에서 분리한 β-liriodenolide의 충치균에 대한 항균효과[6]와 호장근(Polygoni Radix)에서 분리한 emodin의 충치균에 대한 항균력[7]을 보고한 바 있다. 또한 본 연구자 등은 magnolol, honokiol이 충치균 *S. mutans*에 대해 최소저지농도(minmal inhibitory concentration=MIC)가 6.3 μg/ml로서 식물성분으로서 항균력이 강하다고 알려진 berberine(MIC, 100 μg/ml) 보다 강력한 항균 물질임을 밝힌바 있으며[8] magnolol과 honokiol의 화학 구조와 항균력의 상관 관계를 밝히기 위해 이들 물질의 유도체 또는 유사체를 합성하여 충치균에 대한 항균력을 검토하여 보고한 바도 있다.[9-12]

본 실험에서는 이러한 연구의 일환으로서 magnolol과 honokiol이 수종 항생제의 항균력에 미치는 병용효과를 확인코자 하였다. 항생제의 병용 투여는 내성균주의 발현 빈도를 현저히 감소시킬 수 있으며, 단독 투여시 독성 및 부작용이 있는 항생제는 병용 투여하여 약용량을 줄일 수 있으므로 독성을 감약시킬 수 있고, 세균의 복합 감염시에는 보다 넓은 항균 범위를 갖는 등의 기대 효과가 있기 때문에 항생제가

*교신저자 : Fax : 042-823-6566

발견된 후 지금까지 활발히 연구되고 있다. 그 예로써 trimethoprim과 sulfamethoxazole, penicillin류와 aminoglycoside류의 병용 투여시 항균력 증가 및 내성 균주의 생성을 현저히 억제 시킴이 보고된 바 있다. 뿐만 아니라 항생제와 항균성 천연물을 병용할 경우 항생제의 항균 효과를 증대시킬 수 있다는 기대 때문에 이에 관한 연구들도 활발히 이루어지고 있다.[13-17] 즉 김 등[13]이 인삼 사포닌이 수종의 항생물질의 항균작용에 미치는 영향을 보고하였고 신[14]은 13종의 담자균 메탄올 추출물의 항균력을 검색하고 다른 항생물질의 항균력에 미치는 상호 작용을 보고한 바 있으며, 윤 등[15]은 영지버섯 엑스가 수종 항생제의 항균력에 미치는 병용 효과를, 김 등[16]은 잔나비걸상 엑스가 수종 항생제의 항균력에 미치는 병용 효과에 대하여 각각 보고한 바 있다.

이러한 연구의 일환으로 본 연구에서는 주로 그람양성 세균에 대해 항균 효과가 있는 magnolol/honokiol과 대표적인 항생제와의 상호작용을 실험하여 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

magnolol 및 honokiol 시료 – biphenyl 유도체의 일종인 magnolol과 honokiol은 본 실험실에서 일본목련(*Magnolia obovata* Thunb.)의 줄기껍질로부터 추출, 단리한 것을 사용하였으며 물질의 분리 및 확인은 Bang[17]의 보고에 의하였다.

표준 항생제 – β-lactam계 항생제 amoxycillin(종근당), tetracycline계 항생제 oxytetracycline(종근당), aminoglycoside계 항생제 gentamicin(동신제약) 및 기타 계열 chloramphenicol(종근당)을 시중에서 입수하여 실험에 사용하였다.

균주 및 배양 – nutrient agar slant에 계대 배양하여 4°C에 보관하고 있는 2종의 그람양성 세균(*Bacillus thurungiensis* 및 *Sarcina lutea*)과 2종의 그람음성 세균(*Serratia marcescens* 및 *Samonella typhimurium*)을 실험 균주로 사용하였다. 배지로는 Mueller-Hinton 한천 배지(MHA, Difco) (pH 7.4±0.2) 및 Muller-Hinton broth(MHB, Difco)를 사용하였고, MHB에 18시간 배양한 균액을 600 nm에서 광투과도가 10%가 되도록 MHB로 희석하여 접종에 사용할 희석 균액을 만들었다. 모든 배양은 37°C로 유지되는 배양기(Forma, USA)내에서 시행하였다.

disk-plate 법을 이용한 상호작용 실험 – 실험하기 바로 전에 소량의 에탄올로 시료를 용해시킨 후 직경 8 mm의 항균실험용 디스크(Toyo Seisakusho Co., LTD)에 30 μl씩의 시료를 함입시키고 용매가 휘발되도록 실내에서 3-4시간 이상 방치하여 실험용 디스크를 제작하였다. 한편 용매가 실험균의 발육 억제에 영향을 주지 않음을 대조 실험을 통해 확인하였으며 시료 농도는 상호 작용을 관찰하기에 적당한 직경 15-20 mm 저지원을 나타내는 용량으로 하였다(Table I). 한편 45°C로 유지시킨 MHA에 희석 균액을 1%(v/v) 접종하여 seed layer액을 준비하고 이를 미리 10 ml의 MHA 10 ml를 가하여 만든 basal layer 위에 5 ml를 부어 항균 실험용 접종 plate를 제작했다. 접종 plate 표면에 약물이 함입된 disk를 올려 놓고 37°C에서 18시간 배양시킨 뒤 실험 약물과 항생제 디스크 사이의 억제 영역의 유형을 관찰하였다.

checkerboard titration 법에 의한 상호작용 실험[19] – disk plate법에서 현저한 상호작용이 확인된 조합에 대해서 96-well culture plate를 사용하여 checkerboard titration을 실시하였다. 실험에 사용한 항생제등은 MHB에 용해, 희석하여 농도를 조절하였으나 magnolol, honokiol은 MHB에 잘 용해되지 않기 때문에 소량의 DMSO에 용해시킨 후 MHB로 희석하였다. 실험에 사용한 농도의 DMSO는 균의 발육에 지장이 없음을 미리 확인하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 육안으로 균의 발육 유무를 관찰하고 fractional inhibitory concentration index(FIC index)를 계산하여 평가하되 FIC index 값이 0.5 이하일 경우 synergism, 1.0이면 additivity, 1.0을 초과하면 antagonism, 그 이외의 경우는 indifference로 간주하였다.

Table I. Concentration of magnolol, honokiol and antibiotics used in disk plate method

antibiotic / test material	concentration (μg/ml)		
	high	medium	low
Getamicin	10	2.5	0.6125
OTC[a], AMPC[b], CAP[c]	200	100	50
AMPC*	5	2.5	1.25
Magnolol	2,000	1,000	500
Honokiol	2,000	1,000	500

a : OTC = oxytetracycline.
b : AMPC = amoxycillin.
c : CAP = chloramphenicol.
* The concentration of amoxycillin used against *Sarcina lutea*.

Table II. Interaction of Magnolol and Honokiol with several representative antibiotics assessed by disk-plate method on Mueller-Hinton agar medium

Bacterial strains	Honokiol				Magnolol			
	AMPC[a]	OTC[b]	CAP[c]	GM[d]	AMPC	OTC	CAP	GM
B. thurungiensis	x[e]	x	x	add-syn[f]	ant[g]	x	x	x
S. lutea	x	x	x	add-syn	ant	x	x	x
S. marcescens	x	x	x	x	x	x	x	x
S. typhimurium	add-syn	x	add-syn	x	add-syn	add-syn	add-syn	x

a: AMX = amoxycillin. b: OTC = oxytetracycline. c: CAP = chloramphenicol. d: GM = gentamicin.
e: × = indiferrence. f: add-syn = additivity to synergism. g: ant = antagonism.

결과 및 고찰

본 실험에서 상호작용을 확인하기 위해서 사용한 방법은 disk-plate method와 chekerboard titration method로서 이중 disk-plate 방법은 상호작용 여부를 육안으로 쉽게 판별할 수 있는 장점이 있으며 checkerboard 법은 FIC index 값을 구하여 상호작용 유형을 정량적으로 평가할 수 있기 때문에 제한된 약물 조합의 실험에 흔히 사용되고 있다.[19]

이 가운데 disk-plate법으로 상호작용 여부를 관찰한 결과, Table II에 나타낸 바와 같이, 그람 양성균인 *B. thurungiensis*와 *S. lutea*에 대하여 magnolol은 amoxycillin과 antagonism을 나타냈고 honokiol은 gentamicin과 additivity 내지 synergism을 나타냈다. 그러나 그 이외의 경우는 모두 indifferent가 나타났다. 한편 그람 음성균인 *S. marcescens*와 *S. typhimurium*의 경우 magnolol과 honokiol 자체는 항균 효과(저지대)가 관찰되지 않았다. 그러나 이들 약물은 amoxycillin 및 chloramphenicol의 *S. typhimurium* 에 대한 항균력을 증강시켜 honokiol 및 magnolol 디스크 쪽으로 저지대가 확산되었고 외관상 additivity 내지 synergism을 나타내었다. 이외에도 *S. typhimurium*에 대해서 magnolol은 oxytetracycline과 synergism을 나타내었다. 그러나 그 외의 다른 모든 조합은 additivity 내지 indifferent가 나타났다. 대표적인 실험결과를 Fig. 1에 나타내었다.

전항의 실험결과 항생제와 additivity 내지 synergism 또는 antagonism을 나타낸 조합들만을 checkerboard method를 이용해 그람양성 세균 *B. thurungiensis* 및 그람 음성 세균 *S. typhimurium*에 대해 액체 배지 중에서의 상호작용을 실험하였다. 그 결과 B. thurungiensis에 대해 고체배지 상에서 additivity 내지 synergism을 보였던 honokiol-gentamicin 조합은 FIC index 값이 1로 계산되어 additivity로 판명되었고 antagonism을 보였던 magnolol-amoxycillin 조합은 FIC index 값이 0.625로 계산되어 indifference로 판정되었다. 한편 그람 음성세균인 *S. typhimurium*균에 대해 대해 고체배지 상에서 additivity 내지 synergism을 보였던 조합들인 magnolol-amoxycillin 조합(FIC index=0.75)은 indifference로, magnolol-chloramphenicol 조합(FIC index=1.5)은 antagonism으로 판정되었다(Table III). 한편 *S. typhimurium*균에 대한 실험에서 honokiol은 12 mg/ml까지 실험하였으나 시료가 배지 중에서 석출되어 항균효과의 관찰이 불가하였다. 본 실험 결과만으로 판단할 때, 고체배지에서와 액체 배지에서의 실험 결과가 부분적으로 일치되지 않음을 알 수 있으며 이는 실험 물질들이 agar가 함유된 고체배지에서와 agar가 배제된 액체 배지에서의 동태가 상이함에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 천연물로부터 분리된 항균성 물질과 기존 항생제

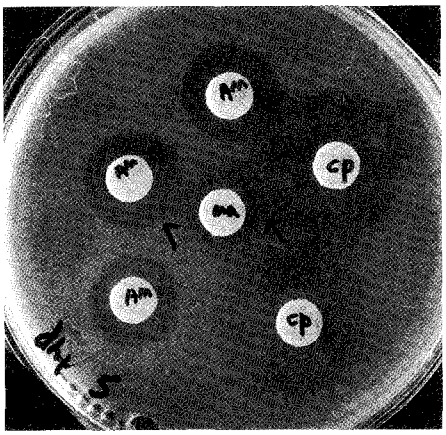

Fig. 1. A representative result showing additive to synergism interaction between magnolol (MG) and Gentamicin against a gram-negative bacterium *Salmonella typhimurium* on an Mueller-Hinton agar plate.

Table III. Interaction of Magnolol and Honokiol with several representative antibiotics assessed by checker-board method

Bacterial strains	Honokiol			Magnolol
	AMPC[a]	CAP[b]	GM[c]	AMPC
B. thurungiensis	N.D[d]	N.D.	add[e] (FICI[f] =1.00)	ind[g]
S. typhimurium	ind	ind	N.D.	N.D.

a: AMX = amoxycillin. b: CAP = chloramphenicol. c: GM = gentamicin. d: N.D. = not done.
e: add = additivity. f: FICI = fractional inhibitory concentration (FIC) index g: ind = indiferrence.

의 상호작용을 실험할 경우, 고체배지 및 액체배지 실험 결과를 병행하는 것이 바람직하리라고 판단된다.

실험 예가 매우 한정적이긴 하지만 이상의 결과를 종합적으로 검토하면 magnolol과 honokiol이 항생제에 감수성이 낮은 그람음성 세균에 대해 additivity 내지 synergism을 나타내는 경우가 많았으며 이는 임상적으로 의미 있는 결과로 받아들일 수 있다. 즉 magnolol 및 honokiol은 일반 항생제로 치료가 어려운 그람음성 감염증의 치료에 기존 항생제와 병용할 경우 치료효과의 증대될 것으로 기대된다. 따라서 이 방면의 보다 체계적인 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

결 론

후박에서 분리한 honokiol, magnolol과 항생물질과의 상호작용을 그람 양성 및 음성 세균 각각 2개 균주에 대해 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고체 배지 상에서 그람 음성균 *Salmonella typhimurium*에 대해서 honokiol은 amoxycillin 및 chloramphenicol과 additivity 내지 synergism을, magnolol은 amoxycillin, oxytetracyclin 및 chloramphenicol과 additivity 내지 synergism을 보였다. 그러나 *Serratia marcescens*에 대해서는 모두 indifference를 나타내었다.

2. 고체 배지 상에서 그람 양성균인 *Sarcina lutea, Bacilus thurungiensis*에 대해 honokiol은 gentamicin과 additivity 내지 synergism을, magnolol은 amoxycillin과 antagonism을 나타내었고 기타 조합은 indifference를 나타내었다.

3. 액체배지에서의 4개 조합 중 어느 조합에서도 synergism이나 antagonism이 관찰되지 않았다.

인용문헌

1. Namba, T., Tsunezuka, M., Bae, K. and Hattori, M. (1981) Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicine (1), Screening of crude drugs for antibacterial action against *Streptococcus mutans*, *Shoyakugaku Zasshi*, **35**: 295-302.
2. Sugii, Y. (1930) Constituents of the bark of *Magnolia officinalis* and *M. obovata, J. Pharm. Soc, Jap.*, **50**: 183-187.
3. Fujita, M., Itokawa, H. and Sashida, Y. (1973) Studies on the component of *Magnolia obovata* Thunb (II), On the components of the methanol extract of the bark, *Chem. Pharm. Bull.*, 422-428.
4. Bae, K., Kim, Y., Won, D., Lee, J., Kang, J. (1997) Quality Evaluation on Magnoliae Cortex, *Yakhak Hoeji*, **41**: 407-413.
6. Bae, K. and Byun, J. (1987) Screening of Korean higher plants for antibacterial action, *Kor. J. of Pharmacogn.*, **18**: 1-4.
7. Bae, K., Kim., B., Myung., P. and Byun., J. (1990) The Isolation and Evaluation of Bioactive Components from Crude Drugs against a Cariogenic Bacterium. *Streptococcus mutans* OMZ 176 (1). On the Antibacterial Component of the Leaves of *Liriodendron tulipifera* and Its Safety, *Yakhak Hoeji*. **34**: 106-111.
8. Bae. K, Kim. B., Myung. P., Chung. K., and Baek, J. (1990) The isolation and evaluation of bioactive components from crude drugs against a cariogenic bacterium, *Streptorcoccus mutans* OMZ 176, *Yakhak Hoeji*, **34**: 277-281.
9. Bae, K., Yoo, B., Lee, M., and Seo, W. (1985) Antimicrobial activities of hydroxybiphenyl derivatives (1), Antibacterial activities and HPLC determination of magnolol and honokiol, *Arch. Pharm. Res.*, **8**: 85-89.
10. Seo, W., Koo, S. and Bae, K. (1986) Antimicrobial activities of hydroxyniphenyl derivatives (2), Synthesis and antibacterial cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ176, *Arch. Pharm. Res.* **9**: 127-130.
11. Bae, K. Seo, W. and Park, J. (1991) Antimicrobial activities of hydroxybiphenyl derivatives (3), The antibacteral activities of phenylphenol derivaties against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176, *Yakhak Hoeji*, **35**: 7-10.
12. Bae, K., Koo, S. and Seo, W. (1991) Synthesis and

Antibacterial activities of 4-hydroxy-o-phenylphenol and 3,6-diallyl-4-hydroxy-o-phenylphenol against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ176, *Arch. Pharm. Res.*, **14**: 41-43.

13. Kim, H., Han, S., Oh, K., Jeong, T., and Nam, K. (1987) Effects of ginseng saponin on the antimicrobial activities of some antibiotics. *Kor. J. Mycol*, **15**: 87-91.
14. 신명철 (1987) 한국산 담자균의 항균력 및 수종의 항생제와의 상호작용에 관한 연구, 충남대학교 석사 학위 논문.
15. Yoon, S., Eo, S., Kim, Y., Lee, K. and Han, S. (1994) Antimicrobial activity of *Ciannoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics, *Arch.. Pharm. Res.*, **17**: 438-442.
16. Kim, Y., Rym, K., Lee, C., Han, S. (1994) Antimicrobial activity of *Elfvingia applanata* extract alone and in combination with some antibiotics, *Yakhak Hoeji*, **38**: 742-748.
17. Bang, K., Kim, Y., Min, B., Na, M., Rhee, Y., Lee, J., and Bae, K. (2000) Antifungal activity of magnolol and honokiol, *Arch. Pharm. Res.*, **23**: 46-49.
18. Maur Neuman (1985) Useful and harmful interactions of antibiotics, ISB, 21-23.
19. Victor Lorian, M. D. (1985) Antibiotics in Laboratory Medicine 4th Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1-111.

(2000년 11월 17일 접수)