백두옹 추출물의 치주 병인균에 대한 항균효과

정성화[1] · 정진형[1] · 임성빈[1] · 김정근[2] · 소은희[3]

단국대학교 치과대학 치주과학교실[1]
단국대학교 치과대학 구강생화학교실[2]
서울대학교 생명과학자원부[3]

I. 서론

중년기 이후 현대인에게 발현하는 치아상실의 주원인은 치주질환이다. 치주질환은 급, 만성으로 진행되며 치주조직이 파괴되어 가는데, 그 주원인은 세균을 주성분으로하는 치태와 치석에 있다. 이에 따라 적절한 치태 조절 능력이 치주질환 억제효과와 직결된다[1-4].

치태 조절 능력 중 가장 중요한 사항은 정확한 양치방법이며, 이에 따른 칫솔, 치실, water jet 등이 1차적으로 널리 사용되고 치아의 형태학적 약점 보완을 위해서는 화학적 보조제를 치태형성을 억제하기 위하여 사용하여 왔다[5-7].

화학적 보조제는 치약, chewing gum, 구강 양치액에 포함시켜 사용할 수 있는데, 주로 양치액에 사용하였다[8-9].

구강 양치액으로 이용되는 약제로는 chlorhexidine 등의 bisguanides제재, hexidine 등의 pyrimidine유도제재, sanguinarine등의 식물성 alkaloid제재, 4급 암모니움 화합물제재, 각종 항생제재 등이 있으며 구강 내 세균에 우수한 항균효과를 갖는다[10-11].

그러나 4급 암모니움 화합물은 구강 내 적절한 농도 유지가 어렵다는 점이, 식물성 alkaloid인 sanguinarine는 구강 내 물질과의 접합력이 너무 강해 약효가 저하되고[12] 또한 치약 속에 연마제나 치약내 성분인 sodium lauryl sulfate와 길항작용으로 항균효과가 저하된다고 보고되어 있다[13-14].

특히 항생제재는 내성균주의 출현과 조직 내 과민반응 가능성 때문에[15-16] 현재로서 가장 널리 사용되어지는 bisguanides 제재인 chlorhexidine은 치태 억제 효과는 우수하나, 착색, 미각훼손 및 점막 염증 유발 가능성으로 장기간 사용되지 않고 있다[17-21].

따라서 장기간 치주병인 균에 강력한 항균작용을 하며 신체 부작용이 없는 저렴한 가격대의 약제의 개발이 필요성이 대두되었다.

최근의 연구는 안전성이 높고, 내성균주의 발현과, 조직 위해작용이 적은 천연추출물에 많은 연구가 이루어져 왔다.

한방에서 오래 전부터 사용되어온 천연 추출물로는 녹차(*Theae folium*), 몰약(*Myrrha*), 상백피(*Mori radicis cortex*), 승마(*Cimicifugae rhizoma*), 인삼 사포닌(*Ginseng Saponine*) 등이 있는데 이것들은 구강 내 염증완화, 소염, 진통의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[22-23].

몰약은 치은염, 아구창, 구강방부에 효과가

있으며[23], 상백피 추출물의 주성분인 Sanggenon C는 *S. mutans*의 대사 저해로 glucan의 형성을 줄여, 치태형성의 제1단계인 균 부착을 방해한다 하였으며[24] 녹차(*Theae folium*)의 성분인 polyphenol류는 동물실험에서 치아우식 유발 억제하는 보고가 있었다[25].

치주질환에 있어 생약제재로 민 등[26]은 *Zea Mays L.(ZML)*과 ascorbic acid를 동시 투여 시 상피 재생, 결합조직 증식, 조골현상에 현저한 효과를 보았고, 최 등[27]은 치주수술 시행 후 *ZML* 투여 시 치은지수, 치아동요도가 더 감소하고 치조백선 출현율이 높았다고 보고했다. 김 등[28]은 *ZML* 투여가 치주낭 깊이, 치태지수, 부착상실이 유의성 깊게 감소한 보고를 하였다. 元村洋一 등[29]은 금은화와 연요의 농축액으로 치은염증 소견이 개선됨을 Chung 등[30]은 *Scutellaria baicalensis* 추출물이 항 염증작용과 치은섬유아세포의 세포생물학적 기능을 증강시킨다고 보고하였다.

백두옹(白頭翁, *Pulsatilla koreana Nakai et Mori*)은 미나리제재과(*ranunculaceae*)에 속하는 다년초로서 우리나라 각지에 야생하며 중국 동북에도 분포한다. 이 생약은 신농본초경 하품에 소개되어, 통상적으로 치통, 해열, 수종에 응용되었고, 소염, 수렴, 지혈, 이질, 청열해독, 음낭대하, 항균, 진정, 항암 등에 사용되어 왔다.[31-35]

또한 예로부터 우리 민간에서는 이 물질을 소염, 진통, 해열, 해독의 목적으로 많이 사용되었고 항균효과가 있음이 보고되었으나 항균 활성 물질의 성분은 아직 규명되지 않았다.

본 연구의 목표는 민간요법으로 사용되어 왔던 백두옹의 추출물을 분석하여 치주 병인균에 대해 항균 효과가 있는지를 연구, 분석하고자 하는데 있다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 백두옹

시중에서 판매되고 있는 잘 건조된 한국산 백두옹(*Pulsatilla Koreana*)을 이용하였다.

(2) 세균 균주

본 연구에 사용된 검사세균은 Table 1과 같으며, 강릉대와 연세대 그리고 KCTC(Korean Collection for Type Culture), KCCM(Korean Culture Center of Microorganism)에서 ATCC 균주들을 분양 받아 실험에 사용하였다. BHIA(Brain Heart Infusion Agar, supplemented by Vit. K and Hemin Sol. DIFCO, USA)배지와 필요에 따라 5% defibrinated sheep blood(DIFCO, USA)를 함유한 BHIA 배지에서 계대 배양하여 시험에 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 시료의 추출(Figure 1)

① 백두옹 150 ㎎을 homogeniger로 마쇄한 후 석유 에테르(ether)로 탈지하고 100% 메탄올(MeOH) 100 ml로 3회 반복하여 추출하였다.

이 추출물을 여과지로 여과하고 얻어진 여액을 진공증발(TYPE N-N, EYELA, Japan)하여 잔유물과 메탄올(MeOH) 추출물인 A를 얻었다.

② 메탄올(MeOH) 추출물을 클로르포름($CHCl_3$) & 물(H_2O)를 사용하여 수회 반복 분액한다.

이를 클로르포름층과 물층으로 분리하고 클로르포름층에 있는 것을 농축하여 B라 하였다.

③ 상기 물층에 남은 층을 에틸아세테이트/물로 수회 반복 분액하여 이를 에틸아세테이트층과 물층으로 나누고 에틸아세테이트층에 있는 것을 농축하여 C라 하였다.

④ 다시 상기 물층에 남은 것을 부틸알콜/물

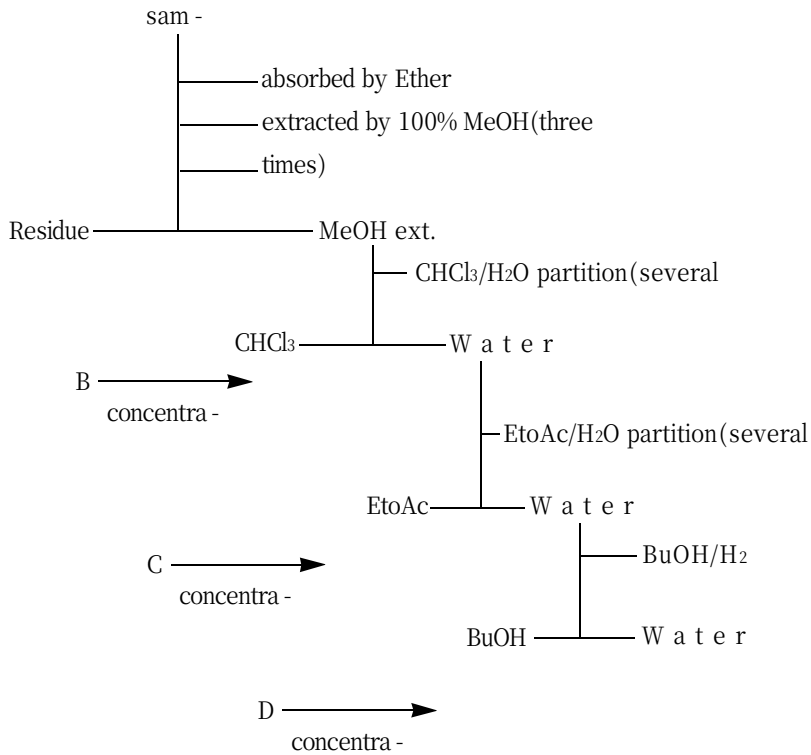

Figure 1. The extracts process of Pulsatilla koreana

Table 1. Periodontopathic bacteria for antimicrobial experiment

Actinobacillus actinomycetemcomitans(ATCC 33384)
Actinomyces viscosus(ATCC 15987)
Rothia dentocariosa(ATCC 17931)
Porphylomonas gingivalis(ATCC 33277)
Streptococcus sanguis(ATCC 10556)
Streptococcus mutans(ATCC 25175)
Fusobacterium nucleatum(ATCC 25586)
Eikenella corrodens(ATCC 23834)
Bacteroides forsythus(ATCC 43037)
Prevotella intermedia(ATCC 25611)
Prevotella nigrescens(ATCC 33563)
E. coli(ATCC 8739)
Staphylococcus aureus(ATCC 65389)
Pseudomonas aeruginosa(ATCC 9027)

로 수회 반복 분액하여 물층과 부틸알콜층으로 나누고 부틸알콜층에 남은 것을 농축하여 D라 하였다.

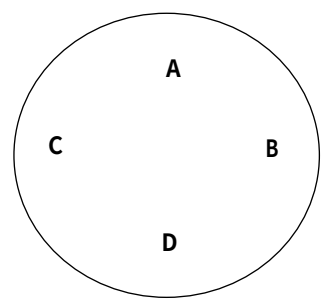

Figure 2. Arrangement of testing material(A, B, C, D)

(2) 검사물질 A, B, C, D의 구강 내 세균에 대한 항균효과 조사.

① 연구내용

일차적으로 검사물질들의 항균효과를 확인한 후 구강 내 세균에 대한 최소억제농도(MIC)를 조사하였다.

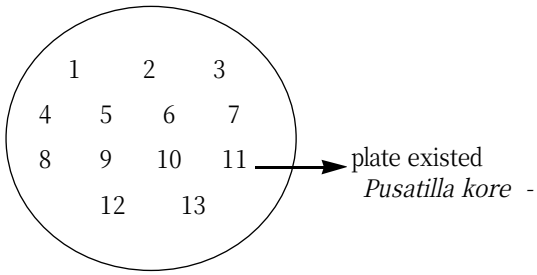

그림 3. Arrangement of MIC testing bacteria
1. *Bacteroides forsythus,* 2. *Streptococcus mutans,* 3. *Streptococcus sanguis,* 4. *Porphylomonas gingi - valis,* 5. *Actinobacillus actinomycetemcomitans,* 6. *Eikenella corrodens,* 7. *Prevotella intermedia,* 8. *Actinomyces viscosus,* 9. *Prevotella nigrescens,* 10. *Rothia dentocariosa,* 11. *Fusobacterium nucleatum,* 12. *Pseudomonas aeruginosa,* 13. *Staphylococcus aureus*

② 연구재료 및 방법

i. 검사물질(A, B, C, D)

본 연구에 사용된 검사물질들은 시료에서 각각의 유기용매로 추출한 fraction이다(A: 메탄올, B: 클로로포름, C:에틸아세테이트, D:부틸알콜).

ii. 항 미생물효과

Figure 1과 같이 배열된 4가지(A, B, C, D) 검사물질에 대한 14가지 검사세균(Table 1)의 감수성 검사를 위하여 한 배지에 14가지 세균을 가장 널리 이용되는 표준화된 방법인 원판확산법(Kirby - Bauer method)으로 검사하였으며 6 mm의 paper disk를 사용하였다.

iii. 최소억제농도(MIC)

검사물질 A, B, C, D의 각 세균들에 대한 최소억제농도(MIC)는 혐기성 세균의 항미생물 감수성 검사를 위한 NCCLS의 REFERENCE AGAR DILUTION PROCEDURE에 따라 결정하였으며, 평판 배지에 접종할 세균의 농도는 생리식염수(0.9% NaCl)에 ㎖당 10^4 - 10^6 CFU(colony forming unit)로 통일하여 사용하였다(Figure 3).

실험에 사용된 배지는 검사물질 20 ㎕/㎖을 최고농도로 2 배 희석하여 제조 사용하였으며, 검사물질은 추출물의 안정성을 고려하여 배지성분 20 ㎕씩 정확하게 제조된 고체평판배지에 검사물질들을 직접 도말(spreading)하여 30분 후 실험에 사용하였다. 각 세균은 multipoint inoculator(Bootles, England)를 이용하여 1 ㎕씩 접종하였다. 대조군 배지는 검사물질이 전혀 함유되지 않은 것으로 하였으며, 첫 번째와 마지막에 접종하여 균이 모두 성장한 것을 확인하여 자료로 처리하였다(Figure 4). 모든 배지는 Anaerobic System™(DIFCO, USA)을 사용하여 CO_2의 최종농도가 7 - 10%인 anaerobic jar(DIFCO, USA)안에서 혐기성 상태로 37℃에서 24시간 배양하였다.

III. 실험결과

1. 항균효과(Anti - microbial effects)

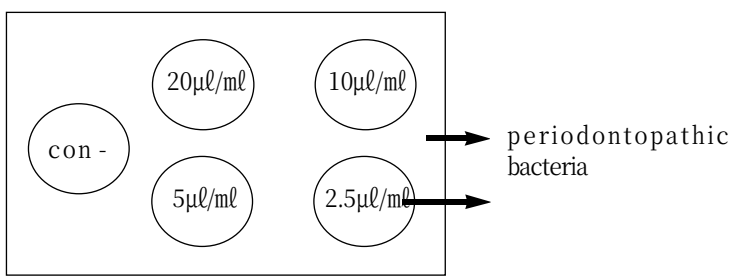

Figure 4. Arrangement of plate for MIC testing

Table 2. The results of antimicrobial susceptibility testing

bacteria \ substance	A	B	C	D
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	8
E. coli	-	-	-	9
Staphylococcus aureus	-	-	-	8
Rothia dentocariosa	-	-	-	8
Actinomyces viscosus	-	-	-	8
Prevotella intermedia	-	-	-	7
Prevotella nigrescens	-	-	9	8
Eikenella corrodens	-	-	-	7
Actinobacillus actinomycetemcomitans	-	-	-	7
Bacteroides forsythus	- -	-	7	
Porphylomonas gingivalis	-	-	-	-
Streptococcus mutans	-	8	8	8
Streptococcus *sanguis*	-	11	10	8
Fusobacterium nucleatum	-	-	-	8

(unit : ㎜, paper disk : 6㎜)

4 가지(A, B, C, D) 검사물질에 대한 14 가지 검사세균의 감수성 검사의 결과는 Table 2와 같다.

검사물질 A는 14 가지의 모든 세균에서 원형의 발육저지대가 관찰되지 않았으며, 검사물질 B는 *P. nigrescens, S. mutans, S. sanguis*에서, 검사물질 C에서는 *S. mutans, S. sanguis*에서만 발육저지대가 보였다. 다른 검사물질과는 달리 검사물질 D에서는 *P. gingivalis*를 제외한 나머지 13가지의 검사세균에서 발육저지대가 관찰되었다.

따라서 검사물질 B는 항균효과가 없는 것으로 사료되며, B, C, D의 검사물질에 나타난 발육저지대는 사용한 paper disk의 직경 6 mm를 고려하면 검사물질 B, C, D 모두 항균효과는 크지 않은 것으로 생각된다.

Table 3. Anti - microbial activity of A, B, C, D(MIC)

bacteria \ substance	A	B	C	D
Pseudomonas aeruginosa	>20	>20	>20	20
Staphylococcus aureus	>20	>20	>20	>20
Rothia dentocariosa	>20	>20	>20	20
Actinomyces viscosus	>20	>20	>20	20
Prevotella intermedia	>20	>20	>20	>20
Prevotella nigrescens	>20	20	20	>20
Eikenella corrodens	>20	>20	20	>20
Actinobacillus actinomycetemcomitans	>20	>20	>20	>20
Bacteroides forsythus	>20	>20	>20	>20
Porphylomonas gingivalis	>20	>20	>20	>20
Streptococcus mutans	>20	>20	>20	20
Streptococcus sanguis	>20	>20	>20	10
Fusobacterium nucleatum	>20	>20	>20	20

그러나 검사물질의 분리과정, 즉, sample에서 일차적으로 메탄올을 이용하여 A를 분리한 후 다시 A에서 클로로포름 층(B), 에틸아세테이트 층(C), 부틸알콜 층(D)의 분리과정을 고려하면, 항균효과를 보이는 검사물질 B, C, D와 다른 물질이 같이 혼합되어 있는 검사물질 A는 항균효과를 갖는 물질이 희석되어 있는 상태로 원판 확산법(Kirby - Bauer method)에서 사용한 20㎕/㎖의 농도에서는 항균효과가 나타나지 않은 것으로 사료된다. 따라서 검사물질 B, C, D의 항균력은 매우 약한 것으로 사료되며 검사물질 B, C, D의 결과들은 현재 사용중인 항균제에 의한 세균증식 발육 저지대에 따른 판독기준(The National Committee for Clinical Laboratory Standards)에 적용이 불가능하므로 검사 물질에 대한 검사세균들의 내성 또는 감수성 여부의 판정은 의미가 없는 것으로 생각된다.

2. 각 분획의 최소억제농도

14 가지의 검사세균에 대한 4 가지(A, B, C, D) 검사물질의 MIC 결과는 Table 3와 같다.

검사물질 A에서는 최고농도의 배지(20㎕/㎖)에서도 모든 검사세균이 성장하였으며, 대조군과의 비교에서도 성장의 저해는 없는 것으로 관찰되었다.

검사물질 B에서는 MIC 20㎕/㎖를 보인 *P. nigrescens*를 제외한 모든 검사세균이 최고농도의 배지(20㎕/㎖)에서 성장하였으며 *A. viscosus*, *R. dentocariosa, F. nucleatum*은 대조군 배지와 비교해서 20㎕/㎖에서 50% 정도의 성장이 저해되는 것으로 관찰되었으며, 원판 확산법에서 검사물질 C에서 가장 넓은 생장억제대를 보였던 *S. sanguis*는 20㎕/㎖에서도 성장하였지만 대조군과 비교해서 80% 이상의 성장 저해를 보였다.

검사물질 D에서는 *S. aureus, P. intermedia, E. corrodens, A. actinomycetemcomitans, B. forsythus, P. gingivalis* 등은 최고농도의 배지(20㎕/㎖)에서 성장하였으며, *P. aeruginosa, R. dentocariosa, A. viscosus, P. nigrescens, S. mutans* 등은 MIC 20㎕/㎖에서, *S. sanguis*는 MIC 10㎕/㎖에서 성장이 저해되었다.

검사물질 B 에서는 C와 비슷한 경향을 보였으며 *P. nigrescens*만 MIC 20㎕/㎖를 보였으며, 원판 확산법에서 검사물질 C에서 가장 넓은 생장억제대를 보였던 *S. sanguis*는 20㎕/㎖에서도 성장하였지만 대조군과 비교해서 50% 이상의 성장저해를 보였다.

원판확산법(Kirby - Bauer method)의 결과를 고려하여 MIC값을 검토할 때 A는 항균효과가 없는 것으로 사료되며 B, C는 항균효과를 가지나 항균력은 높지 않은 것으로 생각되었다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

본 연구는 민간요법으로 활용되어 온 생약제재 중 백두옹에 의한 항염 효과를 밝힘으로써 이후 구강 세정액 및 치주 질환치료제로서 활용하고자 하였다.

세균학적 구성에 있어 정상 치주낭에는 그람양성 통성균과 *Streptococcus, Actinomyces* 등이 존재하나 치은염 등이 계속 진행되면서 치은연하 치주낭 내 *Streptococcus*의 비율은 감소하고 혐기성 세균이 증가하며 치은 열구액의 증가, 출혈, 산화 항원 전위의 감소 등 전반적인 변화는 치주 염증이 악화되는 결과를 초래한다[36].

치주조직 재생에 도움이 되는 천연물 중 치과영역의 연구로 *Centella asiatica L Urban* 추출물은 창상, 화상, 욕창 및 궤양에 효과가 있음이 보고되고, 원촌양일 등[29]은 금은화와 연요 등의 농축액을 추출하여 치은염증이 개선되는 효과를 발견하여 치주 치료제로 개발하였다.

천연물 추출물의 경우 현재 옥수수 불검화 추출물이 치주 인대의 재생, 치은의 각화도 증진, 치아동요도의 감소 및 치조골 재생의 효과가

있음이 알려져 있고 Sanguinaria 추출물이 치약 등에 사용되고 있다[26, 27, 37 - 43].

Sanguinarine은 Sanguinaria Canadensis로부터 추출된 일종의 benzophenan - thridine으로 상당히 안정된 quaternaryiminum이온 형상태이다. 이것이 항균, 항염기증을 가진 물질로서 in vivo 및 in vitro에서 치은염 및 치주염에 관여하는 세균에 항균효과를 나타낸다고 보고했다.[44] Sanguinaria 추출물은 실험실 실험결과와는 다르게 일정한 임상효과를 나타내지 못하고 있다.

송 등[45]은 황련(*Rhiszoma coptidis*)이 치주인대 세포의 활성을 촉진하며, IL - 6의 생산을 억제한다고 하였고, 장 등[46]은 후박 추출물(Magnoliac cortex)인 Magnolol과 Honokiol이 염증 매개물질인 cytokines의 생산을 억제하고 항치아우식 효과[47] 및 치태세균과 치주질환 병인균에 대해 항균효과가 있고, 치은 섬유아세포에서 교원질 분해효소의 생산을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다[48].

양 등[49]은 Magnolol과 Holokiol등이 chlorohexidine에 비해 세포성장 촉진효과가 있어 복합적인 면에서 더 좋은 효과를 기대할 수 있다고 주장하였다.

Phenolic compound는 광범위 항균제재로 Triclosan은 치약내 성분으로 함유시 유효농도의 유지와 임상적 효과를 잘 나타내고[50] copolymers를 첨가시 타액 내 세균의 수가 유의성 있게 감소하였으며, zinc citrate와 혼합 시 임상적 효과가 증대되었다[51]. 과산화물은 발생기산소 방출로 구강 내 세균에 대한 살균효과는 인정되나 자체 화학적 성질이 불안정하여 구강 내 효과는 의문시된다.[52]

Mannitol과 Xylitol등 당 대체물은 *Streptococcus*의 대사에 작용 치태에 PH 감소를 억제하는 효과가 있으나 낮은 항 치태 효과와 높은 수용성으로 유효농도 유지가 어려워 주로 chewing gum에 사용되어진다[53].

Chlorhexidine을 함유한 세정제는 음이온의 청정제와 칼슘이온에 의해 비 활성화되거나 구강내 부착부위에 방해를 받아 항 치태 기능이 다른 세정제에 비해 다소 떨어진다고 보고되었다[54 - 58].

천연물질로는 Thymol 등의 정유는 유효농도 유지 효과가 낮아 주로 구강양치액으로 사용되고 있으며 Sanguinaria는 일정 종류의 그람 음성 및 양성 세균의 성장을 in vitro에서 억제 가능하다고 보고되었다[53]. 은행엽 추출물은 순환기 장애 예방에 사용되어지는데 ginkgoflavonglycoside, ginkgolide, 유기산 등의 성분을 함유 collagenase억제 효과를 갖으며 치은 섬유 아 세포의 교원질 합성과 총 단백질 합성에서 좋은 결과를 나타내었다[59].

후박은 *S. mutans*에 강한 항균 효과를 가지고 있고, *P. gingivalis*에 대해 in vitro에서 항균효과가 입증되었다[60].

이들은 chlorhexidine 및 sanguinarine보다 높은 세포 활성도를 보였고 항균 효과는 chlorhexidine보다는 약하나 Listerine보다는 강한 것으로 알려져 있다[60].

은행엽 추출물은 자체로는 미약한 항균효과를 나타내나 후박 추출물과 혼합 시 후박의 높은 항균효과를 그대로 유지하게 하며 은행엽 추출물 단독에서 나타나는 세포 활성도와 비슷한 정도의 높은 활성도를 보인다[59].

Zinc이온을 세정제로 사용 시 치태형성을 억제한다는 여러 연구 보고가 있고[58], Zinc citrate를 세치제로 사용 시 치태 형성을 억제한다는 연구 보고가 있다. Phenol류 인 triclosan은 항 치태 기능을 갖는 비 이온성 물질로 단독일 때 효과가 있지만 zinc citrate와 병용 시 더 우수한 항 치태 효과를 보고하였다[61].

몰약(*Myrrha*), 상백피(*Mori radicis cortex*), 승마(*Cimicifugae rhizoma*)등 오래 전부터 한방제로서 항염 진통에 쓰이던 물질을 세치제에 포함시켜 사용 시 이들이 치태형성 억제와 치아우식을 예방한다는 연구 보고가 있다[62].

천연물로서의 요구 조건은 세치제에 다른 물질의 항균 기능을 방해해서도 안되며 구강세균의 자연적 평형성을 깨서도 안된다. 또한 장기간 사용 시 점막의 부작용이나 내성균주의 형성이 없어야 한다.

항균효과를 갖는 천연 물질을 세치제에 사용할 시는 다른 세마제, 청정제, 결합제, 방향제 등 항균, 항염작용에 영향을 미칠 수 있는 물질 또한 연구되어져야 한다.

이상과 같은 연구들은 생약성분이 갖는 항균, 항염 및 진통작용, 치태 침착의 억제작용을 통하여 치주 질환의 원인요소인 세균성 치태의 억제와 치주염으로 유발되는 염증 증상을 경감시킬 수 있다.

백두옹은 소염, 진통, 해독, 해열에 효능을 가지고 있어 약초로 널리 이용되어 왔는데[63-66] 신 등[67]은 ameba적리의 성장을 억제하며, 신선한 줄기와 잎에서 짜낸 즙액은 황색 포도상균에 대해 항균작용이 있음을 보고한 바 있다. 백두옹은 saponin이 약 9% 함유되어 이를 가수분해 시 triterpen형의 genin, glucose, rhamnose 및 미지의 당으로 변하고 독성물질인 anemonin이 함유되어 있다. 뿌리를 제외한 전 부위는 강심 작용 효과가 있다고 보고되었다.

정 등[68]은 백두옹에서 제초활성물질을 탐색한 결과 11-hoxadecnoic acid, 14-methylpentadecanoic acid, 1.2-benzenedicarboxylic acid, 6-octadecenoic acid, 15-methyl-heptadecanoic acid등 수종을 동정하였다.

약리작용에 대한 연구로 김 등[69]은 백두옹 추출물인 SB-31β가 각종 고형암에 독성이 적으면서 강력한 항암효과를 갖는다고 하였고, 이는 methanol추출물이 alloxan 투여에 의해 현저히 증가하는 혈당량과 혈청 중 total cholesterol 함량을 저하시켜 정상치로 회복시킨다는 보고를 하였다. Friese 등[70]은 *Pulsatilla saponin D*가 항균작용을 갖는다고 보고하였다. 동속식물 연구로 Martin 등[71-73]은 *Pulsatilla alpina*가 in vitro에서 진균작용, 해열작용 및 진정작용을 갖는다고 보고하였다.

Shashi 등[74]은 triterpenoid saponin은 소염작용을 가지고 있고 여러 문헌에서 언급한 바 백두옹의 주성분인 triterpenoid계 saponin이 소염작용을 가질 것으로 추정된다.

본 실험은 메탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부틸알콜로 각 성분을 추출하여 배당 받은 세균에 계대배양하여 항염효과를 조사하였다.

또한 구강 내 세균에 최소억제효과 농도를 조사키 위해 검사물질이 전혀 함유되지 않은 것을 대조군으로 하고 20㎕/㎖를 최고농도로 하여 검사물질에 대한 각 세균들에 대하여 최소억제농도를 측정하였다. 백두옹의 MIC는 1-10㎕/㎖에서 세균의 성장을 억제하는 chlorhexidine이나 5-20㎕/㎖에서 세균의 성장을 억제하는 sanguinarine보다는 더 높은 MIC level을 보였지만 Honokiol과 Listerine의 MIC가 20-160㎕/㎖, 몰약과 인삼사포닌의 MIC가 80-640㎕/㎖인 것과 비교해서는 우수한 항균효과를 나타냈다고 할 수 있다. 또한 *P. gingivalis*를 제외한 *Staphylococcus aureus*를 포함한 그람 양성 세균 및 *E. coli*를 포함한 그람 음성 세균 등 13가지 세균에 이르기까지 넓은 항균범위를 나타냈다. 본 실험은 민간요법으로 소염, 진통, 해독, 해열의 효과로 널리 쓰여오던 백두옹을 분석하여 분석된 성분들이 전반적으로 항균작용이 있다는 사실을 규명한 연구이다. 추후 백두옹 내 어떠한 성분이 어느 세균에 효과가 있는지에 대한 성분 분석이 더욱 필요하고 독성물질인 anemonin의 독작용효과에 대하여도 더욱 연구가 필요하다 하겠다. 부틸알콜로 분리한 층에서 전반적인 세균(13가지)에 대하여 우수한 항균효과가 있음이 밝혀졌고 이를 바탕으로 백두옹의 성분 분석과 함께 구강세정제나 치약의 성분으로 활용될 수 있는 연구가 병행되어야 하겠다.

V. 결론

백두옹(*Persatilla koreana*)의 메탄올, 아세틸아세테이트, 클로로포름, 부틸알콜로 계통학적 분핵 후 배당된 세균의 항염효과를 검사하였고, 각 검사물질들에 대한 세균들의 최소억제농도(MIC)는 20㎕/㎖를 최고농도로 2배 희석하여 제조 사용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 메탄올로 분리된 검사물질에서는 모든 세균에서 발육저지대가 나타나지 않았고 에틸알콜로 분리된 검사물질에서는 *P. nigrescens, S. mutans, S. sanguis*에서, B에서는 *S. mutans, S. sanguis*에서만 발육저지대가 보였다. 부틸알콜로 분리된 검사물질 D에서 *P. gingivalis*를 제외한 13가지 검사세균에서 발육저지대가 관찰되었다.
2. 메탄올로 분리된 검사물질에서는 최고농도의 배지에서도 검사세균이 성장하여 대조군과 큰 차이가 없었다.
3. 부틸알콜로 분리된 검사물질에서는 최고농도 배지(20㎕/㎖)에서 *S. aureus, P. intermedia, E. corrodens, A. actinomycetemcomitans, B. forsythus, P. gingivalis*등은 성장이 저하되었으며, *P. auruginosa, R. dentocariosa, A. viscosus, P. nigrescens, S. mutans* 등은 MIC 20㎕/㎖에서, *S. sanguis*는 MIC 25㎕/㎖에서 성장 저해를 보였다.
4. 원판확산법의 결과를 고려하여 MIC 값을 검토할 때 A는 항균효과가 없는 것으로 사료되고, 부틸알콜로 분리한 검사물질층에서 가장 좋은 항균효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 백두옹에서 추출한 물질에서 광범위한 항균제로 이용할 수 있는 물질을 추출할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Le, E., Theilade, E., and Jensen, B.: Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965; 36: 177.
2. Ellison, S. A.: Oral bacteria in periodontal disease. J Dent Res 1970; 49: 198.
3. Socransky, S. S.: Microbiology of periodontal disease: Present status and future considerations. J periodontol 1977; 48: 497.
4. Listgarten, M. A.: The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. J Clin periodontol 1988; 15: 485.
5. Massler, M.: Gingivitis in young adult males. Lack of effective use of a permissive program of tooth brushing. J Periodontol 1957; 28: 111.
6. Lindhe, J. and Koch, G.: The effect of supervised oral hygiene on the gingivae of children. Lack of prolonged effect of supervision. J periodont Res 1967; 2: 215.
7. Khocht, A., Spindel, L., and Person, P.: A comparative clinical study of the safety and efficacy of three toothbrushes. J Periodontol 1992; 63: 603.
8. Newman, H. N.: Modes of application of anti-plaque chemicals. J Clin Periodontol 1986; 13: 965.
9. Wennstr m, J. L.: Mouthrinses in "experimental gingivitis" studies. J Clin Periodontol 1988; 15: 511.
10. Addy, M.: Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. J Clin Periodontol 1986; 13: 957.

11. Hull, P. S.: Chemical inhibition of plaque. J Clin Periodontol 1980; 7: 431.
12. Goodsen JM. Pharmacokinetic principles controling efficacy of oral therapy. J Dent Res 1989; 68: 1625.
13. Johnson JR, Gjermo P, Eriksen HM. Effect of 2 years' use of chlorhexi - dine - containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. Scand. J dent Res 1975; 83: 288.
14. Van der Ouderaa FJ, Cummins D. Delivery systems for agents in supra - and sub - gingival plaque control. J Dent Res 1989; 68: 1722.
15. Goodson, J. M. and Tanner, A.: Antibiotic resistance of the subgingival microbiota following local tetracycline therapy. Oral Microbiol Immunol 1992; 7: 113.
16. Rames, T. E., Balbaola, O. O., and Slot, J.: Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and *Staphylococci* after systemic doxycycline therapy. Oral Microbiol Immunol 1990; 5: 166.
17. Gusberti, F. A., Sampathkumar, P., Siegrist, B. E., and Lang, N. P.: Microbiological and clinical effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide mouthrinses on developing plaque and gingivitis. J Clin periodontol 1988; 15: 60.
18. Moran, J., Addy, M., and Newcombe, R.: A clinical trial to assess the efficacy of *Sanguinarine* - zinc mouthrinses(Veadent) compared with chlorhexidine mouthrinse(Corsody). J Clin periodontol 1988; 15: 612.
19. Edwardsson, S. , Collaert, B., Attstr m, R. , haes, J. C. , and Movert, R.: Rinsing with delmopinol 0.2% and chlorhexidine 0.2%: Shortterm effect on salivary microbiology , plaque and gin - givitis. J periodontol 1992; 63: 618.
20. Greensteun, G. , Berman, C. , and Jaffin, R.: Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986; 57: 370.
21. Eriksen, H. M., Nordbo, H., Kantanen, H., and Ellingsen, J. E.: Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. J Clin Periodontol 1985; 12: 345.
22. 한덕룡 외. 현대 생약학. 학창사 1987; 45, 76, 189, 248, 338.
23. 한대석 외. 생약학. 연지사 1983; 385.
24. 박원재 외. 상백피의 Sanggenon C에 의한 *Streptococcus*의 생육 및 균부착 저해 효과. 약학회지 1990; 34: 434.
25. Silness P, L e H.: Periodontal dis - ease in pregnancy. Acta Odontol Scan 1964; 22: 121.
26. 민원기, 이만섭: Ascorbic acid와 *Zea Mays L.* 의 불검화 정량추출물이 치주염 치유에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한 치주과학회지. 1988; 18(2): 6 - 23.
27. 최상묵, 한수부, 황광세: *Zea Mays L.* 의 불검화 정량추출물이 외과적 치주 치료 후의 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구. 대한 치주과학회지. 1989; 19(1): 63 - 70.
28. 김종관, 채중규, 조규성, 문의상, 최성호: *Zea Mays L.* 불검화 정량추출물의 치주염 치료효과에 대한 임상적 연구. 대한 치주과학회지. 1991; 21(2): 225 - 234.
29. 元村洋一, 宮田 隆, 荒木久生, 申 基喆, 本傳宣, 花?重正, 北野?雄, 池田克己: 生藥の 齒周ポケシト改善敎果인に及ぽす 影響(第

1) 日齒周誌. 1994; 36: 474 - 479.
30. Chung, CP, Park, JB and Bae, KH: Pharmacological effects of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* to human gingival fibroblasts. Planta medica 1995; 61: 11 - 14.
31. 難汲恒雄: 和漢藥百科圖鑑.(株)保育社. 大阪. 1980; 462 - 463
32. 赤松金芳: 新訂 花漢藥. 醫齒藥出版株式會社. 東京. 1980; 57 - 58
33. H.M. Chang and P.P.H But: Pharmacology and applications of chinese materia medica. Oriental Healing Arts Institute. Long Beach. 1986; 226.
34. 王浴生: 中葯葯理與應用. 人民 生出版社. 北京. 1983; 330 - 337
35. 上海科學誌技術: 中藥大辭典(第3卷).(株)小學館. 東京. 1985; 2084 - 2087.
36. Savitt E. D, Socransky S. S.: Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. J Periodont Res 1984; 19: 111 - 123.
37. Morgues F: A double blind study of Insadol. Minerva Stomat 1970; 19(7 - 8): 293 - 298.
38. Chaput A, Krikorian K, Brion M, Labie C, Perrault M: Effect of Insadol on experimental periodontal disease in hamster. Revue Francaise d'odonto - stomatologiques 1971; 189: 1145 - 1154.
39. Porte J, Durand B, Libourel P, Perdrix G, Parret J: Clinical and ultra - structural study of the action of unsaponifible comseed oil in a case of periodontolysis in man. Osteocytic balance. Actual Odontostomatol(Paris) 1978; 121: 125 - 139.
40. Chaput A: Insadol and parodontol - yses. L'Information Dentaire. 1964; 23: 2148 - 2153.
41. Tecucianu J: Double blind clinical trial of titrared extract of the unsaponifiable fractions of *Zea Mays L.* on gingival inflammation. Inf Den 1975; 57:27
42. Son S: Influence of standard extract of the unsaponifiable fraction of *Zea Mays L.* on periodontal disease. Quintessence Int'l 1982; 8: 1 - 7.
43. Kopczyk RA, Abramas H, Brown AT, Mateny JL, Kaplan AL: Clinical and microbiological effects of a *Sanguinaria* - containing mouthrinse and dentifrice with and without during 6 months of use. J Periodontol 1991; 62: 612 - 622.
44. Scheie, A. Aa: Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other thanchlorhexidine. J Den Res 1989; 68(Special Issue): 1609 - 1617.
45. 송기범, 공영환, 유형근, 신형석.: 황련이 lipopolysaccharide를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL - 6 생산에 미치는 영향, 대한치주과학회지 Vol. 26, NO. 3, 641 - 654, 1996
46. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환: *Magnolol*과 *Honokiol*이 항균, 교원질분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주학회지. 1993; 23: 145 - 158.
47. Bae K. H.: The antibacterial activities of the components isolated from the stem bark of Magnolia Obovota against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. 1987; 7th Symposium on organic Chemistry Abstract: 34.

48. Chang BS, Lee YM, Ku Y, Bae KH, Chung CP: The antibacterial activities of Magnolol and Honokiol against of Magnolol and Honokiol against peri - odontopathic microorganism. Planta Med 1998; 64: 367 - 369.
49. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평.: 대조추출분획이 치은 섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 1994; 24(1): 144 - 153.
50. Jones C. L, Ritichie J. A, March P. D. and Van der Ouderaa F.: The effect of longterm use of a dentifrice containing zinc citrate and a non - ionic agent on the

oral flora J. Dent. 1988; 67: 46 - 50.
51. Saxton C. A.: The effect of dentifrice containing zinc citrate and 2, 4, 4' trichloro - 2' - hydroxydiphenyl ether J Periodontol 1986; 9: 555 - 561.
52. Saxton C. A. and Van der Ouderaa F. J.: The effect of dentifrice containing zinc cit - rate and triclosan on developing gingivitis J Periodont Res 1989; 24: 75 - 80.
53. Assv S, Scheie A,A.A and Rolla G.: Potential of xylitol, mannitol and sorbose to inhibit metabolism in *Streptococcus sobrinus* OMZ 176 J Dent Res 1989; 68: 1729 - 1731.
54. Gjermo P. and Rolla G.: The Plaque inhibition effect of chlorhexidine containing dentifrice Scan J Dent Res 1971; 79: 126.
55. Scheie A,AA.: Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine J Dent Res 1989; 68: 1609 - 1616.
56. Moran J., Addy M., Newcombe R.: Comparison of an herbal tooth paste with a fluo - ride tooth paste in plaque and gingivitis. Clin prev Dent 1991; 13: 12 - 15.
57. Gjermo P. & Rolla G.: The plaque - inhibiting effect of chlorhexidine - contaning den - tifrices. Scan J Den Res 1971; 79: 126 - 132.
58. Gjermo, P.: Chlorhexidine and related substances. J Den Res 1989; 68(Special Issue): 1602 - 1608.
59. 정종평, 구영, 배기환: 은행엽 추출물이 치은섬유아세포에 미치는 생물학적 영향 대한치주과학회지 1995; 제25권(3호): 469 - 477.
60. Bae KH and Oh, HR: synergistic effect of lysozyme on bacterial activity of Magnolol and Honokiol against a carriogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. Arch Pharm Res 1990; 13: 117 - 119.
61. Skjorland K., Gjermo, P. & Rolla, G.: Effect of some polyvalant cations on plaque formation in vivo. Scan J Den Res 1978; 86: 103 - 107.
62. Ryu, S., Ahn, B, and Pack, M.: The cytotoxic principle of Scutellarise Radixagainst L1210 cell. Planta Medica 1985; 51: 462.
63. 권혁상: 백두옹 에텔분획의 약효성분에 관한 연구. 중앙대학교 대학원 석사학위청구논문, 중앙대학교 대학원. 경희대학교 대학원 박사학위 청구논문 경희대학교 대학원. 1975.
64. 이근후: 백두옹 *Pulsatillae Radix*의 약리학적 연구. 경희대학교 대학원 박사학위 청구논문 경희대학교 대학원. 1975.
65. 김혜성: 백두옹탕 수침 엑시스가 mouse 빈식능력에 미치는 영향. 중앙대학교 대학원 석사학위청구논문, 중앙대학교 대학원 1989.
66. 백영훈: 각종 암세포주에 대한 백두옹 추출물(SB - 31β)의 항암효과 및 항암작용. 충남대학교 대학원 박사학위청구논문. 충남대학교 대학원1995.
67. 신민교, 정보섭: 향약생약 대사전. 영람사, 1990; 495.
68. 정형진, 김진우, 김형동: 백두옹(*Pulsatilla koreana Nakai*)뿌리로부터 제초활성물질의 분리. 한국자원식물학회지. 1996; 9: 47.
69. S. Y. Kim and S. B. Kim: Anti - tumor effects of extracts of *Pulsatilla koreana(*SB -

31β) in vitro. J. Kor. Cancer. 1994; 26(6): 959 - 963.
70. K.H. Friese, S. Kruse, R. Ludtke and H. Moeller: The homeopathic treatment of otitis media in children - comparisons with conventional therapy. Int J Clin Pharmacol Ther 1997; 32(7): 296 - 301.
71. M.L. Martin, L. San Roman and A. Dominguez: In vitro activity of protoanemonin, an antifungal agent. Planta Med 1990; 56(1): 66 - 69.
72. M.L. Martin, A.V. Ortiz de Urbina, M.J. Montero, R. Carron and L. San roman: Pharmacologic effects of lactones isolated from *Pulsatilla alpina subsp. apiifolia.* J Ethnopharmacol 1988; 24(2 - 3): 185 - 191.
73. M.L. Matin, A. Moran and L. San Roman: Pharmacologic screening of *Pulsatilla alpina subsp.* J Ethnopharmacol 1987; 21(2): 201 - 206.
74. S.B. Mahato, S.K. Sarkar and G. Podder: *Triterpenoid saponins.* Phytochemistry. 1988; 27(10): 3037 - 3067.

- Abstracts -

The Antimicrobial Effect of *Pulsatilla Koreana* Extracts to Oral Micro - Organism

Sung - Wha Chung[1], Chin - Hyung Chung[1], Sung - Bin Lim[1], Jung - Keun Kim[2], Eun - Hee So[3]

Department of Periodontolgy, College of Dentistry, Dankook University[1]
Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Dankook University[2]
The national crop experiment station(NCES) Soybean breeding[3]

Gingivitis and periodontitis are infectious diseases in that microorganisms are the primary extrinsic cause of the diseases. the occurrence of gingivitis has been associated clearly with the presence of microorganisms at the disease site, and the histologic nature of the tissue involved is indicative of an inflammatory response induced by microorganisms. additional evidence for the microbial etiology of periodontal disease is that numerous antimicrobial agents are effective in reducing plaque accumulation and periodontal diseases. the purpose of this article is to analyze the antimicrobial effects of *Pulsatilla koreana.*

Well - dried *Pulsatilla koreana* purchased from herbs distributor was ground and extracted into methanol(MeOH), ethylacetate(EtoAc), chlorform($CHCl_3$) and Butyl alcohol(BuOH).

we have then applied each solution to the bacteria samples(*Bacteroides forsythus, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis, Porphylomonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Eikenella corrodens, Prevotella intermedia, Actinomyces viscosus, Prevotella nigrescens, Rothia dentocariosa, Fusobacterium nucleatum, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus)* collected from several organizations.

To conduct susceptibility test(Kirby - Bauer method), plate contained each periodontopathic bacteria is spread extracted into methanol(MeOH), ethylacetate(EtoAc), chlorform($CHCl_3$) and Butyl alcohol(BuOH) and to measure the minimum inhibition concentration(MIC) of the bacteria against the solutions to ultimately determine antimicrobial effects of the solutions, insert bacteria sample into 20㎕/㎖, 10㎕/㎖, 5㎕/㎖, 2.5㎕/㎖ of each solution and control group(not contained solution)

1. Solution extracted into methanol did not show clear zone against all bacteria samples. Only *P. nigrescens*, *S. mutans and S. sanguis* in soluton extracted into ethylacetate, *S. mutans and S. anguis* in solutions extracted into chlorform and Butyl alcohol showed clear zone against all bacteria samples. Solution extracted into Butyl alcohol showed clear zone against 13 types of bacteria, excluding *P. gingivalis*.
2. In Solution extracted into methanol, the bacteria samples grew in the highest

concentrated plate, showing minimal variation from control group.

3. In Solution extracted into Butyl alcohol, *S. aureus, P. intermedia, E. corrodens, A. actinomycetemcomitans, B. forsythus, P. gingivalis et al.* showed decreased growth in the highest concentrated plate. *P. auruginosa, R. dentocariosa, A. viscosus, P. nigrescens, S. mutans et al.* showed decreased growth at MIC 20㎕/㎖ and *S. sanguis* showed decreased growth at MIC 10㎕/㎖.
4. By analyzing the MIC level through considering the results from Kirby-Bauer method, Solution extracted into methanol did not reveal any antimicrobial effects and Solution extracted into Butyl alcohol showed the highest antimicrobial effects

In conclusion, it can be used the extracts of *Pulsatilla koreana* as wide spectrum antimicrobial agent.