

몇몇 식물 정유성분이 항생제내성균주 *Staphylococcus aureus* SA2의 성장에 미치는 영향

문경호 · 서봉수 · 김혜경 · 박민수 · 이정규[#]

경성대학교 약학대학

(Received December 22, 2003; Revised February 11, 2004)

Effects of Essential oils of Several Aromatic Plants on the Growth of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus* SA2

Kyung Ho Moon, Bong Soo Seo, Hyekyung Kim, Minsoo Park and Chung Kyu Lee[#]

College of Pharmacy, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea

Abstract — The essential oil fractions from six plant parts including leaf of *Zanthoxylum piperitum* and flower of *Lindera obtusiloba* have revealed to possess resistance inhibitory activity on antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* SA2 when combined with chloramphenicol (Cm). The combination of Cm and essential oil mixtures showed potent resistance inhibition in the level of 10~20 µg/ml.

Keywords □ growth inhibition, antibiotics resistance, resistance inhibition, *Staphylococcus aureus* SA2, essential oil, *Lindera obtusiloba*, *Zanthoxylum piperitum*

항생제의 빈번한 사용으로 인한 내성균주의 증가는 감염성 질환의 치료에 큰 장애가 되고 있다. 우리가 흔히 접하는 병원성 세균 중의 하나인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 역시 새로운 항생제가 꾸준히 개발되고 있음에도 불구하고 계속적으로 내성을 획득하게 되어 여전히 인류를 위협하고 있다.^{1,2)}

저자 등은 항생제에 내성을 가진 균주인 황색포도상구균 *Staphylococcus aureus* SA2³⁾ 등의 내성을 억제함으로써 항생제의 효능을 높이거나 확장하는 물질을 찾고자 일련의 연구를 수행한 결과 식물 정유성분이 항생제와 병용될 때 내성균의 내성을 억제하는 경향을 보고한바 있다.⁵⁻⁹⁾ 보고된 28종의 방향성 정유성분 중 초피나무 잎을 비롯하여 생강나무의 꽃 등 6종의 식물부위에서 얻은 정유가 가장 강한 활성(내성억제)을 나타내었으며 그 정유성분(정유혼합물)의 유효성분과 그 작용기전을 밝힘으로서 항생제 내성억제약물의 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

식물재료

초피나무(*Zanthoxylum piperitum*, 부산근교)의 가지 및 잎, 생강나무(*Lindera obtusiloba*, 부산 및 경남 일원)의 꽃, 고광나무(*Philadelphus schrenkii*)의 잎, 단풍취(*Ainsliaea acerifolia*)의 뿌리 및 쥐오줌풀(*Valeriana fauriei*, 이상 강원도 원주 근교)의 뿌리 등은 채집한 후 감정하고 말리지 않고 사용하였다.

시약

Tryptic soy broth(TSB)와 agar는 Difco 제품을, Cm, acetyl CoA, Tris 등은 Sigma 제품 것을 사용하였다.

균주

항생제 다제 내성균 *S. aureus* SA2는 ampicillin, Cm, erythromycin, gentamicin, kanamycin, methicillin, streptomycin, tetracyclin, tobramycin, clindamycin에 내성을 보이는 다제내성균으로 본 대학 실험실에서 배양한 것이다.³⁾

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4880 (팩스) 051-620-4880
(E-mail) cklee@star.ks.ac.kr

추출 및 분획

실험에 사용할 식물의 정유성분은 김 등¹⁾의 방법에 따라 추출하였다. 초피나무 잎과 생강나무 꽃은 수증기 증류로 분리한 정유성분으로부터 활성성분을 분리하기 위하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피법(Kiesel gel 60, 230~400 mesh, E. Merck, 용매: 석유벤젠-클로로포름=1-1→1-9)과 preparative TLC법(Kieselgel 60F₂₅₄, 1 mm, E. Merck, 용매: 석유벤젠-클로로포름=1-4)을 반복하여 oil상 성분을 분리하여 각각 9종(ZP1~ZP9)과 8종(LO1~LO8)의 subfraction과 2종의 단일성분을 분리하였다.

활성측정

최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 및 최소내성억제농도(minimal resistance inhibitory concentration, MRIC)는 다음과 같은 과정을 거쳐 측정하였다. 분리과정을 거쳐 얻어진 성분들은 absolute ethanol(Hayman Limited)에 녹여 사용하였고 TSB 배지에서 12시간 이상 배양한 *S. aureus* SA2 배양액을 1×10^5 colony forming unit(CFU) 되도록 하여, 각 농도의 정유성분이 들어 있는 TSB 배지에 접종시킨 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하여 성장 여부 및 정도를 관찰한 후 균의 성장을 억제하는 최소농도를 MIC로 표시하였다. 동일한 방법으로 배양액을 조성하여, 50 µg/ml의 Cm과 각 농도의 정유성분이 들어 있는 TSB 배지에 접종시킨 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하여 성장 여부를 관찰하여 MRIC를 측정하였으며 control group에 대한 항생제와 추출물을 병용 처리한 group의 균 성장 억제 정도를 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

정유분획-Cm 복합제가 내성균 성장에 미치는 영향

식물의 정유와 Cm의 복합제제가 내성균의 성장억제에 미치는 영향을 재확인하기 위하여 종전의 실험에서 활성을 보인 정유를 선택하여 재실험 한 결과는 Table I에 나타난 바와 같다. 이 실험에서는 50 µg/ml의 Cm에는 성장 억제가 일어나지 않는 *S. aureus* SA2 균주도 여러 농도의 정유와 Cm 복합제제에 의해서는 성장이 억제되는 경향을 보여, 이들 정유의 내성억제 현상을 확인할 수 있었다. 이러한 내성억제를 계량화하기 위하여 MIC 및 MRIC를 측정 한 결과는 Table II와 같다. 즉, Cm을 첨가하지 않고 정유 자체만의 항균력은 500 µg/ml 이상(쥐오줌풀의 경우 200 µg/ml)인 조건에서 Cm과 병용할 경우의 최소내성억제농도는 고광나무 잎의 정유(200 µg/ml 이상)를 제외하고는 모두 100 µg/ml 이하로 나타났다. 이러한 결과는 이들 정유성분이 Cm과 병용될 경우 내성균의 성장을 여전히 억제할 수 있음을 확인시켜 준다. 이상의 실험에서 내성억제효과가 큰 초피나무 잎과 생강나무 꽃으로부터 얻은 정유에 대하여서는 그 활성성분을 분

Table I - Effects of several essential oils combined with chloramphenicol (Cm)¹⁾ on the growth of *S. aureus* SA2.¹⁾

Treatments and plants sources	Part used	Dose (µg/ml)	Growth % of control
Cm (not combined with essential oil)		50	100
Cm combined with			
<i>Philadelphus schrenkii</i>	Leaf	200	20
		100	20
		50	20
		25	40
<i>Ainsliaea acerifolia</i>	Root	200	0
		100	0
		50	40
		25	40
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Twig	200	0
		100	0
		50	0
		25	20
	Leaf	200	0
		10	0
<i>Valeriana fauriei</i>	Root	200	0
		25	0

The bacterial strain was cultivated in tryptic soy broth (TSB) with Cm for sustaining the resistance and suppression of other bacterial strain at 37°C for 12 hrs.

¹⁾50 µg/ml (combined with each essential oil); ²⁾ 1×10^5 colony forming unit in 1 ml of TSB medium.

Table II - Minimal inhibitory concentration (MIC)¹⁾ and minimal resistance inhibitory concentration (MRIC)²⁾ of several essential oil combined with chloramphenicol (Cm) against *S. aureus* SA2

Treatments	Part used	MIC (µg/ml)	MRIC (µg/ml)
<i>Philadelphus schrenkii</i>	Leaf	>500	>200
<i>Ainsliaea acerifolia</i>	Root	>500	100
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Twig	>500	50
	Leaf	>500	25
<i>Valeriana fauriei</i>	Root	200	25
<i>Lindera obtusiloba</i>	Flower	>500	25

For method refer to the footnote of Table I.

¹⁾MIC value is the level of essential oil itself without Cm and ²⁾MRIC is that of essential oil combined with Cm on the growth of Cm resistant *S. aureus* SA2.

리하기로 하였고 내성억제력은 이들과 비슷하나 MIC가 다른 것과는 차이가 나는 길초근 정유에 대하여서는 자체 항균력과 내성억제력과의 효능 검토가 필요하다고 생각되어 내성억제 실험에서는 제외하였다.

초피나무 잎과 생강나무 꽃의 정유를 칼럼 크로마토그래피 및 preparative TLC법으로 얻은 subfraction을 대상으로 내성균의 성장과 내성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table III에 나타난 바와 같다. 초피나무 정유의 subfraction 중 ZP3~ZP6이 함께 내성균의 성장을 완전히 억제하였으며 MRIC도 10 µg/ml로 상당히 낮게 나타났다. 생강나무 꽃의 정유에서는 subfraction LO4~LO6가 같은 효과를 나타내었다. 이상의 결과에 따라 두

Table III – Growth Inhibition and minimal resistance inhibitory concentration (MRIC) of essential oil subfractions of *Zanthoxylum piperitum* leaf¹⁾ and *Lindera obtusiloba* leaf²⁾ combined with chloramphenicol³⁾ against *S. aureus* SA2⁴⁾

Subfractions	Growth % of control MRIC (µg/ml)		
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	ZP1	100	>25
	ZP2	100	>25
	ZP3	0	10
	ZP4	0	10
	ZP5	0	10
	ZP6	0	10
	ZP7	100	>25
	ZP8	100	>25
	ZP9	100	>25
<i>Lindera obtusiloba</i>	LO1	100	>25
	LO2	100	>25
	LO3	100	>25
	LO4	0	20
	LO5	0	20
	LO6	0	20
	LO7	100	>25
	LO8	100	>25

For method refer to the footnote of Table I.
 Doses: ¹⁾10 µg/ml, ²⁾20 µg/ml and ³⁾50 µg/ml.
⁴⁾Number of cells: 1 × 10⁵ cells/ml.

Table IV – MIC and Minimal resistance inhibitory concentration (MRIC) of isolated compounds combined with chloramphenicol (Cm)¹⁾ against *S. aureus* SA2²⁾

Treatments	MIC (µg/ml)	MRIC (µg/ml)
Constituent ZP4-A from <i>Zanthoxylum piperitum</i>	>50	2.5
Constituent LO5-A from <i>Lindera obtusiloba</i>	>5	10.0

For method refer to the footnote of Table I.
¹⁾50 µg/ml of Cm was combined with essential oil constituents.
²⁾Number of cells: 10⁵ cells/ml.

정유 성분 subfraction에 대하여서는 성분화학적 검토가 진행 중이며 또한 구조-활성 상관관계도 검토되어야 할 것이다.

위의 실험 결과를 바탕으로 하여 내성억제 유효물질을 분리하기 위하여 초피나무의 잎에서 얻은 ZP3~6분획을 모아 prep-TLC를 실시한 결과 두개의 spot으로 나타났는데 이중 한 개의 spot에 해당하는 물질(ZP4-A)에 대하여 MIC와 MRIC를 최종적으로 확정한 결과는 Table IV에 나타난 바와 같으며 그 화학구조는 구명 중에 있다. 또한 생강나무의 꽃에서 얻은 LO4~6분획을 모아 같은 방법으로 prep-TLC를 실시하여 물질 LO5-A를 분리하였고 이에 대한 MIC와 MRIC는 표에 나타난 바와 같다. 이 물질의 화학구조는 역시 구명 중에 있다.

결 론

이상의 실험 결과를 검토할 때 생강나무 꽃과 초피나무 잎의

정유에서 얻은 두 함유 성분은 10~20 µg/ml의 농도에서 Cm과 복합투여 되면 내성균 황색포도상구균에 대하여 강한 억제작용을 나타냄을 확인하였으며, 이들 물질의 화학적 본질은 구명 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2000-000-00197-0)지원으로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Baird-Parker, A. C. : Classification and identification of staphylococci and their resistance to physical agents. *The Staphylococci*, 1 (1972).
- 2) Oeding, P. : Taxonomy and identification. Staphylococci and staphylococcal infections, *Clin. and Epidemiol. Aspects.* 1, 1 (1983).
- 3) Lee, D. W. and Moon, K. H. : Characterization of chloramphenicol resistant plasmid of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *Yakhak Hoeji* 37, 621 (1993).
- 4) Kim, H.-K., Park, S. W., Park, J. N., Moon, K. H. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. I. - Resistance inhibition of 21 Korean plants, *Nat. Prod. Sci.* 1(1), 50 (1995).
- 5) Park, J. N., Kim, H.-K., Moon, K. H. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. II. Inhibitory effects of 'Chwinamool' (*Aster scaber*), *Kor. J. Pharmacogn.* 28(3), 162 (1997).
- 6) Lee, C. K., Kim, H.-K., Moon, K. H. and Shin, K. H. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. III. - Resistance inhibition of volatile components of Korean aromatic herbs, *Arch. Pharmac. Res.* 21(1), 62 (1998).
- 7) Kim, H.-K., Moon, K. H., Ryu, S.-Y., Moon, D.-C. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. IV. - Resistance inhibitors from *Anethum graveolens* and *Acorus gramineus*, *Arch. Pharmac. Res.* 21(6), 734 (1998).
- 8) Kim, H.-K., Moon, K. H. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. V. - Resistance inhibition by acorenone from *Acorus gramineus* Solander, *Nat. Prod. Sci.* 6(1), 36 (2000).
- 9) Moon, K. H., Kwon, J. Y., Kim, H.-K., Seo, B. S. and Lee, C. K. : Effect of hexane extract of *Acori graminei* Rhizoma on the growth of chloramphenicol resistant bacteria, *Nat. Prod. Sci.* 9(3), 183 (2003).