

향유 지상부의 정유의 수종 항생제 내성 병원성 균주에 대한 억제효과

신 승 원[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received January 26, 2010; Revised February 4, 2010; Accepted February 4, 2010)

Study on Activities of the Essential Oil from *Elsholtzia ciliata* against Some Antibiotic-Susceptible and -Resistant Strains of Pathogenic Bacteria

Seungwon Shin[#]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — The essential oil fraction was extracted from the aerial parts of the plant by steam distillation method and its composition was analyzed by GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) which led to the identification of 43 compounds. Dehydroelsholtzia ketone (56.81%) and elsholtzia ketone (30.05%) were identified as the predominant components of this oil. The antibacterial activities of the essential oil fraction were assessed by micro-dilution tests against antibiotic-susceptible and -resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, and *S. typhimurium*. The oil inhibited most of the tested strains significantly resulting MICs (minimum inhibiting concentrations) between 2 mg/ml and >16 mg/ml. In most cases of this study *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* showed higher sensitivity to this oil than *Salmonella* strains.

Keywords □ essential oil, *Elsholtzia ciliata*, antibiotic-resistance, elsholtzia ketone, dehydroelsholtzia ketone, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*

각종 세균성 질환에 대처하기 위하여 지금까지 미생물의 대사 산물 및 합성품으로부터 강력한 많은 항생제들을 개발되었으며 또한 식품의 방부제나 주변 환경의 살균을 위한 목적으로도 각종의 강력하고 경제적인 화학물질들을 사용하게 됨에 따라 이들의 독성 및 부작용에 관한 문제점 외에도 여러 방면에서 심각한 문제들이 속속 발생하기 시작하였다. 이중 가장 중요한 측면이 내성균의 발생인데, 어떤 항생제로도 죽지 않는 VRSA 등 기존에 사용되고 있는 중요 항생제들에 대한 내성균의 출현이 가속화 되고 있으며, 이는 매우 심각한 문제를 야기하고 있다.^{1,2)} 또한 임상이나 축산으로부터 환경으로 내성균의 확산이 예상되는데, 항생제 내성을 획득한 균주가 분변이나 생활하수, 양식장이나 축산 폐기물들을 통해 자연계로 확산될 경우, 자연계 내의 여러 종류의 세균에 내성을 전달시킬 수 있는 위험성을 가지고 있기 때문에 심각한 문제가 된다.³⁻⁶⁾

이와 같은 기존의 항생제에 대한 내성균 발생의 심각한 가속

화 현상에 대한 대처방안의 하나로 천연 항균제에 대한 중요성이 다시금 부각되게 되었고, 이와 관련된 연구가 세계적으로 큰 관심이 되어, 수많은 천연항균 물질들이 개발되었다. 그 중 특히 식물의 정유분획의 항균작용은 이미 오래 전부터 알려져 있어서, 식물 정유로부터 내성균 억제제 연구가 활발하게 진행되고 있다.^{7,8)}

꿀풀과(Labiatae)에 속하는 향유(*Elsholtzia ciliata*)는 우리나라의 산야에 비교적 흔히 무리 지어 자라는 일년초이며 가을에 피는 보라색의 꽃의 화서 모양이 특이하며 잎과 꽃은 고유한 향기를 내어 한국 중요 정유자원 식물 중 하나이다. 동속 식물인 꽃향유(*E. splendens*)는 다년생 식물이며 향유보다 눈에 띄는 화서를 갖추고 있으며, 한방에서는 꽃필 때의 지상부를 향유와 같이 발한, 해열, 이뇨약으로, 감기 및 전신부종, 복통, 토사 등의 증상에 약용한다.^{9,10)}

본 연구에서는 한국산 꿀풀과 자원식물의 정유로부터 항생제 내성균 억제제를 개발하기 위한 목적으로, 우리나라 산과들에 흔히 야생하는 향유의 지상부를 채집하여 정유를 추출하여 그 조성의 특징을 분석하고, 현시점에서 문제시되는 중요 병원성 내성균 수 중에 대한 억제작용을 향생제와 비교하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8384 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) swshin@duksung.ac.kr

실험방법

정유추출 및 분석

충청북도 제천 근처의 야산 입구에서 야생하는 향유(*Elsholtzia ciliata*)의 지상부를 9월 초에 채취하여 SDE(Spontaneous Distillation and Extraction) 장치를 이용하여 수증기 증류하여 상법에 따라 정유를 추출하였다. 재료 식물 표본(ESH-1)은 덕성여자대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

추출한 정유의 조성은 Hewlett-Packard 6890 GC와 Hewlett-Packard 5973 MSD 분석기기에 2% 용액(ether) 1 µl씩을 주입하여 아래와 같은 조건에서 분석하였다. 측정된 각 peak의 mass spectrum은 computer에 저장된 mass data(PBM Search of Library file: Data: Wiley L.)와 비교하여 구조를 동정하였다. Carrier gas: He(0.8 및 1.6 ml/min), column: HP-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) capillary column, oven temperature: 50°C (10 min), 3°C/min(50~125°C), 1°C/min(125~145°C), 3°C/min (145~250°C) split(10 : 1).

사용균주 및 배양

S. aureus ATCC29213, *S. aureus* CCARM3511, *S. aureus* CCARM3523, *S. pneumoniae* KCCM 40410, *S. pneumoniae* CCARM 4009, Sp010: *S. pneumoniae* CCARM 4010, *S. enteritidis* KCCM12201, *S. enteritidis* CCARM8010, *S. enteritidis* CCARM8011, *S. typhimurium* KCCM11862, *S. typhimurium* CCARM8007, *S. typhimurium* CCARM8009를 한국미생물보존센터(KCCM)와 항생제 내성 균주 은행(CCARM)에서 분양 받아서, Müller-Hinton I 액체배지에(BD) 배지에 현탁하고, McFarland 0.5 Standard와 같은 탁도로 조정된 균액을 제조하여 균의 농도가 약 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ CFU/ml가 되게 만들어서 항균효과 측정에 사용하였다.

정유 비교물질 및 항생제

정유 분획을 hexane : ethyl acetate=9 : 1을 용매로 사용하여 silicagel column chromatography를 한 결과 fraction 1~6을 얻었고, TLC와 GC-MSD에 의해 camphor와 borneol이 함유된 것으로 확인된 fraction 2와 5를 농축하여 같은 조건으로 2차 chromatography를 하여 각 해당 fraction 으로 부터 camphor와 borneol 결정을 얻어 재결정하고, 측정된 기기분석 data로 재확인하였다. Kanamycin(98.8%), streptomycin(99%) 등의 항생제는 Sigma-Korea Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

액체배지 희석법에 의한 MIC 측정

항균 활성 실험은 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, USA)¹¹에서 제시한 microbroth dilution test 규정에 따

라 실행하였다. 수증기 증류에서 얻은 향유 정유 분획과 비교물질인 borneol 및 camphor를 각각 에탄올과 소량의 Tween 80을 가하여 현탁 시킨 후 syringe filter로 무균 여과하여, 최고농도 50 mg/ml에서 최저농도가 0.78 mg/ml에 이르도록 단계적으로 희석하여 96 well plate의 각 well에 100 µl씩 주입한 후 균액을 100 µl씩 첨가하였다. 이것을 shaking incubator(100 rpm)에 넣고 36°C에서 24시간 배양한 후, 육안으로 관찰하여 균의 성장이 억

Table I – Composition of the essential oil from the aerial parts of *E. ciliata* analyzed by GC-MS

RT*	Area %	Compounds
8.71	0.46	1-octene-3-ol
10.88	0.44	1, 8-cineol
14.39	1.79	p-cymen-7-ol
14.52	0.92	linalool
14.61	0.14	α-thujone
16.43	0.30	camphor
17.03	0.08	iso menthone
17.58	0.04	camphol
17.77	0.03	α-terpineol
17.93	0.03	nerol
18.93	0.16	α-terpineol
19.78	30.05	elsholtzia ketone
20.41	1.18	n-methyl-2-formylpyrrole
21.28	0.03	pulegone
21.59	0.02	carvone
23.32	0.07	p-cymen-7-ol
24.05	0.03	β-myrcene
24.65	56.81	dehydroelsholtzia ketone
24.96	0.07	artemisia ketone
27.01	0.02	eugenol
27.33	0.01	neryl acetate
27.44	0.02	copaene
27.81	0.59	β-bourbonene
28.23	0.02	elemene
28.76	0.03	cis-jasmone
28.92	0.02	epi-α-cedren I
29.30	0.76	caryophyllene
29.76	0.06	β-cubebene
30.42	0.04	germacrene
30.79	3.44	α-humulene
31.23	0.03	β-farnesene
31.99	0.22	β-cubebene
32.19	0.03	(+)-aromadendrene
32.41	0.02	β-damascone
33.4	0.43	α-farnesene
33.86	0.08	δ-cadinene
35.65	0.02	nerolidol
35.98	0.02	(-)-spathulenol
36.16	0.05	(-)-caryophyllene
36.83	0.03	α-ocimene
36.97	0.02	2, 4-diethylanisole
38.54	0.03	γ-cadinene
39.05	0.04	α-cadinol

*RT; Retention time. Compounds are listed in their order of their elution on the HP-5MS column.

제된 최저농도(MIC)를 판별하였다. Kanamycin, norfloxacin 등의 비 수용성 항생제는 dimethylsulfoxide(DMSO)를 용매로, streptomycin, oxacillin, ampicillin 등의 수용성 항생제는 증류수를 용매로 하여, 2 mg/ml부터 8단계까지의 배수 희석액을 제조하였다. 각각 한 농도의 sample을 각 well 마다 5 μ 씩을 주입하고, 균액 100 μ l, 배지 95 μ l를 첨가하고, 정유와 같은 조건에서 배양하였다. 사용한 용매와 Tween 80이 시료의 항균력에 영향을 미치지 않았음을 대조실험을 통해 확인하였다. 대조실험에서는 시료를 제외하고 균과 용매, Tween 80을 본 실험과 같은 조건에서 배양하여, 균만을 배양했을 때와 비교하여 균 성장에 첨가한 Tween 80이 영향을 주지 않음을 확인하였다.

실험결과 및 고찰

향유 지상부로부터 추출한 정유를 GC-MS로 분석한 결과 Table I에 정리된 바와 같이 총 43종의 성분이 확인되었다. 구성 성분 중 dihydroelsholtzia ketone(56.81%)과 elsholtzia ketone(30.05%)가 정유의 대부분을 차지하고 있어서, 이 두 성분이 향유정유 분획의 항균작용에 큰 영향을 미칠 것으로 예상되었다. Dehydroelsholtzia ketone과 elsholtzia ketone은 각각 MW=164 및 164의 구조 유사 화합물(Fig. 1)로 향유 외 *Elsholtzia*속 다른 종의 식물 정유에도 다량 함유 되어 있음이 보고된 바 있으며, 이들

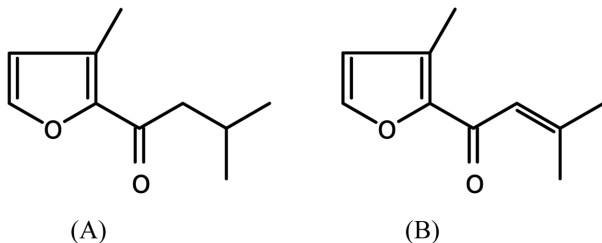


Fig. 1 - Structure of elsholtzia ketone (A) and dehydroelsholtzia ketone (B).

성분의 구성비율은 같은 중에서도 자생지역에 따라 현저한 차이가 있어 chemo type에 따른 분류에 관하여도 알려져 있다.¹²⁻¹⁴ 또한 이 두 성분들은 공통적으로 정유성분 중 비교적 특이한 furan 구조를 함유하고, 이어 연결된 carbonyl로 하여 반응성이 높아 불안정하나, 동시에 여러 유도체 합성의 출발물질로 이용되어 왔다.^{15,16} 세번째 다량 함유 성분으로 확인된 α -humulene (3.44%)은 non-oxygenated sesquiterpene hydrocarbon으로 구조상 정유분획의 항균활성에 기여하는 바가 적었을 것으로 예상되었다.

향유 정유분획과 비교물질로는 camphor 및 borneol의 각 항생제에 대한 감수성 또는 내성인 *S. aureus* ATCC29213, *S. aureus* CCARM3511, *S. aureus* CCARM3523, *S. pneumoniae* KCCM 40410, *S. pneumoniae* CCARM 4009, *S. pneumoniae* CCARM 4010에 대한 억제활성을 측정하기 위하여 실험한 microbroth dilution test의 결과를 Table II에 정리하였다. 향유 정유는 *S. aureus* 3종 균의 항생제 내성 여부와 관계없이 동일한 항균효과를 보였다. *S. aureus* 3종 중 2종(Sa11, Sa13)에 대해 carvone보다는 높고 camphor에 비하여는 낮은 MIC 결과(2 mg/ml)를 나타내었고, Sa23에 대한 MIC는 carvone과 같고, camphor 보다는 낮았다. *S. pneumoniae* 4종 균에 대한 향유 정유의 억제활성은 camphor나 carvone과 전반적으로 큰 차이를 나타내지 않았고, MIC 결과는 대상균의 항생제 내성과는 연관이 없는 것으로 나타났다.

Table III에 나타낸 바와 같이 그람 음성균인 *S. enteritidis* KCCM12201, *S. enteritidis* CCARM8010, *S. enteritidis* CCARM8011, *S. typhimurium* KCCM11862, *S. typhimurium* CCARM8007, *S. typhimurium* CCARM8009에 대한 향유 정유의 MIC는 4~>16 mg/ml로 그람 양성균인 *S. aureus* 또는 *S. pneumoniae*에 대한 결과에 비해 대체로 높게 나타났다. *S. enteritidis*의 경우는 strain의 항생제 내성 여부와 관계없이 향유 정유의 MIC가 4 mg/ml로 일정하였으나, 반면 *S. typhimurium*에서는 실험한 대부분의 항생제에 대한 감수성이 상대적으로 높

Table II - MICs (minimum inhibitory concentrations) of the *E. ciliata* against antibiotic-susceptible and -resistant strains of *S. aureus* and *S. pneumoniae*

Samples (mg/ml)	<i>S. aureus</i>			<i>S. pneumoniae</i>			
	Sa13	Sa11	Sa23	Sp410	Sp33	Sp09	Sp010
<i>E. ciliata</i> oil	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	4.00
Carvone	0.25	0.13	2.00	4.00	4.00	2.00	4.00
Camphor	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	4.00	2.00
Oxacillin*	128.00	16.00	128.00	4.00	>16.00	>16.00	>16.00
Penicillin G*	0.13	0.50	2.00	0.03	8.00	1.00	1.00
Ampicillin*	0.12	1.00	1.00	0.03	8.00	8.00	>8.00
Erythromycin*	0.25	>64.00	16.00	0.50	>1024	>1024	>1024
Norfloxacin*	2.00	512.00	128.00	4.00	4.00	2.00	>64.00

Sa13: *S. aureus* ATCC29213, Sa11: *S. aureus* CCARM3511, Sa23: *S. aureus* CCARM3523, Sp410: *S. pneumoniae* KCCM 40410, Sp09: *S. pneumoniae* CCARM 4009, Sp010: *S. pneumoniae* CCARM 4010, * μ g/ml.

Table III – MICs (minimum inhibitory concentrations) of the *E. ciliata* against antibiotic-susceptible and -resistant strains of *Salmonella* species

Samples (mg/ml)	<i>S. enteritidis</i>			<i>S. typhimurium</i>		
	Se21	Se10	Se11	St62	St07	St09
<i>E. splendens</i> oil fraction	4	4	4	2	>16	>16
Borneol	1	1	1	1	2	1
Camphor	4	4	4	2	4	4
Kanamycin*	1	16	8	4	2	2048
Streptomycin*	4	512	512	32	64	1024

Se21: *S. enteritidis* KCCM12021, Se10: *S. enteritidis* CCARM8010, Se11: *S. enteritidis* CCARM8011, St62: *S. typhimurium* KCCM11862, St07: *S. typhimurium* CCARM8007, St09: *S. typhimurium* CCARM8009.

*µg/ml.

은 KCCM11862 strain의 MIC는 2 mg/ml이었으나, 높은 항생제 내성을 나타내는 CCARM8007 및 8009에 대하여는 낮은 억제 활성(MIC=>16 mg/ml)을 나타냈다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 향유 정유는 본 실험에 사용한 항생제 감수성 및 내성 균주 대부분에 항균작용을 나타냄을 확인하여, 이 정유의 항생제 내성 균주 감염 질환에 대한 치료제로의 개발 가능성을 제시하였다.

감사의 말씀

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행한 연구임(NRF-2008-531-E00106).

참고문헌

- 1) Kikuchi, K. : VRE, VRSA. *Japan. J. Clin. Med.* **65**, 423 (2007).
- 2) Zhanel, G. G., Voth, D., Nichol, K., Karlowsky, J. A., Noreddin, A. M. and Hoban, D. J. : Pharmacodynamic activity of ceftobiprole compared with vancomycin versus methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) using an in vitro model. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 364 (2009).
- 3) Zhao, S., McDermott, P. F., White, D. G., Qaiyumi, S., Friedman, S. L., Abbott, J. W., Glenn, A., Ayers, S. L., Post, K. W., Fales, W. H., Wilson, R. B., Reggiardo, C. and Walker, R. D. : Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Veter. Microbiol.* **123**, 122

- (2007).
- 4) Hald, T., Lo, F. W., Danilo, M. A. and Aarestrup, F. M. : The attribution of human infections with antimicrobial resistant salmonella bacteria in Denmark to sources of animal origin. *Foodb. Path. Dis.* **4**, 313 (2007).
- 5) Singh, B. R., Singh, P., Agrawal, S., Teotia, U., Verma, A., Sharma, S., Chandra, M., Babu, N. and Kant Agarwal, R. : Prevalence of multidrug resistant *Salmonella* in Coriander, mint, carrot, and radish in Bareilly and Kanpur, northern India. *Foodb. Path. Dis.* **4**, 233 (2007).
- 6) Foley, S. L. and Lynn, A. M. : Food animal-associated Salmonella challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Animal Sci.* **86**, 173 (2008).
- 7) Byun, Y. H. and Shin, S. : Analysis of composition and activity of essential oil from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* and *C. indicum* against antibiotic-resistant pathogenic bacteria. *Nat. Prod. Sci.* **14**, 138 (2008).
- 8) Chung, E. Y., Byun, Y. H., Shin, E. J., Chung, H. S., Lee, Y. H. and Shin, S. : Antibacterial effects of vulgarone B from *Artemisia iwayomogi* alone and in combination with oxacillin. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 1711 (2009).
- 9) Chi, H. J., Shin, S. and Chang, J. I. : Analysis of essential oils from *Elsholtzia ciliata* and the production of essential oils by tissue cultures. *Kor. J. Pharmacog.* **23**, 77 (1992).
- 10) 이창복 : 한국식물도감. 향문사 서울 p. 660 (1986).
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventh informational supplement 27, pp. 98-114. Suit, USA (2007).
- 12) Ito, M. and Honda, G. : Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry* **68**, 446 (2007).
- 13) Kobold, U., Vostrowsky, O., Bestmann, H. J., Bisht, J. C., Pant, A. K., Melkani, A. B. and Mathcla, C. S. : Terpenoids from *Elsholtzia* species; II. Constituents of essential oil from a new chemotype of *Elsholtzia cristata*. *Planta Med.* **53**, 268 (1987).
- 14) Choi, H. S. and Min, K. C. : Aroma-active compounds of *Elsholtzia splendens* using AEDA and HS-SPME-GC-O dilution analysis. *Flavour Frag. J.* **23**, 58 (2008).
- 15) Liu, C., Chang, C. and Chou, T. : A novel synthesis of cis-dihydro-rose oxide and related stereochemistry. *J. Heterocycl. Chem.* **21**, 129 (1984).
- 16) Weyerstahl, P. and Shultze, M. : Structure-odour correlation, part XIV: Aldol reaction of acyl furans to α , β -unsaturated furanyl ketones (naginata ketone analogues) and their olfactive properties. *Flavour Frag. J.* **6**, 171 (1991).