

黃連解毒湯, 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子の Staphylococcus aureus에 대한 항균효과

김인수, 오현승, 신민구, 이영수
동신대학교 한의과대학 내과학교실

Antimicrobial Activity of *Hwangryunheadok-tang*, and *Scutellariae Radix* Extract, *Phellodendri Cortex* Extract, *Coptis Rhizoma* Extract, *Gardenia Jasminoides* Extract against *Staphylococcus aureus*

In-soo Kim, Hyun-seung Oh, Min-koo Shin, Young-su Lee
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives: This experiment was done for investigating antimicrobial activity of *Hwangryunheadok-tang* and *Scutellariae Radix* extract, *Phellodendri Cortex* extract, *Coptis Rhizoma* extract, *Gardenia Jasminoides* extract against *Staphylococcus aureus*.

Methods: After administering *S. aureus* on a bacterial culture media plate, antimicrobial activity was tested by dripping 80 μ l diluted *Hwangryunheadok-tang* and *Scutellariae Radix* extract, *Phellodendri Cortex* extract, *Coptis Rhizoma* extract, and *Gardenia Jasminoides* extract (100%, 50%, 10%, 1%) on plates that were cultivated for a span of time from 16 to 72 hours. Also, minimal inhibitory concentration (MIC) was tested by dripping the minimum dilution density solution that has antimicrobial activity between 80 μ l and 20 μ l (80 μ l, 60 μ l, 40 μ l, 20 μ l) in measure of density. Antimicrobial activity of *Hwangryunheadok-tang* and four kinds of extracts against *S. aureus* was continually displayed.

Results:

1. *S. aureus* (Standard Microorganism, ATCC)

(1) Antimicrobial activity was displayed for *Hwangryunheadok-tang*, *Scutellariae Radix* extract, and *Phellodendri Cortex* extract respectively in the undiluted solution and 50% of diluted magnification. *Gardenia Jasminoides* extract showed its activity only in the undiluted solution: *Coptis Rhizoma* extract showed its activity down to 10% of diluted magnification. The antimicrobial activity of the undiluted solution was increased when the volume of inoculation increased. But, there was no difference when time was extended for cultivation.

(2) MIC of *Hwangryunheadok-tang*, *Scutellariae Radix* extract was 50%, 20 μ l. *Coptis Rhizoma* extract was 10%, 20 μ l. *Phellodendri Cortex* extract was 50%, 80 μ l and *Gardenia Jasminoides* extract was 100%, 60 μ l.

2. *S. aureus* isolated from diarrheal patients

(1) When compared to standard microorganism, MIC has decreased. As a result, their antimicrobial activity has increased.

(2) Antimicrobial activity of *Hwangryunheadok-tang* and four extracts was continually shown in extending of the time, 16, 24 and 72 hours.

Conclusions: The author comes to the conclusion that *Hwangryunheadok-tang*, and four kinds of extracts have antimicrobial activity against *S. aureus*. Especially, when comparing standard microorganisms with *S. aureus* isolated from diarrheal patients, some cases showed that antimicrobial activity of all the extracts were better than antibiotics. Thus, if a further study is performed, the use of *Hwangryunheadok-tang*, and four kinds of extracts will be valuable and beneficial in clinical treatments.

Key words: *Hwangryunheadok-tang*, Antimicrobial Activity, *Scutellariae Radix* Extract, *Phellodendri Cortex* Extract, *Coptis Rhizoma* Extract, *Gardenia Jasminoides* Extract

· 교신저자: 이영수 광주시 남구 월산로 141
동신대학교 광주한방병원
TEL: 062-350-7203 FAX: 062-350-7141
E-mail: hefari92@hanmail.net
· 이 논문은 2014년도 동신대학 대학원 한의학 박사학위 논문임.

1. 서론

식중독은 오염된 음식을 섭취함으로써 발생하는 구토, 설사, 복통 등의 증세를 동반한 임상 증후군

으로 해마다 국내외적으로 식중독 사건은 증가하고 있는 추세이다¹. 이러한 식중독의 원인균 가운데 가장 많은 비중을 차지하는 것으로 *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp* 등이 있는데², 이들 식중독 세균은 주로 육류, 채소, 난류, 우유나 유제품 그리고 조리 가공식품 등의 여러 가지 음식물에 오염되어, 이를 섭취한 사람으로 하여금 심각한 식중독을 유발시킨다³.

이와 같은 식중독균들에 대해 항생제가 등장하면서 치료율이 높아졌으나, 무분별한 항생제의 오·남용으로 인한 항생제 내성균의 등장으로 의료계는 감염성 질환의 치료에 많은 어려움을 겪게 되었다. 이로 인하여 내성균에 의한 감염성질환을 대처하기 위해 새로운 항생제들의 개발이 현재에도 끊임없이 요구되고 있지만 새로운 항생제의 개발은 많은 시간과 인력 그리고 개발비가 요구되는 실정이다⁴. 이에 세계보건기구는 천연 항생물질에 대한 연구를 지속해오고 있는데 국내에서도 이에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다^{5,6}.

黃連解毒湯은 諸熱毒을 瀉火解毒하는 효능이 있어 그 동안 천연항균성 물질의 대표 처방으로써 많은 연구가 되어왔으며 그 구성 약물로는 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子⁷이다.

현재까지 식중독의 원인균으로서 *S. aureus*에 대한 단일 한약재들과⁸⁻¹⁸, 복합 한약 처방들^{19,20}의 항균효과에 대한 많은 연구가 있었다.

그러나 현재까지 다종의 식중독균들에 대해 黃連解毒湯과 그 구성 약재인 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子の 항균력을 함께 수평적으로 비교함으로써, 黃連解毒湯의 어떤 약재가 항균력에 얼마만큼 기여하였는가를 분석해보는 연구는 없었으며 특히 표준균주가 아닌 항생제에 내성을 가진 환자분리균주를 이용한 연구로는 장²¹의 연구를 제외하고 현재까지는 전무한 실정이다.

이에 저자는 식중독 대표 원인균의 하나인 *Staphylococcus aureus*를 표준균주와 항생제 내성을 가진 환자분리균주 두 가지로 준비하고, 두 종

류의 균주에 대해 黃連解毒湯과 각각의 구성 약물들이 가지고 있는 항균효과를 비교함으로써 천연 항균제로서 이용 가능성에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 약재들은 현재 동신대광주한방병원에서 사용되고 있는 제품을 구입하여 雜質을 제거하고 형태가 완전한 것을 정선하여 사용하였다.

2) 균주 및 사용배지

(1) 표준균주

본 실험에 사용한 표준균주는 광주광역시 보건환경연구원의 보관균주로 *S. aureus*(ATCC, 13565)를 Tryptic soy agar(TSA)(Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) 배지에서 배양하였다.

(2) 분리균주

본 실험에 사용한 분리균주는 광주광역시 보건환경연구원에서 광주지역에서 2012년 1월부터 2013년 8월까지 실사환자에게서 분리된 균주로 *S. aureus*를 미생물 생화학적 동정기(Vitek II Compact, bioMerieux, France)를 이용하여 동정한 후, 표준균주와 동일한 방법으로 배양하였다.

2. 방 법

1) 黃連解毒湯, 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子 추출물 제조방법

(1) 약재 선별

약재를 준비하여 각질을 제거하고 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子를 각 50 g을 취해 합하여 200 g의 黃連解毒湯을 준비하고 따로 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子 각 약재 100 g을 취하여 준비하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Hwangryunheadok-tang*

Herb	Scientifis name	Dose (g)
<i>Hwangryun</i>	<i>Coptis Rhizoma</i>	50
<i>Hwanggeum</i>	<i>Scutellariae Radix</i>	50
<i>Hwangbaek</i>	<i>Phellodendri Cortex</i>	50
<i>Chija</i>	<i>Gardenia Jasminoides</i>	50
Total		200

(2) 약재 불린

약재를 비이커에 黃連解毒湯, 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子の 각각 취한 량 100 g당 증류수 1,000 ml를 넣고 실온에서 8시간 동안 약재를 불렸다.

(3) 약재 전탕

비커에서 불린 약재를 전탕기(TOPS, IL Gwang Engineering Co.)에 옮기고 4시간 동안 전탕하였다

(4) 상층액 분리 및 농축

전탕이 끝난 농축액을 원심분리기(Allegra X-12R, Beckman coulter, USA)로 3,000 rpm에서 20분 원심분리한 후 찌꺼기는 버리고 상층액을 모아 진공감압농축기(Rotary Evaporator NE-1001, Eyela, Japan)를 이용하여 80 °C에서 90 rpm으로 감압 농축하여 최종 용적을 100 ml로 하였다.

2) 피검균액의 준비

(1) 표준균주 준비

표준균주 ATCC 13565를 TSA배지에 접종한 후, 36 °C에서 48시간 배양하고 배양된 균주를 다시 Tryptic soy broth(TSB)(Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)에 접종하여 36 °C에서 48시간 배양하였다. 배양된 균주는 0.85% Nacl에 0.5 McFarland 가 되도록 현탁하여 사용하였다.

(2) 분리균주 준비

분리균주는 광주광역시보건환경연구원에서 2013년 광주지역에서 발생한 설사환자에서 분리된 균주로, 미생물 생화학 자동 동정기를 사용하여 동정한 후, 표준균주와 동일한 방법으로 배양하여 사용하였다.

3) 분리균주의 항생제 감수성시험

분리된 균주의 항생제 감수성시험은 미생물 생화

학 자동동정기를 사용하여 실시하였고, 항생제 내성 기준은 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)지침에 따라 내성률을 산출하였다.

3. 관찰방법

1) 항균효과측정

(1) 각 추출물의 희석률에 따른 항균력

희석률에 따른 최소 성장 억제 농도 측정 측정은 Disc diffusion method에 준하여 실험하였다. 준비된 표준균주 및 분리균주 현탁액을 Mueller-Hinton agar(MHA)(Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)에 도말하였다. 한약 추출액은 원액과 50%, 10%, 1%로 희석한 것을 준비하여 멸균된 8 mm Paper disc(Advantec, Toyo Roshi Kaishm, Ltd., Japan)에 각 추출물을 80 µl씩 흡수시켰다. 식중독균을 도말한 배지 위에 한약 추출액이 흡수된 paper disc를 올려놓고 36 °C에서 16시간 동안 배양한 후 disk 주위의 clear zone의 직경(mm)를 측정하여 항균력의 유무를 관찰하였다. 항균력 효과를 비교하기 위하여 ciprofloxacin 250 mg(시플록신정 250 mg, 한국콜마)과 doxycycline 일수화물 100 mg(바이브라마이신-엔정 100 mg, 한국화이자제약)을 1정씩 취하여 증류수 250 ml에 녹여 원액으로 사용하였고 한약 원액과 동일하게 희석하여 실험하였다.

(2) 각 추출물 원액의 접종량에 따른 항균력

각 추출물의 접종량에 따른 항균력 측정은 '희석률에 따른 항균력 측정'과 동일한 방법으로 수행하되, 각 추출물 원액(100%)을 가지고 접종량을 달리하여(80 µl, 60 µl, 40 µl, 20 µl) disc에 접종한 후 억제환의 크기를 비교하였다.

(3) 항균력이 나타난 최소희석농도 검액의 접종량에 따른 항균력과 MIC(Minimal inhibitory concentration)

희석률에 따른 항균력 측정 실험에서 각 추출물 별로 항균력이 나타난 최소희석농도의 검액을 가지고 80~20 µl까지 접종량을 달리하면서 실험하였다. 실험방법은 희석률에 따른 항균력 측정과 접종

량에 따른 항균력 측정 실험을 동일한 방법으로 실험하였다. 각 추출물의 항균력이 나타난 최소희석농도와 최소 희석 농도 검액에서 접종량을 달리 하여 실험한 결과 값을 가지고 MIC를 측정하였다.

(4) 배양 시간에 따른 항균력, 항균효과 지속성
항균효과 지속성 측정은 위의 세 가지 실험과 동일한 방법으로 표준균주와 분리균주에 대해 실험한 후, 36 °C에서 16시간에서 72시간까지 배양하면서 같은 조건하에서 억제환의 크기비교 및 항균력의 지속성 여부를 비교하였다.

2) 미생물의 생육도 측정

본 실험의 미생물 생육도 측정은 다섯 가지 추출물 중 가장 높은 항균력을 보인 황련 추출물만을 가지고 시행되었다. 추출물의 농도를 확인하기 위하여 황련 추출물의 함량이 5 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml, 80 µl/ml, 160 µl/ml, 320 µl/ml가 되도록 TSB 배지에 희석하였다. 또한 실험에 사용된 다섯 종류의 균주는 생리식염수에 0.5 McFaland로 맞추어 각각의 희석된 배지에 200 µl씩 접종하였다. 접종된 배지는 36 °C에서 24시간 배양(incubator, JEIO TECH, IL-21A, Korea)하여 육안으로 미생물의 증식이 확인되지 않은 농도를 확인하고 이를 기준으로 하였다.

*S. aureus*의 농도가 5 µl/ml, 10 µl/ml, 20 µl/ml, 40 µl/ml가 되도록 조절한 TSB배지에 희석하고, 0.5 McFaland가 되도록 만든 후 각각의 희석된 배지에 200 µl씩 접종하고, 36 °C에서 48시간 배양하면서 일정 시간 간격으로 배양액을 취한 후 배양액을 생리식염수로 희석하였다. 희석한 배양액에서 1.0 ml씩 패트리디쉬에 취하고 TSA를 분주하여 36 °C에서 24시간동안 배양한 후 나타난 균수를 colony forming unit(log CFU/ml)으로 나타내었다.

III. 결 과

1. 추출수율

건조된 재료 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子 각 100 g과 黃連解毒湯 200 g으로 부터 추출물을 얻기 위하여 용매로는 distilled water 1.000 ml를 사용하였다. 각 재료를 distilled water 1.000 ml에 넣고 8시간 정치시킨 다음 약탕기를 이용하여 100 °C로 4시간 동안 전탕하고 3.000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 80 °C에서 감압농축 하였다. 추출물의 수율은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Extraction Yields of Herb-Med on 100 °C

NO.	Matter	Solvent	Yield (%)
1	<i>Hwangryunheadok-tang</i>	Distilled water	12.4
2	<i>Scutellariae Radix</i>	Distilled water	22.2
3	<i>Phellodendri Cortex</i>	Distilled water	10.2
4	<i>Coptis Rhizoma</i>	Distilled water	11.9
5	<i>Gardenia Jasminoides</i>	Distilled water	9.8

2. 항균효과측정

1) 표준균주

(1) 각 추출물의 희석률에 따른 항균력(80 µl 접종)

黃連은 10%까지, 黃連解毒湯, 黃芩, 黃柏은 50%까지, 梔子是 100%에서만 항균력을 나타냈다. 각 추출물들의 억제환의 크기는 농도에 비례하여 나타났다. 억제환의 크기에 따른 항균력은 黃連이 가장 큰 것으로 나타났으며 그 뒤로 黃連解毒湯, 黃芩, 黃柏, 梔子 순이었다. 대조군으로 사용한 doxycycline 과 ciprofloxacin은 1% 농도까지 항균력을 보였으며 두 항생제 사이의 억제환 차이는 거의 없었다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. The Size of Inhibition Zone according to Density & Cultivating Time of Five Kinds of Extracts on *S. aureus* (in Standard Microorganism, 80 μ l)

Extract	100%			50%			10%			1%		
	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h
<i>hwangryunhaedok-tang</i>	16	16	16	14	14	14	0	0	0	0	0	0
<i>hwangryun</i>	24	24	24	22	22	22	14	14	14	0	0	0
<i>hwangbaek</i>	13	13	13	11	11	11	0	0	0	0	0	0
<i>hwanggeum</i>	16	16	16	13	13	13	0	0	0	0	0	0
<i>chija</i>	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
doxycycline	32	32	32	30	30	30	25	25	25	16	16	16
ciprofloxacin	35	35	35	33	33	33	27	28	28	16	16	16

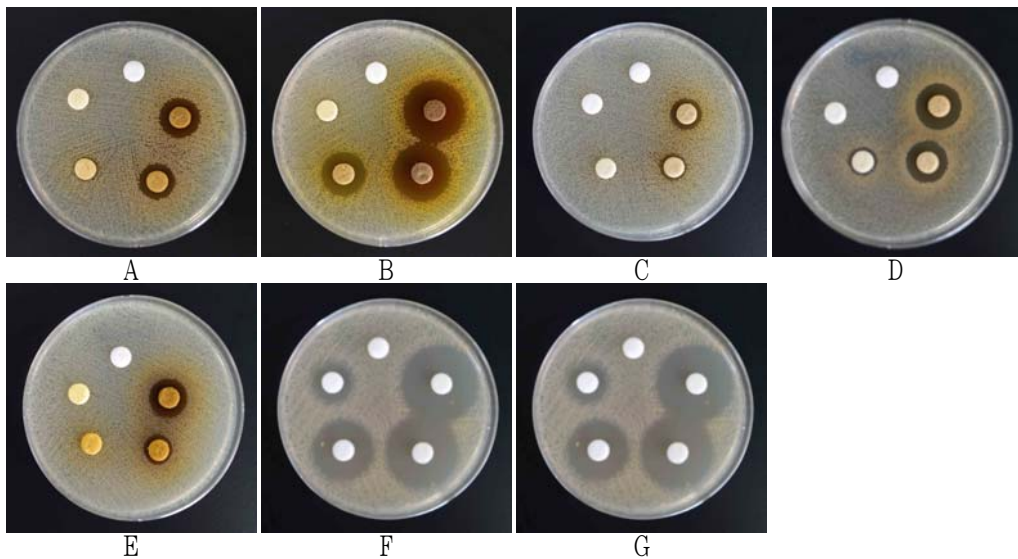


Fig. 1. Inhibition zone according to density of extracts and antibiotics on *S. aureus* (in standard microorganism, after 16 hours, 80 μ l)

A : *Hwangryunhaedok-tang*, B : *Hwangryun*, C : *Hwangbaek*, D : *Hwanggeum*, E : *Chija*, F : *Doxycycline*, G : *Ciprofloxacin*

(2) 각 추출물 원액(100%) 접종량(80 μ l, 60 μ l, 40 μ l, 20 μ l)에 따른 항균력

黃連解毒湯과 黃連 黃芩은 20 μ l까지, 黃柏은 40 μ l까지, 梔子是 80 μ l까지 항균력을 보였다. 각 추

출물들의 억제환의 크기는 접종량에 비례하여 나타났다. 억제환의 크기에 따른 항균력은 黃連이 가장 큰 것으로 나타났으며 그 뒤로 黃芩, 黃連解毒湯, 黃柏, 梔子 순이었다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. The Size of Inhibition Zone according to Inject Quantity & Cultivating Time of Five Kinds of Extracts on *S. aureus*

Extract	80 μ l			60 μ l			40 μ l			20 μ l		
	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h
<i>hwangryunhaedok-tang</i>	16	16	16	13	13	13	12	12	12	11	11	11
<i>hwangryun</i>	23	23	23	22	23	23	21	21	21	21	21	21
<i>hwangbaek</i>	12	12	12	11	11	11	9	9	9	0	0	0
<i>hwanggeum</i>	16	16	16	15	15	15	13	13	13	12	13	13
<i>chija</i>	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

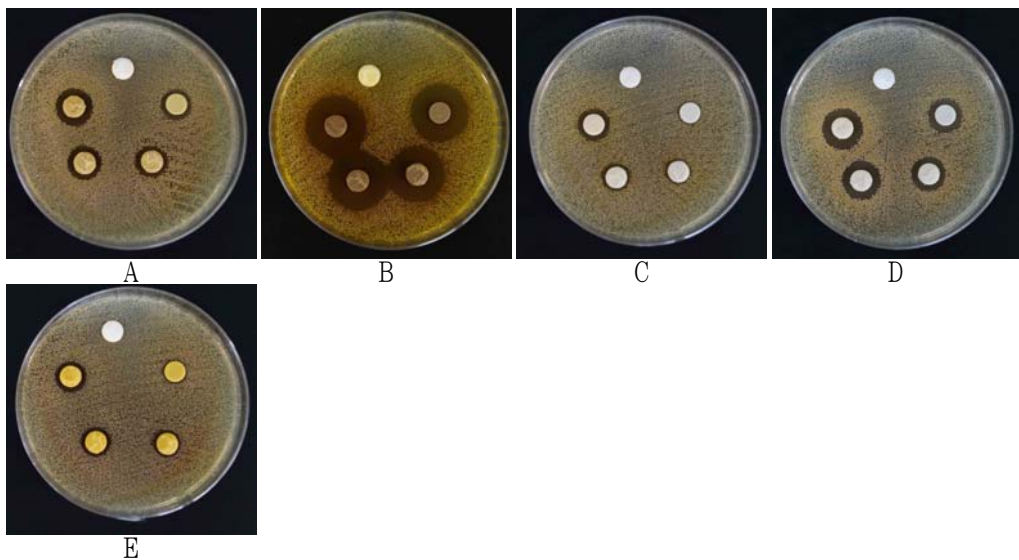


Fig. 2. Inhibition zone according to inject quantity of five kinds of extracts on *S. aureus*. (in standard microorganism, after 16 hours)

A : *Hwangryunhaedok-tang*, B : *Hwangryun*, C : *Hwangbaek*, D : *Hwanggeum*, E : *Chija*

(3) 항균력이 나타난 최소희석농도 검액의 집
중량에 따른 항균력과 MIC

MIC는 黃連이 10%, 20 μ l, 黃連解毒湯과 黃芩

은 50%, 20 μ l, 黃柏은 50%, 80 μ l, 梔子是 100%,
60 μ l이었다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. The Size of Inhibition Zone according to Inject Quantity & Cultivating Time at Minimum Dilution Density Extracts on *S. aureus*

Extract	80 μ l			60 μ l			40 μ l			20 μ l		
	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h
<i>hwangryunhaedok-tang</i> (50%)	13	14	14	12	12	12	10	10	10	10	10	10
<i>hwangryun</i> (10%)	16	16	16	15	15	15	13	13	13	11	11	11
<i>hwangbaek</i> (50%)	11	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>hwanggeum</i> (50%)	13	13	13	12	12	12	10	11	11	10	10	10
<i>chija</i> (100%)	10	10	10	9	9	9	0	0	0	0	0	0

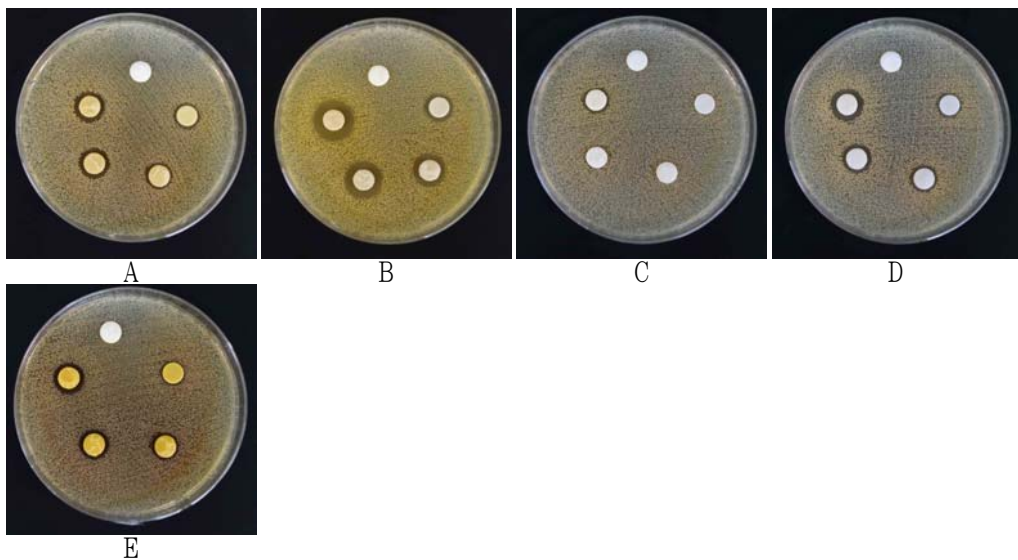


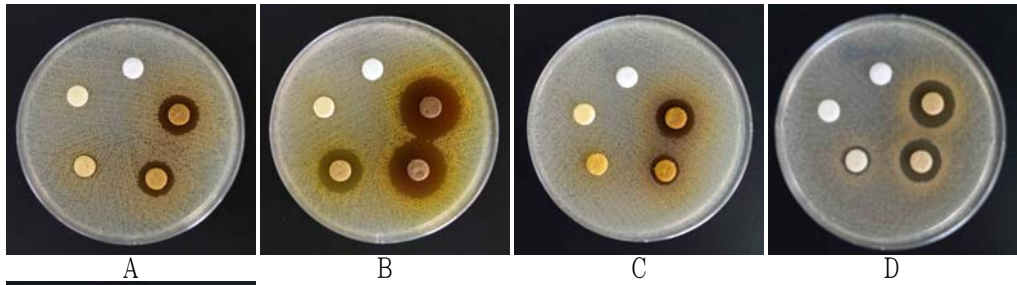
Fig. 3. Inhibition zone according to inject quantity at minimum dilution density extracts on *S. aureus*. (in standard microorganism, after 16 hours)

A : *Hwangryunhaedok-tang* 50%, B : *Hwangryun* 10%, C : *Hwangbaek* 50%, D : *Hwanggeum* 50%, E : *Chija* 100%

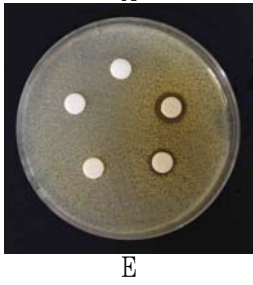
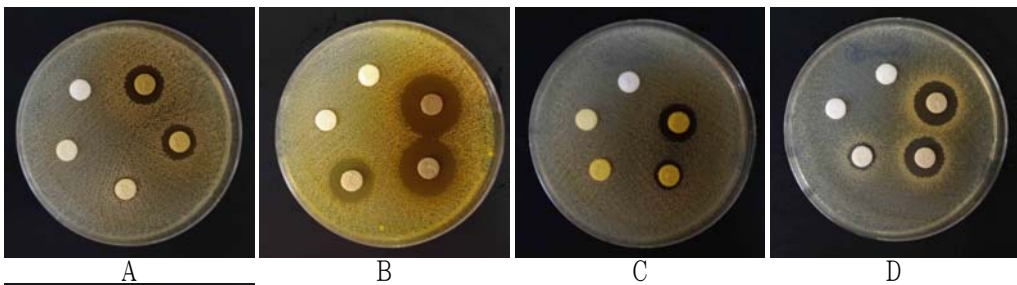
(4) 배양 시간에 따른 항균력, 항균효과 지속성
 ① 실험 검액별 희석배율에 따른 항균력 비교실험
 각 추출물들의 항균력(억제환의 크기)은 모든 (100%~1%)농도에서 16시간과 24시간, 72시간 모두 동일하게 나타났다(Table 3, Fig. 4).
 ② 실험 검액별 원액에서의 접종량에 따른 항균력 비교실험
 각 추출물들의 항균력(억제환의 크기)은 모든

(80~20 μ l) 접종 용량에서 16시간과 24시간, 72시간 모두 동일하게 나타났다(Table 4).
 ③ 항균력이 나타난 최소희석농도 검액의 접종량에 따른 항균력 비교실험
 항균력이 나타난 최소희석 농도 검액들의 항균력(억제환의 크기)은 희석률과 접종량에 관계없이 16시간과 24시간, 72시간 모두 동일하게 나타났다 (Table 5).

黃連解毒湯, 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子の *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과



after 16 hours



after 24 hours



Fig. 4. The variation of inhibition zone according to cultivating time on *S. aureus*.

A : Hwangryunheadok-tang 100%, B : Hwangryun 100%, C : Hwangbaek 100%, D : Hwanggeum 100%, E : Chija 100%

2) 환자분리균주

(1) 분리균주의 항생제 감수성시험 (Table 6)

Table 6. Antibiotic Susceptibility of *S. aureus*

Antibiotics Bacteria	Ampicilin	Penicillin	Oxacillin	Rifampin	Vancomycin	Ciprofloxacin
<i>S. aureus</i>	14-16 19	28-29 S	11-12 18	17-19 R	15 25	16-20 S

Antibiotics Bacteria	Gentamicin	Imipenem	Cefepime	Tetracycline	Cefotetan	Trimethonrim
<i>S. aureus</i>	13-14 19	14-15 S	15-17 51	15-18 S	13-15 27	14-16 S

S : stability, I : intermediate, R : resistance

(2) 각 추출물의 희석률에 따른 항균력

黃連解毒湯 黃連 黃芩은 10%까지, 黃柏은 50%까지, 梔子是 100%에서만 억제환이 나타났다. 100%, 50% 농도에서는 표준균주와 분리균주에 대한 항균력이 유사하였으나 黃連解毒湯과 黃芩의 경우

10% 농도까지 억제환을 보여 이들의 항균력은 다소 증가하였음을 알 수 있었다. 각 추출물들의 억제환의 크기는 농도에 비례하여 나타났다 (Table 7, Fig. 5).

Table 7. The Size of Inhibition Zone according to Density & Cultivating Time of Five Kinds of Extracts on *S. aureus* (isolated from diarrheal patients, 80 μ l)

Extract	100%			50%			10%			1%		
	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h
<i>hwangryunhaedok-tang</i>	16	16	16	14	14	14	11	11	11	0	0	0
<i>hwangryun</i>	24	24	24	22	22	22	17	17	17	0	0	0
<i>hwangbaek</i>	13	13	13	11	12	12	0	0	0	0	0	0
<i>hwanggeum</i>	16	16	16	14	14	14	10	10	10	0	0	0
<i>chija</i>	12	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>doxycycline</i>	32	32	32	30	30	30	25	25	25	15	15	15
<i>ciprofloxacin</i>	36	36	36	34	34	34	27	27	27	13	13	13

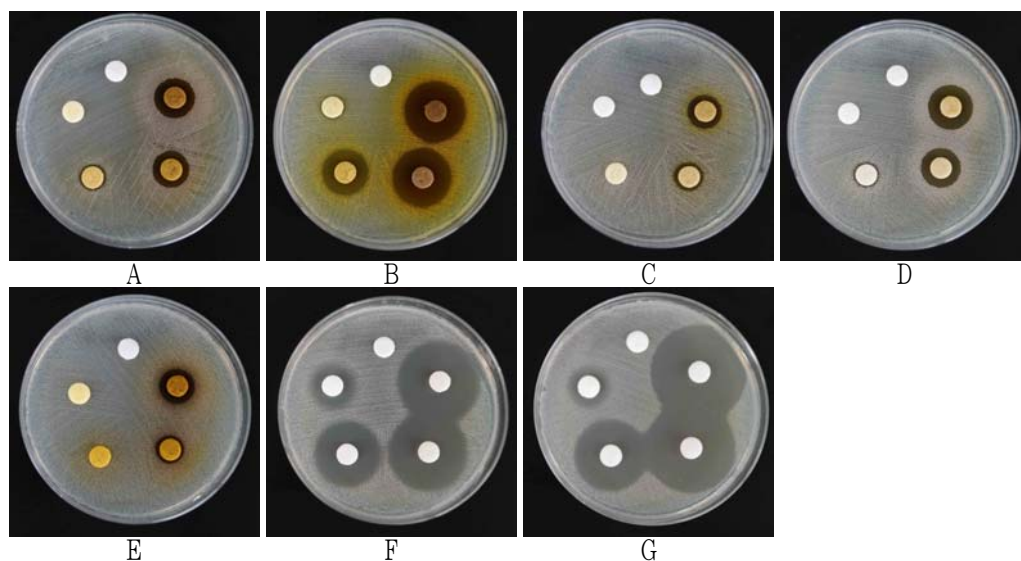


Fig. 5. Inhibition zone according to density of extracts and antibiotics on *S. aureus*. (isolated from diarrheal patients, after 16 hours, 80 μ l)

A : *Hwangryunhaedok-tang*, B : *Hwangryun*, C : *Hwangbaek*, D : *Hwanggeum*, E : *Chija*, F : *Doxycycline*, G : *Ciprofloxacin*

3) 각 추출물 원액(100%)의 접종량(80 μ l, 60 μ l, 40 μ l, 20 μ l)에 따른 항균력

黃連解毒湯, 黃連, 黃柏, 黃芩은 20 μ l까지, 梔子は 40 μ l까지 항균력을 보였다. 표준균주 실험과 비교

했을 때, 다섯 가지 추출물 모두에서 전반적으로 항균력이 다소 증가하였다. 각 추출물들의 억제환의 크기는 접종량에 비례하여 나타났다(Table 8, Fig. 6).

Table 8. The Size of Inhibition Zone according to Inject Quantity & Cultivating Time of Five Kinds of Extracts on *S. aureus*

Extract	80 μ l			60 μ l			40 μ l			20 μ l		
	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h
<i>hwangryunhaedok-tang</i>	16	16	16	13	13	13	12	12	12	12	12	12
<i>hwangryun</i>	25	25	25	23	23	23	21	21	21	21	21	21
<i>hwangbaek</i>	12	13	13	11	11	11	10	10	10	9	9	9
<i>hwanggeum</i>	18	18	18	16	16	16	14	14	14	13	13	13
<i>chija</i>	14	14	14	12	12	12	9	9	9	0	0	0

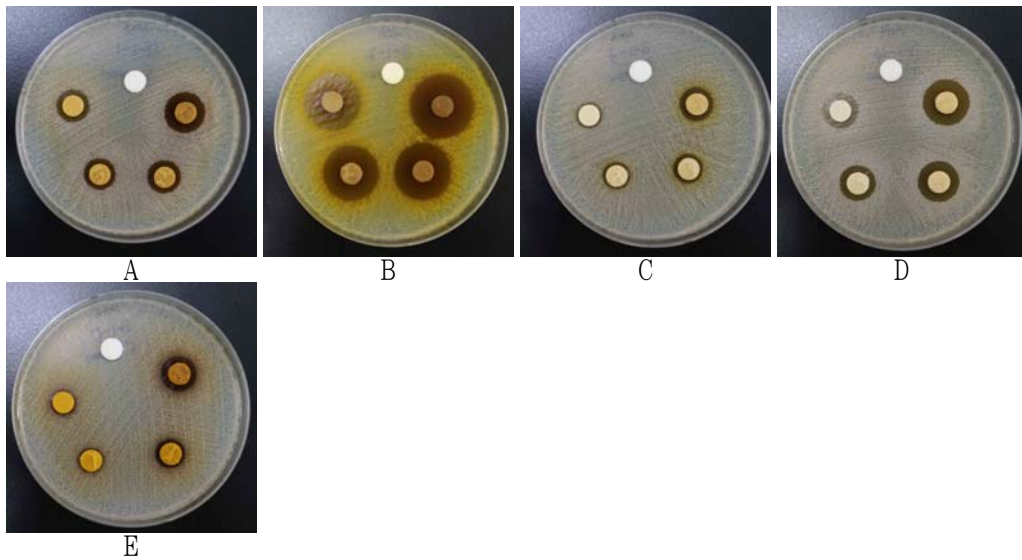


Fig. 6. Inhibition zone according to inject quantity of five kinds of extracts on *S. aureus*. (isolated from diarrheal patients, after 16 hours)

A : *Hwangryunhaedok-tang*, B : *Hwangryun*, C : *Hwangbaek*, D : *Hwanggeum*, E : *Chija*

(3) 항균력이 나타난 최소희석농도 검액의 접종량에 따른 항균력과 MIC

MIC는 黃連解毒湯과 黃芩은 10%, 80 μ l, 黃連은 10%, 20 μ l이며, 黃柏은 50%, 60 μ l, 梔子は 100%, 40 μ l였다.

표준균주 실험과 비교해 모든 추출물에서 항균력이 다소 증가함에 따라 각 추출물의 MIC는 감소하여 나타났다. 각 추출물들은 동일한 농도에서 접종량에 비례하여 억제환의 크기가 나타났다(Table 9, Fig. 7).

Table 9. The Size of Inhibition Zone according to Inject Quantity & Cultivating Time at Minimum Dilution Density Extracts on *S. aureus*

Extract	80 μ l			60 μ l			40 μ l			20 μ l		
	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h	16h	24h	72h
<i>hwangryunhaedok-tang</i> (10%)	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>hwangryun</i> (10%)	17	17	17	16	16	16	14	14	14	13	13	13
<i>hwangbaek</i> (50%)	11	11	11	10	10	10	0	0	0	0	0	0
<i>hwanggeum</i> (10%)	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>chija</i> (100%)	14	14	14	12	12	12	9	9	9	0	0	0

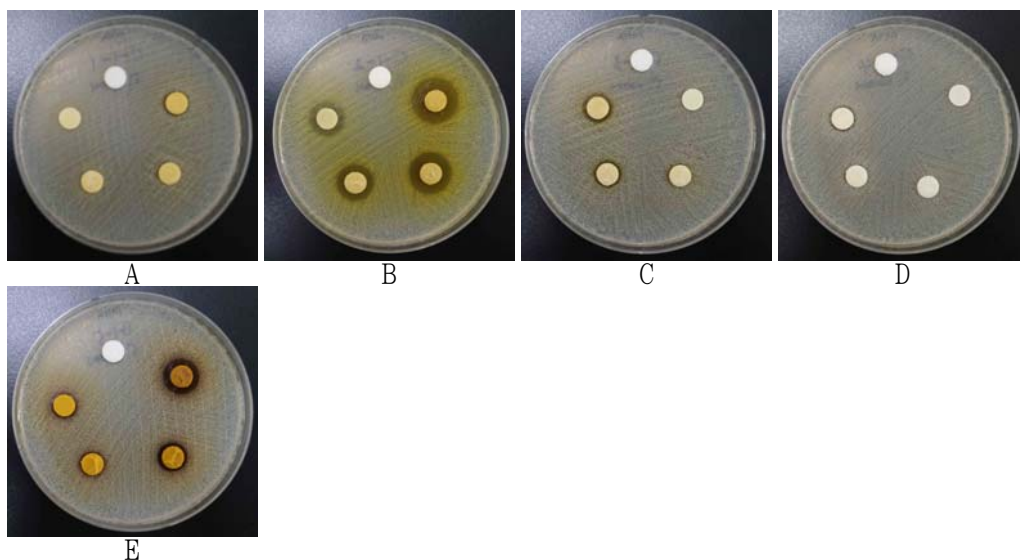


Fig. 7. Inhibition zone according to inject quantity at minimum dilution density extracts on *S. aureus*. (isolated from diarrheal patients, after 16 hours)

A : *Hwangryunhaedok-tang* 10%, B : *Hwangryun* 10%, C : *Hwangbaek* 50%, D : *Hwanggeum* 10%, E : *Chija* 100%

(4) 배양 시간에 따른 항균력, 항균효과 지속성 표준 균주 실험과 마찬가지로 환자 분리 *S. aureus*에 대해 항균력은 희석률과 접종량에 관계없이 16시간과 24시간, 72시간 모두에서 동일하게 나타났다 (Table 7, 8, 9).

3. 미생물의 생육도 측정

미생물 생육도 측정 실험은 다섯 가지 식중독 균주들에 대해 가장 높은 항균력을 보인 黃連으로 시행하였다. *S. aureus*에 대해서 黃連 추출물이 균

주들의 생육에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다.

추출물의 농도 5 μ l/ml에서 측정한 결과 6시간 후부터 지속적인 생육저해가 나타남을 확인할 수 있었고, 12시간대에서 대조군과 비교하여 3.54 log cycle의 차이를 나타내었다. 마찬가지로 다른 모든 농도에서도 시간이 경과할수록 log cycle의 감소차가 커져 뚜렷한 성장 억제 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

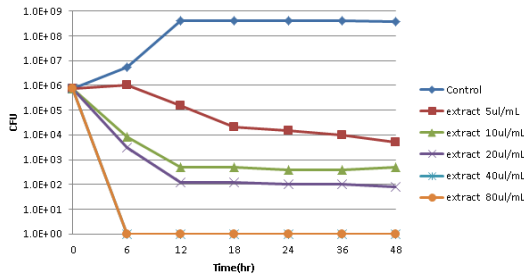


Fig. 8. Growth inhibition of *Coptis Rhizoma* extract against *S. aureus*.

IV. 고찰

식생활의 다양화와 국제교류의 증가 등 식중독의 발생원인은 더욱 다양해지고 증가 추세에 있으며 그 원인으로 식품의 종류 및 보관상태, 조리기구, 시설 및 조리종사자의 비위생적 의식 등이 다양하게 보고되고 있다²². 식중독 발생 시 식중독의 원인균을 규명하는 것은 환자의 치료와 식중독의 확산방지 및 사후 대책수립에 있어서 매우 중요하다²³. 우리나라의 식중독 발생현황을 보면 90년대 이후 꾸준한 증가추세에 있으며³, 식품의약품안전청의 보고²⁴에 의하면 호흡기 감염에 이어 두 번째로 많이 발생하는 질환이 설사질환을 포함한 소화기 감염성 질환이다.

식중독의 원인균 가운데 *S. aureus*는 자연계에 널리 분포되어 있는 세균의 하나로서 식중독뿐만 아니라 피부의 화농·중이염·방광염 등 화농성 질환을 일으키는 원인균으로 우리나라에 있어 살모넬라 식중독 및 대장균 식중독 다음으로 많이 일어나는 식중독이다³. 황색포도상구균은 열에는 강한 세균이지만 80 °C에서 30분에 사멸되나 황색포도상구균이 생산한 장독소는 100 °C에서 30분간 가열하여도 파괴되지 않고, 살모넬라 등과 달리 7% 정도의 소금 농도, 10-45 °C 온도영역에서 발육할 뿐만 아니라 다른 세균에 비해 산성이나 알칼리성에서 생존력이 강한 세균이다^{25,26}. 포도상구균 식중독의 증상은 독소가 위나 장에 흡수되어 구토·설

사·복통을 일으킨다²⁷.

식중독균을 포함한 세균에 의한 대부분의 감염 질환과 질병치료는 항생제로 치료하고 있다. 그러나 다양한 경로를 통해 항생제와 접하게 되는 기회가 많아지게 되면서 세균들은 항생제 내성을 획득하게 되는 기회를 얻었다. 우리나라 국민들의 항생제 사용량은 세계적으로 매우 높은 것으로 알려져 있는데, 최근에 항생제 사용량이 해마다 줄어 들고 있는 추세이긴 하지만 OECD 가입 국가들과 비교했을 때 여전히 항생제 사용량이 특히 많은 나라에 속한다²⁸. 이에 세계보건기구는 천연 항생물질에 대한 연구를 지속해오고 있으며 국내에서도 역시 이에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데^{5,6}, 현재까지 단일 한약재와 복합 한약처방의 식중독 세균 증식 억제 효과와 항균작용에 대한 다종의 연구가 있다. 그 중에서도 *S. aureus*에 대한 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子, 牡丹皮, 紫草, 金銀花, 蛇床子, 蒲公英, 連翹, 五味子, 豆腐, 無花果, 마늘 등⁸⁻¹⁸의 항균효과 연구가 있으며, 복합제제로는 黃芩湯¹⁹, 黃連解毒湯²⁰ 등의 연구가 있다.

黃連解毒湯은 <肘後備急方>에서 언급된 이래 瀉火解毒의 대표적인 처방으로 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 구성되어 있다. 黃芩(*Scutellariae Radix*)은 苦, 寒, 無毒하고 清熱燥濕, 瀉火解毒, 止血安胎 등의 효능²⁹이 있으며, 解熱 血壓降下 殺菌 粥大動脈 硬化의 방지 등의 약리 작용³⁰을 한다. 黃連(*Coptis Rhizoma*)은 苦, 寒, 無毒하고 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒 등의 효능²⁹이 있으며, 殺菌, 殺蟲, 鎮痙, 血糖調節 등의 약리작용³⁰을 한다. 梔子(*Gardeniae Fructus*)는 苦, 寒, 無毒하고 瀉火除煩, 清熱利濕, 涼血止血 등의 효능²⁹이 있으며 血壓降下 消炎解熱 鎮痛 등의 약리 작용³⁰을 한다. 黃柏(*Phellodendri Cortex*)은 苦, 寒, 無毒하고 清熱燥濕, 瀉火解毒, 清退虛熱 등의 효능²⁹이 있으며, 血糖降下 中樞神經抑制 抗炎症 등의 약리작용³⁰을 한다. 이러한 구성으로 된 黃連解毒湯은 抗菌, 消炎, 鎮痛, 解熱, 鎮靜, 止血, 抗潰瘍, 止瀉作用과 광범위한 spectra작용과 항바이

러스 작용이 있어 인플루엔자, 뇌염, 패혈증, 뇌막염 등의 급성 감염증과 피부의 화농증, 급성 출혈증, 급성 위장염, 세균성下痢 등에 사용되어 오고 있다³¹.

그러나 현재까지 다종의 식중독균들에 대해 黃連解毒湯과 그 구성 약재인 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子の 항균력을 함께 수평적으로 비교함으로써, 黃連解毒湯의 어떤 약재가 항균력에 얼마만큼 기여하였는가를 분석해보는 연구는 없었으며 특히 표준균주가 아닌 항생제에 내성을 가진 환자분리균주를 이용한 연구로는 장²¹의 연구를 제외하고 현재까지는 전무한 실정하기에 黃連解毒湯과 그 구성 약물들을 이용한 본 연구를 통해 천연 항균제로서의 가능성을 검증해 기초 자료로 활용하고자 연구를 실시하였다.

먼저 표준균주를 대상으로 한 추출물들의 희석률에 따른 항균력 비교실험에서 黃連解毒湯, 黃連, 黃芩, 黃柏이 50% 농도까지 항균력을 보였으며 梔子は 100% 원액에서만 작은 억제환을 만들어 항균력을 보였다. 전체적으로 黃連의 억제환 크기가 확연히 크게 나타나 항균효과가 다른 추출물에 비해 뛰어남을 알 수 있었다. 그 뒤로는 黃連解毒湯, 黃芩, 黃柏, 梔子 순으로 항균효과를 보였다. 원액의 접종량에 따른 항균력 비교 실험과 항균력을 보인 최소 희석 농도 검액을 접종량을 달리하여 비교한 실험으로 추출물들의 MIC(Table 10)를 알 수 있었는데, 최소성장억제농도로 비교한 항균력의 크기도 黃連이 가장 크고 그 다음이 黃連解毒湯, 黃芩, 黃柏, 梔子 순이었다.

Table 10. MIC of Extracts against Standard Microorganism & *S. aureus* Isolated from Patient

No	Extract	Bacteria	<i>S. aureus</i>
1	<i>Hwangryunhaedok-tang</i>	50%, 20 µl	10%, 80 µl
2	<i>Hwangryun</i>	10%, 20 µl	10%, 20 µl
3	<i>Hwangbaek</i>	50%, 80 µl	50%, 60 µl
4	<i>Hwanggeum</i>	50%, 20 µl	10%, 80 µl
5	<i>Chija</i>	100%, 60 µl	100%, 40 µl

배양시간에 따른 항균효과 실험에서 *S. aureus*에 대해 다섯 가지 추출물 모두가 16시간, 24시간, 72시간 배양 후에도 동일한 억제환의 크기를 유지하고 있었다. 이것으로 볼 때, 각 추출물이 16시간 후에 이미 최대 항균력을 보이는 것으로 사료할 수 있으며 72시간 이후까지 항균효과가 지속적으로 유지되는 것을 알 수 있었다.

黃連의 항균력이 가장 뛰어나고 梔子の 항균력이 가장 작기 때문에 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子를 1:1:1:1 비율로 조제한 黃連解毒湯의 항균력은 黃連보다는 작고 黃柏, 黃芩에 비해서는 다소 큰 것을 알 수 있었다. 항균력이라는 측면에서는 黃連 단일 추출물을 이용한 항생제제 제조가 가장 효과적임을 알 수 있었다.

실험에서 사용된 환자분리균주들에 대한 항생제 내성 테스트에서 다음과 같은 결과(Table 6) 실험에 대조균으로 사용된 항생제인 tetracycline과 ciprofloxacin 모두에서 감수성이 뛰어난 것으로 나타났다.

환자분리균주에 대한 추출물들의 희석률에 따른 항균력 비교 실험에서 *S. aureus*에 대해 黃連解毒湯, 黃芩의 항균력은 10%까지 나타났으며, 黃連 역시 10% 농도에서 표준균주 실험에 비해 억제환의 크기가 커져서 전체적으로 추출물들의 항균력이 표준균주에 비해 증가하였음을 알 수 있었다. 대조균으로 사용된 doxycycline과 ciprofloxacin의 억제환 크기는 변화가 없었다. 이를 통하여 추출물들이 실제 임상에 응용되었을 때 표준균주를 대상으로 했던 기존 실험들에서 알려진 항균효과보다 더욱 우수한 효과를 나타낼 것이라 유추할 수 있었다. 환자분리균주에 대한 각 추출물들의 MIC는 다음과 같다(Table 10). 배양시간에 따른 항균효과 실험에서도 표준균주 실험에서와 같이 다섯 가지 추출물 모두가 16시간, 24시간, 72시간 배양 후에도 동일한 억제환의 크기를 유지했다.

미생물의 생육도 측정은 다섯 추출물 중에서 가장 높은 항균력을 보인 黃連으로 수행되었다. 측정 결과 *S. aureus*는 40 µl/ml 이상 농도에서 생육하지

못하였으며 그 이하 농도에서는 생육을 보이기는 했으나 대조군과 비교해 유의한 억제효과를 나타냈다. 결국 48시간까지 배양하는 동안 최소저해농도 이상에서는 균이 생육하지 못하였음을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 黃連解毒湯, 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子は *S. aureus*에 대해 항균력을 가지는 것을 알 수 있다. 그러나 梔子の 항균력은 항생제로의 효과를 기대하기에 미미하였고 그 외 黃連解毒湯, 黃芩, 黃連, 黃柏은 유의한 항균력을 보였다. 특히 黃連解毒湯과 黃連의 항균력은 천연항생제로서의 역할을 기대해 볼 만한 결과를 보였다. 또한 환자 분리 균주와 표준균주 실험을 비교했을 때, 다섯 가지 추출물들이 표준균주에서보다 분리균주에서 증가한 항생력을 보이거나, 삼환계나 퀴놀론계 항생제에 내성이 생긴 균주에 대해서 항생력을 유지하거나 오히려 증가된 항생력을 보이는 결과도 있어 항생제 내성균에 대한 증식 억제 효과도 있음을 알 수 있었다.

그러나 본 연구는 희석액에서도 높은 항균력을 나타낼 수 있는 사용량에 대한 연구, 추출방식에 따라 수득률과 항균효과가 다른 것으로 알려져 있기³² 때문에 수득률과 효과가 가장 효율적인 추출방식을 찾는 것에 대한 연구, 또한 한약재들의 항균력이 단순히 재료의 양에 의존적이지 않으므로³³ 최대의 항균력을 보이는 약재 용량에 대한 연구, 그리고 끝으로 생체에 투여되었을 때 나타나는 효과에 대한 실험적인 연구 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

黃連解毒湯, 黃連추출물, 黃芩추출물, 黃柏추출물, 梔子추출물이 *S. aureus*에 미치는 항균효과를 알아 보기 위하여 표준균주, 환자분리균주 각각에 대해 추출물의 희석률·접종량에 따른 억제환(Inhibition zone) 비교 실험, 최소 성장억제 농도실험(MIC), 배양시간에 따른 항균효과 지속성실험을 실시하고 다음과

같은 결론을 얻었다.

- 표준균주

1. 黃連解毒湯과 黃芩, 黃柏은 50% 농도까지 항균력을 나타냈고, 梔子は 100%에서만, 그리고 黃連은 10%까지 항균력을 보였다.
2. 원액(100%)에서의 항균력은 접종량이 많아짐에 따라(20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 80 μ l) 더 우수한 항균력이 나타나는 것을 볼 수 있었다.
3. 黃連解毒湯, 黃芩, 梔子の MIC는 50%, 20 μ l였다. 黃柏은 50%, 80 μ l였고 黃連은 10%, 20 μ l였다.
4. 시간에 따른 항균력은 16시간, 24시간, 72시간에서 유의한 차이가 없었으며 모든 추출물이 *S. aureus*에 대해 지속적인 항균력을 보였다.

- 환자분리균주

1. 표준균주 실험과 비교했을 때, *S. aureus*에 대해 다섯 종류 추출물 모두에서 항균력은 증가하는 결과를 얻을 수 있었다.
2. 표준균주 실험과 마찬가지로 *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, ETEC, *V. parahaemolyticus* 분리균주에 대해서도 黃連解毒湯, 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子 모두 16시간, 24시간, 72시간 후에도 지속적인 항균효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면 黃連解毒湯과 黃連, 黃柏, 黃芩, 梔子 추출물은 *S. aureus*에 대해 모두 항균력을 보였다.

항균력은 黃連, 黃連解毒湯, 黃芩, 黃柏, 梔子 순이었으며 그 중에서도 黃連의 항균력이 가장 좋았다. 유의성 있는 항균력을 가진 추출물은 黃連解毒湯과 黃連, 黃芩이었다.

표준균주 실험과 환자 분리균주 실험을 비교하였을 때 梔子를 제외한 네 가지 추출물들은 항생효과가 유지되었다.

이상에서 항균력이 확인된 세균으로 인한 각종 식중독에 黃連解毒湯, 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子 추출물의 사용을 고려할 만하며 항생제 내성균에 대해서

도 이용 가능성을 검토할 가치가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Oldfield EC. Emerging foodborne pathogens: keeping your patients and your families safe. *Rev Gastroenterol Disorders* 2001;1(4):177-86.
2. 송유진, 박수호, 유지영, 조운석, 오계현. 김치에서 분리한 세균인 *Lactobacillus plantarum* YK-9의 식중독 원인세균에 대한 항균활성 및 특성. *KSBB Journal* 2009;24(3):273-8.
3. 이종경, 박인희, 윤기선, 김현정, 조준일, 이순호, 황인균. 최근 2년간(2009-2010) 우리나라 병원성 대장균 식중독 역학조사 보고서 분석. *J Fd Hyg. Safety* 2012;27(4):366-74.
4. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350(9092):1670-3.
5. 손동화, 이석일, 정영진. 한약재의 식중독균에 대한 항균효과. *J Korean Soc. Hygienic Sciences* 2001;7(2):102-8.
6. 박옥연, 장동석, 조학래. 한약재 추출물의 항균효과 검색. *J Korean Soc. Food Nutr* 2001;21(1):91-6.
7. 방제학 교수. 방제학. 서울: 영림사; 1999, p. 180.
8. 성인화. 黃芩과 黃柏추출물의 MRSA와 *Candida*에 대한 항균활성. *The Korean Journal of Microbiology* 2004;40(1):17-22.
9. 배지현, 김홍연, 장지연. 連翹 추출물이 항균활성 검색 및 일부 식중독균의 증식에 미치는 영향. *Korean J Food Cookery Sci* 2005;21(3):319-25.
10. 이진우, 한효상, 이영중. 黃連 추출물의 항염효능에 관한 연구. *대한본초학회지* 2010;29(5):83-90.
11. 이종구. 黃柏과 連翹로부터 분리된 생리 활성물질 및 그들의 melanogenesis 저해효과와 항염증작용. 영남대학교 박사학위논문 2008.
12. 고광목. 치자 엑스의 가수분해에 의한 피부투과 및 항염효과. 우석대학교 박사학위논문. 2002.
13. 류응주, 조성환. 梔子추출물의 항균특성 및 안전성 검사. *J Agriculture & Life Sciences* 2004;38(4):11-9.
14. 도은수. 지모, 일황련 및 황백나무 추출액의 항균활성. *Korean J Plant Res* 1997;10(4):351-9.
15. 윤인숙. 마늘추출물의 식중독균에 대한 항균검사. 한국콘텐츠학회논문지 2009;9(2):339-49.
16. 홍경현, 남은숙, 박신인. 오미자 추출액 첨가 요구르트의 식중독균 증식 억제 효과. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 2003;23(4):342-9.
17. 정미란, 차정단, 이영은. 국내산 무화과의 식중독균에 대한 항균활성. *Korean J Food Cookery Sci* 2005;21(1):84-93.
18. 우인택, 박경남, 이신호. 두부 부패 미생물과 병원성 미생물에 대한 황금의 항균효과. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007;36(4):470-5.
19. 이종기, 서진중. 黃芩湯 및 黃芩추출물의 식중독 세균들에 대한 생육억제 효과. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005;34(10):1606-10.
20. Hong ND, Kim JW, Doo HK, Kim NJ. Studies on the efficacy of combined preparation of crude drugs. *Kor J Pharmacogn* 1982;13(1):26-32.
21. 장재선, 김정희, 권문주. 항생제 내성균에 대한 황금 추출물의 항균효과. *Korean J Food & Nutr* 2011;24(4):708-12.
22. 유화춘. 단체급식에서의 HACCP 도입방안에 관한 연구. 한국보건산업진흥원 1999.
23. Alterkruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne disease. *Emerg Infect Dis* 1997;3:285-93.
24. 항생제내성균주은행. 식품의약품안전청. 항생제 내성균 검사 표준 시험법. 서울: 식품의약품안전청.
25. 이주영, 왕혜진, 신동빈, 조용선. 식품에서 분리한 황색포도상구균의 항생제 내성 특징 및 균막 형

- 성. 한국미생물·생명공학회지 2013;41(1):96-104.
26. 윤은정, 이춘영, 이종서, 최응철, 심미자. 시프로플록사신 내성 황색 포도상 구균에서 MIC의 하향 분포로 입증된 DW-224a의 in vitro 항균 활성의 비교 우수성. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 2009;39(6):431-5.
 27. 정경혜. 지역사회병원에서의 황색포도상구균혈증에 대한 임상적 고찰. *감염과화학요법* 1997; 29(1):39-47.
 28. 강성구. 인체생물학. 서울: 아카데미서적; 2006, p 363-7.
 29. 신민교. 임상본초학. 서울: 영림사; 2000, p. 372, 400, 402, 405.
 30. 최용태, 외. 침구학. 서울: 집문당; 1988, p. 198-9, 480-1, 484.
 31. 한종현. 한방약리학. 서울: 의성당; 2004, p. 187-90.
 32. 최미숙. 황금, 황련, 황백의 항균효과. *승실대학교 중소기업대학원 석사논문* 2009.
 33. 서형식. 황련의 증량에 따른 전탕액이 *Staphylococcus aureus*에 미치는 항균효과에 대한 실험적 연구. *대한약침학회지* 2007;10(3):47-52.