

## 나린게닌의 항균력에 미치는 관련 후라보노이드의 병용효과

한성순# · 이종길 · 김영소

충북대학교 약학대학

(Received August 5, 1992)

### Antimicrobial Effects of Naringenin alone and in Combination with Related Flavonoids

Seong-Sun Han#, Chong-Kil Lee and Young-Soe Kim

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**Abstract**—As part of our search for less toxic antimicrobial substances from natural resources, naringenin was isolated from peels of *Citri fructus* and then hydrolyzed to naringenin. The antimicrobial activity of naringenin was examined by measuring the minimal inhibitory concentration(MIC) against fourteen species of bacteria. The antimicrobial activity of naringenin in combination with rutin or hesperetin was evaluated by checkerboard method. Among fourteen species tested, the antimicrobial activity of naringenin was the most prominent against *Staphylococcus aureus* and *Shigella boydii* showing MIC of 100 µg/ml for both species. Combinations of naringenin with rutin or hesperetin showed synergism against several species of bacteria, but no antagonism was observed.

**Keywords** □ Naringenin, antimicrobial activity, minimal inhibitory concentration(MIC), combination, checkerboard method.

Naringenin(나린게닌)은 5,7,4'-trihydroxyflavanone  $C_{15}H_{12}O_5$ 의 화학구조를 갖는 flavonoid 성분의 일종으로 무색의 침상 또는 소엽상의 결정성 물질이다.<sup>1,2)</sup> 이 물질은 단독<sup>3)</sup> 또는 배당체인 naringin으로 천연 물질로 분포되어 있다.<sup>1,4,5)</sup>

Naringenin의 생리작용은 혈압강화작용, 지방산화 저지작용 등이 보고되었으며,<sup>1)</sup> 항균력에 관한 연구보고는 찾아볼 수 없다. 배당체인 naringin에 대한 항균력시험은 수종의 세균에 대하여 보고되었으며,<sup>6)</sup> 안전성에 관한 연구는 혈액임상화학적, 병리조직학적 검사에 있어서 모두 안전성이 있는 것으로 보고되었다.<sup>6)</sup>

따라서 naringenin은 naringin의 생체내 활성물질이며,<sup>7,8,9)</sup> 일반적으로 flavonoid의 비당체는 배당체

보다 항균력이 우수하고,<sup>10)</sup> hydroxy기가 항균활성에 있어서 필수적이라는 보고<sup>11)</sup>를 토대로 하여 naringenin에 대한 항균력시험을 실시하고 rutin 및 hesperetin과의 병용투여시 항균효과를 평가하고자 병용투여 시험을 실시하여 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

#### 실험방법

**시료**—한국산 감귤의 과피에서 얻은 naringenin을 가수분해하여 naringenin을 얻었다.<sup>12)</sup>

**시험균주**—본 대학 미생물학교실에서 계대배양하여 보관하고 있는 균주 중 gram 양성세균 5종과 gram 음성세균 9종을 사용하였으며 그 종류는 Table I 및 Table II와 같다.

**배지**—배지로는 nutrient broth medium(pH 6.8~

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

**Table I**—Test strains of gram positive bacteria

|   |
|---|
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348         |
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219          |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341       |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598   |

**Table II**—Test strains of gram negative bacteria

|   |
|---|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 31030          |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145    |
| <i>Salmonella paratyphi</i> B(S-3)          |
| <i>Salmonella typhi</i> D(S-58)             |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028    |
| <i>Serratia marcescens</i> ATCC 11105       |
| <i>Shigella boydii</i> C2, L1, S2 ATCC 8700 |
| <i>Shigella sonnei</i> D1, L1, S2 ATCC 9290 |

7.0) 및 Mueller Hinton broth medium을 사용하였으며 *Mycobacterium smegmatis*는 Dubos medium을 사용하여 배양하였다.

**시료용액의 조제**—시료인 naringenin, rutin, hesperetin은 향량이 될 때 까지 건조시킨 후 용매로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시키고 nutrient broth로 최고농도가 1000 µg/ml가 되도록 시료용액을 조제하였다.

**균액의 조제**—시험균주 중 *Serratia marcescens*는 26°C에서 *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*는 30°C에서, 그밖의 균주는 37°C에서 18시간 액내배양하여 UV-Spectronic 21로 540 nm에서 T(%)≥30이 되도록 희석한 후 1 ml를 100배 희석하여 균수를 조정하였다.

**Naringenin의 항균력시험**—Serial dilution method<sup>13)</sup>로 실시하였으며 균의 발육여부는 최소발육저지농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)로서 결정하였다. DMSO는 균의 발육억제에 전혀 영향을 주지 않는 농도에서 대조시험을 병행하였다. 더욱 정확한 MIC를 구하기 위하여 시료용액의 농도를 더 세분하여 시험하였다.

**Rutin 및 Hesperetin과의 병용투여시험**—Naringenin과 rutin 및 hesperetin과의 병용투여시험은 checkerboard method<sup>14)</sup>에 따라서 실시하였으며 시험균주는 항균력시험 결과 항균력이 우수한 9종의 균주를

**Table III**—Antimicrobial activity of naringenin against gram positive bacteria

| Strains                                   | MIC(µg/ml) |
|---|------------|
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348         | 300        |
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219          | 125        |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341       | 200        |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468 | 200        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598   | 100        |

**Table IV**—Antimicrobial activity of naringenin against gram negative bacteria

| Strains                                     | MIC(µg/ml) |
|---|------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 31030          | 550        |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933         | 550        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145    | 500        |
| <i>Salmonella paratyphi</i> B(S-3)          | 600        |
| <i>Salmonella typhi</i> D(S-58)             | 400        |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028    | 600        |
| <i>Serratia marcescens</i> ATCC 11105       | 500        |
| <i>Shigella boydii</i> C2, L1, S2 ATCC 8700 | 100        |
| <i>Shigella sonnei</i> D1, L1, S2 ATCC 9290 | 450        |

선택하였다.

## 결과 및 고찰

**Naringenin의 항균력시험**—Gram 양성균에 대한 항균력시험 결과는 Table III과 같고 gram 음성균에 대한 항균력시험 결과는 Table IV과 같다.

**Rutin 및 hesperetin과의 병용투여시험**—Naringenin에 대한 항균력시험 평가에서 항균력이 우수한 균주 9종에 대한 rutin 및 hesperetin의 항균력시험 결과 각각의 MIC는 Table V와 같고 병용투여시험을 실시한 바 naringenin과 rutin의 FIC 및 FICI는 Table VI과 같고 naringenin과 hesperetin의 FIC 및 FICI는 Table VII과 같다. 병용투여시험 결과의 판정은 Jada-vji 등<sup>15)</sup>의 기준을 근거로 판정하였다. 또한 병용투여시에 상승효과, 상가적 효과 및 무관한 결과를 나타내는 대표적인 균주에 대한 isobologram은 Fig. 1, 2, 3과 같다.

이상의 결과를 고찰하여 보면 naringenin은 gram 양성균인 *Staphylococcus aureus* 및 gram음성균인 *Shigella boydii*에 대한 MIC가 모두 100 µg/ml로 항균력이 가장 우수하였으며 gram양성균에 대하여는

Table V—Antimicrobial activities of naringenin, rutin and hesperetin

| Strains                                     | MIC( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |            |
|---|-------------------------|-------|------------|
|   | Naringenin              | Rutin | Hesperetin |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348           | 300                     | 800   | 900        |
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219            | 125                     | 900   | 700        |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 31030          | 550                     | 700   | 800        |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341         | 200                     | 500   | 800        |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468   | 200                     | 600   | 500        |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933         | 550                     | 700   | 500        |
| <i>Serratia marcescens</i> ATCC 11105       | 500                     | 700   | 700        |
| <i>Shigella sonnei</i> D1, L1, S2 ATCC 9290 | 450                     | 650   | 650        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598     | 100                     | 750   | 700        |

Table VI—FICs and FICIs between naringenin and rutin

| Strains                                     | FIC        |       | FICI  |
|---|------------|-------|-------|
|   | Naringenin | Rutin |       |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348           | 0.500      | 0.063 | 0.563 |
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219            | 1.000      | 0.062 | 1.062 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 31030          | 1.000      | 0.063 | 1.063 |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341         | 0.500      | 0.062 | 0.562 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468   | 0.125      | 0.250 | 0.375 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933         | 0.500      | 0.500 | 1.000 |
| <i>Serratia marcescens</i> ATCC 11105       | 0.250      | 0.500 | 0.750 |
| <i>Shigella sonnei</i> D1, L1, S2 ATCC 9290 | 0.500      | 0.500 | 1.000 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598     | 1.000      | 0.063 | 1.063 |

Table VII—FICs and FICIs between naringenin and hesperetin

| Strains                                     | FIC        |            | FICI  |
|---|------------|------------|-------|
|   | Naringenin | Hesperetin |       |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348           | 0.127      | 0.126      | 0.253 |
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219            | 0.128      | 0.250      | 0.378 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 31030          | 0.251      | 0.250      | 0.501 |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341         | 0.250      | 0.250      | 0.500 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 14468   | 0.500      | 0.250      | 0.750 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933         | 1.000      | 0.062      | 1.062 |
| <i>Serratia marcescens</i> ATCC 11105       | 0.500      | 0.250      | 0.750 |
| <i>Shigella sonnei</i> D1, L1, S2 ATCC 9290 | 0.500      | 0.500      | 1.000 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598     | 1.000      | 0.063      | 1.063 |

시험균주에 대한 MIC의 평균치보다 우수한 항균력을 나타내었고, 반면 gram 음성균에 대하여는 *Shigella boydii* 이외에 모두 평균치 이하의 항균력을 나타내었다. 따라서 naringenin은 gram 음성균에서 보다는 gram 양성균에 대하여 강한 항균력을 나타내었다. 또

한 최근의 감염증의 원인균으로 주목되고 있으며 대부분의 항생물질에 대한 저항성이 강한 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 MIC는 500  $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었다.

Naringenin과 rutin의 병용투여시험에 있어서는

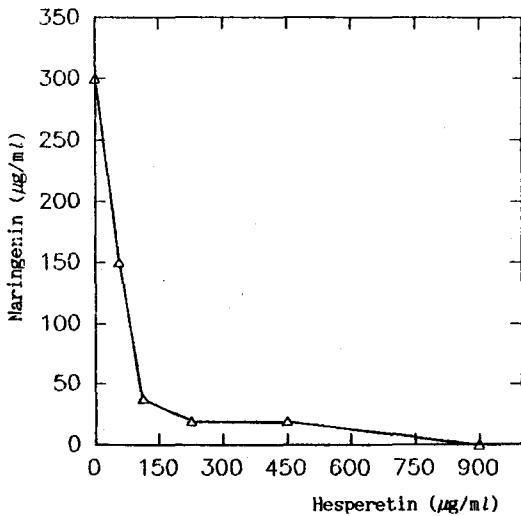


Fig. 1—Isobologram showing a synergy between naringenin and hesperetin against *Bacillus cereus* ATCC 27348.

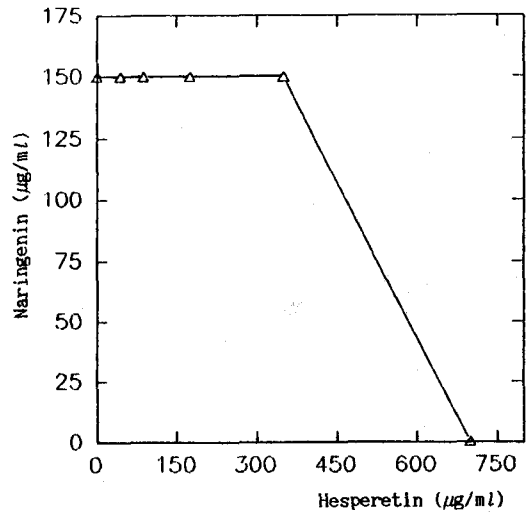


Fig. 3—Isobologram showing an indifferent action between naringenin and hesperetin against *Staphylococcus aureus* ATCC 12598.

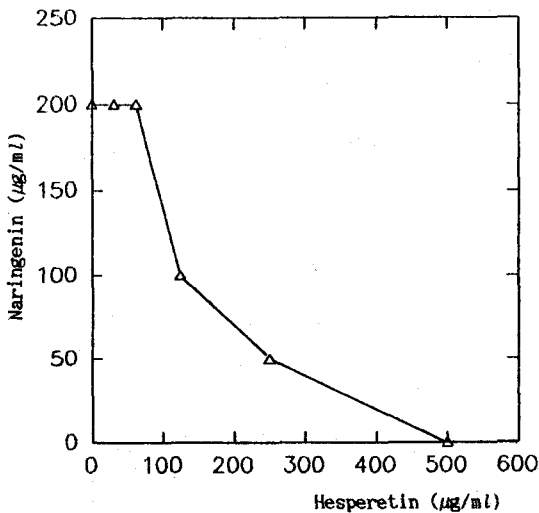


Fig. 2—Isobologram showing an additive action between naringenin and hesperetin against *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468.

*Mycobacterium smegmatis*에 대하여 상승효과를 나타내었으며, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei* 등 5종의 균주에 대하여는 상승효과를 나타내었고, *Bacillus subtilis* 등 3종의 균주에 대하여는 병용투여와 무관한 것으로 나타났다.

Naringenin과 hesperetin의 병용투여시험에 있어

서는 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* 등 4종의 균주에 대하여 상승효과를 나타내었고, *Mycobacterium smegmatis*, *Serratia marcescens* 및 *Shigella sonnei* 등의 3종의 균주에 대하여 상승효과를 내었다. 또한 *Staphylococcus aureus* 및 *Proteus mirabilis*의 2종의 균주에 대하여는 병용투여와는 무관한 결과를 나타내었다. Naringenin과 rutin 및 hesperetin의 병용투여시험 결과 길항작용을 나타낸 균주는 없었고, naringenin-rutin과 naringenin-hesperetin의 병용투여시험 결과를 비교할 때, naringenin-hesperetin을 병용투여시에 더 많은 균주에 대하여 상승효과를 나타내었다. 전체적으로는 gram음성균에 대해서 보다 gram양성균에 대해서 더 많은 균주에서 상승효과를 보였다.

## 결 론

1. Naringenin에 대한 항균력시험에서는 gram양성균인 *Staphylococcus aureus*와 gram음성균인 *Shigella boydii*에 대한 MIC가 100 µg/ml로 가장 우수하였고, 전체적으로는 gram음성균 보다 gram양성균에 대하여 항균력이 우수하였다.

2. 병용투여시험에서는 naringenin과 rutin의 경우에 *Mycobacterium smegmatis*에 대한 FICI가 0.375를,

naringenin과 hesperetin의 경우에는 *Bacillus cereus*에 대한 FICI가 0.253을 나타내므로써 가장 우수한 상승효과를 보였다.

### 감사의 말씀

“이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음”을 감사드립니다.

### 문헌

- 1) 山口一考: 植物成分分析法(上), 南江堂, 東京 pp. 206-208(1958).
- 2) 官道悅男: 動植物成分 訂正増補版: 共立出版株式會社, 東京 p. 276(1957).
- 3) Harborne, J. B.: *The Flavonoids; Advances in Research* 4th ed., Chapman and Hall Ltd., London, pp. 351-352(1988).
- 4) 유경수, 한대석, 유승조, 정진섭, 성충기: 천연물화학 *Integrated Essentials*. 영림출판사, 서울 p. 221(1989).
- 5) 服部靜夫: 植物色素, 岩波書店, 東京 pp. 122-124 (1936).
- 6) Han, S. S. and You, I. J.: Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. *Kor. J. Mycol.*, **16**(1), 33-40(1988).
- 7) Booth, A. N., Francis, T. J. and DeEds, F.: Metabolic fate of some flavanones. *Federation Proc.* **15**, Abst., 724(1956).
- 8) Hackett, A. M. and Griffiths, L. A.: Selective excretion of flavanone in bile. *Biochem. Soc. Trans.*, **7**(4), 645-6(1979).
- 9) Hackett, A. M., Marsh, I., Barrow, A. and Griffiths, L. A.: The biliary excretion of flavanones in the rat. *Xenobiotica*. **9**(8), 491-502(1979).
- 10) Yoshio, S.: Bactericidal, paramedicinal and spermatocidal actions of some flavonoids. *Gifu Ika Daigaku Kiyo*, **10**(2), 123-30(1963).
- 11) Bae, K. H., Seo, W. J. and Leem, S.H.: Synthesis of 4, 4'-biphenol derivatives and antibacterial activities against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Yakhak Hoeji*, **36**(1), 36-39(1992).
- 12) Boyd, R. F. and Hoerl, B. G.: *Basic Medical Microbiology* 3rd ed., Little, Brown and Co., Boston, pp. 267-269(1986).
- 13) Daniel, W. F., William, L. S. and Simon, H. W.: Hydrolysis of some flavonoid rhamnoglucosides to flavonoid glucosides., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2505 (1953).
- 14) Lorian, V.: *Antibiotics in Laboratory Medicine* 2nd ed., William & Wilkins Co., New York, pp. 537-545 (1985).
- 15) Jadavji, T., Prober, C. G. and Cheung, R.: *In vitro* interactions between rifampin and ampicillin or chloramphenicol against haemophilus influenzae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 210-215(1984).