

황백, 연교 및 감초 추출물을 이용한 국소제제의 *Staphylococcus intermedius*에 대한 항균효과

정효훈 · 오태호¹

경북대학교 수의과대학

Antibacterial Activity of Topical Agent Extracted from *Phellodendri cortex*, *Forsythia fructus* and *Glycyrrhizae radix* Against *Staphylococcus intermedius* in Dogs

Hyo-Hoon Jeong and Tae-Ho Oh¹

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, South Korea

Abstract : This study was performed to examine the antibacterial efficacy of topical agent extracted from *Phellodendri cortex*, *Forsythia fructus* and *Glycyrrhizae radix* as an alternative dermatological agent. Also, the most efficacious concentration of this agent and the skin-contact time inhibiting the vegetation of bacterial cells in various dilutions were determined. Five strains of *Staphylococcus intermedius* were exposed to various dilutions of this agent. The efficacy was assessed after exposure for time periods varying between 0 and 30 min. The antibacterial efficacy was shown to be the strongest at dilution of 1:2. The number of viable organisms decreased significantly after 8 minutes of exposure time and was the smallest after 30 minutes of exposure time. This alternative dermatological agent is considered to be effective against *Staphylococcus intermedius* and has a potential to be a new topical agents for the treatment of pyoderma in dogs.

Key words : *Staphylococcus intermedius*, *Phellodendri cortex*, *Forsythia fructus*, *Glycyrrhizae radix*, antibacterial efficacy, dog.

서 론

*Staphylococcus intermedius*에 의한 피부질병은 개에서 흔하며 임상 증상은 홍반, 소양증, 농포 형성 등이다. 피부 병변의 부위와 정도에 따라 표면성, 표재성, 심재성 농피증으로 분류한다. 대부분의 경우 세균성 피부질환은 알려지성 피부 질환, 외부 기생충성 질환, 각화이상, 내분비성 질환, 혹은 면역부전이나 이상에 속발하기 때문에 진단 및 치료는 원발성 질환의 유무를 반드시 고려해야 한다^{3,8,11,17}. 세균성 피부질환의 치료는 국소항균요법과 전신항생제요법 또는 두 가지를 병행하는 요법이 있으며 충분한 기간동안 치료하는 것이 매우 중요하다^{11,17}. 국소 제제로는 benzoyl peroxide, chlorhexidine, iodine과 triclosan 등이 있으며 이들 제제는 좋은 항균 효과를 가지지만 제제에 따라 홍반, 가려움증, 통증 혹은 착색 등의 부작용을 일으키는 단점이 있다^{3,5,8,17}.

황백 (*Phellodendri cortex*)^{6,7}, 연교 (*Forsythia koreana*)⁹와 감초 (*Glycyrrhizae radix*)^{4,18,19}는 한방에서 항균작용이 있는 것으로 알려져 있으며 각각 다양한 세균에 대해 항균 작용이 있다고 알려져 있다. 본 연구는 이들 항균작용을 갖는 약초 추출물로 구성된 국소제제의 *Staphylococcus intermedius*에 대한 항균 효과와 항균효과를 나타내는 피부 접촉 시간을 알아 보고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험용 국소 항균제

각각의 약초를 수세후 90°C에서 3시간 가열하여 추출한 후 여과후 60°C에서 진공농축하여 70 brix로 적정하였다. 이후 멸균 증류수로 1:2, 1:4, 1:10으로 희석하여 각각 10 ml씩 16 × 125 mm 시험관에 담아 항균작용을 시험하였다. 각 희석 농도 별로 MP 220 pH meter (Mettler Toledo, USA)을 사용하여 용액의 pH를 측정하였다.

접종 세균의 분리 동정과 초기 접종액 내 세균 수의 산정

*Staphylococcus intermedius*는 환축 5도로부터 분리하였다. 집락의 성장, 색깔, 용혈능, Gram 염색, catalase 시험, coagulase 시험, API STAPH-IDENT System® (bioMérieux Co., France), Biolog® (Microstation Co., U.S.A.)를 통해 *Staphylococcus intermedius*임을 확인하였다. 각각의 균주를 Tryptic soy broth를 이용해 37°C에서 18시간 배양 후 2,000 g에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 pellet을 0.0003 M phosphate-buffered water (PBW, pH 7.2)에 부유시켰다. 세균 부유액을 균일하게 혼합 후 PBW로 10:1로 희석한 stock 접종액을 사용하였다. 이 stock 균액을 1 ml씩 각각의 희석된 국소항균제에 접종하였다. 접종액 0.1 ml당 세균 수를 산정하기 위하여 PBW를 이용한 단계희석법을 사용하였다 (10⁻¹-10⁻⁷). 10⁻³에서 10⁻⁶까지의 희석액을

¹Corresponding author.
E-mail : thoh@knu.ac.kr

Tryptic soy agar에 접종, 도달하여 37°C에서 18시간 배양한 후 형성된 집락 수가 30개 이상 300개 이하일 때 계수하여 접종액 0.1 ml당 세균 수를 산정하였다. 초기 접종액 내의 세균 수는 각각 2.85×10^8 , 5.4×10^7 , 3.7×10^7 , 1.74×10^8 , 5.9×10^6 개였다.

항균효과와 최적 항균 농도, 접촉 시간의 결정

세균 접종 후 30초, 1분, 4분, 8분, 16분, 30분마다 1 ml의 국소항균제 희석액을 채취하여 PBW로 10배 희석한 후 0.1 ml씩 TSA plate에 접종하고 37°C에서 24시간 배양 후 형성된 집락수를 계수하여 세균 수를 산정하였다.

결 과

국소 항균제는 1:2 희석 농도에서 가장 높은 항균 효과를 보였다. 1:4 희석 농도에서도 균주에 따라 16분의 접촉 시간 후부터 현저한 항균 효과를 보이기도 하였지만 그 효과는 1:2 희석 농도에 비하여 약하게 나타났다. 1:2 희석 농도에서 모든 균주에 대하여 접촉 시간 4분까지는 세균증식을 크게 억제하지는 못했지만, 8분 후부터는 현저한 세균 증식 억제 효과를 보였다. 세균 증식 억제 효과는 접촉 시간이 길어질수록 더 크게 나타났다 (Table 1). 각 용액의 pH는 1:2

희석 농도에서 4.74, 1:4에서 4.80, 1:10에서 4.84로 농도가 낮아질수록 증가하였다.

고 찰

개에서 흔한 세균성 피부질환의 치료는 병변의 정도에 따라 국소제제만을 단독으로 사용하거나 전신항균요법을 병행하는 방법이 널리 쓰이고 있다^{3,8,11,17}. 가장 널리 쓰이는 국소제제로는 benzoyl peroxide, chlorhexidine, iodine, triclosan 등을 들 수 있다^{3,5,17}. Benzoyl peroxide는 효과가 좋은 제제이나, 그 부작용으로 홍반, 소양증, 통증, 심한 피부 건조증을 일으키는 단점이 있다³. Chlorhexidine은 benzoyl peroxide에 비해 자극성이 낮고 피부 건조를 유발하지는 않지만, 상처치유관련 세포독성과 이도로 직접 주입 될 경우 이독성이 있다는 단점이 있다^{3,12,13,16}. Iodine은 피부자극, 과민반응 유발, 피부 건조나 피모의 착색 등의 부작용을 가진다고 보고된 바 있다^{10,11,16}.

항균제 추출물은 3가지 이상의 약초로 구성된 항균대체요법 제제이다. 주요 구성 성분은 황백(*Phellodendri cortex*), 연교(*Forsythia koreana*), 감초(*Glycyrrhizae radix*)이며 이들 약초는 우리나라, 중국, 일본을 비롯한 아시아 지역에서 오랜 시간 전부터 다양한 약리학적 효과를 인정 받아 각종 국

Table 1. The effect of concentration of topical agent extract on *Staphylococcus intermedius*

Dilutions and isolates	No. of bacteria/0.1 ml of stock inoculum	No. of bacteria recovered/0.1 ml after contact time					
		30 s	1 min	4 min	8 min	16 min	30 min
Isolate 1	2.85×10^8						
1:2		TNTC	TNTC	TNTC	1550	840	240
1:4		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2900	1460
1:10		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
Isolate 2	5.4×10^7						
1:2		TNTC	TNTC	TNTC	1950	1290	630
1:4		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	1860
1:10		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
Isolate 3	3.7×10^7						
1:2		TNTC	TNTC	TNTC	830	540	140
1:4		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	1560	780
1:10		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
Isolate 4	1.74×10^8						
1:2		TNTC	TNTC	TNTC	2970	1140	150
1:4		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	1750
1:10		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
Isolate 5	5.9×10^6						
1:2		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2710	1160
1:4		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2440
1:10		TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC

TNTC: Too numerous to count.

소 혹은 전신성 질병의 치료제로 이용되어 왔다. 황백 (*Phellodendri cortex*)은 한방에서 널리 사용되는 약제로 그 성분은 berberine이 다량을 차지하며 항균작용, 항 콜레라 독소 작용, 소염작용, 담즙분비 촉진 작용을 나타내며 사람에게서 acne를 일으키는 *Propionibacterium acne*에 항균효과가 있다^{2,6,7,15}. 다른 몇몇 약초성분과 혼합하여 피부 질환에 적용시 강한 소염 효과를 가지고 있다². 황백은 상기한 항균, 소염 작용 외에도 항진균 작용도 가지는 것으로 알려져 있다¹⁴. 연교의 항균작용은 suspenside, β -hydroxyacteoside, forthiaside, acteoside를 함유하는 phenylpropanoid glycosides에 의한다⁹. 감초(*Glycyrrhizae radix*)는 licorice라고 불리며, 항균작용 외에 소염, 해열, 진통, 부신피질 호르몬 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 감초는 *Helicobacter pylori*⁴, *Bacillus subtilis*¹⁹, 및 *Streptococcus pyogenes*¹⁸, *Haemophilus influenzae*¹⁸, *Moraxella catarrhalis*¹⁸에 대해 항균작용이 있다고 알려져 있으며 항균 작용 이외에도 감초 뿌리 추출물은 항산화작용이 있으며, 개의 아토피성 피부염의 임상 증상에도 효과를 가지는 것으로 보고되었다¹³.

본 연구는 황백, 연교, 감초 추출물로 구성된 대체요법제제의 *Staphylococcus intermedius*에 대한 *in vitro* 항균효과를 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 본 실험의 결과, 1:2 희석 농도의 추출물을 8분 이상 피부에 적용하였을 때 현저한 항균효과를 보였으며 접촉 시간이 30분일 때 가장 큰 효과를 보였지만, 여전히 완전한 살균 작용을 보이지는 않았다. 또한 임상적으로 30분의 접촉 시간을 주는 것은 힘들 것으로 판단되며 국소항균제제로 단독 사용하기보다는 다른 항균제와 혼합 사용하거나, 항생제를 첨가하면 그 항균 작용이 더욱 증진될 것으로 기대된다.

항균작용과 pH는 반비례하게 나타났다. 희석배수가 높아질수록 pH는 증가하였는데, 이는 항균작용과 관계가 있을 것으로 사료되며 항균 작용과 pH와의 관계에 대하여도 추후 연구가 더 필요하다고 생각된다. 1:2 희석에서 pH는 4.74로 가장 낮았으며 가장 큰 항균 효과를 보였다. 이는 추출물의 pH를 낮추게 되면 항균 효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다.

배양시간과 배양온도 등 모든 조건을 동일하게 하였음에도 불구하고 초기 접종액 내의 세균수의 증가는 초기 접종액 이전단계의 broth 접종량의 차이, 균주에 따른 증식능, 저항성의 차이 등에 의한 것으로 보인다. 분리균 1이나 4의 초기 접종액 내의 세균수는 분리균 5보다 상당히 높았음에도 불구하고 30분 후 생존율은 분리균 5보다 훨씬 낮았음을 알 수 있다. 이는 분리균 5의 저항성이나 증식능이 타 균주보다 클 수 있음을 시사하여 준다.

본 실험에 사용된 약초 추출액은 여러 종류의 생약 성분으로 이루어져 있으며 그 성분 개개가 다양한 약리학적 작용을 가진다. 본 실험에서는 *Staphylococcus intermedius*에 대한 항균 효과를 조사하였으나 기타 피부 질환을 일으키는 Gram 음성균이나 fungi에 대한 효과에 대하여도 추후 연구가 더 필요할 것으로 사료된다. 약초 추출물의 항균 효과 및

부작용이 적은 장점 등으로 미루어 볼 때, 충분한 임상 적용 가능성이 있을 것으로 기대되며, 타 국소제제와의 병용이나 항생제와의 혼합, pH의 저하 등을 통해 임상 적용 가능성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

1:2 희석 농도의 약초 추출물은 8분 이상의 접촉 시간 후 *Staphylococcus intermedius*에 대한 항균 효과가 인정되며 개의 세균성 피부질환 치료제나 보조제로써 임상 적용 가능성이 있다고 사료된다. 그러나, 구성성분 개개의 작용이나 기타 피부 질환을 일으키는 Gram 음성 세균, 진균에 대한 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Berkelman RL, Holland BW, Anderson RL. Increased bactericidal activity of dilute preparations of povidone-iodine solutions. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 635-639.
- Cuellar MJ, Giner RM, Recio MC, Manez S, Rios JS. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia* 2001; 72: 221-229.
- DeBoer JD. Strategies for management of recurrent pyoderma in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990; 20: 1509-1525.
- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* 2002; 71: 1449-1463.
- Guaguere E. Topical treatment of canine and feline pyoderma. *Vet Dermatol* 1996; 7: 145-151.
- Higaki S, Hasegawa Y, Morohashi M. The correlation of kampo formulations and their ingredients on anti-bacterial activities against *propionibacterium acnes*. *J Dermatol* 1995; 22: 4-9.
- Higaki S, Nakamura M, Morohashi M. Activity of eleven kampo formulations and eight kampo crude drugs against *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: retrospective evaluation in 1990 and 1995. *J Dermatol* 1996; 23: 871-875.
- Hill PB, Moriello KA. Canine pyoderma. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 204: 334-340.
- Kitagawa S, Nishibe S, Baba H. Studies on the Chinese crude drug "*Forsythia fructus*". *Yakugaku Zasshi* 1987; 107: 274-278.
- Koch HJ, Vercelli A. Shampoos and others topical therapies. In: *Advances in Veterinary Dermatology Vol 2*. Oxford: Pergamon Press. 1993: 409-411.
- Kwochka KW. Recurrent pyoderma. In: *Current Veterinary Dermatology*. St. Louis: Mosby-year Book. 1993: 3-21.
- Lemarie RJ, Hosgood G. Antiseptics and disinfectants in small animal practice. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1995; 17: 1339-1351.
- Lozier SM. Topical wound therapy. In: *Surgical Complications and Wound Healing in the Small Animal Practice*. Philadelphia: WB Saunders. 1993: 63-88.

14. Nagle TM, Torres SM, Horne KL, Grover R, Stevens MT. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to investigate the efficacy and safety of a Chinese herbal product (P07P) for the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2002; 12: 265-274.
15. Nakamoto K, Sadamori S, Hamada T. Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi. *J Prosthetic Dent* 1990; 64: 691-694.
16. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Dermatologic therapy. In: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2001: 207-273.
17. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Bacterial skin diseases. In: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2001: 274-335.
18. Tanaka Y, Kikuzaki H, Fukuda H, Nakatani N. Antibacterial compounds of licorice against upper airway respiratory tract pathogens. *J Nutr Sci Vitaminol* 2001; 47: 270-273.
19. Tsukiyama RI, Katsura H, Tokuriki N, Kobayashi M. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1226-1230.