

천연보존제를 위한 특정 한방처방의 추출용매에 따른 항균활성 비교

도의정^{1,2}, 백승호³, 이금산^{1*}

¹원광대학교 한의과대학 본초학교실

²원광대학교 의과대학 대사기능제어연구센터

³건국대학교 특성화대학 특성화학부 생명과학전공

Comparison of Antimicrobial Activity of Specific Korean Medicinal Prescription for Natural Preservatives

Doh Eui-jeong^{1,2}, Baek Seungho³, Lee Guemsan^{1*}

¹Department of Herbology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

²Center for Metabolic Function Regulation, School of Medicine, Wonkwang University

³Department of Biological science, Konkuk University

Abstract

This study was conducted to investigate the new candidates of natural preservatives, modified by based on the Korean medical prescription. We created 4 candidate extracts with different solvents. The crude water extract JBTP01 and JBTP02 showed weak antibacterial activities. Otherwise, 70% EtOH extract JBTP03 and MeOH extract JBTP04 showed wide antibacterial spectrum. Both were shown strong antibacterial activity to *E. coli*. JBTP03 was also effected bacteria *C. albicans*. Compared the antibacterial activities with methylparaben, commonly used syntetic antiseptic, and 3 natural preservatives in market. JBTP03 and JBTP04 showed similar modality of antibacterial activity spectrum. In other words, JBTP03 and JBTP04 had strong possibility to be new natural preservatives. Further study need to be done to use JBTP03 and JBTP04 for natural preservatives in cosmetics.

Keywords: Antibacterial activity, Korean medical prescription, Natural preservative, JBTP03 and JBTP04

* Correspondence: 이금산(Lee Guemsan. Tel: +82-63-850-6985 E-mail: rasfin@wku.ac.kr)

· Received 2015-02-25, accepted 2015-03-02.

서론

화장품은 유통기한도 비교적 길며 사용방법과 보관에 있어 미생물과 접촉할 가능성이 매우 높다. 성분과 제형의 특성상 미생물 생존에 필수적인 수분 및 다양한 탄소, 질소원을 함유하고 있어 미생물 오염을 방지하기 위한 방부제 처리 필요성이 높으며 그로인한 문제점을 갖고 있다¹⁻³⁾. 현재 화장품에 사용되는 방부제 종류는 다양하나 대부분 합성 화학제품에 의존하고 있다. 파라벤류, 퀴터늄-15, 이미다졸리디닐우레아, 페녹시에탄올 등이 주로 사용되는 합성방부제이다⁴⁻⁶⁾. 그 중 파라옥시안식향산 에스테르인 파라벤으로 진균류에 효과적이며 세균류에 대해서도 매우 넓은 항균스펙트럼을 갖고 있어 사용량 및 빈도가 가장 높다⁷⁻⁹⁾. 파라벤류는 다른 화학합성제품에 비해 상대적으로 독성이 낮으나 대부분의 다른 화학 방부제처럼 피부알레르기 유발, 피부자극, 환경호르몬으로서의 가능성, 내성균 유발 등과 같은 다양한 문제를 갖고 있다¹⁰⁻¹⁵⁾. 또한 허용 기준내의 사용도 장기간 사용으로 지속적 체내 축적과 이로 인한 급·만성 독성, 암 및 돌연변이 유발 등의 가능성이 새로운 문제로 대두되고 있다¹⁶⁾.

합성 화학방부제의 단점을 극복하기 위해 천연방부제 또는 방부 기능을 지닌 천연소재에 대한 관심과 연구가 오래전부터 수행되어 왔다. 천연 항균물질에 관한 연구로는 지방산, 정유, alkaloid, flavonoid, phytoalexin 등이 보고되어 있다. 이러한 천연항균 물질들을 주요 성분으로 함유하고 있는 한약재는 매우 적합한 시료라 할 수 있으며 이를 이용한 항균활성 연구들이 다양하게 수행되고 있다. 한약재를 이용한 항균활성 연구의 대부분은 단일 한약재 혹은 단일 추출물을 이용하여 수행되었고, 최근 그간 축적된 학술 결과를 이용한 복합 혼합물을 생성하는 연구들이 수행되고 있다. 본 연구에서는 단일 한약재 또는 단일 추출물을 이용하는 것이 아닌 한방 처방에 바탕을 둔 천연한방보존제 후보를 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 한약재는 오향환의 가미방으로 대황, 사상자, 황백, 황금, 촉초, 춘피, 오미자를 광명당제약에서 건조 상태의 것을 구입하였으며, 원광대학교 한의대 본초학교실에서 감정하였다. 추출하기 전 불순물을 제거하고 냉장보관 하였다.

2. 한약재 추출시료 조제

대황, 사상자, 황백, 황금, 촉초, 춘피, 오미자를 분쇄한 후 증류수, 70% 에탄올, 메탄올을 용매로 사용하여 초음파추출을 하였다. 추출이 완료된 용액을 옮긴 뒤 용매를 추가하여 2차 초음파추출을 시행하였다. 2차 추출액을 1차 추출액과 합한 후 여과지(Whatman No.)로 여과한 뒤 유기용매로 추출한 것은 회전감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조하였고 증류수로 추출한 것은 곧바로 동결건조하였다. 동결 건조한 분말은 냉동보관 한 후 항균실험에 사용하였다. JBTP01와 JBTP02는 증류수로 제조하였으나 후자는 대황을 전탕 종료 후 30분을 침지시켰으며, JBTP03는 70% 에탄올을 용매로, JBTP04는 메탄올을 용매로 사용하여 제조하였다.

3. 사용균주 및 배지

항균활성 측정에 사용한 균주는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), 그람 음성균인 *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), 효모류인 *Candida albicans* (ATCC 10231)와 곰팡이균인 *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)로 한국중균협회 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받아 사용하였다. 균주 배양은 표(Table 1)에 제시된 조건으로 진행하였다.

Table 1. Culture condition of microorganisms for antimicrobial activity test

Strains	Media	Temp(°C)
Gram positive bacteria <i>staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Trypicase soy agar/broth	37°C
Gram negative bacteria <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739)	Nutrient agar/broth	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Trypicase soy agar/broth	37°C
Yeast <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	YM agar/broth	25°C
Fungi <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Potato dextrose agar/broth	25°C

4. 항균활성(Clear zone) 측정

한약재 추출물의 항균력 측정은 disk method를 이용하였다. 5가지 균주를 액체배지에 접종한 후 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*는 37°C에서 *C. albicans*, *A. brasiliensis*는 25°C에서 배양 후 각각 고체배지에 균일하게 도말하였다. 멸균된 paper disc (Advantec, 8mm)를 농도를 달리한 한약재 추출용액에 침지하여 포화시킨 후 건조하여 고체배지 위에 일정한 간격으로 놓고 배양시킨 후 disc 주위의 clear zone의 직경을 측정하였다. 추출물 용해용매인 물, 70% EtOH, 의 영향을 확인하기 위해 용해용매를 Negative control로 실험하였다.

한약재 추출물의 항균활성 정도를 비교하기 위한 대조군으로는 천연보존제로 상용화되어 유통되는 3개 제품 및 화학 합성 보존제인 methylparaben(Sigma, USA)을 구입하여 사용하였다.

결과

1. 한약재 추출물의 항균활성 탐색

선별된 한약재를 물, 70% 에탄올, 메탄올을 용매로 추출하여 총 4가지 천연보존제 후보 추출물을 제조하여 처방의 천연보존제로서의 가능성 확인을 위해 paper disc법을 이용하여 세균, 진균에 대한 항균 활성을 탐색하였다. 추출물의 항균활성 측정은 표(Table 1)에 제시된 5가지 균주를 사용하여 진행되었으며 결과는 표(Table 2)에 제시된바와 같다. 항균활성 측정결과 물 추출물인 JBTP01는 *E. coli*에 항균활성을 보였으며, *P. aeruginosa*에 대해서도 약하지만 활성 반응이 나타났다. JBTP02 역시

*S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 약한 항균활성 반응이 나타났다. 그러나 물 추출물인 JBTP01과 JBTP02는 나머지 균주들에 대해서 항균활성 반응이 없었다. 반면, 70% 에탄올 추출물인 JBTP03과 메탄올 추출물인 JBTP04는 모든 균주에서 항균활성 반응이 나타났다. 특히 JBTP04는 *E. coli*에 강한 항균활성을 보였으며, JBTP03은 *E. coli* 뿐만 아니라 진균인 *C. albicans*에도 명확한 항균활성을 보여주었다. JBTP03과 JBTP04 둘 다 5개 균주에 대해 항균활성을 지녔으나, JBTP04가 진균인 *C. albicans*에 대한 활성이 약하게 나타나 JBTP03이 보다 넓은 항균스펙트럼이 있음을 확인하였다.

2. 상용제품과 항균활성 비교

4가지 천연보존제 후보추출물 중 항균활성이 뚜렷이 나타나는 JBTP03, JBTP04와 상용되는 제품들과의 항균활성 비교를 통해 후보추출물들의 천연보존제로서의 가능성을 알아보려고 하였다. JBTP03, JBTP04의 대조군으로는 합성화학보존제인 metylparaben 및 천연방부제로 시판되는 3개 제품을 사용하였다. 또한, 추출물 용해용매의 영향을 확인하기 위해 항균활성 실험에 사용된 동일한 양의 물과 70% 에탄올을 negative control로 비교 분석하였다. 합성화학보존제인 metylparaben은 *E. coli*와 진균인 *C. albicans*, *A. brasiliensis*에 강한 항균활성을 보였다. 천연방부제로 유통되는 시판 제품 3개는 권장사용량을 기준으로 항균활성을 비교했을 시 나머지 4개 균주에 비해 *E. coli*에 상대적으로 강한 항균활성을 나타냈다. 시판 사용제품과 JBTP03, JBTP04의 항균활성 반응을 비교했을 시, 유사한 수준의 항균반응이 나타나는 것을 확인하였다. JBTP03은 시판제품보다 *C. albicans* 균주에 상대적으로 높은 항균반응을 나타냈다(Table 2). Paper disc 실험 중 용해용매에 의한 영향을 알아보기 위해 물, 70% 에탄올을 실험에 사용한 동일한 양을 disc에 침지시켜 확인한 결과 용매 자체에 따른 영향은 없음을 확인하였다.

Table 2. Comparison of antibacterial activities of candidates with other natural preservatives against micro-organisms

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
JBTP01	-*	+	±	-	-
JBTP02	±	-	±	-	-
JBTP03	+	++	+	++	+
JBTP04	+	+++	+	±	+
상용제품 A	+	++	+	+	+
상용제품 B	+	++	+	+	+
상용제품 C	+	+++	++	+	+
Metylparaben	+	+++	++	+++	+++
H ₂ O	-	-	-	-	-
70% EtOH	-	-	-	-	-

*Antibacterial activity(Size of clear zone) - : none detected, ± : slightly, + : under 10mm, ++ : under 12mm, +++ : > 12mm.

고찰 및 결론

기존의 한약재를 이용한 항균활성 연구는 단일 약제 혹은 단일 추출물을 이용한 것이 대부분이었으나, 최근 단일 추출의 단점을 보완하고자 복합 추출물을 이용하는 연구들이 보고되고 있다. 또한 항균활성 추출물에 대한 특허를 조사해 보면 단일 추출물을 이용한 것 보다 복합추출물을 이용한 비율이 더 높다. 이는 특정 균에 강한 억제력을 보여주기 보단, 다양한 항균스펙트럼이 요구되는 천연물보존제에 있어서 단일 추출물보다 복합 추출물이 보다 적합하다는 것을 의미한다. 현재 발표된 연구나 특허에 등록된 복합추출물들의 경우 대부분 단일추출물에 대한 기존의 학술적 결과들을 활용하여 복합물의 형태로 응용한 것이다. 본 연구에서는 단일 추출물을 이용하는 것이 아닌 기존에 존재하는 한방처방 중 항균효과가 뚜렷한 것을 선택하여 그 구성을 응용한 것으로 기존 복합추출물과의 차이를 두고자 하였다.

4가지 후보추출물 중 물 추출물인 JBTP01과 JBTP02의 경우 에탄올, 메탄올 추출물에 비해 항균효과가 낮았는데 이는 에탄올 추출물이 물 추출물에 비해 항균효과가 더 높았다고 보고된 기존 연구결과와 일치하였다¹⁷⁻¹⁹⁾. 황금의 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균활성이 보고된 바 있으나 본 연구에서는 JBTP02에서만 약한 항균활성이 나타났다¹⁸⁾. 이는 추출물의 농도와 추출방법에 따른 차이가 나타난 것으로 여겨진다. JBTP03과 JBTP04는 물 추출물에 비해 상대적으로 높은 항균활성을 나타냈다. 또한, MeOH 추출물인 JBTP04의 경우 용해용매를 메탄올을 사용하는 것보다 70% 에탄올을 사용하는 것이 5가지 균주에 대해 상대적으로 더 높은 항균활성 반응을 보여주었다(data not shown). 이는 메탄올보다 70% 에탄올에 더 다양한 항균활성 물질이 추출된다는 것을 보여주고 있다. 시판되는 천연방부제 3개 품목과의 항균활성 비교를 통해 4개의 후보추출물 중 상용제품과 유사한 항균 스펙트럼을 보이며 새로운 천연보존제로서의 가능성을 보이는 것이 있는지 알아보려고 하였다. 그 결과 JBTP03과 JBTP04가 상용제품과 유사한 항균 스펙트럼을 보였으며, JBTP03은 진균인 *C. albicans*에 대해 시판 천연방부제 3개 제품보다 항균활성이 높게 나타났다. 또한, 합성화학보존제의 항균활성 양상과도 비교하였는데, 본 연구에는 parabens 중 butyl-, propyl-paraben보다 상대적으로 항균활성은 낮으나 독성이 비교적 낮기 때문에 화장품과 식품에 널리 사용되는 methyl-paraben을 사용하였다. methylparaben의 항균활성과 비교 시, 세균인 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에 대한 항균활성은 유사한 비율을 보여주지만 진균에 대해서는 methylparaben이 높은 항균활성을 보여주었다. 이는 methylparaben이 항곰팡이제로 화장품, 식품, 의약품에 널리 사용되고 있는 이유이기도 하다.

이러한 비교실험 결과는 JBTP03과 JBTP04가 시판 제품들과 유사한 항균 스펙트럼을 보여줌으로써 새로운 천연한방보존제의 후보로 적당함을 확인해 주었다. JBTP 후보물질들의 경우 시판제품과 같이 권장 사용농도가 결정되지 않았기 때문에 본 연구 결과를 바탕으로 보다 높은 농도의 항균활성물질을 추출하고 권장 사용농도를 결정하는 지속적인 연구가 필요하며 또한 화장품에 적용하기 위하여 적은 양의 유기용매를 이용하여 추출하도록 추출법의 개량이 추가되어야 한다.

감사의 글

본 과제는 전라북도 R&D지원사업의 지원(20140311-A-005)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Kim HJ, Bae JY, Jang HN, Park SN. Comparative study on the antimicrobial activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts with various countries of origin as natural antiseptics. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 2013;41(3):358-66.
2. Cho HS et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Combined Extracts of *Galla rhois*, *Achyranthes japonica* Nakai, *Terminalia chebula* Retz and *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J. 2014;20(1):29-35.
3. Cho EM, Bae JT, Pyo HB, Lee GS. Antimicrobial Plant Extracts as an Alternative of Chemical Preservative: Preservative Efficacy of *Terminalia chebula*, *Rhus japonica* (gallut) and *Cinnamomum cassia* Extract in the Cosmetic Formular. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 2008;34(4):325-31.
4. Yang, H. G., H. J. Kim, H. S. Kim, and S. N. Park. Antioxidative and antibacterial activities of *Artemisia princeps* Pampanini extracts. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 2012;40:250-60.
5. Lee, J. Y., J. N. Lee, G. T. Lee, and K. K. Lee. Development of antimicrobial plant extracts and its application to cosmetics. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 2012;38:171-9.
6. Kim, S. Y., D. H. Won, and S. N. Park. Antibacterial activity and component analysis of *Persicaria perfoliata* extracts. Kor.J. Microbiol. Biotechnol. 2010;38:278-82.
7. Esposito E, Bortolotti F, Nastruzzi C, Menegatti E, Cortesi R. Diffusion of preservatives from topical dosage forms: a comparative study, J. Cosmet. Sci. 2003;54(3):239.
8. Steinberg D et al. The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria, J. Dentistry. 1999;27(2):101.
9. Steinberg D, Frequency of use of preservatives 2001. Cosmet. Toil. 2002;117(4):41.
10. Esposito, E, Bortolotti F, Nastruzzi C, Menegatti E, Cortesi R. Diffusion of preservatives from topical dosage forms: A comparative study. J. Cosmet. Sci. 2003;54:239-50.
11. Vilaplana J and Romaguera C, Contact dermatitis from parabens used as preservatives in eyedrops, Contact Dermatiti. 2000;43(4):248.
12. Cooper SM and Shaw S, Allergic contact dermatitis from parabens in a tar shampoo, Contact Dermatiti. 1998;39(3):140.
13. Bonnevie P. Overfolsomhed for aetylparaoxybenzoat (Mycoten), Nordisk Medicin, 1940;6:684.
14. Sarkany L. Contact dermatitis from pafaben, J. Dermatol. 1960;72(10):345.
15. Fisher AA. The paraben paradox, Cutis, 1973;12:830.
16. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic, Toxicol. Appl. Pharm. 1998;153(1):12.
17. Choi OJ, Rhee HJ, Choi KH. Antimicrobial activity of Korean wild tea extract according to the degree of fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2005;34:148-57.
18. Doh ES. Antibacterial activity of medicinal plant extracts to *S. aureus* KCCM12256 and *V. parahaemolyticus* KCCM11965. J East Asian Soc. Dietary Life. 2010;20(6):881-7.
19. Kim SJ et al. Investigation of antimicrobial activity and stability of ethanol extracts of Licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). Korean J. Food Sci. Technol. 2006;38(2):241-8.