

오배자 추출물의 *Candida albicans*에 대한 항진균 활성

고려대학교 의과대학 미생물학교실

성 인 화

= Abstract =

Antifungal Activity of the Extracts from *Galla rhois* against *Candida albicans*

Inwha Seong

Department of Microbiology, College of Medicine, Korea University,
Seoul 136-705, Republic of Korea

Hexane, dichloromethane, methanol and water extracts from *Galla rhois* were examined for antifungal activity against *Candida albicans* isolated from the patients with recurrent vaginal candidiasis. Only methanol extract showed anticandidal activity and the methanol extract was fractionated through silica gel column. Each fraction had not antifungal activity but mixture of three fractions showed antifungal activity. The results showed that the methanol extract from *Galla rhois* had antifungal activity against *Candida albicans* and could be a candidate for new antifungal agent.

Background: *Candida albicans* is a member of the normal flora of the skin, mucous membranes and gastrointestinal tract. Vaginal candidiasis remains a significant problem in women of childbearing age, majority of the cases are caused by *C. albicans* and recurrence is common in spite of topical treatment.

Objective: The purpose of this study was to develop the antifungal agent from the medicinal herbs traditionally used in Korea.

Method: In this study, the extracts from *Galla rhois* were examined for antifungal activities against *C. albicans*. *Galla rhois* was extracted with hexane, dichloromethane, methanol and water respectively and serially. Silica gel column chromatography and thin layer chromatography were used to separate the fractions with antifungal activity.

Results: Only methanol extract showed the antifungal activity against *C. albicans*.

Conclusion: Methanol extract from *Galla rhois* could be a candidate for a new antifungal agent against *C. albicans*. [*Kor J Med Mycol* 2007; 12(4): 175-179]

Key Words: *Galla rhois*, Methanol extract, Antifungal activity, *Candida albicans*

서 론

항생제는 1940년대 초기부터 널리 사용되기 시작되었지만 첫 항진균제로 1949년에 등장한 nystatin은 *Streptomyces noursei*에서 분리되었고

†별책 요청 저자: 성인화, 136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 의과대학 미생물학교실
전화: (02) 920-6167, Fax: (02) 923-3645
e-mail: inwha@korea.ac.kr

독성이 상당히 강하여 경구적으로 전신 진균증의 치료에 사용되지 못하고 피부점막에 발생하는 진균증에 사용되었다. 그 이후 polyene계 항진균제로 amphotericin, fluvastatin, trichomycin, candicidin, tolnaftate 등의 항진균제들이 개발되었고 경구 투여가 가능한 griseofulvin이 개발되었다. 근래에 와서는 새로운 항진균제로 독성이 비교적 적고 항진균력이 우수한 azole계 항진균제들로 clotrimazole, miconazole, ketoconazole, fluconazole, itraconazole

zole, voriconazole 등이 있다. Terbinafine은 독성이 비교적 적은 항진균제로 알려져 현재까지 여러 가지 진균질환 치료에 사용되고 있다.

국외에서는 식물들에서 항균, 항바이러스 및 항진균 활성을 나타내는 물질을 분리해내고자 하는 연구들이 활발하게 진행되어 왔으나 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못한 실정이다.

본 연구는 식물로부터 항진균 활성을 가지고 있는 물질을 찾아내기 위한 연구의 일환으로 우리나라에서 오랫동안 사용되어 인체에 큰 해가 없는 것으로 알려진 한약 재료 중의 하나인 오배자를 여러 가지 용매로 추출한 추출물이 항진균 활성이 있는지 특히 가임기의 여성들에게 흔하게 올 수 있는 진균질환인 재발성 질 칸디다증 환자에서 분리한 *Candida albicans*에 대하여 항진균 활성이 있는지 여부를 규명하기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료

오배자는 서울시 제기동에 있는 약령시 내 한약재상에서 구입하여 분쇄기로 분쇄하였다.

2. 추출

오배자 분말 600 g을 teflon stopper가 부착된 separatory funnel에 넣고 hexane, dichloromethane, methanol, 물의 순서로 각각 2리터의 용매를 넣어 추출하되, dichloromethane과 methanol을 넣은 것은 실온에서 24시간 방치하였고, 물 추출은 80℃에서 2시간 동안 가온하여 추출하였다. 동일하게 2차 추출한 것을 합하여 각각 여과지로 여과한 다음 rotary evaporator를 사용하여 40℃에서 가온 농축하였다.

3. 항진균 활성 검사

1) 배 지

Sabouraud's dextrose agar와 broth를 사용하였다.

2) 균 주

재발성 질 칸디다증 환자들에서 분리된 *Candida albicans* 중 10주와 *Candida albicans* 표준균주 (ATCC 10231)를 사용하였다.

3) 항진균 활성 검사

디스크 확산법을 사용하였는데 그 이유는 추출물의 희석에 사용한 용매인 hexane, dichloromethane과 methanol이 그 자체 항균성이 있어 일

Table 1. Antimicrobial Activities of the Extracts from *Galla rhois* against *C. albicans*

Microorganism	Growth Inhibition / Extract			
	Hexane	Dichloromethane	Methanol	Water
<i>C. albicans</i> -1	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -2	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -3	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -4	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -5	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -6	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -7	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -8	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -9	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> -10	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> *	-	-	+	-

*: Standard strain

반적인 방법인 tube dilution 방법이나 agar dilution 방법으로 할 수 없기 때문이었다.

최종 추출물들을 각각의 용매로 용해한 용액 (20 mg/ml)을 각각의 용매로 2배 계단 희석한 희석액 20 µl를 직경 6 mm의 여과지 (Advantec NO. 26) 디스크에 가하고 음압에서 건조시켜 용매를 제거한 디스크들을 사용하였다. 균들은 Sabouraud broth에 부유하여 37°C 배양기에 24시간 배양한 후 Saborauud's dextrose agar에 다시 배양한 다음 각 균의 집락을 하나씩 broth에 넣어 배양하고 농도를 McFarland standard # 0.5에 맞춘 균부유액 0.1 ml를 agar 표면에 도말한 다음 디스크들을 올려놓고 37도에서 24시간 방치한 후 형성된 성장억지대의 직경을 측정하였다.

4. 추출물의 분획

각 추출물들의 항진균 활성 보유여부를 검사하고 활성이 가장 높은 추출물을 Silica gel column chromatography (Merck silica gel 60)와 Thin layer chromatography (Merck glass TLC plate)를 이용하여 얻은 각 분획들의 항진균 활성 보유여부를 검사하였다.

Table 2. Antimicrobial activities of fractions from methanol extract from *Galla rhois* against *C. albicans*

Microorganism	Growth Inhibition / Fraction			
	1	2	3	1+2+3
<i>C. albicans</i> -1	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -2	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -3	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -4	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -5	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -6	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -7	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -8	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -9	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> -10	-	-	-	+
<i>C. albicans</i> *	-	-	-	+

*: Standard strain

결 과

1. 각 추출물들의 항진균 활성

각 추출물의 항진균 활성을 검사한 결과 methanol 추출물만이 *C. albicans* 10주와 표준균주에 대하여 항진균 활성을 나타내었다 (Table 1).

2. Methanol 추출물의 MIC와 분획의 항진균 활성

Methanol 추출물의 MIC를 측정한 결과 0.5 mg/ml이었다. Methanol 추출물에 동량의 물을 가하고 chloroform으로 3회 추출하여 얻은 추출물을 전개용매 (ethyl acetate : chloroform 1:1)로 시작하여 methanol의 양을 점진적으로 늘려가면서 silica gel column chromatography와 thin layer chromatography를 시행한 결과 3개의 분획들을 얻었는데 가장 양이 많고 연한 핑크색의 Rf치가 0.5인 분획 뿐 만 아니라 나머지 두 분획도 *C. albicans*에 대한 항진균 활성은 없었으며 세 분획을 혼합한 것은 항진균 효과가 있었다 (Table 2, 3).

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration of Mixed Fraction

Microorganism	Growth Inhibition / Concentration (mg/ml)			
	100	50	25	12.5
<i>C. albicans</i> -1	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -2	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -3	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -4	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -5	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -6	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -7	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -8	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -9	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> -10	+	+	-	-
<i>C. albicans</i> *	+	+	-	-

*: Standard strain

고 찰

세균감염질환을 치료하는데 사용되어온 항생제들은 다양하고 종류들이 많지만 진균들은 세균들과 많은 차이가 있어 세균처럼 진균에게만 선택 독성을 나타내는 항진균제들이 많지 않고 현재까지 개발되어 사용되고 있는 항진균제들도 대부분 한 가지 이상의 한계성을 가지고 있는데 심한 부작용, 좁은 항진균 스펙트럼, 일부조직에의 낮은 침투성, 내성 등이며 상당한 수준의 독성을 나타내므로 간 기능 검사 등 여러 가지 검사를 하면서 조심스럽게 사용되고 있다. 진균들은 사람 세포와 같이 진정핵 세포로 되어 있어 세포 수준과 분자 수준에서의 수많은 상동성이 있기 때문에 진균에 대해서만 선택 독성을 가진 항진균제의 개발이 쉽지 않다. 항진균제는 1970년대azole 계의 ketoconazole이 개발되면서 획기적인 발전을 이루었고 계속해서 clotrimazole, econazole, miconazole 등 imidazole계의 항진균제의 개발에 이어 triazole계의 fluconazole, itraconazole, terconazole, voriconazole 등의 약들이 개발되었다^{1,2}. 최근에는 allylamine계에 속하는 terbinafine이 등장하여 독성이 거의 없다고 알려져 여러 가지 진균질환의 치료에 널리 사용되고 있으나 오심, 설사, 복통, 미후각 장애, 현훈, 간 기능 장애, 백혈구 수 감소, 피부에 색소침착, 전신성 발진, 급성간염 등 여러 가지 부작용이 보고되었다³⁻⁷.

세계보건기구는 개발도상국에 살고 있는 사람의 80%가 전통의학에 의지하고 있다고 추산하였으며 그 대부분이 오래 전부터 효과가 있다고 알려진 식물들을 사용하는 것이라고 하였다⁸.

식물에서 항균 활성이 있는 물질을 추출해 내 고자 하는 연구는 전 세계적으로 오래 전부터 진행되어 왔으며 수많은 식물들이 특히 항균, 항진균 활성이 있는 물질을 생산하고 있음을 규명하였고 지금 그러한 연구는 활발하게 진행되고 있으나 국내에서는 이에 대한 연구가 활발하지 못하다^{9,10}.

오배자는 옷나무과 (Anacardiaceae)에 속하는 붉나무에 속진딧물과에 속하는 자충의 오배자진딧물 (*Melaphis chinensis* Bell)이 상처를 주어 생긴 벌레집으로 붉나무의 방어 수단으로 생긴 것으로 보여지며 우리나라 각지에 분포한다. 벌레의 집인 오배자의 성분은 50~70%의 탄닌과 약간의 몰식자산, 지방, 수지 등이다. 이와 안 등은 오배자를 실온에서 48시간 4회 추출한 물 추출물이 *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*같은 세균에 항균활성은 있으나 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Monascus anka* 같은 진균에 대한 항진균 활성이 없음이 보고하였다^{11,12}. 본 연구에서 80℃에 2시간 추출한 물 추출물도 항진균 활성이 없었고 오직 메타놀 추출물만이 캔디다에 대하여 항진균 활성이 있었다.

결 론

전통한약재 중 하나인 오배자 추출물의 항진균 활성 유무를 규명하기 위한 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Hexane, dichloromethane, methanol 및 물 추출물 중 methanol 추출물만이 *C. albicans*에 대하여 항진균 활성을 나타내었다.
2. Methanol 추출물의 *C. albicans*에 대한 MIC는 50 mg/ml이었다.
3. Methanol 추출물을 silica gel chromatography thin layer chromatography를 통하여 얻은 3분획들은 각각 *C. albicans*에 대하여 항진균 활성이 없었으나 3가지 분획들을 혼합하였을 때는 항진균 활성이 있었다.
4. 오배자의 methanol 추출물은 *C. albicans*에 의한 감염질환을 치료할 수 있는 새로운 항진균제의 candidate로서 개발할 가치가 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Smith EB. History of antifungals. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 776-778
2. Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C, Natarajan-Ame. Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56, suppl. S1, i139-i148
3. Gupta AK, Sibbald RG, Knowels SR, et al Terbinafine therapy may be associated with the development of psoriasis de novo or its exacerbation; four case reports and a review of drug-induced psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 858-862
4. Wach F, Stolz W, Hein R, et al. Severe erythema anulare centrifugum-like psoriatic drug eruption induced by terbinafine. *Arch Dermatol* 1995; 131: 960-961
5. Gupta AK, Kopstein JB, Shear NH. Hypersensitivity reaction to terbinafine. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36: 1018-1019
6. Duoin N, Gorin L, Djien V, et al. Acute generalized erythematous pustulosis induced by terbinafine. *Arch Dermatol.* 1996; 132: 123-1254
7. Bennet ML, Jorizzo JL, White WL. General pustular eruptions associated with oral terbinafine. *Int J Dermatol* 1999; 38: 596-600
8. Vivas S, Rodriguez M, Palacid MA, et al. Acute hepatitis associated with terbinafine. *Gastroenterol Hepatol.* 1997; 20: 456-458
9. Cox PA. The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations, pp25-41 *In: G.T. Prance. Ethnobotany and the search for new drugs.* Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185), 1994
10. Grayer RJ, Harborne JB. Review article No.92. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem* 1994; 37: 19-42
11. 이만중, 김관필, 김성호, 정낙현, 임무현. 오배자와 포도 껍질 추출물의 항균 활성에 관한 연구. *한국식품영양학회지* 1997; 10: 174-179
12. 안봉진. 오배자와 적포도과피 폴리페놀 분획물의 항균성 및 Glucosyltransferase 저해효과. *농산물저장유통학회지* 2001; 8: 217-223