Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Anti-bacterial Activity and Standardization on
Hwangryunhaedok-tangDae-Yeon Lee^{1,2}, Young-Woo Yi¹, Wan-Su Kim², Sun-Hyung Sim², Pil-Seung Kwon³, In-Hee Lee^{1,3}¹The Fore, Seoul, Korea²Forest Hospital, Seoul, Korea³Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

황련해독탕의 항균활성 및 표준화 연구

이대연^{1,2}, 이영우¹, 김완수², 심선형², 권필승³, 이인희^{1,3}¹(주)더 포레, ²포레스트 요양병원, ³원광보건대학교 임상병리과

ARTICLE INFO

Received April 26, 2019
Revised 1st May 17, 2019
Revised 2nd May 29, 2019
Accepted May 30, 2019

Key words

Antibacterial activity
Disc diffusion
HPLC
Hwangryunhaedok-tang
Minimum inhibition concentrations

ABSTRACT

Hwangryunhaedok-tang (HT) is prescribed in oriental medicine to treat inflammation-related diseases. This study examined the anti-bacterial effect to select the index components of Traditional Chinese Medicine (TCM) HT. The disc diffusion method and minimum inhibition concentrations (MIC) tests were conducted to measure the antibacterial activity of HT. The strains were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* 23724. Berberine and geniposide were selected as the index components of HT and were analyzed quantitatively by high-performance liquid chromatography (HPLC). As a result, the inhibition ring was formed at 11.7 ± 1.3 mm and 8.7 ± 0.7 mm at HT 20 mg and 10 mg on *S. aureus* ATCC 25923, respectively; and 8.0 ± 0.0 mm at HT 20 mg on *E. coli* ATCC 23724. The MIC were 31.25 mg/mL in *S. aureus* ATCC 25923 and 125.0 mg/mL in *E. coli* ATCC 23724. In quantitative analysis for standardization, HT contained 16.55 mg/g of berberine and 81.85 mg/g of geniposide. Overall, when antibiotics are developed using natural products, they may reduce the side effects and inhibit resistant bacteria. If research on HT continuously proceeds, positive developments are expected to be made in oriental medicine as well as in various other industries.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

세균에 의한 감염질환의 치료를 위해 화학적인 항생제를 사용한다. 세균들은 다양한 경로를 통해 항생제와 접하는 기회가 많아지게 되어 내성을 가지게 된다[1-3]. 다양하게 발생하는 폐수나 가정에서의 하수에 포함된 항생제는 분해되지 않은 상태에서 자연계로 배출되면서 여러가지 항생제에 다중으로 내성을 갖는 다제 내성 세균도 나타나게 되었다[4]. 정상세균 역시도 항

생제에 노출되었을 때에는 항생제 내성을 획득할 수 있다[5, 6]. 이들은 plasmid 또는 transposon 등의 이동성 유전자를 통해 다른 병원성 세균으로 내성 유전자를 전달하기도 한다[7-9]. 이렇게 구분별한 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성 세균이 나타남에 따라 감염성 질환의 치료에 어려움이 많게 되었으며 그에 대처하기 위하여 많은 시간과 비용이 요구되는 새로운 항생제들의 개발이 지속적으로 이루어지고 있다[10]. 이에 국제적으로 천연물을 이용한 항생제에 대한 연구를 지속적으로 진행해오고 있으며 이에 발맞춰 국내에서도 천연 항생물질에 대한 연구가 적극적으로 이루어지고 있다[11, 12]. 황련해독탕은 *Coptis japonica*, *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendron amurense*, *Gardenia jasminoides*의 한약재로 구성되어 있으

* Corresponding author: In-Hee Lee

The Fore, 6 Ogeum-ro 19-gil, Songpa-gu, Seoul 06541, Korea

E-mail: ih0915@hanmail.net

* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0733-990X>

며[13] 중추 신경계와 교감신경의 흥분작용 억제, 항바이러스, 항고혈압, 항알레르기 등의 생리활성이 보고되어 있다[14-17]. 황련해독탕은 한방산업에서 탕약 및 약침으로 보편적으로 사용되고 있으며 약침의 경우 자율신경 조절[18], 기능성 두통[19], 흉부 상열감[20], 만성 결막염 또는 안구건조증[21], 지루성피부염[22] 등의 효과가 있고 매선과 병행 사용할 때 두피 열감, 발적, 상열감에 효능이 있다는 것이 임상적 보고되어 있다[23]. 최근 연구동향으로 황련해독탕 약침이 iNOS 생성을 억제하여 알레르기성 비염의 치료에 효능이 있다고 하였으며[24], 조 등은 심박변이에도 영향을 미친다고 하였다[25]. 급성 족관절 염에 봉약침과 더불어 황련해독탕 약침이 효과가 있다는 임상보고도 있었다[26]. 기존 천연물에 대한 항균효능 연구를 보면 대황과 견우를 주약제로 한 대황견우산으로 기존 항생제와 병행사용하였을 때의 시너지 효능에 대한 연구가 있었으며[27], 황금, 천궁, 당귀, 작약, 지황을 주약제로 하여 *Propionibacterium acnes*에 대한 항균 효과를 확인하는 보고도 있었다[28]. 황련해독탕은 전통적으로 염증을 낮추는 효능을 가진 처방으로 알려져 있기에 항균력에 대한 확인이 필요할 것이며, 추출하는 방식에 따라 충분히 효능에 차이가 있을 수 있기에 본 연구의 주제로 선정하였다. 또한 나아가 식품, 화장품, 제약 등 여러사업에서 활용하기 위하여 유효성분 및 지표성분으로 이미 생리활성이 있다고 알려져 있고 HPLC 분석이 용이한 berberine, geniposide를 선정하여[29] 지표성분에 대한 연구도 진행하여 품질관리의 기틀을 마련하려 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 23724 균주는 tryptic soy agar (Becton Dickinson, NC, USA)에 계대 배양하여 35.5°C로 18~24시간 동안 배양하였다.

2. 황련해독탕의 조제

본 연구에서 사용한 황련, 황금, 황백, 치자의 약재(Green Pharm, Namyangju, Korea)는 자체적으로 검증 후 사용하였다. 황련, 황백, 황금, 치자를 1:1:1:1의 비율로 총 300 g의 약재를 10배수의 70% EtOH로 3시간 환류추출 하였다. 여과 후 에탄올(EtOH)의 비율을 80%, 90%로 변경하면서 정제하였다. 최종 여액은 동결건조 한 후 실험시까지 냉동보관 하였다. 동결건조기(Illshinbiobase, Yangju, Korea)는 Lyoph-Pride03 모델을

사용하였으며 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)는 N-2110 모델을 사용하였다.

3. 디스크 확산법

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 가이드라인 M07-A10에 따라 대상균주를 Mueller Hinton agar (Becton Dickinson, USA)로 계대 배양한 후 incubator (Jeio-tech, Daejeon, Korea)에서 18~24시간 동안 35.5°C에서 배양하였다. 배양된 각 균주의 집락을 얻어서 Mueller Hinton broth 2 mL에 현탁하여 1.5×10^8 cell/mL가 되는 0.5 McFarland 표준 값을 micro plate reader 625 nm로 측정 후 Mueller Hinton agar에 멸균 된 면봉으로 고르게 spreading 하였다. 실험에 사용된 황련해독탕 원료는 동결건조를 통한 원료를 멸균수에 녹여 사용하였다. 디스크 확산법 진행 시 황련해독탕의 최종 농도는 20 mg/20 μ L, 10 mg/20 μ L 였다. 황련해독탕 분말은 멸균수에 희석하여 1000 mg/mL, 500 mg/mL의 농도로 6 mm disk (Advantec, Tokyo, Japan)에 20 μ L (20 mg/10 mg)씩 분주하여 건조 시켰다. Mueller Hinton agar에 멸균된 핀셋으로 해당 disk를 올려 놓고 살짝 눌러 붙인 후 35.5 °C로 18~24시간 동안 배양하였다. 대조를 위해 oxacillin (Sigma- Aldrich, MS, USA) 1 μ g과 ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, MS, USA) 5 μ g도 동일한 방법으로 디스크를 제작하였다. 배양 후 디스크 주변의 억제환 직경(mm)을 측정하였다. 이와 같은 실험은 3회 반복 시행하였다.

4. 최소억제농도(minimum inhibition concentration, MIC)

CLSI 가이드라인 M07-A10에 따라 배양된 각 균주의 집락을 얻어서 Mueller Hinton broth 2 mL에 현탁 하여 1.5×10^8 cell/mL가 되는 0.5 McFarland 표준 값을 micro plate reader (Biotek, Vermont, USA) 625 nm로 측정한 후 대상 균주를 1.5×10^7 cell/mL로 희석한 후 사용하였다. 96 well plate에 Mueller Hinton broth를 100 μ L씩 모두 분주하였고 각각의 용액에서 두 번째 well부터 oxacillin은 128 μ g/mL부터 2 fold dilution으로 주입하였다. ciprofloxacin은 16 μ g/mL부터 2 fold dilution으로 주입하였다. 황련해독탕의 농도는 1000 mg/mL 부터 2 fold dilution으로 주입하였다. 각각의 용액을 모두 분주 후 대상 균주를 희석한 용액을 100 μ L씩 모두 분주한 후 18~24시간 동안 배양시킨 후 육안으로 억제 농도를 측정하였다.

5. 지표성분 후보물질의 분석

황련해독탕은 berberine, geniposide를 지표성분으로 선정하였다. 검액은 황련해독탕 분말 30.2 mg을 증류수 1 mL와 MeOH (Daejung Chemical, Siheung, Korea) 2 mL로 녹여 사용하였다. Berberine 표준품(Sigma-Aldrich, MS, USA)은 1.4 mg을 칭량하여 10 mL의 증류수에 녹인 후 1 mL을 채취하여 MeOH로 희석하였다. Geniposide 표준품(Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea)은 1.0 mg을 칭량하여 10 mL의 증류수에 녹인 후 1 mL을 채취하여 MeOH로 희석하였다. Berberine은 50% ACN (Honeywell, NJ, USA) 1 L + 인산이 수소칼륨(Samchun Chemicals, Pyeongtaek, Korea) 3.4 g + 라우릴황산나트륨(Samchun Chemicals, Pyeongtaek, Korea) 1.7 g을 이동상으로 하였으며 345 nm에서 검출하였다. Geniposide는 (A) 1% acetic acid (Daejung Chemical, Siheung, Korea), (B) ACN+1% acetic acid를 이동상으로 하여 (A)/(B)=95/5 (0분)→(A)/(B)=30/70 (40분)→(A)/(B)=0/100 (50분)→(A)/(B)=95/5 (55분)와 같이 기울기 용매조건으로 하였고 254 nm에서 검출하였다. 분석에 사용된 컬럼은 C₁₈ ODS (25 cm*I.D 50 µm, Agilent, CA, USA)이었고, 컬럼온도는 berberine은 40°C, geniposide는 35°C로 하였다. 각 분석조

건에서 이동상의 유속은 1 mL/min로 유지하였다. 이동상으로 사용된 Water (Honeywell, NJ, USA)는 HPLC Grade로 정량분석을 위한 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)는 LC-20A, CBM-20A, LC-20AT, SIL-20AC, CTO-20ACM, DGU-20A5R, SPD-M20A, LC-PDA 모델을 사용하였다.

결 과

1. 디스크 확산법

황련해독탕의 항균력 억제대 측정 결과 Table 1에 따라 *S.aureus* ATCC 25923 균주에서 황련해독탕 20 mg은 11.7 ± 1.3 mm의 억제대를 형성하였으며 10 mg은 8.7 ± 0.7 mm의 억제대를 보였다. 그람양성알균에 사용되는 oxacillin 1 µg의 억제환을 측정한 결과 *S.aureus* ATCC 25923 균주에서 21.3 ± 2.0 mm가 나왔다(Figure 1A). *E.coli* ATCC 23724 균주에서 황련해독탕 20 mg은 8.0 ± 0.0 mm의 억제대를 형성하였으며 10 mg에서는 억제대를 보이지 않았다. 그람음성막대균에 사용되는 ciprofloxacin 5 µg의 억제대를 측정한 결과 *E.coli* ATCC 23724 균주에서 46.0 ± 1.0 mm의 억제대가 형성되었다(Figure 1B).

2. 최소억제농도(minimum inhibition concentration, MIC) 측정 결과

황련해독탕의 최소억제농도를 알아보기 위하여 황련해독탕의 농도는 1 g/mL에서 2 fold dilution으로 계단 희석하였고, 대조군으로는 oxacillin과 ciprofloxacin을 동시에 실험 진행하였다. 황련해독탕의 MIC법 항균 실험 결과는 Table 2와 같이 *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 23724 균주에서 각각 31.25 mg/mL, 125.0 mg/mL가 측정되었다. 그람양성알균에

Table 1. Antimicrobial activity of Hwangryunhaedok-tang by disc diffusion method

Bacteria	Inhibition Zone (mm)			
	HT* 20 mg	HT* 10 mg	Oxacillin	Ciprofloxacin
<i>S.aureus</i>	11.7 ± 1.3	8.7 ± 0.7	21.3 ± 2.0	ND [†]
<i>E.coli</i>	8.0 ± 0	ND [†]	ND [†]	46.0 ± 1.0

Abbreviations: HT, Hwangryunhaedok-tang; ND, not detected.

Figure 1. Antibacterial experiments on each bacteria by disk diffusion method. (A) Antibacterial activity of Hwangryunhaedok-tang on *S. aureus* ATCC 25923. (B) Antibacterial activity of Hwangryunhaedok-tang on *E. coli* ATCC 23724. Abbreviations: Oxa, oxacillin; Cip, ciprofloxacin; HT, Hwangryunhaedok-tang; Con, control.

사용되는 oxacillin 최소억제농도를 측정한 결과 *S.aureus* ATCC 25923 균주에서 0.5 µg/mL가 형성되었고 그람음성막 대균에 사용되는 ciprofloxacin 최소억제농도를 측정한 결과 *E.coli* ATCC 23724 균주에서 0.5 µg/mL가 형성되었다.

3. 지표성분 후보물질의 정량분석

황련해독탕 중 Berberine의 함량은 16.55 mg/g이었으며 retention time (RT)은 15.727분에 동일하게 나타났다(Figure 2A). Geniposide의 함량은 81.85 mg/g이었으며 retention time (RT)은 21.991분으로 동일하게 나타났다(Figure 2B). 지표성분으로서 선정하기에 충분히 peak가 분리되었으며 적당한 크기를 나타내었다.

고 찰

항생제를 대신하여 내성세균을 극복하기 위한 연구는 지속적으로 활발히 진행되고 있으며[30, 31], 이에 따라 많은 연구자들은 항균작용을 보이면서 인체에 부작용이 적은 것으로 알려져 있는 천연물을 이용한 연구에 관심을 보이고 있다[32]. 최근 항균실험 연구 경향으로 봤을 때 주로 디스크 확산법과 최소억제농도법으로 항균력 검사를 시행하고 있다[33]. 천연물을 이용한 항균실험 연구는 해외에서도 진행되고 있는데 해외에서는 MIC 뿐만 아니라 기존 항생제들과의 시너지효과에 대한 연구

도 진행하고 있다[34]. 세균학적 조건으로 인하여 항생제가 잘 듣지 않는 *Helicobacter pylori*의 경우에도 천연물을 이용한 항생제 개발이 연구되어 지고 있다[35].

본 연구에서는 한방산업에서 다빈도로 사용되는 천연 물질인 황련해독탕을 기반으로 항균력을 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 황련해독탕의 항균효능에 대한 연구는 기존에 진행된 바 있지만[36, 37], 황련해독탕의 70% EtOH 추출물에 대한 연구는 전무하였다. 또한 황련해독탕의 생리활성은 항균 이외에도 아토피 질환에 대한 효능 보고도 있다[38]. 70% EtOH로 추출된 황련해독탕의 항균제로서의 가능성을 모니터링하고 차후 제품화를 위한 지표성분을 설정하는 데에 본 연구의 목적이 있다.

디스크 확산법 실험의 경우 *S.aureus* ATCC 25923균주는 황련해독탕 1 g/mL의 농도에서 11.7 ± 1.3 mm의 억제대를 보였고 0.5 g/mL의 농도에서 8.7 ± 0.7 mm의 억제대를 보여 *S.aureus* ATCC 25923에 대한 농도 의존적인 항균력을 확인할 수 있었다. MIC법 실험은 *S.aureus* ATCC 25923균주의 경우 황련해독탕 31.25 mg/mL 농도에서 최소억제농도가 형성되었으며 *E.coli* ATCC 23724 균주의 경우 황련해독탕 125.0 mg/mL 농도에서 최소억제농도가 형성되었다. 대조군인 ciprofloxacin는 CLSI 가이드라인의 범위에서 벗어났으나 그 오차가 크지는 않았으며 본 연구에 사용된 *E.coli* ATCC 23724는 표준균주가 아니었기 때문에 내성에서 차이가 생긴 것으로 예측된다. 황련해독탕은 *S.aureus* ATCC 25923에서의 항균력이 *E.coli* ATCC 23724보다 높게 나타나 추가적인 균주에 대한 항균 효능을 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다. 천연 항생제와 기존의 항생제를 병용 사용하여 시너지 효능을 기대하는 연구에 oxacillin과 황흑산 에탄올 추출물을 사용한 보고가 있었다. 연구에 따르면 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection (MRSA)에 oxacillin을 단독으로 투여하였을 때는 항균활성이 보이지 않았다. 그러나 황흑산 에탄올 추출물

Table 2. Antibacterial activity of Hwangryunhaedok-tang minimum inhibition concentration

Bacteria	MIC		
	HT* (mg/mL)	Oxacillin	Ciprofloxacin
<i>S.aureus</i>	31.25	0.5	1.0
<i>E.coli</i>	125.0	128.0	0.5

Abbreviations: See Table 1.

Figure 2. Quantitative analysis chromatogram of Hwangryunhaedok-tang by HPLC. (A) Chromatograms of berberine standard and Hwangryunhaedok-tang. (B) Chromatograms of geniposide standard and Hwangryunhaedok-tang. The RT of berberine and geniposide is 15.727 min, 21.991 min. The sample matched the standard product.

과 같이 병용처리 하였을 경우에는 낮은 농도에서도 유효한 항균활성이 나타났다. 또한, 황흑산 에탄올 추출물과 다른 항생제와의 병용처리에서도 단독으로 투여했을 경우와 비교하여 유효한 생장억제효과가 나타났다[39]. 이처럼 항생제의 단독 치료가 아니라 천연물과 기존의 항생제를 병용하여 치료하면 기대 이상의 효과가 나타나는 경우가 있다. 이처럼 황련해독탕에 대한 연구 중 기존 항생제들과 병용해서 치료하면 감염질환을 치료함에 있어서 몸에 부작용이 줄어들거나 내성세균극복에 대한 효능을 기대할 수도 있다. 아무리 생리활성이 뛰어나다고 하여도 품질관리를 위한 표준화가 없다면 제품화는 쉽지 않다. 이에 본 연구에서는 황련해독탕의 지표성분으로 berberine과 geniposide를 선정하여 정량분석조건을 확립하였다. Berberine은 황련의 대표적인 지표 성분으로 황련은 강한 항균 작용이 있다고 여러 연구에서 보고되었다. 황련의 대표 구성성분 중 하나인 berberine은 장내 세균과 감염에 대해 강한 항균력이 있다고 알려져 있기에[40] 황련해독탕의 유효성분이자 지표성분으로써 충분한 가치가 있다. Geniposide는 치자의 지표성분으로 일반적으로는 소염, 이뇨, 항균작용이 있다고 알려져 있다[41]. Geniposide는 HPLC 분석 시 peak의 분리도가 좋으며 농도대비 큰 peak area를 형성하여 황련해독탕의 지표성분으로 손색이 없었다. 이 같은 천연 항생제는 단일물질로 이루어진 화학적 합성물이 아닌 여러가지 유효성분들의 조합에 의해 생리활성을 보이기 때문에 부작용이 적고 세균의 내성을 억제하는 데에 효율적일 수밖에 없다. 이러한 점을 착안하여 지속적으로 연구를 진행한다면 한방산업과 더불어 여러 산업에서의 발전을 기대할 수 있을 것이다.

요 약

황련해독탕은 한방산업에서 염증관련 질환에 다빈도로 사용되는 처방이다. 본 연구의 목적은 전통적 한약인 황련해독탕의 항균활성을 확인하고 지표성분을 선정하는 것이다. 황련해독탕의 항균활성을 측정하기 위하여 디스크 확산법과 최소억제농도법을 사용하였다. 사용균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 23724였으며 대조균으로 oxacillin과 ciprofloxacin을 이용하여 황련해독탕의 항균활성을 확인하였다. 결과적으로 디스크 확산법에서는 *S.aureus* ATCC 25923에서 황련해독탕 20 mg과 10 mg은 11.7 ± 1.3 mm, 8.7 ± 0.7 mm의 억제환을 형성하였으며 *E.coli* ATCC 23724에서는 황련해독탕 20 mg이 8.0 ± 0.0 mm의 억제환을 형성하였다. 최소억제농도는 *S.aureus* ATCC 25923가 31.25

mg/mL, *E.coli* ATCC 23724에서는 125.0 mg/mL였다. 표준화를 위한 HPLC 정량분석 결과, 황련해독탕은 berberine을 16.55 mg/g 함유하고 있었으며 geniposide를 81.85 mg/g 함유하고 있었다. 천연물을 이용하여 항생제를 개발할 경우에는 내성세균을 억제하고 부작용을 줄일 수 있다는 장점이 있다. 이러한 점을 착안하여 지속적으로 연구를 진행한다면 한방산업과 더불어 여러 산업에서의 발전을 기대할 수 있을 것이다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Lee DY^{1,2}, M.D.; Yi YW¹, Researcher; Kim WS², Researcher; Sim SH², Researcher; Kwon PS³, Professor; Lee IH^{1,3}, Professor.

REFERENCES

1. Yoo YA, Kim MS, Kim KS, Park SH, Jung SK. Antimicrobial resistance and implicated genes of *E. coli* isolated from commercial and cooked foods in Seoul. *J Food Hyg Saf.* 2010;25:220-225.
2. Dixon B. Antibiotics as growth promoters: risks and alternatives. *ASM News.* 2000;66:264-265.
3. Jack AH, Robert GA, Carlos FA. Do antibiotics maintain antibiotic resistance. *Drug Discovery Today.* 2000;5:195-204. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(00\)01483-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(00)01483-5).
4. Oh HK, Park JH. Characteristic of antibiotic resistant bacteria in urban sewage and river. *J Korean Soc Environ Eng.* 2009; 31:232-239.
5. Lim SK, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Jung SH. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from healthy animals during 2010-2012. *Korean J Vet Res.* 2014;54:131-137. <http://doi.org/10.14405/kjvr.2014.54.3.131>.
6. Tedesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:741-749. <https://doi.org/10.3201/eid1805.111153>.
7. Hummel R, Tschape H, Witte W. Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. *J Basic Microbiol.* 1986;26:461-466.
8. Murry BE. Can antibiotic resistance be controlled? *N Engl J Med.* 1994;330:1229-1230. <https://doi.org/10.1056/NEJM199404283301710>.
9. Pohl P, Lintermans P. Reservoirs of resistance plasmids. *J Toxicol Clin Exp.* 1987;7:383-397.
10. 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;350:1670-1673. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07324-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07324-8).
11. Son DH, Lee SI, Chung YG. Antioxidative of medicinal plants on

- pathogenic bacteria. J Korean Soc Hygienic Sciences. 2001; 7:103-108.
12. Park UY, Chang DS, Cho HR. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J Korean Soc Food Nutr. 1992; 21:91-96.
 13. Kim BA, Park SH, Yang JC. Antioxidative and antimicrobial activities of herbal complex extract from Hwangryunhaedok-tang and essential oil of *Chamaecyparis obtusa*. Kor J Herbol. 2017;32:75-81. <http://doi.org/10.6116/kjh.2017.32.1.75>.
 14. Kong MJ, Ha NN, Lee HY, Kim YT, Rho SJ, Kim HC. Effect of Hwangryunhaedok-tang and its modified prescription on the recovery of spatial cognitive function in the brain ischemia induced by four-vessel occlusion in rats. Kor J Herbol. 2004; 19:161.
 15. Hwang YS, Shin CY, Huh Y, Ryu JH. Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. Life Sci. 2002;71:2105-2117. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01920-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01920-3).
 16. Kim SG, Poudel A, Kim YK. Development of simultaneous analysis for marker constituents in Hwangryunhaedok-tang and its application in commercial herbal formulas. J Nat Med. 2013;67:390-398. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0687-2>.
 17. Yang HJ, Weon JB, Lee BH, Ma CJ. The alteration of components in the fermented Hwangryunhaedok-tang and its neuro-protective activity. Pharmacogn Mag. 2011;7:207-219. <http://doi.org/10.4103/0973-1296.84234>.
 18. Seol H, Yook TH. Effects of Hwangryunhaedoktang herbal-acupuncture at G21(kyonjong) on the heart rate variability. J Acupunct Rse. 2004;21:37-50.
 19. Kim HK, Youn HM, Ahn CB. Clinical studies on Hwangryunhaedoktang herbal-acupuncture therapy on functional headache. J Pharmacopuncture. 2006;9:131-138. <http://doi.org/10.3831/KPI.2006.9.3.131>.
 20. Cho GI, Kim JU, Lee YJ, Rhim EK, Shin SH, Kim DW, et al. Two cases of chest heating sensation treated by Hwangryunhaedok-tang herbal-acupuncture. J Pharmacopuncture. 2003;6:127-135. <http://doi.org/10.3831/KPI.2003.6.2.127>.
 21. Lee CY, Park IB, Kim SW, Ahn CB, Song CH, Jang KJ, et al. The clinical study on chronic conjunctivitis or xerophthalmia treated with the Hwangryunhaedok-tang herbal acupuncture therapy. Korean J Acupunct. 2003;20:77-84.
 22. Hong CH. Two cases of seborrheic dermatitis treated by Hwangryunhaedok-tang pharmacopuncture therapy. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2012;25:68-75. <http://doi.org/10.6114/jkood.2012.25.2.068>.
 23. Yun JH, Kim KH, Jang SJ, Sin MS. One case treated alopecia areata with herbal acupuncture. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2001;14:105-110.
 24. Cho JY, Kim YJ, Kim EJ, Lee SD, Kim KS. The effects of Hwangryunhaedok-tang pharmacopuncture by the anti-inflammatory action of suppression of iNOS production on mice with allergic rhinitis. J Korean Acupunct Moxib Soc. 2012; 29:89-101.
 25. Cho SY, Ha SY, Jang JY, Nam SS, Kim YS. Effect of Hwangryunhaedok-tang pharacopuncture at CV17(jeonjung) for mental stress on short-term analysis of heart rate variability. J Korean Acupunct Moxib Soc. 2009;26:49-56.
 26. Kang I, Moon JY, Lim MJ, Cho JH, Lee HE. The comparison study between different interventions for treating acute ankle sprain-using dry needle, bee venom acupuncture, Hwangryunhaedoktang herbal acupuncture. J Korean Acupunct Moxib Soc. 2008;25:89-95.
 27. Park JY, Na YS, Oh GC, Lee SM, Choi BK, Lee YS, et al. A study on antibacterial activity of Daehwanggeonwoo-san (Dahwang-qianniu-san) ethanol extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Korean Med Rehabil. 2018;28:21-35. <https://doi.org/10.18325/jkmr.2018.28.2.21>.
 28. Lee IC, Kim MK. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory of mixed medicinal herb extract. Kor J Herbol. 2015;30:51-58. <https://doi.org/10.6116/kjh.2015.30.5.51>.
 29. Lee JH, Kim MJ, Lee JW, Kim MR, Lee IH, Kim EJ. Comparison of the ingredient quantities, and antioxidant and anti-inflammatory activities of Hwangryunhaedok decoction pharmacopuncture by preparation type. J Korean Acupunct Moxib Soc. 2014;31:45-55. <https://doi.org/10.13045/acupunct.2014053>.
 30. Kim KJ, Yu HH, Cha JD, Seo SJ, Choi NY, You YO. Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytother Res. 2005;19:599-604. <https://doi.org/10.1002/ptr.1660>.
 31. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. Phytomedicine. 2010;17:1057-1060. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.03.020>.
 32. Yun YI, Lee HS, Jung MJ, You SI, Song YS, Kwon DY. Antimicrobial effects of ethanol extract of Yongdamgosamhwan against *Streptococcus mutans*. Kor J Herbol. 2015 ; 30 : 55-61. <https://doi.org/10.6116/kjh.2015.30.6.55>.
 33. Hong SB, Lee CH. Antimicrobial activity of *Houttuynia cordata* ethanol extract against major clinical resistant microorganisms. Korean J Clin Lab Sci. 2015;47:140-146. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2015.47.3.140>.
 34. Lu X, Yang X, Li X, Lu Y, Ren Z, Zhao L, et al. In vitro activity of sodium new houttuynfonate alone and in combination with oxacillin or netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE. 2013;8:E68053-68560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068053>.
 35. Malliga RM, Sangeetha VS, Chang GS, Hanumantha RBR. Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some commonly known natural products: bench to bedside. Integr Med Res. 2014;3:111-118. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2014.04.001>.
 36. Kim IS, Seo JJ, Kim KG, Ha DR, Shin MK, Kim ES, et al. Antimicrobial activity of Hwangryunhaedok-tang extract against keratitis. J Int Korean Med. 2014;35:288-297.
 37. Hwang YH, Cho WK, Jang DR, Ha JH, Jung KY, Yun HI, et al. Effects of berberine and Hwangryunhaedok-Tang on oral bio-availability and pharmacokinetics of ciprofloxacin in rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:1-7. <https://doi.org/10.1155/2012/673132>.
 38. Kim BA, Kim MS, Kang BM, Byeon SH, Park IH, Park JH, et al. Inhibitory studies of Hwangryunhaedok-tang on development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. Kor J Herbol. 2008;

- 23:59-65.
39. Choi SH, Kang OH, Zhou T, Kong R, Lee SJ, Kang DH, et al. The antimicrobial activity of Hwangheuk-san and synergy effect with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Kor J Herbol. 2016;31:93-98. <https://doi.org/10.6116/kjh.2016.31.5.93>.
40. Cho JY, Kim AR, Park MH. Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. Planta Med. 2001;67:312-316. <https://doi.org/10.1055/s-2001-14322>.
41. Kim KH, Kim SM, Shin SH, Lee YJ, Baek WS. Quality monitoring of specification standard of Gardeniae Fructus in the Korean pharmacopoeia and studies HPLC standard chromatogram. Kor J Herbol. 2017;32:97-105. <http://doi.org/10.6116/kjh.2017.32.2.97>.