



(72) 발명자

권송희

경기 부천시 원미구 상동 사랑마을아파트 1615동

권이영

경기 안양시 동안구 호계1동 주공2차아파트
201-225

김규희

경기 파주시 문산읍 한진아파트 807호

특허청구의 범위

청구항 1

캐살피니아 사판(*Caesalpinia sappan*)의 추출물을 유효성분으로 하는 유해 구강미생물에 대한 항균제.

청구항 2

제 1항에 있어서 캐살피니아 사판으로부터 분리된 브라질린(brazilin)을 함유하는 유해 구강미생물에 대한 항균제.

청구항 3

캐살피니아 사판의 항균활성 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 구강청정제 및 치약 조성물.

청구항 4

캐살피니아 사판으로부터 분리된 브라질린을 함유하는 것을 특징으로 하는 구강청정제 및 치약 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 항생물질을 이용할 경우 미생물로 하여금 내성을 갖게 하거나, 설사, 구토 등의 부작용을 유발할 수 있는 단점이 있고, 또한 이러한 항생물질의 남용으로 인해 구강 내 상재균들의 생육이 저해되는 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 발명은 구강 내 유해 세균만을 효과적으로 제거하기 위해서는 인체에 무해하고, 부작용이 적으며 구강 내 유해 병원성균에만 특이적으로 작용할 수 있는 새로운 천연 항균물질의 탐색을 목적으로 한다.

배경 기술

- <2> 치과 의학상 충치와 치주염은 여러 가지 원인이 있을 수 있으나, 구강 내에 상주하는 세균의 발효작용에 의하여 치아에 부착된 음식찌꺼기의 당분이나 전분 등의 탄수화물이 분해되어 생기는 젖산이 치아 경조직의 석회를 탈각시켜 충치가 발생하고, 이어서 혐기성 병원균체들이 대량 증식하면서 치주염 균주들에 의한 독소성분 등으로 인하여 잇몸 조직이 파괴되고 결국 치아가 흔들리고 탈락되는 현상이 일어난다. 이러한 충치와 치주염을 일으키는 병원성 미생물은 여러 가지 종들이 알려져 있지만 특히 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)와 포피로모나스 진지바리스(*Porphyromonas gingivalis*)가 가장 주도적으로 충치와 치주염 발생에 주 병원체요인으로 작용한다(참조 : Liljemark, W.F., 등, Crit. Rev. Oral Bio. Med., 7:180-198, 1996).
- <3> 충치는 어린이부터 성인까지의 치과질환의 많은 부분을 차지하고 있으며, 최근 발증빈도가 더욱 높아지고 있다. 현재 대한치과 의사협회의 보고에 따르면 우리나라 아동의 90% 이상이 치아우식(dental caries)을 경험했으며, 성인들의 80% 이상이 치주염(periodontitis)을 갖고 있다고 한다.
- <4> 스트렙토코커스 뮤탄스는 균체외 혹은 균체표층에 글루코실트랜스퍼레이즈(glucosyltransferase, GTase)라는 효소를 분비하므로써 음식물내 수쿠로즈(sucrose)를 기질로 하여 글루코즈(glucose)와 프락토즈(fructose)를 생성하고, 동시에 글루코즈의 중합체인 불용성 글루칸(insoluble glucan)을 치면에 형성하게 된다. 이 글루칸에 의해 구강내 다른 미생물들이 치면에 부착하므로써 치면 세균막 즉, 치태(dental plaque)를 형성하게 된다. 이 치태내에서 스트렙토코커스 뮤탄스균을 포함한 젖산균이 증식되어 프락토스를 탄소원으로 젖산을 생성하게 되고, 부착성 글루칸에 포집, 농축되어 고농도의 산으로 치아의 구성성분인 인산칼슘층 Ca^{2+} 를 녹여 내리게 하여 치아의 외막인 법랑질(enamel)을 용해하여 충치를 유발하게 된다(참조 : Sigmund, S.S., 등, J. Periodontol., 63:322-331, 1992).
- <5> 치면세균막은 일반적으로 치면에 미생물과 미생물의 대사산물 및 타액성분 등이 부착한 것으로 양치질이나 구강청정제등으로 쉽게 제거되지 않는다. 치면세균막의 70~80% 이상은 미생물이 차지하고 있으며, 치면세균막 1 g당 평균 2천5백억개의 미생물이 존재한다.
- <6> 충치와 치주염을 억제하기 위해 사용되는 방법으로는 스포라마이신(sporamycin), 반코마이신

(vancomycin), 클로로헥시딘(chlorhexidine) 등의 항생물질을 이용한 방법, 유기 또는 무기 불소에 의한 병원성 세균의 억제 방법 등이 있다(참조 : Mellberg, JR, 등, Quintessence, 41-80, 1983).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 따라서 본 발명은 충치 및 치주질환의 원인이 되는 미생물인 스트렙토코커스 뮤턴스(*Streptococcus mutans*)와 포피로모나스 진지바리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 대해 강력한 항균활성을 나타내는 물질을 캐살피니아 사판으로부터 분리 및 정제하여 부작용 없이 식품이나 의약품으로 이용 가능한 항균활성물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<8> 또한 본 발명은 상기의 항균활성 물질을 함유하여 항균작용이 우수한 구강청정제 및 치약조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

효 과

<9> 상기와 같은 본 발명의 항균활성을 가진 물질은 저분자 물질로서 고온에서도 안정하여 어떤 온도에서도 가공처리가 가능하고 성분을 추출할 때 고온에서 추출할 수 있어 추출수율을 높이고 추출시간을 단축시킬 수 있다.

<10> 또한 본 발명의 캐살피니아 사판으로부터 분리된 브라질린은 20 µg/ml의 매우 낮은 농도에서 10분 내에 스트렙토코커스 뮤턴스균을 완전히 사멸시키는 강력한 항균활성을 나타냄으로서 사람들이 양치질하는 시간인 평균 3분 내외의 시간에 매우 효과적인 항균효과를 낼 수 있을 것으로 생각되며, 기존의 천연물로부터 분리한 성분들이 구강병원성균이 생산하는 효소의 활성을 억제하는 2차 적인 저해활성을 가지는 것에 반해 본 발명의 항균성분은 균 자체를 사멸시키는 1차 적인 저해활성을 가지는 점에서 큰 차이가 있다.

<11> 따라서 본 발명의 캐살피니아 사판으로부터 분리된 브라질린은 천연물로부터 분리된 유용한 성분으로서 부작용을 최소화하며 식품의약품 산업상 매우 우수한 발명인 것이다.

<12> 그리고 본 발명의 항균활성물질을 함유한 구강청정제 및 치약 조성물도 부작용 없이 우수한 항균활성을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<13> 본 발명은 캐살피니아 사판으로부터 분리된 브라질린을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 충치와 치주염 예방 및 치료용 항균제와 구강 위생용 조성물을 제공한다. 본 발명의 항균제 및 구강 위생용 조성물에 있어서, 브라질린은 캐살피니아 사판으로부터 추출된 것을 사용할 수 있으며, 이러한 브라질린은 구강청정제 및 치약 등의 다양한 구강 위생용 조성물에 첨가될 수 있다.

<14> 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명은 캐살피니아 사판으로부터 분리된 브라질린을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 충치와 치주염 예방 및 치료용 항균제와 구강 위생용 조성물을 제공한다. 본 발명의 항균제 및 구강 위생용 조성물에 있어서, 브라질린은 캐살피니아 사판으로부터 추출된 것을 사용할 수 있으며, 이러한 브라질린은 구강청정제 및 치약 등의 다양한 구강 위생용 조성물에 첨가될 수 있다.

<15> 또한 본 발명은 캐살피니아 사판으로부터 분리된 항균활성을 가진 물질인 조추출물 또는 브라질린을 함유하는 구강청정제에 그 특징이 있다.

<16> 또한 본 발명은 캐살피니아 사판으로부터 분리된 항균활성을 가진 물질인 조추출물 또는 브라질린을 함유하는 치약조성물에 그 특징이 있다.

<17> 캐살피니아 사판은 인도네시아, 말레이시아, 태국, 중국 등지에서 자생하는 식물이며 관절염, 열병, 산후 조리용 치료제 및 백혈세포 사멸 유도 등의 목적으로 전통적 민간 약재로 사용되어 왔다.

<18> 그러나 본 발명의 캐살피니아 사판 추출물 및 이로부터 분리된 성분인 브라질린의 항균작용에 대해서는 지금까지 알려진 바가 없으며, 특히 구강 병원성균에 대한 항균활성은 거의 알려진 바가 없다.

<19> 이하 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

<20> 캐살피니아 사판으로부터 조추출분획물 제조 및 항균물질을 분리 정제하는 과정은 도 1에 상세히 기재되어

있다.

- <21> 먼저 캐살피니아 사판으로부터 향균활성을 가지는 조추출물(crude extract)을 제조하는 방법에 대하여 설명한다.
- <22> 채취하여 건조한 캐살피니아 사판을 분쇄한 후 100% 에탄올(ethanol)과 혼합하여 추출하고 추출용매를 제거하여 에탄올 추출물을 제조한다. 이렇게 제조된 에탄올 추출물과 에틸아세테이트를 혼합하여 에틸아세테이트 용해성 추출물을 제조한다.
- <23> 상기의 과정으로 얻어진 조추출물과 에틸아세테이트 용해성 성분은 대표적인 구강병원성 균주인 스트렙토코커스 뮤탄스에 대해서 가공하지 않은 상태임에도 불구하고 그 최소저해농도(minimum inhibitory concentration)가 각각 64 $\mu\text{g/ml}$ 와 31.2 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 포피로모나스 진지발리스에 대한 최소저해농도가 각각 125 $\mu\text{g/ml}$ 와 31.2 $\mu\text{g/ml}$ 로서 높은 향균 활성을 나타낸다.
- <24> 다음으로 캐살피니아 사판으로부터 향균활성을 갖는 단일물질을 분리하는 방법을 설명한다.
- <25> 상기 에틸아세테이트로 추출한 성분을 농축하여 에틸아세테이트를 제거한 후 건조하지 않은 상태의 에틸아세테이트 용해성 성분을 각 성분의 극성차이에 따라 각 성분별로 분리한다. 이때 분리방법으로는 실리카젤 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography)법을 사용하는 것이 바람직하며, 일차적으로 전개용매로서 클로로포름, 메탄올(methanol), 물을 각각 3 : 1 : 0.1(v/v)의 비율로 혼합한 용매 및 클로로포름, 메탄올(methanol), 물을 각각 5 : 1 : 0.1(v/v)의 비율로 혼합한 용매를 이용하여 전개시킴으로서 불순물을 제거하고, 이를 다시 헥산, 에틸아세테이트를 각각 1 : 1(v/v)의 비율로 혼합한 용매를 이용하여 최종적으로 순수한 단일 향균활성 물질을 분리하였다.
- <26> 상기의 과정에 의하여 분리 및 정제된 향균활성을 가진 단일물질에 대해 ^{13}C -NMR 및 ^1H -NMR 등의 기기분석을 실시하였고, 기존에 보고된 문헌과의 비교를 통해서 캐살피니아 사판으로부터 분리 정제된 향균활성 성분을 브라질린(brazilin)으로 명명하였다.
- <27> 상기와 같이 분리 및 정제된 향균활성을 가진 단일물질은 대표적인 구강병원성 균주인 스트렙토코커스 뮤탄스와 포피로모나스 진지바리스에 대한 최소저해농도가 각각 16 $\mu\text{g/ml}$ 로 극히 낮아서 향균활성이 매우 높다.
- <28> 본 발명의 향균활성을 가진 물질의 최소저해농도값을 강력한 항생물질인 클로르헥시딘(chlorhexidine)과 비교한 결과 클로르헥시딘의 최소저해농도값은 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 브라질린의 향균활성보다 다소 높은 경향을 보였지만 항생물질의 심각한 부작용을 고려한다면, 천연 약용식물에서 분리된 브라질린의 산업적 적용이 유리할 것으로 판단된다.
- <29> 상기의 캐살피니아 사판으로부터 분리한 향균활성물질을 이용한 구강청정제 및 치약조성물에 대하여 설명한다.
- <30> 본 발명의 구강청정제는 통상적인 구강청정제의 성분으로 사용되는 연마제, 약효제로서의 불소화합물, 결합제, 기포제, 향료, 감미제, 완충제, 알콜성분 및 기타 성분들을 전부 또는 일부 함유한다.
- <31> 상기와 같은 통상적인 구강청정제에 향균활성을 가진 향균제로 본 발명의 캐살피니아 사판으로부터 추출한 조추출물 및 브라질린을 첨가하여 구강청정제를 제조한다.
- <32> 본 발명의 치약조성물은 통상적인 치약조성물의 성분으로 사용되는 연마제, 약효제로서의 불소화합물, 결합제, 기포제, 향료, 감미제, 완충제 및 기타 성분들을 전부 또는 일부 함유한다.
- <33> 상기와 같은 통상적인 치약조성물에 향균활성을 가진 향균제로 본 발명의 캐살피니아 사판으로부터 추출한 조추출물 및 브라질린을 첨가하여 치약조성물을 제조한다.
- <34> 이하 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예 및 실험예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <35> 또한 하기 실시예 및 실험예들에서 특별히 부피 % 임을 명시하지 않은 % 는 중량 %를 나타낸다.
- <36> **(실시예 1) 캐살피니아 사판 조추출물 제조**
- <37> 채취하여 건조한 캐살피니아 사판을 믹서로 분쇄하였다. 분쇄한 캐살피니아 사판 시료 100 g을 400 ml의 100% 에탄올을 추출용매로 사용하여 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(Whatman) 여과지 제2번을 이용하여 여과하고, 여과된 추출액을 진공회전농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 동결건조하여 물성분을 제거하여 조추출물을

얻었다.

<38> (실험예 1) 추출물의 열안정성

<39> 열안정성측정은 상기 실시예 1에서 제조된 에탄올 조추출물을 각각 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C 및 100 °C에서 30분 동안, 121에서 15분 동안 각각 열처리한 후 추출물액을 각각의 웰에 0.1 씩 점적하여 상온에서 1시간 이상 확산시킨 다음 37 °C에서 16시간 이상 배양하는 웰확산분석(well diffusion assay)법을 이용하여 스트렙토코커스 뮤턴스에 대한 항균활성을 측정하여 항균활성의 감소여부를 관찰하였다. 항균활성의 감소여부를 관찰한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

<40> 처리시간(분)			30			15
처리온도(°C)	60	70	80	90	100	121
플레이트의 저지환의 직경(mm)	14	13	14	14	13	14

<41> 상기 표 1의 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 60 °C에서 121 °C까지 열처리를 한 후 항균활성의 변화를 관찰한 결과 열처리 후에도 항균활성의 감소가 거의 일어나지 않았다. 따라서 본 발명의 항균활성성분은 고온에서도 안정하다는 것을 확인할 수 있었다.

<42> (실험예 2) 생균수측정(Viable cell count)법에 의한 조추출물의 살균활성

<43> 상기 실시예 1에서 제조된 에탄올 조추출물을 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 0.003%, 0.006%, 0.012% 및 0.025% 농도의 시료로 제조하였다. 제조한 시료를 37 °C에서 각각 1분, 2분, 5분, 10분 동안 반응시킨 후 순차적으로 10배씩 희석하여 유동플레이트법(pour plate method)을 실시하였고, 이를 37 °C의 인큐베이터에서 배양하여 스트렙토코커스 뮤턴스의 생균수를 측정하였다. 그 결과를 도 2의 그래프에 도시하였다.

<44> 도 2의 그래프에서 ◆는 대조구인 디메틸설폭사이드, ■는 0.003% 농도의 시료, ▲는 0.006% 농도의 시료, □는 0.012% 농도의 시료, ○는 0.025% 농도의 시료를 나타낸다.

<45> 도 2의 그래프에서 알 수 있는 바와 같이, 생균수측정법에 의해 생균수를 측정한 결과 추출물의 농도가 0.025%(250 µg/ml)일 때 10분 내에 균이 거의 사멸하는 것으로 나타났다. 10분 내에 균들이 거의 사멸한다는 것은 상업화의 높은 가능성을 암시한다고 볼 수 있는데, 사람들이 평균 3분 내외로 양치질을 한다고 가정했을 때 이 과정 중에 균들을 충분히 사멸시킬 수 있다.

<46> (실시예 2) 추출물의 용매별 분획물 제조

<47> 채취하여 건조한 캐살피니아 사관을 믹서로 분쇄하였다. 분쇄한 캐살피니아 사관 시료 100 g을 100% 에탄올 400 ml와 혼합하여 상온에서 이틀동안 반복추출하였다. 추출된 시료는 와트만여과지 제2번을 이용하여 여과하르써 조추출물을 얻었다. 이렇게 얻어진 에탄올 조추출물을 분획여두에서 각각 에틸아세테이트, 부탄올(butanol)과 1 : 1의 비율로 혼합하여 각 용매에 대한 용해성성분을 추출하고, 마지막으로 물 용해성성분을 얻었다.

<48> 각 용매로 2회 반복하여 추출한 후 각 용매층만을 분리한 후 용매성분을 제거하여 에틸아세테이트분획, 부탄올분획, 물분획을 제조하였다.

<49> (실험예 3) 용매분획에 따른 항균활성 측정

<50> 실시예 2에서 제조된 에틸아세테이트분획, 부탄올분획, 물분획의 3가지 분획을 디메틸설폭사이드에 용해시켜, 준비된 시험관들에 혈액평판배지를 각각 1 ml씩 넣고, 처음 시험관에만 실시예 1의 에탄올 조추출물 및 실시예 2의 에틸아세테이트분획, 부탄올분획, 물분획을 2% 농도로 각각 1 ml씩 넣은 다음 순차적으로 2배씩 희석하였다.

<51> 이 희석액에 스트렙토코커스 뮤턴스와 포피로모나스 진지바리스 100 ml를 2×10^5 CFU/ml가 되도록 각각의 시험관에 첨가하고 37에서 16시간 이상 배양한 후 탁도를 나타내지 않는 최소저해농도를 측정하였다.

<52> 상기의 방법으로 측정한 조추출물과 각 분획별 최소저해농도의 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

<53>

		최소저해농도(μg/ml)		
	에탄올추출물	에틸아세테이트분획	부탄올분획	물분획
스트렙토코커스 뮤탄스	62.5	31.3	500	0
포피로모나스 진지바리스	125	31.3	500	0

<54>

상기 표 2의 결과에서, 3가지 분획중 에틸아세테이트분획이 강한 항균활성을 나타냈고, 부탄올 분획은 약한 항균활성을 나타냈으며, 물분획은 항균활성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 스트렙토코커스 뮤탄스와 포피로모나스 진지바리스의 두 균주에 대해서 모두 공통적으로 에틸아세테이트분획의 항균활성이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

<55>

(실시예 3) 항균활성 단일 물질 비에프의 분리

<56>

상기 실시예 2에서 제조된 에틸아세테이트 용해성 성분을 실리카겔을 6×15 cm로 충전한 칼럼에서 클로로포름, 메탄올, 물을 각각 3 : 1 : 0.1(v/v)의 비율로 혼합한 용매시스템을 사용하여 총 7개의 분획으로 나누고, 이 중에서 항균활성 물질을 포함한 네 개의 분획물을 다시 세파덱스 컬럼(sephadex LH20)을 이용하여 50% 메탄올로 용출시켜 분리한 후, 클로로포름, 메탄올, 물을 각각 5 : 1 : 0.1(v/v)의 비율로 혼합한 용매를 이용한 분리하였다. 이후 hexan, 에틸아세테이트를 각각 1 : 1(v/v)의 비율로 혼합한 용매를 이용하여 최종적으로 순수한 단일 항균활성 물질 브라질린(brazilin)을 분리하였다(도 1).

<57>

상기의 방법으로 정제된 항균활성을 가진 비에프의 ¹³C-NMR 스펙트럼 및 ¹H-NMR 스펙트럼 등을 500 MHz(용매 : CDCl₃)에서 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

<58>

Position	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	7.20, 1H, d, J=8.4 J=8.4	131.9
1a		115.5
2	6.50, 1H, dd, J=8.4, 2.4	109.6
3		155.4
4	6.29, 1H, d, J=2.4	103.9
4a		157.5
6	3.72, 1H, d, J=11.1 3.95, 1H, d, J=11.1	70.7
6a		77.7
7	2.83, 1H, d, J=15.6 3.03, 1H, d, J=15.6	42.8
7a		131.4
8	6.64, 1H, s	112.6
9		145.0
10		144.7
11	6.76, 1H, s	112.2
11a		137.3
12	4.42, 1H, s	51.0

<59>

<60>

(실�험예 4) 브라질린(brazilin)의 항균활성 측정

<61>

상기 실시예 3에서 제조된 브라질린을 디메틸설폭사이드에 용해시켜, 준비된 시험관들에 혈액평판배지를 각각 1 ml씩 넣고, 처음 시험관에만 브라질린을 2% 농도로 각각 1 ml씩 넣은 다음 순차적으로 2배씩 희석하였다.

<62>

이 희석액에 스트렙토코커스 뮤탄스와 포피로모나스 진지바리스 100 ml를 2×10^5 CFU/ml가 되도록 각각의 시험

관에 첨가하고 37 °C에서 16시간 이상 배양한 후 탁도를 나타내지 않는 최소저해농도를 측정하였다.

<63> 상기의 방법으로 측정한 브라질린의 최소저해농도의 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

<64>	최소저해농도($\mu\text{g/ml}$)
스트렙토코커스 뮤탄스	16
포피로모나스 진지바리스	16

<65> 상기 표 4의 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 정제된 브라질린은 대표적인 구강병원성균인 스트렙토코커스 뮤탄스와 포피로모나스 진지바리스에 대해서 최소저해농도 값이 각각 16 $\mu\text{g/ml}$ 로 매우 강력한 항균활성을 나타내었다.

<66> **(실험예 5) 생균수측정(viable cell count)법에 의한 브라질린의 살균활성**

<67> 실시예 3에서 제조된 브라질린을 이용하여 대표적인 구강 병원성균인 스트렙토코커스 뮤탄스에 대한 항균활성을 측정하였다. 즉, 브라질린을 디메틸설폭사이드에 용해시켜 0.0005%, 0.001%, 0.0015% 및 0.002% 농도의 시료로 제조하고 제조된 시료를 스트렙토코커스 뮤탄스 균액과 혼합하여 37 °C에서 각각 1분, 2분, 5분, 10분 동안 반응시킨 후 순차적으로 10배씩 희석하여 유동플레이트법(pour plate method)을 실시하였고, 이를 37 °C의 인큐베이터에서 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과를 도 3의 그래프에 도시하였다.

<68> 도 3의 그래프에서 ◆는 대조구인 디메틸설폭사이드, ■는 0.0005% 농도의 시료, ▲는 0.001% 농도의 시료, □는 0.0015% 농도의 시료, ○는 0.002% 농도의 시료를 나타낸다.

<69> 도 3의 그래프에서 알 수 있는 바와 같이, 생균수측정법에 의해 생균수를 측정한 결과 추출물의 농도가 0.002%(20 $\mu\text{g/ml}$)일 때 10분 내에 균이 거의 사멸하는 것으로 나타났다. 따라서 매우 낮은 농도에서 효과적인 저해를 보인다는 점을 고려할 때 본 발명의 브라질린은 구강병원성균에 대한 항균활성이 매우 우수함을 알 수 있다. 이는 거의 살균의 효과라고 보여지며, 일반적으로 양치질을 할 때 거의 3분 내외로 양치질을 끝내는 것을 생각한다면, 본 발명의 비에프에 의한 10분내 균의 사멸 효과는 실제 산업적 적용에 있어서 우수한 효과를 낼 수 있을 것으로 기대된다.

<70> **(실시예 4-7) 추출물을 함유하는 구강 청정제의 제조**

<71> 상기 실시예 1에서 얻어진 에탄올 조추출물을 이용하여 하기 표 5에 기재된 실시예 4-7의 조성을 지니는 구강청정제를 제조하였다.

표 5

<72>

실시예 4	실시예 5	실시예 6	실시예 7
조추출물 5.0%	조추출물 1.0%	조추출물 0.1%	조추출물 0.01%
불화나트륨 0.02%	불화나트륨 0.02%	불화나트륨 0.02%	불화나트륨 0.02%
에탄올 6.6%	에탄올 6.6%	에탄올 6.6%	에탄올 6.6%
글리세린 6.0%	글리세린 6.0%	글리세린 6.0%	글리세린 6.0%
l-멘톨 0.005%	l-멘톨 0.005%	l-멘톨 0.005%	l-멘톨 0.005%
삭카린나트륨 적량	삭카린나트륨 적량	삭카린나트륨 적량	삭카린나트륨 적량
구연산 적량	구연산 적량	구연산 적량	구연산 적량
색소 적량	색소 적량	색소 적량	색소 적량
페퍼민트에센스 적량	페퍼민트에센스 적량	페퍼민트에센스 적량	페퍼민트에센스 적량
스피아민트에센스 적량	스피아민트에센스 적량	스피아민트에센스 적량	스피아민트에센스 적량

<73> **(실험예 6) 조추출물을 함유한 구강청정제의 항충치 활성 측정**

<74> 실시예 4-7에서 제조한 조추출물을 함유한 구강청정제가 각각의 농도별로 4 ml씩 함유된 테스트 튜브에 구강병원성균을 함유하는 1 ml액을 첨가하고 튜브를 흔들어주면서 배양하고 시간의 경과에 따라 생균수를 측정하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

<75>

		생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)	생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)
구강병원성균	시험액	0시간	24시간
스트렙토코커스	실시예 4	3.2×10^5	<1
뮤탄스	실시예 5	3.2×10^5	<1
	실시예 6	3.2×10^5	<1
	실시예 7	3.2×10^5	1.0×10^2
	조추출물을 뺀 구강청정제	3.2×10^5	2.7×10^4
포피로모나스	실시예 4	3.8×10^5	<1
진지바리스	실시예 5	3.8×10^5	<1
	실시예 6	3.8×10^5	<1
	실시예 7	3.8×10^5	1.5×10^2
	조추출물을 뺀 구강청정제	3.8×10^5	1.8×10^4

<76>

(실시예 8-11) 추출물을 함유하는 치약의 제조

<77>

상기 실시예 1에서 얻어진 조추출물을 이용하여 하기 표 7에 기재된 실시예 8-11의 조성을 지니는 치약을 제조하였다.

표 7

<78>

실시예 8	실시예 9	실시예 10	실시예 11
조추출물 5.0%	조추출물 1.0%	조추출물 0.1%	조추출물 0.01%
솔비톨액 19.2%	솔비톨액 19.2%	솔비톨액 19.2%	솔비톨액 19.2%
글리세린 22.0%	글리세린 22.0%	글리세린 22.0%	글리세린 22.0%
프로필렌글리콜 2.0%	프로필렌글리콜 2.0%	프로필렌글리콜 2.0%	프로필렌글리콜 2.0%
자당지방산에스테르 1.7%	자당지방산에스테르 1.7%	자당지방산에스테르 1.7%	자당지방산에스테르 1.7%
알킬황산나트륨 1.0%	알킬황산나트륨 1.0%	알킬황산나트륨 1.0%	알킬황산나트륨 1.0%
염화나트륨 1.0%	염화나트륨 1.0%	염화나트륨 1.0%	염화나트륨 1.0%
향료 1.1%	향료 1.1%	향료 1.1%	향료 1.1%
카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%	카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%	카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%	카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%
정제수 잔부	정제수 잔부	정제수 잔부	정제수 잔부

<79>

(실험예 7) 조추출물을 함유한 치약의 항충치 활성 측정

<80>

실시예 8-11에서 제조한 조추출물을 함유한 치약을 각각의 농도별로 4 ml씩 함유된 테스트 튜브에 구강병원성균을 함유하는 1 ml액을 첨가하고 튜브를 흔들어주면서 배양하고 시간의 경과에 따라 생균수를 측정하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

<81>

		생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)	생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)
구강병원성균	시험액	0시간	24시간
스트렙토코커스	실시예 8	3.2×10^5	<1
뮤탄스	실시예 9	3.2×10^5	<1
	실시예 10	3.2×10^5	<1

	실시예 11	3.2×10^5	<1
	조추출물을 뺀 치약	3.2×10^5	2.1×10^4
포피로모나스	실시예 8	3.8×10^5	<1
진지바리스	실시예 9	3.8×10^5	<1
	실시예 10	3.8×10^5	<1
	실시예 11	3.8×10^5	<1
	조추출물을 뺀 치약	3.8×10^5	5.4×10^4

<82>

<83> (실시예 12-15) 브라질린을 함유하는 구강 청정제의 제조

<84> 상기 실시예 3에서 얻어진 브라질린을 이용하여 하기 표 9에 기재된 실시예 12-15의 조성을 지니는 구강청정제를 제조하였다.

표 9

<85>

실시예 12	실시예 13	실시예 14	실시예 15
브라질린 1.0%	브라질린 0.1%	브라질린 0.01%	브라질린 0.001%
불화나트륨 0.02%	불화나트륨 0.02%	불화나트륨 0.02%	불화나트륨 0.02%
에탄올 6.6%	에탄올 6.6%	에탄올 6.6%	에탄올 6.6%
글리세린 6.0%	글리세린 6.0%	글리세린 6.0%	글리세린 6.0%
l-멘톨 0.005%	l-멘톨 0.005%	l-멘톨 0.005%	l-멘톨 0.005%
삭카린나트륨 적량	삭카린나트륨 적량	삭카린나트륨 적량	삭카린나트륨 적량
구연산 적량	구연산 적량	구연산 적량	구연산 적량
색소 적량	색소 적량	색소 적량	색소 적량
페퍼민트에센스 적량	페퍼민트에센스 적량	페퍼민트에센스 적량	페퍼민트에센스 적량
스피아민트에센스 적량	스피아민트에센스 적량	스피아민트에센스 적량	스피아민트에센스 적량

<86>

<87> (실험예 8) 브라질린을 함유한 구강청정제의 항충치 활성 측정

<88> 실시예 12-15에서 제조한 브라질린을 함유한 구강청정제가 각각의 농도별로 4 ml씩 함유된 테스트 튜브에 구강병원성균을 함유하는 1 ml액을 첨가하고 튜브를 흔들어주면서 배양하고 시간의 경과에 따라 생균수를 측정하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

<89>

		생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)	생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)
구강병원성균	시험액	0시간	24시간
스트렙토코커스	실시예 12	3.2×10^5	<1
뮤탄스	실시예 13	3.2×10^5	<1
	실시예 14	3.2×10^5	<1
	실시예 15	3.2×10^5	2.3×10^2
	브라질린을 뺀 구강청정제	3.2×10^5	1.9×10^4
포피로모나스	실시예 12	3.8×10^5	<1
진지바리스	실시예 13	3.8×10^5	<1
	실시예 14	3.8×10^5	<1

	실시예 15	3.8×10^5	4.4×10^2
	브라질린을 뺀 구강청정제	3.8×10^5	2.7×10^4

(실시예 16-19) 브라질린을 함유하는 치약의 제조

상기 실시예 3에서 얻어진 브라질린을 이용하여 하기 표 11에 기재된 실시예 16-19의 조성을 지니는 치약을 제조하였다.

표 11

실시예 16	실시예 17	실시예 18	실시예 19
브라질린 1.0%	브라질린 0.1%	브라질린 0.01%	브라질린 0.001%
솔비톨액 19.2%	솔비톨액 19.2%	솔비톨액 19.2%	솔비톨액 19.2%
글리세린 22.0%	글리세린 22.0%	글리세린 22.0%	글리세린 22.0%
프로필렌글리콜 2.0%	프로필렌글리콜 2.0%	프로필렌글리콜 2.0%	프로필렌글리콜 2.0%
자당지방산에스테르 1.7%	자당지방산에스테르 1.7%	자당지방산에스테르 1.7%	자당지방산에스테르 1.7%
알킬황산나트륨 1.0%	알킬황산나트륨 1.0%	알킬황산나트륨 1.0%	알킬황산나트륨 1.0%
염화나트륨 1.0%	염화나트륨 1.0%	염화나트륨 1.0%	염화나트륨 1.0%
향료 1.1%	향료 1.1%	향료 1.1%	향료 1.1%
카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%	카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%	카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%	카르복실메틸셀룰로즈나트륨 0.4%
정제수 잔부	정제수 잔부	정제수 잔부	정제수 잔부

(실험예 9) 브라질린을 함유한 치약의 항충치 활성 측정

실시예 16-19에서 제조한 브라질린을 함유한 치약을 각각의 농도별로 4 ml씩 함유된 테스트 튜브에 구강병원성균을 함유하는 1 ml액을 첨가하고 튜브를 흔들어주면서 배양하고 시간의 경과에 따라 생균수를 측정하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 12에 나타내었다.

표 12

		생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)	생균수(균수 $\mu\text{g/ml}$)
구강병원성균	시험액	0시간	24시간
스트렙토코커스	실시예 16	3.2×10^5	<1
뮤탄스	실시예 17	3.2×10^5	<1
	실시예 18	3.2×10^5	<1
	실시예 19	3.2×10^5	<1
	브라질린을 뺀 치약	3.2×10^5	2.9×10^4
포피로모나스	실시예 16	3.8×10^5	<1
진지바리스	실시예 17	3.8×10^5	<1
	실시예 18	3.8×10^5	<1
	실시예 19	3.8×10^5	<1
	브라질린을 뺀 치약	3.8×10^5	3.3×10^4

도면의 간단한 설명

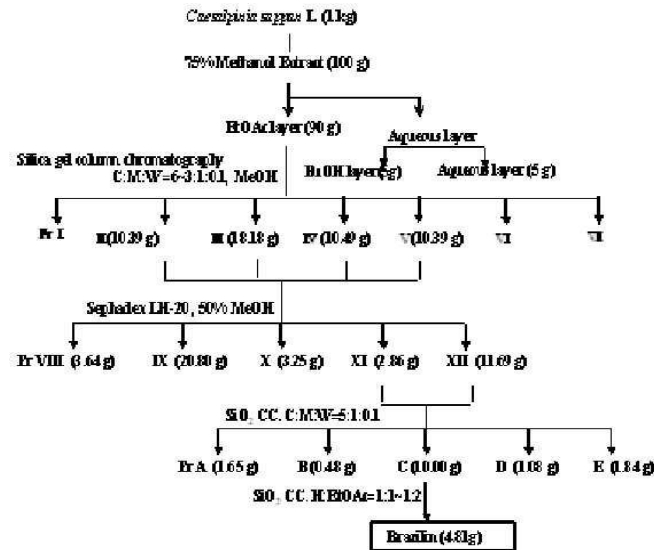
도 1은 본 발명의 브라질린의 분리방법을 나타낸 그래프이다.

<98> 도 2는 본 발명의 캐살피니아 사판 에탄올 추출물의 스트렙토코커스 뮤턴스에 대한 항균활성을 생균수 측정법에 의하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

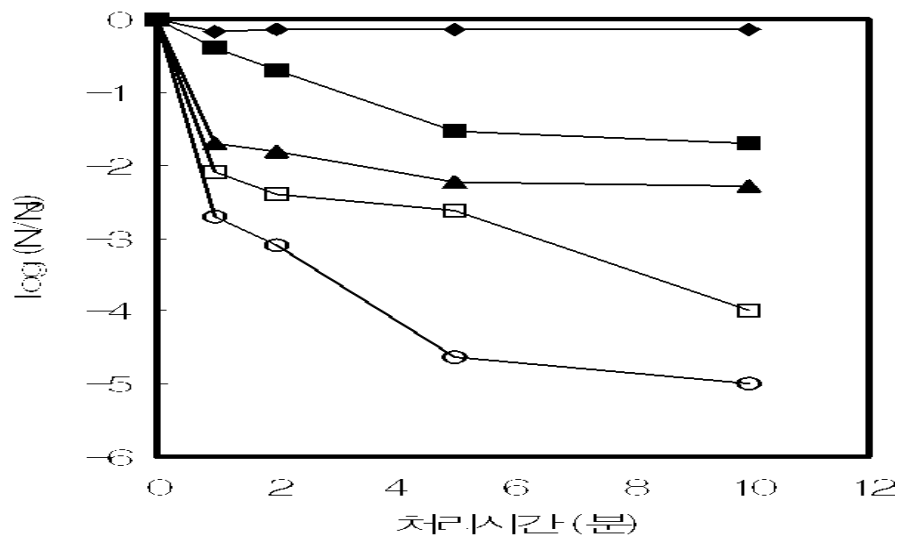
<99> 도 3은 본 발명의 캐살피니아 사판 에탄올 추출물로부터 분리된 브라질린의 스트렙토코커스 뮤턴스에 대한 항균활성을 생균수 측정법에 의하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

