



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0139310
(43) 공개일자 2012년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/35 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0059045

(22) 출원일자 2011년06월17일

심사청구일자 2011년06월17일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

허성오

강원도 춘천시 삭주로 89-7, 106동 107호 (후평동, 에리트아파트)

최동주

서울특별시 동대문구 이문로54길 36, 이편한세상 아파트 109동 502호 (이문동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김정현

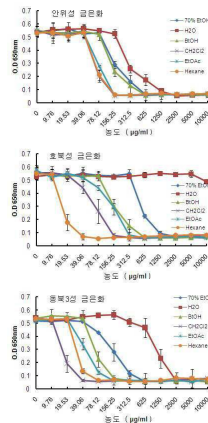
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물

(57) 요약

본 발명은 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하여 치주질환 원인균에 대하여 우수한 항염 및 항균효과를 가지는 동시에, 충치 예방, 구강 질환 및 잇몸 질환의 예방과 치료에 큰 효과가 있는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

김안숙

경기도 안양시 동안구 관양동 1589-1 한가람아파트
409-202

진대성

서울특별시 동대문구 천장산로12길 4, 1층 (이문동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 000410730110

부처명 중소기업청

연구사업명 산학연공동기술개발사업

연구과제명 금은화 유효 추출물의 약효 발현 특성화 기술 및 약물 전달 강화 제품의 저탄소 제조공정 개발

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

금은화 추출물 0.1~40중량%를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기금은화 추출물은 구강 조성물에 10~20중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기금은화 추출물은 70% 에탄올(EtOH) 엑기스, 헥산(hexane) 분획물, 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물, 부탄올(BuOH) 분획물 및 물(H_2O) 분획물 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기금은화 추출물은 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, ATCC 25586), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, ATCC 33277), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*, ATCC 35405), 테넬라 포르시티아(*Tannerella forsythia*, ATCC 43037), 에그리가티박터 액티노마이세탐코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ATCC 43718) 및 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*, ATCC 25611) 중 어느 하나의 치주질환 원인균에 대한 항균작용을 가지는 것을 특징으로 하는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물의 제형이 치약, 구강청정제, 구강세정제, 잇몸 마사지 크림 또는 가식성 필름인 것을 특징으로 하는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물.

청구항 6

금은화 추출물 0.1~40중량%를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 치주질환용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

금은화 추출물 0.1~40중량%를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 치주질환용 의약외품 또는 의약품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는금은화 추출물을 유효성분으로 포함하여 치주질환에 대한 우수한 항염 및 항균효과를 가지는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 치주질환은 세균에 의해 야기되는 치아지지 조직의 염증상태를 말하며, 치은염 및 치주염으로 분리할 수 있다. 발병원인은 불량한 구강 위생상태로 인한 구강 세균이 치면세균막을 형성하는데 있다. 치면세균막이란 침에 있는 끈끈한 물질을 접착체로 이용하여 세균이 치아 표면에 달라붙은 후 증식한 세균덩어리를 말한다. 치면세균막은 그냥 방치해두면, 염증이 생겨 가끔 잇몸에서 피가 나고, 구취가 나는 경우가 있으며, 이러한 증상을 치은염이라고 한다.
- [0003] 치은염이 더 진행되면 치아와 잇몸사이의 벌어진 틈이 더 깊어져서 치주낭이 생기고, 여기에 치주질환을 일으키는 세균들이 번식하여 치주염이 발생된다. 치주염이 진행되면 잇솔질과 같은 약한 자극에도 잇몸에서 피가 나기도 하며 붓고, 종종 급성염증으로 변화되어 통증을 유발한다. 이러한 염증은 골을 만드는 기능을 저하시키고, 골을 흡수하는 작용이 높아져서 치조골이 점점 낮아지게 되어 치조골이 파괴되고 결국 치아를 상실하게 된다.
- [0004] 진행된 치주염은 치아 상실을 일으키는데, 40세 이후의 성인에 있어서 치아를 뽑게 되는 원인 중 치주염이 차지하는 비율이 40%나 된다는 보고가 있을 정도로 치주염으로 인한 치아상실은 심각한 문제이다.
- [0005] 치주질환에서의 치주인대와 치조골의 파괴는 이들 조직의 주성분인 교원질(collagen)의 분해에 의한 것이다. 정확한 기작은 아직 밝혀져 있지는 않지만, 교원질의 분해는 숙주가 분비하는 콜라게나아제와 치주질환 원인균으로부터 분비된 중성 단백질 분해 효소에 의한 것으로 알려져 있다. 따라서 콜라게나아제 효소 및 단백질 분해 효소의 활성을 억제함으로써 치주질환의 진행을 억제하려는 연구가 시도되고 있다.
- [0006] 치주질환의 치료는 환자의 개선된 구강위생의 확립, 비외과적 혹은 외과적인 치석제거술, 치근활택술, 치은소과술과 신부작을 응용한 치주조직의 재생술들이 이용되어져 왔다. 그러나 이런 외과적인 치료 방법은 치료를 위해 치과를 가야하는 번거로움이 있고, 또한 병의 예방보다는 병이 어느 정도 진행되었을 경우 행하는 치료에 국한되어 치료를 하지 않을 경우 만성으로 진행되는 경우가 대부분이다.
- [0007] 부가적인 치료로 전신적인 항생제의 복용과 국소 서방형 제제가 사용되어 왔으나, 불필요한 부위에도 약물이 너무 많이 전달되어 그로 인한 부작용이 있다. 또한, 최근 사용되는 항생제에 대한 내성을 나타내는 치주질환균이 분리된 예가 보고되고 있어 심각한 문제점을 안고 있다.
- [0008] 이러한 외과적 치료의 한계성과 항생제 사용의 문제점을 보완하기 위하여 항세균성, 항치태제제가 함유된 치약, 구강청정제 등의 구강 조성물의 사용은 치아 우식증, 치주질환 등의 세균성 구강질환의 예방 및 치료 보조제로서 효과가 보고되었다.
- [0009] 식물 추출물을 대상으로 한 치주질환 치료제에 대한 기술로, 국내등록특허 제138248호에는 식물 추출물을 함유한 구강위생 증진용 조성물에 대하여 개시하고 있으며, 국내등록특허 제121550호에는 포공영을 함유하는 구강용 조성물에 대하여 개시하고 있다. 또한, 국내등록특허 제313491호에는 항균성 식물추출물을 함유하는 치약 조성물에 관한 것으로, 금초, 마로니에, 포공영, 맹종죽, 오배자, 황금, 측백엽, 은행엽 등을 함유하는 구강위생용 조성물에 대하여 개시하고 있다. 그러나, 상기 특허들에 사용된 원료들은 안전성이 확보되지 않은 것으로 구강위생용 조성물로서의 개발이 어려운 천연물이 대부분이다. 상기 선행기술들과 같이 안전성이 확보되지 않은 원료를 이용한 구강위생용 제품의 개발은 그 원료의 안전성을 입증하기 위한 시간적, 물질적 투자의 비율이 매우 높아 근시일내 제품화가 어렵다는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 치주질환 원인균에 대하여 우수한 항염 및 항균효과를 가지는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한 본 발명은 치주질환뿐 아니라 충치, 구강 질환 및 잇몸 질환에 대한 항염 및 항균효과를 가지는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한 본 발명은 치주질환, 충치, 구강 질환 및 잇몸 질환에 대한 항염 및 항균효과를 가지는 치주질환용 건강식품 조성물, 의약품 또는 의약품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 금은화 추출물 0.1~40중량%를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로

하는 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물을 제공한다.

- [0014] 보다 바람직하게, 본 발명의 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물은 금은화 추출물을 10~20중량%로 포함하는 것이다.
- [0015] 상기 금은화 추출물은 70% 에탄올(EtOH) 액기스, 헥산(hexane) 분획물, 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물, 부탄올(BuOH) 분획물 또는 물(H_2O) 분획물인 것이 바람직하다.
- [0016] 특히, 상기 금은화 추출물은 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, ATCC 25586), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, ATCC 33277), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*, ATCC 35405), 테네렐라 포르시티아(*Tannerella forsythia*, ATCC 43037), 에그리가티박터 액티노마이세탐코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ATCC 43718) 및 프리보텔라 인터미디어(*Prevotella intermedia*, ATCC 25611)의 치주질환 원인균에 대하여 우수한 항염 및 항균효과를 나타낸다.
- [0017] 상기와 같은 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물은 치약, 구강청정제, 구강세정제, 잇몸 마사지 크림 또는 가식성 필름 등의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명은 금은화 추출물 0.1~40중량%를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 치주질환용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 금은화 추출물 0.1~40중량%를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 치주질환용 의약품 또는 의약품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 구강 조성물은 치주질환 원인균에 대하여 우수한 항염 및 항균효과를 가지는 동시에 충치 예방, 구강 질환 및 잇몸 질환의 예방과 치료에 큰 효과가 있다. 또한, 본 발명의 구강 조성물은 안전성이 입증된 천연추출물을 원료로 하여 인체에 안전하며, 사용에 따른 부작용이 전혀 없다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 산지별(안위성, 호북성, 동북3성) 금은화로부터 추출한 70% 에탄올 액기스를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 안위성 금은화로부터 분획물을 분리하는 공정 및 분리된 분획물을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 호북성 금은화로부터 분획물을 분리하는 공정 및 분리된 분획물을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 동북3성 금은화로부터 분획물을 분리하는 공정 및 분리된 분획물을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 치주질환 원인균(푸조박테리움 뉴클레아툼)에 대한 산지별 금은화 추출물의 항균시험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 치주질환 원인균(포르피로모나스 긴기발리스)에 대한 산지별 금은화 추출물의 항균시험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 일실시예에 따라 치주질환 원인균(트레포네마 덴티콜라)에 대한 산지별 금은화 추출물의 항균 시험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 일실시예에 따라 치주질환 원인균(테네렐라 포르시티아)에 대한 산지별 금은화 추출물의 항균 시험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 일실시예에 따라 치은섬유모세포에 대한 본 산지별 금은화 추출물의 70% 에탄올 액기스(고형분)에 대한 세포독성 시험결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 본 발명의 일실시예에 따라 조골세포에 대한 본 산지별 금은화 추출물의 70% 에탄올 액기스(고형분)에 대한 세포독성 시험결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명자는 치주질환을 유발하는 수종의 혐기성 세균에 대한 직접적인 항균활성을 검정하여 금은화 추출물이 치주질환 원인균에 대한 생육억제능이 있음을 검증하고, 치주질환 전문 치료제로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0024] 본 발명의 치주질환 예방 및 치료용 조성물은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 상기 금은화(*Lonicera japonica thunberg*)는 인동과의 인동덩굴 또는 그 변종의 꽃봉오리를 말한다. 차갑고 독이 없으며 맛은 달다. 외감성으로 열이 나며 가슴 속이 답답하고 편안치 않은 증상과 갈증이 있을 때 차로 달여서 마신다. 종기와 피부가 헐어 독이 퍼졌을 때 유효하며, 맹장염, 복막염, 자궁내막염, 내부장기염증 등의 염증 제거 및 고름을 내보내주는 작용이 있다. 또한, 이질에 농이 섞인 변을 배설할 때도 유효하다.
- [0026] 상기 금은화는 열독으로 인한 피부의 조직괴사에도 신속한 효과를 보이고, 초기 유선염에도 치료율이 높다. 열을 내리고 독을 풀며 경맥을 잘 통하게 하며, 강한 항균작용으로 여러 가지 염증성 질환과 감기로 인한 발열, 외과의 부스럼 등에 적용한다. 바이러스 억제 작용이 있으므로 유행성 감기나 악성 유행성 감기, 호흡기 질병, 매독에 효과가 좋고, 고열로 의식 불명이나 수족마비가 일어났을 때도 쓰이며, 인후통, 대장염, 위궤양, 방광염, 인두염, 편도선염, 기관지염, 결막염 및 부스럼, 유행성 이하선염으로 인한 고열, 화농성 감염증 등을 치료한다. 또한, 항균작용이 있어서 황색포도상구균, 용혈성연쇄상구균, 폐렴쌍구균, 백일해균, 이질균, 녹농균, 콜레라균, 대장균의 발육을 억제하고, 항염증에 효능이 있어 염증의 증식을 막으면서 해열작용과 백혈구의 탐식작용을 촉진시킨다. 혈청콜레스테롤을 일정하게 내리고, 실험성 궤양에 가벼운 예방효과를 보인다.
- [0027] 상기 금은화로는 통상의 것을 사용하거나, 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있음은 물론이며, 본 발명에서는 중국의 안위성, 호북성, 동북3성에서 생산된 것을 사용하였다.
- [0028] 상기 금은화 추출물은 물, 알코올 등의 용매를 사용하여 냉침, 온침, 가열 등 통상의 추출방법에 따라 추출할 수 있다.
- [0029] 보다 구체적으로 상기 금은화 추출물은, 먼저 70% 에탄올(EtOH)로 70℃에서 환류(reflux)시켜 3시간씩 5회 추출하여 70% 에탄올 액기스를 제조한다. 그 다음, 상기 70% 에탄올 액기스에 증류수를 가하여 현탁시킨 후, 동량의 헥산(hexane)을 가하고 진탕 방치한 후 분획하여 헥산 분획물과 수층을 분리하고, 계속하여 수층에 동량의 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)로 순차적으로 가하여 동일한 방법에 따라 분획하여 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물을 분리한 다음, 수층을 농축하여 물(H_2O) 분획물을 얻을 수 있다.
- [0030] 상기 금은화는 본 발명의 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물에 0.1~40중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10~20중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.1중량% 미만일 경우에는 원하는 만큼의 치주질환 원인균에 대한 항염 및 항균효과를 볼 수 없으며, 40중량%를 초과할 경우에는 사용량에 따른 항염 및 항균효과가 미미하고, 구강용 치료제로 제조가 어려울 수 있다.
- [0031] 구강 내 세균으로는, 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*), 프리보텔라 로셰이(*Prevotella loescheii*), 트리포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 포르피로모나스 엔도돈탈리스(*Porphyromonas endodontalis*), 펩토코커스 아나에로비우스(*Peptococcus anaerobius*), 미크로스 프리보티(*Micros prevotii*), 에우바스테리움 리모숨(*Eubacterium limosum*), 센티페디아 페리오돈티(*Centipedia periodontii*), 셀레노모나스 아르테리미디스(*Selenomonas arterimidis*), 푸조박테리움 페리오돈티쿰(*Fusobacterium periodonticum*), 에우박테리움 속(*Eubacterium spp.*), 박테리오테스 속(*Bacteroides spp.*)을 들 수 있으며, 치주병에 관계하는 세균으로서, 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 액티노바실러스 액티노마이세툼코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 캄피로박터 렉터스(*Campylobacter rectus*), 테넬라 포르시티아(*Tannerella forsythia*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*), 액티노마이세스 비스코소스(*Actinomyces viscosus*), 스트렙토코커스 뮈턴스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 소브리너스(*Streptococcus sobrinus*)를 들 수 있다.

- [0032] 이들 세균 중, 특히 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 및 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)에 대하여 활성을 나타내는 항균제는 구강 내 세균의 감소에 유효하다고 사료된다.
- [0033] 포르피로모나스 긴기발리스는 그람 음성 혐기성 세균으로, 치주병 원인균의 대표적인 것임과 동시에, VSC를 생산하여 구취의 원인균으로 알려져 있다. 포르피로모나스 긴기발리스는 강한 부착능을 가지며, 복수의 균종과 공응집한다(제 1 치과출판 발행, 계간 치과 의료 20(1) 31-39, 2006). 또한, 포르피로모나스 긴기발리스는 콜라게나아제나 긴기펜인 등의 프로테아제나, 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제를 생산하여, 숙주의 면역 응답을 저해한다. 포르피로모나스 긴기발리스가 분비하는 긴기펜인이 액티노마이세스 비스코커스의 공응집에 공헌한다는 보고도 있다.
- [0034] 푸조박테리움 뉴클레아툼도 그람 음성 혐기성 세균으로, 치주병의 원인균임과 동시에, VSC를 생산하여 구취의 원인균으로서 알려져 있다. 푸조박테리움 뉴클레아툼은 치주 조직 세균에 독성을 나타내는 지방산을 생산하여, 숙주의 면역 응답을 저해하고, 더 나아가 스피로헤테타 등의 증식을 촉진한다.
- [0035] 이상과 같이, 포르피로모나스 긴기발리스 및 푸조박테리움 뉴클레아툼은 숙주의 면역 응답을 저해하여, 그 외의 구강 내 세균의 증식을 조장하고, 프라그의 형성에 공헌한다.
- [0036] 본 발명에서는 치주질환 원인균에 대한 금은화 추출물의 항균효과를 검증하기 위하여, 상기와 같이 분리한 금은화의 70% 에탄올(EtOH) 엑기스, 헥산(hexane) 분획물, 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물, 부탄올(BuOH) 분획물 및 물(H_2O) 분획물을 사용하여 치주질환 원인균인 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, ATCC 25586), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, ATCC 33277), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*, ATCC 35405), 테넬라 포르시티아(*Tannerella forsythia*, ATCC 43037), 에그리가티박터 액티노마이세탐코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ATCC 43718) 및 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*, ATCC 25611)에 대한 생육억제능을 시험하였다.
- [0037] 상기와 같은 본 발명의 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물은 치은염, 치주염 등 치주질환에 효과가 있으며, 항생물질이 아니면서도 잇몸의 염증을 감소시켜 줄 뿐만 아니라 잇몸을 튼튼하게 하여 세균 감염으로부터 저항할 수 있게 한다.
- [0038] 본 발명의 치주질환 예방 및 치료용 구강 조성물은 그 제형에 있어 특별히 한정되지 않고 통상의 제형을 가질 수 있으며, 구체적으로는 치약, 구강세정제, 구강청정제, 잇몸 마사지 크림, 가식성 필름 등의 제형을 가질 수 있다. 본 발명에서 제공하는 구강 조성물은 그 제형에 따라 제제화에 필요한 각종의 기재와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다. 예를 들면, 구강 조성물의 제형이 치약류인 경우, 연마제, 습윤제, 기포제, 결합제, 감미제, pH조절제, 방부제, 약효성분, 향료, 증백제, 색소, 용제 등을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0039] 또한 본 발명은 상기와 같은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주질환 개선을 목적으로 하는 건강식품 조성물, 의약품 또는 의약품 조성물을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 금은화 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 금은화 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 금은화 추출물이 원료에 대하여 50 중량부 이하, 바람직하게는 25 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0041] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코릿, 캔디류, 젤리류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 감류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0042] 본 발명의 금은화 추출물이 음료로 사용될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스, 같은 디사카라이드, 스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르트암과 같은

합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.1~20g, 바람직하게는 약 1~10g이다.

[0043] 상기 외에 본 발명의 금은화 추출물이 음료로 사용될 경우 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 금은화 추출물이 음료로 사용될 경우 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 금은화 추출물 함유 음료 100중량부 당 0.05~50중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0044] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이다. 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0045] 실시예 1. 금은화 추출물 제조

[0046] 1-1. 70% 에탄올 엑기스 추출

[0047] 중국 안위성, 호북성, 동북3성에서 구입한 금은화 15g씩을 70% 에탄올(EtOH)로 70℃에서 환류(reflux)시켜 3시간씩 5회 추출하여 70% 에탄올 엑기스를 얻었다. 이렇게 수득한 금은화는 각각 8.3g, 4.7g, 7.6g이었다.

[0048] 상기와 같이 수득한 각각의 70% 에탄올 엑기스 중 가장 수득률이 많은 것은 안위성 금은화로, 고형분의 무게가 300mg이었고, 호북성 금은화와 동북3성의 금은화의 경우 각각 고형분의 무게가 100mg이었다(도 1).

[0049] 1-2. 금은화 분획물 분리

[0050] 중국 안위성, 호북성, 동북3성에서 구입한 금은화 20g씩을 70% 에탄올(EtOH)로 70℃에서 환류(reflux)시켜 3시간씩 5회 추출하여 70% 에탄올 엑기스를 얻었다.

[0051] 이렇게 얻어진 금은화의 70% 에탄올 엑기스에 증류수를 가하여 현탁시켜 200ml로 맞추었다. 여기에 동량의 헥산(hexane)을 가하고 진탕 방치한 후 분획하여 헥산 분획물과 수층을 분리하고, 상기 수층에 동량의 디클로로메탄(CH_2Cl_2)을 가하고 진탕 방치한 후 분획하여 디클로로메탄 분획물과 수층을 분리하였다. 또, 상기 분리한 수층에 동량의 에틸아세테이트(EtOAc)를 가하고 진탕 방치한 후 분획하여 에틸아세테이트 분획물과 수층을 분리하였다. 계속해서 상기 수층에 부탄올을 가하고 진탕 방치한 후 분획하여 부탄올 분획물과 수층을 분리한 다음, 상기 수층을 농축하여 물(H_2O) 분획물을 얻었다.

[0052] 상기 수득한 산지별(안위성, 호북성, 동북3성) 금은화에 대한 헥산(hexane) 분획물, 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물, 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물, 부탄올(BuOH) 분획물 및 물(H_2O) 분획물의 분리공정과 이렇게 수득된 분획물은 도 2 내지 4에 나타내었다.

[0053] 또한, 산지별(안위성, 호북성, 동북3성) 금은화 20g에 대한 분획물의 중량을 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

[0054] 하기 표 1의 단위는 g이다.

표 1

[0055]

구분	안위성 금은화	호북성 금은화	동북3성 금은화
헥산 분획물	0.024	0.071	0.032
디클로로메탄 분획물	0.122	0.148	0.118
에틸아세테이트 분획물	0.357	0.295	0.398
부탄올 분획물	4.28	3.07	3.53
물 분획물	3.536	1.83	3.452
합계	8.319	5.414	7.53
recovery rate(%)	75.63	87.32	75.30

[0056] 실시예 2. 항균 시험

[0057] 금은화 추출물의 치주질환 예방 및 치료 효과를 측정하기 위하여, 상기 실시예 1에서 수득한 안위성, 호북성, 동북3성 금은화의 70% 에탄올 엑기스, 헥산(hexane) 분획물, 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물, 에틸아세테이트

(EtOAc) 분획물, 부탄올(BuOH) 분획물 및 물(H₂O) 분획물을 사용하여 치주질환 원인균에 대한 항균시험을 실시하였다.

[0058] 치주질환 원인균으로는 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, ATCC 25586), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, ATCC 33277), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*, ATCC 35405), 테네넬라 포르시티아(*Tannerella forsythia*, ATCC 43037), 에그리가티박터 액티노마이세템코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ATCC 43718) 및 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*, ATCC 25611)를 사용하였다.

[0059] 에그리가티박터 액티노마이세템코미탄스는 BHI(brain-heart infusion) 액체배지에, 푸조박테리움 뉴클레아툼, 프리보텔라 인터미디아 및 포르피로모나스 긴기발리스는 BHI에 헤민(hemin)과 비타민 K(vitamin K)를 포함한 액체배지에, 트레포네마 덴티콜라는 TYGVS와 BHI를 1:1의 비율로 혼합한 배지에, 테네넬라 포르시티아는 modified NOS(New Oral Spirochete) media를 이용한 배지에 각각 2×10^6 cells/ml의 농도로 희석하고 150 μ l로 접종하여, 37℃에서 24~48시간 동안 전배양하였다.

[0060] 먼저, 핵산 분획물, 디클로로메탄 분획물 및 에틸아세테이트 분획물은 무수알코올로 용해시키고, 나머지 70% 에탄올 엑기스, 부탄올 분획물 및 물 분획물은 증류수에 용해시킨 후, 0.2 μ m 필터로 여과 멸균하여 시료를 제조하였다.

[0061] 각각의 시료를 microtitre plate에 계단희석(serial dilution)을 이용하여 희석한 후, 각각의 시료에 상기 전배양한 치주질환 원인균들을 최종 부피가 150 μ l가 되도록 접종하였다. 이들을 혐기조건 하 37℃에서 24~48시간 동안 정치배양한 후, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)로 650nm에서 흡광도를 측정하여 치주질환 원인균에 대한 생육억제능을 시험하였다. 각 치주질환 원인균에 대한 산지별 금은화 추출물의 항균시험 결과를 도 5 내지 8에 나타내었다.

[0062] 도 5 내지 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 금은화 엑기스 및 각각의 분획물은 치주질환 원인균인 푸조박테리움 뉴클레아툼(도 5), 포르피로모나스 긴기발리스(도 6), 트레포네마 덴티콜라(도 7) 및 테네넬라 포르시티아(도 8)에 대하여 매우 우수한 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0063] 이같은 결과를 통하여, 본 발명의 구강 조성물에 함유되는 금은화 추출물은 치주질환 원인균의 생육을 억제하여 치주질환의 예방 및 치료에 효과가 있을 것임을 예측할 수 있었다.

[0064] 실시예 3. 세포독성 시험

[0065] 금은화 추출물의 세포독성을 시험하기 위하여, 치은섬유모세포 및 조골세포를 다음과 같은 조건으로 배양한 후 시험에 사용하였다.

[0066] 치은섬유모세포(gingival fibroblast cell line)로는 초대배양된 인간 GF 세포를 10% FBS(PAA Laboratories, Etobicoke, ON, Canada), 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 DMEM high glucose 배지(PAA Laboratories, Linz, Austria)에서 80% confluence에 도달할 때까지 37℃, 5% 이산화탄소, 99% 습도 조건에서 배양하였다. 배지는 3일마다 바꿔주었다. 조골세포(Osteoblast like cell line)로는 MG63(ATCC, Manassas, VA, USA)을 상기 치은섬유모세포와 동일한 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0067] 먼저, 상기 실시예 1에서 수득한 안위성, 호복성, 동복3성 금은화의 70% 에탄올 엑기스(고형분)를 DMSO로 녹이고, 0.2 μ m 셀룰로오즈 필터를 이용하여 여과멸균하였다.

[0068] 상기 준비한 치은섬유모세포 및 조골세포를 각각 웰당 3×10^3 개가 되도록 96웰에 분주하여 배양하였다. 24시간 배양한 후 free media로 바꿔주었다. 그 다음, 상기 안위성, 호복성, 동복3성 금은화의 70% 에탄올 엑기스를 웰당 1, 5, 10, 50, 100 μ g/ml의 농도로 넣은 후 혐기조건 하 37℃에서 24~72시간 동안 배양한 후, MTT assay(540 nm)를 통하여 얻어진 실험시간에 따른 세포주 생존결과(생존한 세포수)를 도 9 및 10에 나타내었다. 실험결과는 반복실험에 의한 평균값이다.

[0069] 도 9 및 10에 나타낸 바와 같이, 치은섬유모세포에 안위성, 호복성, 동복3성의 금은화 70% 에탄올 엑기스를 처리한 경우 금은화 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 시간이 경과함에 따라 세포 생존수가 현저하게 나타났다으며, 이같은 결과를 통하여 본 발명의 구강 조성물에 함유되는 금은화 추출물은 치은섬유모세포(도 9) 및 조골세포(도 10)에 대한 세포독성이 없이 우수함을 알 수 있었다.

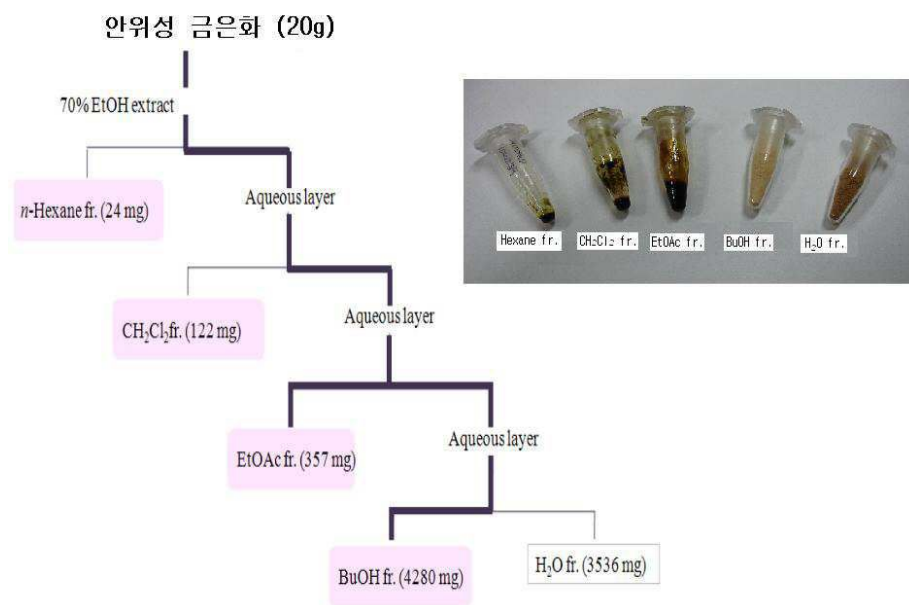
- [0070] 제조예 1. 치약 제조
- [0071] 탄산칼슘 48.0중량%, 글리세린 20.0중량%, 카르복시메틸셀룰로오스 2.0중량%, 라우릴황산나트륨 2.0중량%, 향료 1.0중량%, 사카린 0.1중량%, 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 3.0중량%, 클로로헥시딘 0.01중량% 및 잔량의 물을 혼합하여 통상의 치약 제조방법에 따라서 치주질환 예방 및 치료 효과를 지니는 치약을 제조하였다.
- [0072] 제조예 2. 구강청정제(가글) 제조
- [0073] 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 0.1중량%, 글리세린 35.5 중량%, 폴리아크릴레이트 나트륨 5.0중량%, 소디움라우릴 설페이트 1.0중량%, 사카린 나트륨 0.1중량%, 에탄올 5.0중량%, 착향 1.3중량% 및 잔량의 물을 혼합하여 통상의 구강청정제 제조방법에 따라 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 구강청정제(가글)를 제조하였다.
- [0074] 제조예 3. 구강 스프레이 제조
- [0075] 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 0.1중량%, 글리세린 35.5 중량%, 폴리아크릴레이트 나트륨 5.0중량%, 소디움라우릴 설페이트 1.0중량%, 사카린 나트륨 0.1중량%, 에탄올 5.0중량%, 착향 1.3중량% 및 잔량의 물을 혼합하여 통상의 구강 스프레이 제조방법에 따라 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 구강 스프레이를 제조하였다.
- [0076] 제조예 4. 츄잉검 제조
- [0077] 검 베이스 20.0중량%, 설탕 54.7중량%, 글루코오스 15.0중량%, 물엿 9.3중량%, 향료 0.5중량%, 및 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 0.5중량%를 혼합하여 통상의 츄잉검 제조방법에 따라 츄잉검의 성질을 잃지 않고 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 츄잉검을 제조하였다.
- [0078] 제조예 5. 캔디 제조
- [0079] 설탕 49.6중량%, 물엿 33.0중량%, 구연산 1.0중량%, 향료 0.2중량%, L-멘톨 1.0중량%, 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 0.8중량% 및 물 14.4중량%를 혼합하여 통상의 캔디 제조방법에 따라 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 츄잉검을 제조하였다.
- [0080] 제조예 6. 초콜릿 제조
- [0081] 카카오버터 20.0중량%, 전지분유 20.0중량%, 카카오버터 17.0중량%, 분당 41.75중량%, 레시틴 0.45중량%, 향료 0.2중량% 및 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 0.6중량%를 혼합하여 통상의 초콜릿 제조방법에 따라 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 초콜릿을 제조하였다.
- [0082] 제조예 7. 음료 제조
- [0083] 오렌지 과즙 30.0중량%, 이성화당 15.33중량%, 구연산 0.1중량%, 비타민C 0.04중량%, 향료 0.1중량%, 상기 실시예 1의 안위성 금은화 70% 에탄올 엑기스 0.01중량% 및 물 54.42중량%를 혼합하여 통상의 음료 제조방법에 따라 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 음료를 제조하였다.
- [0084] 제조예 8. 가식성 필름 제조
- [0085] 통상의 가식성 필름에 금은화 추출물 10~20중량%를 함유하도록 하여 치주질환 예방 및 치료 효과가 있는 가식성 필름을 제조하였다.
- [0086] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

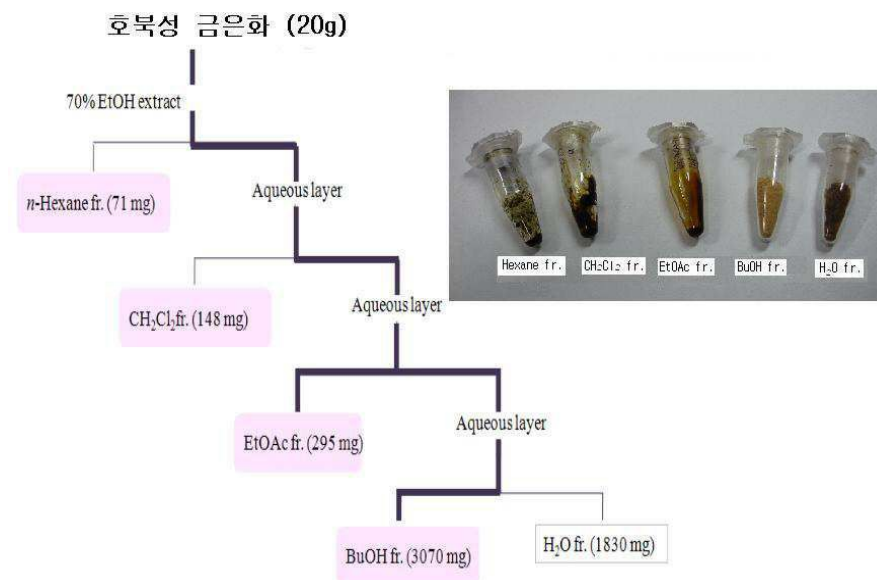
도면1



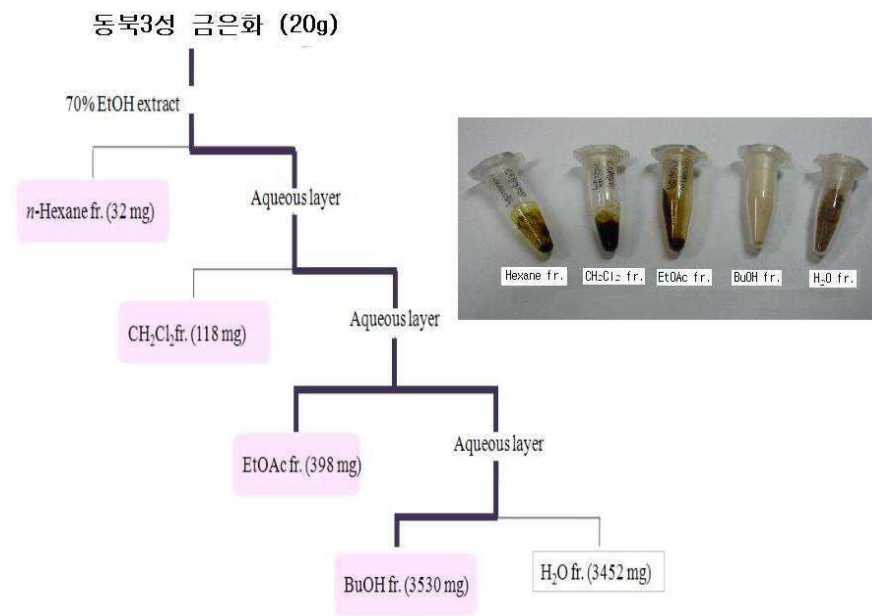
도면2



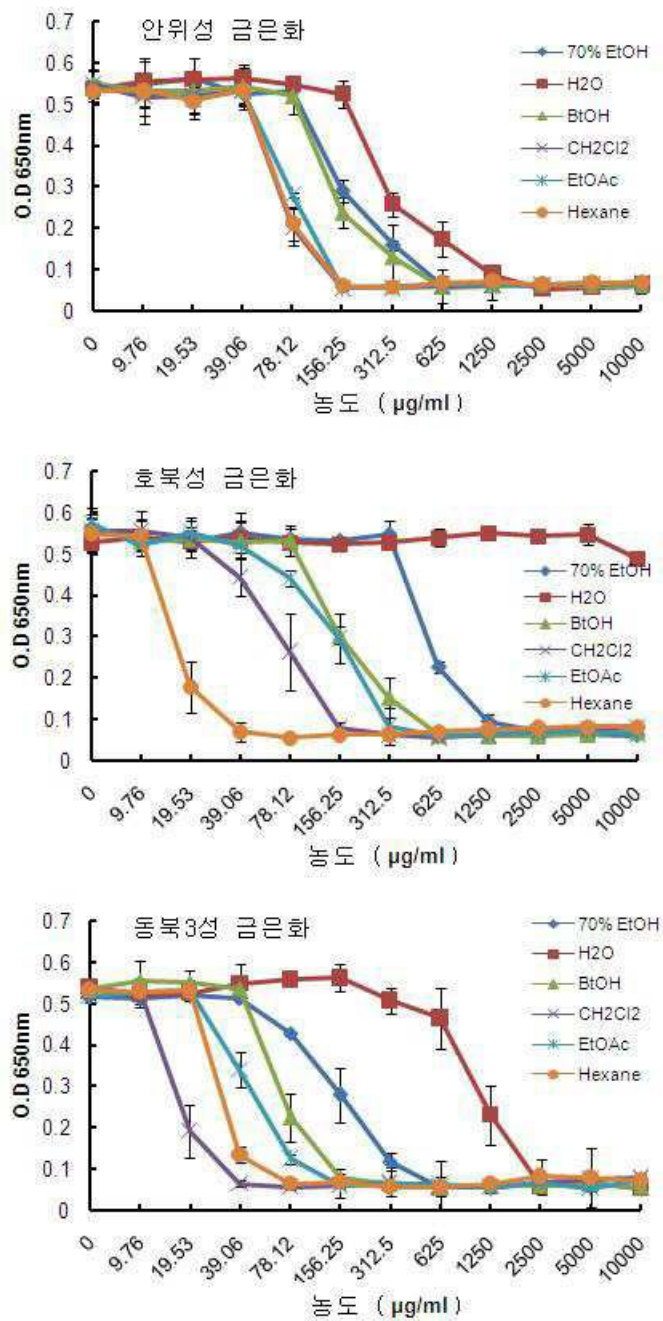
도면3



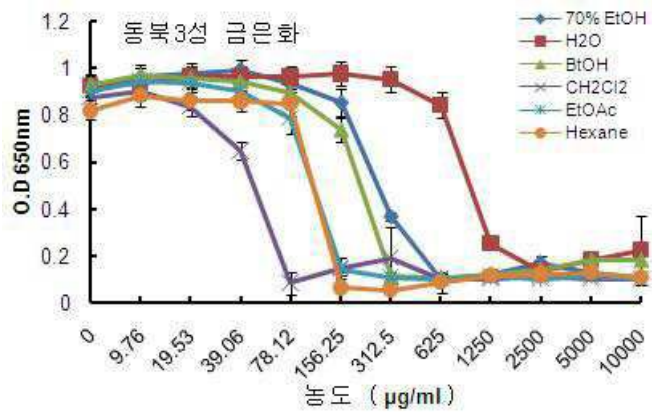
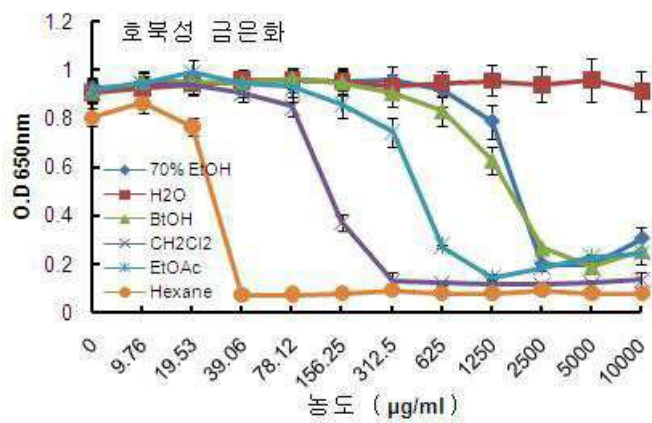
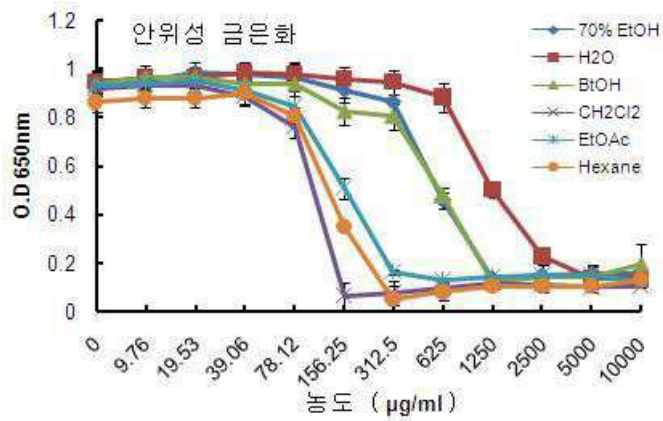
도면4



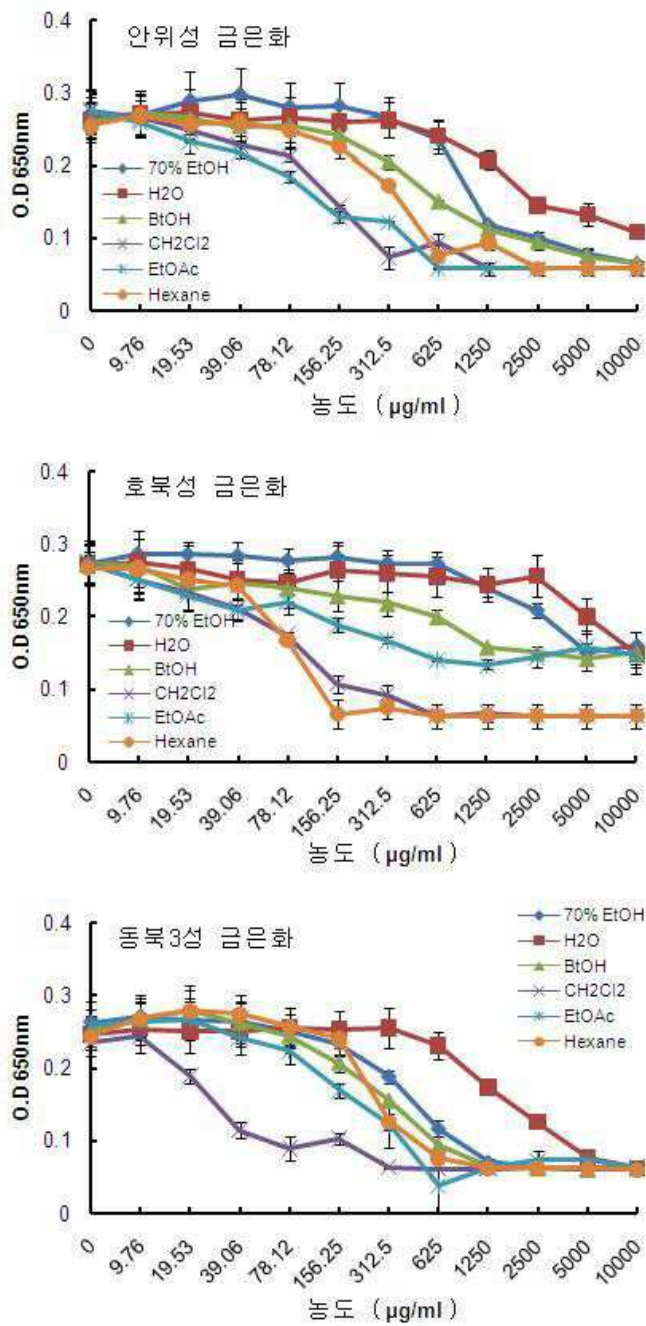
도면5



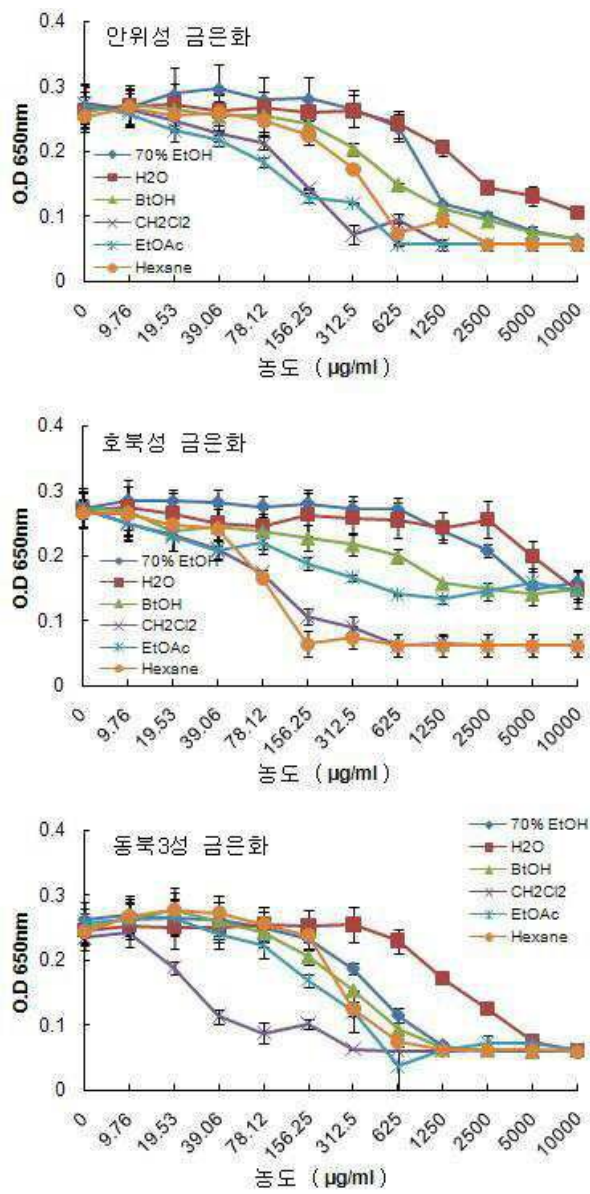
도면6



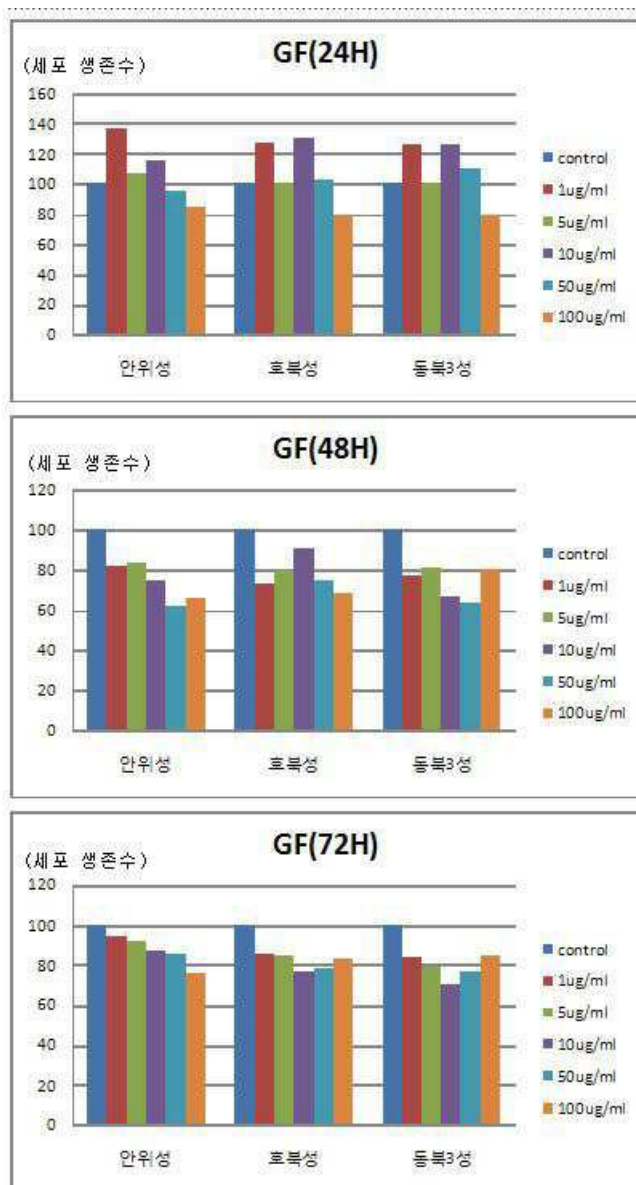
도면7



도면8



도면9



도면10

