



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0027682
(43) 공개일자 2016년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/97 (2006.01) A61K 36/49 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01) A61Q 11/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0116064

(22) 출원일자 2014년09월02일

심사청구일자 2014년09월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임승택

서울특별시 도봉구 해동로 32 106-303(창동, 서울가든아파트)

함지선

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 생명공학과 (안암동5가)

(74) 대리인

특허법인충현

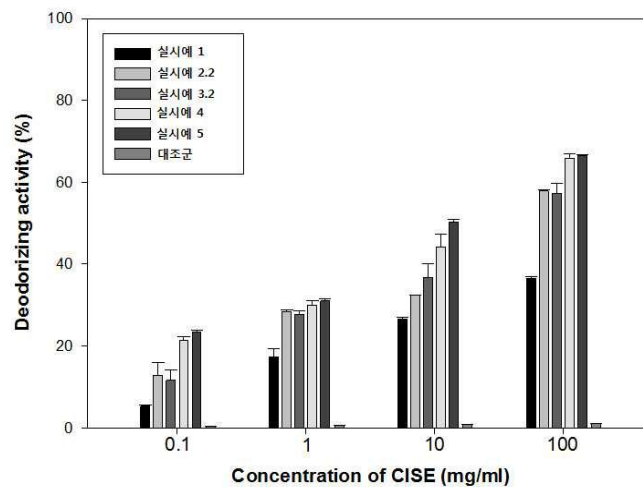
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 율피 추출물을 유효성분으로 하는 충치 예방 또는 구강용 소취제 조성물과 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 율피(Chestnut inner shell)를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출하는 추출 단계; 및 상기 추출 단계에서 얻은 추출 혼합물을 여과하여 불순물이 제거된 여액을 수득하는 단계;를 포함하는 율피 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

율피(Chestnut inner shell) 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 녹차추출물, 라즈베리 추출물, 홍차추출물 및 도토리껍질 추출물 중에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 구취 제거용 소취제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 율피 추출물이 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 함유되는 것을 특징으로 하는 구취제거용 소취제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 율피 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출된 추출물인 것을 특징으로 하는 구취제거용 소취제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 구취제거는 구강 내 휘발성 황화합물의 제거 또는 충치 원인세균 증식억제인 것을 특징으로 하는 구취제거용 소취제 조성물.

청구항 6

율피(Chestnut inner shell)를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출하는 추출 단계; 및

상기 추출 단계에서 얻은 추출 혼합물을 여과하여 불순물이 제거된 여액을 수득하는 단계;를 포함하는 율피 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 추출 단계는 추출용매 100 중량부에 대하여 염기 0.1 내지 10 중량부를 더 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 구취제거용 소취제 조성물의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서

상기 추출 단계는 초음파를 조사하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 구취제거용 소취제 조성물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서

상기 초음파 조사는 15 내지 25 kHz 및 500 내지 800 watt로 2 내지 60분간 조사되는 것을 특징으로 하는 구취 제거용 소취제 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 구취 유발 원인 물질인 휘발성 황화합물에 대하여 소취력을 가지는 동시에 충치 원인균에 대한 증식을 억제하는 특성이 우수한 율피 추출물을 유효성분으로 하는 구취제거용 소취제 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 구취의 원인은 크게 구강 내적 원인 구강 외적 원인으로 분류할 수 있으며, 구강 내적 원인으로는 대표적으로 구강 내의 미생물 또는 치료되지 않은 치아우식증(충치), 치주질환 등의 구강질환이 있고, 구강 외적 원인으로는 호흡기관계 질환, 위장관계 질환 등과 공복, 월경, 흡연, 음주 등의 다양한 원인이 있다.

[0003] 상기 원인 중에서도 구취는 주로 미생물에 의해 치아 사이에 침전된 음식물 찌꺼기가 분해됨으로써 생성된 휘발성 황화합물로 인해 발생하는 경우가 많은데, 이들 휘발성 황 화합물에는 황화수소, 메틸머캅탄(methyl mercaptan, CH_3SH), 디메틸설파이드(dimethyl sulfide, $\text{S}(\text{CH}_3)_2$) 등이 있다. 이들 중 메틸머캅탄은 구취의 주성분으로 알려져 있다[Kleinberg and Westbay, 1990; Loesche and Kazor, 2002].

[0004] 구체적으로 휘발성 황 화합물은 구강 내 황을 함유하는 펩타이드 및 단백질 기질에 대해 그람 음성 혐기성 세균의 발효작용을 통해 발생하는 것으로 알려져 있으며 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)로 인한 치주질환이 있는 사람의 경우 특히 황 화합물에 의한 구취 발생이 증가하게 된다. 그 외에도 구취 유발물 질로는 트리메틸 아민 등의 휘발성 아민 화합물, 알데 하이드, 지방산, 암모니아 등이 있다.

[0005] 구강 내에는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 상귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 살리바리스(*Streptococcus salivarius*) 등 여러 미생물이 존재하며 충치는 이 중 스트렙토코커스 뮤탄스가 주요 원인균으로 알려져 있다(Loeshe 1986; Bowen 2002; Beighton 2005). 일반적으로 충치는 구강 내 병원성균, 잔여 음식물, 타액의 상호 작용에 의해 유발되는 질환이다. 충치는 일종의 구강세균에 의한 감염성 질환으로 특히 스트렙토코커스 뮤탄스에 의해 생성된 텍스트란이 치아 표면에 막인 플라그(plaque)를 생성하고 플라그를 이루고 있는 세균에 의해 입속에 남아있던 설탕(sucrose), 전분 등이 분해되고 이때 생성된 산이 치아의 에나멜 표면(법랑질)을 손상(탈회)시켜 충치를 진행시키며 구취를 함께 발생시키게 된다.

[0006] 따라서, 종래에는 플라그 형성을 예방하고 충치 발생을 억제하기 위하여 스트렙토코커스 뮤탄스의 증식을 억제하는 항생물질 또는 불소와 같은 화합물을 치약과 같은 구강용 제품에 포함시켜 사용하는 것이 제시되었으며, 구강 내 병원균을 제거하기 위해 각종 항생제와 살균제들이 구강용 조성물로 많이 사용되어 왔다. 그러나 이러한 항생제나 살균제들은 우리 몸에 대해 부작용과 함께 구강 내 내성균의 출현을 유발할 수 있기 때문에 장기적인 사용이 곤란하여 치료제만으로 이용될 수 있다는 단점이 있다.

[0007] 구강건강 및 구취제거에 관한 종래의 기술로 한국 공개특허 제2005-0010082호는 치아미백, 충치예방, 치주질환 예방 등의 효과를 가지도록 은용액, 은분말 또는 은박막편을 첨가된 은치약을 제조하는 방법에 관한 특징을 개시하고 있으며, 한국 등록특허 제0691792호에는 충치 유발균인 스트렙토코커스 뮤탄스 균과 치주질환 유발균인 포피로모나스 진지발리스에 대한 항균력이 우수한 리그난 유도체를 함유한 충치와 치주염 예방 또는 치료용 구강조성물에 관한 특징을 개시하고 있고, 국 공개특허 제2001-0001476호는 구강살균제, 치주질환 억제제, 플라보노이드를 함유하여 구강내 병원성균, 치주질환 및 악취 유발물질을 제거하여 구취를 억제하는 조성물에 관한 특징을 개시하고 있다.

[0008] 그러나 항생물질을 지속적으로 사용하게 되면, 미생물이 내성을 갖게 되거나, 구토 등을 유발할 수 있으며, 구강 내 상재 균들의 생육이 저해되는 문제점이 있다. 따라서, 천연물로부터 부작용이 없는 항충치, 항치주질환 및 구취제거 물질을 분리하는 것이 절실히 요구된다.

[0009] 한편, 밤나무(*Castanea crenata* Sieb)는 참나무과에 속하는 낙엽 활엽 고목으로 그 열매인 밤(*Castanea crenata*)은 열매, 내피 및 외피로 구성된다. 율피라고도 불리우는 내피는 뚝은맛을 내기 때문에 밤 알맹이를 식

용으로 이용하기 위해서는 일반적으로 제거한 후 이용되고 있으며, 제거된 내피는 폐기물로 버려지고 있는 실정이다. 대한민국 공개특허 제 10-2006-0110579호에는 율피로부터 추출된 케르세틴을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 이용하여 멜라닌 생성 및 멜라닌 세포의 분화와 성숙 등에 관여하는 c-kit 활성을 저해하는 특징이 개시된바 있으며, 그외에도 율피 추출물이 항산화 및 항염증 활성을 나타내어 아토피 질환의 기능성 소재로서 활용될 수 있음을 보고된 있으나 구취 제거용으로서의 활용 가능성에 관해 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 율피 추출물을 유효성분으로 포함하는 구취제거용 소취제 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 상기 구취제거용 소취제 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은 율피(Chestnut inner shell) 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 구취제거용 소취제 조성물은 녹차추출물, 라즈베리 추출물, 홍차추출물 및 도토리껍질 추출물 중에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 율피 추출물이 상기 구취제거용 소취제 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 함유될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 율피 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출된 추출물일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 구취제거는 구강 내 휘발성 황화합물의 제거 또는 충치 원인세균 증식억제를 통해 달성될 수 있다.

[0017] 한편 상기 율피(Chestnut inner shell) 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물은 율피(Chestnut inner shell)를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출하는 추출 단계; 및 상기 추출 단계에서 얻은 추출 혼합물을 여과하여 불순물이 제거된 여액을 수득하는 단계;를 포함하여 수행함으로써 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 추출 단계는 추출용매 100 중량부에 대하여 염기 0.1 내지 10 중량부를 더 포함하여 수행될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 상기 추출 단계는 초음파를 조사하는 단계를 더 포함하여 수행될 수 있으며, 상기 초음파 조사는 15 내지 25 kHz 및 500 내지 800 watt로 2 내지 60분간 조사되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 율피추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물은 구취를 유발하는 황 화합물과 같은 물질을 효과적으로 흡착 또는 화학적으로 결합하여 구취를 억제할 수 있으며, 구강 내 존재하는 구강 병원균에 대하여 항균력이 우수하여 충치나 치주질환 등 구취를 유발하는 감염성 구강질환을 예방 또는 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 율피 추출물의 축합형 탄닌 함량을 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 율피 추출물의 총 플라보노이드 함량을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 60 ℃ 추출온도에서의 율피 추출물의 농도에 따른 메틸머캅탄에 대한 소취력을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 90 ℃ 추출온도에서의 율피 추출물의 농도에 따른 메틸머캅탄에 대한 소취력을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0023] 본 발명의 구취제거용 소취제 조성물은 율피(Chestnut inner shell) 추출물을 유효성분으로 함유한다.
- [0024] 본 발명에 의하면, 상기 율피 추출물의 성분 중에서 구취제거에 특히 효과를 나타내는 성분은 플라보노이드 또는 탄닌 화합물 일 수 있는데, 상기 탄닌은 갈로탄닌(gallotannins) 및 엘라기타닌(ellagitannins) 등의 가수분해형 탄닌(hydrolysible tannins)과 카테킨, 에피카테킨 및 에필로카테킨 등의 축합형 탄닌(condensed tannins)일 수 있다.
- [0025] 본 발명에 의하면, 상기 율피 추출물은 구취를 유발하는 원인 물질을 흡착시켜 기화를 억제하므로 냄새가 퍼지는 것을 억제할 수 있는데, 특히 율피 추출물의 성분 중 에피카테킨 및 에필로카테킨 등의 축합형 탄닌 성분은 구취를 유발하는 원인 물질을 흡착하는 능력이 우수하며, 프리라디칼(free radical) 억제 효과로 인한 높은 항산화 효과를 나타내므로 구강 내 유해 세균의 증식을 억제할 수 있어 구취를 억제할 수 있으므로 바람직하다.
- [0026] 또한, 본 발명에 의하면, 상기 율피 추출물은 구취를 유발하는 원인 물질과 가교결합을 하여 냄새 지각이 감소되거나 불쾌하지 않은 냄새를 나타내는 새로운 분자를 형성하거나 중화하여 구취를 소취할 수 있으므로 바람직하다. 예를 들어, 율피 추출물의 성분 중 플라보노이드는 분자 구조 내 보유하고 있는 히드록시기를 통해서 악취를 일으키는 암모니아 또는 메틸머캅탄의 기능성기인 -NH, -SH와 축합, 중합 또는 부가반응을 하여 구취를 억제할 수 있고, 탄닌은 상기 -NH, -SH와 에스테르화 반응을 형성하여 구취를 억제할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 의하면, 상기 구취 제거용 소취제 조성물 중의 율피 추출물의 함량은 제형에 따라 다소 차이가 있을 수 있으나 0.001 내지 50 중량%로 사용될 수 있다. 율피 추출물의 함량이 0.001 중량% 미만이면 구취 제거 효과를 기대하기 어려우며, 율피 추출물의 함량이 50 중량%를 초과하면 제형의 안정화가 어려워 바람직하지 않다.
- [0028] 본 발명에 의하면, 상기 구취제거용 소취제 조성물은 유효성분으로 율피 추출물 이외에 녹차 추출물, 라즈베리 추출물, 홍차 추출물 및 도토리껍질 추출물 중에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0029] 녹차 추출물, 홍차 추출물, 라즈베리 추출물에는 카테킨, 에피카테킨, 에피갈로카테킨, 에피카테킨갈레이트, 에피갈로카테킨갈레이트, 갈산 등의 탄닌 함량이 높고, 그 이외에도 폴리페놀과 플라보노이드 성분이 다량 함유되어 있어 구취를 제거하는데 효과적으로 작용할 수 있으므로 바람직하다.
- [0030] 또한, 도토리껍질 추출물에는 폴리페놀, 특히, 갈산, 트리갈산, 갈로탄닌 등의 탄닌 성분을 비롯한 폴리페놀 및 플라보노이드가 많이 함유되어 있어 구취를 제거하는데 효과적으로 작용할 수 있으므로 바람직하다.
- [0031] 본 발명에 의하면, 상기 녹차 추출물, 라즈베리 추출물, 홍차 추출물 및 도토리껍질 추출물 중에서 선택되는 1종 이상을 더 첨가하는 경우, 상기 추출물 들은 율피 추출물 10 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부의 비율로 함유될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 의하면, 상기 첨가물이 녹차 추출물, 라즈베리 추출물, 홍차 추출물 및 도토리껍질 추출물 중에서 선택되는 1종인 경우, 첨가물의 함량은 율피 추출물 10 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부의 비율로 함유될 수 있으며,
- [0033] 첨가물이 2종 이상인 경우에는 혼합된 첨가물의 함량이 율피 추출물 10 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유될 수 있다.
- [0034] 첨가물의 녹차 추출물, 라즈베리 추출물, 홍차 추출물 및 도토리껍질 추출물 의 비율은 특별히 제한은 없으나 예를 들어, 녹차 추출물 1 중량부에 대해 라즈베리 추출물 0.05 내지 2 중량부, 홍차 추출물 0.05 내지 2 중량부 및 도토리껍질 추출물 0.05 내지 2 중량부일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 상기 율피 추출물은 율피를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출된 추출물일 수 있는데, 바람직하게는 30 내지 80 부피%의 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 수용액으로 추출된 추출물인 것이 추출 수율이 우수하면서도 추출물 중의 구취 제거에 유효한 성분의 함량이 높으므로 좀 더 바람직하다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올 중에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올 일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 의하면, 상기 구취제거는 구강 내 악취유발 물질 및 휘발성 황 화합물의 제거 또는 충치원인 세균 중

식의 억제될 수 있다.

- [0038] 한편, 상기 율피 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취제거용 소취제 조성물은 율피(Chestnut inner shell)를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나의 용매로 추출하는 추출 단계; 및 상기 추출 단계에서 얻은 추출 혼합물을 여과하여 불순물이 제거된 여액을 수득하는 단계를 포함하여 수행함으로써 제조될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 의하면, 상기 율피는 밤의 속껍질로, 바람직하게는 밤의 속껍질을 분쇄한 율피 분말일 수 있는데, 추출 시 율피 분말을 사용하는 것이 표면적이 넓어져 율피에 함유된 구취 제거에 유효한 물질을 추출하기 용이하여 수율이 향상될 수 있으므로 바람직하다.
- [0040] 본 발명에 의하면, 상기 추출은 용매 100 중량부에 대하여 율피 5 내지 50 중량부를 첨가하여 수행될 수 있으며, 25 내지 100 ℃의 온도범위에서 0.5 내지 12시간 동안 교반함으로써 수행될 수 있다. 상기 교반 온도가 상기 범위 미만이면, 구취 제거에 유효한 물질의 추출 수율이 낮아지면서도, 온도를 낮추기 위한 장비가 필요하므로 경제적이지 않으며, 교반온도가 상기 범위를 초과하면 구취 제거에 효과적인 유효성분이 파괴되거나, 구취 제거에 유효하지 않은 물질이 함께 추출되어 소취력이 낮아진 추출물을 얻을 수 있어 바람직하지 않다.
- [0041] 본 발명에 의하면, 상기 교반 온도는 50 내지 95 ℃의 온도범위인 것이 식품 세포 조직이 연화되어 구취 제거에 효과적인 성분의 용출이 용이해지므로 소취력이 우수한 추출물을 얻을 수 있으므로 좀 더 바람직하다.
- [0042] 본 발명에 의하면, 상기 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 30 내지 80 부피%의 알콜 수용액일 수 있고, 가장 바람직하게는 30 내지 70 부피%의 에탄올 수용액일 수 있다.
- [0043] 본 발명에 의하면, 상기 추출 시 추출용매 100 중량부에 대하여 염기 0.1 내지 10 중량부를 더 포함하여 수행될 수 있는데, 상기 염기는 NaOH 또는 KOH일 수 있다. 본 발명에 의하면, 상기 염기의 함량이 상기 범위 미만이면 율피 추출물이 추출 수율이 증가되는 정도가 미미하며, 상기 범위를 초과하면 구취제거에 유효한 물질이 가수분해되어 소취력이 낮아진 추출물을 얻을 수 있으므로 바람직하지 않다. 좀 더 바람직하게는 용매 100 중량부에 대하여 염기 0.5 내지 3 중량부를 더 포함하여 수행하는 것이 가수분해성 탄닌, 축합형 탄닌, 총 플라보노이드 및 총 페놀류의 함량이 높은 추출물을 얻을 수 있으며, 특히 에피카테킨 및 에킬로카테킨 등의 축합형 탄닌 함량과 총 플라보노이드의 함량이 향상되어 구취에 대하여 소취력이 향상된 추출물이 제조될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 의하면 상기 교반 시 초음파를 조사하는 단계를 더 포함하여 수행함으로써 구취제거에 효과적인 유용성분의 추출 수율을 증가시킬 수 있다.
- [0045] 상기 초음파 조사는 15 내지 25 kHz 및 500 내지 800 watt로 2 내지 60분간 조사되는 것일 수 있는데, 조사시간이 상기 범위 미만이면 초음파 조사시간이 너무 짧아 초음파 조사에 의한 효과가 미미하며, 조사시간이 상기 범위를 초과하면 구취제거에 유효한 물질의 성분이 파괴되거나 구취제거에 효과적이지 않은 구조로 변질될 수 있으므로 바람직하지 않다.
- [0046] 본 발명에 따른 구취제거용 소취제 조성물은 제형에 제한이 있는 것이 아니며, 예를 들어, 용액, 가글용액, 스프레이, 치약 등의 통상적으로 제조 가능한 제형의 방법을 이용하여 제형할 수 있다.
- [0047] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진자에게 자명할 것이다.
- [0048] **실시예**
- [0049] 제조예 1
- [0050] 밤 속껍질(율피)을 박피하여 세척하고 12시간 동안 자연건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 율피 분말을 얻었다.
- [0051] 제조예 2

- [0052] 물 100g에 녹차 분말 30g을 첨가하고 60 ℃에서 교반하여 녹차 추출물을 제조하였다.
- [0053] 제조예 3
- [0054] 물 100g에 라즈베리 분말 30g을 첨가하고 60 ℃에서 교반하여 라즈베리 추출물을 제조하였다.
- [0055] 제조예 4
- [0056] 물 100g에 홍차 분말 30g을 첨가하고 60 ℃에서 교반하여 홍차 추출물을 제조하였다.
- [0057] 제조예 5
- [0058] 물 100g에 도토리껍질 분말 30g을 첨가하고 60 ℃에서 교반하여 도토리껍질 추출물을 제조하였다.
- [0059] 실시예 1. 구취 제거용 소취제 조성물의 제조
- [0060] 실시예 1.1
- [0061] 물 10 g에 제조예 1의 율피분말 1g을 첨가하여 25 ℃에서 0.5시간 동안 교반하여 율피 추출액을 제조한 후, 여과하여 율피 분말 및 불순물을 제거하고 여액을 감압 농축하여 율피 추출물을 제조하였다.
- [0062] 실시예 1.2
- [0063] 25℃ 대신에 60℃에서 교반한 것을 제외하고는 실시예 1.1의 방법으로 율피 추출물을 제조하였다.
- [0064] 실시예 1.3
- [0065] 25℃ 대신에 90℃에서 교반한 것을 제외하고는 실시예 1.1의 방법으로 율피 추출물을 제조하였다.
- [0066] 실시예 2
- [0067] 추출용매로 물 대신에 각각 30%, 50% 및 70%인 에탄올 수용액을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1.1 내지 실시예 1.3의 방법으로 율피 추출물을 제조하였다.
- [0068] 실시예 3
- [0069] 추출용매로 물 대신에 각각 30%, 50% 및 70%인 메탄올 수용액을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1.1 내지 실시예 1.3의 방법으로 율피 추출물을 제조하였다.
- [0070] 실시예 4
- [0071] 추출용매로 물 대신에 각각 1%(w/v) NaOH 수용액을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1.1 내지 실시예 1.3의 방법으로 율피 추출물을 제조하였다.
- [0072] 실시예 5
- [0073] 추출용매로 물 대신에 각각 2%(w/v) NaOH 수용액을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1.2의 방법으로 율피 추출물을 제조하였다.

시험예 1. 성분 분석

가. 축합형 탄닌 함량

축합형 탄닌 함량은 vanillin-HCl법 (Price et al. 1978)에 따라 측정하였다. 율피 추출물을 동결건조하여 얻은 고형분을 Absolute methanol 10ml에 재분산시켜 농도가 5000 ppm인 율피 추출물을 제조하였다. 율피 추출물 1 ml에 0.5% vanillin 시약 2 ml과 4% HCl 2 ml을 가하고 실온에서 20분간 반응시켰다. 반응이 종료된 후, UV-Vis spectrometer를 사용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 율피 추출물 대신 methanol용액을 사용하여 동일하게 처리하였으며, 표준 곡선은 (+)-catechin hydrate(Sigma Co., USA)의 농도를 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하여 구하였고 이를 이용하여 축합형 탄닌 함량 (mg catechin equivalent/g 율피) 을 구하였다.

나. 총 페놀 함량

율피 추출물의 총 페놀 함량은 Folin & Ciocalteu법에 따라 측정하였다. 농도가 100 ppm인 율피 추출물 200 μl 에 Folin-Ciocalteu reagent 800 μl 을 가하고, 10분 후에 7.5% Na_2CO_3 용액 2ml을 추가하였다. 그 후, 90분간 암실에서 반응시킨 후 765nm 에서 UV-Vis spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 mg Gallic acid equivalents (GAE)/g 율피(Chestnut inner shell)로 나타내었다.

다. 총 플라보노이드 함량

율피 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Aluminium chloride colormetric 방법 (Zhishen J et al. 1999)를 통해 측정하였다. 율피 추출물을 동결건조하여 얻은 고형분은 Absolute methanol 10 ml에 재분산시켜 농도가 1000 ppm인 율피 추출물을 제조하였다. 율피 추출물 0.5 ml에 5% NaNO_2 75 μl 와 증류수 1 ml을 가한 뒤 5분간 반응시켰다. 그 후, 10% AlCl_3 시약 150 μl 를 가하고 실온에서 6분간 추가 반응 시킨 뒤 1M NaOH 500 μl 와 증류수 275 μl 를 추가하여 최종 2.5ml으로 맞춘 후 상온에서 15분간 반응시켰다. 반응종료 후 UV-Vis spectrometer를 사용하여 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 율피 추출물 대신 methanol용액을 사용하여 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 (+)-catechin hydrate (Sigma Co., USA)의 농도를 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하여 구하였고 이를 이용하여 플라보노이드 함량 (mg catechin equivalent/g 율피) 을 구하였다.

시험예 1.1 추출 용매에 따른 성분 분석

용매에 따른 축합형 탄닌 함량을 확인하기 위하여, 용매로 각각 물, 메탄올 수용액(30%, 50% 및 70%), 에탄올 수용액(30%, 50% 및 70%), 메탄올 및 에탄올을 사용하여 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 교반하여 율피 추출물을 제조하였으며, 축합형 탄닌 함량을 계산하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분			축합형 탄닌 함량 (mg 카테킨/g 율피)	플라보노이드 함량 (mg 카테킨/g 율피)
실시예1.2	물		95.63	255.07
실시예2.1	에탄올	30%	118.21	264.81
실시예2.2		50%	193.47	481.61
실시예2.3		70%	172.15	451.15
실시예3.1	메탄올	30%	115.28	260.45
실시예3.2		50%	192.97	479.82
실시예3.3		70%	170.45	448.21

표 1에 나타낸 바와 같이, 축합형 탄닌 및 플라보노이드는 모두 50% 알콜 수용액에서 가장 높은 함량으로 추출

되었으며, 알코올의 농도가 50% 이상 증가하면 추출함량이 감소되는 경향을 나타내었다.

[0085] 시험예 1.2. 추출 온도에 따른 성분 분석

[0086] 추출온도 및 용매에 따른 축합형 탄닌, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량을 확인하기 위하여, 용매로 각각 물(실시예 1), 50% 에탄올(실시예 2.2), 50% 메탄올(실시예 3.2), 1%(w/v) NaOH(실시예 4), 2%(w/v) NaOH(실시예 5)을 사용하여 율피 추출물을 제조하였으며, 추출온도에 따른 축합형 탄닌 함량을 확인하기 위하여 25 °C, 60 °C 및 90 °C에서 30분 동안 교반하여 율피 추출물을 제조하였다. 이는 하기 표 2에 나타내었다(단위: mg 카테킨/g 율피).

표 2

[0087]

구분		실시예 1	실시예 2.2	실시예 3.2	실시예 4	실시예 5
축합형 탄닌	25 °C	85.13	171.30	172.47	240.80	238.63
	60 °C	95.63	193.47	192.97	241.97	244.47
	90 °C	100.97	229.97	226.30	244.63	228.13
총 페놀	25 °C	221.37	242.74	211.11	-	-
	60 °C	287.18	521.79	464.53	470.94	473.93
	90 °C	411.11	558.12	510.26	463.67	457.69
총 플라보노이드	25 °C	237.07	446.94	438.57	699.25	708.82
	60 °C	255.61	481.61	479.82	765.02	775.78
	90 °C	292.08	593.42	602.39	831.39	764.42

[0088] 표 2에 나타낸 바와 같이 추출 시 용매에 염기를 첨가하여 추출한 율피 추출물에서 총 페놀류, 축합형 탄닌 및 총 플라보노이드가 모두 증가하여 추출되는 것으로 나타났으며, 추출온도가 높을수록 유용성 성분이 많이 추출되는 것을 확인하였다.

[0089] 시험예 2. 소취력 측정

[0090] 율피 추출물의 구취제거 효과를 확인하기 위하여 Manual SPME-GC 방법을 이용하여 구취의 주요 원인 물질인 메틸머캅탄에 대한 소취력 측정 실험을 실행하였다. 농도가 500,000 ppm인 율피 추출물 1ml을 메틸머캅탄(50 ppm)과 혼합하여 밀봉한 뒤, 율피 추출물과 메틸머캅탄이 담긴 밀봉된 바이알을 37 °C에서 10분간 반응시켜 바이알의 head space에 휘발성 물질이 포집되도록하였다. 그 후, SPME fiber; 100 μ m PDMS (Supelco)를 이용하여 head space에 포집된 메틸머캅탄을 10분간 흡착시킨 뒤, 메틸머캅탄이 흡착된 SPME fiber를 GC injector에 바로 injection(250°C)하여 fiber에 흡착된 냄새성분을 탈착시키면서 분석하였다. 대조군으로 율피 추출물 대신 물을 사용하여 소취력을 측정하였다.

표 3

[0091]

구분		메틸머캅탄	대조군	실시예 1	실시예 2.2	실시예 3.2	실시예 4	실시예 5
60 °C	peak area	223325.7	218591.2	163858.0	150930.6	141164.6	124529.0	111114.8
	소취력(%)	-	2.12	26.6	32.42	36.79	44.26	50.25
90 °C	peak area	223325.7	218434.9	156637.3	125967.3	136403.1	106990.9	119254.7
	소취력(%)	-	2.19	29.86	43.59	38.92	52.09	46.6

[0092] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이 추출 온도가 증가할 수록 메틸머캅탄에 대한 소취력이 향상되었으며, 이는 총 페놀, 축합형 탄닌 및 총 플라보노이드 함량 증가와 유사한 경향으로 나타났다. 또한 염기 처리 시 추출물의 소취력이 크게 향상되었으나, 염기의 함량이 2% 이상인 경우 함유되는 경우 추출온도가 높으면 소취력이 저하되는 것을 확인하였는데, 이는 율피에 함유된 구취제거에 유효한 성분들이 고온 및 고농도의 염기에서 파괴되는 것에서 기인한다.

시험예 3. 구강세균에 대한 항균실험

본 발명에 따른 율피 추출물이 충치의 원인 세균인 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)를 이용하여 균주를 억제하는 효과가 있는지 조사하였다. 동결건조 상태의 충치균인 스트렙토코커스 뮤탄스(KCCM 11823)를 BHI 액체배지에 현탁하고 37℃에서 24시간 배양하여 균을 활성화시킨 다음 다시 BHI 고체배지에 도말 후 24시간 동안 배양하였다. 항균력 테스트로 페이퍼 디스크 검사법을 이용하여 실험을 진행하였으며 50% 에탄올을 이용하여 90℃에서 추출한 율피 추출물은 각각 0.5, 1, 2 mg/disc 농도로 처리하였고, 대조군은 5% 페놀용액과, BHI 액체배지를 이용하여 실험을 진행하였다. 이에 최적 배양조건에서 24시간 배양한 후 생육저지환의 크기(mm)를 측정하였고, 이에 기초하여 항균활성을 검증하였으며, 이를 하기 표4에 나타내었다.

표 4

구분	율피 추출물(1 ml)			BHI 배지	5% 페놀
처리농도	0.5 mg/disc	1 mg/disc	2 mg/disc	1 mg/disc	1 mg/disc
생육저지환(mm)	5	8	9	-	11

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 율피 추출물의 농도가 증가함에 따라 스트렙토코커스 뮤탄스에 대한 생육저지환 크기역시 증가하는 것으로 조사되어 항균 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 율피 추출물에 다량 함유된 탄닌 성분이 미생물 세포벽의 단백질과 반응하여 미생물의 효소활성이 저해되어 항균효과를 나타내는 것으로 추측된다.

시험예 4. 항산화효과

추출용매 및 추출온도에 따른 율피 추출물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능소거능을 측정하였다. 농도가 1000 ppm인 실시예 1, 실시예 2.2 (50% ethanol), 실시예 3.2 (50% methanol), 실시예 4 (1% NaOH), 실시예 5 (2% NaOH)의 율피 추출물 500 μ l에 DPPH(1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl) 시약 (6×10^{-5} mol/L in ethanol) 500 μ l를 가하여 30분간 암실에서 반응시킨 뒤 UV-Vis spectrometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화력은 mM Trolox equivalent/g 율피(chestnut inner shell)로 나타내었으며 이를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

구분	실시예 1	실시예 2.2	실시예 3.2	실시예 4	실시예 5
항산화력	25℃	159.79	170.20	169.75	-
	60℃	162.60	172.56	170.66	168.68
	90℃	164.96	174.61	173.47	169.67

표 5에 나타난 바와같이, 항산화력은 50 %에탄올 수용액으로 90 ℃dpt 추출한 율피 추출물에서 가장 높은 효능을 가지는 것으로 확인되었으며, 2% NaOH 수용액의 경우 추출온도가 증가할수록 항산화력 또한 감소되는 것으로 확인되어 소취력테스트와 유사한 경향을 보였다.

시험예 5. 초음파 처리에 따른 소취력 테스트

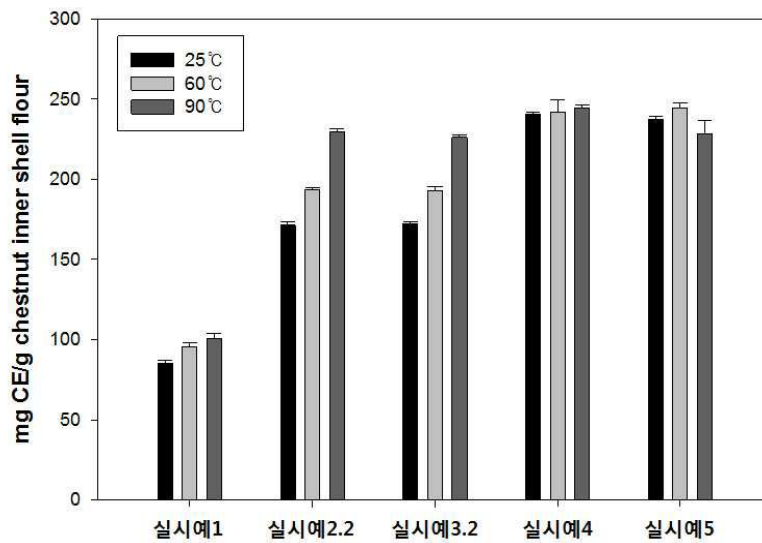
추출 시 초음파 처리 및 초음파 조사시간에 의한 효과를 측정하였다. 초음파 추출기(SEEC-SONIC II, UL-Tech, Korea)를 사용하여 25 ℃, 20 kHz, 750 watt 및 20 amplitude 조건에서 초음파를 발생시켜 처리하였으며, 온도를 일정하게 유지하기 위하여 순환식 항온 수조를 연결하여 사용하였다. 초음파는 각각 0, 10, 30, 45, 60, 90 및 120 분간 조사한 뒤, 실시예 1.2의 방법으로 율피 추출물을 제조하여 소취력 테스트를 수행하였으며 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

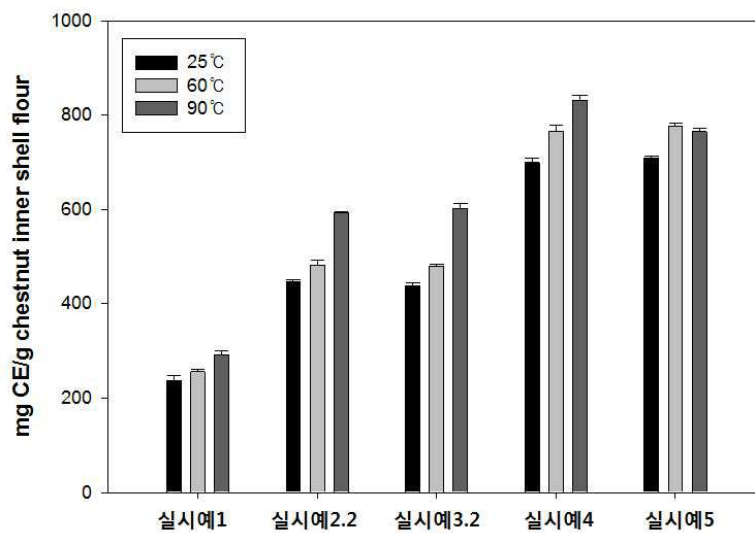
	메틸머 캡탄	실시예 1.2	실시예 6.1					
조사시간	-	0	10	30	45	60	90	120
peak area	223325	163858	163250	162134	156997	159901	163920	165037
소취력(%)	0	26.6	26.9	27.4	29.7	28.4	26.6	26.1

도면

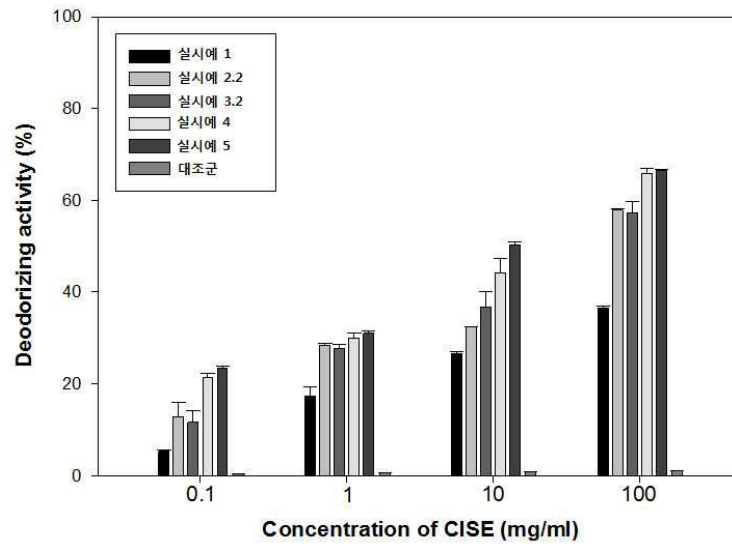
도면1



도면2



도면3



도면4

