(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0136610
(43) 공개일자 2018년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 6/08 (2006.01) *A61C 5/70* (2017.01)
A61K 6/00 (2006.01) *A61K 6/02* (2006.01)
A61K 6/087 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 6/08 (2013.01)
A61C 5/70 (2017.02)
(21) 출원번호 10-2017-0074928
(22) 출원일자 2017년06월14일
심사청구일자 2017년06월14일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(주)하이텍
광주광역시 북구 첨단과기로208번길 50 (오룡동,조선대학교첨단산학캠퍼스본부동1층)
(72) 발명자
김수관
광주광역시 서구 풍암중앙로 68, 104동503호 (풍암동, 금호아파트)
이숙영
광주광역시 남구 봉선2로 96-14, 무등파크 2차 202동 1107 (봉선동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박윤호

전체 청구항 수 : 총 15 항

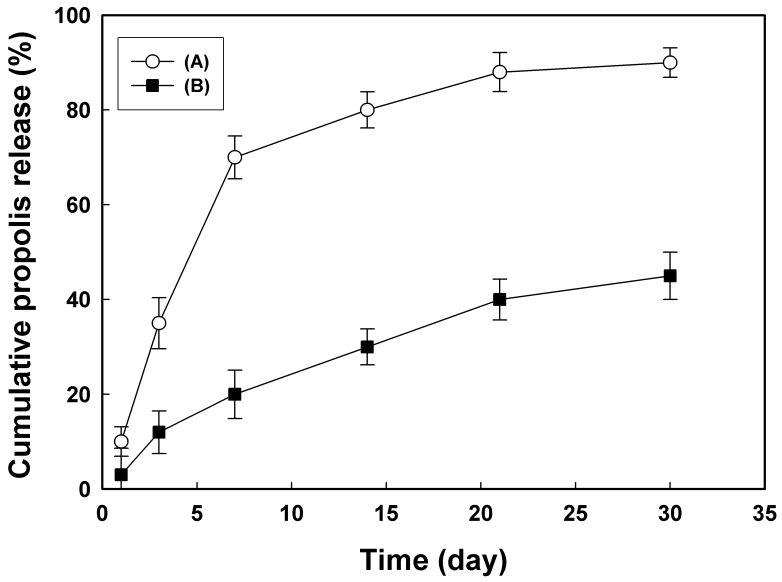
(54) 발명의 명칭 **유치관용 조성물 및 이를 이용한 항균성 유치관과 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 유치관용 조성물 및 이를 이용한 항균성 유치관과 그 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 유치관 조성물은 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~50중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~30중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%를 포함하며, 본 발

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도41



명에 따른 유치관용 조성물은 생체 적합성이 우수하면서도 상대적으로 높은 강도와 저감된 취성(brittleness)에 더하여, 상대적으로 우수한 열성형 특성을 가지며, 우수한 항균물질 서방출성(sustained-releasing property)을 지니므로 항균성 유치관 성형에 유용하며, 본 발명에 따른 항균성 유치관은 천연 항균 물질을 서방출(sustained releasing)함으로써 구강 내 유해 세균의 증식을 억제하여 유치(primary teeth) 보호 및 구강 질환의 예방에 효과적이면서도 인체에 무해함과 아울러, 높은 생체 적합성 및 강도와 심미성, 그리고 저감된 취성을 지니며, 또한 천연 유치의 색상과 실질적으로 동일한 쉐이드 가이드(shade guide)를 용이하게 실현할 수가 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 6/0073 (2013.01)
A61K 6/024 (2013.01)
A61K 6/087 (2013.01)

(72) 발명자
손준식
서울 성동구 옥수1동 514-29
한형렬
광주 서구 치평로 15, 201동 704호 (치평동, 라인대주아파트)
강경록
광주광역시 동구 동명로14번길 44, 상명빌라 302호
김복희
광주광역시 동구 천변우로 329-5, 고운하이츠 1차 604호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1425096965
부처명 중소기업청
연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 도약기술개발사업(조사분석사업명:산학연협력기술개발)
연구과제명 항균소재가 담지된 나노입자 함유-열가소성 복합물질로 구성된 기능성 유치관 개발
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~60중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~40중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%로 구성되는 유치관용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기한 상용화제가 폴리메틸메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate):PMMA), 폴리메틸아크릴레이트(poly(methyl acrylate): PMA), 폴리에틸렌글리콜(poly(ethyleneglycol):PEG), 락트산-글리콜산 공중합체(poly(lactic-co-glycolic acid):PLGA) 및, 글리시딜 메타크릴레이트(poly(glycidyl methacrylate):GMA)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 적어도 1종의 상용화제인 유치관용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기한 무기 충진제가 실리카(SiO_2), 수산화 아파타이트, 삼인산칼슘, 생체 유리, 생체 결정화 유리 및, 알루미나로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 적어도 1종의 무기 충진제인 유치관용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기한 유치관용 조성물이 천연 항균 물질 담지 나노입자를 전 조성물 중량 기준으로 0.02~2중량% 더욱 포함하는 유치관용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기한 천연 항균 물질 담지(carrying) 나노입자가 제올라이트, 클레이, 알루미노실리케이트, 알루미노포스페이트, 실리코알루미노포스페이트, 이산화규소, 티타늄옥사이드 및, 산화알루미늄으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 적어도 1종의 담지체인 유치관용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기한 나노입자가 평균 입경 50~150nm인 유치관용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기한 천연 항균 물질이 프로폴리스, 베르베린, 로즈마린산, 카테킨 및, 나린진으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 천연 항균 물질인 유치관용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기한 천연 항균 물질이 지용성 프로폴리스로서 담지량이 전 조성물 중량 기준으로 0.006~1.6중량%인 유치관용 조성물.

청구항 9

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기한 유치관용 조성물이 쉐이드(shade) 조색을 위한 황색 안료 0.01~0.09 phr(per hundred resin) 및 적색 안료 0.01~0.09 phr의 안료 혼합물을 더욱 포함하는 유치관용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기한 안료 혼합물이 황색 안료 : 적색 안료 = 0.08phr:0.02phr의 혼합물로서 쉐이드 가이드(shade guide) A2 색조를 발현하도록 제형화된 유치관용 조성물.

청구항 11

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 유치관용 조성물의 사출 성형에 의해 형성되는 항균성 유치관.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기한 항균성 유치관이 황색 안료 : 적색 안료 = 0.08phr:0.02phr의 혼합물이 포함되어 쉐이드 가이드(shade guide) A2 색조를 발현하는 항균성 유치관.

청구항 13

(A) 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~60중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~40중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%로 구성되는 유치관용 조성물을 혼련(kneading)하여 압출한 후 커터로 절단하여 칩, 펠릿, 또는 그레인 형태의 매트릭스 수지를 제조하는 단계와,

(B) 평균 입경 50~150nm의 나노입자를 열처리하여 건조시킨 후, 천연 항균 물질 수용액에 분산시켜 교반하고, 회수하여 건조시켜 천연 항균 물질 담지 나노입자를 제조하는 단계와,

(C) 상기한 매트릭스 수지와 천연 항균 물질 담지 나노입자를 컴파운딩한 후 사출 성형하여 유치관을 형성하는 단계를 포함하는

항균성 유치관의 제조방법.

청구항 14

제14항에 있어서, 상기한 단계 (A)에 후속하여 40~150kGy의 전자선 조사 단계를 더욱 수행하는 항균성 유치관의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기한 단계 (A)에서 황색 안료 0.01~0.09 phr 및 적색 안료 0.01~0.09 phr의 안료 혼합물을 더욱 포함시키는 항균성 유치관의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유치관용 조성물 및 이를 이용한 항균성 유치관과 그 제조방법에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 생체적합성이 우수한 생분해성 고분자 매트릭스 수지와, 상대적으로 높은 강도와 저감된 취성(brittleness), 심미성 및, 우수한 항균 물질 서방출성(sustained-releasing property)을 부여하기 위한 여러 충진제(fillers)를 포함하는 유치관용 조성물 및, 상기한 유치관용 조성물로 성형되어 천연 항균 물질을 서방출함으로서 구강 내 유해세균의 증식을 억제하여 유치(primary teeth)의 보호 및 구강 질환 예방에 효과적인 항균성 유치관 및 그 효과적인 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로, 치관(crown)이란 치은선 위쪽의 구강 내에 노출되어 있는 치아머리 부분을 의미하는 임상적 치관, 또는 법랑질에 둘러싸여 있는 부분을 의미하는 해부학적 치관으로 정의되며, 치아의 저작(chewing) 및 심미 기능과 발성에 기여한다.

[0003] 유치는 생후 6~8개월경부터 시작하여 약 2년여에 걸쳐 완성되는 치열로서, 유치는 영구치가 나올 공간을 확보함과 아울러 영구치가 나오는 길을 안내하는 역할을 하므로 유치의 손상이나 조기 손실은 영구치의 부정교합이나 덧니의 원인이 될 수 있음은 물론, 안면 골격의 불균형이나 발음 부정확, 영구치에 대한 충치 유발, 저작상의 문제로 인한 영양 불균형이나 소화 장애를 일으킬 수 있다.

[0004] 근래 들어, 인스턴트식품 및 설탕함유 식품 환경에 많이 노출되는 어린이들은 영구치가 생성되기 전 조기에 충치가 발생하여 불량 치아로 되는 빈도가 증가하고 있는 추세에 있다.

[0005] 특히, 이러한 불량 치아 중에서도 충치로 인한 유치 손상이 심하여 치아 길이가 짧아진 경우나 치근에 충치가 발생한 경우, 또는 유치의 파절로 인하여 치근만 남은 경우에는, 인공 유치관을 이용하여 수복 또는 보철함으로

써 치아의 약해진 기능 또는 상실된 기능을 회복 및 유지시켜 줄 필요가 있다.

[0006] 이러한 치관보철(crown prosthesis)은 치관부의 치질 결손이 크고 치아의 충전으로는 그 기능 회복이 곤란한 경우에 행하여지며, 치관보철은 씌우는 면적 및 형태에 따라 전부관과 국부관으로 분류될 수 있고, 그 소재에 따라 금 합금이나 은 합금 또는 니켈 합금 등으로 된 금속관, 도재를 이용한 세라믹관, 그리고 합성수지를 이용한 레진관으로 대별될 수 있다.

[0007] 종래의 인공 치관 대부분은 단순 보철물 수준으로 이용되어 왔으며, 일부 무기 코팅재를 이용한 항균 치관이 제안되어 있기는 하지만, 충치질환에 노출되기 쉬운 소아 유치의 보건상태를 고려한 항균물질 서방출형 치관은 제안되어 있는바 없다.

[0008] 또한 인공치관은 그 주변부에 주위염 및 치석이 생기기 쉽다는 문제점이 있다.

[0009] 치관 또는 유치관에 관한 전형적인 종래의 기술로서는 하기의 것들을 들 수 있다.

[0010] 한국 등록특허공보 제10-1071554호(2011.10.04. 등록)는 지르코니아 또는 알루미나와, 사출 성형 시 연성 부여를 위한 중합체와, 조색제를 혼합하고, 가열하여 사출 성형한 다음, 취성 약화를 위해 중합체를 추출하고 탈지한 후 소결하고, 연마하여 광택을 내기 위해 바렐 가공하는 유치관의 제조방법을 제안하고 있으며, 한국 등록특허공보 제10-1287812호(2013.07.15. 등록)는 상악 전유치의 충치부 제거 노출 외형부에 끼워지는 요부가 기부에 구비되고, 상기한 상악 전유치에 합치되는 하악 전유치에 합치될 수 있는 외형부가 구비되며, 설측면 쪽에 관통구멍이 형성되어 있는 세라믹 유치관을 제안하고 있으나, 이들은 모두 세라믹 유치관에 대한 것으로서 서방출형 항균성 레진 치관과는 전혀 무관하다.

[0011] 또한 한국 등록특허공보 제10-1237103호(2013.02.19. 등록)는 치과용 보철의 외표면에 양극산화(anodizing) 코팅된 티타늄 산화막으로 된 보호층과, 나노실버와 티타늄으로 된 완충층과, 나노실버로 코팅된 항균층으로 구성되는 항균 코팅 처리된 치과용 보철을 개시(開示)하고 있으며, 한국 등록특허공보 제10-1477066호(2014.12.22. 등록)는 질소 도핑 티타니아 나노튜브 코팅층을 갖는 어버트먼트(abutment)를 포함하며 상기 질소 도핑 티타니아 나노튜브 코팅층이 항생제 및 폴리락트산 혼합물을 포함하는 치과용 임플란트를 개시하고 있으나, 전자는 무기물로서의 은 나노 코팅에 의한 항균 효과를 발현하며, 후자는 폴리락트산으로 인캡슐레이션(encapsulation)된 항생제가 질소 도핑 티타니아 나노튜브 내부로부터 용출된 후 폴리락트산이 생분해됨에 따라 항생제의 약리 효과가 서서히 발현되도록 함으로써 식재된 임플란트 주변 부위의 세균 감염을 예방하도록 하고 있다.

[0012] 한편, US 8,372,420 B2(2013.02.12. 특허) 및 US 8,425,927 B2(2013.04.23. 특허)는 의료용 임플란트 코팅용 조성물 및 방법을 제시하고 있으나, 이들은 이식된 의료용 임플란트, 예컨대 폴리(Foley) 카테터, 수술 배출관, 인공혈관, 기관내 및 기관절개 튜브, 또는 혈관 주입 카테터 등과 같은 카테터에 의한 세균성 콜로니 형성을 예방하도록 다양한 항생제를 방출할 수 있게 한 것으로서, 치과용 임플란트와는 무관하다.

[0013] 또한 WO 2012 096965 A1(2012.07.19. 국제공개)는 인공 관절 부품의 표면에 코팅되는 금속 부착성 담체에 다양한 항생제를 혼입시킨 어깨관절 성형술에 사용되는 보철 관절을 제안하고 있으나, 이 역시 치과용 보철과는 무관하다.

[0014] 인스턴트식품 및 설탕 함유 식품에 대한 노출 빈도가 갈수록 높아져 국내 소아의 조기 충치 유병률이 30% 이상으로 높은 최근의 실정을 고려할 때, 영구치가 정상적으로 생성될 때까지 불량치아를 효과적으로 보완 또는 대체할 수가 있는 효과적인 인공 유치관의 개발 필요성이 당업계에 오랜 기간 요망되어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 등록특허공보 제10-1071554호(2011.10.04. 등록)

(특허문헌 0002) 등록특허공보 제10-1287812호(2013.07.15. 등록)

(특허문헌 0003) 등록특허공보 제10-1237103호(2013.02.19. 등록)

(특허문헌 0004) 등록특허공보 제10-1477066호(2014.12.22. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 따라서 본 발명의 첫 번째 목적은 생체 적합성이 우수하면서도 상대적으로 높은 강도와 저감된 취성(brittleness), 그리고 상대적으로 우수한 열성형 특성을 가지는 유치관 성형에 유용한 유치관용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0017] 본 발명의 두 번째 목적은 상기한 첫 번째 목적에 더하여 우수한 항균물질 서방출성(sustained-releasing property)을 지니는 유치관용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0018] 본 발명의 세 번째 목적은 천연 항균 물질을 서방출(sustained releasing)함으로써 구강 내 유해 세균의 증식을 억제하여 유치(primary teeth) 보호 및 구강 질환의 예방에 효과적이면서도 인체에 무해한 인공 항균성 유치관을 제공하기 위한 것이다.

[0019] 본 발명의 네 번째 목적은 상기한 세 번째 목적에 더하여 생체 적합성이 우수한 생분해성 고분자 수지를 이용하면서도 상대적으로 높은 강도와 만족스러운 취성(brittleness) 특성을 지니는 항균성 유치관을 제공하기 위한 것이다.

[0020] 본 발명의 다섯 번째 목적은 높은 심미성과 상대적으로 우수한 단열성을 지니는 항균성 유치관을 제공하기 위한 것이다.

[0021] 본 발명의 여섯 번째 목적은 천연 유치의 색상과 실질적으로 동일한 쉐이드 가이드(shade guide)를 용이하게 실현할 수가 있는 항균성 유치관을 제공하기 위한 것이다.

[0022] 본 발명의 일곱 번째 목적은 상기한 제반 목적에 따른 항균성 유치관의 효과적인 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기한 본 발명의 첫 번째 목적은 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~60중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~40중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%로 구성되는 유치관용 조성물에 의해 달성될 수 있다.

[0024] 여기서, 상기한 상용화제는 폴리메틸메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate):PMMA), 폴리메틸아크릴레이트(poly(methyl acrylate): PMA), 폴리에틸렌글리콜(poly(ethyleneglycol):PEG), 락트산-글리콜산 공중합체(poly(lactic-co-glycolic acid):PLGA), 글리시딜 메타크릴레이트(poly(glycidyl methacrylate):GMA), 또는 이들의 임의의 혼합물일 수 있다.

[0025] 또한 상기한 무기 충진제는 실리카(SiO_2), 수산화 아파타이트, 삼인산칼슘, 생체 유리, 생체 결정화 유리, 알루미나, 또는 이들의 임의의 혼합물일 수 있다.

[0026] 상기한 본 발명의 두 번째 목적은 상기한 첫 번째 목적에 따른 유치관용 조성물에, 천연 항균 물질 담지(carrying) 나노입자를 전 조성물 중량 기준으로 0.02~2중량% 더욱 포함하고 있는 유치관용 조성물에 의해 달성될 수 있다.

[0027] 상기한 천연 항균 물질 담지 나노입자는 제올라이트, 클레이, 알루미노실리케이트, 알루미노포스페이트, 실리코알루미노포스페이트, 이산화규소, 티타늄옥사이드, 산화알루미늄, 또는 이들의 임의의 혼합물일 수 있다.

[0028] 상기한 나노입자는 평균 입경 50~150nm일 수 있다.

[0029] 또한 상기한 천연 항균 물질은 프로폴리스, 베르베린, 로즈마린산, 카테킨, 나린진, 또는 이들의 임의의 혼합물일 수 있다.

[0030] 특히, 상기한 천연 항균 물질은 지용성 프로폴리스일 수 있으며, 그 담지량은 전 조성물 중량 기준으로 0.006~1.6중량%일 수 있다.

[0031] 또한 상기한 유치관용 조성물은 쉐이드(shade) 조색을 위한 황색 안료 0.01~0.09 phr(per hundred resin) 및 적색 안료 0.01~0.09 phr의 안료 혼합물을 더욱 포함할 수 있다.

[0032] 특정하게는, 상기한 안료 혼합물은 황색 안료:적색 안료 = 0.08phr:0.02phr의 혼합물로서 쉐이드 가이드(shade guide) A2 색조를 발현하도록 제형화된 것일 수 있다.

[0033] 상기한 본 발명의 세 번째 내지 다섯 번째 목적은 전술한 천연 항균 물질 담지 제올라이트를 포함하는 유치관용 조성물의 사출 성형에 의해 형성되는 항균성 유치관에 의해 달성될 수 있다.

[0034] 또한 본 발명의 여섯 번째 목적은 상기한 황색 안료 및 적색 안료가 포함된 유치관용 조성물의 사출 성형에 의해 형성된 항균성 유치관에 의해 달성될 수 있다.

[0035] 상기한 본 발명의 일곱 번째 목적은 (A) 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~60중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~40중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%로 구성되는 유치관용 조성물을 혼련(kneading)하여 압출한 후 커터로 절단하여 칩, 펠릿, 또는 그레인 형태의 매트릭스 수지를 제조하는 단계와, (B) 평균 입경 50~150nm의 나노입자를 열처리하여 건조시킨 후, 천연 항균 물질 수용액에 분산시켜 교반하고, 회수하여 건조시켜 천연 항균 물질 담지 나노입자를 제조하는 단계와, (C) 상기한 매트릭스 수지와 천연 항균 물질 담지 나노입자를 컴파운딩한 후 사출 성형하여 유치관을 형성하는 단계를 포함하는 항균성 유치관의 제조방법에 의하여 달성될 수 있다.

[0036] 한편, 상기한 단계 (A)에 후속하여 40~120kGy의 전자선 조사 단계를 더욱 수행할 수도 있다.

[0037] 또한 상기한 단계 (A)에서는 황색 안료 0.01~0.09 phr 및 적색 안료 0.01~0.09 phr의 안료 혼합물을 더욱 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따른 유치관용 조성물은 생체 적합성이 우수하면서도 상대적으로 높은 강도와 저감된 취성(brittleness)에 더하여, 상대적으로 우수한 열성형 특성을 가지며, 우수한 항균물질 서방출성(sustained-releasing property)을 지니므로 항균성 유치관 성형에 유용하며, 본 발명에 따른 항균성 유치관은 천연 항균 물질을 서방출(sustained releasing)함으로써 구강 내 유해 세균의 증식을 억제하여 유치(primary teeth) 보호 및 구강 질환의 예방에 효과적이면서도 인체에 무해함과 아울러, 높은 생체 적합성 및 강도와 심미성, 그리고 저감된 취성을 지니며, 또한 천연 유치의 색상과 실질적으로 동일한 쉐이드 가이드(shade guide)를 용이하게 실현할 수가 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 실시예 1의 매트릭스 수지 펠릿을 나타내는 사진이다.

도 2는 실시예 3의 매트릭스 수지 펠릿을 나타내는 사진이다.

도 3 및 도 4는 각각 실험예 1의 베르베린의 세포생존율에 대한 그래프이다.

도 5 및 도 6은 각각 실험예 1의 베르베린의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과 사진이다.

도 7은 각각 실험예 1의 로즈마린산의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 8 내지 도 12는 각각 실험예 1의 카테킨 EGCG의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 13 및 도 14는 각각 실험예 1의 카테킨 ECG의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 15는 실험예 1의 카테킨 EC의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 16은 실험예 1의 카테킨 EGC의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 17 내지 도 20은 실험예 1의 카테킨 4종 각각에 대한 세포생존율에 의한 생체 안전성 결과를 나타내는 그래프이다.

도 21은 실험예 1의 나린진의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 22 및 도 23은 각각 실험예 1의 프로폴리스의 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 24는 실험예 1의 프로폴리스에 대한 세포생존율에 의한 생체 안전성 결과를 나타내는 그래프이다.

도 25 및 도 26은 각각 실험예 2의 수용성 및 지용성 프로폴리스의 구강 유해균에 대한 항균 시험

결과사진이다.

도 27 및 도 28은 각각 실험예 2의 프로폴리스의 상 형태 별 및 배합 농도 별 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과사진이다.

도 29 및 도 30은 각각 실험예 2의 열처리에 따른 프로폴리스의 항균력을 나타내는 항균 시험 결과 사진이다.

도 31 및 도 32는 각각 비교예 1에서의 제올라이트의 CHX 담지 전후의 주사전자현미경(SEM) 사진이다.

도 33은 비교예 1에서의 순수 제올라이트, CHX 및, CHX 담지 제올라이트의 ATR-FTIR 스펙트럼이다.

도 34는 실시예 4에서 제조된 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 제올라이트 나노입자 벌크를 나타내는 사진이다.

도 35는 실시예 4의 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 HPLC 스펙트럼이다.

도 36은 실시예 4의 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 제올라이트 나노입자의 SEM 사진이다.

도 37은 실시예 4의 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 ATR-FTIR 프로파일이다.

도 38은 실시예 5의 펠릿을 나타내는 사진이다.

도 39는 실험예 3의 제올라이트에 담지된 CHX의 방출거동을 HPLC로 분석한 그래프이다.

도 40은 실험예 3의 CHX가 담지된 제올라이트 및 아크릴 레진에 대한 항균시험 결과 사진이다.

도 41은 실험예 3에서 실시예 4 및 실시예 5의 프로폴리스 방출 거동을 나타내는 그래프이다.

도 42는 실험예 3의 실시예 5의 항균 효과를 나타내는 사진이다.

도 43은 실험예 3의 실시예 5의 용출액에 대한 구강 유해균에 대한 항균 시험 결과를 나타내는 사진이다.

도 44는 실험예 4의 열분해 분석 결과 그래프이다.

도 45는 실험예 4의 열중량 분석기를 이용한 열분해 분석 결과 그래프이다.

도 46은 실시예 6의 항균성 유치관 제조에 대한 공정도이다.

도 47 및 도 48은 각각 실시예 6에서 제조한 항균성 유치관의 예시 사진이다.

도 49는 실험예 5에서의 굴곡강도 측정용 시편에 대한 사진이다.

도 50은 실험예 6에서의 제올라이트 무담지 펠릿(대조군)에 대한 항균 시험 결과 사진이다.

도 51은 실험예 6에서의 제올라이트 담지 펠릿(대조군)에 대한 항균 시험 결과 사진이다.

도 52는 실험예 6에서의 제올라이트 담지 펠릿의 MTT 검정법에 의한 생체안전성(세포독성)을 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 53은 실험예 6에서의 피부자극 테스트 결과를 나타내는 도면이다.

도 54는 실시예 6 시제품에 대한 ISO 10993에 의거한 세포독성 반응등급 0등급임을 나타내는 공인성적표이다.

도 55 및 도 56은 각각 실시예 6 시제품에 대한 ISO 10993-10에 의거한 구강점막 자극 없음을 나타내는 육안 및 현미경 관찰에 의한 공인성적표이며, 도 57은 조직 시편에 대한 현미경 염색 사진이다.

도 58은 실시예 6의 시제품에 대한 용출물 시험 공인 성적표이다.

도 59 및 도 60은 각각 실시예 6 시제품에 대한 ISO 10993에 의거한 감작성 시험 결과를 나타내는 공인성적표이다.

도 61은 실시예 6 시제품에 대한 ISO 10993에 의거한 유전독성 시험 결과 음성임을 확인하는 공인성적표이다.

도 62는 실시예 6 시제품에 대한 ASIM E2149-13a에 의거한 항균력 시험 결과를 나타내는 공인성적표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명을 첨부 도면을 참조하여 더욱 상세히 설명하기로 한다.

[0041] 본 발명에 따른 유치관용 조성물은 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~60중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~40중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%로 구성된다.

[0042] 본 발명의 유치관용 조성물에 사용되는 폴리락트산은 우수한 생체 적합성을 지니는 의료용 고분자로서 상대적으로 우수한 열가공 특성 및 강도 특성을 가지나 취성 특성이 열등하여 깨지기 쉽다는 문제점이 있으며, 이러한 폴리락트산의 유치관으로서의 열등한 취성 특성을 개선하기 위하여 본 발명은 다른 의료용 고분자로서 우수한 유연성을 지니는 폴리카플롤락톤을 사용한다.

[0043] 상기한 폴리락트산과 폴리카프롤락톤은 상호 비혼화성(immiscible)으로서 분리된 두 상 사이의 계면접착력이 부족한 비상용성(incompatible) 블랜드를 형성하므로, 본 발명에 따른 유치관용 조성물은 적합한 고분자 알로이(alloy)를 형성할 수 있도록 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리메틸아크릴레이트(PMA), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 글리시딜 메타크릴레이트(GMA), 또는 이들의 임의의 혼합물로 된 상용화제를 3~20중량% 사용한다.

[0044] 상기한 상용화제 중에서, 글리시딜 메타크릴레이트는 라디칼 반응이 가능한 이중결합 또는 축중합 가능한 에폭시기를 가지므로 폴리락트산과 폴리카프롤락톤의 계면에서 그래프트 중합하여 공중합체를 형성하므로 폴리락트산과 폴리카프롤락톤의 상용성을 효과적으로 증진시킬 수 있으므로 보다 바람직하다.

[0045] 상기한 상용화제의 함량이 전 조성물 중량 기준으로 3중량% 미만에서는 상용화 효과가 지나치게 낮아질 우려가 있고, 역으로 20중량%를 초과하면 폴리락트산과 폴리카프롤락톤의 계면에서 팽윤 현상이 발생할 우려가 커지므로 역시 바람직하지 못하다.위에서, 폴리락트산의 함량이 전 조성물 중량 기준으로 30중량% 미만에서는 강도 특성 및 열가공 특성 저하를 초래할 수 있어 바람직하지 못하며, 역으로 60중량%를 초과하면 취성 특성의 개선 효과가 미흡하게 될 우려가 있으므로 바람직하지 못하다.폴리카프롤락톤의 함량은 전 조성물 중량 기준으로 10중량% 미만에서는 취성 특성 개선 효과가 미흡하게 될 우려가 있어 바람직하지 못하며, 역으로 40중량%를 초과하면 강도 저하를 초래할 우려가 있으므로 바람직하지 못하다.

[0046] 또한 본 발명에 따른 유치관용 조성물은 γ-선, χ-선, 전자선 등과 같은 고에너지 전리방사선을 이용하여 개질할 경우, 사슬절단, 가지화 및 가교화 반응에 의해 높은 상용성을 나타내는 고분자 블랜드를 형성할 수 있다.

[0047] 폴리락트산은 높은 조사량에서 고분자사슬 절단 현상이 현저히 증대되고, 폴리카프롤락톤은 가교화가 현저히 일어나며, 40~120kGy의 전자선을 조사하는 것에 의해 두 상의 계면이 메워지거나 경계 구분이 모호해져 하나의 상처럼 나타나는 양호한 블랜드 형성에 유용할 수 있다.

[0048] 또한 본 발명에 따른 유치관용 조성물은 강도 및 내마모성과 내식성을 향상시키기 위하여, 무기 충진제로서 실리카(SiO_2), 수산화 아파타이트, 삼인산칼슘, 생체 유리, 생체 결정화 유리, 알루미나, 또는 이들의 임의의 혼합물을 전 조성물 중량 기준으로 10~30중량% 포함한다.

[0049] 상기한 무기 충진제의 함량이 10중량% 미만인 경우에는 강도, 내마모성 및 내식성 증진 효과가 충분치 못하게 될 우려가 있으며, 역으로 30중량%를 초과하면 열가공 특성이 저하될 우려가 있다.

[0050] 상기한 무기 충진제 중에서, 실리카는 경제성 및 강도, 내마모성 및 내식성 증진 효과 측면에서 보다 바람직할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 유치관용 조성물에 사용되는 지르코니아(ZrO_2)는 부식 및 독성이 없는 생체 친화적 소재이면서도 유치관에 높은 강도와 경도를 부여하여 내구성을 증대시키며, 단열성을 증가시키고, 특히 유치관에 심미성을 부여하며, 그 첨가량이 0.5중량% 미만인 경우에는 심미성 증진 효과가 충분치 못하게 될 우려가 있으며, 한편 2중량%를 초과하더라도 그 첨가량 증가에 따른 심미성 증대 효과를 기대하기 곤란하다.

[0052] 본 발명에 따른 유치관용 조성물은, 선택적 및 바람직하게는, 천연 항균 물질 담지(carrying) 나노입자를 전 조성물 중량 기준으로 0.02~2중량% 더욱 포함할 수 있다.

[0053] 상기한 천연 항균 물질 담지 나노입자로서는, 제올라이트, 클레이, 알루미노실리케이트, 알루미노포스페이트, 실리코알루미노포스페이트, 이산화규소, 티타늄옥사이드, 산화알루미늄, 또는 이들의 임의의 혼합물을 들 수 있으며, 이 중에서도 높은 천연 항균 물질 담지량 및 서방출성 측면에서 제올라이트가 특히 바람직하다.

[0054] 상기한 천연 항균 물질 담지 나노입자의 크기는 평균 입경 50~150nm이며, 50nm 미만으로 하는 것은 공정 효율성

및 경제성 측면에서 바람직하지 못할 수 있으며, 150㎚를 초과하면 천연 항균 물질의 서방출성에 영향을 미칠 수 있어 바람직하지 못할 수 있다.

[0055] 한편, 상기한 나노입자에 담지될 수 있는 천연 항균 물질로서는, 프로폴리스, 베르베린, 로즈마린산, 카테킨, 나린진, 또는 이들의 임의의 혼합물을 들 수 있으며, 바람직하게는 열적 안정성 및 항균 효과와 서방출성 측면에서 프로폴리스, 특히 지용성 프로폴리스일 수 있다.

[0056] 그러나 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니며, 구강 질환 유발균에 대한 증식 억제능을 나타내는 것으로 확인된 호장근, 신이, 마성초, 백지, 산수유, 인동덩굴, 포공영, 황금, 황련, 사간, 금은화, 유향, 후박, 천문동, 고삼, 하고초, 대황, 누른, 황백, 침향, 오미자, 가자, 진범, 연교, 백굴채, 상엽, 목향, 오배자, 세신, 배초향 추출물을 사용할 수도 있다.

[0057] 특히, 상기한 천연 항균 물질의 담지량은 나노입자 중량의 30~80% 범위, 구체적으로는 전 조성물 중량 기준으로 0.006~1.6중량%일 수 있다.

[0058] 또한 본 발명에 따른 유치관용 조성물은 본래의 치아 쉐이드(shade)와 동일 내지 극히 유사한 쉐이드 조색을 위하여 황색 안료 0.01~0.09 phr(per hundred resin) 및 적색 안료 0.01~0.09 phr의 안료 혼합물을 포함시킬 수 있으며, 특정하게는, 한국인의 가장 일반적인 치아 색조인 쉐이드 가이드(shade guide) A2 색조를 발현하도록 황색 안료:적색 안료 = 0.08phr:0.02phr의 혼합물을 포함시킬 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 항균성 유치관은 전술한 천연 항균 물질 담지 제올라이트를 포함하는 본 발명의 유치관용 조성물을 특정한 종류의 치아 형상 몰드를 이용하여 사출 성형하는 것에 의해 형성된다.

[0060] 이어서, 본 발명에 따른 항균성 유치관의 제조방법에 대하여 설명하기로 한다.

[0061] 본 발명에 따른 항균성 유치관의 제조방법은 하기의 단계를 포함한다.

[0062] (A) 매트릭스 수지 형성 단계:

[0063] 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 30~60중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 10~40중량%, 상용화제 3~20중량%, 지르코니아(ZrO_2) 0.5~2중량% 및, 무기 충진제 10~30중량%로 구성되는 유치관용 조성물을 혼련(kneading)하여 압출한 후 커터로 절단하여 칩, 펠릿, 또는 그레인을 제조한다.

[0064] 선택적으로는, 더욱 높은 상용성을 나타내는 고분자 블랜드를 형성하기 위하여, 혼련 과정에서 40~120kGy의 전자선을 조사할 수 있다.

[0065] (B) 천연 항균 물질 담지 나노입자 제조 단계:

[0066] 평균 입경 50~150㎚의 나노입자를 500~700℃에서 0.5~2시간 열처리하여 수분을 완전히 제거하여 건조시킨 후, 천연 항균 물질 수용액에 분산시켜 교반하고, 원심분리 등의 적절한 수단에 의하여 회수한 다음, 동결 건조시킨다.

[0067] (C) 유치관 제조 단계:

[0068] 상기한 매트릭스 수지와 천연 항균 물질 담지 나노입자를 컴파운딩한 후 사출 성형하여 유치관을 형성한다.

[0069] 이하 실시예 및 시험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다.

[0070] 실시예 1: 유치관 조성물을 이용한 펠릿의 제조

[0071] 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 50중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 20중량%, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA) 3중량%, 폴리메틸아크릴레이트(PMA) 2중량%, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 1중량%, 락트산-글리콜산 공중합체(PLGA) 3중량%, 지르코니아(ZrO_2) 1중량% 및, 실리카 20중량%를 혼련하여 압출하고 절단하여 매트릭스 수지 펠릿을 제조하였으며, 제조된 펠릿을 도 1에 나타냈다.

[0072] 실시예 2: 유치관 조성물을 이용한 펠릿의 제조

[0073] 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 50중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 20중량%, 글리시딜 메타크릴레이트(GMA) 8중량%, 지르코니아(ZrO_2) 2중량% 및, 실리카 20중량%를 혼련하여 압출하고 절단하여 매트릭스 수지 펠릿을 제조하였으며, 제조된 펠릿은 도 1에 나타낸 것과 동일한 색조를 나타냈다.

[0074] 실시예 3: 유치관 조성물을 이용한 펠릿의 제조

[0075] 폴리락트산(poly(lactic acid): PLA) 45중량%, 폴리카프롤락톤(Poly(ε-caprolactone: PCL) 15중량%, 글리시딜 메타크릴레이트(GMA) 8중량%, 지르코니아(ZrO_2) 2중량% 및, 실리카 30중량%를 혼련하여 압출하고 절단하여 매트릭스 수지 펠릿을 제조하였으며, 제조된 펠릿을 도 2에 나타냈다.

[0076] 실험예 1: 구강 내 유해균에 대한 천연 항균 물질의 억제능 분석

[0077] (1) 베르베린(Berberine)의 세포생존율 및 구강유해균에 대한 저해능

[0078] 황련과 매발톱나무 뿌리 유래 천연물질(isoquinoline alkaloid)인 베르베린이 구강 정상세포에 안전한지를 분석하고, 구강유해균에 대한 억제능을 분석하였다.

[0079] ① 인체 구강정상세포(keratinocyte: NHOKs) 에 대한 세포생존율 분석:

[0080] 인체 구강정상세포에 대하여 berberine을 농도별(1mg/mL ~ 100ng/mL)로 처리하여 세포생존율이 높은 최적농도를 결정하였다.

[0081] 1차 실험결과, 5ug/mL ~100ng/mL 농도군에서는 세포생존에 전혀 영향을 미치지 않았으며, 2차 실험의 결과, 0.01~1ug/mL 농도에서 대조군과 동일하게 세포생존에 무독함을 알 수 있었다.

[0082] 도 3에 100ng ~ 1mg 농도 범위에서의 세포생존율에 대한 1차 실험 결과 그래프를 나타냄과 아울러, 도 4에 1ug ~ 0.01ug 농도 범위에서의 세포생존율에 대한 2차 실험 결과 그래프를 나타냈다.

[0083] ② 3종 구강유해균에 대한 억제능 분석:

[0084] C. albicans, S. mutans, S. sobrinus에 대한 berberine의 항균활성 분석을 하단과 같이 2회 수행한 결과, 1차 실험에서는 100㎍/mL 농도에서 S. sobrinus에 대하여 강한 억제능을 보였고, 250~500㎍/mL 농도로 처리하였을 때는 S. mutans, S. sobrinus 모두에 대하여 억제능을 나타내었으며, 500㎍/mL 농도군에서는 3종균에서 억제능을 보였다. 2차 실험에서는 나노입자인 제올라이트에 담지할 분말형태의 베르베린이 분말자체로도 항균력을 나타내는지 확인하기 위하여 분말을 균 론(lawn)에 점적하여 12시간 이상 배양한 후 결과를 확인한 결과, 분말상태에서도 항균 투명대를 확인할 수 있었다.

[0085] 1차 실험 결과를 하기의 표 1 및 도 5에, 그리고 2차 실험 결과를 하기의 표 2 및 도 6에 각각 나타낸다.

표 1

[0086] Berberine의 3종 구강유해균에 대한 억제능에 대한 1차 실험 결과

	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C.albicans	*S.mutans*	*S.sobrinus*
Control	-	-	-
100㎍/mL	0.0 mm	0.0 mm	3.0 mm
250㎍/mL	0.0	1.0	3.0

500 μg/mL	1.0	2.0	4.5

표 2

[0087] Berberine의 3종 구강유해균에 대한 억제능에 대한 1차 실험 결과

	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C.albicans	*S.mutans*	*S.sobrinus*
Control	-	-	-
액상 5mg/mL	3.0 mm	4.0 mm	4.0 mm
액상 15mg/mL	4.0	5.0	5.0
액상 50mg/mL	5.0	5.0	6.0
Powder	-	3.0	3.0

[0088] (2) 로즈마린산(Rosmarinic acid)의 구강유해균 S. sobrinus에 대한 항미생물 활성 분석

[0089] 로즈마린산은 국내 자생 배초향(Agastache rugosa)과 로즈마리 유래의 천연성분으로서 3,4-디하이드록시페닐아세트산이 포함된 카페인산 에스터, 페놀 활성 화합물이며, 구강유해균 S. sobrinus에 대한 항미생물 활성을 분석하였다.

[0090] 구강유해균 S. sobrinus에 대한 억제능을 분석하였으며, 500ug/mL~2mg/mL의 농도범위로 처리한 결과, 모든 농도군에서 저해능을 나타내었으며, 1mg/mL 과 2mg/mL 에서는 특별한 차이를 보이지 않았으며, 결과를 하기의 표 3 및 도 7에 나타낸다.

표 3

[0091] rosmarinic acid의 S. sobrinus에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)
	S. *sobrinus*
Control	-
500 μg/mL	3.0mm
1mg/mL	4.0
2mg/mL	4.0

[0092] (3) 카테킨(Catechin)의 구강유해균에 대한 항균활성 분석

[0093] 충치예방, 항산화능, 발암억제, 항바이러스능, 항균, 해독, 소염작용이 있는 차나무 유래 천연물인 캬테킨에 대하여 4종의 주요 성분(EGCG, ECG, EC, EGC)에 대하여 분석하였다.

[0094] ① 카테킨 EGCG의 S. mutans, S. sobrinus, C. albicans 억제에 미치는 영향:

[0095] * EGCG의 3종 구강유해균에 대한 억제능 : EGCG를 2가지 고농도(1, 10mg/mL)로 3종의 구강균에 대하여 각각 처리한 결과, 농도 1mg/mL에서는 S. mutans와 S. sobrinus가 약 1.8mm의 투명 억제대를 보였으며, C. albicans의 경우엔 3mm 이상의 투명대를 나타냈다. 또한, 10mg/mL에서는 S. mutans와 S. sobrinus, C. albicans 모두에서 10mm 이상의 투명대를 나타냈다.

[0096] 결과를 하기의 표 4에 나타낸다.

표 4

[0097] 1mg/mL 및 10mg/mL EGCG의 S. mutans, S. sobrinus, C. albicans에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)		
	S. mutans	S. sobrinus	C. albicans
Control	-	-	-
1mg/mL	1.8 mm	1.8 mm	〉3.0 mm
10mg/mL	10.0	11.0	11.0

[0098] 1mg/mL의 S. mutans 및 S. sobrinus의 억제능에 대한 항균 시험 결과를 도 8 및 도 9에, 그리고 C. albicans의 억제능에 대한 항균 시험 결과를 도 10에 나타냄과 아울러, 10mg/mL EGCG의 C. albicans, S. mutans 및, S. sobrinus의 억제능에 대한 항균 시험 결과를 도 11에 나타냈다.

[0099] * 저농도 EGCG의 S. mutans와 S. sobrinus에 대한 억제능 :

[0100] EGCG를 3가지 저농도(15, 15, 100ug/mL)로 2종의 구강균에 대하여 각각 처리한 결과, 농도 15ug/mL에서는 S. mutans의 경우, 1.0mm, S. sobrinus의 경우 4.0mm의 투명 억제대를 보였으며, 15, 100ug/mL 농도군에서는 농도 의존적으로 두 균에 대하여 더 높은 억제능을 나타내었다.

[0101] 결과를 하기의 표 5 및 도 12에 나타낸다.

표 5

[0102] 저농도 EGCG 의 S. mutans와 S. sobrinus 에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)	
	S.*mutans*	*S.sobrinus*
Control	-	-
15㎍/mL	1.0mm	4.0mm
50㎍/mL	1.5	4.5
100㎍/mL	2.5	4.5

[0103] ② 카테킨 ECG (Epicatechin gallate)의 S. sobrinus 억제에 미치는 영향:

[0104] 15, 50, 100㎍/mL의 농도범위에서 치주질환의 주요 원인균인 S. sobrinus에 대하여 각각 처리한 결과, 3.0, 4.0, 4.0mm의 투명억제대를 나타냈으며, 50과 100㎍/mL 농도간에는 특별한 차이를 보이지 않았다.

[0105] 결과를 하기의 표 6에 나타낸다.

표 6

[0106] ECG 의 S. sobrinus 에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)
	S. *sobrinus*
Control	2.0 mm
15㎍/mL	3.0
50㎍/mL	4.0
100㎍/mL	4.0

[0107] 15㎍/mL 및 100㎍/mL의 농도에서의 항균 결과를 각각 도 13 및 도 14에 나타낸다

[0108] ③ 카테킨 EC(Epicatechin)의 구강유해균(S. mutans, S. sobrinus, C. albicans) 억제에 미치는 영향:

[0109] EC를 10mg/mL의 농도로 3종의 구강균에 대하여 각각 처리한 결과, S. mutans에서는 4mm의 투명대를, S. sobrinus에서는 7mm의 투명 억제대를, C. albicans의 경우엔 6mm의 투명대를 나타냈다.

[0110] 결과를 하기의 표 7 및 도 15에 나타낸다.

표 7

[0111] 카테킨 EC의 구강유해균에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)		
	S. mutans	S. sobrinus	C. albicans
Control	-	-	-
10mg/mL	4.0 mm	7.0 mm	6.0 mm

[0112] ④ 카테킨 EGC(Epigallocatechin)의 구강유해균(S. mutans, S. sobrinus, C. albicans) 억제능:

[0113] EGC 15, 50, 100 ug/mL의 농도군이 S. mutans, S. sobrinus, C. albicans 의 증식억제에 미치는 영향을 살펴본 결과, C. albicans 는 농도간에 억제력의 차이가 나타나지 않았으며, S. sobrinus에 대한 증식 억제력은 다른 2종의 균들에 비하여 매우 강하게 나타났다.

[0114] 결과를 하기의 표 8 및 도 16에 나타낸다.

표 8

[0115] EGC 의 C. albicans, S. mutans, S. sobrinus에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C.albicans	*S.mutans*	*S.sobrinus*
Control	-	-	-
15㎍/mL	1.5 mm	1.0 mm	4.0 mm
50㎍/mL	1.5	2.0	4.5
100㎍/mL	1.5	2.0	4.5

[0116] ⑤ 카테킨(catechin)의 세포생존율 분석을 통한 생체안전성 검증:

[0117] 4종류의 카테킨(EGCG, EGC, EC, ECG)을 농도별(1~100ug/mL)로 Raw 264.7 세포에 처리한 결과, EGCG의 경우 1~10ug/mL의 농도범위에서는 세포생존율에 영향을 미치지 않았으며, EGC를 처리한 경우에는 모든 농도범위(1~100ug/mL)에서 세포생존율에 영향을 미치지 않았으며, EC를 처리했을 때는 1~50ug/mL의 농도범위에서는 세포생존율에 거의 영향을 미치지 않았으며, ECG의 경우엔 모든 농도 범위(1~100ug/mL)에서 80% 이하의 세포생존율을 보이므로서 약간의 독성이 있음을 확인하였다.

[0118] 결론적으로 3종류의 카테킨(EGCG, EGC, EC)은 1~50ug/mL의 농도범위에서 세포에 영향을 미치지 않으므로 유효활성을 위한 분석과 기능성 측면에서 이용할 경우, 최적농도로 사용이 가능함을 실험적으로 확인할 수 있었다.

[0119] EGCG, EGC, EC, ECG에 대한 결과를 각각 도 17 내지 도 20에 나타낸다.

[0120] (4) 나린진(Naringin)의 2종 구강유해균에 대한 억제능

[0121] 500, 700㎍/mL과 1mg/mL의 농도로 2종의 구강유해균(S. mutans, S. sobrinus)에 처리한 결과, 모든 농도군에서 S. mutans 보다는 S. sobrinus를 더 강하게 억제하였으며, 700㎍/mL과 1mg/mL의 농도군에서는 2종의 균에 대한 억제력에 특별한 차이가 없음을 알 수 있었다.

[0122] 결과를 하기의 표 9 및 도 21에 나타낸다.

표 9

[0123] Naringin 의 S. mutans, S. sobrinus에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)	
	S. *mutans*	*S. sobrinus*
Control	-	-
500 μg/mL	1.0mm	2.5mm
700 μg/mL	1.5	3.0
1mg/mL	1.5	3.0

[0124] (5) 프로폴리스(Propolis)의 3종 구강유해균에 대한 억제능 및 세포생존율 분석

[0125] ① 프로폴리스 농도 0.5%, 1%를 3종의 균(C. albicans, S. mutans, S. sobrinus)에 처리하여 1,2차 실험을 진행한 결과는 하단의 그림과 같으며, 현재까지 선발하여 항균활성을 분석한 매우 선명한 억제 투명대를 나타냈다.

[0126] 결과를 하기의 표 10과 도 22 및 도 23에 각각 나타낸다.

표 10

[0127] Propolis 의 C. albicans, S. mutans, S. sobrinus에 대한 억제능

	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C. *albicans*	*S. mutans*	*S. sobrinus*
Control	-	-	-
0.5%	5.0 mm	6.0 mm	4.0 mm
1%	5.0	6.5	4.0

[0128] ② 세포생존율 분석:

[0129] 하단의 그래프와 같이 세가지 농도범위(1.25~10 ug/mL)에서 24시 간, 48시간, 72시간 세포에 처리하여 세포생존율을 확인하였다. 24시간 처리했을 경우, 모든 농도군에서 세포생존에 전혀 영향을 미치지 않았으며, 48시간 처리했을 경우에도 모든 농도군에서 80% 이상의 세포생존율을 나타냈으며, 72시간 처리했을 경우에는 10ug/mL 농도군(생존율 60%)을 제외한 다른 농도군에서는 모두 80% 또는 그 이상의 세포생존율을 보였다.

[0130] 프로폴리스의 MTT 분석에 의한 세포생존율에 대한 결과를 도 24에 나타낸다.

[0131] 실험예 2: 천연 항균 물질로서의 프로폴리스의 유치관 조성물에 대한 배합 최적 조건 분석

[0132] (1) 수용성 propolis와 지용성 propolis의 항균력 비교 분석

[0133] C. albicans을 대상균주로 하여 수용성, 지용성 프로폴리스의 항균력을 비교 분석한 결과, 수용성 프로폴리스의 경우 모든 농도군(0.137~1.10%)에서 균에 대한 항균력을 보이지 않거나 매우 미약한 항균력을 나타낸 반면, 지용성 프로폴리스는 모든 농도군(0.137~1.10%)에서 매우 탁월한 항균력을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0134] 결과를 하기의 표 11 및 표 12와 도 25 및 도 26에 각각 나타낸다.

표 11

[0135] C. albicans에 대한 수용성 propolis의 농도별 항균활성

	수용성 propolis			
	① 0.137 %	② 0.275 %	③ 0.55 %	④ 1.10 %
Control (EtOH)	-	-	-	-

C. albicans	-	-	0.1 mm	0.5 mm

표 12

[0136] C. albicans에 대한 지용성 propolis의 농도별 항균활성

	지용성 propolis [Inhibition zone (Dia, mm)]			
	① 0.137 %	② 0.275 %	③ 0.55 %	④ 1.10 %
Control (EtOH)	-	-	-	-
C. albicans	1.5~2.0 mm	2.0~2.5 mm	2.5~3.0 mm	4.0 mm

[0137] (2) 지용성 propolis의 최적농도

[0138] 제올라이트에 담지할 지용성 프로폴리스의 배합농도를 결정하기 위하여, 3종의 구강유해균(C. albicans, S. mutans, S. sobrinus)을 대상으로 0.125, 0.25, 0.5, 1.0%의 농도범위에서 항균력을 분석한 결과, 0.5%와 1.0% 사이에서 항균력에 대한 특별한 차이는 보이지 않았으며 모든 농도군에서 유의할만한 항균력을 나타냈다. 따라서 제올라이트에 담지할 최적의 농도로 0.5%를 결정하였다.

[0139] 또한 제올라이트에 담지할 프로폴리스의 형태를 결정하기 위하여 분말형 프로폴리스를 세균 론(bacterial lawn) 상에 로딩(도 27에서 8시 방향)하여 항균력 유무를 동시에 확인하였다.

[0140] 액상 프로폴리스와 파우더 프로폴리스의 항균력 비교 결과를 하기의 표 13과와 도 27에, 그리고 액상 프로폴리스의 농도별 항균력 비교 결과를 하기의 표 14와 도 28에 각각 나타낸다.

표 13

[0141] 액상 프로폴리스와 파우더 프로폴리스의 항균력 비교 결과

단위(mm)	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C. albicans	*S. mutans*	*S. sobrinus*
Control	0	0	0
0.5%	4.0	4.5	5.0
1%	4.0	5.0	5.0
powder	3.0	3.0	5.0

표 14

[0142] 액상 프로폴리스의 농도별 항균력 비교 결과

단위(mm)	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C. albicans	*S. mutans*	*S. sobrinus*
Control	-	-	-
0.125%	2.0	1.0	1.0
0.25%	2.0	1.0	1.5
0.5%	2.0	2.5	2.5
1%	3.0	4.0	4.5

[0143] (3) 열처리에 따른 propolis의 항균력 변화 분석

[0144] 프로폴리스를 120℃ 및 150℃로 각각 처리한 후 열처리에 따른 항균력 변화유무를 살펴본 결과, 항균력이 다소 약화되었으나 항균력은 유지된 상태임을 확인할 수 있었다.

[0145] 120℃에서의 열처리 결과를 하기의 표 15 및 도 29에, 그리고 150℃에서의 열처리 결과를 하기의 표 16 및 도

30에 각각 나타낸다.

표 15

[0146] 120℃로 처리 propolis의 항균력

농도(mg/mL)	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C. albicans	*S. mutans*	*S. sobrinus*
Control	-	-	-
5	-	-	-
10	-	-	-
50	1.0	0.7	1.0
100	1.0	1.5	1.5

표 16

[0147] 150℃로 처리 propolis의 항균력

농도(mg/mL)	Inhibition zone (Dia, mm)		
	C. albicans	*S. mutans*	*S. sobrinus*
Control	-	-	-
5	-	-	-
10	-	-	-
50	1.5	1.5	1.0
100	1.5	2.5	2.0

[0148] 비교예 1: CHX의 제올라이트에 대한 담지

[0149] 제올라이트에 대한 천연 항균 물질의 담지 디자인을 위하여 일반적으로 구강치료에 사용되는 클로로헥시딘(chlorhexidine, CHX)을 사용하여 선행실험을 진행하였으며, 제올라이트[H-beta, SiO_2:Al_2O_3 = 98:2 (w/w)]는 600℃에서 1시간 열처리하여 제올라이트 기공에 존재할 수 있는 수분을 완전히 제거하였다.

[0150] 제올라이트에 CHX를 담지하기 위하여 CHX 30mg을 10 mL 증류수에 녹여 CHX 수용액을 제조한 다음 제올라이트 30 mg을 투입하여 24시간 동안 교반하였으며, 이후, 원심분리기를 이용하여 제올라이트를 회수한 다음 증류수로 3회 세정하고, 동결건조하였다.

[0151] CHX 담지 전 제올라이트 입자와, 제조된 CHX 담지 제올라이트의 형태학적 특성을 주사전자현미경(SEM)을 사용하여 관찰한 결과를 도 31 및 도 32에 각각 나타냈다.

[0152] 제올라이트 입자는 평균 100 nm의 입도분포를 갖는 것을 사용하였으며 고온 열처리를 통해 제올라이트 기공에 함유되어 있는 물 분자를 완전히 제거한 다음 막자사발을 이용하여 분말화시켰으며, 제조된 CHX 담지 제올라이트는 순수 제올라이트와 형태학적으로 유사하게 관찰되었고, CHX에 의한 제올라이트의 뭉침 또는 CHX 분말 및 덩어리가 관찰되지 않아 제올라이트 기공 또는 표면에 CHX가 잘 담지된 것으로 판단되었다.

[0153] 제올라이트에 담지된 CHX를 확인하여 퓨리에 변환 적외선 전반사 분광 스펙트럼(attenuated total reflectance-fourier transform infrared:ATR-FTIR)을 측정하였으며, 그 결과를 도 33에 나타냈다.

[0154] 도 33에 그 ATR-FTIR 스펙트럼을 나타내며, 순수 제올라이트는 (a), CHX는 (b), CHX 담지 제올라이트는 (c)이다.

[0155] 순수한 제올라이트는 스펙트럼에서 H_2O에 기인한 바이브레이션(vibration)이 3,620과 3,420 cm^{-1}에서 관찰되었고, H-O-H에 스트레칭에 의한 피크가 1,640 cm^{-1}에서 관찰되었으며, Si-O 스트레칭에 의한 바이브레이션은 969-461 cm^{-1}에서 확인되었다.

[0156] CHX의 경우 1,640 cm^{-1}에서 C-N 스트레칭, 아로마틱 C-C 벤딩(bending)에 의한 피크가 1,500 cm^{-1}, N-H 스트레칭과 벤딩에 의한 피크가 2,540 및 1,520 cm^{-1}에서 확인되었다.

[0157] 그리고 CHX가 담지된 제올라이트의 경우 1,000^{-1}, 600 cm^{-1}에서 제올라이트와 CHX에 기인한 피크가 모두 관찰되어 제올라이트에 CHX가 성공적으로 담지된 것을 확인하였다.

[0158] 실시예 4: 프로폴리스의 담지 제올라이트의 제조

[0159] 상기 CHX를 제올라이트 나노입자에 담지하는 디자인을 기반으로 하여 프로폴리스를 제올라이트 나노입자에 담지하였다.

[0160] 먼저 제올라이트 나노입자(평균 100 nm)를 600℃에서 1시간 열처리하여 제올라이트 기공에 존재할 수 있는 수분을 완전히 제거한 다음 프로폴리스 10 g이 녹아 있는 수용액 150 mL 수용액에 제올라이트 20 g을 분산시킨 후 상온에서 24시 동안 교반하였다.

[0161] 이후 원심분리로 제올라이트를 회수한 다음 동결건조하여 프로폴리스가 담지된 제올라이트 나노입자를 제조하였다.

[0162] 도 34에 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 제올라이트 나노입자 벌크를 나타냈다.

[0163] 제조된 프로폴리스 담지 제올라이트 나노입자의 담지율을 HPLC로 측정하였으며, 상기한 바와 같이 프로폴리스 수용액에 제올라이트를 분산시켜 24시간 교 반 후에 원심분리로 제올라이트를 회수하고 그 수용액을 이용하여 HPLC로 잔류하는 프로폴리스를 정량함으로써 제올라이트에 담지된 프로폴리스 양을 분석하였다.

[0164] HPLC를 이용한 프로폴리스 특성피크는 플라보노이드의 한 종류인 p-coumaric acid, Quercetin, Cinnamic acid로서, 이중에서도 Qurecetin의 면적비를 이용하여 제올라이트 담지 전후의 프로폴리스 수용액을 HPLC로 분석하여 최종 제올라이트에 담지된 프로폴리스 양을 정량하였다.

[0165] HPLC 측정조건은 이동상(Mobile phase)으로 물:메탄올 = 70:30으로 하였으며 초산 0.1%를 추가하였으며, 그리고 유속은 1 mL/mim, 인젝션량은 10 ㎕하여 275 nm의 파장에서 측정하였다.

[0166] 이렇게 측정된 HPLC의 면적비를 이용하여 담지율을 측정한 결과 제올라이트에 78.58중량%가 담지된 것을 확인하였다.

[0167] 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 HPLC 스펙트럼을 도 35에 나타낸다.

[0168] 제조된 프로폴리스 담지 제올라이트의 형태학적 특성을 SEM을 이용하여 분석하였으며, 프로폴리스 담지 전후의 제올라이트 입자 형태와 크기는 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었으나, 프로폴리스가 담지된 제올라이트의 경우 제올라이트 표면에 프로폴리스가 흡착되어 나노미터 크기로 균일하게 분산되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0169] 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 제올라이트 나노입자의 SEM 사진을 도 36에 나타낸다.

[0170] 제조된 프로폴리스 담지 제올라이트 나노입자에서 프로폴리스를 확인하기 위하여 ATR-FTIR을 측정하였으며, 프로폴리스가 담지된 제올라이트의 경우 순수 제올라이트 특성피크 이외에 프로폴리스에 기인한 특성피크들이 나타남을 확인하였다.

[0171] 프로폴리스 담지 전(A) 및 후(B)의 ATR-FTIR 프로파일을 도 37에 나타낸다.

[0172] 프로폴리스 특성피크로는 3310 cm^{-1} 부근에서 O-H 스트레칭(stretching), 2920 cm^{-1} 부근에서 아로마틱 화합물의 C-H 벤딩, 1600 cm^{-1} 부근에서 아로마틱 링의 C=C 스트레칭, 1200~1400 cm^{-1} 범위에서 C-O-C 스트레칭, C-H 왜깅(wagging), CH+OH 벤딩, 861 cm^{-1} 부근에서 아로마틱 링의 바이브레이션을 관찰함으로써 프로폴리스가 제올라이트에 담지된 것을 확인하였다.

[0173] 실시예 5: 천연 항균 물질 서방출형 항균성 유치관 조성물의 제조

[0174] 실시예 2의 매트릭스 수지 펠릿에, 전 중량 기준으로 실시예 4에서 제조한 프로폴리스 담지 제올라이트를 2.6787중량%(제올라이트 1.5중량% 및 담지된 프로폴리스 1.1787중량%)의 양으로 첨가하고, 트윈 스크류 압출기(Twin screw Extruder: 한국이엠, Φ=32, L/D=40)를 이용하여 하기의 표 17과 같은 조건으로 컴파운딩을 수행한 후, 압출 성형하여 천연 항균 물질 서방출형 항균성 유치관 조성물로 된 펠릿을 제조하였다.

표 17

[0175] PLA 복합물-Zeolite의 컴파운딩 조건

Zone	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	Adapter	Die
온도(℃)	120	135	135	140	145	145	150	150	160	160	160
Melt pressure = 1 kg/㎠					Temperature = 161 ℃						
Main motor = 15 amp					Exturder-speed = 99.5 r/min						
Screw feeder = 10 rpm											

[0176] 제조된 결과물을 도 38에 나타낸다.

[0177] 실험예 3: 항균 물질 담지 제올라이트로부터의 항균 물질 방출 거동 및 항균력 평가

[0178] (1) CHX 담지 제올라이트의 방출 거동 및 항균성 평가

[0179] 제올라이트에 담지된 CHX의 방출거동을 다음과 같이 분석하였다.

[0180] 먼저 CHX 담지 제올라이트를 광중합형 아크릴레진에 분산시킨 다음 디스크 형태로 제조하고, 제조된 아크릴 레진을 인산 완충 식염수 용액(phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)에 20일 동안 침지하면서 일정한 시간에 시료를 채취하여 액체크로마토그래피로 분석하였으며, 그 방출 거동에 대한 그래프를 도 39에 나타냈다

[0181] .순수한 CHX 파우더를 직접 아크릴 레진에 혼합한 시료(a)의 경우 방출 20일 동한 CHX가 38% 방출되었고, CHX를 제올라트에이 담지하여 아크릴 레진과 혼합한 시료(b)의 경우 방출 20일 동안 14%의 CHX가 방출되어 제올라이트를 사용할 경우 고분자 기질로부터 CHX가 서서히 방출되는 것을 확인하였다.

[0182] 즉, 제올라이트를 담지체로 사용할 경우 제올라이트에 담지된 항균물질이 서서히 방출되는 것을 확인함으로서 오랜 기간 항균물질이 서방출될 수 있는 기능성 유치관의 개발이 기대되었다.

[0183] CHX가 담지된 제올라이트 혼합 아크릴 시료의 항균효과는 S. mutans를 사용하여 한천 확산 시험을 통해 확인하였으며, CHX가 담지된 제올라이트 및 아크릴 레진의 실험 결과 도 40에 나타낸다.

[0184] 먼저 입자 형태의 순수한 제올라이트(c), CHX(a), CHX가 담지된 제올라이트의 경우 순수한 제올라이트는 항균효과가 없는 것으로 관찰되었고, CHX가 담지된 제올라이트의 경우 항균 효과가 우수하게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0185] 그리고 CHX가 담지된 제올라이트가 혼합된 아크릴 레진(b)은 CHX 분말을 직접 혼합하여 제조한 아크릴 레진(c) 대비 S. mutans의 억제 존이 작게 나타났지만 항균효과가 있는 것으로 관찰되었으며, 순수한 제올라이트를 혼합하여 제조한 아크릴 레진의 경우 항균 효과는 관찰되지 않았다.

[0186] 결과적으로, 항균물질을 담지한 제올라이트 및 이러한 제올라이트를 함유하는 고분자 레진의 경우 순수한 항균물질을 직접 고분자 레진에 혼합하여 사용하는 것보다 제올라이트를 담지체로 사용할 경우 적절한 농도의 항균물질이 오랜 기간 동안 안정적으로 서방출되어 우수한 항균효과가 나타남을 확인하였다.

[0187] (2) 프로폴리스 담지-제올라이트의 방출 거동 및 항균성 평가

[0188] 제올라이트에 담지된 프로폴리스의 방출거동을 다음과 같이 분석하였다.

[0189] 먼저 실시예 4의 프로폴리스가 담지된 제올라이트 만을 37℃의 PBS에 침지하여 정적인 상태로 방치하고, 이후 시간별로 용출액을 회수하여 상기한 바와 같이 HPLC로 분석하여 방출 거동을 측정하였다. 이때 프로폴리스 방출량 분석은 프로폴리스 특성피크인 쿠에르세틴(Qurecetin) 피크의 면적비를 사용하였다.

[0190] 또한 프로폴리스가 담지된 제올라이트를 포함하는 실시예 5의 조성물 펠릿으로부터의 프로폴리스의 방출 거동 측정 역시 37℃의 PBS에 침지하여 상기와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0191] 결과:

[0192] 실시예 4의 프로폴리스 담지 제올라이트 만으로부터의 프로폴리스의 방출 거동은 침지 5일 이내에 50%가 방출되었고 침지 7일 이내에 대략 70% 이상의 프로폴리스가 방출되었음. 침지 7일 이후부터는 방출량이 크게 감소하였으며, 부연하면 프로폴리스 담지 제올라이트의 경우 침지 7일 이내에 대부분의 프로폴리스가 방출되었다.

[0193] 반면에, 프로폴리스 담지 제올라이트가 PLA/PCL 매트릭스 수지 중에 분산된 실시예 5의 경우 침지 5일 이내에 약 20%의 프로폴리스가 방출되었고, 이후 안전정적인 방출이 이루어지면서 침지 30일에는 약 40% 이상 방출되었다.

[0194] 즉, PLA/PCL 매트릭스 수지 중에 함유된 프로폴리스 담지 제올라이트로부터 프로폴리스의 방출은 PLA/PCL 고분자 매트릭스에 의해 급격한 방출이 아닌 지속적이고 안정적인 서방출 거동이 나타남을 확인하였으며, 30일 동안 방출 후에도 약 50% 이상의 프로폴리스가 매트릭스 수지 중에 잔류하는 것을 확인하였다.

[0195] 도 41에 프로폴리스 방출 거동 그래프를 나타내며, (A)는 프로폴리스 담지 제올라이트 나노입자에 대한 것을, 그리고 (B)는 프로폴리스 담지 제올라이트 함유 PLA/PCL 매트릭스 수지를 나타낸다.

[0196] 제조된 프로폴리스 함유 제올라이트를 포함하는 실시예 5의 항균 효과를 C. albicans를 사용하여 한천 확산 실험(agar diffusion test)를 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 42에 나타냈다.

[0197] 대조(control)로 사용된 CHX 파우더(A)의 경우 억제 존(inhibition zone)이 명확하고 크게 나타나는 것을 관찰하였고, 프로폴리스가 담지된 제올라이트를 포함하는 실시예 5의 (B)도 CHX와 유사한 억제 존을 나타냈으나, 순수한 제올라이트(C)의 경우 항균효과가 없는 것을 관찰할 수 있었다(도 42의 좌측 도면).

[0198] 그리고 실시예 5의 프로폴리스 담지 제올라이트를 함유한 PLA/PCL 매트릭스 수지의 용출액(2)을 이용한 항균 효과의 경우 control인 CHX 수용액(1) 대비 억제 존은 작지만 분명한 항균 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 42의 우측 도면).

[0199] 이어서, 실시예 5의 프로폴리스 담지 제올라이트를 함유한 PLA/PCL 매트릭스 수지 중의 제올라이트에 담지된 프로폴리스를 에탄올로 용출하여 3종의 구강균에 대한 항균력을 분석한 결과, 정상적인 항균활성을 유지하고 있음을 확인하였으며, 결과를 하기의 표 18 및 도 43에 나타낸다.

표 18

[0200] 프로폴리스 담지-제올라이트의 구강유해균 3종에 대한 항균력

농도(mg/mL)	Inhibition clear zone (diameter, mm)		
	C. albicans	*S. mutans*	*S. sobrinus*
Control	-	-	-
5	-	-	-
10	-	-	-
50	2.0	1.0	1.0
100	3.5	1.5	2.0

[0201] 실험예 4: 매트릭스 수지와 항균 물질 담지 제올라이트 나노입자의 혼합 조건 확립

[0202] 열중량분석기(TGA)를 이용한 프로폴리스 담지 제올라이트의 열분해 분석결과, 하기의 표 19 및 도 44에 나타낸 바와 같이 상온에서 120℃까지 약 3.8% 중량 감소가 1차로 일어났으며, 2차 중량감소는 120℃에서 700℃까지 서서히 일어나며 전체 중량 감소가 24.4%로 나타남을 확인할 수 있었다.

표 19

[0203] 열중량분석기(TGA)를 이용한 프로폴리스 담지 제올라이트의 열분해

Sample	T_D^i(℃) at air	Residue(%) at air
Zeolite	57.8	75.6

[0204] DSC(Differential Scanning Calorimeter)를 이용한 PLA compound의 열분해 분석 결과, 실시예 5는 PLA와 PCL이 블렌딩되어 있는 것을 확인하였으며(PLA Tm=15 9℃), Zeolite가 포함된 경우 PLA의 TC가 높아지는 것도 확인하였다.

[0205] 결과를 하기의 표 20 및 도 45에 나타낸다.

표 20

[0206] DSC를 이용한 PLA compound의 열분해 분석

Sample	Tg	Tc	Tm
PLA 복합물질(상단 그래프)	-	87.7	55.30 159.6
PLA/zeolite(하단 그래프)	-	125.8	61.3 159.7

[0207] PLA 복합 매트릭스 수지와, PLA 복합 매트릭스 수지에 항균 물질 담지 제올라이트 컴파운드의 용융 인덱스(melting index:MI) 측정 결과, 제올라이트를 컴파운딩한 후 MI가 향상되었음을 확인하였으며, 결과를 하기의 표 21에 나타낸다.

표 21

[0208] PLA 복합 매트릭스 수지와, 실시예 5의 용융 인덱스

Sample		190℃	210℃
PLA 복합 매트릭스 수지	무 게(g/min)	3.0217	5.8923
		3.1392	4.4424
		2.9967	4.2714
	평 균(g/min)	3.05	4.87
PLA 복합 매트릭스 수지 + Zeolite	무 게(g/min)	3.4962	5.7071
		3.2639	5.4250
		3.4805	5.8644
	평 균(g/min)	3.41	5.67

[0209] 실시예 6: 항균성 유치관의 제조

[0210] 실시예 5의 조성물에 하기의 표 22에 나타낸 바와 같은 양으로 황색 및 적색 안료를 혼합하고, 도 46에 나타낸 바와 같은 공정순서에 따라 항균성 유치관을 사출 성형하였다.

표 22

[0211]

Yellow	Red	Yellow	Red
0.02 phr	0.001 phr	0.02 phr	0.002 phr
0.04 phr		0.04 phr	
0.06 phr		0.06 phr	
0.08 phr		0.08 phr	

[0212] 한국인 대부분에 대한 최적의 쉐이드(Shade)인 A2 색조는 황색안료: 적색안료 = 0.08 phr : 0.002 phr에서 얻어졌다.

[0213] 사출 성형된 항균성 유치관의 시제품을 도 47 및 도 48에 나타낸다.

[0214] 실험예 5: 항균성 유치관의 물리화학적 특성 분석

[0215] (1) 굴곡강도(유치관 소재 강도)의 측정:

[0216] - 시험기준 : ISO 10477(Flexural strength) 기준값 : ≥ 50 MPa

[0217] Dentistry - Polymer-based crown and bridge materials

[0218] - 시편(도 49 참조)

[0219] 실시예 5의 조성물로 제작한 시편 5개를 사용((2±0.1) mm x (2±0.1) mm x (25±2.0) mm)

[0220] - 시험방법: 위의 시편을 준비한 후, 시험 전까지 (37±1)℃ 증류수에서 (24±1)시간 동안보관하고, 인장 및 압축시험기의 Cross-head speed를 (0.75±0.25) ㎜/min로 3점 굽힘 시험을 하여 최대 하중을 측정하였다.

[0221] - 시험결과

[0222] ① 측정치 : 1번(59.4 MPa), 2번(58.9 MPa), 3번(56.5 MPa), 4번(56.7 MPa), 5번(59.2 MPa)

[0223] ② 측정한 결과치 모두가 ISO 10477:2009에서 요구하는 50 MPa이상이었다.

[0224] ③ 굴곡강도는 모든 시편이 유치관으로서 적합한 것으로 확인되었다.

[0225] (2) 용해도

[0226] - 시험기준 : ISO 10477(Solubility) ≤ 7.5 ug/㎟

[0227] Dentistry - Polymer-based crown and bridge materials

[0228] - 시편

[0229] 실시예 5의 조성물로 제작한 시편 5개 (15±1) ㎜ 직경과 (1.5±0.1) ㎜ 두께

[0230] - 시험방법:

[0231] 준비된 시편을 (37±1)℃에서 시편을 23시간 보관한 후, (23±1)℃에서 2시간 보관한 다음 무게를 측정하고, 10 ㎖ 증류수에 시편을 넣고 (37±1)℃에서 7일 동안 보관한 후, 시편 표면의 수분을 제거하고 15초 동안 공기를 불어준 후 무게를 측정하여 용해도를 산정하였다.

[0232] - 시험결과

[0233] 측정 결과, 1번(1.7ug/㎟), 2번(1.4ug/㎟), 3번(1.7ug/㎟), 4번(1.7ug/㎟), 5번(1.4ug/㎟)로서, ISO 10477:2009에서 요구하는 7.5 ug/㎟ 이하로 나타났으며, 유치관 시편은 모두 허용 가능한 용해도 범위 내인 것으로 판명되었다.

[0234] 실험예 6: 항균력 분석 빛 생체안전성 평가

[0235] (1) 제올라이트 무담지 펠릿 및 제올라이트 담지 펠릿의 항균력 비교

[0236] KS J 4206을 기준으로 한 액체진탕배양법을 이용하여 제올라이트 무담지 펠릿(대조군)과 제올라이트 담지 펠릿(항균 펠릿, 시험군(실시예 5))의 항균력을 비교하였다.

[0237] 대조군과 시험군을 각기 3반복으로 준비하고, *Escherichia coli* ATCC 25922을 TSB 배지에 종균 배양한 후, 균수가 ($1x10^5$) 개 (CFU)/ml 되도록 균 배양액을 희석한 다음, 멸균한 TSB 액체배지(50 mL)에 시험군과 대조군를 각각 넣고 희석한 E. coil 배양액을 100ul씩 접종하여 37 ℃에서 120 rpm 으로 24 시간 진탕 배양하였다. 이어서 TSA 배지에 희석배양액 약 200uL를 스프레딩한 다음, 37 ℃ 에서 24 시간 배양 후 나타난 콜로니 수를 확인하여 산출하였다.

[0238] 한편, 접종 즉시 시험군과 대조군에서 일정량을 채취하여 생리식염수를 이용하여 (10^1~10^3) 배의 희석범위로 희석하고, TSA 배지에 희석배양액 약 200uL를 스프레딩한 다음, 37 ℃ 에서 24 시간 배양 후 균수를 확인하였다.

[0239] 제올라이트 무담지 펠릿(대조군)의 경우에는 도 50에 나타낸 바와 같이 E. coli 가 정상적으로 증식하였음을 확인하였다.

[0240] 한편, 제올라이트 담지 펠릿(시험군: 실시예 5)의 경우에는 도 50과는 달리 도 51에 나타낸 바와 같이 E. coli 증식이 상당히 억제되었음을 확인하였다.

[0241] (2) 제올라이트 무담지 펠릿 및 제올라이트 담지 펠릿의 생체안전성(세포독성) 분석

[0242] 용출물 제조: 항균물질이 담지되지 않은 제올라이트 무담지 페릿(대조군)과 실시예 5(시험군)의 용출물을 제조하기 위하여, 1g 씩을 세포배지성분인 DMEM/CM 10mL에 넣고 37℃에서 24시간 용출하여 세포독성 분석용 시료로 사용하였다.

[0243] 상기의 방법으로 얻어진 용출물을 MTT assay에 의하여 정상세포(HaCaT cell)의 생존율을 분석하였으며, 블랭크로서 배지성분(DMEM/CM)(좌측)만을, 대조군으로서 항균물질이 담지되지 않은 대조군 펠릿(중앙)의 용출과 비교하였다. 분석 결과, 도 52에 나타낸 바와 같이 블랭크 및 대조군과 시험군(우측)을 비교 시 거의 100%에 가까운 세포생존율을 보였으며 이로써 실시예 5는 무독함을 확인할 수 있었다.

[0244] (3) 피부자극 시험(patch test)

[0245] 용출물 제조: 항균물질이 담지되지 않은 제올라이트 무담지 페릿(대조군)과 실시예 5(시험군)의 용출물을 얻기 위하여, 각각의 펠릿 1g을 세포배지성분인 DMEM/CM 10mL에 넣고 37℃에서 24시간 용출하여 세포독성 분석용 시료로 사용하였다.

[0246] 상기한 방법으로 얻어진 펠릿의 용출물을 시험군으로 하여 피부자극 테스트의 기본방법을 적용하여 1회용 대일밴드의 거즈 면에 약 200uL의 증류수(대조군)와 시제품 용출액(시험군)을 각각 도포하여 팔의 상박부 안쪽 피부면에 부착한 후 12시간 후 피부상태를 점검하였다.

[0247] 부착한지 12시간이 경과한 후 대일밴드를 피부면으로부터 탈착하여 피부의 홍반, 소양증, 자극성, 부풀어오름 등이 유발되었는지 여부를 육안으로 조사한 결과, 대조군과 시험군 간에 차이점을 발견할 수 없었으며, 이상의 실험결과를 통하여 시제품이 피부에 무독함을 검증하였다.

[0248] 피부자극 테스트 결과를 도 53에 나타낸다.

[0249] 그 외, 도 54는 실시예 6 시제품에 대한 ISO 10993에 의거한 세포독성 반응등급 0등급임을 나타내는 공인성적표이고, 도 55 및 도 56은 각각 ISO 10993-10에 의거한 구강점막 자극 없음을 나타내는 육안 및 현미경 관찰에 의한 공인성적표이며, 도 57은 조직 시편에 대한 현미경 염색 사진이고, 도 57은 용출 시험 공인 성정표이며, 도 58 내지 60은 각각 ISO 10993에 의거한 감작성 시험 결과를 나타내는 공인성적표이고, 도 61은 ISO 10993에 의

거한 유전독성 시험 결과 음성임을 확인하는 공인성적표이며, 도 62는 ASIM E2149-13a에 의거한 항균력 시험 결과를 나타내는 공인성적표로서, 이들은 타기관에 의한 것이므로 본 발명의 효과를 확인하기 위한 도면으로서 첨부하며, 이들에 대한 부연은 생략한다.

도면

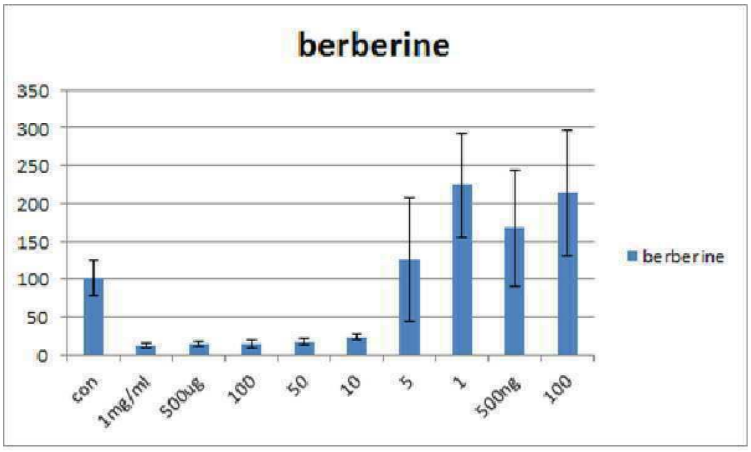
도면1



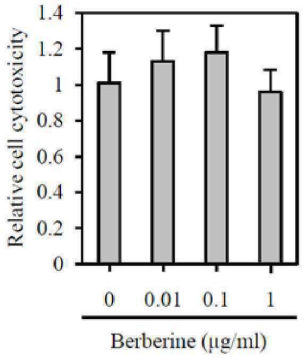
도면2



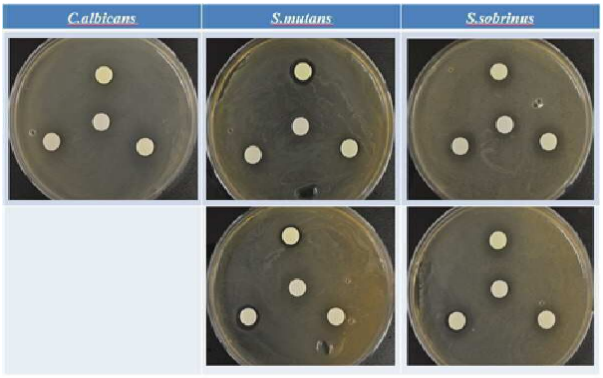
도면3



도면4



도면5



도면6



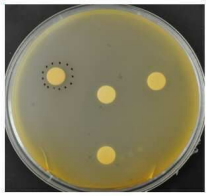
도면7



도면8

Epigallocatechin gallate

S. mutans

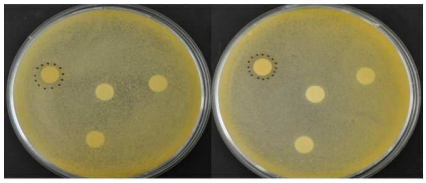


1mg/ml에서 1.8mm의 clear zone 생성

도면9

Epigallocatechin gallate

S. sobrinus



1mg/ml에서 1.8mm정도의 clear zone 생성

도면10

Epigallocatechin gallate

C. albicans



1mg/ml에서 3mm이상의 clear zone 생성

도면11



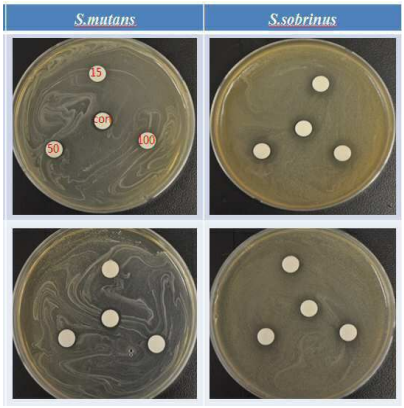
C. albicans Clear zone : 11mm

S. mutans Clear zone : 10mm

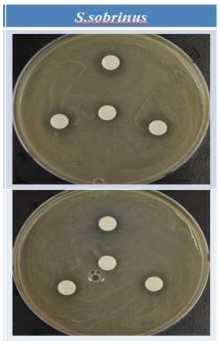
S. sobrinus Clear zone : 11mm

EGCG:10mg/mL, control:DMSO

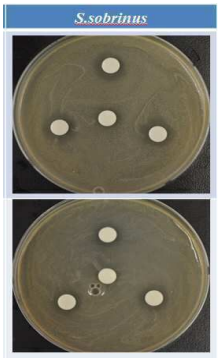
도면12



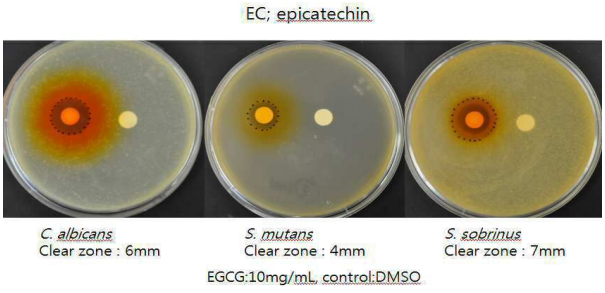
도면13



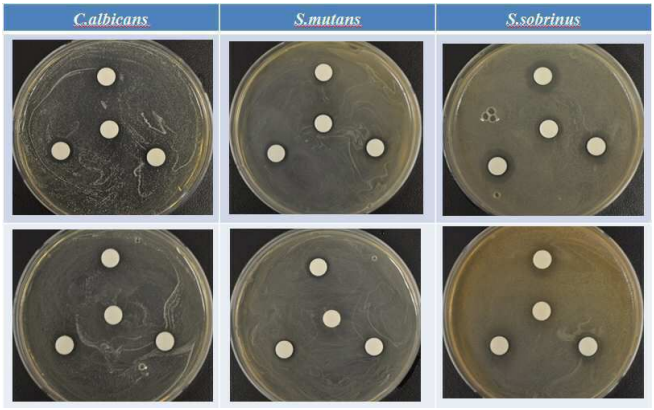
도면14



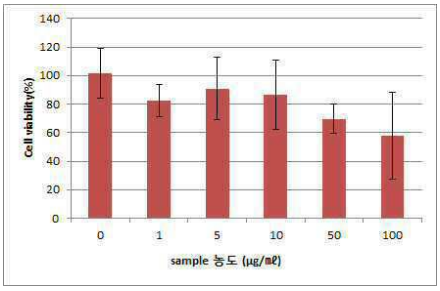
도면15



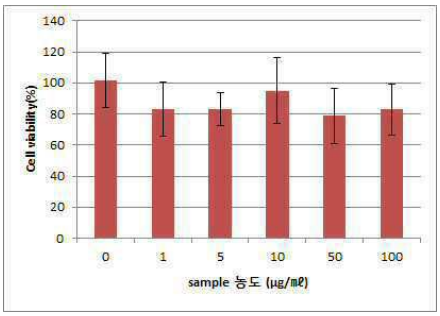
도면16



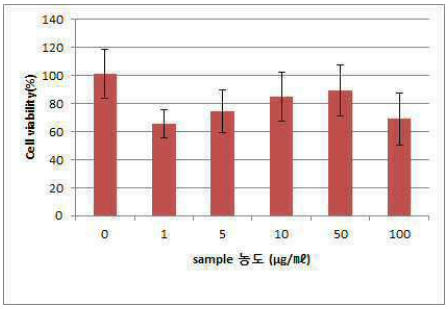
도면17



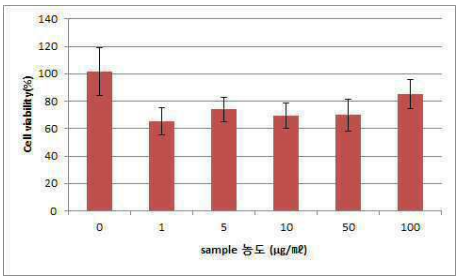
도면18



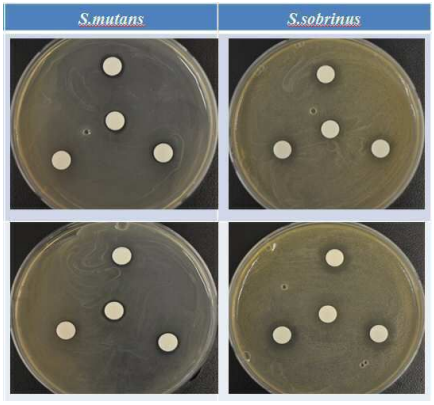
도면19



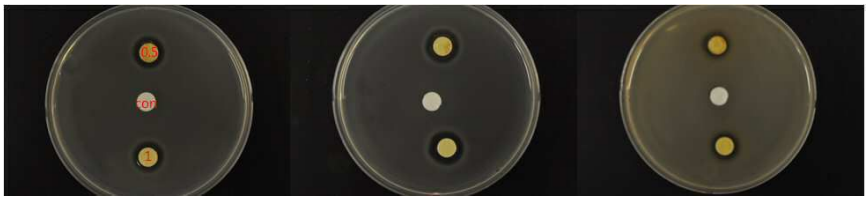
도면20



도면21



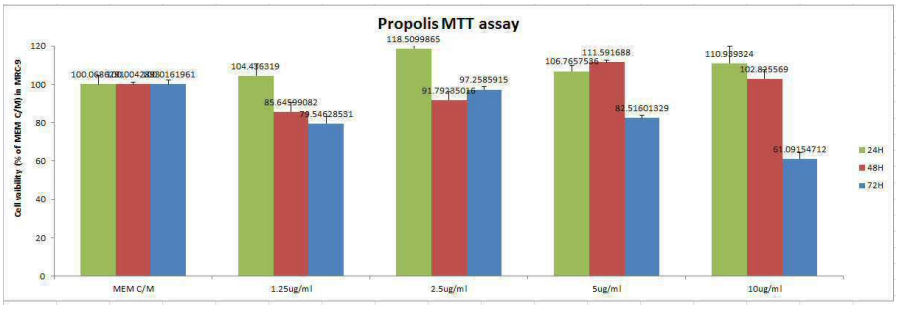
도면22



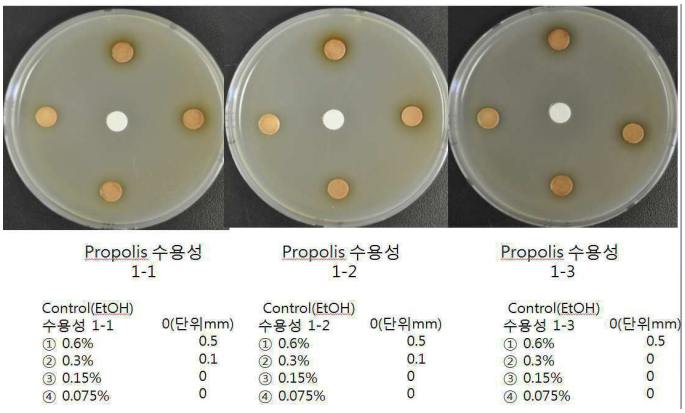
도면23



도면24



도면25



Propolis 수용성 1-1

Control(EtOH) 수용성 1-1	0(단위mm)
① 0.6%	0.5
② 0.3%	0.1
③ 0.15%	0
④ 0.075%	0

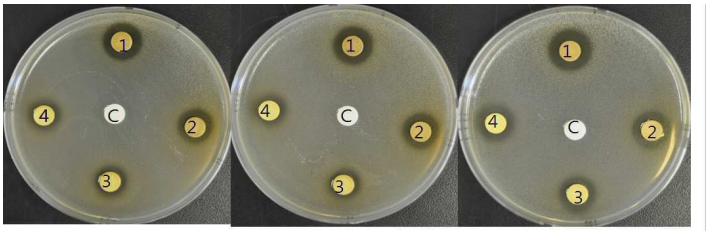
Propolis 수용성 1-2

Control(EtOH) 수용성 1-2	0(단위mm)
① 0.6%	0.5
② 0.3%	0.1
③ 0.15%	0
④ 0.075%	0

Propolis 수용성 1-3

Control(EtOH) 수용성 1-3	0(단위mm)
① 0.6%	0.5
② 0.3%	0
③ 0.15%	0
④ 0.075%	0

도면26



Propolis 지용성 1-1

Control(EtOH) 지용성 1-1	0(단위mm)
① 1.1%	4
② 0.55%	2.5
③ 0.275%	2
④ 0.137%	1.5

Propolis 지용성 1-2

Control(EtOH) 지용성 1-2	0(단위mm)
① 1.1%	4
② 0.55%	3
③ 0.275%	2
④ 0.137%	1.5

Propolis 지용성 1-3

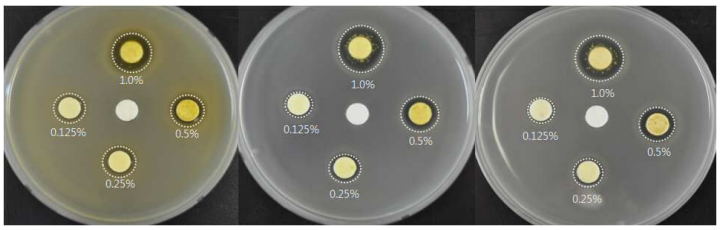
Control(EtOH) 지용성 1-3	0(단위mm)
① 1.1%	4
② 0.55%	3
③ 0.275%	2.5
④ 0.137%	2

도면27

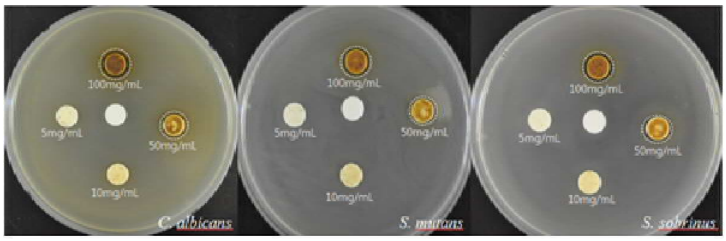


C.albicans S.mutans S.sobrinus

도면28



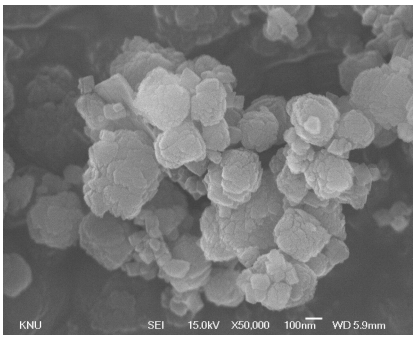
도면29



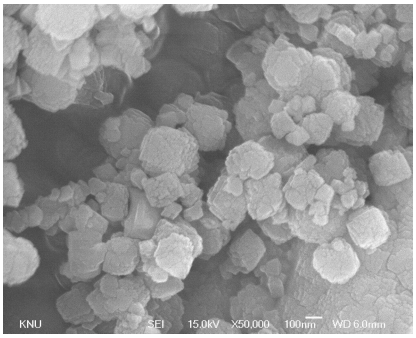
도면30



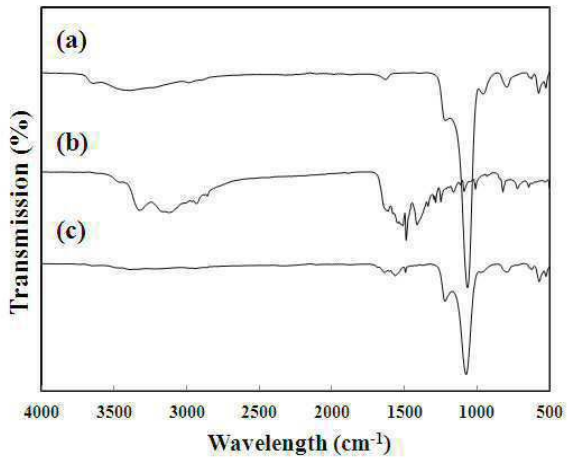
도면31



도면32



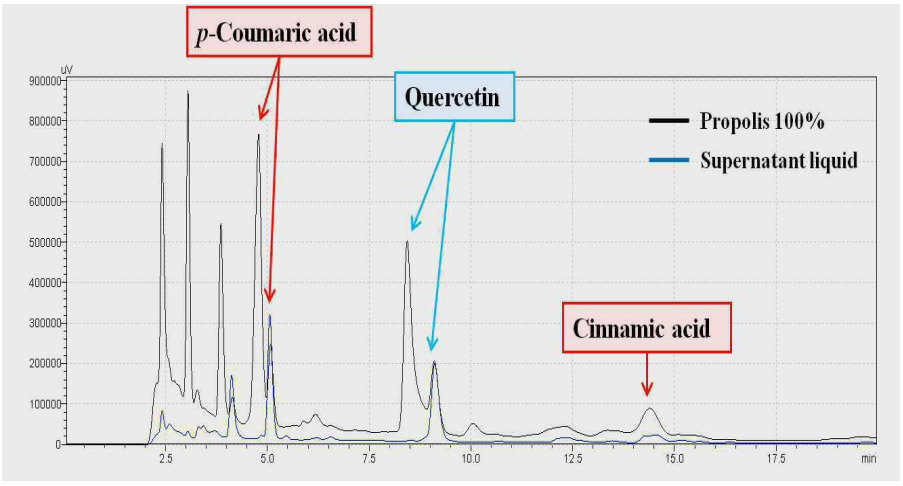
도면33



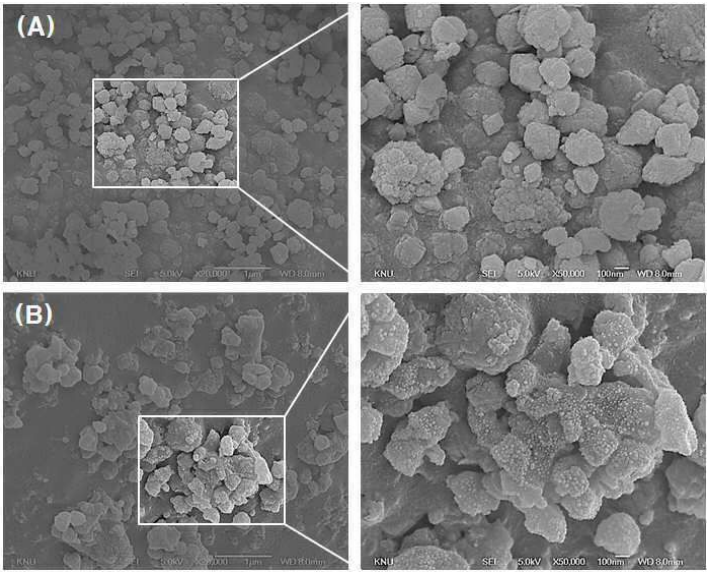
도면34



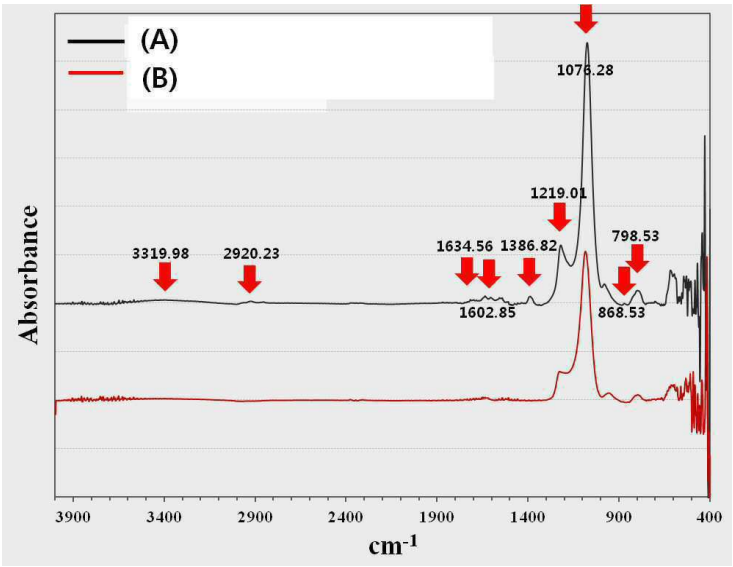
도면35



도면36


(A)
(B)

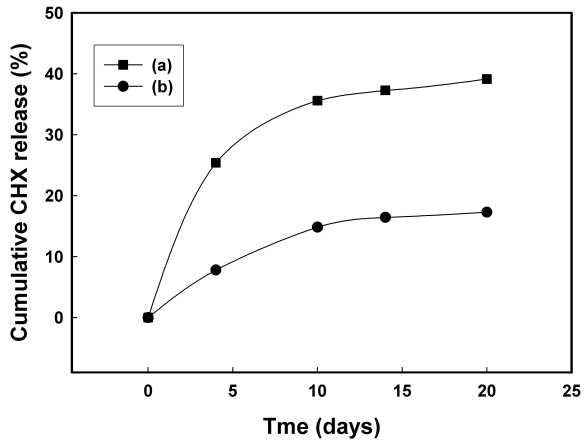
도면37


(A)
(B)
1078.28
1219.01
798.53
3319.98
2920.23
1634.56
1386.82
1602.85
868.53
Absorbance
3900
3400
2900
2400
1900
1400
900
400
cm-1

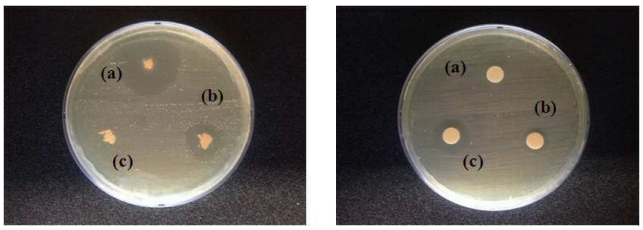
도면38



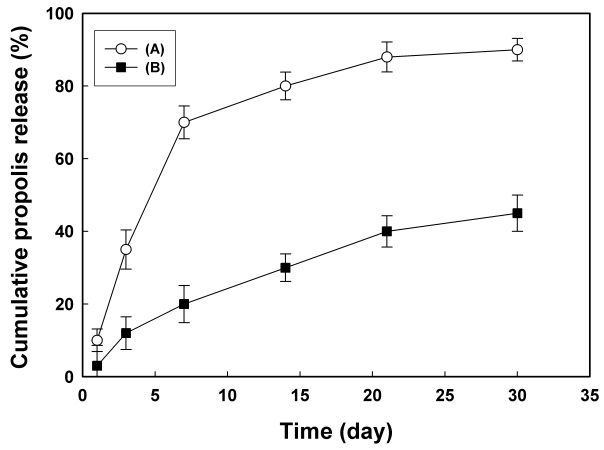
도면39



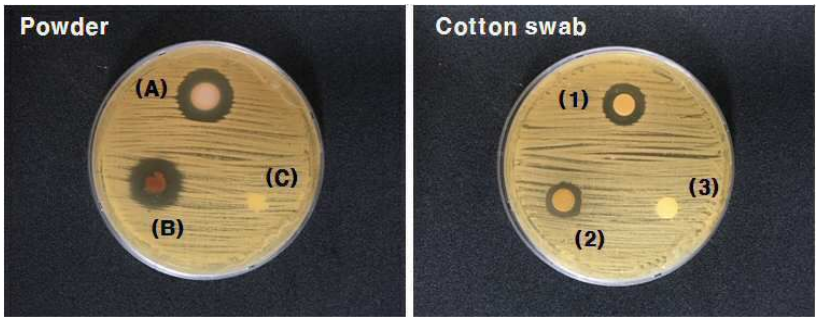
도면40



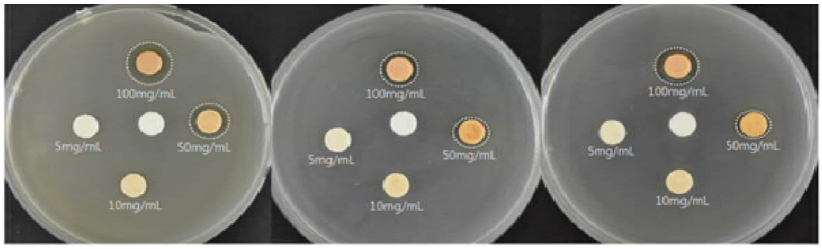
도면41



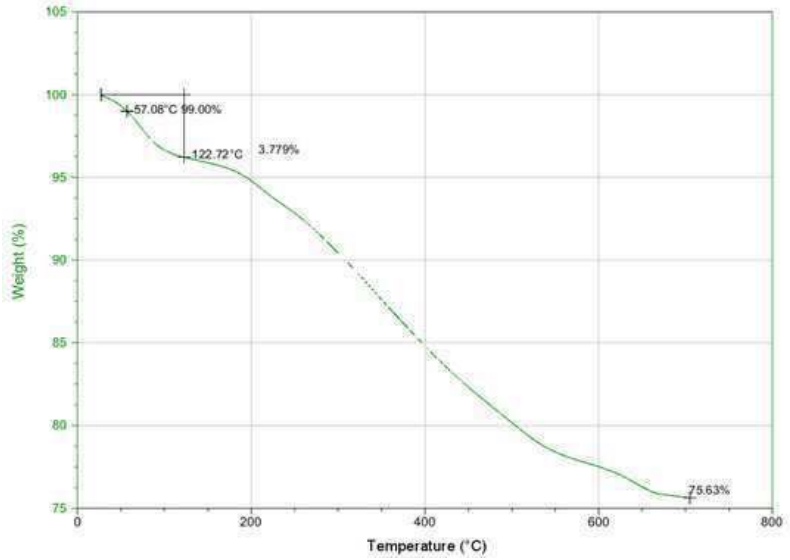
도면42



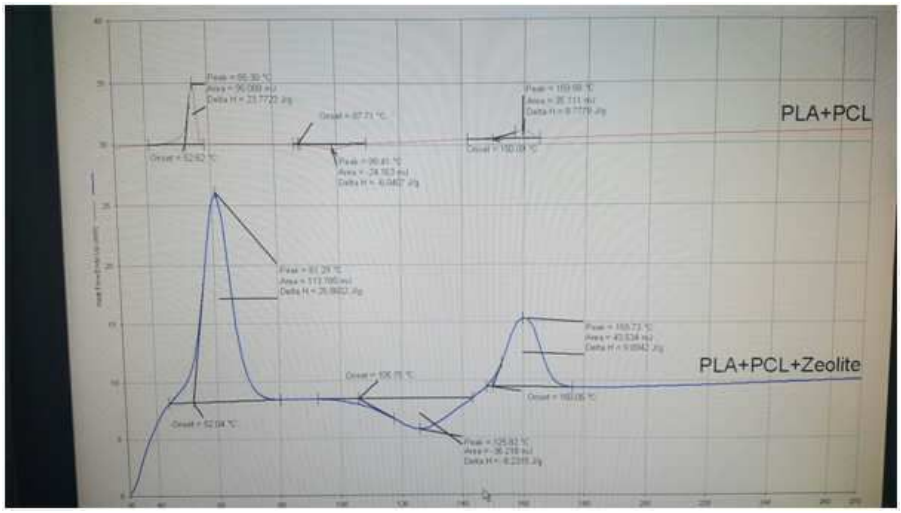
도면43



도면44


105
100
95
90
85
80
75
Weight (%)
57.08°C 99.00%
122.72°C
3.779%
75.63%
0
200
400
600
800
Temperature (°C)

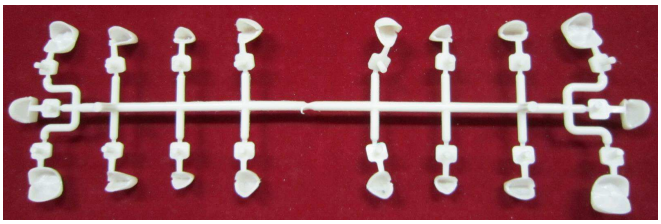
도면45


PLA+PCL
PLA+PCL+Zeolite

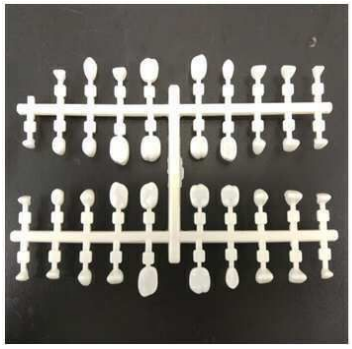
도면46



도면47



도면48

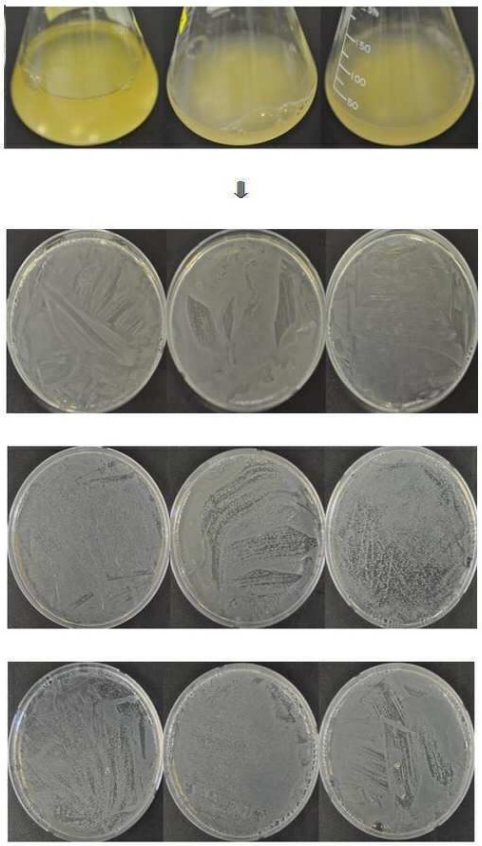




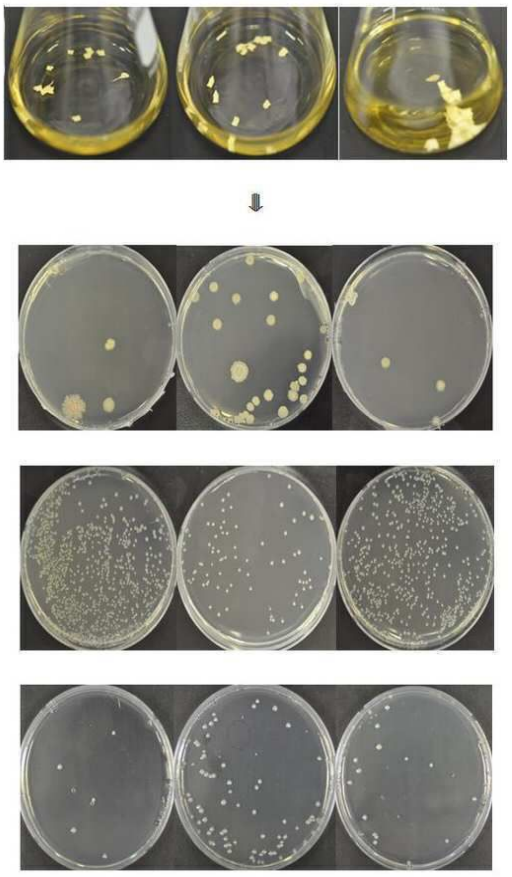
도면49



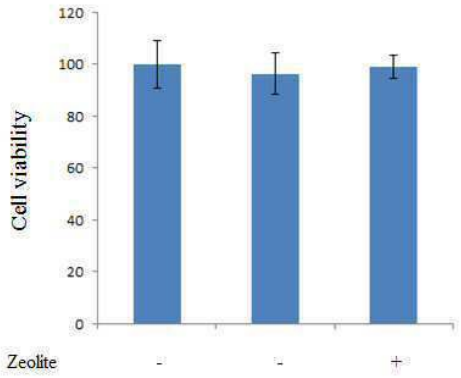
도면50



도면51



도면52



도면53

구 분	대조군 (증류수)	시제품 (용출물)
참여자 1		
참여자 2		
참여자 3		
참여자 4		
참여자 5		

도면54

【 세포독성시험 관찰 결과 】

시험물질	증식포화 상태 (Confluent Monolayer)	원형세포 비율 (Percent Rounding)	세포질내 과립을 포함하지 않는 세포의 비율 (Percent Cells Without Intracytoplasmic Granules)	용해도 (Percent Lysis)	등급 (Grade)	반응 (Reactivity)
시험군(1)	(+)	0	0	0	0	None
시험군(2)	(+)	0	0	0	0	None
시험군(3)	(+)	0	0	0	0	None
음성대조군(1)	(+)	0	0	0	0	None
음성대조군(2)	(+)	0	0	0	0	None
음성대조군(3)	(+)	0	0	0	0	None
용매대조군(1)	(+)	0	0	0	0	None
용매대조군(2)	(+)	0	0	0	0	None
용매대조군(3)	(+)	0	0	0	0	None
양성대조군(1)	(-)	99	99	99	4	Severe
양성대조군(2)	(-)	99	99	99	4	Severe
양성대조군(3)	(-)	99	99	99	4	Severe

(+) = Present (-) = Absent

도면55

동물번호	체중 (g)		임상 증상	육안관찰평가(Macroscopic evaluation)		
	0 d	1 d		Test	Control	Average
160901-1	186.5	186.9	N	0	0	0.0
160901-2	175.1	176.0	N	0	0	0.0
160901-3	186.6	186.9	N	0	0	0.0

N : Normal

도면56

Microscopic evaluation						
	Test			Control		
Animal No.	160901-1	160901-2	160901-3	160901-1	160901-2	160901-3
Epithelium	0	0	0	0	0	0
Leucocyte infiltration (per high power field)	0	0	0	0	0	0
Vascular congestion	0	0	0	0	0	0
Oedema	0	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0	0
AVERAGE	0.0			0.0		

Test average [0.0] - Control average [0.0] = 0.0

Irritation Index

Non-Irritant (0) : √

Minimal Irritant (1 to 4) : ___

Mild Irritant (5 to 8) : ___

Moderate Irritant (9 to 11) : ___

Severe Irritant (12 to 16) : ___

도면57



Fig. 1. Control, 무처치군 점막에서 백혈구 침투 등의 조직반응은 관찰 되지 않음

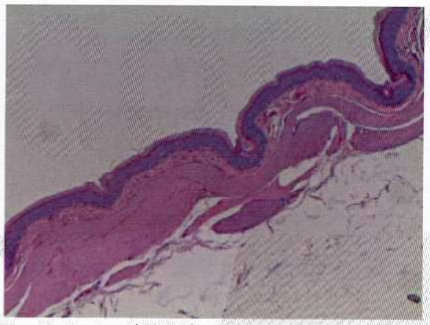


Fig. 2. Test, 시험물질 적용부위 점막에서 백혈구 침투 등의 조직반응은 관찰 되지 않음

도면58

시험항목		단위	시험기준	시험결과
용출물시험	성상	-	육안으로 관찰한다.	무색투명하고 이물질 없음
	pH	-	대한약전 플라스틱용기시험법의 pH항에 따라 시험한다.	3.06
	과망간산칼륨 환원성물질	mL	검액 및 공시험액 20 mL를 취하여 대한약전 플라스틱용기시험법의 과망간산칼륨환원성물질항에 따라 시험한다.	0.21
	자외선흡수 스펙트럼	-	검액과 공시험액을 대조로 하여 파장 250 nm ~ 350 nm에서 대한약전 일반시험법 중 흡광도측정법에 따라 흡광도를 측정하여, 최대흡광도의 차이를 확인한다.	0.0
	증발잔류물	mg	검액 및 공시험액 10 mL를 취하여 수욕상에서 증발건조하고 그 잔류물을 105 ℃에서 1 시간 건조하여 그 양을 측정한다.	0.4
	중금속	-	검액 10 mL를 취하여 대한약전 일반시험법 중금속 시험법의 제1법에 따라 시험한다. 비교액에는 납표준액 2.0 mL를 넣는다.	비교액보다 진하지 않음
※ 용출조건 : 4 g / 20 mL, (70±2) ℃ / (24±2) 시간				

도면59

【 LLNA:BrdU-ELISA 시험결과 】

군	동물번호	임상증상							BrdU LI		SI
		체중 (g)			전신증상*		국소증상**				
		0 일	6 일	gain	0 일	6 일	0 일	6 일	370nm-492nm	Mean	
비극성시험군 (T-AOO)	161027-11	18.6	19.1	0.5	N	N	0	0	0.9663	1.0082	1.3
	161027-12	20.1	20.5	0.4	N	N	0	0	1.0173		
	161027-13	18.9	20.2	1.3	N	N	0	0	1.1823		
	161027-14	20.4	20.7	0.3	N	N	0	0	0.9503		
	161027-15	19.3	20.0	0.7	N	N	0	0	0.9247		
비극성대조군 (VC-AOO)	161027-21	21.3	21.0	-0.3	N	N	0	0	0.7857	0.7574	1.0
	161027-22	19.8	20.3	0.5	N	N	0	0	0.8103		
	161027-23	18.5	19.0	0.5	N	N	0	0	0.7903		
	161027-24	19.3	20.1	0.8	N	N	0	0	0.6763		
	161027-25	19.6	19.6	0.0	N	N	0	0	0.7243		
극성시험군 (T-SC)	161027-16	19.6	20.7	1.1	N	N	0	0	0.9003	1.0518	1.3
	161027-17	20.4	21.6	1.2	N	N	0	0	1.2420		
	161027-18	19.6	20.9	1.3	N	N	0	0	1.1970		
	161027-19	19.5	19.9	0.4	N	N	0	0	0.9947		
	161027-20	19.1	20.2	1.1	N	N	0	0	0.9250		
극성대조군 (VC-SC)	161027-26	18.7	20.2	1.5	N	N	0	0	0.7987	0.8020	1.0
	161027-27	19.1	19.7	0.6	N	N	0	0	1.1133		
	161027-28	21.0	22.1	1.1	N	N	0	0	0.6763		
	161027-29	18.6	19.2	0.6	N	N	0	0	0.6103		
	161027-30	20.5	21.2	0.7	N	N	0	0	0.8113		
양성대조군 (PC-25 % HCA)	161027-51	20.2	20.9	0.7	N	N	0	0	1.7763	1.7959	2.4
	161027-52	20.0	20.9	0.9	N	N	0	0	1.6503		
	161027-53	20.3	21.1	0.8	N	N	0	0	1.9830		
	161027-54	20.9	21.0	0.1	N	N	0	0	2.2520		
	161027-55	20.7	20.9	0.2	N	N	0	0	1.3180		

※ SC : 0.05 g of hydroxyethyl cellulose/10 mL 첨가 후 적용

도면60

【 Erythema Score 】

Observation	Score
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema	4

* : Systemic toxicity

** : Erythema Score

N : Normal

BrdU LI=$(ABS_{em}-ABS\ blank_{em})-(ABS_{ref}-ABS\ blank_{ref})$

em : emission wavelength(370nm)

ref : reference wavelength(492nm)

SI=Mean of BrdU LI in Test group/Mean of BrdU LI in Vehicle group

도면61

표 1. 복귀돌연변이 시험 결과

시험 균주	시험용액	Dose	콜로니 수/plate (Mean±S.D.)	
			S9 무첨가	S9 첨가
TA98	Saline control	-	18.3 ± 3.2	27.7 ± 6.8
	DMSO control		17.3 ± 4.0	24.3 ± 10.8
	Saline extracted		21.0 ± 2.6	22.0 ± 6.6
	DMSO extracted		21.3 ± 5.8	32.0 ± 4.6
TA100	Saline control	-	138.0 ± 7.5	143.0 ± 10.6
	DMSO control		135.3 ± 13.7	140.3 ± 21.4
	Saline extracted		162.3 ± 3.5	146.3 ± 23.5
	DMSO extracted		132.7 ± 21.5	179.0 ± 7.2
TA1535	Saline control	-	15.3 ± 4.0	18.7 ± 2.5
	DMSO control		12.7 ± 5.1	18.7 ± 4.6
	Saline extracted		16.0 ± 6.1	20.0 ± 3.0
	DMSO extracted		14.7 ± 2.5	12.3 ± 1.5
TA1537	Saline control	-	4.7 ± 4.0	8.0 ± 2.6
	DMSO control		3.7 ± 0.6	5.7 ± 2.1
	Saline extracted		4.7 ± 0.6	7.0 ± 2.6
	DMSO extracted		5.0 ± 3.6	9.0 ± 2.6
WP2*uvrA*	Saline control	-	26.7 ± 9.5	43.0 ± 13.5
	DMSO control		30.3 ± 7.2	25.3 ± 2.5
	Saline extracted		39.7 ± 7.8	38.7 ± 13.1
	DMSO extracted		28.0 ± 1.7	33.3 ± 3.1
<양성대조군>				
TA98	AF-2	0.1	236.7 ± 66.4	-
TA100	AF-2	0.01	284.7 ± 31.2	-
TA1535	NaN_3	0.5	445.3 ± 27.2	-
TA1537	9-AA	80.0	470.3 ± 103.0	-
WP2*uvrA*	AF-2	0.01	303.0 ± 25.6	-
TA98	2-AA	0.5	-	113.3 ± 26.5
TA100	2-AA	1.0	-	909.3 ± 106.5
TA1535	2-AA	2.0	-	46.3 ± 4.9
TA1537	2-AA	2.0	-	25.7 ± 2.1
WP2*uvrA*	2-AA	10.0	-	385.0 ± 125.8

도면62

시험항목	시험균	단위	대조군 (미생물 배양액)		시험군 (항균 처리)		항균활성치 (Log)
			측정값	평균값	측정값	평균값	감소율(%)
항균력시험	*E.coli* (ATCC 25922)	CFU/mL	$6.5x10^5$	$7.1x10^5$	$3.3x10^2$	$3.3x10^2$	3.34
			$7.5x10^5$		$4.2x10^2$		99.95
			$7.3x10^5$		$2.3x10^2$		

※ 항균활성치(Log N)는 10^N 배 감소를 의미한다.