



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015년 2월

석사학위논문

2015년 2월  
석사학위 논문

구강 및 의치 세정제 조성을 위한  
황칠나무 추출물의 항균, 항산화 효과  
및 세포 독성에 관한 연구

조선대학교 대학원

치의학과

김려운

구강 및 의치 세정제 조성을 위한 황칠나무 추출물  
의 항균, 항산화 효과 및 세포 독성에 관한 연구

김려운

구강 및 의치 세정제 조성을 위한  
황칠나무 추출물의 항균, 항산화 효과  
및 세포 독성에 관한 연구

Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of  
*Dendropanax morbifera* extract for  
mouthwash and denture cleaner solution

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 려 운

구강 및 의치 세정제 조성을 위한  
황칠나무 추출물의 항균, 항산화 효과  
및 세포 독성에 관한 연구

지도교수 손 미 경

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2014년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 려 운

## 김려운의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 수 관 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 숙 영 (인)

위 원 조선대학교 교수 손 미 경 (인)

2014년 11월

조선대학교 대학원

# 목 차

표 목 차 .....	ii
도 목 차 .....	iii
영문초록 .....	iv
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
III. 실험 결과 .....	9
IV. 총괄 및 고찰 .....	20
V. 결 론 .....	24
참고문헌 .....	25

## 표 목 차

Table 1. The ingredients of newly formulated mouthwash and denture cleaner	... 5
Table 2. Inhibition zone of <i>Dendropanax morbifera</i> extract against <i>S. mutans</i>	... 10
Table 3. Inhibition zone of <i>Dendropanax morbifera</i> extract against <i>C. albicans</i>	... 10
Table 4. Inhibition zone(mm) of solvent fractions from EtOH extract of <i>Dendropanax morbifera</i> extract against <i>S. mutans</i>	12
Table 5. Inhibition zone(mm) of solvent fractions from EtOH extract of <i>Dendropanax morbifera</i> extract against <i>C. albicans</i>	12
Table 6. Inhibition zone(mm) of newly formulated mouthwash and denture cleaner on <i>S. mutans</i>	14
Table 7. Inhibition zone(mm) of newly formulated mouthwash and denture cleaner on <i>C. albicans</i>	15
Table 8. DPPH radical scavenging activity(%) followed by different concentrations of EtOH extract from <i>Dendropanax morbifera</i>	16
Table 9. DPPH radical scavenging activity(%) followed by different concentrations of solvent fractions from EtOH extracts of <i>Dendropanax morbifera</i>	17
Table 10. DPPH radical scavenging activity(%) followed by different concentrations of newly formed mouthwash and denture cleaner	18

## 도 목 차

Fig. 1. Antimicrobial and antifungal activity of extract from <i>Dendropanax morbifera</i> extract against (A) <i>S. mutans</i> and (B) <i>C. albicans</i> (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml) .....	9
Fig. 2. Antimicrobial activity of solvent fractions from EtOH extract of <i>Dendropanax morbifera</i> against <i>S. mutans</i> (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml) .....	11
Fig. 3. Antifungal activity of solvent fractions from EtOH extract of <i>Dendropanax morbifera</i> against <i>C. albicans</i> (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml) .....	11
Fig. 4. Antimicrobial activity of formulated mouthwash and denture cleaner against <i>S. mutans</i> (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml) .....	14
Fig. 5. Antifungal activity of formulated mouthwash and denture cleaner against <i>C. albicans</i> (C; control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml) .....	15
Fig. 6. Cell viability of EtOH extract of <i>Dendropanax morbifera</i> .....	19



## ABSTRACT

Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of  
*Dendropanax morbifera* extract for  
mouthwash and denture cleaner solution

Kim, Ryeo-Woon

Advisor : Prof. Son, Mee-Kyoung D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

**Purpose** : The purpose of this study as a preceding research is to assess whether *Dendropanax morbifera*(*D. morbifera*) can be used for the development of natural mouthwash and denture cleaner, and to analyze the antimicrobial, antioxidant activity and cytotoxicity of *D. morbifera* extract.

**Methods** : The extract was obtained from branches of *D. morbifera*. The solvent fractions were acquired by fractionating *D. morbifera* extract using hexane, ethyl acetate, and butanol solvent. The composites for mouthwash and denture cleaner were produced by adding *D. morbifera* extract into saline or chlorohexidine solvent, and 4 types of composites were made. Among the analysis methods for antimicrobial proliferation-inhibiting activity, paper disc test was used to evaluate the antimicrobial and antifungal activity of *D. morbifera* extract, solvent fractions,

and composites for mouthwash and denture cleanser against *S. mutans* and *C. albicans*. The analysis of antioxidant activity was carried out through DPPH radical scavenging assay. The cytotoxicity of *D. morbifera* extract was analyzed through MTT assay using human normal oral keratinocytes.

**Results :** *D. morbifera* extract showed antimicrobial activity against *S. mutans* and especially *C. albicans*. The solvent fractions of *D. morbifera* showed strong antimicrobial activity against *S. mutans* and *C. albicans* in *n*-hexane solvent fraction and butanol solvent fraction, respectively. The composites containing *D. morbifera* extract appeared to have larger antimicrobial activity against *S. mutans* and *C. albicans* compared to the composites without *D. morbifera* extract. *D. morbifera* extract also showed outstanding antioxidant activity. Among solvent fractions of *D. morbifera*, butanol, ethyl acetate, and chloroform solvent fraction tended to have increased antioxidant activity as the concentration increased. There was almost no antioxidant activity of the composites using *D. morbifera* extract. *D. morbifera* extract showed high cell survival rate in cytotoxicity test.

**Conclusions :** As a result of this preceding study, *D. morbifera* extract turned out to have antimicrobial, antioxidant activity and cytophilicity. Based on these results, it is expected that *D. morbifera* is applicable as a ingredient for natural mouthwash and denture cleanser

**Keywords :** *Dendropanax morbifera* extract, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity, mouthwash and denture cleaner

## I. 서 론

의학의 발달과 함께 인류는 65세 이상의 인구가 총 인구의 7% 이상인 고령화 사회(aging society)에서 14% 이상을 차지하는 고령사회(aged society)로 진입하고 있다. 이에 따라 노인 인구의 의료복지 개선에 대한 요구도가 높아짐으로써 치의학계에서도 새로운 의료정책이 제시되어 시행되고 있다. 대부분의 노인 환자들이 치아 결손으로 인하여 가철성 의치(removable denture)나 임플란트(implant) 치료가 필요하다는 인식하에 75세 이상 환자에 대해 2013년부터 완전틀니 급여화를 시작으로 부분틀니, 그리고 임플란트보험 급여화가 시행된 것도 이와 같은 맥락으로 볼 수 있다. 이러한 변화속에서 노인치과학(geriatricdentistry)이 새로운 학문 분야로 자리잡고 있으며 이와 관련된 치료 기술 분야뿐 아니라 치료 장비 및 재료 개발을 비롯한 다양한 연구들이 시도되고 있다.

부분 및 전체 치아 결손이 있는 노인 환자에서 의치 치료는 저작기능을 회복시켜주고 심리적, 신체적 건강을 유지하는 데 도움을 준다. 특히, 점차적으로 외모(esthetic appearance)와 건강에 대한 관심이 높아지고 보험 급여화로 인한 치료비 부담이 줄어들어으로써 최근에는 의치 치료를 받기 위해 치과에 내원하는 환자들의 수가 증가되고 있다. 따라서, 의치의 심미적, 기능적 개선 뿐 아니라 의치 사용자의 구강질환과 전신질환 발생의 연관성에 대한 고려<sup>1,2</sup>, 의치 환자의 구강 및 의치 위생 관리에 대한 중요성이 더욱 부각되고 있다.

유치약 환자들에서 잇솔질이나 구강 청결제와 같은 구강 위생 보조용품을 사용한 위생 관리가 치아와 잇몸을 건강하게 유지하는데 매우 중요하듯이 전체 및 부분 의치 사용 환자들에게서도 구강 및 의치의 위생관리는 잔존치아와 잇몸의 건강을 유지하며 의치를 오랫동안 잘 사용하기 위하여 매우 중요하다. 하지만 치과에서 의치 사용 환자의 정기검진(recall check) 과정에서 살펴보면 구강 및 의치의 위생관리가 소홀한 경우가 더 많으며 이는 의치 환자의 구내염이나 의치 표면 세균 증식에 대한 연구들에서도 보고되고 있다. Glass 등<sup>3</sup>의 연구에 의하면 의치의 세균막(biofilm)에서 약 900종 이상의 호기성과 혐기성 세균이 관찰되었으며, 또 다른 연구에서도 의치 사용 환자에서 구내염이 빈번히 발생되며 주 원인균인 *Candida albicans*(이하, *C. albicans*)가 구내염 환자의 약 86%에서 발견되었다고 보고되고 있다<sup>4</sup>. 또한, 의치상의 재료로 사용되는 아크

릴릭 레진(acrylic resin) 표면이나 구강상피에 존재하는 *Streptococcus mutans*(이하, *S. mutans*), *Streptococcus salivaris*와 같은 세균은 우식 유발균으로 잔존 치아의 우식을 야기할 뿐 아니라 구강 내 환경을 산성으로 만들어 *C. albicans*가 번식, 부착하기 쉬운 환경으로 만들므로<sup>5</sup> 의치나 구강 내 세균막에서 *C. albicans*의 활발한 증식을 야기한다<sup>6,7</sup>. 이러한 연구 결과들을 볼 때 구강 및 의치 세정에 대한 중요도가 높아지는 가운데 칫솔을 사용한 물리적 세정작용이 가장 효과적이라는 것은 명백하다<sup>8</sup>. 하지만 노령 환자의 경우, 구강 및 의치 세정에 대한 인식 부족과 고령 및 신체적 제한으로 인해 물리적 세정이 힘든 경우가 종종 있다. 이런 환자들을 위해 다양한 형태의 구강 및 의치 세정제가 개발되어 판매되고 있다.

시중에 시판되고 있는 대부분의 구강 및 의치 세정제는 화학성분으로 제조된다. 특히 구강 세정제는 구강조직과 직접 접촉하게 되는데, 함유된 화학성분이 세포에 독성작용을 일으키는 문제점이 점차적으로 부각되면서 생체 적합성이 우수하며, 개발 비용이 적게 소요되고 주변에서 쉽게 구할 수 있는 천연물을 함유하는 세정제 개발에 대한 관심이 증가되고 있다. 세균 감염 질환 치료제의 약 75%이상이 천연물에서 직접 추출하거나 천연물에서 유래한 변형물로 제조되고 있는 것<sup>9</sup>에 비추어 볼 때 천연물을 이용한 구강 및 의치 세정제도 점차적으로 더 많이 개발되고 임상에서 사용될 것으로 추측된다.

최근 감태(학명: *Ecklonia cava*)와 같은 해조물이나 담죽엽(학명: *Lophatherum gracile Brongn*)과 같은 약초, 편백(학명: *Chamaecyparis obtusa*)과 같은 교목들을 이용한 구강 및 의치 세정제 개발 연구가 진행되고 이를 활용한 제품들이 시판되고 있다. 이러한 천연물 중 일부는 항균 및 항산화 효과가 입증되어 구강 및 의치 세정제로 사용은 가능하지만, 음용(drink)할 수는 없다. 구강 및 의치 세정제의 경우는 사용 시 성분이 구강 내에 남거나 또는 의도치 않게 삼키기도 하므로 음용이 가능한 천연물을 사용한다면 더욱 안전할 것으로 생각된다. 따라서 음용이 가능하고 여러 치료 효과로 인해 이미 약용으로 사용되고 있는 황칠나무(학명: *Dendropanax moribifera*)는 구강 및 의치 세정제를 위한 천연물로 사용이 고려될 수 있다.

황칠나무는 대한민국 해안선을 따라 제주도와 서남해 일부 지역에 서식하는 나무로 예로부터 간질환, 면역 증강을 위한 차나 약용으로 사용하기도 하였다. 황칠나무 추출물의 다양한 효과에 대해서는 암세포에 대한 면역 활성화와 항산화 작용<sup>10,11</sup>, 당뇨 치료

및 예방에 대한 효과<sup>12</sup>, 살충 효과<sup>13</sup> 등에 대한 연구들이 보고된 바 있다. 그 외에도 항보체 효과<sup>14</sup>, 항균 효과, 간질환에 대한 약리적인 효과 등에 대하여 연구가 된 바가 있다. 특히 황칠나무는 다양한 미생물에 대해 탁월한 증식 억제능을 가지고 있는데 이와 관련한 연구보고를 살펴보면 이 등<sup>15</sup>은 황칠나무가 *Staphylococcus aureus*에 항균 활성을 가진다고 하였고, 국립산림과학원<sup>16</sup>의 수목의 생리활성에 관한 연구에서는 황칠나무가 항우식 활성수종에 포함되었다. 치과분야에서 황칠나무 추출물을 활용한 연구는 거의 전무하다고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 황칠나무 가지 추출물, 용매 분획물, 그리고 황칠나무 추출물을 함유한 구강 및 의치 세정제 조성물의 항균 효과, 항산화능 및 세포 독성에 대해 평가하였으며 본 연구 결과를 향후 구강 및 의치 세정제 개발 가능성 평가를 위한 선행 연구로 사용하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료의 준비

#### A. 황칠나무 추출물 제조

본 연구에서 사용된 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)는 2013년 2월 전라남도 해남군 자생지에서 가지 부위를 채취하여 실온에서 건조시킨 후 추출용 재료로 사용하였다. 채취한 황칠나무 가지는 직경이 작은 부위는 약 2.0cm의 길이로 절단하고, 직경이 두꺼운 부분은 1.0cm × 1.0cm × 1.0cm 의 길이로 잘랐다. 위와 같이 준비된 황칠나무 가지 500g을 5L 용량의 추출용 유리용기(Pyrex)에 담고, 94%(v/v) 에탄올 5L를 용매로 하여 50°C에서 JAC ultrasonic 4020(KODO, Daejeon, South Korea)으로 5시간 동안 3회 반복 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman paper No.5)로 3회 반복 여과하여 하층의 여액을 감압용 둥근 플라스크에 분리한 후, 진공 감압장치(vacuum evaporator)로 감압하여 에탄올을 증발시켜 농축하였다.

#### B. 에탄올 추출물의 용매 분획물 조제

황칠나무 추출물의 기능을 좀 더 세부적으로 분석하기 위하여 4종의 용매를 사용하여 케미컬후드 내에서 용매 분획을 수행하였다. 추출물 16g에 증류수 300ml 첨가하여 추출물을 완전히 현탁시킨 후, 현탁액에 300ml의 헥산(*n*-hexane)을 첨가하여 10분 정도 진탕(hand shaking)한 후 물층과 헥산층이 완전히 분리될 때까지 정치한 다음 상층의 헥산층을 물층과 혼합되지 않도록 주의하면서 비커에 담는다. 동일한 방법으로 3회 반복하여 획득한 헥산층을 감압농축기로 농축한 후, 50°C 드라이 오븐에서 30시간 이상 건조시켜 순수한 헥산 용매층만을 획득하였다. 같은 방법으로 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethylacetate), 부탄올(butanol) 순으로 용매 분획을 시행하였으며, 획득된 각각의 용매 분획물은 냉장고에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

### C. 구강 및 의치 세정제 조성물의 구성

본 연구에서는 클로르헥시딘(chlorhexidine)의 *C. albicans*에 대한 항진균 효과를 나타낸 Barkvoll의 연구<sup>17</sup>와 *S. mutans*에 대한 항균 효과를 실험한 Epstein 등<sup>18</sup>의 논문을 참고로 하여 클로르헥시딘을 주요 성분으로 포함시켜 구강 및 의치 세정제를 조제하였다. 황칠나무 추출물이 구강 및 의치 세정제에서 나타내는 효과를 확인하기 위하여 함유성분을 각각 다르게 혼합한 4종류의 조성물을 조제하였으며, 구체적인 조성물의 성분은 Table 1과 같다. 조성물의 조제 시 황칠나무 추출물을 주 용매인 생리 식염수(saline)와 클로르헥시딘에 용해시키기 위해 각 조성물에 유화제인 폴리소르베이트20(polysorbate20)과 습윤제인 소르비톨액(sorbitol)을 첨가하였으며, 각 조성물들이 pH가 5.0~6.0이 되도록 구연산과 구연산나트륨으로 조정하였다. 또한 이 실험에 필요한 대표적인 대조군으로는 현재 시판되고 있는 Polident<sup>®</sup>(Glaxo Smith Kline, Tokyo, Japan)와 Sawayaka<sup>®</sup>dent(High Dental Japan, Osaka, Japan)를 사용하였다.

Table 1. The ingredients of newly formulated mouthwash and denture cleaner

Composition	Ingredients
1	Saline, <i>Dendropanax morbifera</i> extract, Polysorbate20, Sorbitol
2	Saline, Polysorbate20, Sorbitol
3	Chlorhexidine, <i>Dendropanax morbifera</i> extract, Polysorbate20, Sorbitol
4	Chlorhexidine, Polysorbate20, Sorbitol
Control 1 (Polident <sup>®</sup> )	Everase 6.0T, Potassium monopersulfate, Sodium perborate
Control 2 (Sawayaka <sup>®</sup> dent)	Polyoxyethylene alkyl ether

## 2. 항균 및 항진균 실험

### A. 실험균주의 배양

본 실험에서 사용한 구강 미생물은 *C. albicans*(ATCC 90028), *S. mutans*(KCTC 3065)는 조선대학교 치과대학 임상 실험실로부터 분양받아 사용하였다. *C. albicans*는 LB broth(Luria-Bertainibroth), *S. mutans*는 Brain heart infusion agar(BHI)의 37°C 하에서 24~48시간 초기 배양하고, 계속하여 3회 계대 배양한 후 항균력 분석에 이용하였다. 분석용 아가 플레이트에 접종할 균의 농도는 분광광도계(ELISA reader, Bio-Tek instruments Inc., Winooski, Vermont, USA)로 측정하였으며 650nm 하에서 1ml당 균의 흡광도를 0.4~0.5로 조정하여 접종하였다.

### B. Paper disc법을 이용한 추출물, 분획물 및 조성물의 항균 효과 검정

항균 및 항진균 효과 검증을 위해 항미생물 증식 저해능 분석 중 paper disc법<sup>19</sup>을 이용하였다. 추출물, 용매 분획물 및 조성물의 농도가 20µg/ml, 40µg/ml, 80µg/ml, 100µg/ml가 되도록 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma CO., St. Louis, Missouri, USA)를 100%로 희석한 후 지름 8mm의 paper disc(ADVANTEC®, Toyo Roshi Kaisha, Japan)에 40µl을 흡수시켰다. 37°C에서 약 24시간 동안 *S. mutans*와 *C. albicans*를 배양 후 disc를 중심으로 균의 증식이 억제된 투명한 부위(clear zone; 투명대)의 직경을 측정하여 균의 증식 억제 정도를 확인하였다.



### 3. 추출물, 용매 분획물 및 조성물의 항산화 활성 측정 (DPPH)

#### A. DPPH 라디칼 소거능의 측정

항산화능 분석을 위해 DPPH 라디칼 소거능 분석법<sup>20</sup>으로 추출물, 용매 분획물 그리고 조성물이 어느 정도 자유 라디칼(free radical)을 소거하는지 측정하였다. 각 시료는 31.3µg/ml, 62.5µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml 농도로 제조하였다. 양성 대조군으로 비타민 C(Vit. C)와 BHT(butylated hydroxytoluene)을 사용하였고, 500µM DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액을 시료와 1:1 농도가 되게 한 후 30분 이상 실온의 어두운 곳에 방치하였다. 분광광도계(ELISA reader, Bio-Tek instruments Inc., Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 517nm 하에서 흡광도를 관찰하였다.

#### B. 통계 처리 및 분석

DPPH 라디칼 소거능의 결과는 SPSS 21.0 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA와 Turkey 사후검정(Turkey's multiple comparison test)을 사용하여 5% 수준에서 유의성을 검증하였다.

### 4. 세포 독성 실험

#### A. 세포 배양

구강 정상 각화세포(Human Normal Oral Keratinocyte, HNOK)를 Science Cell Research Laboratories(Carlsbad, California, USA)로부터 분양받아 제시된 배양조건에 따라 세포배양을 실시한 후, 세포 독성실험에 사용하였다.

10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, New York, USA)과 1% Penicillin/Streptomycin(P/S, Gibco, Grand Island, New York, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, New York, USA) 배지를 사용하여 24~36시간 간격으로 계대 배양 후 96 well cell culture plate에  $1 \times 10^4$  cell/well 농도로 분주하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다.

## B. 세포 생존율 평가

시료의 세포 독성은 MTT assay를 이용한 세포 생존율 실험을 통해 평가하였다. 황칠나무 추출물을 각각 0µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 25µg/ml, 40µg/ml의 농도로 200µl씩 구강 정상 각화세포에 처리하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 20시간 동안 반응 시킨 후, MTT solution(Sigma Co., St. Louis, Missouri, USA)을 20µl씩 각각 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 반응시켰다. 4시간 후, MTT solution이 들어있는 배양액을 모두 제거하고 구강 정상 각화세포를 200µl DMSO(SigmaCO., St.Louis, Missouri, USA)에 용해한 후, 분광광도계(ELISA reader, Bio-Tek instruments Inc., Winooki, Vermont, USA)를 사용하여 흡광도 540nm 하에서 관찰하였으며, 독립적인 동일 실험을 3회 반복하여 수행하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 항균 및 항진균 효과

##### A. 황칠나무 추출물의 항균 및 항진균 효과

*S. mutans*에 대한 황칠나무 추출물의 증식 억제능은 Fig. 1(A)와 Table 2에 나타난 것과 같다. 20 $\mu$ g/ml 일 때 *S. mutans*에 대한 투명대의 직경은 뚜렷이 나타나지는 않았으나 40, 80, 100 $\mu$ g/ml일 때, 각각 2.5, 3.0, 3.0~3.5mm의 억제능을 보였다.

*C. albicans*에 대한 증식 억제능 분석 결과, 추출물의 농도가 20 $\mu$ g/ml 일 때 투명대의 직경은 2.0mm로 나타났고, 40, 80  $\mu$ g/ml 일 때 각각 2.0~2.5mm, 100 $\mu$ g/ml 일 때 3.0mm의 투명대를 관찰할 수 있었다(Fig. 1(B), Table 3).

황칠나무 추출물이 가장 낮은 농도인 20 $\mu$ g/ml 에서 *S. mutans*에 대한 항균 효과는 뚜렷이 나타나지 않은 반면, *C. albicans*에 대해서는 항진균 활성을 보이는 것으로 미루어 *C. albicans* 에 대한 감수성이 더 높은 것으로 판단되며, 40 $\mu$ g/ml이상의 농도에서는 *S. mutans*와 *C. albicans*가 유사한 항균 효과를 나타내었다.

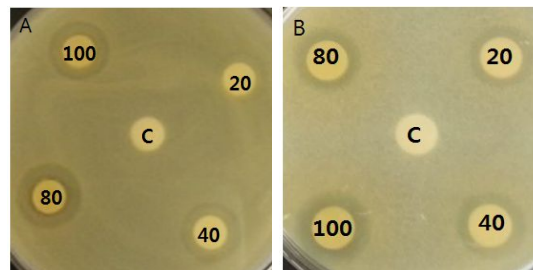


Fig. 1. Antimicrobial and antifungal activity of extract from *Dendropanax morbifera* extract against (A) *S. mutans* and (B) *C. albicans* (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40  $\mu$ g/ml, 80; 80  $\mu$ g/ml, 100;  $\mu$ g/ml)

Table 2. Inhibition zone of *Dendropanax morbifera* extract against *S. mutans*

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	Zone of inhibition (mm)
20	0
40	2.5
80	3.0
100	3.0~3.5

 Table 3. Inhibition zone of *Dendropanax morbifera* extract against *C. albicans*

Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )	Zone of inhibition (mm)
20	2.0
40	2.0~2.5
80	2.0~2.5
100	3.0

## B. 황칠나무 용매 분획물의 항균 및 항진균 효과

황칠나무의 에탄올 추출물을 4종의 유기용매를 사용하여 용매 분획물을 조제한 후, 각각의 분획물에 따른 *S. mutans*와 *C. albicans*에 대한 증식 억제능을 살펴 보았다. 황칠나무 에탄올 추출물의 용매 분획물에 대한 *S. mutans*의 증식 억제능 결과는 Fig. 2, Table 4와 같다. 헥산 분획물의 경우 다른 분획물에 비해 월등히 높은 수준의 항균 활성을 나타냈으며, 농도가 증가되면서 *S. mutans*에 대한 항균 활성능도 비례적으로 높아짐을 알 수 있다. 추출물의 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$  일 때 투명대의 직경은 1~1.5mm로 나타났고, 40, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$  일 때 각각 1.5~2.3, 2~2.5, 2.3~3mm으로 *S. mutans*에 대한 억제능을 보였다. 에틸아세테이트 분획물의 경우 헥산 분획물보다 전체적으로 항균 활성이 낮게 나타났으나 클로로포름이나 부탄올 분획물과 달리 농도가 20, 40 $\mu\text{g/ml}$  일 때에도 항균 효과(< 0.5mm)를 나타내었으며 농도가 80, 100 $\mu\text{g/ml}$  일 때 투명대의 직경은 1mm로 나타났다. 클로로포름 분획물의 경우 저농도(20, 40 $\mu\text{g/ml}$ )에서는 항균 활성을 보이지 않았으나 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 급격하게 항균 활성이 증가하였다(1~1.5mm). 부탄올 분획물에서는 20과 40 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 투명대가 나타나지 않았으며, 80과 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 0~0.3, 0~0.5mm의

미약한 항균 활성을 관찰할 수 있었다.

*C. albicans*에 대한 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올 분획물 각각의 증식 억제능(Fig. 3, Table 5)을 농도별로 살펴보면 부탄올 분획물에서 유일하게 20 $\mu$ g/ml 농도에서 항진균 활성을 관찰할 수 있었고, 40, 80, 100 $\mu$ g/ml에서는 각각 1.0, 1~1.5, 1.5mm로 타 분획물에 비해 넓은 투명대를 관찰할 수 있었다. 부탄올 분획물 다음으로 뚜렷한 항진균 활성을 보이는 분획물은 헥산으로 40 $\mu$ g/ml 농도 이상에서 0.2~1.2mm의 투명대를 관찰할 수 있었고, 클로로포름 분획물에서는 40 $\mu$ g/ml 농도 이상에서 0.5mm로 일정한 투명대가 나타났으며, 에틸아세테이트 분획물에서는 80 $\mu$ g/ml 농도 이상에서 0.5mm의 일정한 투명대가 나타났다.

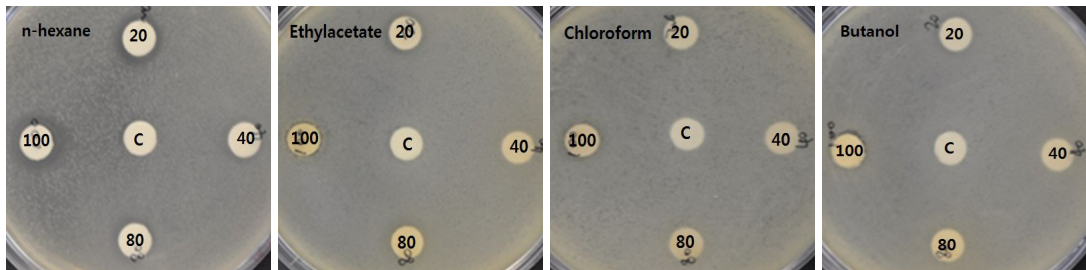


Fig. 2. Antimicrobial activity of solvent fractions from EtOH extract of *Dendropanax morbigera* against *S. mutans* (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40  $\mu$ g/ml, 80; 80  $\mu$ g/ml, 100;  $\mu$ g/ml)

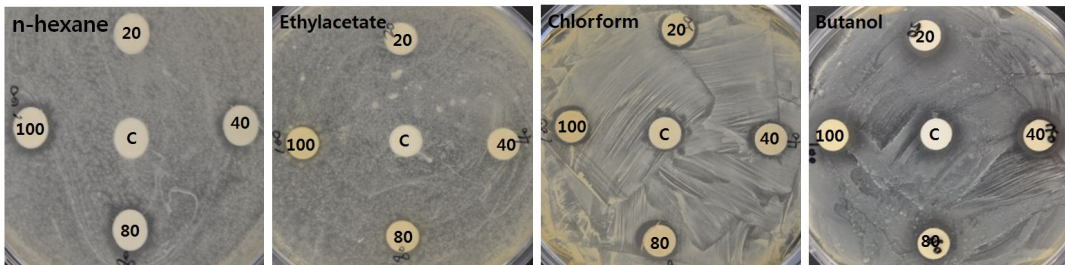


Fig. 3. Antifungal activity of solvent fractions from EtOH extract of *Dendropanax morbigera* against *C. albicans* (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40  $\mu$ g/ml, 80; 80  $\mu$ g/ml, 100;  $\mu$ g/ml)

Table 4. Inhibition zone(mm) of solvent fractions from EtOH extract of *Dendropanax morbifera* extract against *S. mutans*

Solvent fractions	Concentration (µg/ml)			
	20	40	80	100
<i>n</i> -hexane	1~1.5	1.5~2.3	2~2.5	2.3~3
ethylacetate	0~0.3	0.1~0.5	1	1
chloroform	-	-	0.3~1	1~1.5
butanol	-	-	0~0.3	0~0.5

Table 5. Inhibition zone(mm) of solvent fractions from EtOH extract of *Dendropanax morbifera* extract against *C. albicans*

Solvent fractions	Concentration (µg/ml)			
	20	40	80	100
<i>n</i> -hexane	-	0.2~0.7	0.7~1.2	0.7~1.2
ethylacetate	-	-	0.5	0.5
chloroform	-	0.5	0.5	0.5
butanol	0.5	1	1~1.5	1.5

### C. 황칠나무 추출물 함유 조성물의 항균 및 항진균 효과

클로르헥시딘과 황칠나무 추출물의 함유 유무에 따라 제조한 4가지의 구강 및 의치 세정제의 *S. mutans*에 대한 항균 활성은 Fig. 4와 Tale 6에 나타난 바와 같다. 클로르헥시딘에 황칠나무 추출물을 함유한 조성물 3은 100µg/ml 농도에서 2.5~3mm의 투명대를 나타내면서 *S. mutans*에 대해 가장 효과적인 항균 활성을 보였다. 클로르헥시딘을 함유하고 황칠나무 추출물을 함유하지 않은 조성물 4는

100 $\mu$ g/ml 농도에서 조성물 3보다는 약간 낮은 수준(1.8~2.2mm)의 항균 활성을 관찰할 수 있었다. 황칠나무 추출물을 함유한 식염수로 이루어진 조성물 1은 80 $\mu$ g/ml 농도(< 0.5mm) 이상에서 미약한 항균 활성을 확인할 수 있었으나, 황칠나무 추출물을 함유하지 않은 조성물 2는 항균 활성을 나타내지 않았다. 즉, 클로르헥시딘이나 식염수에 황칠나무 추출물이 함유된 조성물이 함유되지 않은 조성물보다 *S. mutans*에 대하여 더 높은 항균 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 대조군인 Polident<sup>®</sup>는 *S. mutans*에 대한 유의할만한 항균 활성을 나타내지 않았고 Sawayaka<sup>®</sup>dent는 80  $\mu$ g/ml 이상의 농도(< 0.7mm)에서 미약하나마 *S. mutans*에 대해 항균 활성을 관찰할 수 있었다.

구강 및 의치 세정제의 *C. albicans*에 대한 항진균 활성은 Fig. 5와 Table 7과 같다. 클로르헥시딘을 함유한 조성물 3과 4는 80 $\mu$ g/ml 이상 농도에서 2~2.5mm의 투명대를 보임으로써 다른 조성물 및 대조군보다 월등히 높은 항진균 활성을 나타냈다. 식염수에 황칠나무 추출물을 첨가한 조성물 1은 80 $\mu$ g/ml과 100 $\mu$ g/ml에서 1mm의 투명대를 나타낸 반면 추출물을 함유하지 않은 조성물 2는 모든 농도에서 항진균 활성을 보이지 않았다. 대조군인 Polident<sup>®</sup>는 농도 100 $\mu$ g/ml에서만 0.3~0.7mm의 투명대가 관찰되었고 Sawayaka<sup>®</sup>dent는 40 $\mu$ g/ml 농도 이상에서 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 보였다.

*S. mutans*와 *C. albicans* 모두 클로르헥시딘에 황칠나무 추출물을 첨가한 조성물 3에서 가장 우수한 항균 및 항진균 효과를 나타내었지만, 이는 클로르헥시딘에 황칠나무 추출물을 첨가하지 않은 조성물 4에서 나타나는 투명대의 직경과는 큰 차이가 없었으며 대조군인 Polident<sup>®</sup>, Sawayaka<sup>®</sup>dent 보다 효과적인 항균 및 항진균 활성을 보였다. 대조군인 Sawayaka<sup>®</sup>dent의 100 $\mu$ g/ml에서 *C. albicans*에 대하여 1~1.7mm의 투명대를 나타내며 유의할만한 항진균 활성을 나타내었으며, 황칠나무 추출물을 함유하지 않은 식염수(조성물 2)에서는 어떠한 효과도 확인할 수 없었다. 반면에 황칠나무 추출물을 함유한 식염수(조성물 1)에서는 미약하나마 항균 및 항진균 활성을 확인할 수 있었다.

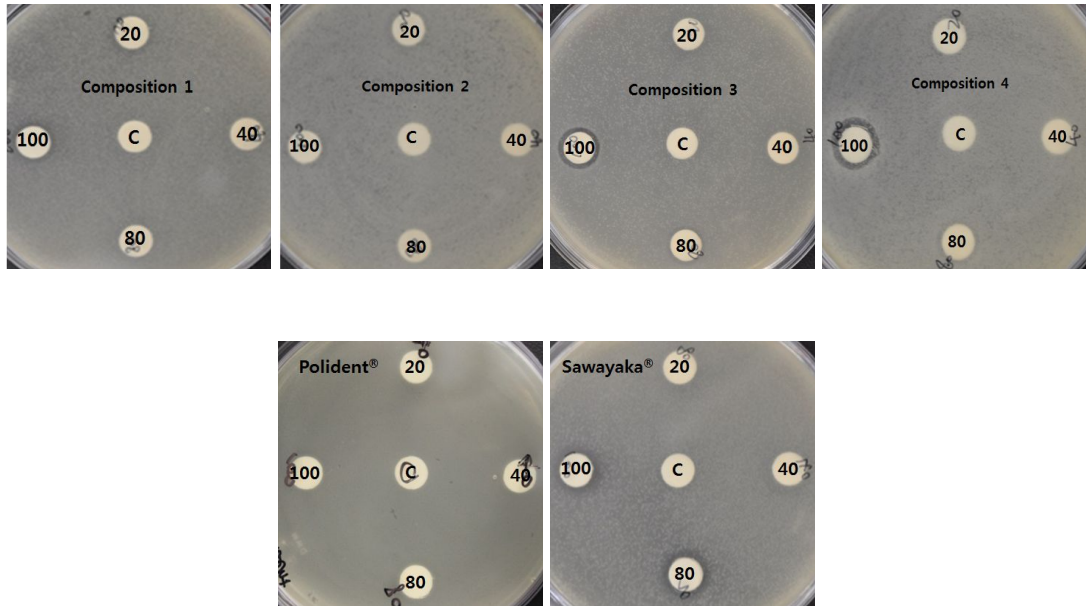


Fig. 4. Antimicrobial activity of formulated mouthwash and denture cleaner against *S. mutans* (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml)

Table 6. Inhibition zone(mm) of newly formulated mouthwash and denture cleaner on *S. mutans*

Composition	Concentration ( $\mu$ g/ml)			
	20	40	80	100
1	-	-	0~0.5	0~0.5
2	-	-	-	-
3	-	-	-	2.5~3
4	-	-	-	1.8~2.2
Polident <sup>®</sup>	-	-	-	-
Sawayaka <sup>®</sup> dent	-	-	0.7	0.7



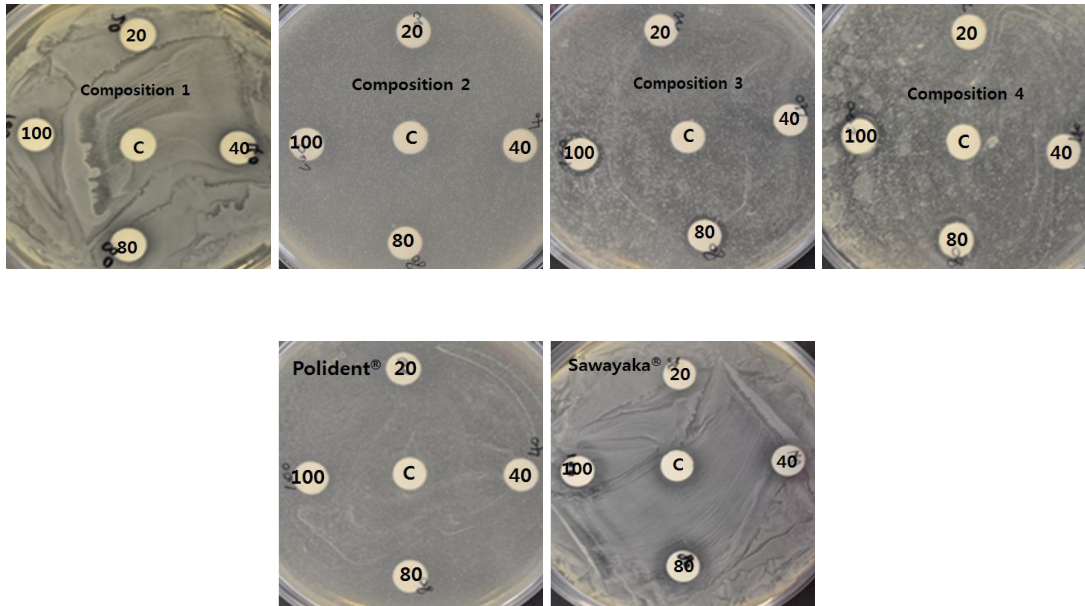


Fig. 5. Antifungal activity of formulated mouthwash and denture cleaner against *C. albicans* (C; Control, 20; 20 $\mu$ g/ml, 40; 40 $\mu$ g/ml, 80; 80 $\mu$ g/ml, 100; 100 $\mu$ g/ml)

Table 7. Inhibition zone(mm) of newly formulated mouthwash and denture cleaner on *C. albicans*

Composition	Concentration ( $\mu$ g/ml)			
	20	40	80	100
1	-	0.5	1	1
2	-	-	-	-
3	-	-	2	2~2.5
4	-	-	2	2~2.5
Polident <sup>®</sup>	-	-	-	0.3~0.7
Sawayaka <sup>®</sup> dent	-	0.2	1	1~1.7

## 2. 항산화 효과

### A. 황칠나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

황칠나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 8과 같다. 황칠나무 추출물은 31.3~62.5 $\mu$ g/ml 범위에서는 합성 항산화물인 BHT와 거의 유사한 DPPH 라디칼 소거능 양상을 나타내었으며 최종농도인 500 $\mu$ g/ml에서는 82.92 $\pm$ 0.49%로 BHT (65.44 $\pm$ 0.62%)보다 매우 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 이 결과를 양성 대조군인 비타민 C와 비교해보면 황칠나무 추출물 500 $\mu$ g/ml 농도에서의 항산화능 (82.92 $\pm$ 0.49%)은 비타민 C의 농도 500 $\mu$ g/ml에서의 항산화 활성(90.11 $\pm$ 0.13%)과 유사한 값을 보였으며, 500 $\mu$ g/ml농도의 BHT(56.71 $\pm$ 6.34%)보다는 40% 이상이나 더 높은 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

Table 8. DPPH radical scavenging activity(%) followed by different concentrations of EtOH extracts from *Dendropanax morbifera*

Samples	Concentration ( $\mu$ g/ml)				
	31.3	62.5	125	250	500
<i>Dendropanax morbifera</i>	29.92 $\pm$ 5.99 <sup>a</sup>	46.31 $\pm$ 6.84 <sup>a</sup>	70.15 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	78.02 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	82.92 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>
ex.					
Vit. C	75.99 $\pm$ 2.61 <sup>b</sup>	85.35 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	89.44 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	90.05 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	90.11 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
BHT	53.71 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>	53.28 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	57.16 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	54.88 $\pm$ 7.28 <sup>c</sup>	56.71 $\pm$ 6.34 <sup>b</sup>

Values are mean $\pm$ SD

<sup>a-c</sup> Means with the different letters are significantly different(P<0.05) by Turkey's multiple comparison test.

## B. 황칠나무 용매 분획물의 DPPH 라디컬 소거능

황칠나무 용매 분획물의 DPPH 라디컬 소거능은 Table 9와 같다. 황칠나무 용매 분획물에서 헥산 분획물은 최종농도 500 $\mu$ g/ml에서도 10% 이하의 매우 미약한 DPPH 라디컬 소거능을 나타내었고, 그 외 에틸아세테이트, 클로르포름, 부탄올 분획물에서는 농도 증가에 따라 비례적으로 DPPH 라디컬 소거능이 높아졌다. 클로르포름 분획물은 500 $\mu$ g/ml 일 때 60% 이상의 소거능을 보였으며, 에틸아세테이트와 부탄올 분획물은 유사한 수준의 항산화능 패턴을 보였는데 125~500 $\mu$ g/ml 범위에서 60% 이상, 최고 85% 이상의 DPPH 라디컬 소거능을 나타내었으며, 500 $\mu$ g/ml 농도에서는 합성 항산화물질인 BHT보다 높은 수준의 항산화능을 보였다.

Table 9. DPPH radical scavenging activity(%) followed by different concentrations of solvent fractions from EtOH extract of *Dendropanax morbifera*

Solvent fractions	Concentration ( $\mu$ g/ml)				
	31.3	62.5	125	250	500
<i>n</i> -hexane	0.79 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	6.47 $\pm$ 2.52 <sup>a</sup>	5.44 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	7.49 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>
ethylacetate	25.15 $\pm$ 5.13 <sup>b</sup>	40.26 $\pm$ 5.60 <sup>b</sup>	62.13 $\pm$ 4.87 <sup>b</sup>	81.94 $\pm$ 2.20 <sup>b</sup>	88.04 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>
chloroform	8.97 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	15.21 $\pm$ 2.30 <sup>c</sup>	41.04 $\pm$ 9.72 <sup>c</sup>	49.39 $\pm$ 3.07 <sup>c</sup>	65.98 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>
butanol	19.75 $\pm$ 4.34 <sup>b</sup>	33.66 $\pm$ 5.95 <sup>b</sup>	62.32 $\pm$ 4.21 <sup>b</sup>	82.31 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>	88.76 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
Vit. C	75.99 $\pm$ 2.61 <sup>c</sup>	85.35 $\pm$ 1.15 <sup>d</sup>	89.44 $\pm$ 0.33 <sup>d</sup>	90.05 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	90.11 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>
BHT	53.71 $\pm$ 4.08 <sup>d</sup>	53.28 $\pm$ 0.84 <sup>e</sup>	57.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	54.88 $\pm$ 7.28 <sup>c</sup>	56.71 $\pm$ 6.34 <sup>d</sup>

Values are mean $\pm$ SD

<sup>a~e</sup> Means with the different letters are significantly different(P<0.05) by Turkey's multiple comparison test.

### C. 황칠나무 추출물 함유 조성물의 DPPH 라디칼 소거능

황칠나무 추출물 함유 조성물의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 10과 같다. 구강 및 의치 세정제 조성물에서 높은 수준의 항산화능에 대해 확인할 수 없었으나 조성물 1과 2를 비교해보면 황칠나무 추출물을 함유한 조성물 1이 함유하지 않은 조성물 2에 비하여 상대적으로 높은 항산화능을 확인할 수 있었고, 마찬가지로 조성물 3과 4를 비교했을 때에도 황칠나무 추출물을 함유한 조성물 3에서 상대적으로 높은 DPPH 라디칼 소거능(10% 미만)을 확인할 수 있었다. 시판되고 있는 Polident<sup>®</sup>, Sawayaka<sup>®</sup> dent와의 비교에서도 상대적으로 황칠나무 추출물을 함유한 조성물 1과 3에서 높은 항산화능을 나타내었다.

Table 10. DPPH radical scavenging activity(%) followed by different concentrations of newly formed mouthwash and denture cleaner

Composition	Concentration (µg/ml)				
	31.3	62.5	125	250	500
1	-0.85±2.87 <sup>a</sup>	-0.52±3.16 <sup>a</sup>	-0.94±3.46 <sup>a</sup>	0.41±4.37 <sup>a</sup>	5.73±4.43 <sup>a</sup>
2	-4.70±3.24 <sup>b</sup>	-5.67±6.73 <sup>b</sup>	-3.12±6.46 <sup>b</sup>	0.55±2.73 <sup>b</sup>	0.09±0.37 <sup>b</sup>
3	0.22±2.32 <sup>c</sup>	5.38±3.39 <sup>c</sup>	7.62±3.81 <sup>c</sup>	3.69±1.48 <sup>c</sup>	4.92±1.17 <sup>a</sup>
4	-8.21±7.90 <sup>d</sup>	-14.66±15.75 <sup>d</sup>	-10.86±6.11 <sup>d</sup>	-9.18±9.71 <sup>d</sup>	-6.17±6.12 <sup>c</sup>
Polident <sup>®</sup>	-0.16±1.41 <sup>e</sup>	-1.35±1.27 <sup>e</sup>	-2.18±1.71 <sup>e</sup>	-2.39±1.99 <sup>e</sup>	-3.45±1.21 <sup>d</sup>
Sawayaka <sup>®</sup> dent	-6.25±5.88 <sup>f</sup>	-6.71±4.48 <sup>f</sup>	-5.96±11.21 <sup>f</sup>	-6.52±15.07 <sup>f</sup>	-6.93±4.55 <sup>e</sup>

Values are mean±SD

<sup>a~f</sup> Means with the different letters are significantly different(P<0.05) by Turkey's multiple comparison test.

#### 4. 구강 세포에 대한 황칠나무 추출물의 세포 생존율

황칠나무 추출물이 구강조직의 정상세포에 대하여 독성이 있는지 확인하고, 조성물 제조시 유효한 추출물의 농도를 결정하기 위하여 구강 잇몸조직으로부터 조직을 수집하여 primary cell를 유도한 후 각각의 추출물을 처리하여 그 결과를 살펴 보았다(Fig. 6).

황칠나무 추출물은 높은 세포 생존율(60~100%)을 보였으며, 대조군과 비교했을 때 생존율에 영향을 미치지 않는 유효한 농도 범위는 2.5~10 $\mu$ g/ml이며, 나머지 농도군(25~40 $\mu$ g/ml)은 약 70%의 생존율을 보였다.

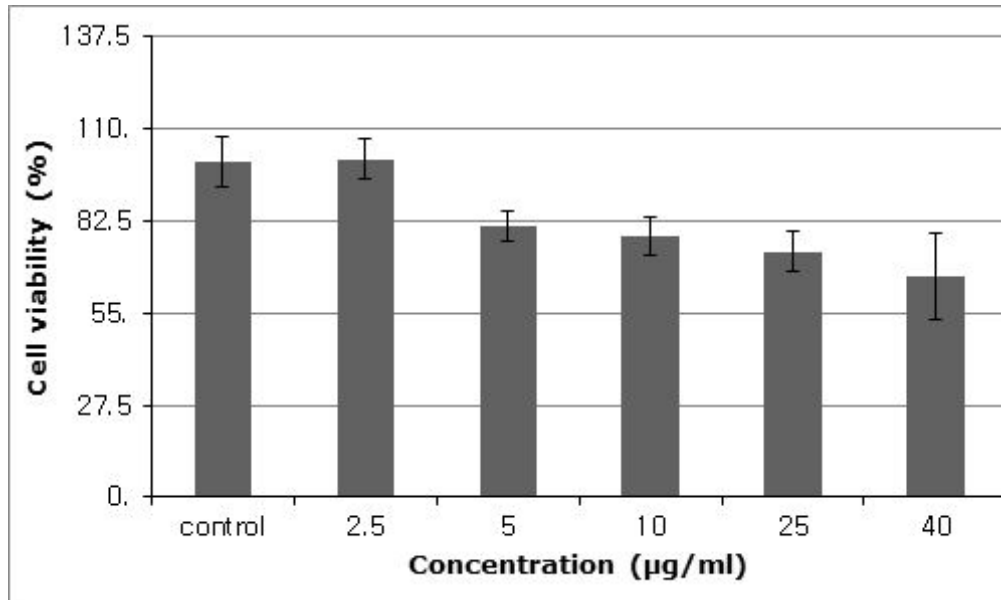


Fig. 6. Cell viability of EtOH extract of *Dendropanax morbifera*

## IV. 총괄 및 고찰

구강 위생관리에 대한 환자들의 인식이 높아지면서 다양한 구강보조 위생용품의 개발이 시도되고 있다. 특히 부분 및 완전 치아상실로 인해 가철성 보철물을 장착하는 환자들의 경우, 잔존해 있는 치아와 잇몸뿐 아니라 의치의 위생관리가 의치 수명에 큰 영향을 미치므로 전용 위생 관리 용품이나 세척제의 사용이 추천되고 있다. 대부분의 구강 세정제는 항미생물 성분으로 클로르헥시딘을 함유한 합성 화학성분으로 구성되어 있다. 클로르헥시딘은 bis-biguanide 계열의 치태조절 물질로 구강점막이나 의치상 표면에 미생물이 부착하는 것을 억제하고<sup>21</sup>, 저농도의 클로르헥시딘은 세포막의 투과성을 증대시키고, 고농도의 클로르헥시딘은 세포의 세포질 침착을 유발함으로써 정균 작용을 한다<sup>22</sup>고 알려져 있어 구강 세정제 외에도 의치 소독을 위해서도 사용되고 있다. 하지만 클로르헥시딘은 장기간 사용 시 치아와 의치의 변색을 유발하는 단점이 있다. 또한 혀나 구강 근육의 움직임이 원활하지 않은 구강질환 환자나 고령 환자의 경우, 사용 중 음용의 가능성이 있어 주의가 요구된다. 따라서, 이와 같은 변색의 문제와 음용시의 위험을 줄이기 위하여 화학 세정제와 유사한 효능을 가지면서 신체에 더 안전한 천연 추출물을 사용한 구강 및 의치 세정제의 개발이 고려되고 있다. 본 연구에 사용된 황칠나무는 예로부터 잎, 줄기, 그리고 뿌리가 식용이 가능하다고 식품공전에 기록되어 있으며 항암, 해독, 당뇨 등 기능성 생리활성 효과를 가지므로 차나 탕약재로 사용<sup>23</sup> 되어 왔다. 따라서 음용이 불가한 편백과 같은 다른 묘목의 추출물보다 구강 내 사용에 있어 더 안전할 것으로 사료된다.

황칠나무 추출물을 이용한 연구들은 아직까지는 매우 제한적이며 잎, 가지, 뿌리 추출물 각각에 대한 일부 연구들이 보고되고 있다. 황칠나무 뿌리의 경우 나무의 수명 때문에 활용에 한계가 있고, 잎의 경우 계절에 따른 수확에 차이가 있으므로 본 연구에서는 활용성이 높을 것으로 생각되는 황칠나무 가지를 사용하였다. 용매 분획은 추출물의 기능성을 더 세부적으로 분석하기 위하여 사용되는데 본 연구에서도 에탄올을 용매로 한 추출물 외에 4종의 유기용매를 사용해 용매 분획물을 제조하여 분석용 시료로 사용하였다. 또한, 의치 소독 및 세정 효과 분석을 위해 4가지 세정제 조성물을 제조하여 항균 및 항산화 작용을 확인함으로써 구강 및 의치 세정제 개발을

위한 탐색연구 자료로서 사용하고자 하였다.

천연 추출물이 구강 및 의치 세정제로 사용되기 위해서는 구강과 의치에 부착되는 주요 세균에 대한 항균 및 항진균 효과에 대한 검증이 필요하다. *S. mutans*는 치아의 우식을 야기하는 대표적인 우식 유발균<sup>24</sup>이며 당대사 과정에서 형성하는 유기산이 만드는 산성 환경이 구강점막 및 의치에 *C. albicans*가 부착하는 것을 더욱 촉진한다<sup>5</sup>. 또한, 아크릴릭 레진과 같은 가철성 보철물에 생기는 polymicrobial biofilm을 구성하는 대부분이 *Staphylococcus*와 *Candida*로 이루어져 있고<sup>5</sup>, 의치성 구내염의 환자에서 *Alpha haemolytic streptococcus*와 *C. albicans*의 급격한 증가<sup>25</sup>가 관찰되는 것을 미루어볼 때 *S. mutans*와 *C. albicans*가 특히 의치 장착 환자에게서 주요 구강 질환 유발 미생물이라는 것을 뒷받침한다. 따라서, 본 연구에서도 *S. mutans*와 *C. albicans*에 대한 황칠나무 추출물, 용매 분획물, 구강 및 의치 세정제 조성물의 항균 및 항진균 활성 작용을 분석하였다.

황칠나무 추출물의 항미생물 작용에 대한 연구들로서 한국 과학기술부의 보고서<sup>26</sup>에 의하면 황칠나무 잎 추출물에서 그람 양성 세균에 대한 강한 항균 효과와 *C. albicans*에 대한 강한 항진균 효과를 보인다고 하였으며, 다른 연구<sup>13</sup>에서도 황칠나무 추출물이 클로르퀸(chlorequine, 항원충제)에 민감한 균주(*P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*)에 대하여 유의할만한 성장 억제 효과를 나타낸다고 보고하였다. 반면, 황칠나무 추출물이 *S. mutans*에 대해서는 뚜렷한 항균 활성이 없으며, 대신 *S. mutans*와 같은 혐기성 세균이고 치주질환을 유발하는 *Haemophilus actinomycetemcomitans*를 약 20~40%의 억제한다는 연구보고도 있다<sup>27</sup>. 본 연구에서는 황칠나무 추출물의 경우, *S. mutans*와 *C. albicans*에 항균 활성을 보였으며 특히 *C. albicans* 대해서는 낮은 농도에서도 강한 항진균 활성을 보였다. 황칠나무 용매 분획물에서는 헥산(*n*-hexane) 용매 분획물이 다른 용매 분획물보다 뚜렷이 높은 수준의 *S. mutans* 항균 활성을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었다. 녹차<sup>28</sup>나 다양한 식물 추출물에는 폴리페놀 성분이 포함되어 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며<sup>29</sup>, 황칠나무에도 폴리페놀(polyphenol)의 중합체인 수용성 타닌(tanin)이 함유되어 있고<sup>30</sup>, 타닌은 *S. mutans*의 glucosyltransferase가 불용성 glucan을 합성하는 것을 저해함으로써 세균의 증식을 억제한다고 보고된 바 있다<sup>31</sup>. 본 연구의 결과는 황칠나무의 헥산 용매 분획물에서 추출된 페놀계 성분이 주 항균활성을 나타낸다는

다른 연구 결과<sup>26</sup>와도 일치한다.

손 등<sup>32</sup>의 연구에서는 대부분의 약용식물은 부탄올과 에틸아세테이트 용매 분획물에서 *C. albicans*에 대해 강한 항진균 활성을 낸다고 하였다. 본 연구에서도 부탄올 용매 분획물에서 *C. albicans*에 대한 가장 높은 항진균 활성이 관찰되었다. 황칠나무에는 다량의 사포닌(saponin)이 함유되어 있는데 이 사포닌은 부탄올 용매에 추출되어 나온다. 대부분의 항진균제가 세포막 투과성 변화로 인하여 균체 성분이 세포 외로 누출되어 증식이 억제되는 것과 같이 사포닌이 *C. albicans*의 세포막 주요성분인 ergosterol 합성에 영향을 미치게 되면서 항진균 효과를 나타낸다<sup>33</sup>는 이전 연구와도 상응하는 결과이다.

구강 및 의치 세정제를 위한 조성물에서 대조군으로 사용된 Polident<sup>®</sup>의 경우 *S. mutans*에 대한 항균 작용은 관찰되지 않았고 *C. albicans*에 대한 항진균 활성은 관찰되었다. 이는 Polident<sup>®</sup>가 *S. mutans*에 대하여 항균 효과를 나타내지 못한다는 Gornisky 등<sup>34</sup>의 연구 결과와 일치한다. 각각의 조성물의 경우 클로르헥시딘을 함유한 조성물이 *S. mutans*에 대하여 높은 항균 활성을 보였다. 황칠나무 추출물 여부에 따라서는 황칠 추출물을 함유한 조성물이 추출물을 함유하지 않은 조성물보다 더 큰 항균 활성을 보였다. *C. albicans*에 대해서는 클로르헥시딘이 포함된 조성물에서 황칠나무 추출물의 함유 유무가 큰 영향을 주지 않은 것으로 관찰되는 반면, 클로르헥시딘이 포함되지 않은 조성물 중에서는 황칠나무 추출물이 포함된 조성물이 더 큰 효과를 보였다. 즉, 식염수를 용매로 한 구강 및 의치 세정제의 조성에서 황칠나무 추출물이 나타내는 항균 및 항진균 효과를 확인할 수 있었으나 클로르헥시딘을 용매로 하는 조성물에서는 황칠나무 추출물의 뚜렷한 항균 및 항진균 효과를 확인할 수 없었다. 클로르헥시딘이 갖는 항미생물 효과가 황칠추출물의 함유 유무와 관계없이 더 큰 효과를 보였기 때문에 사료된다.

본 연구에서는 세포의 대사과정 중 생성되는 활성산소종에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)를 개선 또는 예방할 수 있는 항산화 효과를 평가하는 하나의 지표로 DPPH 소거능을 이용하였다. 천연 항산화물인 비타민 C와 합성 항산화물인 BHT를 양성 대조군으로 하여 그 효과를 비교하였다. 본 연구에서는 황칠나무 추출물이 500 $\mu$ g/ml의 농도에서 82.92 $\pm$ 0.49%로 합성 항산화물인 BHT(56.71 $\pm$ 6.34%)보다 더 높은 효과를 나타내었으며, 이는 황칠나무 추출물이 우수한



항산화능을 나타낸다고 보고한 다른 연구들과 유사한 결과이다<sup>11,25,35</sup>.

천연 추출물의 항산화 효과는 다양한 성분에 의해 나타나며, 주로 total phenol component와 total flavonoid component 함유와 연관이 있으며<sup>35</sup>, 본 연구에서는 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물에서 우수한 항산화능을 확인할 수 있었다. 황칠나무 뿐만 아니라 흰썸바귀(학명: *Ixeris dentate* Nakai)<sup>36</sup>, 생얼귀나무(학명: *Rosa davurica* Pall.)<sup>37</sup>, 도라지(학명: *Pladycodon grandiflorum*)<sup>38</sup>등 다른 천연 추출물에서도 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 높은 항산화능을 나타냈다. 특히, 황칠나무의 에틸아세테이트 분획물에서는 카테킨(catethin)이 다량 함유되어 있어 높은 항산화능을 나타내며<sup>37</sup>, 그 외에도 비타민 C와 수용성 타닌<sup>39</sup>성분이 함유되어 항산화능에 기여하는 것으로 보인다.

구강내 의치 세정제는 구강 점막조직과 직접 접촉한다는 점에서 세포 독성 여부가 매우 중요하다. 구강 세정제의 독성에 관한 연구에서, 클로르헥시딘 성분은 농도가 100 $\mu$ g/ml에서 세포 용해를 일으키며<sup>40</sup>, 25 $\mu$ g/ml 이상에서 상피세포 성장을 억제한다고 보고되기도 하였다<sup>41</sup>. 본 연구에서는 세포에 대한 독성 평가를 위해 MTT assay를 사용하였다. 이는 각종 화학물 세포 독성의 일차적인 검정에 주로 사용되는 정량적인 독성평가 방법<sup>42</sup>이다. 일반적으로 천연 추출물의 경우 합성 화합물에 비해 낮은 독성을 나타내게 되는데, 지금까지 황칠나무의 세포 독성에 관한 연구는 암세포에 대한 항암활성 평가<sup>10</sup>가 주를 이루었고, 황칠나무의 구강 정상 세포에 관한 독성 실험에 대한 연구는 거의 미비하다. 독성 검사결과, 황칠나무 추출물은 모든 농도에서 높은 세포 생존율(60% 이상)을 관찰할 수 있었다. 피부 각화세포(HaCaT cell)를 이용한 세포 독성 실험에서 황칠나무 잎 추출물은 50 $\mu$ m/ml의 농도 이하에서 독성을 나타내지 않았는데<sup>43</sup>, 본 연구에서 시행한 구강 점막 각화세포를 대상으로 한 실험한 결과와 독성 발현에 농도 차이를 나타내며, 이는 세포 감수성에 의한 차이로 이해된다.

본 연구는 황칠나무 추출물과 용매 분획물, 구강 및 의치 세정을 위한 조성물의 항균, 항진균 및 항산화 효과를 확인함으로써 구강 및 의치 세정제에 이용할 수 있는 천연물로써의 황칠의 기능성을 확인할 수 있었다. 하지만, 황칠나무 추출물을 이용한 구강 및 의치세정 제품의 개발을 위해서는 조성물의 성분의 함량과 투입 순서, 교반법, 제형 등 종합적인 평가 및 실험이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

황칠나무 추출물을 이용한 항균, 항산화, 세포독성 실험결과 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 황칠나무 추출물은 *S. mutans*와 *C. albicans*에 항균 및 항진균 활성을 보였으며 특히 *C. albicans*에 강한 항진균 활성을 나타냈다.
2. 황칠나무 추출물의 용매 분획물은 헥산 용매 분획물에서 강한 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 보였고, 부탄올 용매 분획물에서 강한 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 보였다.
3. 황칠나무 추출물을 함유한 조성물이 함유하지 않은 조성물보다 *S. mutans*와 *C. albicans*에 대하여 더 큰 항균 및 항진균 활성을 보였다.
4. 황칠나무 추출물은 우수한 항산화 활성을 보였다.
5. 황칠나무 추출물의 용매 분획물 중 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 용매 분획물은 농도 증가에 따라 항산화능이 증가하였다.
6. 황칠나무 추출물을 함유한 조성물은 다른 조성물에 비하여 상대적으로 높은 항산화능을 나타내었다.
7. 황칠나무 추출물은 세포 독성 실험에서 높은 세포 생존율을 보였다.

본 연구의 통하여, 황칠나무 추출물의 항균 및 항산화 활성과 세포 친화성을 확인함으로써 향후 구강 및 의치 세정제의 개발에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고 논문

1. Barros SP, Suruki R, Loewy ZG, Beck JD, Offenbacher S. A cohort study of the impact of tooth loss and periodontal disease on respiratory events among COPD Subjects: modulatory role of systemic biomarkers of inflammation. PloS ONE 2013;8(8):e68592.
2. Smith JM, Sheiham A. How dental conditions handicap the elderly. Community Dent Oral Epidemiol 1979;7(6):305~10.
3. Glass RT, Conrad RS, Bullard JW, Goodson LB, Mehta N, Lech SJ, Loewy ZG. Evaluation of microbial flora found in previously worn prostheses from the Northeast and Southwest regions of the United States. J Prosthet Dent 2010;103(6):384~89.
4. BUDTZ-JÖRGENSEN E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. Eur J Oral Sci 1974;82(2):151~90.
5. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas L. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Medicina Oral S.L. 2004;10:27~39.
6. Campos M, Marchini L, Bernardes L, Paulino L, Nobrega F. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol 2008;23(5):419~24.
7. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;98(1):53~59.
8. Caton JG, Blieden TM, Lowenguth RA, Frantz BJ, Wagener CJ, Doblin JM, Stein SH, Proskin HM. Comparison between mechanical cleaning and an antimicrobial rinse for the treatment and prevention of interdental gingivitis. J Clin Periodontol 1993;20(3):172~78.
9. David J. Newman GMC, and Kenneth M. Snader. Natural products as sources of new drugs and over the period 1981~2002. J Nat Prod 2003;66:1022~37.
10. Lee SH, Park YS, Hwang BI, Kim JH, Lee HY. Screening of immune activation

- activities in the Leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. Korean J. Medicinal Crop Sci 2002;10(2):109~15.
11. Hyun TK, Kim MO, Lee H, Kim Y, Kim E, Kim JS. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveille. Food Chem 2013;141(3):1947~55.
  12. Moon HI. Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Hum Exp Toxicol 2011;30(8):870~75.
  13. Chung IM, Kim MY, Park WH, Moon HI. Antiatherogenic activity of *Dendropanax morbifera* essential oil in rats. Int J Pharm Sci 2009;64(8):547~49.
  14. Chung IM, Song HK, Kim SJ, Moon HI. Anticomplement activity of polyacetylenes from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille. Phytother Res 2011;25(5):784~86.
  15. Lee CK, Kim H, Moon KH, Shin KH. Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials—resistance inhibition of volatile components of Korean aromatic herbs. Arch Pharm Res 1998;21(1):62~66.
  16. 이위영, 안진권, 박영기, 국립산림과학원. 수목의 생리활성 탐색. 2006. 국립산림과학원
  17. Barkvoll P, Attramadal A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989;67(3):279~81.
  18. Epstein JB, McBride BC, Stevenson-Moore P, Merilees H, Spinelli J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991;71(2):172~78.
  19. Wilkins TD, Holdeman LV, Abramson IJ, Moore WEC. Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1972;1(6):451~59.
  20. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol 1995;28(1):25~30.
  21. Pratten J, Smith A, Wilson M. Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. J Antimicrob

- Chemother 1998;42(4):453~59.
22. Gjermo P. Chlorhexidine and related-compounds. J Dent Res 1989;68:1602-08.
  23. Kim H, Song MJ. Analysis and recordings of orally transmitted knowledge about medicinal plants in the southern mountainous region of Korea. J Ethnopharmacol 2011;134(3):676~96.
  24. Islam B, Khan SN, Khan AU. Dental caries: from infection to prevention. Med Sci Monit 2007;13(11):196~203
  25. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. J Oral Rehabil 1997;24(10):788~90.
  26. University CN. Studies on the Technical Improvement to use "Hwangchil-traditional Korean golden varnish" and the diversified uses of *Dendropanax morbierea* Lev.. Chunnam, Korea: Ministry of Science and Technology 1996.
  27. 백동현. 구강 질환 유발 미생물에 대한 항생작용을 갖는 천연물 추출물 검색. 한국미생물학회지 2007;43(3):227~31.
  28. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 1991;25(6):438~43.
  29. Smullen J, Koutsou G, Foster H, Zumbé A, Storey D. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. Caries Res 2007;41(5):342~49.
  30. 김형량, 정희종. 황칠나무 잎 및 종실의 화학적 특성. 한국농화학회지 2000;43(1):63~6
  31. Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of *mutans streptococci*. J Agric Food Chem 2000;48(11):5666~71.
  32. 손호용, 금은주, 권윤숙, 권기석, 진익렬, 권하영, 권정숙, 손건호. Candidosis 치료제 개발을 위한 약용 및 야생 식물의 항진균 활성의 검색. 생명과학회지 2003;13(5):604~1734.

33. Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. ACS Chem Biol 2010;5(3):321~32.
34. Gornitsky M, Paradis I, Landaverde G, Malo AM, Velly AM. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. J Can Dent Assoc 2002;68(1):39~45.
35. Zou Y, Liao S, Shen W, Liu F, Tang C, Chen CYO, Sun Y. Phenolics and antioxidant activity of mulberry leaves depend on cultivar and harvest month in southern China. Int J Mol Sci 2012;13(12):16544~53.
36. 홍슬기, 정동명, 김기영, 황은희. 흰씀바귀(*Ixeris dentate* var. *albiflora* Nakai)뿌리의 성분 분석과 추출물의 세포 생존율 및 DPPH 라디칼 소거 활성. 한국영양학회지 2010;43(2):105~1339.
37. 사재훈, 신인철, 정경진, 심해흠, 오홍석, 박상균, 정의호, 김석남, 김광기, 최대성. 생열귀나무의 카테킨 함량 및 항산화효과 2002;33(3):177~181
38. 장주리, 황선연, 임선영, 도라지 부탄올 추출물의 항산화 및 nitric oxide 생성 저해 효과. 한국식품저장유통학회지(구 농산물저장유통학회지) 2011;18(1):65~71
39. 김형량, 정희중. 황칠나무 잎 및 종실의 화학적 특성. 한국농화학회지 2000;43(1):63~6
40. Gabler WL, Roberts D, Harold W. The effect of chlorhexidine on blood cells. J Periodontal Res 1987;22(2):150~55.
41. HELGELAND K, HEYDEN G, RÖLLA G. Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. Eur J Oral Sci 1971;79(2):209~15.
42. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987;47(4):936~42.
43. 박수아, 박준, 박찬일, 지영중, 황윤찬, 김용현, 전소하, 이혜미, 하지훈, 김경진. 황칠나무 추출물의 세포 항산화 활성과 미백활성 측정. 한국미생물생명공학학회지 2013;41(4):407~15.