

계면활성제를 첨가한 잔토리졸의 항균효과

김해선^{1,2}, 강시묵^{2,3}, 권호근^{2,3,4}, 김백일^{2,3,4}

¹백석문화대학 치위생과, ²연세대학교 치과대학 예방치과학교실, ³구강악안면경조직재생센터, ⁴두뇌한국21 연세치과의과학사업단

Antibacterial effect caused by the combination of xanthorrhizol and several surfactants

Hae-Sun Kim^{1,2}, Si-Mook Kang^{2,3}, Ho-Keun Kwon^{2,3,4}, Baek-Il Kim^{2,3,4}

¹Department of Dental Hygiene, Baekseok Culture University, ²Department of Preventive Dentistry & Public Oral Health, College of Dentistry, Yonsei University, ³Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, ⁴Brain Korea 21 Project

Objectives. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect caused by a combination of Xanthorrhizol (Xan) and several surfactants on planktonic and biofilm of *S. mutans*. An additional aim was to confirm the safety of a combined solution as a MTT cell viability assay.

Methods. The Xan, isolated from Indonesian folk medicinal plants, was used at concentrations of 12.5 and 25 ppm. Ethanol (12.5%) was used as a solvent, while sodium lauryl sulfate (SLS; 200, 250 ppm) and sodium methyl cocoyl taurate (Tau; 250, 300 ppm) were used as surfactants. The planktonic *S. mutans* ATCC 25175 (2×10^7 CFU/ml) was mixed with Xan containing surfactant and ethanol for 5 minutes, and counted as colonies of live cells. The antibacterial effect of Xan was tested by a biofilm model with *S. mutans*, which was used with the saliva-media, hydroxyapatite (HA) disc and BHI broth. The cultured biofilm on HA disc was exposed to the treatment solutions mixed with Xan, surfactants, and ethanol for 5 minutes. This process was repeated at 16, 40, 64 hours later. MTT assays were carried out to evaluate cell viability and cell proliferation after exposure of Xan.

Results. Antibacterial effect of Xan on planktonic *S. mutans* significantly increased when applied with 200 ppm SLS and 300 ppm Tau ($p < 0.05$). The formation of *S. mutans* biofilm was inhibited by 25 ppm Xan mixed with 250 ppm SLS or 300 ppm Tau. In addition, the cytotoxicity of Xan was similar to that of 0.2% chlorhexidine oral rinse.

Conclusions. The solutions of Xanthorrhizol with surfactants such as SLS and Tau showed significant antimicrobial effect on planktonic and biofilm cells of *S. mutans* ($p < 0.05$). These solutions also exhibited biological safety similar to chlorhexidine oral rinse.

Key Words: biofilm, oral rinse, *S. mutans*, solubilization, surfactants, xanthorrhizol

색 인: 가용화, 계면활성제, 구강양치액, 바이오필름, 잔토리졸, *S. mutans*

투고일자: 2011. 3. 4, 심사일자: 2011. 3. 10, 게재확정일자: 2011. 3. 11

책임저자: 김백일, 연세대학교 치과대학 예방치과학교실, (120-752) 서울시 서대문구 성산로 250

Tel: 02-2228-3070, Fax: 02-392-2926, E-mail: drkbi@yuhs.ac

*본 연구는 2008년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-E00347).

서론

구강양치액은 대표적인 화학적 치태조절 방법이라고 할 수 있다. 클로르헥시딘이 함유된 구강양치액은 항균 작용이 뛰어난 구강양치액으로 가장 널리 알려져 있다. 하지만 클로르헥시딘은 뛰어난 항균작용, 항치은염 효과를 나타내지만 맛이 쓰고 장기간 사용 시 치아와 연조직에 변색을 유발시키며, 치석형성을 일으키는 문제점이 있다^{1,2)}. 따라서 최근에는 식물에서 추출한 천연 물질인 에센셜오일을 구강양치액에 활용하려는 움직임이 활발하다. 에센셜오일이 함유된 구강양치액은 치석형성이나 치아 착색과 같은 부작용이 없어 안전하며 상당한 항균작용, 항치은염 효과, 치태감소 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다³⁾.

본 연구에서 주목한 물질은 인도네시아 약용식물인 *Curcuma xanthorrhiza*의 뿌리 부분에서 추출한 잔토리졸(Xanthorrhizol, 1,3,5,10-bisabolatetraen-3-ol, Xan)이다. 잔토리졸은 구강 내 미생물에 대해 뛰어난 항균효과를 나타내며, 특히 치아우식증 원인 균주인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)에 뛰어난 항균효과를 가지는 것으로 보고되었다^{4,5)}. 잔토리졸은 바이오필름의 항균에도 효과적이어서 *S. mutans* 바이오필름에 0.025 mg/ml 농도의 잔토리졸을 5분간 노출시킬 경우 61.9% 미생물이 감소되고 30분간 노출시킬 경우 89.9%까지 감소되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 그러나 잔토리졸은 sesquiterpenoid 계열의 화합물로서 소수성(hydrophobic)의 특성을 갖는다. 일반적으로 약물은 용해되어 있는 상태에서만 약리작용을 나타낼 수 있으므로 소수성의 특성을 가지고 있는 잔토리졸이 항균효과를 나타내게 하기 위해서는 적절한 유기용매를 사용하여 가용화 시켜야하고, 이러한 상태를 안정적으로 유지하는 것이 필요하다. 이를 위해서는 적절한 유화제의 사용이 필요한데, 잔토리졸의 경우 실험실 연구에서는 주로 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용한다. 그러나 잔토리졸을 실제 임상에서 구강양치액의 형태로 활용하기 위해서는 에탄올과 같은 안전성이 확보된 유기용매의 사용이 필요하다. 그러나 잔토리졸의 경우 에탄올만으로 가용화시키고자 할 때는 고농도로 사용해야 하며, 이는 구강건조증을 비롯한 각종 부작용을 초래할 수 있다⁷⁾. 에센셜오일을 사용한 대표적인 구강양

치액인 리스테린의 경우 에센셜오일을 가용화시키기 위해서 20% 이상의 에탄올을 사용하기 때문에 이로 인한 구강점막 자극 및 어린이들의 안전사고 등이 문제가 되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 따라서 잔토리졸을 구강양치액의 형태로써 효과적으로 활용하기 위해서는 에탄올의 함량을 최소로 하면서 에센셜오일의 용해도를 높일 수 있는 새로운 가용화 방법이 필요한 실정이다.

물이나 수용액에 잘 녹지 않는 약물을 가용화 하는 방법으로는 계면활성제(surfactant)를 이용한 마이크로 에멀전의 형성, 공용매(cosolvent)의 사용, 흡수성 물질의 첨가, 사이클로덱스트린(cyclodextrin)과의 복합체 형성, 고상(solid-state)으로의 변환 및 프로드럭(prodrug) 형성 등 다양한 방법들이 있다. 이들 중 전통적으로 가용화에 가장 많이 사용된 계면활성제는 용액 내에서 마이셀(micelle)을 형성하여 난용성 약물의 가용화를 돕는다. 마이셀은 수용액 상에서 양친성(친/소수성) 분자에 의해 형성되는 입자이다. 블록 공중합체(amphiphilic block copolymer)는 수용액 상에서 회합하여 내부의 소수성 영역과 외부의 친수성 영역으로 구성되는 마이셀을 형성한다. 이 마이셀 내부에 소수성 약물을 봉입함으로써 가용화가 이루어진다.

이에 본 연구의 목적은 *Curcuma xanthorrhiza*에서 추출한 난용성 항균물질인 잔토리졸을 가용화시키기 위해서 저농도의 에탄올을 사용하면서 수종의 계면활성제를 병용하여 가용화를 시키는 방법을 탐색하는 것이다. 또한 *S. mutans* 부유성 모델과 바이오필름 모델을 이용하여 새로운 성분의 용액의 항균 효과를 평가하고, MIT 세포독성 실험으로 안전성을 평가하는 것이다.

연구대상 및 방법

1. 연구재료

1.1. 잔토리졸(Xanthorrhizol): 본 연구에서 사용한 Xan은 바이오신소재 연구실(연세대학교)에서 공급받았다. Xan은 약용식물인 *C. zanthorrhiza* Roxb을 메탄올을 이용하여 추출한 후 flash 컬럼 크로마토그래피에 적용하여 정지상으로 실리카 겔(silica gel)을 사용하였고, 이동상으로 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 사용하여 정제하였다⁵⁾. 본 연구에서 이용한 잔토리졸 농도는 12.5, 25.0 ppm의 농도였다⁶⁾. 잔토리졸 용액의 제조를 용이하게 하

기 위해 먼저 100% 에탄올을 이용하여 125와 250 ppm의 저장용액(stock solution)을 제조한 후에 희석하여 사용하였다.

1.2. 계면활성제(surfactants): 본 연구에서는 잔토리졸 가용화를 위해서 치약에서 계면활성제로 널리 사용되고 있는 sodium lauryl sulfate (SLS, Sigma Chemical Co., USA)와 저자극성 계면활성제로 알려진 Sodium methyl cocoyl taurate (Tau, Durae Co., Korea)를 사용하였다. 잔토리졸의 가용화를 위한 조건을 탐색하기 위해 잔토리졸이 함유된 저장용액과 계면활성제 용액을 혼합하여 최종 계면활성제의 농도를 각각 SLS는 200과 250 ppm, Tau는 250과 300 ppm이 되도록 하였고, 이 때 에탄올의 함량은 12.5%이었다.

2. 연구방법

2.1. 균주의 배양: 실험에 사용한 구강미생물로는 *S. mutans* ATCC 25175 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였으며, 이 균주를 BHI (Brain Heart Infusion, Difco Co., USA) agar 배지에서 순수 배양하였다. 48시간 동안 혐기 배양(5% CO₂) 후 잘 분리된 집락 2~3개를 백금으로 선별하여 BHI 액체배지에 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 균주를 최종 2×10⁷ CFU/ml이 되도록 10% glycerol solution에 담아 -80°C에 보관하여 실험에 이용하였다.

2.2. 부유성 *S. mutans*에 대한 항균력 평가: 잔토리졸을 계면활성제(SLS: 200, 250 ppm, Tau: 250, 300 ppm)와 섞은 뒤 12.5% 에탄올에 잔토리졸의 농도가 12.5, 25.0 ppm이 되도록 혼합하였다. 각각의 혼합물은 1.5 ml microtube에 넣고 잘 혼합될 수 있도록 와동하였다. 혼합된 실험용액 800 μl와 2×10⁷ CFU/ml *S. mutans* 200 μl을 1.5 ml microtube에 넣어 균과 용액이 고루 섞이도록 한 뒤 5분간의 반응 시간을 부여하였다. 5분 뒤 실험용액에 접촉된 균을 최종 10⁻⁴ 까지 희석하였으며 희석된 용액의 20 μl만을 채취하여 15% 자당(sucrose)이 함유된 MSB agar plate에 도말하였다. 37°C에서 72시간 동안 혐기 배양한 후 균의 집락 수(CFU/ml)를 확인하였다.

2.3. *S. mutans* 바이오필름에 대한 항균력 평가: 실험실 실험에서 바이오필름 형성을 유도하기 위해 살균된 인공타액(Gastric musin 4.4 g, NaCl 0.762 g, CaCl₂ 0.426 g, KH₂PO₄ 1.476 g, KCl 2.228 g in 2,000 ml distilled water)

에 직경 10.6 mm, 높이 1.3 mm의 수산화인회석 디스크를 담귀 4시간 동안 37°C 항온기에서 코팅하였다. 인공타액으로 코팅된 수산화인회석 디스크를 인공타액(800 μl)이 0.3% 포도당(최종 포도당 농도 0.15%)이 함유된 BHI 액체배지(800 μl)를 1 : 1 비율로 섞은 타액-배지(saliva-media)에 담갔다. 최종적으로 *S. mutans* 200 μl를 접종시킨 후 바이오필름이 형성되도록 37°C 혐기 배양하였다. 16, 40, 64시간 배양 시점에 새로운 타액-배지(타액(800 μl)+0.15% 포도당과 0.15% 자당(최종 0.075% 포도당+0.075% 자당)이 함유된 BHI 액체배지(800 μl))로 교체해 주었다.

배양 후 16시간째에는 바이오필름이 형성된 디스크를 새 배지로 옮기기 직전 항균물질(1 ml, 상온)에 5분 동안 노출시킨 후 생리 식염수로 세척하였다(3×2 ml, 10초 동안 두 번 침적시킴). 세척한 디스크를 새로운 타액-배지로 옮긴 후 배양하였다(37°C, 10% CO₂). 이후 항균물질 노출은 20, 24, 40, 64시간에도 다시 반복해 주었고, 40과 64시간째에는 배지교환 과정을 시행하였다.

수산화인회석 디스크에 형성된 바이오필름 내 균체량을 측정하기 위해 1 ml의 생리식염수가 들어있는 튜브에 디스크를 넣고 5분 동안 와동하였으며 초음파세척기를 이용하여 나머지 균체를 떨어뜨렸다. 모아진 균체를 10⁻⁴까지 희석하여 MSB 배지에 도말하여 48시간 동안 37°C에서 혐기 배양하였다. 48시간 후 MSB 배지에 나타난 균체를 확인하여 최종 CFU/ml를 계산하였다.

2.4. 세포 독성평가: 본 연구에서는 평가한 각종 시험용액의 안전성을 평가하기 위해서 MTT 세포독성 평가를 시행하였다. 시험용액은 12.5% 에탄올+200 ppm SLS+250 ppm 잔토리졸, 12.5% 에탄올+250 ppm Tau+250 ppm 잔토리졸을 시험균으로 하였고 12.5% 에탄올, 200 ppm SLS, 250 ppm Tau, 12.5와 25.0 ppm 잔토리졸, 0.1% 클로르헥시딘과 아무것도 첨가하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 5×10⁵ cells/ml 929 세포주⁷⁾ 200 μl를 배지(Roswell park memorial institute-1640, Gibco BRL, USA)에 넣고 24시간 동안 전배양을 하였다. 24시간 경과 후 배지를 제거해 내고 각 well에 배지와 함께 시험용액을 첨가한 다음 5분 동안 37°C에서 반응시켰다. 5분 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 20 μl를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후 well의 모든 용액을 제거하고 DMSO

200 μ l를 첨가하여 다시 30분 동안 37°C에서 배양한 후 비색정량법(570 nm)으로 세포의 사멸율을 측정하여 세포에 대한 독성을 평가하였다.

2.5. 통계분석: 시험용액의 부유성 미생물과 바이오필름 형성 억제 효과 및 세포독성 효과의 비교를 위해서 ANOVA 분석을 시행하였으며, 다중검정은 Duncan과 Tukey의 사후 분석 방법으로 확인하였다. 유의 수준은 0.05로 정하였다. 모든 분석은 SPSS 12.0 프로그램(SPSS Inc. USA)을 이용하였다.

연구성적

1. 가용화된 잔토리졸 용액의 부유성 *S. mutans*에 대한 항균효과

부유성 *S. mutans* 모델을 사용하여 잔토리졸의 항균효과를 평가한 결과 잔토리졸만 사용했을 경우 12.5% 에탄올 용매에서도 충분히 가용화 되지 못하여 항균력을 거의 나타내지 못했다(Table 1). 한편 SLS는 그 자체가 항균효과가 있어서 250 ppm의 경우 잔토리졸 농도에 상관

없이 모든 균을 사멸시켰다. 200 ppm SLS의 경우 잔토리졸과 병용했을 때 항균효과가 유의하게 향상되었다($p < 0.05$). 한편 Tau 자체는 SLS에 비해서 자체 항균력은 적게 나타났지만, 250과 300 ppm 용액에서 잔토리졸과의 상승 효과를 통해 항균력이 크게 향상되었다(Table 1).

2. 가용화된 잔토리졸의 *S. mutans* 바이오필름에 대한 항균효과

잔토리졸(25.0 ppm)은 1% DMSO에 녹였을 때보다는 (Table 2) 에탄올과 계면활성제를 함께 이용해 가용화시켰을 때 *S. mutans* 바이오필름 형성 억제 효과가 유의하게 높게 나타났다. 잔토리졸만을 단독으로 포함하는 시험용액 보다는 SLS 또는 Tau를 첨가한 시험용액에서 바이오필름 형성 억제 효과가 각각 12.5%, 9.3% 향상되었다 ($p < 0.05$).

3. 세포 독성 평가

25.0 ppm 농도의 잔토리졸 자체는 0.1% 클로르헥시딘에 비해 세포독성이 유의하게 낮았다. 또한 잔토리졸을

Table 1. Antibacterial effects of xanthorrhizol containing surfactants on planktonic *S. mutans* (Log [CFU/ml])

Solutions	Concentration of Xanthorrhizol (ppm)			p-value
	0.0	12.5	25.0	
Distilled Water	7.72±0.02	-	-	-
None	7.48±0.14	7.58±0.15	7.52±0.12	0.470
12.5% SLS (200 ppm)	2.80±0.18 ^a	1.80±0.17 ^b	2.09±0.36 ^b	0.007
12.5% SLS (250 ppm)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
EtOH Tau (250 ppm)	4.01±0.13 ^a	0.90±1.56 ^b	1.29±1.14 ^b	0.028
EtOH Tau (300 ppm)	3.61±0.12 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.000

The differences among the groups were analyzed by one way ANOVA and Duncan's post hoc analysis. Same letters are not significantly different among the groups at the 5% level of significance. The data shown are the Mean±SD. EtOH=ethanol; SLS=sodium lauryl sulfate; Tau=sodium methyl cocoyl taurate.

Table 2. Antibacterial effects of xanthorrhizol containing surfactants on *S. mutans* biofilm

EtOH (%)	DMSO (%)	Xan (ppm)	SLS (ppm)	Tau (ppm)	Log (CFU/ml)
12.5	-	-	-	-	7.92±0.05 ^a
-	1.0	25.0	-	-	7.85±0.05 ^a
12.5	-	25.0	250	-	6.87±0.02 ^b
12.5	-	25.0	-	300	7.12±0.14 ^b

The differences among the groups were analyzed by one way ANOVA and Duncan's post hoc analysis. Same letters are not significantly different among the groups at the 5% level of significance. The data shown are the Mean±SD. Xan=xanthorrhizol; EtOH=ethanol; SLS=sodium lauryl sulfate; Tau=sodium methyl cocoyl taurate.

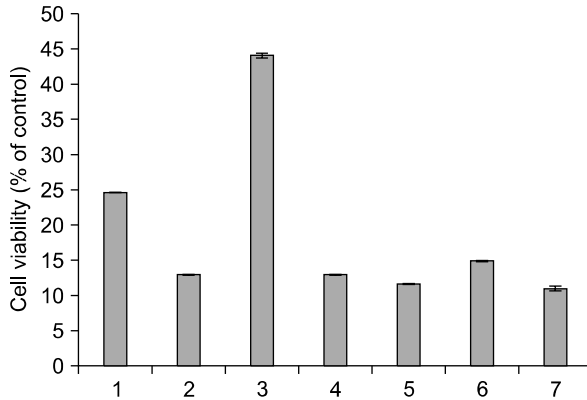


Fig. 1. Cytotoxicity of antibacterial agents by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. 1=ethyl alcohol (EtOH, 12.5%); 2=chlorhexidine (CHX, 0.1%); 3=xanthorrhizol (XAN, 25 ppm); 4=sodium lauryl sulfate (SLS, 250 ppm); 5=SLS (250 ppm)+EtOH (12.5%)+Xan (25 ppm); 6=sodium methyl cocoyl taurate (Tau, 300 ppm); 7= Tau (300 ppm)+EtOH (12.5%)+Xan (25 ppm).

SLS 또는 Tau와 같은 계면활성제를 이용해서 가용화시킨 실험 용액의 경우도 0.1% 클로르헥시딘에 비해서 비슷한 수준의 세포 독성을 나타냈다(Fig. 1).

고안

본 연구에서는 구강 내 우식성 균주에 대해서 효과적인 항균효과가 있다고 보고된 인도네시아 약용식물 추출물인 잔토리졸을 구강양치액 형태로 개발하기 위해서 저농도의 에탄올(12.5%)과 계면활성제(SLS or Tau)를 병용하여 가용화시킨 뒤 항균효과를 평가하였다.

잔토리졸의 항균력을 보고한 대부분의 선행 실험실 연구에서는 가용화를 위해서 1~10% 농도의 DMSO를 사용하였다^{4,6,11}. 하지만 DMSO의 안정성에 대한 문제점이 거론되면서 대체물질의 탐색이 필요한 상황으로 리스테린의 경우 에센셜오일을 가용화시키기 위해서 21~25%의 에탄올을 사용하고 있다¹²⁻¹⁴. 하지만 이 정도 수준의 에탄올은 위험성 또한 높기 때문에 가능하다면 보다 저농도의 알코올이 함유된 구강양치액 개발이 필요하다^{9,15}.

본 연구에서는 부유성 *S. mutans* 모델을 사용하여 잔토리졸의 항균 효과를 검토한 결과 12.5% 에탄올 용매만을 사용한 경우에는 혼합용액의 항균력이 거의 없는 것으로 보아서 잔토리졸이 가용화 되지 않은 것으로 여겨진다. 그러나 200 ppm SLS를 첨가하자 잔토리졸의 항균력

이 크게 향상되었고 이는 SLS가 잔토리졸을 가용화시켰기 때문으로 사료된다. 또한 Tau의 경우 잔토리졸에 각각 250과 300 ppm을 첨가하자 항균력이 크게 향상되어 잔토리졸이 가용화되었음을 알 수 있었다. 선행 잔토리졸을 활용한 실험연구에서는 잔토리졸을 가용화시키기 위해 DMSO를 주로 사용했으나 본 연구에서는 구강양치액 제조라는 목표를 위해서 DMSO 대신 에탄올을 사용하였다.

일반적으로 DMSO는 에탄올에 비해 점도와 밀도가 크고 유전상수 또한 높다¹⁶. 따라서 DMSO는 분자간 인력을 방해하여 침전되는 것을 억제한다. 하지만 DMSO는 특유의 향뿐만 아니라 안전성에 대한 우려 때문에 인체 내 사용이 제한되고 있다. Jennifer 등¹⁷에 따르면 신경세포가 DMSO에 주기적으로 노출된 경우 세포자살(apoptosis)을 유발할 수 있다고 보고하였다. 에탄올 또한 난용성 약물을 용해시키기 위한 유기용매로 널리 사용되고 있으나 그 유해성이 지속적으로 제시되고 있으며, 특히 구강 점막에 대해서 구강암을 유발할 수 있는 가능성도 제기된 바 있다⁸. 이에 본 연구에서는 미량의 계면활성제를 병용함으로써 에탄올의 함량을 최소화하면서 잔토리졸을 가용시킬 수 있는 방법을 탐색하였다. 계면활성제는 단일분자 내에 극성 부분과 비극성 부분을 함께 갖고 있는 양친 용매성 물질로써 세포막을 구성하는 인지질과 유사한 구조를 갖고 있다. 즉 계면활성제는 수용액에서 마이셀을 구성하고 안쪽에 형성된 비극성 영역에 난용성 유효물질을 포집하여 수용액 내에 고루 분산되게 한다. 이렇게 마이셀 내부에 캡슐화된 유효물질은 세포와 접촉하게 되면 세포 안으로 유입되어 약리작용을 나타낸다. 한편 계면활성제는 pH, 온도 등 주위 환경에 따라 마이셀 형성에 영향을 받는다¹⁸. Yiv 등¹⁹은 알코올 첨가 시 계면활성제에 의한 마이셀의 크기가 최소화되어 응집이 줄어든다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 잔토리졸의 가용화 효과는 알코올과 계면활성제에 의해 형성된 작은 마이셀 내부로 잔토리졸이 유입되어 효과적으로 가용화가 되는 기전 때문이라고 여겨진다.

바이오필름을 형성하고 있는 세균은 부유 상태의 미생물보다 항생물질에 대한 강력한 내성²⁰을 갖기 때문에 바이오필름 평가에서는 잔토리졸의 농도는 25.0 ppm을 선택하였고 계면활성제 역시 항균활성이 뚜렷하게 나타난 농도를 선택하여 평가하였다. 그 결과 SLS 250 ppm이

함유된 잔토리졸 혼합용액과 Tau 300 ppm이 함유된 잔토리졸 혼합용액은 바이오필름 형성을 유의하게 억제하는 것으로 나타났다.

선행연구에 의하면 잔토리졸과 클로르헥시딘을 대상으로 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 minimum inhibitory concentration (MIC)을 비교했을 때 각각 2 $\mu\text{g/ml}$ 과 1 $\mu\text{g/ml}$ 으로 뛰어난 항균효과를 나타낸다고 알려졌다⁵⁾. 또한 잔토리졸은 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 *S. mutans*의 바이오필름 형성을 60% 감소시켜 치태 형성을 예방할 수 있는 것으로 보고 된 바 있다¹¹⁾. 하지만 바이오필름에 대한 선행연구에서는 잔토리졸이 미리 코팅된 표면에 바이오필름이 형성되는 것을 저해하는 효과를 보인 것이고 바이오필름 형성 지지체 또한 표면이 매끈한 96-well microtiter plate를 이용했기 때문에 본 연구에서 사용한 바이오필름 모델과는 다소 차이가 있다. 본 연구에서 이용한 바이오필름 모델은 치아 성분으로 알려진 수산화인회석을 디스크 형태로 제작하여 보다 실제 치아에 가까운 표면 구조를 재현하였다. 바이오필름 형성 억제 효과 또한 대부분의 선행 연구에서는 표면을 잔토리졸로 미리 코팅한 후 평가를 시행하였기 때문에 실제 구강내에서의 바이오필름 형성억제평가라는 점에서는 제한점이 있었다. 이에 본 연구에서는 초기 6시간 동안 바이오필름을 수산화인회석 디스크에 1차로 형성시킨 뒤 잔토리졸을 5분간 노출시킴으로써 실제상황에 보다 가깝도록 재현하였다. 이처럼 복합적인 요인을 반영한 바이오필름 모델과 비교적 짧은 5분이라는 접촉시간을 고려했을 때 SLS와 Tau에 의해 가용화된 잔토리졸의 바이오필름 형성 억제 효과는 뛰어난 것으로 여겨진다.

한편 각종 천연 에센셜오일의 항균력을 평가한 Takarada 등²¹⁾의 연구에 의하면 Manuka oil은 0.25%, Tea tree oil, Eucalyptus oil은 1.0%, Lavandula oil, Romarious oil은 1.0%의 MIC를 나타냈다. 또한 *Mentha piperita* 또는 *Cuminum cyminum* essential oil을 이용한 Shayegh 등²²⁾의 보고에 따르면 이들 물질들의 *S. mutans*에 대한 minimum bactericidal concentration(MBC)가 각각 6,000 ppm 또는 4,000 ppm으로 잔토리졸에 비해 항균력이 현저히 낮은 것을 알 수 있다. 즉, 대부분의 천연 추출 오일들의 경우 구강내 형성된 바이오필름을 억제하기 위해서는 상당히 고농도의 유효성분이 필요하며 이들을 가용화 하기 위해 많은 유기 용매 및 계면활성제가 사용되어야 하는 문제

가 있다. 따라서 본 연구를 통해 도출된 가용화 방법을 이용하여 잔토리졸을 활용할 경우 낮은 농도에도 불구하고 효과적인 구강관리가 가능하리라 예상된다. 특히 Fine 등²³⁾의 보고에 따르면 에센셜오일을 주성분으로 함유한 대표적인 구강양치액인 리스트린의 경우 불소 제제 또는 triclosan 등을 주성분으로 함유한 양치액에 비해 바이오필름 제거에 탁월한 효과를 나타내고 있어 향후 잔토리졸의 활용성이 매우 높을 것으로 보인다.

항균력과 세포독성은 서로 밀접하게 관련된 개념으로써 미생물에 항균력이 높다는 것은 반대로 세포독성 역시 높을 수 있다는 것을 의미한다. 그러므로 새로운 물질에 대해서는 세포독성 검사를 통해 안전성을 반드시 확인할 필요가 있다. 세포독성 평가 결과 잔토리졸 혼합용액은 현재 널리 사용되고 있는 0.1% 클로르헥시딘과 세포독성 정도가 거의 유사하게 나타났다. 반면 에탄올과 계면활성제가 포함되지 않은 순수한 잔토리졸의 경우는 0.1% 클로르헥시딘에 비해 세포독성이 훨씬 낮게 나타났다. 하지만 계면활성제와 혼합할 경우 세포독성이 높아지는 것으로 보아 잔토리졸 혼합용액의 세포독성은 주로 계면활성제의 영향인 것으로 보여진다. 특히 SLS는 저렴한 가격에 뛰어난 항균효과로 치약에서 가장 많이 사용되고 있는 계면활성제이다. 그러나 SLS는 구강 점막을 자극할 뿐만 아니라 재발성 아프타성 궤양 발생을 증가시키는 것으로 알려져 있어 대체물질에 대한 연구가 진행되고 있는 실정이다^{24,25)}. 그러므로 본 연구에서는 SLS보다 안전성이 높다고 알려진 Tau를 사용한 결과 잔토리졸의 가용화 및 의미있는 항균 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과를 활용할 경우 대표적인 에센셜오일계 구강 양치액인 리스트린에 갖고 있는 점막 자극성이라는 한계점을 극복하면서 사용감이 편한 구강양치액의 개발도 가능하리라 사료된다.

본 연구에서는 대표적인 치아우식증 유발 균주인 *S. mutans*만을 사용하여 부유성과 바이오필름 모델로 항균 효과를 평가했지만, 향후 연구에서는 치주질환 유발 균주와 같은 다른 구강 내 미생물에 대한 항균 평가도 필요하며, 아울러 가용화된 잔토리졸 함유 양치액을 이용한 임상연구도 필요하다. 또한 향후 에탄올이 완전히 배제된 양치액 개발을 위해 폴리옥시에틸렌 수소화 캐스터 오일(Polyoxyethylene hydrogenated castor oil) 등의 새로운 유화제를 탐색하는 노력이 필요하다. 한편, 현재 실험

실 수준의 가용화가 실제 산업화 수준에서도 동일한 작용을 하는지 검증이 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 난용성 천연 항균물질인 잔토리졸에 SLS와 Tau를 병용할 경우 낮은 알코올 함량을 가진 용액의 형태로 가용화시킬 수 있었으며, 이 용액은 *S. mutans*에 대해서 우수한 항균효과를 보이면서 기존의 상용 클로르헥시딘과 유사한 정도의 세포독성을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과를 활용할 경우 향후 기존의 구강양치액이 갖는 부작용을 최소화시킨 천연물인 잔토리졸을 활용한 구강양치액의 제조가 가능할 전망이며, 아울러 유아나 전신질환을 갖고 있는 환자의 구강관리에 활용 가능한 제품의 개발도 가능하리라 사료된다.

결론

본 연구에서는 난용성 약물인 잔토리졸을 이용한 구강양치액 개발을 위해 가용화 기술을 탐색하였으며 다양한 가용화 방법 중 계면활성제와의 상호작용에 대한 효과를 부유성 및 바이오필름 모델에 적용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 부유성 *S. mutans*에 대한 항균력은 Tau에 비해 SLS가 높았지만, 잔토리졸과의 시너지효과는 Tau에서 더 크게 나타났다.

2. 바이오필름 모델 평가결과, 부유성 모델과 유사하게 잔토리졸과 계면활성제 혼합에 의해 항균력이 상승되는 현상을 확인하였다.

3. 바이오필름 모델에 대한 항균력은 12.5% 에탄올 + 250 ppm SLS + 25 ppm Xan 조성의 혼합액에서 가장 높게 나타났다($p < 0.05$).

4. 계면활성제를 이용한 잔토리졸 가용화 용액의 세포독성은 기존에 구강 항균물질로 많이 사용하던 0.1% 클로르헥시딘 용액과 비슷한 수준을 보였다.

본 연구를 통해 도출된 가용화 방법은 잔토리졸을 이용한 다양한 구강관리용품에 활용될 수 있으며, 또한 여러 난용성 약물의 가용화에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res* 1994;8(2):

291-301.

2. Loe H, Schiott CR, Karring G, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodontol Res* 1976;11(3):135-144.

3. Sharma N, Charles CH, Lynch MC, Qaqish J, McGuire JA, Galustians JG, et al. Adjunctive benefit of an essential oil-containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss regularly: a six-month study. *J Am Dent Assoc* 2004;135(4):496-504.

4. Shim JS, Pyun YR, Hwang JK. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia* 2000;71(3):321-323.

5. Hwang JK, Shim JS, Baek NI, Pyun YR. Xanthorrhizol: a potential antibacterial agent from *Curcuma xanthorrhiza* against *Streptococcus mutans*. *Planta Med* 2000;66(2):196-197.

6. Kim JE, Kim HE, Hwang JK, Lee HJ, Kwon HK, Kim BI. Antibacterial characteristics of *Curcuma xanthorrhiza* extract on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Microbiol* 2008;46(2):228-232.

7. Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *J Essent Oil Res* 2003;1(3):4-12.

8. Werner CW, Seymour RA. Are alcohol containing mouthwashes safe? *Br Dent J* 2009;207(10):E19; discussion 488-489.

9. Weaver A, Fleming SM, Smith DB. Mouthwash and oral cancer: carcinogen or coincidence? *J Oral Surg* 1979;37(4):250-253.

10. Mayer J, Filstead WJ. The adolescent alcohol involvement scale. *J Stud Alcohol* 1979;40(3):291-300.

11. Rukayadi Y, Hwang JK. Effect of coating the wells of a polystyrene microtiter plate with xanthorrhizol on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *J Basic Microbiol* 2006;46(5):410-415.

12. Claffey N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *J Clin Periodontol* 2003;30(Suppl 5):22-24.

13. Bernstein ML. Oral mucosal white lesions associated with excessive use of listerine mouthwash. Report of two cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46(6):781-785.

14. Modell JG, Taylor JP, Lee JY. Breath alcohol values following mouthwash use. *J Am Med Assoc* 1993;270(24):2955-2956.

15. Bolanowski SJ, Gescheider GA, Sutton SV. Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. *J Periodontol Res* 1995;30(3):192-197.

16. Park JK, Kim JK. Protein migration in the high electrical field using the micro-aqueous system. *Hwahak Konghak* 1994;32(2):206-212.

17. Jennifer LH, Karen L, Kevin KN, John WO, Charles FZ, Steven M, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* 2009;34(1):1-10.

18. Gaysinsky S, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J. Stability and antimicrobial efficiency of eugenol encapsulated in surfactant micelles as affected by temperature and pH. *J Food Prot* 2005;68(7):1359-1366.

19. Yiv S, Zana R, Ulbricht W, Hoffmann H. Effect of alcohol on the properties of micellar systems: II. Chemical relaxation studies of the dynamics of mixed alcohol + surfactant micelles. *J Colloid Interface Sci* 1981;80(1):224-236.

20. Shani S, Friedman M, Steinberg D. The anticariogenic effect of

- amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res* 2000;34(3):260-267.
21. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(1):61-64.
 22. Shayegh S, Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh SD. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat Prod Res* 2008;22(5):428-439.
 23. Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2001;28(7):697-700.
 24. Herlofson BB, Barkvoll P. Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers. A preliminary study. *Acta Odontol Scand* 1994;52(5):257-259.
 25. Herlofson BB, Barkvoll P. Oral mucosal desquamation caused by two toothpaste detergents in an experimental model. *Eur J Oral Sci* 1996;104(1):21-26.