

치약 및 함유 성분의 구강 점막 자극 평가를 위한 새로운 *in Vitro* 시험법 적용

조선아, 김유진, 김찬호, 김영소, 안수선*

(주) 아모레퍼시픽 기술연구원

Application of New *in Vitro* Test Method to Evaluate the Oral Mucosal Irritation for Toothpaste and its Ingredients

Sun-A Cho, Yoo-Jin Kim, Chan-Ho Kim, Young-So Kim, Su-Sun An*

AmorePacific R&D Unit, 1920 Yonggu-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Kyonggi-do, 17074, Korea

ABSTRACT. Oral hygiene products, such as toothpastes, are essential for personal hygiene. However, these products contain substances that cause mucosal irritation but are essential to maintain functionality. Until now, there is no *in vitro* animal test to evaluate oral mucosal irritation for oral hygiene products and its ingredients. Moreover, oral hygiene products are classified as cosmetics in EU, thus the irritation test for these products and its ingredients are prohibited. In Korea, oral products are classified as quasi-drugs now, but there is a high possibility to change to cosmetics according to global trends. So we needed to set up the *in vitro* test system to evaluate oral mucosal irritation and we studied the oral mucosal irritation for toothpaste and its ingredients by agar diffusion test. In the evaluation of ingredients, the use of surfactant, tooth whitening ingredient and some functional ingredients affect the increase of cytotoxicity. In addition, when diluted to 25%, the toothpastes showed the broad range of irritation and it was appropriate to judge the level of irritation. From the results, we can set the evaluating method for toothpaste and its ingredients and internal criteria for the mucosal irritation at same time.

KEY WORDS: Toothpaste, oral mucosa, irritation, agar diffusion assay, alternative

서론

치약 같은 구강 세정 제품은 현대인의 개인위생 관리에 필수적으로 사용되는 제품 카테고리 매일, 수회, 평생 동안 사용되고 있다. 치약 및 구강 청결제 같은 구강 적용 제품들은 적용 부위 특성상 소화 기계로 유입될 가능성이 있으므로 의약외품으로 분류하여 주성분에 대해서는 사용 원료 성분 및 함량 제한으로

안전에 대한 관리를 하고 있다. 그러나 이들 제품은 유럽연합에서는 기능성 화장품으로 분류되고 있으며 유럽 화장품 법의 7차 개정에 의거 안전성 평가에 동물 시험이 금지되고 있다 (European Union, 2003). 현재는 우리나라의 경우는 의약외품 중 일부 (염모제, 탈염 및 탈색제, 제모제, 탈모 방지제, 옥용제)가 화장품으로 전환이 되었고, 기능성 화장품으로 분류되거나 해외 국가의 규제 경향에 맞추어 간다는 점에 고려하면 치약 및 구강 제품 류도 화장품으로 전환될 가능성이 높다 (European Union, 2009).

이전 동물 및 임상 연구들에서 계면활성제와 같은 치약 내 사용 원료에 의해 구강 점막 자극이 유발될 수 있음이 보고된 바 있다. (Babich et al., 1997; Bourrinet et al., 1995; Herlofson et al., 1996; Rantanen et al., 2003; Veys et al., 1994). 따라서

Received: 18 February 2019
Revised: 13 December 2019
Accepted: 13 December 2019

* Corresponding author: Susun An
AmorePacific R&D Unit, 1920 Yonggu-daero,
Giheung-gu, Yongin-si, Kyonggi-do, 17074, Korea
Tel: 82-31-280-5851
E-mail: ssan@amorepacific.com

치약 사용 원료 및 제품에 대한 구강 점막 자극 시험은 제품 개발 단계나 출시 전에 반드시 필요하다. 그러나 국내법 법규상 성분 허가 등록을 위한 구강 점막 자극 가능성을 평가에는 햄스터 혹은 랫드 같은 실험동물을 이용한 구강 점막 자극 시험법을 이용하고 있다. 치약의 안전성에 대해서는 인체 사용성 평가를 통해 간접적으로 수행할 수 있으나 원료가 아닌 제형에 대한 평가만 가능하고 인체 시험에 대한 리스크 및 고비용의 임상 시험 비용 때문에, 인체 최종 시험 전 사전에 치약 함유 원료 및 제형에 대한 점막 자극성을 확인하는 과정이 필요하다. 그러나 세계적인 실험동물 윤리 문제나 규제 흐름상 동물실험을 배제해야 하나 현재 구강 점막 자극에 대한 공인된 *in vitro* 시험법은 없는 상황이다.

본 연구는 이러한 동물 실험 금지의 트렌드와 구강 제품 및 함유 원료의 안전성을 확보한 *in vitro* 시험법을 확보하고 이 시험법을 통하여 치약 원료의 구강 자극 수준 및 함유 제형에서의 영향, 현재 시장에서 판매 중인 치약의 자극 수준을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험 물질 및 시험 농도

구축하고자 하는 시험법이 동물 구강 점막 자극 시험법의 결과의 상관성을 보이는지 확인하기 위해 동물 데이터가 있는 성분 5종에 대해 평가하여 시험법의 효용성을 평가하였다 (Table 1). 그다음 구축된 시험법에 의한 구강 사용 원료의 자극 수준을 확인하기 위해 총 87종의 원료에 대해 사용 농도 10배를 기준으로 자극 수준을 확인하였다 (Table 2). 만약 사용 예정 농도 10배의 농도에서 중등도 (moderate) 이상의 자극이 유발되면 추가적으로 농도를 단계적을 낮추어 사용 예정 농도까지 평가하였다. 원료 평가에서 자극에 영향을 주는 원료에 대해 제형에서의 자극 영향도를 확인하기 위해 원료에 평가 시 사용 농도에서 중등도 이상의 자극을 보이는 원료를 대상으로 기본 치약 점도 베이스 제형에 계면활성제 혼합물 2종과 그 외 기능성 물질 6종을 다양한 조합의 18종의 제형을 제작 (Table 3)하고 10%, 25%, 50% 농도로 희석하여 agar diffusion assay를 수행하였다. 또한 현재 판매 중인 국내외 제품 79종의 치약에 대해 농도 별 자극 수준을 평가하였는데, 시험군은 sulfate 계면활성제가 없다고 소구 하는 제품 19종 (T1-T9), 어린이 치약 5종 (T23, T61-64), sulfate 계면활성제 함유 제품 55종

으로 구성하였다.

Table 1. Lists of test materials for *in vivo* data correlation

in vivo	Chemical
Irritant	SLS 1%
NA*	SLS 0.5%
Irritant	Triton X-100 1%
Irritant	Hydrogen peroxide 30%, 3% (active)
Irritant	Ethanol 100%
NA*	Ethanol 30%
NA*	Sorbitol 100% (active 70%)
	Negative control (media)

*NA: Not assessed. However, it is an approved raw material for use in oral products.

2. Agar diffusion assay

본 시험은 의료 기기에 심사 허가 과정에서 요구하는 시험 항목으로 가이드라인에 언급된 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다 (ISO, 2009; US pharmacopeia 31, 2008). 10% Fetal bovine serum (FBS: Gibco, Grand island, USA) 및 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Gibco)배지에 L929 cell (ATCC CCL1(NCTC clone 929), ATCC, VA, USA)을 2×10^5 cells/ml의 밀도로 희석한 후 6웰 플레이트 (Falcon, NY, USA)에 2 ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 (SANYO Electric Co., Osaka, Japan)에서 24시간 동안 배양하였다. 다음날 세포의 단층 배양 상태(배양 용기 면적의 80%이상)와 형태를 현미경으로 확인하였다. 아가로즈 (Agarose) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 멸균 3차 증류수에 3% 농도로 분산시킨 후, 전자레인지에 이용하여 열을 가해 투명하고 약한 점성 있는 용액이 되도록 하였다. 그 다음에 20% FBS가 혼합된 phenol red free DMEM (Gibco)와 1:1로 동량 혼합한 다음 100 ml당 1 ml의 비율로 0.33% neutral red 수용액 (Sigma-Aldrich)을 넣어 재 혼합한 후 42°C가 되도록 상온에서 식혀주었다. 6 웰 플레이트에 분주된 세포 배양액을 제거한 후 아가로즈-phenol red free DMEM-Neutral red 혼합액을 2 mL씩 벽면을 타고 천천히 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 45분 동안 혼합액을 굳혀주었다. 멸균된 지름 8 mm의 원형 필터 디스크 (Advantec, CA, USA)에 15 ul의 시험 물질을 도포한 다음 굳어진 아가로즈위에 조심스럽게 올려주었다. 이때 양성

Table 2. Lists of ingredient that used in oral hygiene product

Category (n)	Test material	Test concentration
Fragrance/ Flavor (20)	Fragrance/ Flavor mixture no. 1~20 †	1%, 10%
Surfactant (6)	Sodium lauryl sulfate	Active 1%, 0.5%, 0.1%
	Sodium lauryl glutamate	Active 1%, 0.5%, 0.1%
	Lauamidopropyl betaine	Active 1%, 0.5%, 0.1%
	Cocaminopropyl betaine	Active 1%, 0.5%, 0.1%
	Sodium methyl cocoyl taurate	Active 1%, 0.5%, 0.1%
	Potassium cocoyl glycinate	Active 1%, 0.5%, 0.1%
Abrasive (3)	Hydrated silica*	Supernatant of 20% extract
	Calcium carbonate*	Supernatant of 20% extract
	Silica*	Supernatant of 20% extract
Formulation composition (2)	Sorbitol (70% active)	100%
	Glycerine	100%
pH modifier (4)	Argine	5%
	Citric acid	1%
	Sodium citrate	1%
	Phosphoric acid	5%
Viscosity modifier (5)	Sodium alginate	20%
	Cellulose gum	10%
	Hydroxyethyl cellulose	20%
	Xanthan gum	10%
	PEG-32	50%
Sweetener (7)	Stevioside	5%
	Potassium acesulfame	5%
	Sucralose	5%
	Xylitol	5%
	Sodium saccharin	5%
	Cyclodextrin syrup	50%
	Erythritol	100%
Active Ingredients (12)	Sodium chloride	20%
	Tocopheryl acetate	10%
	Calcium glycerophosphate	2%
	Hydrogen peroxide	8.57%
	Potassium nitrate †	15%
	Dipotassium Glycyrrhizate	0.1%
	Sodium monofluorophosphate	0.76%, 7.6%
	Sodium fluoride	3 %
	Tetrasodium pyrophosphate	3.4 %, 34%
	Cetylpyridium chloride	0.05%, 0.5%
	<i>Camellia sinensis</i> leaf extract	0.004%
	Titrated extract of <i>Zea mays</i> L. unsaponifiable fraction	0.002%
Granular powder (4)	Zeolite/ Titanium dioxide (CI 77891)/ Menthol/ Hydrated silica / <i>Mentha piperita</i> (peppermint) extract / <i>Eucalyptus globulus</i> leaf extract	80%
	Titanium dioxide (CI 77891)	3%
	Hydroxyapatite	2%
	<i>Juglans regia</i> (walnut) shell powder	3%

Category (n)	Test material	Test concentration
Extracts / Oil (21)	<i>Pueraria lobata</i> root extract	1%
	<i>Panax ginseng</i> root extract	1%
	<i>Scutellaria baicalensis</i> root extract	1%
	<i>Prunus persica</i> (peach) kernel extract	1%
	<i>Olea europaea</i> (olive) fruit oil †	10%
	<i>Thuja orientalis</i> seed extract †	1%
	<i>Morus alba</i> bark extract †	1%
	<i>Angelica acutiloba</i> root extract	1%
	<i>Camellia sinesis</i> leaf extract	1%
	Chamomile oil †	1%
	Rosmary oil †	1%
	<i>Lilium candidum</i> bulb extract	1%
	Pine Oil †	1%
	<i>Zingiber officinale</i> (ginger) root extract	1%
	Lemon oil †	1%
	<i>Citrus junos</i> fruit extract	1%
	<i>Cocos nucifera</i> (coconut) oil †	50%
	<i>Aloe barbandesis</i> leaf extract	1%
	Rose Extract	1%
	Malic acid	1%
	<i>Lavandula angustifolia</i> (Lavender) flower water	1%
Emulsifier (1)	PEG-60 Hydrogenated castor oil	100%
Preservative (1)	Sodium benzoate	0.3%, 3%
Chelating agent (1)	Disodium EDTA	0.05%, 0.5%

*은 불용성 물질로 20%농도로 배지에 희석하여 37°C에서 24시간 동안 추출한 후 원심을 돌려 상층액을 이용하여 평가함
 †은 난용성 물질로 olive 오일에 녹여 평가함

Table 3. Formulation compositions for evaluation of irritation effect by raw material

Ingredient	Formulation No.																	
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18
D.I.Water	49	47	44.6	29	27	24.6	40.43	38.43	36.03	48.24	46.24	43.84	45.6	43.6	41.2	48.95	46.95	44.55
Sorbitol (active 70%)	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Glycerine	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Cellulose gum	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sodium laury sulfate	.	2	.		2			2			2			2			2	
Mixture of Sodium lauroyl glutamate and Lauramidopropyl Betaine	.	.	2			2			2			2			2			2
Sorbitol (active 70%)	.	.	1.7			1.7			1.7			1.7			1.7			1.7
Sodium chloride	.	.	.	20	20	20												
Hydrogen peroxide (active 35%)	.	.	.				8.57	8.57	8.57									
Sodium monofluorophosphate	.	.	.							0.76	0.76	0.76						
Tetrasodium pyrophosphate	.	.	.										3.4	3.4	3.4			
Cetylpyridinium Chloride																0.05	0.05	0.05

컨트롤로 1%의 sodium lauryl sulfate (SLS, Sigma-Aldrich)를 사용하였고, 음성 대조군 (용매 대조군)으로는 DMEM 배지 혹은 olive oil (지용성의 물질의 경우, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 물질 적용 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 다음날 자를 이용하여 필터에서 환의 가장자리까지의 거리(decolorization zone)를 측정하였다.

3. 결과의 판정

모든 시험 물질의 샘플 수는 3개씩 수행하였으며, 이들의 평균을 구한 다음 Table 4에 언급된 판정 기준에 따라 자극 수준을 분류하였다 (US pharmacopeia 31, 2015). 또한 제품에 대한 평가시 각 농도별 자극의 분포와 통계는 Minitab 18 프로그램 (Minitab, LLC, Pennsylvania, USA)의 기술통계량 분석을 통해 확인하였다.

결 과

1. Agar diffusion assay와 동물 점막 자극 시험법 상관성 연구

두 시험법의 상관성 연구 결과는 Table 5와 같다.

Table 4. Reactivity Grades for Agar Diffusion Test.

Grade	Reactivity	Condition of Culture
0	None	No detectable zone around or under specimen
1	Slight	Some malformed or degenerated cells under specimen
2	Mild	Zone limited to area under specimen and less than 0.45 cm beyond
3	Moderate	Zone extends 0.45-1.0 cm beyond specimen
4	Severe	Zone extends greater than 1.0 cm beyond specimen

Table 5. The comparative study for results of *in vivo* data and agar diffusion assay

in vivo	Chemical	Decolorization zone (mm)											
		Run 1				Run 2				Run 3			
		Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity
Irritant	SLS 1%	10.7	0.6	4	Severe	10.3	0.6	4	Severe	11.0	0.0	4	Severe
NA*	SLS 0.5%	5.0	0.0	3	Moderate	5.3	0.6	3	Moderate	5.7	0.6	3	Moderate
Irritant	Triton X-100 1%	9.7	0.6	3	Moderate	9.7	0.6	3	Moderate	10.7	0.6	3	Severe
Irritant	Hydrogen peroxide 30% (active)	14.0	0.0	4	Severe	14.0	0.0	4	Severe	14.0	0.0	4	Severe
Irritant	Hydrogen peroxide 3% (active)	14.0	0.0	4	Severe	14.0	0.0	4	Severe	14.0	0.0	4	Severe
Irritant	Ethanol 100%	14.0	0.0	4	Severe	14.0	0.0	4	Severe	14.0	0.0	4	Severe
NA*	Ethanol 30%	8.7	0.6	3	Moderate	9.0	0.0	3	Moderate	9.0	0.0	3	Moderate
NA*	Sorbitol	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
	NC (media)	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None

*NA: Not assessed. However, it is an approved raw material for use in oral products.

대부분 물질에서 agar diffusion assay에서의 평균 decolorization zone이 8 mm 이상의 중등도 (moderate) 이상의 자극을 보이면 실제로 *in vivo* 데이터에서도 자극을 유발하였다. 그러나 30%의 ethanol과 0.5%의 SLS의 경우는 *in vivo* 데이터가 없어 상관성을 확인 할 수 없으나 agar diffusion assay에서는 평균 decolorization zone이 5 mm 이상의 자극을 보였다. Agar diffusion assay의 각 시험 간 및 샘플 간 자극의 표준 편차는 0~0.7 mm 수준으로 나왔다.

2. Agar diffusion assay를 이용한 치약 사용 원료의 자극 수준 확인

Agar diffusion assay를 이용하여 농도 별 평가한 결과는 Table 6에 제시하였다, 향료, 제형 원료, pH 조절제, 점도 조절제, 감미제, 과립 파우더, 유화제, 보존제, 추출물 카테고리 원료들은 사용 농도 10배에서도 무자극을 보였다. 킬레이팅제인 sodium EDTA는 사용 농도 10배에서 decolonization zone 1 mm 이하의 미약한 자극이 보였으나 사용 농도에서는 무자극을 보였다. 주로 계면활성제와 주성분 카테고리가 자극을 유발하는 원료로 주성분의 경우는 hydrogen peroxide (active 35%), sodium monofluorophosphate, tetrasodium pyrophosphate, cetylpyridium chloride가



Table 6. Assessment of irritation of raw materials used in oral products

Category (n)	Test material	Test concentration	Use-fold	Decolorization zone (mm)											
				Run 1					Run 2						
				Average	SD	Grade	Reactivity	Average	SD	Grade	Reactivity	Average	SD	Grade	Reactivity
Fragrance/ Flavor (20)	Fragrance/ Flavor_no. 1 ~ 20 †	1 % / 1 0%	1 X / 10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		active 1 %	.	8.3	0.6	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
		active 0.5 %	.	5.3	0.6	3	Moderate	4.7	0.6	3	Moderate	5.0	0.0	3	Moderate
		active 0.1 %	.	3.0	0.0	2	Mild	3.0	0.0	2	Mild	3.3	0.6	2	Mild
		active 1 %	.	2.0	0.0	2	Mild	1.3	0.6	2	Mild	1.3	0.6	2	Mild
		active 0.5 %	.	1.0	0.0	2	Mild	0.3	0.6	2	Mild	0.0	0.0	0	None
		active 0.1 %	.	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		active 1 %	.	4.7	0.6	3	Moderate	4.3	0.6	2	Mild	4.3	0.6	2	Mild
		active 0.5 %	.	2.0	0.0	2	Mild	1.7	0.6	2	Mild	1.7	0.6	2	Mild
		active 0.1 %	.	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
Surfactant (6)		active 1 %	.	11.0	0.0	4	Severe	9.7	0.6	4	Severe	10.0	0.0	4	Severe
		active 0.5 %	.	8.0	0.0	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
		active 0.1 %	.	5.7	0.6	3	Moderate	5.3	0.6	3	Moderate	5.7	0.6	3	Moderate
		active 1 %	.	8.0	0.0	3	Moderate	7.0	0.0	3	Moderate	7.0	0.0	3	Moderate
		active 0.5 %	.	5.3	0.6	3	Moderate	4.7	0.6	3	Moderate	4.7	0.6	3	Moderate
		active 0.1 %	.	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
Abrasive (3)		active 1 %	.	1.0	0.0	2	Mild	0.3	0.6	2	Mild	0.7	0.6	2	Mild
		active 0.5 %	.	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		active 0.1 %	.	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		Supernatant of 20 % extract	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
Formulation composition (2)		Supernatant of 20 % extract	1 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		Supernatant of 20 % extract	1 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
pH modifier (4)		Supernatant of 20 % extract	1 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		Sorbitol (70% active)	1 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		Glycerine	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
		Argine	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
	Citric acid	1 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
	Sodium citrate	1 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
	Phosphoric acid	5 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None

Category (n)	Test material	Test concentration	Use-fold	Decolorization zone (mm)												
				Run 1					Run 2							
				Average	SD	Grade	Reactivity	Average	SD	Grade	Reactivity	Average	SD	Grade	Reactivity	
Viscosity modifier (5)	Sodium alginate	20 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Cellulose gum	10 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Hydroxyethyl cellulose	20 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Xanthan gum	10 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	PEG-32	50 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
Sweetener (7)	Stevioside	5 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Potassium acesulfame	5 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Sucralose	5 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Xylitol	5 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Sodium saccharin	5 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Cyclodextrin syrup	50 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Erythritol	100 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
Active Ingredients (12)	Sodium chloride	20 %	10 X	9.3	0.6	3	Moderate	9.0	1.0	3	Moderate	9.7	0.6	3	Moderate	
	Tocopheryl acetate	10 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Calcium glycerophosphate	2 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Hydrogen peroxide (active 35%)	8.57 %	1 X	13.0	0.0	4	Severe	13.0	0.0	4	Severe	13.0	0.0	4	Severe	
	Potassium nitrate †	15 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Dipotassium Glycyrhizate	0.1 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Sodium monofluorophosphate	7.6 %	10 X	8.0	0.0	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate	
	Sodium fluoride	0.76 %	10 X	6.7	0.6	3	Moderate	6.0	0.0	3	Moderate	6.3	0.6	3	Moderate	
	Tetrasodium pyrophosphate	3 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
	Cetylpyridium chloride		34 %	10 X	7.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
			3.4 %	1 X	4.3	0.6	2	Mild	4.0	0.0	2	Mild	4.3	0.6	2	Mild
	Camellia sinensis leaf extract		0.5 %	10 X	5.0	0.0	3	Moderate	5.3	0.6	3	Moderate	5.7	0.6	3	Moderate
		0.05 %	1 X	4.7	0.6	3	Moderate	5.0	0.0	3	Moderate	4.7	0.6	3	Moderate	
Titrated extract of Zea mays L. unsaponifiable fraction		0.4 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	
		0.2 %	10 X	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	

Category (n)	Test material	Test concentration	Use-fold	Decolorization zone (mm)													
				Run 1		Run 2											
				Average	SD	Average	SD										
Granular powder (4)	Zeolite/ Titanium dioxide (CI 77891)/ Menthol/ Hydrated silica / Mentha piperita (peppermint) extract / Eucalyptus globulus leaf extract	80 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Titanium dioxide (CI 77891) Hydroxyapatite	3 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Juglans regia (walnut) shell powder	2 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		3 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		10 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
		1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
Extracts / Oil (21)	Pueraria lobata root extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Panax ginseng root extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Scutellaria baicalensis root extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Prunus persica (peach) kernel extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Olea europaea (olive) fruit oil †	10 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Thuja orientalis seed extract †	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Morus alba bark extract †	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Angelica acutiloba root extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Camellia sinensis leaf extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Chamomile oil †	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
Rosmary oil †	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None	
Emulsifier (1) Preservative (1)	Lilium candidum bulb extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Pine Oil †	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Zingiber officinale (ginger) root extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Lemon oil †	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Citrus junos fruit extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Cocos nucifera (coconut) oil †	50 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Albe barbandesis leaf extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Rose Extract	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Malic acid	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Lavandula angustifolia (Lavender) flower water	1 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
Emulsifier (1) Preservative (1)	PEG-60 Hydrogenated castor oil	100 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
	Sodium benzoate	0.3 %	10 X	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None
Chelating agent (1)	Disodium EDTA	0.5 %	10 X	1.0	0.0	2	0	0.7	0.6	2	0	Mild	1.0	0.0	2	0	Mild
		0.05 %	1 X	0.0	0.0	0	0	None	0.0	0	0	None	0.0	0.0	0	0	None

*은 불용성 물질로 20%농도로 배지에 희석하여 37°C에서 24시간 동안 추출한 후 원심을 돌려 상층액을 이용하여 평가함
 †는 난용성 물질로 olive oil에 녹여 평가함

사용 농도에서 평균 decolonization zone이 4 mm 초과 중등도의 자극을 보였다. 또한 계면활성제에 경우에는 계면활성제의 종류에 따라 1% 농도에서 평균 decolonization zone의 범위가 0.67~10.22 mm으로 미약 (Slight)에서 심한 (Severe)의 다양한 한 자극 수준을 보였다. 활성 성분 1% 농도 (active 1%) 기준으로 cocaminopropyl betaine (10.22 mm), sodium lauryl sulfate (7.78 mm), sodium methyl cocoyl taurate (7.78 mm), lauamidopropyl betaine (4.44 mm), sodium lauroyl glutamate (1.56 mm), potassium cocoyl glycinate (0.67 mm) 순서로 자극이 낮아짐을 확인하였다.

3. 원료의 제형 자극 영향도 확인 평가

앞선 원료에 평가 시 사용 농도에서 중등도 이상의 자극을 보이는 원료에 대해 실제 치약 제형에서의 자극 영향도를 평가하고자, 기본 치약 점도 베이스 제형을 기준으로 해서 계면활성제 혼합물 2종과 그 외 기능성 물질 6종으로 다양한 조합의 18종의 제형을 제작 (Table 3)하고 10%, 25%, 50% 농도로 희석하여 agar diffusion assay를 수행하였다. 이에 대한 결과는 Table 7에 제시하였다. 계면활성제의 유무와 조합에 따라 자극의 수준이 차이가 났으며 (제형 #1~3), SLS 2% 단독 함유 제형보다는 lauramidopropyl betaine와 sodium lauroyl glutamate 혼합 제형이 자극이 현저히 낮은 결과를 보였다. 또한 과산화 수소에 의한 영향성에서는 과산화 수소 함유 시 자극이 현저히 상승함이 관찰되었다 (제형 #1 & 7). 이 제형에서 계면활성제 첨가 시 SLS 2%은 자극의 상가 작용 (synergic effect)을 현저하게 보여주고 있었으나 (제형 # 7~ 8), 추가 lauramidopropyl betaine와 sodium lauroyl glutamate 혼합은 미약한 자극을 상승을 보였다 (제형 # 7 & 9). Sodium chloride, sodium monofluorophosphate, tetrasodium pyrophosphate, cetylpyridium chloride의 경우는 제형에서 자극 상승 효과가 없었으며 계면활성제의 조합에서도 상가 작용을 보이지 않았다. 또한 시험 농도 별의 자극의 차이를 보았을 때, 10%와 50% 농도의 경우보다는 25% 농도가 계면활성제의 종류에 따른 제형 별 자극의 차이를 뚜렷하게 관찰 할 수 있었다.

4. 시판 치약의 자극 수준 확인 평가

현재 국내외에 시판되고 있는 치약에 대해 79종에 대해 10%, 25%, 50%의 농도로 희석하여 agar diffusion assay를 수행한 결과는 Table 8에 제시하였다. 10%,

25%, 50%의 농도에서는 decolonization zone의 범위는 각각 0~6.7 mm, 0~11.7 mm, 0~13.0 mm 수준이었다. 시험에 사용된 치약의 전성분 정보를 파악할 수 없어 조성 정보를 아는 치약 (T38~79)을 중심으로 분석해보면 이전의 성분의 제형에서의 영향성 연구의 결과와 같은 경향을 보였다. 계면활성제 구성에서 SLS 2% 단독 함유 치약 (T38~60, T65~66, T77~79)보다는 lauramidopropyl betaine 과 sodium lauroyl glutamate 혼합 형태로 2% 사용된 치약 (T67~76)이나 계면활성제가 전혀 들어가지 않은 어린이 치약 (T61~64)이 현저히 낮은 자극을 보였다. 또한 과산화 수소가 함유된 미백 치약 (T57~59, T65~66)의 경우는 판정 기준은 변화하지 않으나 decolorization zone이 상승하는 결과를 보였다. 그리고 시험 치약의 시험 농도 별 분포를 보면 25%의 농도에서 평가 시 다양한 자극 분포 형태를 보였다 (Fig 1).

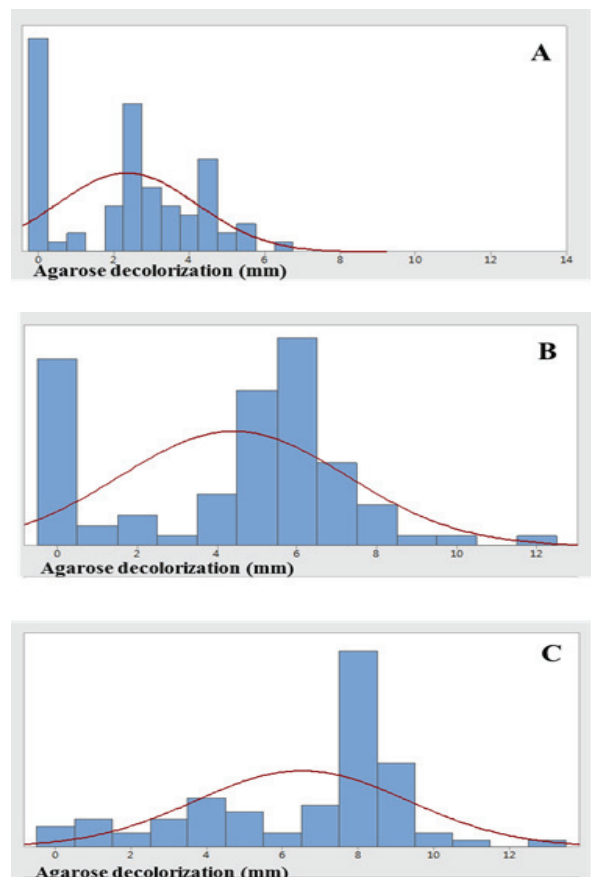


Fig 1. Distribution of lengths of decolorization area by sample concentration

The length of the decolorization area was assessed at concentrations of 10% (A), 25% (B) and 50% (C) following exposure to 79 commercially available toothpastes for 24 hours. Three samples per test group were performed, together with a total of three replicates.

Table 7. The effect for irritation of formulation by ingredients

Formulation No.	Description	Decolorization zone (mm)											
		10%				25%				50%			
		Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity
#1	base formula	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
#2	#1 + SLS 2%	2.0	0.0	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate
#3	#1 + mixture of Lauramidopropyl Betaine and Sodium lauroyl glutamate 2%	0.3	0.6	2	Mild	0.7	0.6	2	Mild	4.7	0.6	3	Moderate
#4	#1 + NaCl 20%	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
#5	#4 + SLS 2%	0.0	0.0	0	None	4.7	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
#6	#4 + mixture of Lauramidopropyl Betaine and Sodium lauroyl glutamate 2%	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate
#7	#1 + H ₂ O ₂ 2.99 %	4.0	0.0	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate	9.7	0.6	3	Moderate
#8	#7 + SLS 2%	7.0	0.0	3	Moderate	9.3	0.6	3	Moderate	11.7	0.6	4	Severe
#9	#7 + mixture of Lauramidopropyl Betaine and Sodium lauroyl glutamate 2%	4.3	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	11.7	0.6	4	Severe
#10	#1 + Sodium monofluorophosphate 0.76 %	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	0.3	0.6	2	Mild
#11	#10+ SLS 2%	2.0	0.0	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate
#12	#10 + mixture of Lauramidopropyl Betaine and Sodium lauroyl glutamate 2%	0.3	0.6	2	Mild	0.7	0.6	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate
#13	#1 + Tetrasodium pyrophosphate 3.4%	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild
#14	#13 + SLS 2%	2.3	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
#15	#1 + mixture of Lauramidopropyl Betaine and Sodium lauroyl glutamate 2%	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	5.3	0.6	3	Moderate
#16	#1 + Cetylpyridium chloride 0.05 %	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	2.7	4.6	2	Mild
#17	#16 + SLS 2%	2.0	0.0	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
#18	#16 + mixture of Lauramidopropyl Betaine and Sodium lauroyl glutamate 2%	0.0	0.0	0	None	1.0	0.0	0	None	5.3	0.6	3	Moderate

Table 8. The results of irritation for toothpaste

Toothpaste	Decolorization zone (mm)											
	10%				25%				50%			
	Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity
T-1	0.0	0.0	0	None	2.0	0.0	2	Mild	3.0	0.0	2	Mild
T-2	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
T-3	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	2.0	0.0	2	Mild
T-4	3.7	0.6	2	Mild	8.7	0.6	3	Moderate	11.3	0.6	4	Severe
T-5	0.7	0.6	2	Mild	3.7	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate
T-6	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
T-7	3.3	0.6	2	Mild	6.3	0.6	2	Mild	8.3	0.6	3	Moderate
T-8	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None
T-9	2.0	0.0	0	None	2.3	0.6	2	Mild	2.7	0.6	2	Mild
T-10	2.0	0.0	0	None	4.3	0.6	2	Mild	7.7	0.6	3	Moderate
T-11	2.0	0.0	0	None	7.3	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
T-12	2.3	0.6	0	None	4.7	0.6	3	Moderate	6.0	0.0	3	Moderate
T-13	2.3	0.6	0	None	8.0	0.0	3	Moderate	9.7	0.6	3	Moderate
T-14	6.7	0.6	3	Moderate	11.7	0.6	4	Severe	13.0	0.0	4	Severe
T-15	0.0	0.0	0	None	1.3	0.6	2	Mild	3.0	0.0	2	Mild
T-16	0.0	0.0	0	None	4.3	0.6	2	Mild	6.7	0.6	3	Moderate
T-17	1.0	0.0	2	Mild	3.0	0.0	2	Mild	3.0	0.0	2	Mild
T-18	3.3	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	6.7	0.6	3	Moderate
T-19	3.7	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate
T-20	0.0	0.0	0	None	2.0	0.0	2	Mild	4.7	0.6	3	Moderate
T-21	4.7	0.6	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-22	4.3	0.6	2	Mild	7.7	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-23	4.7	0.6	3	Moderate	5.3	0.6	3	Moderate	9.0	0.0	3	Moderate
T-24	0.0	0.0	0	None	0.7	0.6	2	Mild	2.0	0.0	2	Mild
T-25	5.3	0.6	3	Moderate	5.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-26	4.7	0.6	3	Moderate	7.0	0.0	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-27	4.0	0.0	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-28	4.3	0.6	2	Mild	7.3	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-29	1.0	0.0	2	Mild	4.0	0.0	2	Mild	7.0	1.0	3	Moderate
T-30	3.7	0.6	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-31	5.7	0.6	3	Moderate	6.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-32	5.7	0.6	3	Moderate	9.7	0.6	3	Moderate	13.0	0.0	4	Severe
T-33	5.0	0.0	3	Moderate	5.7	0.6	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate
T-34	4.7	0.6	3	Moderate	6.3	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-35	4.3	0.6	2	Mild	7.0	0.0	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-36	4.7	0.6	3	Moderate	6.0	0.0	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate
T-37	4.7	0.6	3	Moderate	4.3	1.2	3	Moderate	6.3	0.6	3	Moderate
T-38	2.0	0.0	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate

Toothpaste	Decolorization zone (mm)											
	10%				25%				50%			
	Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity	Mean	SD	Grade	Reactivity
T-39	2.3	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-40	3.0	0.0	2	Mild	6.0	0.0	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate
T-41	2.7	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate
T-42	3.0	0.0	2	Mild	6.0	0.0	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate
T-43	2.7	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-44	2.3	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-45	2.3	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-46	2.0	0.0	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate
T-47	2.3	0.6	2	Mild	5.0	0.0	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-48	3.0	0.0	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate
T-49	2.3	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	7.3	0.6	3	Moderate
T-50	2.3	0.6	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-51	2.3	0.6	2	Mild	6.0	0.0	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-52	2.3	0.6	2	Mild	6.0	0.0	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
T-53	3.0	0.0	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-54	3.0	0.0	2	Mild	5.3	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
T-55	3.0	0.0	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-56	2.7	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
T-57	4.0	0.0	2	Mild	6.3	0.6	3	Moderate	9.0	0.0	3	Moderate
T-58	5.0	0.0	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate	9.7	0.6	3	Moderate
T-59	4.7	0.6	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate	13.0	0.0	4	Severe
T-60	3.0	0.0	2	Mild	5.3	0.6	2	Mild	8.0	0.0	3	Moderate
T-61	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	1.3	0.6	2	Mild
T-62	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	1.0	0.0	2	Mild
T-63	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	1.0	0.0	2	Mild
T-64	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	1.0	0.0	2	Mild
T-65	4.0	0.0	2	Mild	7.0	0.0	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-66	4.0	0.0	2	Mild	6.7	0.6	3	Moderate	8.7	0.6	3	Moderate
T-67	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.3	0.6	2	Mild
T-68	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.7	0.6	3	Moderate
T-69	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.0	1.0	2	Mild
T-70	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.3	1.2	2	Mild
T-71	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	4.3	1.2	2	Mild
T-72	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	5.0	0.0	3	Moderate
T-73	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.0	1.7	2	Mild
T-74	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.7	0.6	3	Moderate
T-75	0.0	0.0	0	None	0.0	0.0	0	None	4.0	1.0	2	Mild
T-76	0.0	0.0	0	None	0.3	0.6	2	Mild	4.3	0.6	2	Mild
T-77	2.7	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.0	0.0	3	Moderate
T-78	2.3	0.6	2	Mild	6.0	0.0	3	Moderate	7.7	0.6	3	Moderate
T-79	2.3	0.6	2	Mild	5.7	0.6	3	Moderate	8.3	0.6	3	Moderate

고 찰

치약 같은 구강 세정 제품은 국내에서는 의약외품으로 분류하여 안전에 대한 관리하고 있으나 유럽연합 (EU)에서는 화장품으로 분류되고 있으며 이에 따라 동물실험이 금지 되어 있다. 화장품 원료 및 그 원료를 사용하는 제품은 각 사용 노출 부위에 따른 자극 혹은 독성 데이터는 제품 개발 단계에서 반드시 필요한 과정이다. 그러나 화장품 영역에서의 구강 적용 제품에 대해서 아직 공인된 *in vitro* 시험 법이 없으므로 이를 위한 시험법의 구축이 필요 하다. 전통적으로 구강 점막 자극의 평가에 대해서는 햄스터 혹은 랫드 같은 실험동물을 이용한 구강 점막 자극 시험 법을 이용하고 있다 (ISO, 2010) 그러나 최근 동물실험의 윤리의 강화로 인해 허가 관련 독성 평가에 대해서도 3R (replacement, reduction, refinement) 원칙 확대 됨에 따라 무차별적인 동물 독성 시험이 자제되고 있고 고비용 때문에 동물실험을 수행하기 전에 의료기기의 허가 과정에서는 *in vitro* 자극 시험 법을 적용하고 있다 (ISO, 2009). 치과용 재료도 의료 기기에 해당되는 물질로 국내외 법규상 *in vitro* 독성 시험 법을 수행하고 있으며 대표적으로 ISO 10993-5:2009 (E) Agar diffusion test이 있다. 이 시험 법은 세포에 agar를 도포하여 물리적인 장벽을 만들고 물질이 장벽을 통해 세포 내로 들어 간 후의 독성을 평가 하기 때문에 용해도가 상대적으로 나쁜 제형 원료에 적용하기 용이하다. 따라서 시료 적용의 용이성 및 치과용 재료 독성 평가에서 세계적으로 공인된 시험 법이라는 점을 고려하여 이 시험 법을 도입하여 치약의 원료 및 제품을 평가하고자 하였다.

이 시험 법이 동물에서의 자극을 예측할 수 있는지 확인하기 위해 우선 문헌 상 자극 여부를 확인할 수 있는 화학물질을 이용하여 비교 연구를 한 결과 높은 상관성을 확인할 수 있었다 (Table 5)(US pharmacopeia 31, 2015). SLS 0.5%와 ethanol 30%에 대한 동물실험 문헌 결과가 없으나 이들 원료는 동물을 이용한 피부 자극 시험에서 자극을 유발하는 성분이므로 피부보다 상대적으로 장벽이 약한 구강 점막에서는 자극이 유발될 가능성이 높다고 생각하여 비교 시 agar diffusion test는 동물을 이용한 구강 자극을 예측 할 수 있었다.

원료를 이용한 평가에서는 대부분의 원료는 사용 10배 농도에서 무자극을 보였다. 그러나 기능성 성분인 hydrogen peroxide (active 35%), sodium

monofluorophosphate, tetrasodium pyrophosphate, cetylpyridium chloride, sodium chloride와 계면활성제는 사용 농도에서 중등도 (moderate)이상의 자극을 보였다 (Table 6). 이 결과를 바탕으로 이들 성분이 실제 제형에서는 자극 변화에 영향을 주는지 확인하기 위해 제형을 제작해서 평가한 결과 hydrogen peroxide과 계면활성제의 종류에 따라 제형에서의 자극이 달라짐이 확인되었다. 그러나 원료에서 높은 자극을 보인 hydrogen peroxide의 경우는 제형에서는 상대적으로 원료 자체는 자극 상승률을 낮은 편이고 제형에서는 계면활성제의 조합이 자극에 큰 영향을 주었다 (Table 7). hydrogen peroxide는 의약외품 규제 상 사용 함량이 제한 되어 있기 때문에 치약의 자극에 영향을 주는 주요 인자는 계면활성제의 조합으로 볼 수 있으며 더 안전한 계면활성제 단독 혹은 조합 선별을 통해 구강 자극 측면에서는 저자극 치약을 개발하는 데 도움이 될 수 있을 것으로 보인다. 이러한 경향은 시판중인 치약에서도 확인 가능하였는데, 성분 및 함량 정보를 알 수 있는 자사 치약으로 분석 시 계면활성제의 종류와 함량에 따라 치약의 자극 수준에 영향을 줄을 확인할 수 있었다 (Table 8). 그리고 농도 별로 평가 하였을 시 특정 범위에 자극이 몰려 있는 경향이 있어 통계적인 분석이 불가능 하였으나, 비교적 다양한 자극 수준으로 고르게 분포가 되어 있는 25 %농도 평가에서 United States pharmacopeia 31의 기준 (Table 4)을 적용 시 내부적으로 원료와 제품의 자극 비교 및 변별성을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해서 기존의 구강 세포주를 활용한 *in vitro* 시험에서 장애 요인인 불용성 물질을 포함하는 구강 관리 제품 용 시료의 시험이 가능한 신규 *in vivo* 구강 자극 독성 평가 시스템을 구축하였다. 또한, 여러 자극을 유발하는 성분 함유 제형의 연구를 통해 계면활성제와 치아 미백에 사용되는 성분의 사용 여부가 구강 자극의 수준에 영향을 줄을 본 시험을 통해 증명하였다. 본 결과를 바탕으로 동물을 사용하지 않고 구강 관리 제품의 자극 수준을 사전에 평가할 수 있는 시스템으로 활용할 수 있을 거라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 아모레퍼시픽 R&D Unit의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- Babich H, Babich JP. (1997). Sodium lauryl sulfate and triclosan: In vitro cytotoxicity studies with gingival cells, *Toxicology Letters*, 91(3); 189 -196
- Bourrinet P, Conduzorgues JP, Dutertre H, Macabies J, Masson P, Maurin J, Mercier O. (1995). Interlaboratory study for the assessment of potential irritative properties of hygiene products on the hamster cheek pouch, *Lab Anim. Sci.*, 45(1); 36-40.
- European Union. (2003). Council Directive on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (76/ 768/ EEC). Official Journal of the European Union 11.3. 2003.
- European Union. (2009). Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the council on cosmetic products
- Herlofson BB, Barkvoll P. (1996). Oral mucosal desquamation caused by two toothpaste detergents in an experimental model. *Eur J Oral Sci* 104: 21-26
- ISO (2009). ISO 10993-5:2009(E). Biological evaluation of medical device Part 5 test for in vitro cytotoxicity: Agar diffusion assay.
- ISO (2010) ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices - Part 10: Tests for irritation and skin sensitization
- Rantanen, K. Jutila, I. Nicander, J. Tenovuo, E. Soderling, (2003) The effects of two sodium lauryl sulphate-containing toothpastes with and without betaine on human oral mucosa in vivo, *Swedish Denal Journal*, 27: 31 -24
- US (2015). United States pharmacopeia 31. General chapter 87, biological reactivity test, in vitro.
- Veys RJ, Baert JH, De Boever JA. De Boever. (1994). Histological changes in the hamster cheek pouch epithelium induced by topical application of sodium lauryl sulphate, *Int. J.Path.*, 75: 203 -209.