

계면활성제의 피부자극에 관한 고찰

에경산업 (주) 중앙연구소
수석연구원 김 혁

목차

1. 머릿말
2. 계면활성제의 피부에 대한 영향
 1. 피부의 구조와 생리
 2. 계면활성제의 피부에 대한 영향
3. 자극성 시험방법
 1. In-vivo test 와 in-vitro test
 2. In-vivo 자극성시험방법
 3. In-vitro 자극성시험방법
4. 계면활성제 구조와 피부자극성
 1. 계면활성제의 피부자극성
 2. 계면활성제의 구조와 피부자극성
5. 저자극성 세제의 개발동향
 1. 저자극성 계면활성제
 2. 저자극성세정제의 formulation 추세
6. 맺음말
7. 참고문헌

계면활성제의 피부자극에 관한 고찰

1. 머릿말

계면활성제는 습윤, 유화, 분산, 가용화, 세정 등 여러가지의 물리화학적 특성과 기능을 가지고 있어 세제, 화장품, 치약, 의약품 등 다양한 생활용품에 사용되고 있다. 이 중에서 인체세정제, 주방용세제, 샴푸 등 인체의 피부와 직접 접촉할 기회가 많은 제품의 경우에는 계면활성제를 선택할 때 피부안전성은 아주 중요한 인자가 된다.

세정제의 반복사용으로 피부와 접촉기회가 잦아지면 탈지, 보습력 저하, 피부단백질변성 등 여러가지 원인에 의하여 피부기능이 약화되어 피부가 거칠어지고 접촉성피부염도 유발될 수 있다.

최근에는 세제에 대한 관심이 기능성 측면에서 환경, 인체안전성으로 바뀌어 저자극성 세제의 개발노력이 활발하게 나타나고 있다. 세제와 계면활성제에 대한 지속적인 연구의 결과로 세정성은 유지하면서 계면활성제-피부의 상호작용은 현저하게 감소한 새로운 계면활성제와 세제가 개발되어 왔다. 이에 따라 계면활성제 및 세제에 의한 자극도를 효과적으로 측정하기 위한 자극성 시험방법의 필요성이 증대되고 있다.

여기서는 피부에 대한 계면활성제의 영향과 자극성시험방법을 살펴보고 저자극성 계면활성제와 세정제개발의 최근 동향을 소개하고자 한다.

2. 계면활성제의 피부에 대한 영향

1. 피부의 구조와 생리

인간의 피부는 최외각에 존재하여 외부의 자극에서 신체를 보호할 뿐만 아니라 체온조절과 지각작용, 분비작용 등 신체전체의 움직임을 도와주는 기능을 가진 중요한 기관이다. 또한 피부에서는 피부 그 자체를 보호하기 위하여, 즉 피부의 恒常性을 유지하기 위한 작용이 복잡한 메카니즘을 통하여 이루어지고 있다.

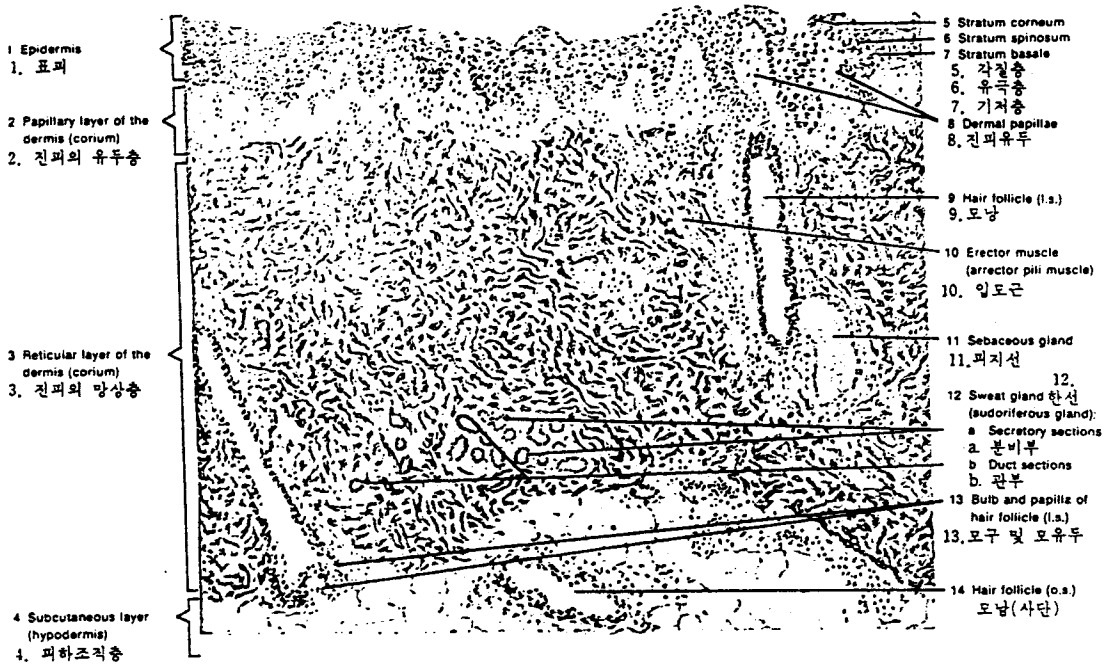


그림 1. 피부의 구조

피부의 표면은 각질로 되어 있고 이것은 표피세포의 대사산물로서 박리하여 생명이 없고 불활성인 것이라 생각되어졌으나 실제로 이 각질층은 중요한 생리적 작용을 하는 보호장벽임이 알려졌다. 이러한 각질층은 0.02~0.03mm의 두께로 생체와 환경사이에서 놀라운 정도로 효과적인 경계를 형성하여 외부의 영향에 대한 보호능력을 가지고 있다. 이러한 보호능력을 가지게 하는 요인은 다음과 같다.¹⁾

첫번째는 촉촉함을 주는 수분이다. 이 수분은 임파액 중의 물이 조직의 간극을 통해서 증산하는 것과 땀샘을 통하여 표면으로 나오는 것이 피부표면의 각질층으로 침투하여 피부에 촉촉함과 윤기를 주어 물리적, 기계적 강도를 주고 있다.

두번째는 피부샘에서 분비되는 피지가 크림상태의 보호막(피지막)을 형성하여 피부표면을 덮어 수분의 증발을 억제함과 동시에 매끄러움을 유지할 뿐만 아니라 기계적인 자극과 먼지, 오염과 같은 부착물을 차단하는 작용도 한다.

세번째는 피부세포의 각화작용에 의하여 생성된 각화산물이다. 각화작용은 피부의 유두층상에 생기는 표피세포 즉 기저세포가 생활반응을 나타내면서 과립세포, 유자세포로 점차 변천하여 최후에는 표면의 각질층까지 변화하는 과정이다. 특히 표피세포의 신진대사 중에서 표면에 가까운 변화를 가리켜 피부의 각화현상이라고 한다. 이때 생성되는 물질이 각화산물로서 피부 표면에 존재하고 있는 각질층에 생명력을 주고 있다. 이들 각화산물의 중에서 각화지질이라는 물질이 피부의 생화학적 기능에 중요한 역할을 한다. 예를 들면 피부 표면의 분비막을 유화상태로 유지하고, 환경에 따라서는 유화막을 o/w 에서 w/o 로 또는 그반대로 자동적으로 반전시켜 피부표면의 수분의 恒常性을 조절한다.

이와 같이 피부는 수분, 분비지질, 각화산물의 3 가지 요소가 서로 밀접하게 연관되어 피부의 항상성을 유지하고 있다.

2. 계면활성제의 피부에 대한 영향

잠재적인 자극성물질들은 원리상 피부의 모든 층에 화학적 효과를 나타낼 수 있다. 예를 들면 각질층, 외피, 진피이다. 각질층에서는 자극물질이 탈수, 탈지, 단백질 변성을 일으켜 표피건조 落屑性 (desquamation, 건조된 표피가 비늘모양으로 피부로부터 떨어져 나가는 현상) 을 유발하고 각질층의 경도를 변화시키며 수분함량을 변화시킨다. 각질층이 물이나 다른 물질에 의한 침투를 저지시키는 주요장벽이기 때문에 자극성물질에 의한 각질층성질의 변화는 피부침투장벽의 기능에 변화를 가져올 수 있다. 예를 들면 여러가지 조제에 사용되는 용매와 계면활성제는 각질층의 장벽기능을 파괴하거나 변화시켜 피부침투를 증가시킬 수 있다. 이는 어떤 화학물질이 이러한 용매에 용해되어 피부에 접촉될 때 증가된 피부투과를 가져올 수 있다는 것이다. 각질층을 투과하게 되면 자극성물질은 외피의 살아있는 조직까지 도달하게 되는데 이렇게 되면 세포막의 항상성을 변하게 하고 세포증식과 분화에 영향을 주며 다양한 효소의 활성을 변화시키고 염증매개물질 (예를 들면 cytokine, arachidonic acid 의 대사물질, acute phase reactant proteins) 의 방출을 유도하게 된다. 이들의 변화는 hyperplasia (비이상적 증식) 또는 세포의 퇴화 심지어는 세포의 치사까지 이르게 된다. 이러한 현상들은 각질층의 완전성에도 영향을 주어 피부로 하여금 보다 낮은 자극성물질에도 접촉하게 한다.³⁾

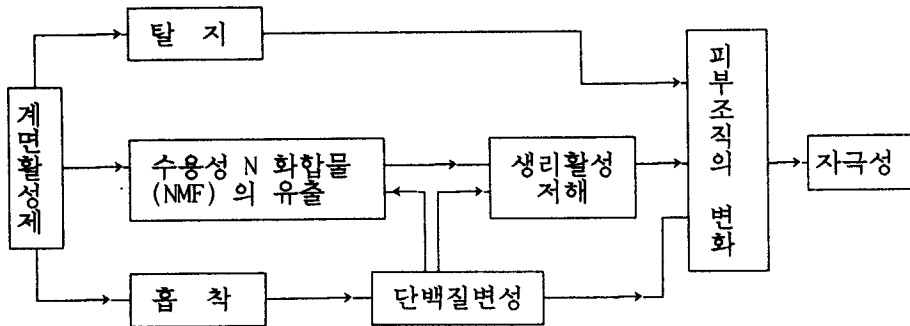


그림 2. 계면활성제에 의한 자극 메카니즘¹⁴⁾

세계에 의하여 발생할 수 있는 피부질환을 살펴보면 비염증성 질환인 표피 건조 낙설성과 염증성 피부질환인 접촉성피부염 (contact dermatitis), 습진, 進行性指掌角皮症과 같은 증상들이다.¹⁵⁾ 이중 계면활성제에 의한 자극이 직접적으로 영향을 주는 것은 표피건조 낙설성 이지만 염증성 피부질환은 직접적인 관련이 없다고 알려져 있다.¹⁾ 표피건조 낙설성을 좁은 의미의 피부자극성 (skin roughness)이라 하고 염증성 피부질환을 포함한 것은 넓은 의미의 피부자극성이다. 계면활성제가 피부에 미치는 작용을 살펴보면 다음과 같다.⁷⁾

1) 탈지작용

피부표면은 표피지질과 수분에 의하여 보호막을 형성하여 외부환경의 영향에서 피부를 보호하는 기능을 가지고 있다. 계면활성제의 세정력은 표피지질을 제거하여 표피의 각질층에 존재하는 방어층의 효과를 약하게 하며 결국은 수분의 과잉증발을 일으켜 피부가 외부에 영향을 쉽게 받도록 한다. 한편 물 단독으로도 상당량의 피지가 제거되어 피부에 나쁜 영향을 주어 동절기에 손이 트거나 거칠어지게 한다. 피지의 과도한 제거로 세척후 피부의 팽윤성이 증가되고 이로 인하여 인체에 해로운 물질의 경피투과성이 증가되는 원인이 된다.

2) 각질층에 대한 작용

각질층은 계면활성제에 의한 손상의 일차적인 지점이며, 외피, 진피에 대한 주요방어막으로 작용한다. 용액상태의 다른 성분들과 마찬가지로 계면활성제는 각질층위로 침적되거나 각질층속의 물질을 가용화시키며 각질층을 통과하여 내부로 침투하여 피부와 상호작용한다. 각질층과의 상호작용은 단백질과의 상호작용을 내포하고 있는 것이며 아마도 계면활성제의 자극과정에서 가장 중요한 것이라 생각된다.

① 각질층의 팽윤

1950 년대의 초창기에 Gotte 는 음이온 계면활성제들이 각질층을 팽윤시킬 수 있음을 지적했다. 이후 Scheuplein 과 Ross 는 5% sodium laurate 로 처리한 결과 이러한 발견을 확인하였고, laurate 음이온이 α -케라틴필라멘트의 확장 및 폴립을 개시하여 β -케라틴과 확장된 막을 형성한다고 제안하였다.²⁵⁾

Putterman 은 많은 세계와 단백질 변성물질에 대하여 guinea pig 의 각질층 팽창에 있어서의 효과를 조사하였는데, 음이온계면활성제들은 각질층의 가역적 팽창을 일으키지만 비이온계면활성제들은 팽창을 일으키지 않고, 음이온 계면활성제 중에서는 비누와 AS 는 팽윤효과가 크지만 AES 는 팽윤성이 거의 없음을 발견하였다.²⁴⁾ (팽윤성의 크기는: sodium laurate > SLS > sodium oleate)

Lauryl trimethylammonium chloride 의 실험에서는 SLS 만큼의 팽창효과를 보임에 따라 각질층의 팽윤효과가 단지 음이온 계면활성제에만 국한된 것이 아님을 제안하였다.

② 보습인자의 유출

낮은 상대습도에서 계면활성제와의 접촉은 피부가 거칠어지거나 트게 될 수 있다. Blank 와 Shappirio 는 AS, LAS, Soap 으로 사람의 callus 를 처리하면 다양한 상대습도영역에서 물을 흡수하는 능력이 감소한다는 것을 보여주었다.²⁶⁾ 또한 그들은 계면활성제처리가 물로만 처리한 경우보다 수용성물질을 훨씬 더 많이 제거한다고 설명하였다. Guinea pig foot pad 의 경우 Middleton 은 SLS 에 대하여 이러한 관찰을 입증하였고 sodium lauroyl isethionate 는 foot pad 의 수화정도를 변화시키지 않고 SLS 처럼 많은 수용성물질을 추출해내지 않음을 보여주었다. 그는 계면활성제가 수용성물질을 유지하는 장벽을 변화시킨다고 제안하였다.

③ 단백질 변성

피부거칠음에 관한 계면활성제의 효과를 측정하는데 있어서 지방분을 사용하는 것 대신에, Imokawa 는 소혈청알부민(BSA, Bovine Serum Albumin) 의

optical rotation 에 대한 계면활성제의 효과와 피부거칠음을 연관시키는 시도를 하였다.^{8,26)} Imokawa 와 Takeguchi 는 계면활성제-단백질의 상호작용의 측정은 유리슬라이드(glass slide)로부터 지방분의 제거나 sulfhydryl(SH) 기의 유리를 측정하는 것보다 거칠음성과의 상관성이 더 좋음을 보여주었다. 계면활성제가 단백질의 수화에 역할을 한다면 BSA 와 같은 몇몇 모델시스템들은 계면활성제-피부상호작용을 예측하는데 유용할 것이다.

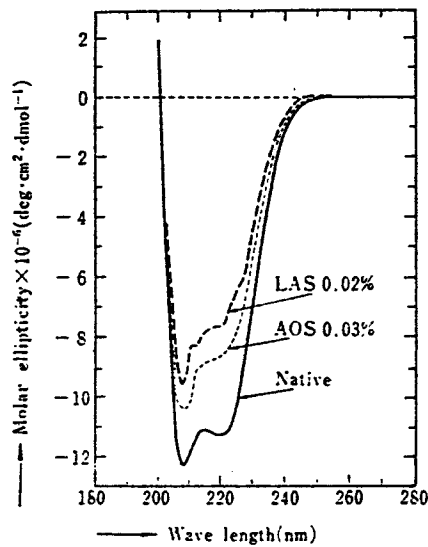


그림 3. Circular dichroism 을 이용한 계면활성제에 의한 단백질 변성의 측정

④ 피부투과성의 변화

오랫동안 계면활성제들이 사람피부의 투과성을 상당히 변화시킬 수 있다는 것이 알려져 왔다. 이러한 투과성의 변화는 계면활성제에 따라 정도와 형태의 차이가 있다. 어떤 변화는 표피단백질의 입체구조변화, 표피의 팽윤과 상관관계가 있다. 1960 년에 Bettley 는 이러한 연구를 확장하여 비누로 표피를 처

리한 것이 포도당과 sodium salycilate 의 피부내로의 수송을 증가시킴을 보여주었다. 후에 Bettley 는 계면활성제가 표피단백질을 변성시켜 피부투과성을 변화한다고 제안하고 단백질변성물질이 표피내로 이온수송을 증가시킴을 보여주었다. Bettley 와 Wood 는 계면활성제의 표피단백질의 변성(SH 기를 측정함에 의하여) 에 대한 효과와 이온수송에 대한 효과사이에 부분적인 상관관계를 얻었다.²⁸⁾ 그러나 sodium lauroyl sarcosinate 는 단백질을 강하게 변성시키지만 장벽기능을 변화시키지 않는다. 이와 같이 sulfohydryl 기의 방출이 항상 손상된 막의 결과와 일치하지는 않는다.

사람피부의 전도성을 측정함에 의해서도 계면활성제에 의하여 변화된 투과성을 측정할 수 있는데 Scheuplein 과 Dugard 는 AS 의 동족체 계열중에서 lauryl 이 가장 전도성증가에 영향을 많이 주었음을 밝혔다.²⁹⁾

⑤ 효소활성저해

계면활성제가 단백질을 변성시키는 능력이 있음이 알려져 있듯이 효소의 단백질구조도 변화시켜 효소의 활성을 떨어뜨리거나 기능을 상실케 한다.²⁾

표 1. SLS 에 의한 효소저해 (1hr)

효소	잔류활성(%)	농도(wt%)	온도 (°C)
Alcohol dehydrogenase	35	1	25
Alkaline phosphatase	100	1	25
α-Amylase	30	0.15	25
Glucose oxydase	0	1	60
Trypsin	0	1	25
Lactic dehydrogenase	0	0.5	25

3. 자극성시험방법

1. In-vivo test 와 in-vitro test

피부의 자극성을 평가하는 시험방법으로서는 크게 두가지 유형으로 분류된다. 그중 하나는 살아있는 생물을 대상으로 하는 in-vivo test 이고 다른 하나는 어원상으로 「시험관에서 행하여지는」이라는 의미의 in-vitro test 이다.

In-vivo test 의 대표적인 예로서는 1944년에 개발되어 반세기 동안 널리 사용되어 온 Draize-test 가 있는데 이 방법은 털을 깎은 토끼의 피부에 첩포 시험을 하여 육안으로 임상결과를 관찰하는 시험방법이다. In-vivo test 는 대체로 쥐나 토끼와 같은 동물을 대상으로 하는 animal test 와 사람의 피부를 직접 대상으로 하는 human test 로 나뉘어 진다. 시험대상물질의 특성과 사용과정에 준하여 적절한 시험방법을 선택하는 것이 바람직하다.

In-vitro test 는 피부자극 및 독성의 메카니즘을 이해함과 동시에 경험적으로 in-vivo 결과와의 상관성을 바탕으로 개발된 시험방법으로 무척추동물(원생동물)을 시험대상으로 하는 방법에서부터 척추동물의 조직과 세포를 이용하는 시험방법, 여러 자극메카니즘에서 제안된 생화학적 모델을 이용하여 개발된 시험에 이르기까지 아주 다양하다.

그러나 최근에는 Draize test , 즉 in-vivo test를 대체하려는 움직임이 일어나고 있다. 정부, 산업계, 학계, 동물애호단체가 협력하여 Draize test 를 대체할 수 있는 in-vitro test 를 개발하는데 많은 노력을 기울이고 있는 것이다.^{5,21)} 그 주된 이유는 in-vivo test 가 많은 수의 실험동물이 필요할 뿐만 아니라 비경제적이기 때문이다. 또한 in-vivo test 는 일반적으로 장시간이 필요하고 임상결과를 해석하기 위해서는 특별히 훈련된 사람이 필요하며 결과 해석에서도 주관적일 수 있다는 단점이 있고 자극성이 낮은 시료간의 자극도의 차이는 구별하기 힘들다.¹⁶⁾ 한편 동물시험에서 얻어진 결과와 human test 에서 얻어진 결과와는 잘 일치하지 않는다는 지적도 있다.

오래전부터 in-vivo test 의 단점을 극복하려는 시도로 많은 in-vitro test

가 개발되어 왔고 최근에도 많은 문헌에서 다양한 in-vitro test 가 소개되고 있다. In-vitro test 는 동물세포를 배양하는 시험에서도 동물의 사용량을 크게 줄이고 그 밖의 in-vivo 에서의 단점을 줄인 것으로 보여지지만 이상적인 in-vitro test 가 되기 위해서는 다음과 같은 요건을 가져야 한다.

- (a) 재현성
- (b) in-vivo test 결과와의 상관성
- (c) 피부자극 메카니즘과의 연관성
- (d) 경제성

In-vitro test 는 대부분 단일변수에 대한 결과이지만 in-vivo 결과는 다양한 종말점, 예를 들면 홍반(erythema), 부종(edema), 인설(scaling), 균열(fissuring) 에 대한 결과이다. 따라서 어떤 in-vivo parameter 가 in-vitro 결과와의 상관성을 얻기 위해 선택되어야 하는가가 중요한 문제로 대두된다. 분명한 것은 in-vitro/in-vivo 의 상관성은 in-vivo 종말점의 선택에 좌우될 것이다. Draize test 와 같은 in-vivo test 에서는 최소한의 자극정도를 erythema 와 edema 를 종말점으로 한다.²⁰⁾ 그러나 비교적 자극정도가 작은 물질을 대상으로 하는 세정제에서는 이보다는 임상적 측면에서 자극도가 경미한 scaling 을 종말점으로 선택할 것이다.

2. In-vivo 자극성시험방법

1) Draize test (Animal test)

Draize 가 1944 년 급성 1차 자극성을 평가하는 동물시험모델로 개발한 방법으로써 그후 미국의 FHSA (Federal Hazardous Substance Act) 에서 채택된 시험방법이다.⁴⁾

털을 깎아낸 토끼의 손상 또는 정상피부를 이용하여 첩포시험하여 자극성을 평가하는 방법이다. 최소 6마리를 손상 및 정상피부시험에 사용한다. 1 inch × 1 inch 크기의 patch 에 액체시료의 경우 0.5ml, 고체나 페이스트상은 0.5 g 을 도포하고 시험동물의 몸통부위에 첩포한다. 24 시간 접촉후, patch 를

제거하고 표 2에 제시된 채점방법에 따라 반응결과를 평가한다. 72시간경과후 다시 관찰한다. 평가방법은 정상피부와 손상피부에 대하여 24 시간후와 72 시간후에 홍반과 부종에 대하여 각각 2개의 수치를 얻는다. 총 8 개의 수치를 합하고 4로 나눈 것을 1차 자극치로 한다.

표 2. 피부반응의 평가

Skin reaction	Value
Erythema and eschar formation	
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
Edema formation	
No edema	0
Very slight edema (very perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approx. 1mm)	3
Severe edema (raised more than 1mm and extending beyond the area of exposure)	4

2) 첩포시험 (human test)

첩포시험은 여러가지가 알려져 있으나 가장 대표적인 방법은 다음의 3 가지이다.

a) Al-Test

지름 10mm 의 여과지와 알루미늄 원판으로 구성된 것을 첩포하여 시험한다.

b) Finn Chamber Test

1975 년 Pirilla 에 의해 제안된 것으로 chamber 는 알루미늄원판 (직경 8mm, 두께 0.5 mm)으로 만들어졌고 여과지는 용액으로 시험할 때만 필요하다.

c) During Chamber Test

1979 년 Frosch 와 Kligman 에 의해 제안된 것으로 During Chamber 는 직경 12mm, 용량이 250 μ l 을 지닌 확장된 aluminium unit 로 되어 있고 8 개의 chamber 는 각 상박의 굴근에 알맞게 되어 있다.

3) 침적법

실용적인 측면이나 손의 피부에 대한 마일드성을 측정하기 위한 종합적인 시험방법으로서 생각되지만 시험할 수 있는 시료의 수가 비교적 작다는 단점이 있다. 계면활성제 또는 세제의 일정농도의 시험용액과 대조용 물의 각각 20 l (35 \pm 1 $^{\circ}$ C)에 건강한 피부를 지닌 시험자 (남녀 각각 9명 씩 18 명) 의 손을 1분간 침적시킨 후 1분간 온풍에서 (약 58 $^{\circ}$ C) 건조한다. 이와 같은 조작을 30회 반복한다.

침적시험을 종료한 후 충분히 물로 씻고 건조시킨후 24, 48 시간후에 증상에 따라 점수를 매긴다.

4) 순환법

첩포시험에 비하여 세정제의 사용환경에 접근된 in-use test 이다. 침적법에 비하여 보다 많은 시료를 테스트할 수 있다.¹⁹⁾ 계면활성제 용액 (1%, 37 $^{\circ}$ C) 을 상박의 안쪽에 (38cm²) 그림 4와 같은 순환장치로 glass cap 에 순환시키고 (200ml/min) 10 분간 1일 1회 실시하여 자극성정도를 평가한다.

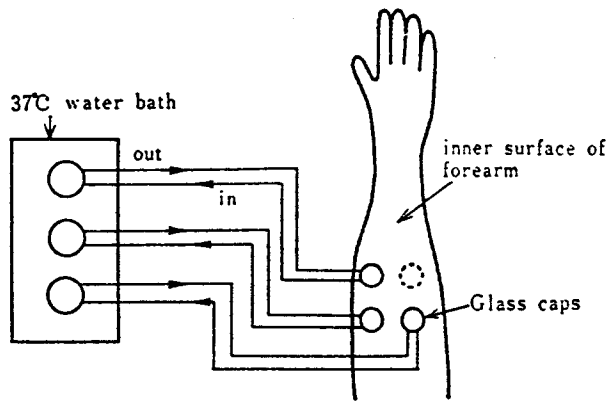


그림 4. 순환법에 의한 자극성 시험

5) Flex Wash test

침적법이나 순환법에 비하여 아주 sensitive 하여 시료간의 작은 자극성 차이도 분별할 수 있다. 물에 적신 상박에 순수한 시험물질을 1일 4회 도포하고 5일 후 임상결과를 관찰한다.

3. In-vitro 자극성시험방법

1) 단백질 변성시험

① Zein test

In-vitro 자극성시험방법 중에서 비교적 오래전부터 알려진 방법으로 현재에도 자극성의 선별시험으로서 널리 사용되고 있는 방법이다.

옥수수에서 추출한 단백질인 zein 을 계면활성제용액에서 일정조건하에서 (37°C) 1시간 동안 교반한 후 여과하여 상등액을 얻은 후 micro-Kjeldahl 법

에 의한 질소정량으로 zein 의 용해량을 측정한다. Gotte 는 다음과 같은 자극성 분류기준을 제시하였다.^{6,11)}

- 0 - 200 mgN/100ml : non-irritant
- 200 - 400 mgN/100ml : slightly irritant
- > 400 mgN/100ml : irritant

② Red Blood Cell test

자극성이 강할수록 용혈작용(hemolysis) 이 강하다고 알려져 있으며 용혈능은 세포막에 대한 작용이라고 할 수 있다. RBC test 는 다양한 in-vivo test 와의 상관성이 인정되고 있다.

신선한 소피를 채취하여 구연산 완충용액과 혼합하여 운반한뒤 원심분리하여 원형질을 제거하고 적혈구만을 분리한다. 0.125mg/ml 의 옥시헤모글로빈을 함유한 RBC 분산액 (인산염 완충용액) 에 계면활성제의 농도를 증가시키면서 상온에서 배양한다. 고속원심분리기로 배양을 정지시킨 후 530, 560nm 에서 용출된 헤모글로빈양을 측정한다.¹²⁾

③ 산성 phosphatase 저해성 시험

효소단백질의 저해(변성)에 대한 모델시험법이다. 산성 phosphatase 0.321 mg/ml 의 tricine 완충용액 (pH 6.0) 및 p-Nitrophenyl 인산나트륨 0.4 g/100ml 의 동일 완충용액을 제조한 후에 산성 phosphatase 2ml 에 계면활성제 완충용액 (pH 6.0) 을 2ml 가하고 29℃ 로 보온하고 20 분후 29℃ 에서 보온한 p-nitrophenyl 인산용액 2ml 를 가하고 바로 29℃ 에서 UV (440nm) 로 p-nitrophenol 의 초기생성속도를 측정한다. 저해 백분율은 계면활성제를 혼합하지 않은 경우를 Rb, 계면활성제가 혼합된 경우를 Rs 로 하여 $(Rb - Rs) / Rb \times 100$ 로 나타낸다.¹⁰⁾

④ Egg Albumin 변성시험

난백알부민 0.025% 를 함유한 0.05M 인산염 완충용액 9ml 에 계면활성제 수용액 1ml 또는 대조용으로 증류수 1ml 를 가한 후, 25℃ 항온암실에서 보존한

다. 이후 배양 4일 동안 수계여과 크로마토그래피법을 사용하여 단백질 변성을 구한다.⁹⁾

컬럼 : TSK-G300SW

용리액 : 0.15M Na₂SO₄ 를 함유한 인산염완충용액

검출기: UV (220nm)

⑤ Circular Dichroism 을 이용한 단백질 변성측정

단백질의 입체구조를 추정하는데 유용한 CD(circular dichroism) 분광법을 이용하여 계면활성제수용액중의 단백질의 구조변화를 측정하는 방법이다. 단백질로는 주로 구형 단백질인 소혈청 알부민 (BSA) 을 사용하는데 208, 220 nm 에서 α -helix, β -sheet 의 특성peak 가 나타난다.³⁾

50mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.0) 에 계면활성제를 용해시켜 CMC 이상 되게 하고 BSA 를 0.01 g/100ml 가 되도록 용해시킨다. CD 분광계를 사용하여 200~250nm 에서 CD 스펙트럼을 구한다. 220nm 에서의 분자타원율로 단백질변성도를 추정한다.

⑥ Sulfhydryl 기 유리량 측정

머큐리오렌지를 이용하여 가는 원심관에 조제된 callus 분을 20mg 또는 30mg 를 취하고 계면활성제 수용액을 10ml 추가한 후 40℃ 에서 2~4 시간 교반한다. 교반종료후 계면활성제를 제거하기 위하여 원심분리, 이온교환수에 의한 세정을 4회 반복하고 인산염 완충액으로 2회 세정한 후 머큐리오렌지 이소아밀 아세테이트용액 5ml 를 가하여 1시간 동안 강하게 교반하면서 유리SH 기와 반응시킨다. 반응 종료후 15분동안 원심분리 및 이소아밀 아세테이트 세정을 4회 반복한다. 세정종료후 이소아밀아세테이트 5ml 를 가하고 진한 염산 2ml 를 첨가하여 1시간 강하게 교반하고 단백질 SH 에 결합하고 있는 머큐리오렌지를 이소아밀아세테이트에 재용해시킨다. 교반 종료후 상등액을 이소아밀아세테이트에 재용해한 머큐리오렌지양을 470 nm 에서 흡광도를 측정하고 검량선에 의해 SH 양을 구한다.¹⁰⁾

2) 배양세포를 이용한 시험방법

대부분의 기존시험법들은 잠재적인 자극성을 평가하는 선별시험이고 제품개발의 초기단계에서만 사용될 수 있었다. 최근에 동물시험의 대체시험법으로 활발하게 연구되고 있는 시험법은 배양세포를 이용한 시험방법이다. 이러한 배양세포를 이용한 시험법에서 사용되는 지표들은 다음과 같다.³⁾

- a. 최고허용량(HTD): 구조변화를 일으키지 않는 최고농도
- b. 독성결정농도(TTC) : 시료제거후 독성자극으로부터 회복될 수 있는
최고농도
- c. IC50: 세포증식을 50% 억제하는 농도
- d. CD50: 50% 의 세포를 유리시키는 농도
- e. EC50: 세포내효소를 50% 유출시키는 농도
- f. 활성세포의 수를 50% 감소시키는 농도
- g. cytokine 또는 염증매개물질의 방출을 50% 증가시키는 농도
- h. 각질층의 투과성을 변화시키는 농도

세포수의 정량화를 위하여 cell count, 총단백질정량, dye absorption 측정, thiazolyl blue 변환분석, neutral red uptake, thymidine incorporation 이 사용된다.

표 3. 배양세포를 이용한 in-vitro 자극성 시험방법

Test	Assessment	End Point
Morphology	Phase contrast microcopy Light microscopy	HTD, TTC stratum corneum integrity
Cell proliferation	Colony formation inhibition Determination of cell number ³ H-thymidine incorporation into DNA ³ H-uridine incorporation into DNA Determination of cellular proteins NR uptake, MTT conversion activity	
Cell differentiation	Determination of cell number Determination of cellular protein NR uptake, MTT conversion activity	
Cell adhesion	Histology Expression of specific protein differentiation markers confined envelope formation	
Cell membrane integrity/viability	NR release, MTT activity Trypan Blue retention Propidium iodide incorporation Release of cellular enzymes ⁵¹ Cr release from prelabelled cells	EC50
Cell metabolism	Incorporation of radiolabelled precursors into proteins and lipids Rate of glucose utilization Rate of glucose/fatty acid oxidation Induction of heat shock protein synthesis pH change Plasminogen activator induction	
Stratum corneum integrity assay	In-vitro percutaneous absorption	Ratio of penetration rate
Cell function impairment	Inhibition of fibroblast-induced collagen contraction Inhibition of gap junctional intercellular communication	EC50
Release of inflammatory mediators	Release of arachidonic acid metabolites (prostaglandin, leukotrienes, HETEs) Release of interleukins	

4. 계면활성제구조와 피부자극성

1. 계면활성제의 피부자극성

1) 농도 및 접촉시간에 따른 피부자극정도

In-vivo, in-vitro 자극성시험결과를 종합한 결과, 계면활성제의 접촉농도, 접촉시간에 의해 피부에 미치는 영향이 다르다는 것이 확인 되었다. 표피건조, 낙설성변화 및 피부자극성 변화가 일어나기 위한 계면활성제의 접촉농도, 접촉 시간은, 자극성이 가장 강한 것으로 알려진 SLS 의 경우, in-vivo 실험에서 5%, 2회 처리후 약한 표피건조, 낙설성변화 및 염증성변화가 관찰되었고 0.5% 이하에서는 자극성결과가 관찰되지 않았다는 사실로부터 추정할 수 있을 것이다.¹⁹⁾

Human test (circulation method) 에서는 5% SLS 1회 처리로는 자극성변화가 관찰되지 않았으나 2회 처리후에는 자극성이 크게 증가하는 것으로 관찰되었다. (그림 5)

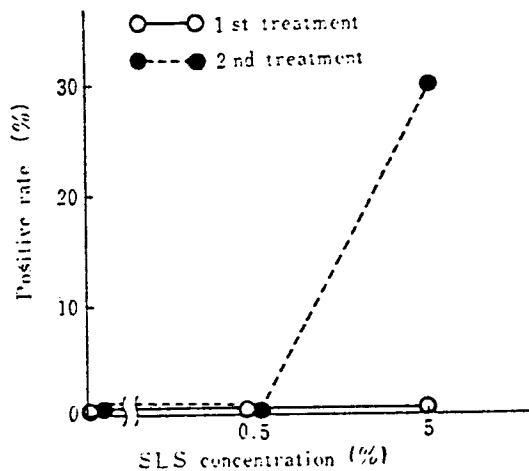


그림 5. 계면활성제의 농도와 자극성관계

SH 기 유리량측정에 의한 단백질변성시험에서는 20분처리의 경우, 5% SLS는 SH 유리량이 확인되지 않았지만 120 분 처리후에는 SH 유리량이 현저하게 증가하는 것이 관찰되었다. (그림 6)

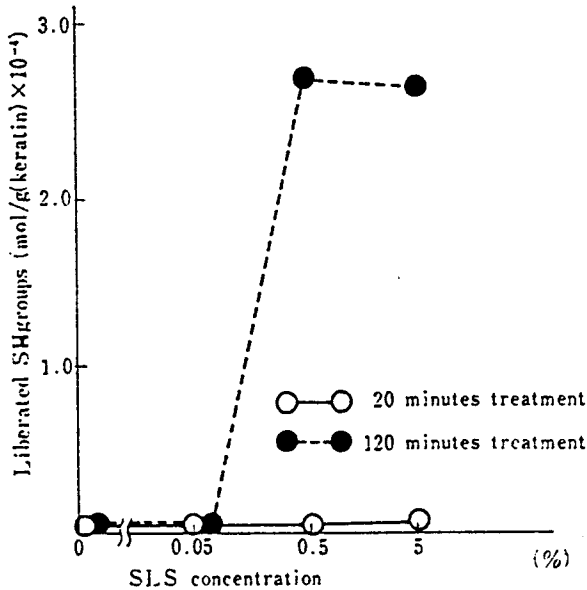


그림 6. 케라틴 분말로부터 유리된 SH 량

2) 계면활성제 종류별 피부자극성

일반적으로 계면활성제들의 자극성정도는 음이온 계면활성제 > 양성이온 계면활성제 > 비이온 계면활성제 의 순으로 알려져 있다.

문헌에 발표된 음이온 계면활성제들사이의 자극성 크기는 다음과 같다.

AS > LAS > SAS > AOS > AES

그러나 자극성시험방법의 특성에 따라 각 계면활성제들사이의 자극성 서열은 다소 차이가 있다. (표 4)

표 4. 자극성시험방법에 따른 계면활성제의 자극성비교¹¹⁾

시험방법	강한 자극성	중간정도의 자극성	무자극 또는 저자극성
Duhring Chamber test (human)	AS, SAS	LAS	AES, Betaine sulfosuccinate
Zein test (in-vitro)	AS, SAS LAS	SLES	AES, Betaine sulfosuccinate
경피투여 (animal)	SLS, SAS	LAS	AES, Betaine sulfosuccinate
반복접포시험 (animal)	SAS	SLS, LAS	AES, Betaine sulfosuccinate
안점막 자극시험 (Draize test)	SAS, AES AS, Betaine	LAS	sulfosuccinate

2. 계면활성제의 구조와 자극성

1) 탄소사슬길이에 따른 자극성

계면활성제의 동족체(homolog)들의 자극성을 측정한 결과, 경험적으로 중간 정도의 탄소길이를 갖는 것이 가장 자극성이 크다는 것이 알려져 왔다. 물론 모든 계면활성제에서 공통적으로 나타나는 것은 아니지만 몇몇의 음이온 계면활성제에서 C12, C14의 자극성이 다른 동족체들보다 자극성이 높게 나타나는 현상이 뚜렷하다. 이러한 현상을 설명하기 위한 이론적인 모델로서 물리화학적으로 해석이 제시된 바 있다.

표 5. 계면활성제의 구조와 자극성²²⁾

계면활성제	자극성 시험방법	시험결과
Soap	epicutaneous test	8 < 10 < 12 > 14 > 16 > 18
AS	epicutaneous test	8 < 10 < 12 > 14 > 16
LAS	단백질변성	8 < 12 > 14 > 16
AOS	단백질변성	12 > 14 > 16

음이온계면활성제의 알킬사슬길기와 단백질사이의 상호작용에 영향을 주는 두가지 변수는 물-기름사이의 분배계수와 계면활성제가 수용액에서 단분자로 존재하는 최대농도이다.¹⁷⁾ 즉 각질층에 흡수되는 계면활성제의 농도는 물-기름사이의 분배계수에 의하여 예측될 수 있고, 또 CMC 이상에서 미셀은 단분자의 활동도에 거의 영향을 주지 않으므로 피부에 흡수되는 계면활성제의 양은 CMC 이상의 농도에서 거의 일정하다는 것을 가정한 것이다.

탄소길이에 따른 분배계수는 탄소수 n 의 함수로써 묘사된다.

$$\log P = \log P_0 + \pi n$$

P 는 유상-수상 분배계수이고 π 는 상수이고 P_0 는 친수성기의 외삽된 분배계수이다. 각질층내의 계면활성제 농도를 C_s 라고 하고 수상에서의 계면활성제 단분자농도를 C_m 이라고 하면 C_s 는 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$C_s = C_m P$$

$$\log C_s = \log P_0 C_m + \pi n$$

$$C_s = C_s^* e^{\pi n}$$

이와 같이 CMC 이상에서 각질층에 흡수되는 계면활성제의 양은 탄소길이에 따라 지수적으로 증가할 것이다.

표 6. Alkyl sulfate 의 탄소길이에 따른 자극성효과

탄소수	Krafft Point(℃)	CMC (mM)	팽윤성(%)	상대전도성
10	8	33.1 (25℃)	17	2
12	20	8.1 (25℃)	31	100
14	33	2.2 (40℃)	25	40
16	46	0.5 (40℃)	4	8
18	58	-	3	-

각질층으로 흡수되는 계면활성제의 양을 결정하는 또다른 변수는 수용액상에 존재하는 계면활성제 단분자의 농도이다. 수용액상에 존재할 수 있는 계면활성제 단분자농도의 상한선은 Krafft point 나 CMC 에 의하여 얻어진다. CMC 이상에서는 단분자의 농도는 증가하지 않고 계면활성제들이 미셀을 형성할 것이기 때문이다. 계면활성제의 CMC 는 다음과 같이 탄소수 n 의 함수로 표현된다.

$$\log \text{CMC} = \log(\text{CMC})_0 - \beta n$$

탄소사슬길이가 증가함에 따라 CMC 는 지수적으로 감소하며, 분배계수증가보다 CMC 감소가 더 빠르다면 일정농도하에서 동족체들의 각질층으로의 흡수 양이 최대값을 갖는 탄소사슬길이가 존재할 것으로 예상된다. 그러나 이러한 평형과정에 의해서만 설명될 수 있는 것은 아니다. 예를 들면 탄소수 12, 14 이상에서는 탄소수증가에 따라 각질층에 대한 영향이 급격하게 감소한다는 사실은 비평형과정의 가능성을 예상하게 한다.

AES 의 경우 EO 사슬길이가 길수록 자극성은 현저하게 감소하는데 EO 사슬은 AES 의 용해성을 증가시키는 등 친수성기로 작용하는 것으로 알려져 있으나 한편으로는 AES 의 CMC 를 감소시키는 소수성기로도 작용한다. 따라서 EO 사슬길이의 증가에 따른 CMC 의 감소가 자극성이 감소하는데 기여한다고 볼 수 있다.

2) 계면활성제 친수성기의 영향

소수성사슬이 각질층의 지질이나 단백질과 비특정적인(non-specific) 상호작용을 설명하는 반면, 친수성기는 특정적인(specific) 상호작용을 한다고 여겨진다. 일반적으로 특정상호작용의 서열은 Laughlin 의 친수성서열을 따르고 이러한 서열에서 친수성이 감소함에 따라 상호작용의 크기가 감소한다.(표 7) 즉 이온성 계면활성제가 양성이온 계면활성제보다 훨씬 더 강하게 상호작용을 하고 양성이온 계면활성제는 비이온 계면활성제보다 더 강하게 상호작용을 한다.¹⁸⁾

표 7. Laughlin 의 친수성 서열

이온 > 양성이온 > amine oxide > phosphine oxide
친수성 감소 →
> sulfoxide > ethoxylate > alcohol

AS 와 비누는 피부를 팽윤시킬 수 있지만 alkyl methyl sulfoxide 는 팽윤시키지 않는다. MAP (monoalkyl phosphate) 를 제외하고는 음이온계면활성제가 피부거칠음을 일으킬 수 있지만 AEO 는 피부거칠음을 유발하지 않는다.

3) 계면활성제의 조합과 자극성

계면활성제 A 에 이보다 CMC 가 낮은 계면활성제 B 를 첨가하면 용액중의 계면활성제 A 의 단분자농도는 감소할 것이다. 또한 혼합미셀을 형성할 경우 계면활성제조합의 CMC 는 더욱 낮아지는 경향이 있다. 그러므로 계면활성제 B 의 첨가로 더 적은 양의 계면활성제 A 가 각질층으로 용해되거나 단백질에 결합될 것이다.

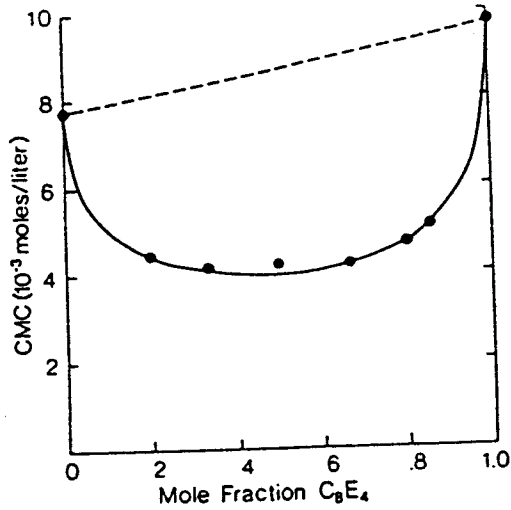
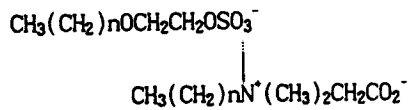


그림 7. SDS 와 AEO 의 mole fraction 에 따른 CMC 의 변화

한편 음이온 계면활성제는 양이온 계면활성제나 양성이온 계면활성제 또는 alkanol amide 와 같은 비이온 계면활성제와의 조합으로 mild 성이 크게 향상된다는 보고도 있다.²³⁾ 이것은 음이온 계면활성제와의 complex 의 형성을 통하여 음이온 계면활성제가 피부에 흡착하는 능력을 감소시키기 때문이라고 설명된다.



5. 저자극성 세제의 개발 동향

최근의 세제개발의 방향은 환경에 적합하고 피부에 자극성이 적은 계면활성제의 사용으로 요약될 수 있다. 생분해성이 열등한 분기형 alkyl benzene sulfonate(ABS) 에서 직쇄 alkyl benzene sulfonate(LAS) 로 전환한 이후에도 AOS(alphaolefin sulfonate), PAS(primary alkyl sulfate) 와 같은 생분해성이 더욱 더 우수한 계면활성제가 세제에 사용되어 왔다. 한편 생분해에 대한 관심에 못지 않게 저자극성 계면활성제 및 세제의 개발에도 많은 진전이 있었다. 여기에서는 최근에 저자극성 계면활성제로 각광받고 있는 계면활성제들과 인체세정제, 주방용세제 등에 응용되는 저자극성 formulation 추세를 소개하고자 한다.

1. 저자극성 계면활성제

1) Sulfosuccinate

기존의 음이온 계면활성제들에 비하여 자극성이 적고 침투성, 습윤성 등 계면활성력이 우수한 계면활성제이다.

2) Alkyl polyoxyethylene ether methyl carboxylate (AEC)

LD50 이 2000 mg/kg 이상으로 인체안전성이 높은 계면활성제로 산성이나 중성에서는 비이온 계면활성제로 알칼리영역에서는 음이온 계면활성제로 작용한다. 또한 비누보다 내경수성이 좋다.

3) Alkylpolyglycoside (APG)

당유도체 계면활성제로 최근에 가장 많은 주목을 받고 있는 계면활성제이다. 통상적으로 널리 사용되어 온 alkyl ethoxylate 계 비이온계면활성제가 기포성이 낮고 고온에서 cloud 현상이 나타나는데 비하여 APG 는 기포성이 좋고 상안정성도 양호하며 특히 피부에 온화한 계면활성제이다.

4) Monoalkyl phosphate (MAP)

음이온 계면활성제중에서 가장 자극성이 낮다고 알려져 있으며 기포의 감속도 우수하여 최근에 인체세정제로 사용되고 있다.

5) Sodium isethionate

주로 복합비누 (syndet bar) 에 사용되며 지방산염계 비누에 비하여 피부에 온화하고 creamy한 기포성을 갖고 있다.

6) Alkyl amidopropyl betaine

양성이온 계면활성제로 음이온 계면활성제보다 자극성이 낮고 특히 음이온 계면활성제, 비이온 계면활성제와의 상승작용으로 피부자극성을 현저히 저하시키는 특성이 있다.

7) Alkyl dimethyl amine oxide (AO)

음이온 계면활성제와의 상승작용으로 단백질 변성을 현저히 저하시키며 기포증강제로도 작용한다.

8) 아미노산 유도체 계면활성제

대표적인 아미노산 유도체로서는 acyltaurate, acylsarcosinate, acyl glutamate 가 있다. 우수한 인체안전성과 함께 피부에도 온화하여 인체세정제, 복합비누, 세안제, 샴푸등에 사용되고 있다.

2. 저자극성 세정제의 formulation 추세

인체세정제, 주방용세제 등에 사용되는 주계면활성제(primary surfactant) 는 주로 음이온 계면활성제인 AS, AES, LAS, AOS, SAS 등이 사용되고, 보조계면활성제(secondary surfactant) 로는 기포증강제 및 증점제로 유용한 alkanol amide, betaine, amine oxide 등이 사용되어 왔다.

표 8. 계면활성제의 성질

계면활성제	세정력	용해성	내경수성	기포성	자극성
음이온 계면활성제					
LAS	●	●	●	●	●
AS	●	▲	●	●	● ~ ▲
AES	▲	◎	◎	▲	◎
AOS	▲	◎	◎	▲	● ~ ◎
SAS	●	◎	●	●	●
비이온 계면활성제					
AEO	▲	◎	◎	×	◎
양성 계면활성제	▲ ~ ×	●	◎	▲ ~ ×	◎
비누	×	▲	×	▲ ~ ×	◎

LAS 를 기준(●)으로 한 평가: ◎ 우수, ▲ 약간 불량, × 불량

그러나 기존의 음이온 계면활성제들은 피부거칠음을 유발하는 정도가 강하기 때문에 중요성이 점차 낮아져 mild 계면활성제의 사용이 증가되고 있다. 즉, 자극성계면활성제/mild 계면활성제의 비가 감소되고 성능은 유지하는 저자극성세제들이 등장하고 있다. 또한 NRE (narrow range ethoxylate), APG 와 같은 mild 형 비이온 계면활성제들이 도입되어 자극성을 현저하게 낮춘 세제들도 개발되고 있다. 그러나 현재까지는 음이온계면활성제들이 가격과 성능면에서 유리하기 때문에 주계면활성제로 사용되고 있다.

표 9. 주방용세제의 계면활성제 시스템의 변천

70 년대	80 년대	90 년대
ABS / AES alkanol amide	LAS / AES / AOS alkanol amide	LAS / AES / AOS alkanol amide / AEO APG / AO / Betaine

저자극성 세제의 formulation 원리를 살펴보면 다음과 같다.

- a. 약산성의 pH 유지 (pH = 5~6)
- b. 저자극성 음이온계면활성제의 도입 (AES, sulfosuccinate 등)
- c. 양성이온 계면활성제 배합 (AO, Betaine)
- d. 비이온 계면활성제 배합 (CDE, APG, AEO)

표 10. 계면활성제 조성에 따른 자극성 정도

효소: human acid phosphatase

활성분시스템	효소 잔류활성 (%)
LAS : AES 1:1	14
SAS : AES 1:1	28
SAS : AES : AA 2:2:1	37
SAS : AES : AEO 2:2:1	59
SAS : AES : AA : AEO 3:3:2:2	87
AES : AO 4:1	88
Water	100

AA: alkanol amide

6. 맺음말

환경과 생체안전성에 대한 관심이 고조되고 있는 추세에서 계면활성제와 이들의 조합으로 된 세정제, 특히 인체세정제, 주방용세제 등은 세정목적이 피부를 대상으로 하거나 세정과정을 통해 피부와의 접촉기회가 많으므로 기본적인 세정기능 외에 피부에 대한 mild 성은 또 하나의 중요한 목표가 되어 왔다. 계면활성제의 피부에 미치는 영향의 메카니즘 규명과 효율적인 피부자극성 평가방법의 개발은 피부의학과 정밀화학자의 공통과제가 될 것이다. 근래 화학물질의 피부에의 영향평가에 있어 객관성, 경제성, 정밀성 등을 유지하기 위해 많은 종류의 in-vitro 방법이 제안되고 있으며 그 타당성과 연관성이 in-vivo test 를 통해 검증되고 있다. 또한 계면활성제에 대한 많은 연구 결과로 기능성과 저자극성을 겸비한 계면활성제 및 세정제가 개발되고 있으며 앞으로도 이분야에서 많은 진보가 있으리라 예상된다.

7. 참고문헌

1. 洗劑の毒性とその評價, 第8章, 日本厚生省環境衛生局食品化學課編
2. C. Gloxhuber, Anionic Surfactants, Marcel Dekker, Inc., New York, 1980.
3. Maria Ponec, International Journal of Cosmetic Science, 14, 245(1992)
4. Robert L. Rieschel, Thomas S. Spencer, Method for Cutaneous Investigation, Marcel Dekker, Inc., 1990.
5. 田中 憲穂, Fragrance Journal, No 8, 12 (1992)
6. Gotte, Ernst, Chem. Phys. Appl. Surface Act. Subst. Proc. Int. Congr., 4, 83 (1964)
7. 芋川 玄爾, 橋村啓子, 葛見 衛, 油化學, Vol. 23, No. 11, 719 (1974)
8. G. Imokawa, K. Sumura, M. Katsumi, JAOCS, 52, 479 (1975)
9. 宮澤 清, 小川 正孝, 光井 武夫, J. Soc. Cosmet. Chem., Vol. 18, No. 2, 96 (1984)
10. 芋川 玄爾, 葛見 衛, 油化學, Vol. 25, No. 1, 24 (1976)
11. 池田 弘, Fragrance Journal, No. 72, 114 (1985)
12. W. J. W. Pape, U. Hoppe, Arzneim.-Forsch./Drug Res., 40(1), Nr. 4, 498 (1990)
13. 大部 一夫, 常名 伸夫, 宮島 信幸, 水島 直樹, 柏 一郎, 油化學, Vol. 29, No. 11, 866 (1980)
14. 大場 健吉, 武井 玲子, 油化學, Vol. 34, No. 3, 161 (1988)
15. 西田 敦, 食品衛生研究, Vol. 40, No. 9, 1-25
16. Stephen D. Gettings, Cosmetics & Toiletries, 107, 71 (1992)
17. Hans Schoot, Journal of Pharmaceutical Science, 62(2), 341 (1973)
18. R. G. Laughlin, Advances in Liquid Crystals, Vol. 3, Academic Press, New York, 1978, pp 41-48
19. 岡本 暉公彦, 河合 通雄, Fragrance Journal, No. 31, 39 (1978)
20. J. Harvell, MD and H. I. Maibach, MD, Cosmetics & Toiletries, Vol.

20. J. Harvell, MD and H. I. Maibach, MD, *Cosmetics & Toiletries*, Vol. 107, 31 (1992)
21. V. C. Gordon, *Fragrance Journal*, No. 8, 15 (1992)
22. J. Flabe, *Surfactants in Consumer Products*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1987, pp 487-493
23. EP 374702
24. G. J. Putterman, N. F. Wolejsza, M. A. Wolfram and K. Laden, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 28, 521 (1977)
25. R. Scheuplein and L. Ross, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 21, 853 (1970)
26. I. H. Blank and E.B. Shappirio, *J. Invest. Dermatol.*, 25, 391 (1955)
27. G. Imokawa and T. Takeguchi, *Cosmetics & Toiletries*, 91, 32 (1976)
28. F.R. Bettley and E. Donoghue, *Nature*, 17, 185 (1960)
29. P. H. Dugard and R. J. Scheuplein, *J. Invest. Dermatol.*, 60, 263 (1973)