

새로운 치면세균막 착색제 개발을 위한 식용색소의 생체적합성 연구

이 광희

원광대학교 치과대학 소아치과학교실

Abstract

BIOCOMPATIBILITY OF FOOD COLORING AGENTS TO DEVELOP NEW DENTAL PLAQUE DISCLOSANTS

Kwang-Hee Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

The purpose of study was to develop new dental plaque disclosing agents which could replace erythrosine. Three food coloring agents(Red No.40, Blue No.1, and Mixed Green), erythrosine and fluorescein were tested for their color difference, antibacterial property, and biocompatibility. Color difference of Red No.40 was greater than that of erythrosine as concentration of solution increased. Color differences of Blue No.1 and Mixed Green were smaller than that of red dyes. Erythrosine showed obvious antibacterial property, but food coloring agents showed almost no antibacterial property. The taste and sensation of erythrosine was the worst, and the taste of Red No.40 and the sensation of Mixed Green were the most tolerable. Erythrosine stained dental plaque and oral soft tissue most deeply and long, and Blue No.1 was the next in the depth and longevity of stain.

Key words : biocompatibility, erythrosine, food color, plaque disclosing

이 연구는 1997년도 학술진흥재단 자유공모과제 연구비의 지원에 의해 수행되었음.

I. 서 론

치면세균막 착색제(dental plaque discolorants)는 치아우식증과 치주병의 원인이 되는 치면세균막 또는 치태를 눈에 잘 띠게 착색시켜서 구강위생의 동기를 유발하고 구강위생술식의 효과를 증진시킬 목적으로 사용되는 염료로서, 1963년에 Armin¹⁾이 추천한 erythrosine이 가장 널리 사용되어 오고 있다. 그 후 Erythrosine과 유사한 구조를 가진 형광 염료 fluorescein을 자외선 조명과 함께 사용하는 방법^{2,3)} 및 erythrosine을 fast green⁴⁾이나 brilliant blue⁵⁾와 함께 사용하는 2색 염료법(two-tone dye systems) 등이 개발되었다.

Erythrosine을 사용한 경우보다 fluorescein을 사용한 경우에 치면세균막의 감소량이 더 커졌으며, 치면세균막 착색제를 사용한 환자들은 착색제를 사용하지 않은 대조군 환자들에 비해 치면세균막 지수가 감소하였다⁶⁾. Fluorescein은 형광염료로서 일반 조명 아래에서는 거의 보이지 않으므로 처음에는 자외선 광원을 사용하였고⁷⁾ 나중에는 filter가 부착된 거울을 사용하여 일반 조명 아래에서도 볼 수 있게 하였다⁸⁾. Fluorescein은 자외선 조명 아래에서 눈에 잘 띠는 장점이 있고, Erythrosine은 착색 범위가 넓은 장점이 있었다⁹⁾. 또한, fluorescein과 fast green은 오래된 치면세균막을 착색시키는 반면에, erythrosine은 새로 형성된 치면세균막을 착색시킨다고 알려졌다^{4,9)}. erythrosine은 착색의 농도(shades)를 통해 치면세균막과 획득피막(pellicle)을 구별할 수 있게 한다고 보고되었다¹⁰⁾. 구강내 세균에 미치는 영향은, 생체외 실험¹¹⁻¹³⁾에서 erythrosine과 fluorescein은 임상적 사용농도보다 낮은 농도에서 살균효과를 나타내었고, brilliant blue와 fast green은 억제효과가 없었으며, 생체내 실험¹⁴⁾에서는 축정이 가능할 정도의 억제효과가 나타난 염료가 없었다.

처음에 이 네 가지 염료들은 모두 미국 식품의 약국(Food and Drug Administration, FDA)에 의해 식품, 의약품, 화장품에 사용할 수 있는 염료(Food, Drug and Cosmetic dyes, FD&C)로 허가되었다¹⁵⁾. FD&C yellow No.8이었던 fluorescein은 현재 허가 목록에 포함되어 있지 않다. FD&C Red No.3인 erythrosine은 1990년에 FDA가 불수용성 형태(lake) 전

체와 수용성 형태(dye)에서는 외용약과 화장품에 사용되는 것에 대해 사용허가를 중지하였고, 식품과 내용약에 대해서는 FDA가 중지시킬 의사를 표시하였지만 사용허가가 계속 유지되고 있는 상태이다¹⁶⁾. Erythrosine의 사용이 제한된 이유는 쥐 실험에서 갑상선 종양과 연관성이 있는 것으로 나타났기 때문이다^{17,18)}.

치면세균막 착색제로서 erythrosine을 사용할 때에는 수용액 또는 타액에 용해되는 정제의 형태로서 사용하므로 불수용성 형태(lake)의 erythrosine 사용을 중지시킨 FDA의 규정에 위반되지 않으나, 구강점막에 대해 일종의 외용약 형태로 장기간 반복적인 사용을 하게 되므로 안전성에 의문이 제기될 수 있다. 일례로서, basic fuchsin은 치면세균막 착색제와 우식 탐지액으로서 사용되어 왔으나 발암성 때문에 더 이상 사용이 권장되지 않는다^{19,20)}. 따라서, 치과진료실에서 오랫동안 일상적으로 사용되어 온 재료라 하더라도 인체에 대한 안전성이 보장되지 않는다면 보다 안전한 재료로 대체할 필요성이 있다.

이 연구의 목적은 erythrosine을 대체할 수 있는 안전한 치면세균막 착색제를 개발하기 위한 기초 연구를 수행하는 것으로서, erythrosine과 fluorescein 및 수종의 식용색소를 대상으로 색차 분석을 하고 항균성 실험과 패널 검사를 통해 생체 적합성을 연구하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

연구에 사용된 염료는 erythrosine(Junsei Chemical, Japan)과 fluorescein(Sigma, USA) 외에 우리 나라의 식용색소 중에서 적색 40호(allura red; 보락, 한국), 청색 1호(brilliant blue; 보락, 한국), 혼합초록색(황색 4호 83.3%, 청색 1호 16.7%; 보락, 한국)이었다. 식용색소 혼합초록색에 포함된 식용색소 황색 4호의 성분은 tartrazine으로서 FD&C Yellow No.5에 해당하였다. 식용색소 적색 40호와 청색 1호는 FD&C Red No.40 및 Blue No.1과 번호가 일치하였다.

2. 색차 분석

각 염료의 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0005%, 0.00005% (w/v) 수용액을 제조하였다. 각 용액의 0.00005% 용액은 육안적으로 색깔을 구별할 수 없었기 때문에 그 이하 농도는 분석에서 제외하였다.

표준화된 색차 비교를 위해 고안된 방법은 백색의 여과지에 염료용액을 일정량 적하하고 염료용액이 충분히 스며들었을 때 젖은 상태에서 색차측정기로 색차를 측정하는 것이었다. 여과지는 염료용액을 충분히 확산시키기 때문에 용액이 국소적으로 저류하여 농도가 균일하지 않게 되는 일이 없고 젖은 상태에서 측정한 것은 구강내에서 초기 우식병소의 착색과 관찰이 젖은 상태에서 이루어지기 때문이었다. 용액이 완전히 건조된 후에는 젖었을 때와 큰 색차를 나타내었다.

염료 별로 9개 농도의 용액들을 여과지 (Whatman, Cat No 1002 185)에 적하하고 용액이 충분히 스며든 다음 건조되기 전에 색차측정기 (Micro Color Tester, TS-6FX color, Tokyo Denshoku)로 색차를 측정하였다.

3. 항균성

염료의 항균성은 *Streptococcus mutans*의 산생성에 미치는 염료의 영향을 통해 관찰하였다. 영하 150°C의 질소탱크 내의 freezing vial에 동결 보관 중인 *Streptococcus mutans* JC2균을 꺼내어 37°C로 incubation시켜 해동시킨 후 vortexing하여 clean bench에서 고체배지 BAP와 Mitis salivarius agar에 각각 접종하였다. 고체배지에서 자란 단일 균집락을 액체배지인 Todd-Hewitt broth와 Nutrient broth에 접종하고 접종된 배지를 CO₂ incubator에서 밤새 배양하였다(37°C, CO₂ 10.0%). 다음 날 배지에 자란 균을 동정하기 위해 Gram stain하고 현미경으로 관찰(X100)하여 연쇄구균(streptococcus)을 확인하였다.

자당 30%, beef extract 0.1%, NaCl 0.2%, sulfisomidine 0.15%의 액체 배지를 만들고 유산용액으로 pH를 5.6으로 맞추었다. Erythrosine, fluorescein, 식용색소 적색 40호, 혼합 초록색, 청색 1호를 1g씩

배지 100ml에 넣고 *S. mutans* JC2 배양액을 0.1ml씩 접종한 후, 염료당 2개 용액을 37°C에서 24, 48, 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 용액의 pH를 pH meter (Expandable Ion Analyzer EA920, Orion Research, USA)와 combination pH electrode (Orion Ross® Electrode Combination pH Model 81-02)로 측정하였다.

다음에, 각 염료가 1%씩 함유된 10% 자당용액 40ml에 *S. mutans* JC2 배양액 0.1ml씩을 넣고 염료당 2개 용액을 37°C에서 24, 48, 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 용액의 pH를 pH meter (Expandable Ion Analyzer EA920, Orion Research, USA)와 combination pH electrode (Orion Ross® Electrode Combination pH Model 81-02)로 측정하였다.

4. 패널 검사

Fluorescein을 제외한 나머지 4개 염료에 대하여 패널 검사를 실시하였다. 대학생 80명을 1개 염료당 20명씩 배정하였다. 피검자들은 실험 시작전 24시간 동안 칫솔질을 하지 않았다. 바셀린을 입술에 바른 후, 각 염료의 1% 수용액 5ml를 입에 넣고 1분간 머금고 있다가 미지근한 물로 입을 행구기를 뱉는 물에 색깔이 거의 비치지 않을 때까지 반복하였다. 염료용액의 맛과 기타 감각에 대해 주관적 평가를 하게 하였고, 치면세균막, 피막, 치은, 혀의 착색 상태를 검사하여 착색의 강도에 대해 4점(매우 진함), 3점(진함), 2점(엷음), 1점(매우 얇음)으로 평가하였으며, 상하 좌우 제 1 대구치, 상악 우측 중절치, 하악 좌측 중절치의 협설면의 치면세균막 부착상태를 0점(치면세균막 없음), 1점(치경부 1/3 이하), 2점(2/3 이하), 3점(2/3 이상)로 각각 조사하여 기록하고 12개 치면의 점수를 합한 것을 치면세균막지수로 하였다. 평상시대로 세치제를 사용하여 칫솔질을 하게 한 후 치면세균막지수를 동일한 방법으로 다시 평가하였다. 끝으로, 처음에 염료용액을 도포한 때로부터 두 시간이 경과하였을 때 치은과 혀 등 연조직의 착색상태를 다시 평가하였다(Fig. 1).

Fig. 1. 염료의 생체적합성에 대한 패널 검사의 평가표

1. 주관적 평가

- 1) 맛 - () 맛이 불쾌하다, () 맛이 보통이다, () 맛이 좋다
 2) 기타 감각 - () 없다, () 있다 - 설명 : ()

2. 염료도포 직후의

착색상태

	매우 진함	진함	엷음	매우 엷음
치태				
피막				
치은				
혀				

4. 염료도포 직후의

치면세균막 지수

	우	중	좌
상	/	/	/
하	/	/	/

3. 두 시간 후의

연조직 착색상태

	매우 진함	진함	옅음	매우 옅음
치은				
혀				

5. 칫솔질 후의

치면세균막 지수

	우	중	좌
상	/	/	/
하	/	/	/

III. 연구성적

1. 색차 분석

백색을 기준으로 하였을 때 색차가 크게 나타난 순서는 1% 농도에서 fluorescein(110.38), 적색 40호(98.24), 혼합 초록색(92.51), 청색 1호(88.66), erythrosine(82.02)이었고, 0.1% 농도에서 fluorescein(91.27), 적색 40호(66.86), erythrosine(64.03), 혼합 초록색(62.66), 청색 1호(58.30)이었으며, 0.005% 농도에서 erythrosine(33.72), fluorescein(33.05), 적색 40호(27.47), 청색 1호(22.53), 혼합 초록색(15.93)이었다(Table 1).

따라서, erythrosine은 고농도에서 색차가 작았고 저농도에서 컸으며, 혼합 초록색과 청색 1호는 적색 염료들에 비해 색차가 작았고, fluorescein은 저농도에서는 색차가 작았으나 전체적으로 가장 색차가 컼고, 적색 40호는 농도가 증가하면서 erythrosine보다 색차가 크게 나타났다.

2. 항균성

Streptococcus mutans JC2 균주의 산 생성에 대한 염료의 영향 실험의 결과를 보면, fluorescein은 pH가 계속 상승하였고 erythrosine은 pH가 조금 올라간 상태에서 머물다가 12일 후에는 감소하였으며 식용색소 중에서는 혼합 초록색이 가장 pH 하강이 커졌고 그 다음은 청색 1호, 적색 40호의 순서이었다(Table 2, 3). Fluorescein 자체가 염기성을 띠고 있다는 것을 감안하더라도 산 생성이 거의 일어나지 않은 것을 볼 때 fluorescein은 세균에 대한 독성을 가지고 있다고 판단되며, erythrosine도 상당한 항균성을 가지고 있는 것으로 판단되었다. 반면에, 식용색소들은 항균성이 거의 없다고 볼 수 있었고 생체친화성이 매우 우수한 염료라고 판단되었다.

3. 염료의 맛과 감각

염료의 맛에 대한 주관적 평가에서 맛이 좋다는 응답이 나온 염료는 하나도 없었고, 맛이 불쾌하

Table 1. Color difference analysis

Dye	Concentration	DL*	Da*	Db*	DE*
Erythrosine	0.0005%	-7.66	4.73	-0.60	9.03
	0.001	-9.08	5.73	-1.62	10.86
	0.005	-15.46	25.46	-7.93	30.83
	0.01	-19.47	35.52	-10.03	41.73
	0.05	-29.34	54.82	-4.76	62.36
	0.1	-33.83	57.36	2.43	66.63
	0.25	-35.49	60.17	10.24	70.60
	0.5	-40.04	63.42	22.01	78.16
	1.0	-44.98	62.37	34.09	84.11
Fluorescein	0.0005%	-14.52	-1.17	6.10	10.16
	0.001	-11.51	-3.41	6.8	13.81
	0.005	-10.04	-7.60	20.88	24.38
	0.01	-10.92	-13.02	33.79	37.82
	0.05	-12.56	-12.03	63.83	66.16
	0.1	-11.06	-19.36	81.70	84.69
	0.25	-10.56	-14.59	98.58	100.21
	0.5	-16.26	-5.74	104.46	105.87
	1.0	-21.29	7.29	112.72	114.95
Red No.40	0.0005%	-8.56	3.16	0.96	9.18
	0.001	-10.56	6.06	1.08	12.22
	0.005	-16.78	17.44	1.24	24.43
	0.01	-17.07	23.32	2.75	29.03
	0.05	-27.08	34.69	14.84	46.44
	0.1	-33.07	44.00	24.77	60.36
	0.25	-41.10	51.93	37.84	76.28
	0.5	-43.99	56.19	47.18	85.55
	1.0	-53.24	63.42	60.77	102.72
Mixed Green	0.0005%	-4.36	-1.73	2.58	5.35
	0.001	-6.55	-2.49	9.67	7.91
	0.005	-7.30	-7.68	9.90	14.50
	0.01	-9.47	-14.10	16.41	23.62
	0.05	-18.50	-30.69	34.60	49.81
	0.1	-21.12	-40.03	43.62	62.86
	0.25	-30.13	-48.31	52.76	77.62
	0.5	-37.03	-51.51	57.78	85.81
	1.0	-46.38	-53.77	63.28	95.11
Blue No.1	0.0005%	-12.33	-2.78	0.81	12.66
	0.001	-12.55	-4.71	-2.73	13.68
	0.005	-14.43	-7.73	-6.77	17.71
	0.01	-18.09	-13.83	-11.52	25.52
	0.05	-28.11	-18.58	-26.57	42.92
	0.1	-34.30	-17.17	-34.31	51.46
	0.25	-44.45	-12.52	-43.50	63.44
	0.5	-52.99	-4.21	-52.09	74.43
	1.0	-64.07	6.36	-58.38	86.91

Dyes were penetrated to filter papers(Whatman, Cat No 1002 185) and measured by Micro Color Tester(TS-6FX color, Tokyo Denshoku) in wet status.

다는 응답이 나온 염료는 erythrosine이 75%로서 가장 많았고 청색 1호가 55%로서 두 번째로 많았으며 혼합초록색이 40%로서 그 다음이었고 적색 40호는 15%로서 가장 적었다(Table 4). 따라서, 염료의 맛은 적색 40호가 가장 낫고 erythrosine이 가장 나쁜 것으로 나타났다.

기타 감각이 있다는 응답은 erythrosine이 35%로서 가장 많았고 청색 1호가 20%로서 두 번째로 많았으며 혼합초록색이 15%였다.

Table 2. Effect on acid production of *S.mutans* JC2 in pH 5.6 sucrose broth

Dyes	pH			
	24	48	72 hours	Change
Erythrosine	6.04	5.93	5.84	+ 0.24
Fluorescein	7.41	7.35	7.33	+ 1.73
Red No.40	4.97	4.72	4.64	- 0.96
Mixed green	5.24	5.11	4.54	- 1.06
Blue No.1	5.46	5.30	4.83	- 0.77
Control	5.18	4.69	4.18	- 1.42

Mean from duplicate experiments

Table 3. Effect on acid production of *S.mutans* JC2 in 10% sugar solution

Dyes	pH				
	Initial	24	48	72 hrs	Change
Erythrosine	7.47	6.45	7.18	7.27	- 0.20
Fluorescein	8.24	8.23	8.05	8.05	- 0.19
Red No.40	6.85	3.81	3.61	3.47	- 3.38
Mixed green	5.97	3.68	3.72	3.80	- 2.17
Blue No.1	6.25	4.28	4.16	4.20	- 2.05

Mean from duplicate experiments

Table 5. Sensation by dyes

	Sensation (N)	Total		%	
		N	%	N	%
Erythrosine	nausea(2), weak bitter taste(2), slight burning sensation(1), pain(1), astringency(1)	7	35		
Red No.40	sticky and slimy(1), feeling as oil(1), slightly brackish(1)	3	15		
Blue No.1	bitter taste(2), nausea(1), slight burning sensation or tingling(1)	4	20		
Mixed Green	tingling of the tip of tongue(1)	1	5		

N = 20 (each group)

았으며 적색 40호가 15%로서 그 다음이었고 혼합초록색이 5%로서 가장 적었다(Table 5). 감각의 내용은 erythrosine은 구역질(2명), 약간 쓴 맛(2명), 약한 작열감(1명), 통통(1명), 맵은 느낌(1명)이었고, 적색 40호는 끈적끈적하고 미끈미끈한 느낌(1명), 기름같은 느낌(1명), 약간 짭짤한 맛(1명)이었으며, 청색 1호는 쓴 맛(2명), 구역질(1명), 약한 작열감 또는 따끔거림(1명)이었고, 혼합초록색은 혀 끝이 따끔거림(1명)이었다. 이러한 감각의 내용은 대부분 불쾌감을 주는 것이므로, 맛 외의 감각에 있어서는 혼합초록색이 가장 양호하였고 erythrosine이 가장 나빴다고 볼 수 있다.

4. 치면세균막과 피막의 착색

치면세균막과 피막을 가장 진하게 착색시킨 염료는 erythrosine이었고 그 다음은 청색 1호이었다 (Table 6). Erythrosine과 나머지 세 염료간에 착색 정도에서 유의한 차이가 있었고, 청색 1호와 적색 40호간 및 청색 1호와 혼합초록색간에도 각각 유의한 차이가 있었다($P<0.05$).

Table 4. Taste of dyes

	Unpleasant		Normal		Pleasant	
	N	%	N	%	N	%
Erythrosine	15	75	5	25	0	0
Red No.40	3	15	17	85	0	0
Blue No.1	11	55	9	45	0	0
Mixed Green	8	40	12	60	0	0

Chi-square : P < 0.01

6. 치은의 착색

Table 6. Degree of plaque and pellicle staining

	Plaque		Pellicle			
	Mean	SD	Mean	SD		
Erythrosine	3.13	0.49	2.24	0.46		
Red No.40	1.79	0.79	1.24	0.33		
Blue No.1	2.50	0.48	1.77	0.38		
Mixed Green	1.75	0.39	1.43	0.33		
ANOVA	P<0.01		P<0.01			
	Green	Red	Blue	Red	Green	Blue
Blue	*	*		*	*	
Eryth	*	*	*	*	*	*

LSD, * : P<0.05

염료 도포 직후에 치은을 가장 진하게 착색시킨 염료는 erythrosine이었고 그 다음은 청색 1호이었으며, 두 시간 후에도 erythrosine에 의한 착색이 가장 진하게 남아 있었다(Table 7). 염료 도포 직후와 두 시간 후 모두 erythrosine과 나머지 세 염료간에 착색 정도에서 유의한 차이가 있었고, 염료 도포 직후에 청색 1호와 적색 40호간에 유의한 차이가 있었다(P<0.05).

7. 혀의 착색

염료 도포 직후에 혀를 가장 진하게 착색시킨 염료는 erythrosine이었고 그 다음은 청색 1호이었

Table 7. Degree of gingival staining

	After application		After two hours		Difference	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Erythrosine	2.31	0.54	1.53	0.54	0.78	0.55
Red No.40	1.21	0.17	1.02	0.05	0.19	0.15
Blue No.1	1.53	0.41	1.13	0.24	0.39	0.54
Mixed Green	1.31	0.27	1.07	0.17	0.24	0.29
ANOVA	P<0.01		P<0.01		P<0.01	
	Red	Green	Blue	Red	Green	Blue
Blue	*					
Eryth	*	*	*	*	*	*

LSD, * : P<0.05

Table 8. Degree of tongue staining

	After application		After two hours		Difference	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Erythrosine	3.82	0.19	2.87	0.59	0.95	0.61
Red No.40	2.57	0.74	1.19	0.24	1.38	0.67
Blue No.1	3.44	0.48	1.65	0.44	1.79	0.62
Mixed Green	2.85	0.62	1.35	0.54	1.50	0.59
ANOVA	P<0.01		P<0.01		P<0.01	
	Red	Green	Blue	Red	Green	Blue
Blue	*	*		*	*	*
Eryth	*	*	*	*	*	*

LSD, * : P<0.05

Table 9. Plaque index before and after toothbrushing

	Before		After		Difference		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Erythrosine	11.03	4.03	3.56	2.76	7.48	3.43	
Red No.40	3.28	3.17	0.41	0.62	2.87	3.20	
Blue No.1	6.14	4.14	0.53	0.77	5.62	3.99	
Mixed Green	2.94	3.03	0.53	0.93	2.41	2.64	
ANOVA	P<0.01		P<0.01		P<0.01		
	Red	Green	Blue	Red	Green	Blue	
Blue	*	*				*	*
Eryth	*	*	*	*	*	*	*

LSD, * : P<0.05

으며, 두 시간 후에도 동일하였다(Table 8). 염료 도포 직후와 두 시간 후 모두 erythrosine과 나머지 세 염료간, 청색 1호와 적색 40호간, 청색 1호와 혼합초록색간에 차색 정도에서 각각 유의한 차이가 있었다(P<0.05).

8. 치면세균막지수

치면세균막지수는 칫솔질 전과 후 모두 erythrosine이 가장 높게 나타났으며 청색 1호는 칫솔질 전에 두 번째로 높게 나타났다(Table 9). 칫솔질 전과 후 모두 erythrosine과 나머지 세 염료간에 유의한 차이가 있었고, 칫솔질 전에 청색 1호와 적색 40호간 및 청색 1호와 혼합초록색간에 각각 유의한 차이가 있었다(P<0.05).

IV. 총괄 및 고찰

식용색소는 우리 나라의 식품위생법에 규정된 식품첨가물 중의 착색제(food coloring agent)에 속 한다²⁰. 우리 나라에서 착색제는 14종의 타르색소와 기타 9종이 지정되어 있다. 타르계 색소는 석탄에서 얻은 콜타르로부터 제조된 것을 가리키며 원래 직물의 염료로서 합성된 것으로서 유해한 것이 많기 때문에 비교적 독성이 적은 것만 식용색소로 지정하고 사용을 규제하고 있다. 우리나라에서 허가된 타르색소의 종류는 녹색 3호, 녹색 3호 알루미늄레이크, 적색 2호, 적색 2호 알루미늄레이크, 적색 3호, 청색 1호, 청색 1호 알루미늄레이크,

청색 2호, 청색 2호 알루미늄레이크, 황색 4호, 황색 4호 알루미늄레이크, 황색 5호, 황색 5호 알루미늄레이크, 적색 40호이다.

한편, 미국 식품의약국(Food & Drug Administration, FDA)의 검정을 받은 색소는 FD&C Blue No.1 (Brilliant Blue FCF), FD&C Blue No.2 (Indigotine), FD&C Green No.3 (Fast Green FCF), FD&C Red No.40 (Allura Red AC), FD&C Red No.3 (Erythrosine), FD&C Yellow No.5 (Tartrazine), FD&C Yellow No.6 (Sunset Yellow), Orange B, Citrus Red No.2이다²². 이 중에서 FD&C Red No.3 erythrosine은 쥐 실험에서 갑상선 종양과 연관성이 있는 것으로 나타났기 때문에^{17,18} 1990년에 FDA가 불수용성 형태(lake) 전체와 수용성 형태(dye)에서는 의용약과 화장품에 사용되는 것에 대해 사용허가를 중지하였고, 식품과 내용약에 대해서는 FDA가 중지시킬 의사를 표시하였지만 사용허가가 계속 유지되고 있다¹⁶. 과거에 FD&C Yellow No.8이었던 fluorescein은 허가목록에서 제외되었다. Erythrosine ($C_2O_4H_{14}O_5$)은 fluorescein($C_2O_4H_{12}O_5$)을 요드화시킨 것으로서 두 염료는 서로 밀접한 관계가 있다²³.

염료의 유전독성(genotoxicity)에 대한 연구 보고들²⁴을 종합해 보면, erythrosine은 돌연변이, DNA 손상, 세포분열유발(clastogenicity)에 관한 보고들이 상충되며 보고들 중의 반 이하에서 유전독성이 있는 것으로 나타났다. Fluorescein과 그 sodium 염인 uranin은 대부분의 연구에서 불활성으로 보고되었다. 식용색소 적색 40호와 청색 1호는 유전독

성이 없는 합성 식용색소로 알려져 있다. 적색 40호는 최근에 소개된 합성 염료 중의 하나로서 돌연변이 및 DNA 손상 시험에서 유전독성이 없는 것으로 나타났다는 것이 주목할만 하며 동물 발암 성도 없었다. 청색 1호는 돌연변이와 DNA 손상이 없었고 섭취 후 대변으로 거의 정량적으로 배설되며 흡수가 거의 안되기 때문에 독성이 낮은 것으로 생각되었다.

식용색소 혼합초록색에 포함된 식용색소 황색 4호는 미국의 FD&C Yellow No.5에 해당하며 성분은 tartrazine이다. Tartrazine은 돌연변이와 DNA 손상에서 유전독성이 없었고 세포분열유발의 보고는 상충되었다. FDA¹⁶⁾는 1986년에 FD&C Yellow No.5가 1만명당 1명 이하의 비율로 과민반응을 일으킬 수도 있다고 결론지었으나, 천식이나 아스피린과민성 환자에 대한 영향은 발견되지 않았으며, 식용색소는 그 첨가 내용이 제품 label에 표시되므로 과민성이 있는 사람은 스스로 피할 수 있다고 보아 규제 조치를 취하지 않았다.

Kieser 등²⁵⁾은 수 종의 식용색소를 치면세균막 착색제로서 시험한 결과에서 식용색소도 기존의 치면세균막 착색제들과 마찬가지로 효과적인 것으로 나타났으며 착색의 강도가 염료의 색보다 더 중요하다고 보고하였다. 이들이 사용한 식용색소 성분 11개 중에서 현재 FDA의 승인을 받고 있는 것은 적색 2호, 적색 3호, 황색 5호, 청색 1호, 녹색 3호이다. 저자의 연구에서는 적색 2호 amaranth 대신에 최근에 개발된 더 안전한 적색 40호를 사용하였고, 황색 5호 tartrazine은 그 자체를 사용할 경우에 착색된 치면세균막이 치아색과 구별되기 어렵기 때문에 청색 1호가 혼합된 혼합초록색을 사용하였다.

치면세균막 착색제의 기본 조건은 치면세균막을 신속하게 확실히 착색시키면서 인체에 안전해야 한다는 것이 될 것이다. 하지만, 치은이나 혀 등의 구강점막은 되도록 착색시키지 않거나 가역적으로 착색시켜야 하므로 착색제의 견뢰성(堅牢性)이 낮은 것 곧 신속히 탈색되는 것이 바람직할 것이다.

연구성적에서 색차가 크게 나타난 순서는 1% 농도에서 fluorescein, 적색 40호, 혼합 초록색, 청색 1호, erythrosine, 0.1% 농도에서 fluorescein, 적색 40

호, erythrosine, 혼합 초록색, 청색 1호, 0.005% 농도에서 erythrosine, fluorescein, 적색 40호, 청색 1호, 혼합 초록색으로서(Table 1), 혼합 초록색과 청색 1호는 적색 염료들에 비해 색차가 작았고, 적색 40호는 농도가 증가하면서 erythrosine보다 색차가 크게 나타났다. 형광염료인 fluorescein은 자외선 조명의 특수 조건이 필요하므로 제외할 때, 염료 자체의 색차가 큰 것은 적색 40호와 erythrosine이라고 볼 수 있다.

생체내에서 치면세균막 등을 착색시키는 염료의 능력은 생체외 실험에서의 색차 비교와 다르게 나타났다. 치면세균막과 피막을 가장 진하게 착색시킨 염료는 erythrosine과 청색 1호였고(Table 6), 치면세균막지수는 칫솔질 전과 후 모두 erythrosine이 가장 높게 나타났으며 청색 1호는 칫솔질 전에 두 번째로 높게 나타났다(Table 9). 따라서, 실제로 치면세균막을 착색시키는 능력이 큰 것은 erythrosine과 청색 1호라고 볼 수 있다.

연조직의 착색 및 염료의 견뢰성과 관련하여, 염료 도포 직후에 치은과 혀를 가장 진하게 착색시킨 염료는 erythrosine이었고 그 다음은 청색 1호이었으며, 두 시간 후에도 erythrosine에 의한 착색이 가장 진하게 남아 있었다(Table 7, 8). 그러므로, erythrosine이 연조직을 착색시키고 그 착색이 오래 지속되는 것은 단점으로 지적될 수 있다.

염료의 생체 적합성과 관련하여 인체세포배양 실험은 대부분의 방법이 비색측정법을 사용하고 있어서 정확한 결과를 얻기가 어려웠기 때문에 연구내용에 포함시키지 않았다. 염료의 맛과 감각에 대한 패널 검사에서, 염료의 맛은 적색 40호가 가장 낮고 erythrosine이 가장 나쁜 것으로 나타났고 (Table 4), 맛 외의 감각에 있어서는 혼합초록색이 가장 낮고 erythrosine이 가장 나쁜 것으로 해석되었다(Table 5). 염료의 항균성에 관한 실험은 Streptococcus mutans를 대상으로 시행하였으며, fluorescein은 항균성이 뚜렷하였고 erythrosine도 상당한 항균성을 가지고 있는 것으로 나타났지만 식용색소들은 항균성이 거의 없었다(Table 2, 3). Baab 등¹²⁾과 Marsh 등²⁶⁾도 erythrosine이 항균성이 있다고 보고하였다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때, 치면세균막 착색제의 조건 중에서 치면세균막 자체의 착색 능

력은 erythrosine이 식용색소들에 비해 뛰어났으나 생체 적합성의 측면에서는 식용색소들이 erythrosine에 비해 더 우수한 것으로 판단되었다. 연구에서 사용된 적색 40호, 청색 1호, 혼합 초록색 중에서 혼합 초록색은 침색 능력이 너무 약하여 치면 세균막 침색제로서 사용되기 어려울 것이며, 적색 40호와 청색 1호는 치면세균막 침색능력과 생체 적합성이 비교적 우수하였지만 침색능력에서 erythrosine에 미치지 못하였기 때문에 erythrosine을 대체할 수 있는 염료로 추천될 수는 없다고 사료되었다. 치면세균막 침색능력과 생체 적합성이 모두 뛰어난 침색제를 찾기 위하여는 식용색소를 중심으로 더 많은 후속연구가 필요하다.

V. 결 론

Erythrosine을 대체할 수 있는 안전한 치면세균막 침색제를 개발하기 위한 기초 연구로서, erythrosine, 식용색소 적색 40호, 청색 1호, 혼합초록색 등을 대상으로 색차 분석을 하고 항균성 실험과 패널 검사를 통해 생체 적합성을 연구하였다. 색차 분석은 각 염료의 농도별 수용액을 제조하여 여과지에 적하한 후 색차측정기로 색차를 측정하였고, 염료의 항균성은 *Streptococcus mutans*의 산생성에 미치는 염료의 영향을 통해 관찰하였으며, 패널 검사는 대학생 80명을 대상으로 염료의 맛과 감각, 치면세균막과 피막의 침색, 치은과 혀의 침색, 치면세균막지수 등을 조사하였다.

1. 적색 40호는 농도가 증가하면서 erythrosine보다 색차가 크게 나타났고 혼합초록색과 청색 1호는 적색 염료들에 비해 색차가 작았다.
2. Erythrosine은 뚜렷한 항균성을 나타내었으나 식용색소들은 항균성이 거의 없었다.
3. 염료의 맛은 erythrosine이 가장 나쁘고 적색 40호가 가장 나은 것으로 보고되었고, 맛 외의 감각은 erythrosine이 가장 나쁘고 혼합초록색이 가장 나은 것으로 보고되었다.
4. 치면세균막과 피막을 가장 진하게 침색시킨 염료는 erythrosine이었고 그 다음은 청색 1호이었으며 적색 40호와 혼합초록색은 침색 능력이 약하게 나타났다.
5. 치은과 혀를 가장 진하게 침색시킨 염료는 ery-

throsine이었고 그 다음은 청색 1호이었으며, 두 시간이 경과한 후에 침색이 가장 진하게 남아 있었던 염료도 동일하였다.

6. 치면세균막 지수는 칫솔질 전과 후 모두 erythrosine이 가장 높게 나타났고 청색 1호가 그 다음으로 높게 나타났다.

참 고 문 헌

1. Arnim SS : The use of disclosing agents for measuring tooth cleanliness. *J Periodontol* 34:227-245, 1963.
2. Brilliant H : Use of Fluorescent Dyes in Dental Diagnostic Methods. US Patent 3-309-274, US Patent Office, 1967.
3. Hefferren JJ, Cooley RO, Hall JB, et al : Use of ultraviolet illumination in oral diagnosis. *J Am Dent Assoc* 82:1353-1360, 1971.
4. Block PL, Lobene RR, Derdivanis JP : A two-tone dye test for dental plaque. *J Periodontol* 43:423-426, 1972.
5. Block PL, Derdivanis JP : Dental Plaque Disclosing Agent. US Patent 3-723-613, US Patent Office, 1973.
6. Cohen DW, Stoller NH, Chace R, et al : A comparison of bacterial plaque disclosants in periodontal disease. *J Periodontol* 43:333-338, 1972.
7. Lang NP, Østergaard E, Löe H : A fluorescent plaque disclosing agent. *J Periodontol Res* 7:59-67, 1972.
8. O'Brien WJ, Fanian F : Use of a dual filter-mirror device with a fluorescent plaque disclosant. *Clin Prev Dent* 6:13-16, 1984.
9. Gillings BRD : Recent developments in dental plaque disclosants. *Aust Dent J* 22:260-266, 1977.
10. Leknes KN, Lie T : Erythrosin staining in clinical disclosure of plaque. *Quintessence Int* 19:199, 1988.
11. Caldwell RC, Hunt DE : A comparison of the antimicrobial activity of disclosing agents. *J Dent Res* 48:913-915, 1969.
12. Baab DA, Broadwell AH, Williams BL : A com-

- parison of antimicrobial activity of four disclosing dyes. *J Dent Res* 62:837-841, 1983.
13. Marsh PD, Bevis RA, Newman HN, et al : Antibacterial activity of some plaque-disclosing agents and dyes. *Caries Res* 23:348-350, 1989.
 14. Goldman RS, Abelson DC, Mandel ID, et al : The effect of various disclosing agents on plaque accumulation in human subjects. *J Periodontol Res* 9:381-385, 1974.
 15. van de Rijke JW : Use of dyes in cariology. *Int Dent J* 41:111-116, 1991.
 16. FDA/IFIC Brochure, Food and Drug Administration/International Food Information Council Foundation, January 1993.
 17. MAFF(Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Food Additives and Contaminants Committee) : Interim Report on the Review of the Colouring Matter in Food Regulations, 1973, FAC/REP/29, HMSO, London, 1979.
 18. Crampton RF : Current methodological approaches to the evaluation of chemical toxicity, In Galli CL, et al : *Chemical Toxicology of Food*, Elsevier/North-Holland, pp289-300, 1978.
 19. Rowland M : Carcinogenic risk of basic fuchsin(letter). *British Dental J* 155:145, 1983.
 20. Fusayama T : Clinical guide for removing caries using a caries-detecting solution. *Quintessence Int* 19:397-401, 1988.
 21. 동아출판사 백과사전부 : 식품착색제, 동아원 색세계백과사전, 동아출판사, 629, 1987.
 22. Newsome RL : Natural and synthetic coloring agents. In Branen AL, Davidson PM, Salminen S : *Food Additives*, Marcel Dekker Inc, 327-345, 1990.
 23. 문성명 : 식품가공 새기술도입전서, 기초편, 168-184, 1986.
 24. Combes RD, Haveland-Smith RB : A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research* 98:101-248, 1982.
 25. Kieser JB, Wade AB : Use of food colourants as plaque disclosing agents. *J Clin Periodontol* 3:200-207, 1976.
 26. Marsh PD, Bevis RA, Newman HN, et al : Antibacterial activity of some plaque-disclosing agents and dyes(short communication). *Caries Res* 23:348-350, 1989.