

항산화력이 우수한 Fructose 1,6-diphosphate(FDP)를 피부적용제로 응용하기 위한 안전성 평가

김배환* · 이병석 · 정경미 · 안수미 · 안수선 · 심영철
태평양기술연구원 의약건강연구소

The Safety Evaluation of a Potent Antioxidant, Fructose 1,6-diphosphate(FDP), for the Skin Application

Bae-Hwan Kim*, Byoung-Seok Lee, Kyoung-Mi Jung, Su-Mi Ahn, Su-Sun An and Young-Chul Sim

Pharmaceutical & Health Research Institute, Pacific Corporation R&D Center, 314-1,
Bora-Ri, Kiheung-Eup, Youngin-Si, Kyounggi-Do 449-729, Korea

(Received April 16, 2002)

(Accepted June 28, 2002)

ABSTRACT : Fructose 1,6-diphosphate (FDP), a glycolytic metabolite, is reported to ameliorate inflammation and inhibit the nitric oxide production in murine macrophages stimulated with endotoxin. It is also reported that FDP has cytoprotective effects against hypoxia or ischemia/reperfusion injury in brain and heart, and may play a protective role in ultraviolet B (UVB, 280~320 nm)-injured keratinocyte by attenuating prostaglandin (PG)-E₂ production and cyclooxygenase (COX)-2 expression, which are possibly through blocking the intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation. Therefore FDP is considered to act as a potent antioxidant especially in the skin. We conducted the several safety tests (single-dose toxicity, primary skin irritation test, eye irritation test, skin sensitization test, phototoxicity test, photosensitization test and human patch test) to see if FDP is safe in case used for the skin application. Our data obtained hitherto suggest that FDP is very safe if applied to the skin.

Key Words : Fructose 1,6-diphosphate (FDP), Antioxidant, Anti-inflammatory, Safety evaluation, Skin application

I. 서 론

생명체는 산소 호흡 과정 중에 유리기(free radical)라는 부산물을 산생하며, 이것이 소거되지 않을 경우 생체내의 지질, 단백질 등의 변성을 일으킬 수 있다. 피부는 특히 외부에 노출되어 있어 내인성 요인 이외에도 자외선, 오존 및 기타 환경오염물질 같은 외인성 요인에 의한 산화적 스트레스에 취약하다. 이와 같이 산화적 스트레스를 방어하기 위해 많은 의약품, 식품 및 화장품들이 개발되어 이용되고 있다. 좋은 항산화 효능을 갖고 있는 원료를 화장품에 도입한다면, 피부의 항산화 활성을 높여 산화적 스트레스를 해소하고 나아가 피부노화를 방지 또는 지연할 수 있는 항노화 화장품으로의 응용도 가능하리라 생각된다.

Fructose 1,6-diphosphate(FDP)는 해당과정의 중간대사체

(glycolytic metabolite)로서 여러 조직의 허혈(ischemia) 및 허혈후 관류장해(postischemic reperfusion injury)에 대해, 혐기성 탄수화물 대사를 증대시켜 세포보호 효과를 보이며(Sola *et al.*, 1996; Tadeuchi *et al.*, 1998), endotoxin에 의한 nitric oxide의 생성을 조절함으로써 그 독성을 줄인다고 보고되고 있다(Edde *et al.*, 1998). 또한 FDP는 자극 받은 호중구(stimulated neutrophil)에 의해 생성되는 활성산소(oxygen free radicals)도 완전히 억제하여 항산화 효과를 보이기도 하고(Sun *et al.*, 1990), phosphofructokinase를 억제함으로써 5탄당회로(pentose phosphate pathway, PPP)의 발현증가를 유도할 수 있다(Kelleher *et al.*, 1995, 1996; Espanol *et al.*, 1999). 이 5탄당회로는 세포산화환원 조절(cellular redox regulation)에 중요한 역할을 한다(Ben-Yoseph *et al.*, 1996).

FDP는 활성산소와 nitric oxide를 조절하여 dexamethasone에 의한 히스타민성 부종을 감소시키거나(Oyanagui, 1998),

*To whom correspondence should be addressed

carrageenan으로 유도되는 염증을 억제한다는 보고도 있다 (Planas *et al.*, 1993). 또한 최근 FDP가 UVB에 손상받은 keratinocyte에서 Prostaglandin(PG)-E₂와 cyclooxygenase (COX)-2를 억제하고 세포내 활성산소 축적을 방지함으로써 보호효과를 나타낸다는 실험도 진행중이다(in press). 이와 같이 FDP는 항산화 및 항염증에 뛰어난 효과를 보이고 있어 피부에 대한 안전성만 확보된다면, 좋은 항산화 화장품 등의 피부적용제 원료로써 사용될 수도 있다고 판단된다. 본 시험은 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 FDP를 피부에 적용할 경우 안전도가 여부를 평가하는 것이 목적이다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에 사용한 FDP(C₆H₁₁O₁₂P₂Na₃)는 Sigma로부터 구입하였으며, 주사용 생리식염수에 적절한 농도로 녹여 각 시험에 사용하였다.

2. 사용동물의 사육조건

본 시험에 사용한 동물(마우스, 토끼 및 기니픽)은 Samtako Bio Korea에서 구입하였다. 사육실의 사육조건은 온도 23±3°C, 습도 50±10%, 환기회수 15회/hr, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(08:00~20:00)으로 유지되도록 컨트롤 하였다. 시험 전기간동안 사료(Purina Korea)와 음수는 자유급식 시켰으며, 사료의 오염성적서는 공급처로부터 입수시에 받았고, 음수의 오염성적서는 년 2회씩 정기적으로 경기도 보건환경연구원에 의뢰하여, 시험에 영향을 줄 오염원이 없음을 확인하였다. 모든 실험동물은 시험전 1주간 검역기간을 거쳐 건강한 동물만 실험에 사용하였다.

3. 시험방법

본 시험에 사용된 모든 시험방법은 「의약품등의독성시험기준」(식품의약품안전청 고시 제1999-61호), 「기능성화장품등의심사에관한규정」(식품의약품안전청 고시 제2001-60호)과 CTFA 및 OECD guideline에 따라 실시하였다.

1) 단회투여독성

예비시험결과 독성이 나타나지 않아 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2 g/kg 투여군만 설정하였으며, 암수 각각 5마리의 ICR 마우스(20~25 g)를 5시간 가량 절식시킨 후 10 ml/kg의 volume으로 1회 경구투여하였다. 투여 후,

14일 동안 체중변화, 일반증상 및 폐사여부를 관찰하였다. 대조군은 용매(생리식염수)만 투여하였다. 시험종료 후 모든 동물은 부검하여 병리조직학적 이상소견을 관찰하였다.

2) 피부1차자극시험

24시간 전에 제모한 6마리의 New Zealand White rabbit(2.0~2.5 kg)를 이용하여 각 동물의 등 부위를 약 2.5 cm×2.5 cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 비찰과 피부 2개소와 찰과 피부 2개소로 하여, 좌측 구획은 대조물질(생리식염수)을, 우측에는 시험물질 10%(사용예정량의 10배 농도로 선정)를 각각 0.5 ml씩 도포하였다. 시험물질 적용 후 24시간째 및 72시간째에 홍반과 가피형성, 부종형성 등의 자극성 유무를 관찰하여 「의약품등의독성시험기준」에 따라 판정하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize(1959)의 P.I.(Primary Irritation Index)의 산출 방법에 따랐다.

3) 안점막 자극시험

안검사를 통해 안구 손상 등 각막의 손상이 없는 수컷토끼(2~2.5 kg) 9마리를 이용하여 좌측 눈은 대조로, 우측 눈에는 시험물질 10%를 각각 0.1 ml씩 점안하였다. 그 중 3마리는 20~30초 후에 미온 생리식염수로 충분히 세안하고, 나머지 6마리는 세안하지 않았다. 시험물질 적용 종료 후 1, 24, 48, 72시간과 4, 7일 후에 적용부위 각막의 혼탁과 그 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종, 배출물의 정도 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 안점막 반응의 자극 평가는 「의약품등의독성시험기준」(식품의약품안전청 고시 제1999-61호)상의 안구병변의 등급을 이용하여 판정하였고, 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 사용되는 Draize(1959)의 안자극 구분표를 따랐다.

4) 피부감작성 시험

FDP에 대한 피부감작성 여부를 군당 암수 10마리의 Hartley Albino guinea pig(250~300 g)을 이용하여 GPMT (Guinea Pig Maximization Test)법에 따라 실시하였다 (Magnusson *et al.*, 1969). 피부1차 시험을 통해 감작(induction) 농도는 10%, 유발(challenge) 농도는 1차자극을 전혀 나타내지 않는 농도인 1%(사용예정량)로 결정하였다. 1차 감작은 제모된 기니픽의 견갑 간부에 시험물질, Freund's complete adjuvant(FCA) 및 FCA와 시험물질혼합물을 2열로 0.1 ml씩 피내주사 하였다. 7일 후 2차 감작은 동일부위를 제모한 후 10% Sodium Lauryl Sulfate (SLS)를 전처치하고 24시간 후에 시험물질을 0.5 ml/site씩 도포하고 가아제로 덮은 뒤 비자극성 테이프로 고정하여 48시간 동안 폐쇄접포 하였다. 첩포 2주 후 감작부위와 다른 등부위를 제모한 후 시험물질을 24시간 동안 폐쇄첩포

(challenge)하여 첩포 제거 후 24, 48, 72시간째에 홍반과 가피형성, 부종형성 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 관찰 결과 양성율이 29% 이상인 경우 sensitizer로 판정하였다. 양성대조군으로는 DNCB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 0.1%를 사용하였으며, 음성대조군은 용매인 생리식염수를 처치하였다.

5) 광독성시험

FDP에 대한 광독성 여부를 5마리의 Hartley Albino guinea pig(250~300 g)을 이용하여 Lovell 등의 방법(1992)에 의해 실시하였다. 시험물질(FDP)의 사용농도는 피부 1차 자극시험을 통해 1차자극을 전혀 보이지 않는 농도인 10%로 선정하였다. 기니피크의 등부위를 제모한 후 양쪽에 2×2 cm²의 구획을 3부위씩 총 6부위를 설정하여, 시험물질, 음성대조물질(생리식염수) 및 양성대조물질(8-Methoxypsoralen, 8-MOP, 0.1%)를 50 μl씩 균등하게 각각 양쪽 부위에 도포 한 후 좌측은 광차단하고 우측은 Ultraviolet A(UVA, 320~400 nm) 15 J/cm²로 광조사하여, 조사 후 24, 48, 72시간에 피부반응을 관찰하였다. 두께 22.5 mm glass filter를 사용하여 소량의 UVB영역은 차단하였으며, UV 조사영역과 비조사영역의 자극정도 차이(광독성지수, phototoxic index)를 계산하여, 0.5 이하를 광독성이 없는 물질로 판정하였다.

6) 광감작성시험

FDP에 대한 광감작성 시험을 군당 5마리의 수컷 Hartley Albino guinea pig(300~350 g)을 이용하여 Adjuvant-strip method(Gerberick and Cindy, 1989)에 의해 실시하였다. 피부1차 시험을 통해 시험물질(FDP)의 감작 농도는 10%, 야기농도는 1차자극을 전혀 나타내지 않는 농도인 1%(사용예정량로 결정하였다. 제모한 견상갑부위(2×2 cm²)에 FCA를 4군데 코너에 0.1 ml씩 피내주사하고 그 부위 피부를 striping한 후, 시험물질을 0.5 ml 씩 2×2 cm² 크기의 여과지에 적혀 2시간 동안 폐쇄도포 한 다음, 첩포제거후 UVA(320~400 nm) 10 J/cm²를 조사하여 감작시켰다. 이런 과정을 주 3회씩 2주에 걸쳐 총 6회 실시하였다. 최종감작 일로부터 10일 후에 다른 등부위를 제모하여(6×6 cm²) 좌우 2개소 위치에 각각 시험물질을 2시간 첩포 후, 왼쪽 부위만을 차광하여 UVA 10 J/cm² 를 조사(challenge)하고, 24, 48, 72시간째에 반응정도를 관찰하였다. 음성대조물질로는 생리식염수를 양성대조물질로는 chlorpromazine(감작농도 : 1%, 야기농도 : 0.1%)을 사용하였다. UV조사시 두께가 22.5 mm인 glass filter를 사용하여 소량의 UVB영역은 차단하였으며, UV 조사영역과 비조사영역의 자극정도 차이(광감작성지수, photo-allergic index)를 계산하여 0.5 이하를 광감작성이 없는 물질로 판정하였다.

7) 인체첩포시험(Human patch Test)

피부관련 질병이 없는 21~39세의 건강한 성인 30명(남자 5명, 여자 25명)을 대상으로 「기능성화장품등의심사에 관한규정」(식품의약품안전청 고시 제2001-60) 및 CTFA Guideline에 따라 피부1차자극시험을 실시하였다. 첩포는 피검자의 좌측 전박부 내측에 부착하였으며, 20 μl의 시험물질 용액(10%)을 각각 마이크로 피펫으로 여과지에 흡수 시킨 후 IQ chamber(Chemotech- nique Diagnostics AB, Sweden)를 이용하여 24시간 동안 폐쇄첩포하였다. 첩포 전과 첩포 제거 1시간 및 24시간 후에 피부의 자극 반응을 관찰하여 홍반(erythema)과 부종(edema)의 정도를 판정하였으며, 총 자극도의 평균 값을 구하였다.

4. 통계학적 분석

단회투여독성시험의 경우, 최고용량 1개 군만으로 실험하였기 때문에 probit법에 의한 LD₅₀ 산출은 행하지 않았다. 대조군과 시험군간의 체중변화에 있어서는 student's t-test를 이용하여 유의성 여부를 검사하였다(data not shown).

III. 결 과

1. 단회투여 독성

시험기간 동안 시험물질에 기인된 체중변화, 임상증상, 폐사 및 육안적 부검소견의 이상변화가 전혀 관찰되지 않아(data not shown), FDP의 LD₅₀는 2 g/kg 이상으로 생각되었다.

2. 피부1차자극시험

시험기간 동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질 처치군의 적용부위에서 가벼운 홍반이 관찰되어 피부1차 자극지수(P.I.)가 0.33으로 산정되었으나(Table 1), 이는 무자극 범위에 속하는 수치였다.

3. 안점막 자극시험

시험기간 동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질의 적용부위에서 비세안(non-washing)군의 경우 1시간째에 몇몇 동물에서 결막 혈관의 약한 충혈이 관찰되었으나 점점 약해져서 48시간 이후에는 아무런 증상도 관찰되지 않았다. 세안(washing)군은 1마리에서 1시간째에만 약한 결막 발적이 관찰되었다. 이로써 비세안군 및 세안군의

Table 1. Results of primary skin irritation test

Sites treated with test compound (FDP)									
Application site	Intact				Abrasion				
Reaction type	Erythema and eschar formation ¹⁾		Edema formation ²⁾		Erythema and eschar formation		Edema formation		
Hrs after application	24	72	24	72	24	72	24	72	
Animal No.									
M1	0	0	0	0	1	0	0	0	
M2	0	0	0	0	1	1	0	0	
M3	1	0	0	0	1	0	0	0	
M4	1	0	0	0	0	0	0	0	
M5	0	0	0	0	1	1	0	0	
M6	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total score	2	0	0	0	4	2	0	0	
P.I.I.*	0.33								
Sites treated with vehicle (Saline)									
Application site	Intact				Abrasion				
Reaction type	Erythema and eschar formation		Edema formation		Erythema and eschar formation		Edema formation		
Hrs after application	24	72	24	72	24	72	24	72	
Animal No.									
M1	0	0	0	0	0	0	0	0	
M2	0	0	0	0	0	0	0	0	
M3	0	0	0	0	0	0	0	0	
M4	0	0	0	0	0	0	0	0	
M5	0	0	0	0	0	0	0	0	
M6	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total score	0	0	0	0	0	0	0	0	
P.I.I.*	0								

Grade of Erythema and Eschar formation¹⁾; 0 (No erythema), 1 (Very slight erythema), 2 (Well-defined erythema), 3 (Moderate to severe erythema), 4 (Severe erythema or eschar formation).

Grade of Edema²⁾; 0 (No edema), 1 (Very slight edema), 2 (slight edema), 3 (Moderate edema), 4 (Severe edema).

*P.I.I. : Primary irritation index, Σ Total Score/(Animal No. \times 4).

Acute Ocular Irritation Index(A.O.I.)값은 1시간째의 Mean Ocular Irritation Index(M.O.I.) 값인 1.33 및 0.67로 각각 산출되었으나(Table 2), 모두 무자극 범위에 해당되었다.

4. 피부감작성시험(GPMT)

시험기간 동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 피부감작성 시험결과 시험물질 및 대조물질 처치군의 경우 모든 동물에서 흥반, 가피, 부종 등의 증상이 전혀 관찰되지 않았다(Table 3). 양성대조군(DNCB)에서는 모든 동물에서 24, 48, 72시간에 명백한 흥반(양성율 : 100%)이 관찰되었다.

5. 광독성시험

시험기간 동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상,

폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질인 FDP(10%) 처치군의 경우, UVA 조사 및 비조사 구역의 자극지수가 모두 0으로 나타나 광독성을 일으키지 않는 물질로 평가되었다(Table 4). 양성대조물질인 0.1% 8-MOP는 광독성 지수가 2.0으로 계산되어, mildly phototoxic한 물질로 평가되었다.

6. 광감작성시험

시험기간 동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질인 FDP(10%)의 광감작성 시험결과, UVA 조사 및 비조사구역의 자극지수가 모두 0으로 나타나 광감작성을 일으키지 않는 물질로 평가되었다(Table 5). 양성대조물질인 chlorpromazine(0.1%)은 자극지수가 1.8로 계산되어, mildly photoallergen으로 평가되었다.

Table 2. Results of eye irritation test

Animal no.	Time after treatment						A.O.I. ^{b)}
	1 hr	24 hrs	48 hrs	72 hrs	4 days	7 days	
Non-washing							
M1	2*	2	0	0	0	0	
M2	2	2	0	0	0	0	
M3	0	0	0	0	0	0	
M4	0	0	0	0	0	0	
M5	2	0	0	0	0	0	
M6	2	2	0	0	0	0	
Average score (M.O.I.) ^{a)}	1.33	1.0	0	0	0	0	1.33
Washing							
M7	0	0	0	0	0	0	
M8	0	0	0	0	0	0	
M9	2	0	0	0	0	0	
Average score (M.O.I.)	0.67	0	0	0	0	0	0.67

*Total score = (Cornea opacity × area of cornea involved × 5) + (Iris lesion × 5) + (Conjunctiva redness + chemosis + exudates) × 2.

^{a)}M.O.I. (Mean ocular irritation index) : total score/tested animal No. in each observation time.

^{b)}A.O.I. (Acute ocular irritation index) : maximum among M.O.I. (0~5, non irritant; 5~15, minimally irritant; 15~30, mildly irritant; 30~60, moderately irritant; 60~80, severely irritant; 80~100, extremely irritant).

7. 인체첨포시험(Human patch Test)

30명 중 3명에서 FDP 10%를 처치 부위에서 첨포제거 1시간 후에 미약한 홍반이 관찰되었으나, 24시간 후에 바로 소멸되었다(Table 6).

Table 3. Results of guinea pig maximization test

Test compound	Induction conc. (%)	Challenge conc. (%)	Positive response (%)* by the 1st challenge			Positive response (%)* by the 2nd challenge		
			24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
FDP	10	1	0	0	0	0	0	0
DNCB (Positive Control)	0.1	0.1	100	100	100	100	100	100
Saline (Negative Control)	-	FDP (1%)	0	0	0	0	0	0
		Saline	0	0	0	0	0	0

*Grade I (0~8%), weak sensitizer; Grade II (9~28%), mild sensitizer; Grade III (29~64), moderate sensitizer; Grade IV (65~80%), strong sensitizer; Grade V (81~100%), extreme sensitizer; Estimated allergen showed above 29% of positive response.

Table 4. Evaluation of phototoxic test

Test compound	No. of animal	Irritation Index ^{a)}		Phototoxic index ^{b)}	Evaluation
		Non-irradiation site	UV-irradiation site		
FDP	5	(0 + 0)/5	(0 + 0)/5	0	Non-phototoxic
Saline (Negative control)	5	(0 + 0)/5	(0 + 0)/5	0	Non-phototoxic
8-MOP (Positive control)	5	(0 + 0)/5	(10 + 0)/5	2.0	Mildly-phototoxic

^{a)}Irritation Index = (ΣMax. score of erythema and eschar + ΣMax. score of edema)/No. of animals.

^{b)}Phototoxic Index = Irritation index of UV irradiation site - Irritation index of non irradiation site (0, non phototoxic; 0.1~0.5, practically non phototoxic; 0.6~1.5, minimally phototoxic; 1.6~3.0, mildly phototoxic; 3.1~5.0, moderately phototoxic; 5.1~6.5, severely phototoxic; 6.6~8.0, extremely phototoxic).

IV. 고 찰

FDP는 일반적으로 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 물질로 많은 보고가 되고 있다(Planas *et al.*, 1993; Oyanagui, 1998; Sun *et al.*, 1990).

FDP는 생체내 정상 pH에서 높은 전하를 띤 분자이므로, 일반적으로는 세포막을 쉽게 통과하지 못한다. 그렇지만, 평활근(vascular smooth muscle) 등에 외인성의 fructose 대사산물은 관찰되지 않고, FDP만 약간 관찰되는 점을 볼 때, FDP는 세포로 이동할 수 있는 것으로 생각된다(Hardin and Roberts, 1995; Tavazzi *et al.*, 1992). 또한 FDP는 인공적인 지질이중층(artificial lipid bilayers)을 용량상관적으로 통과할 수 있다(Ehringer *et al.*, 2000). 게다가 최근엔 dicarboxylate transport system을 통해 세포내로 이동한다는 보고도 있다(Hardin *et al.*, 2001). 이 결과는 FDP가 세포내로 투과되어 독성을 일으킬 수도 있음을 시사하며, 피부에 적용될 경우에 대한 안전성 평가가 요구되어진다.

본 시험결과 FDP는 단회투여독성에서 LD₅₀ 값이 2 g/kg 이상으로 관찰되었으며, 피부1차자극시험(P.I.I. = 0.33) 및 안점막시험(Non-washing group A.O.I. = 1.33, Washing group A.O.I. = 0.67) 결과도 무자극 범위에 해당되었다. GPMT에 의한 피부감작성시험 결과에서도 전혀 알려지가 관찰되지 않았다. FDP에 대한 UV 흡광여부를 200~500 nm 사이에서 측정한 결과 300 nm 부근에서 아주 약한 peak가 관찰되어 광독성 시험 및 광감작성 시험도 실시하였다. 그러나 광독성 및 광감작성시험에서 FDP는 전혀 자극

Table 5. Evaluation of photosensitization test

Material	No. of animal	Irritation Index ^{a)}		Photoallergic index ^{b)}	Evaluation
		Non-irradiation site	UV-irradiation site		
FDP	5	(0 + 0)/5	(0 + 0)/5	0	Non-photoallergen
Saline (Negative control)	5	(0 + 0)/5	(0 + 0)/5	0	Non-photoallergen
Chlorpromazine (Positive control)	5	(0 + 0)/5	(9 + 0)/5	1.8	Photoallergen

^{a)}Irritation Index = (ΣMax. score of erythema and eschar + ΣMax. score of edema)/No. of animals.

^{b)}Photoallergic Index = Irritation index of UV irradiation site - Irritation index of non irradiation site (0, non photoallergic; 0.1~0.5, practically non photoallergic; 0.6~1.5, minimally photoallergic; 1.6~3.0, mildly photoallergic; 3.1~5.0, moderately photoallergic; 5.1~6.5, severely photoallergic; 6.6~8.0, extremely photoallergic).

Table 6. The results of human patch test (n = 30)

Test compound	24 hr				48 hr				Mean response index ^{a)} (%)
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	
FDP	3	-	-	-	-	-	-	-	1.25
Distilled water	1	-	-	-	-	-	-	-	0.42

^{a)}Mean response index = {Σ(Grade × No. of response) × 100} / {4 (Maximum grade) × 30 (No. of total subjects) × No. of reading}.

*Grade 0 (-), No visible reactions; Grade 1 (+), mild erythema; Grade 2 (++) , intense erythema; Grade 3 (+++) , intense erythema with edema; Grade 4 (++++), intense erythema with edema and vesicle.

을 나타내지 않았다. 인체를 대상으로 한 피부1차자극 시험에서 첩포제거 1시간 후에 몇몇 부위에서 약한 홍반이 관찰되었으나, 지속적이지 않는 일시적인 반응으로 판단되어 인체 피부1차자극 측면에서도 안전하다고 생각된다.

이상의 시험결과 FDP는 피부에 적용될 경우 요구되는 모든 안전성 시험에서 매우 안전하다고 판단되며, *in vitro* 및 *in vivo* 효능 시험에서 우수한 항산화 효과를 나타내는 1%의 농도에서 항산화 화장품 등의 원료로 적용 가능하리라 생각된다.

참고문헌

- Ben-yoseph, O., Boxer, P. and Ross, B. (1996): Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J. Neurochem.*, **66**, 2329-2337.
- CTFA Safety Testing Guideline: The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D.C. 20023, 1991.
- Draize, J. H. (1959): Appraisal of the Safety of Chemical in Foods, Drugs and Cosmetics, The Staff of the Division of Pharmacology, Food and Drug Education and Welfare, Pub.
- Edde, L., Zhou, X., Eaton, J.W. and Sherman, M.P. (1998): Induction of nitric oxide synthase in macrophages: inhibition by fructose-1,6-diphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 683-687.
- Ehringer, W.D., Niu, W., Chiang, B., Wang, O.L., Gordon, L. and Chien, S. (2000): Membrane permeability of fructose-1,6-diphosphate in lipid vesicles and endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **210**, 35-45.
- Espanol, M.T., Litt, L., Hasegawa, K., Chang, L., Macdonald, J.M., Gregory, G., James, T.L. and Chan, P.H. (1999): Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. *Anesthesiology*, **88**, 461-472.
- Gerberick, G.F. and Cindy A. (1989): Contact photoallergy testing of sunscreens in guinea pigs. *Contact Dermatitis*, **20**, 251-259.
- Guidelines for the testing of chemical substance (1992): OECD, Paris, France.
- Hardin, C.D. and Roberts, T.M. (1995): Compartmentation of glucose and fructose 1,6-bisphosphate metabolism in vascular smooth muscle. *Biochemistry*, **34**, 1323-1331.
- Hardin, C.D., Lazzarino, G., Taazzi, B., Di pierro, D., Roberts, T.M., Giardina, B. and Rovetto, M.J. (2001): Myocardial metabolism of exogenous FDP is consistent with transport by a dicarboxylate transporter. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**, H2654-H2660.
- Kelleher, J.A., Chan, P.H., Chan, T.Y.Y. and Gregory, G.A. (1995): Energy metabolism in hypoxic astrocytes: protective mechanism of fructose-1,6-bisphosphate. *Neurochem. Res.*, **20**, 785-792.
- Kelleher, J.A., Chan, T.Y.Y., Chan, P.H. and Gregory, G.A. (1996): Protection of astrocytes by fructose 1,6-bisphosphate and citrate ameliorates neuronal injury under hypoxic conditions. *Brain Res.*, **726**, 167-173.
- Lovell, W.W. and Sanders, D.J. (1992): Phototoxicity testing in guinea pig, *Food and Chemical Toxicology*, **30**, 155-160.
- Magnusson, B. and Kligman, A.M. (1969): The identification of Contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Inv. Derm.*, **52**, 268-276.
- Oyanagui, Y. (1998): Fructose-1,6-diphosphate enhanced oxyradicals and nitric oxide-dependent suppressions by dexamethasone of ischemic and histamine paw

- edema of mice. *Life Sci.*, **62**, 241-249.
- Planas, M.E., Sanchez, S., Gonzalez, P., Rodrigues, de O.J. and Bartrons, R. (1993): Protective effect of fructose 1,6-bisphosphate against carrageenan-induced inflammation, *Eur. J. Pharmacol.*, **237**, 251-255.
- Sola, A., Berrios, M., Sheldon, R.A., Ferreiro, D.M. and Gregory, G.A. (1996): Fructose 1,6-bisphosphate after hypoxic ischemic injury is protective to the neonatal rat brain. *Brain Res.*, **742**, 294-299.
- Sun, J., Farias, L.A. and Markov, A.K. (1990): Fructose 1,6 diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats, *Gastroenterology*, **98**, 117-126.
- Tadeuchi, K., Cao-danh, H., Friehs, I., Glynn, P., D'agostino, D., Simplaceanu, E., McGowan, F.X. and Del nido, P.J. (1998): Administration of fructose-1,6-diphosphate during early reperfusion significantly improves recovery of contractile function in the postischemic heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **116**, 335-343.
- Tavazzi, B., Stanes, J.W., Lazzarino, G., Di pierro, D., Nuutinen, E.M. and Giardina, B. (1992): Exogenous fructose-1,6-bisphosphate is a metabolizable substrate for the isolated normoxic rat heart. *Basic Res. Cardiol.*, **87**, 280-289.
- 「기능성화장품등의심사에관한규정」 식품의약품안전청 고시 제 2001-60호, 식품의약품안전청, 서울.
- 「의약품등의독성시험기준」 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호, 식품의약품안전청, 서울.