

In vivo에 의한 미색류 콘드로이틴황산의 기능성 화장품 소재로서의 가능성

김배환² · 안삼환³ · 최병대³ · 강석중³ · 김영림¹ · 이후장¹ · 오명주⁴ · 정태성^{1†}

¹경상대학교 수의과대학 동물의학연구소, ²태평양화학기술연구원

³경상대학교 해양생물이용학부/해양산업연구소, ⁴여수대학교 수산생명의학과

In Vivo Evaluation of Chondroitin Sulfates from Midduk (*Styela clava*) and Munggae Tunics (*Halocynthia roretzi*) as a Cosmetic Material

Bae-Hwan Kim², Sam-Hwan Ahn³, Byeong-Dae Choi³, Seok-Joong Kang³,
Yong-Lim Kim¹, Hu-Jang Lee¹, Myung-Joo Oh⁴ and Tae-Sung Jung^{1†}

¹Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Pharmaceutical & Health Research Institute, Pacific Corporation R&D Center,
Gyeonggi-Do 449-729, Korea

³Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

⁴Dept. of Aquatic Life Medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

Abstract

Crude chondroitin sulfates extracted from midduck tunics (*Styela clava*) and munggae tunics (*Halocynthia roretzi*) were examined *in vivo* in order to be utilized as a cosmetic material which was followed by an *in vitro* assay. Examinations, such as acute oral toxicity, skin sensitization, acute eye irritation, and primary skin irritation, were performed with a variety of laboratory animals. Phototoxic and photosensitization tests were not conducted since all chondroitin sulfates failed to absorb U.V. light at the range of 280 to 420 nm. In acute dermal and eye irritation, both specific clinical signs and dead cases were not demonstrated during the test period, but crude chondroitin sulfates from midduck and munggae tunics, and standard chondroitin sulfate from bovine trachea were showed 2.5, 1 and 1.25 of acute ocular irritation index (A.O.I.), respectively. In the case of skin sensitization, crude chondroitin sulfate from midduck tunics exhibited neither specific clinical signs nor dead cases in the entire course of the examination. While in acute oral toxicity, crude chondroitin sulfates from both midduck and munggae tunics found neither specific clinical signs nor dead cases during the test, and LD50 was suspected to be over 2 g/kg. Based on this study, it was proven that crude chondroitin sulfates from either midduck or munggae tunics can be used safely as a cosmetic material.

Key words: midduck, munggae, chondroitin sulfates, cosmetic material

서 론

최근 생활의 풍요와 과학기술의 발달은 어떻게 젊고 건강하게 나이를 먹어가는가 즉 성공적인 노화(aging)는 실현될 수 있는가라는 질문에 긍정적인 답의 가능성을 더해주고 있다. 또한 환경적인 요인의 악화나 사회의 다양화에 따른 소비자들의 화장품에 대한 욕구는 기능성 화장품의 세분화를 기술적으로 요구하고 있으며, 이와 같은 양상은 더욱 심화될 것으로 예측된다(1).

피부에서 collagen과 hyaluronic acid의 합성과 분해를 억제하고 있는 것은 주로 섬유아세포이다. Collagen이 합성되

면 생화학적, 물리화학적 안정성을 확보하기 위하여 생리적으로 결합하여(성숙가교) matrix로의 기능을 발휘한다. 그러나 안정한 상태에서는 대사회전이 늦어지는 특징을 나타낸다. Hyaluronic acid는 대조적으로 수명이 짧으며 피부에서의 양을 유지하기 위해서는 합성의 촉진이 이루어져야 한다. 피부 섬유아세포에서의 분해는 histamine에 의하여 촉진되는 한편 heparipine으로 억제되는 것이 발견되어 이 기작의 일부가 밝혀지기도 하였다(2).

Glycosaminoglycans(GAGs)은 아미노당을 함유한 다당류, mucopolysaccharides, disaccharides가 반복된 구조로 성분중 하나는 아미노당(N-acetyl-glucosamine이나 N-

*Corresponding author. E-mail: jungts@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5822, Fax: 82-55-751-5803

acetyl-galactosamine)으로 구성되어 GAGs라 불리운다. 이 GAGs를 구성하는 성분중에는 chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, heparin, hyaluronic acid 등이 있다. Chondroitin sulfate는 hexouronic acid가 ester 결합한 sulfated polysaccharides로서 chondroitin sulfate A, B, C, D, E 등의 구조가 있으며 인간과 동물의 조직 내에 푸넓게 존재 한다(3). 대부분 이들 GAGs들이 음전하로 하전되면 수분을 끌어당기는 힘이 생겨 보습효과 및 점성을 나타내어 윤활제로서의 이상적인 역할을 하게되므로 이와 같은 특성을 응용하여 기능성 화장품 원료로 사용되게 된다.

GAGs의 원료로 상어연골(4), 포유동물의 각막(5), 관절(6), 부신피질(7) 등이 이용되어지고 있었으나, 상어는 멸종 위기로 인한 포획금지, 포유동물은 광우병 확산에 따른 자원 확보가 어려운 실정이다. 이러한 자원 문제의 해결을 위해서는 새로운 원료탐색과 새로운 원료로부터 GAGs를 추출정제하는 기술개발이 뒤따라야 한다. 미더덕은 무척추동물 미색류에 속하는 부착생물로 80년대 중반 이후 본격적인 양식으로 어민들의 소득증대에 기여하고 있다. 거제, 통영, 고성을 중심으로 양식되고 있으며 연중 4월부터 7월 사이에 가장 많은 생산량을 보이며 2001년에는 약 15,000 ton이 생산되었지만, 생산량 증가에 따른 미더덕 껌질의 처리에 따른 많은 어려움을 겪고 있다. 폐기되는 미더덕 껌질로부터 GAGs를 추출 할 수 있다면 원료수급에 따른 문제점을 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 껌질 폐기에 따른 환경오염을 줄일 수 있다.

미더덕(*Styela clava*) 및 멍게(*Halocynthia roretzi*)의 crude 추출물에 다양으로 포함되어 있는 콘드로이틴 황산에 대한 화장품 원료로서 가능성에 대하여 세포주를 이용한 *in vitro* 실험한 결과 기능성 화장품으로서의 가능성을 발견하였다. 이를 바탕으로 실제로 사용할 경우 발생할 수 있는 독성에 대하여 *in vivo* 독성검사를 실시하였다. *In vivo* 실험으로는 ICR 마우스를 이용한 단회투여독성, White rabbit을 이용한 피부1차자극시험, 숫 토끼에 대한 안점막 자극시험, Guinea pig를 사용한 피부감작성시험, 광독성 및 광감작성을 위한 UV 흡광실험 등을 실시하여 멍게 및 미더덕으로 추출한 crude 콘드로이틴 황산의 생체에 대한 독성 유무를 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

콘드로이틴황산의 추출

깨끗이 세척한 미더덕 및 멍게 껌질 1000 g씩 취하여 약 10배량의 중류수를 가하고, 105°C에서 3시간 가열하여 얻어진 추출액을 농축한 다음(Brix 9~11), 5.0% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 하룻밤 방치하여 단백질을 제거하였다. 95% ethanol 3배량으로 3회 반복하여 탈색하고 원심분리(10,000 rpm, 20분)하여 침전물을 얻은 다음 동결건조하였다. 얻어진 GAGs 중에 함유된 콘드로이틴황산의 함량은 황

산바륨법(8)으로 정량한 결과 추출물을 콘드로이틴황산이 60% 함유된 원재료로 설정하고 실험에 사용하였으며(9), positive control로서 사용한 bovine chondroitin sulfate는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물에 적용시 콘드로이틴황산의 희석은 생리식염수를 사용하였다.

실험동물의 사육조건

본 시험에 사용한 동물(마우스, 토끼 및 기니피)등을 Samtako Bio Korea에서 구입하였다. 사육실의 사육조건은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 50 ± 10 , 환기회수 15회/hr, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(08:00~20:00)으로 유지되도록 조정하였다. 전 시험기간 동안 사료(Purina Korea Co.)와 음수는 자유 급식시켰으며, 사료의 오염성적서는 공급처로부터 입수시에 받았고, 음수의 오염성적서는 연 2회씩 정기적으로 경기도 보건환경연구원에 의뢰하여, 시험에 영향을 줄 오염원이 없음을 확인하였다. 모든 실험동물은 시험전 1주간 검역기간을 거쳐 건강한 동물만 실험에 사용하였다.

콘드로이틴황산에 대한 *in vivo* 시험방법

시험에 사용된 모든 시험방법은 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약안전청 고시 제 1999-61호)(10), 「기능성화장품등의 심사에 관한 규정」(식품의약안전청 고시 제 2001-60호)(11)과 Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA)(12) 및 OECD guideline(13)에 따라 실시하였다.

단회투여독성

예비시험결과 독성이 나타나지 않아 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2 g/kg 투여군만 설정하였으며, 암수 각각 5마리의 ICR마우스(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 동물을 부검하여 병리조직학적 이상소견을 관찰하였다.

피부 1차 자극시험

24시간 전에 제모한 6마리의 New Zealand White rabbit(2.0~2.5 kg)를 이용하여 각 동물의 등 부위를 약 2.2 cm × 2.5 cm 정도의 크기로 칙추를 중심으로 비찰과 피부 2개소와 찰과 피부 2개소를 선택하여 좌측 구획은 대조물질(생리식염수), 우측에는 시험물질 10%(사용 예정량의 10배 농도로 선정)를 각각 0.5 mL씩 흥반과 가피형성, 부종형성등의 자극성 유무를 관찰하여 「의약품등의 독성시험기준」에 따라 판정하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize(14)의 P.I.I.(Primary Irritation Index)의 산출방법에 따랐다.

안점막 자극시험

안검사를 통해 안구 손상 등 각막의 손상이 없는 수컷토끼(2~2.5 kg) 9마리를 이용하여 좌측 눈은 대조로, 우측 눈에

Table 1. LD₅₀ of chondroitin sulfates acute oral toxicity in ICR mouse

Test group	Vehicle	Dose level (g/kg)	Sex of animal	Mortality	LD ₅₀ (g/kg)
Midduck CS ¹⁾	Saline	2.0	Male	0/5	Over 2.0
			Female	0/5	Over 2.0
Munggae CS	Saline	2.0	Male	0/5	Over 2.0
			Female	0/5	Over 2.0

¹⁾CS: chondroitin sulfate.

는 시험물질 10%를 각각 0.1 mL씩 접안하였다. 그 중 3마리는 20~30초 후에 미온 생리식염수를 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 정동 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 안점막 반응의 자극 평가는 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약안전청 고시 제 1999-61호)상의 앙구병변의 등급을 이용하여 판정하였고, 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 사용되는 Draize(14)의 앙구자극 구분표를 따랐다.

피부 감작성 시험

피부감작성 여부는 군당 암수 10마리의 Hartly Albino guinea pig(250~300 g)을 이용하여 GPMT(Guinea Pig Maximization Test)법에 따라 실시하였다(15). 피부1차 시험을 통해 감작(induction)농도는 10%, 유발(challenge)농도는 1차자극을 전혀 나타내지 않는 농도인 1%(사용 예정량)로 결정하였다. 1차 감작은 제모된 기니픽의 견갑 간부에 시험물지, Freund's complete adjuvant(FCA) 및 FCA와 시험물질혼합물을 2열로 0.1 mL씩 피내주사하였다. 7일 후 2차 감작은 동일부위를 제모한 후 10% sodium lauryl sulfate(SLS)를 전처치한 후 24시간 후에 시험물질을 0.5 mL/site 도포하고 가아제로 덮은 뒤 비자극성 테이프로 고정하여 48시간 동안 폐쇄침포하였다. 첨포 2주 후 감작부위와 다른 등부위를 제모한 후 시험물질을 24시간 동안 폐쇄침포(challenge)하여 첨포 제거 후 24, 48, 72시간째에 홍반과 가피형성, 부종형성 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 관찰결과 양성율이 29% 이상인 경우 sensitizer로 판정하였다. 양성대조군으로는 DNCB(1-chloro-2,4-dinitrobenzen) 0.1%를 사용하였으며, 음성대조군은 용매인 생리식염수를 쳐치하였다.

광독성 및 광감작성을 위한 UV 흡광실험

자외선영역(280~420 nm)에서 흡수가 없을 경우, 광독성 및 광감작성 시험을 시행하지 않는다.

결과 및 고찰

경구독성시험(oral toxicity)

개정된 TG420(Test guideline) 시험법에 의하면 시험물질에 관한 내용에는 시험물질의 성질, 순도, 물리화학적 특성(이성체 포함), CAS 번호 등의 확인자료와 물을 부형제로 사

용하지 않을 경우, 적용한 부형제 선택의 정당성에 관한 내용이 포함되도록 되어 있다(13). 콘드로이틴황산[CAS No. 39455-18-0, (C₁₄H₁₉NO₁₄S)n]은 거대분자의 다당으로 시험법에 관련된 정보가 적어 이에 대한 자료를 구하고자 ICR mouse를 이용하여 기본사항을 기준으로 하여 경구독성시험을 행하였다(Table 1). 미더덕 및 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산 2 g/kg을 수컷 및 암컷 각각 5마리에 14일 동안 급이 하면서 체중변화 등 증상을 관찰하였으나 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물은 없었다. Chung과 Yu(16)는 개정전과 개정된 경구독성 시험법을 비교 분석한 결과 독성이 낮을 것으로 예측되는 물질의 경우 2,000 mg/kg 농도에서 독성을 나타내지 않으면 시험물질에 의한 영향은 거의 없는 것으로 판정하여도 된다고 하였으므로 미더덕 및 멍게로부처 추출된 콘드로이틴황산의 LD₅₀은 2 g/kg 이상으로서 판명되었다.

감작성시험(maximization test)

기니픽을 이용한 감작성시험은 미더덕 유래 crude 콘드로이틴황산과 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 양성대조군으로 하여 guinea pig를 상대로 실시하였다(Table 2). 실험기간 중 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물은 없었다. 감작성 실험은 0.03%, 0.15% 및 0.3%의 세군으로 나누어서 실시하였으며, 0.03% 및 0.15% 농도에서는 반응을 나타낸 개체가 없었으나, 양성대조군은 24 및 48시간 후 100%의 반응을 나타내었다. 그리고 0.3% 농도에서는 24시간 후 10%, 48시간 후에는 5%의 반응율을 나타내었다. 양성반응의 판정은 0~8% 범위는 grade I, 9~28%는 grade II, 29~64%는 grade III, 65~85%는 grade IV, 86~100%는 grade V로 구분하였다.

안점막 자극시험(acute ocular irritation reaction)

토끼를 이용한 안점막 자극시험(Table 3)에서는 실험기

Table 2. Maximization of chondroitin sulfates in guinea pig

Test group	Concentration (%)	Positive reaction (%)	
		24 hrs	48 hrs
Midduck CS ¹⁾	0.30	10 (2/10)	5 (1/20)
	0.15	0 (0/20)	0 (0/20)
DNCB ²⁾	0.03	0 (0/20)	0 (0/20)
	0.10	100 (20/20)	100 (20/20)

¹⁾CS: chondroitin sulfate.

²⁾DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. Grade I (0~8%), weak sensitizer; Grade II (9~28%), mild sensitizer; Grade III (29~64%), moderate sensitizer; Grade IV (65~85%), strong sensitizer; Grade V (86~100%), extreme sensitizer.

Table 3. Acute ocular irritation reaction to chondroitin sulfates in New Zealand white rabbit

Test group	Concentration (%)	M.O.I. (NW/W) ¹⁾				A.O.I. ²⁾
		1 hr	24 hrs	48 hrs	72 hrs	
Midduck CS ³⁾	3.0	0.5/2.0	0.75/2.5	0.25/2.0	0.75/0	2.5
Munggae CS	3.0	0.25/2.5	0.25/2.0	0.25/0.5	0.5/1.0	1.0
Bovine trachea CS	3.0	1.0/1.0	1.25/0	0.5/0.5	0.75/0.5	1.25

¹⁾M.O.I. (mean ocular irritation index): total score/tested animal No. in each observation time.²⁾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).³⁾CS: chondroitin sulfate.

간 중 특이한 임상증상을 보이거나 사망한 동물은 없었으며, 미더덕과 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산 및 표품 콘드로이틴황산(Sigma Chemical Co.) 3.0% 적용시 acute ocular irritation index(A.O.I.)는 2.5, 1 그리고 1.25로 practically non irritating을 나타냈다.

피부자극시험(primary skin irritation test)

미더덕 및 멍게로부터 추출한 콘드로이틴황산과 표품 콘드로이틴황산을 토끼의 피부에 투여하여 홍반, 가피 형성에 미치는 영향을 관찰하였다(Table 4). 시험물질을 3.0% 및 1.5%를 도포한 후 24, 72시간 후 비찰과부위와 찰과부위 모두에서 자극현상 및 부종에 미치는 영향을 관찰할 수 없었다. 그러나 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산에서는 미약하게 보이던 피부반응이 미더덕 유래 crude 콘드로이틴황산에서는 3.0% 적용에서 다소 강한 반응을 보였다. Bae 등(17)은 양파로부터 추출한 천연염료의 피부자극 시험을 관찰한 결과 찰과부위에서 지용성 추출물의 경우 빠른 상처치유 효과를 나타내기도 하였다고 하였으나, 수용성 물질인 본 시험결과에서는 상처치유 효과는 나타나지 않았다.

광독성 및 광감작성 시험(light toxicity and sensitization test)

광독성 및 광감작성을 위한 UV 흡광 실험결과(Table 5) 미더덕 및 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산과 대조군으로서 사용한 표품 콘드로이틴황산 모두 자외선영역(280~420 nm)에서 흡광을 보이지 않아서 광독성 및 광감작성 시험을 시행하지 않았다.

Table 4. Primary skin irritation test in New Zealand white rabbit fressed dermally with chondroitin sulfates

Test group	Concentration (%)	P.I.I. ¹⁾
Midduck CS ²⁾	3.0	0.44
	1.5	0.25
Munggae CS	3.0	0.31
	1.5	0.06
Bovine trachea CS	3.0	0.19

¹⁾P.I.I. (primary irritation index, Σ total score/(animal No. \times 4)): 0~1.5, non irritant; 0.6~2.0, mildly irritant; 2.1~5.0, moderately irritant; over 5.1, severely irritant.²⁾CS: chondroitin sulfate.

Table 5. Evaluation of phototoxic and photosensitization with chonfrtoin sulfates

Test group	Concentration (mg/100 mL D.W.)	Results
Midduck CS ¹⁾	3.0	No absorbance
Munggae CS	3.0	No absorbance
Bovine trachea CS	3.0	No absorbance

¹⁾CS: chondroitin sulfate.

요 약

단회경구독성시험에서 미더덕 및 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산의 LD₅₀는 2 g/kg 이상으로서 판명되어, 단회경구독성 측면에서는 안전한 원료로 판단되었다. 비록 기니피을 이용한 감작성시험은 미더덕 유래 crude 콘드로이틴황산만을 사용하여 실시하였고, 시험 농도는 GAGs의 임상 사용 예정량이 0.03~0.15%임을 고려하여 induction 농도는 임상사용 예정량의 10배인 3.0%, challenge 적용 농도를 0.3% 이하로 잠정 설정하여 3.0%, 0.3%, 0.03% 농도에서 실시하였다. 그 결과 0.03% 및 0.15% 농도에서는 반응을 나타낸 개체가 없었으나, 양성대조군과 비교할 때 0.3% 농도에서는 24시간 후에는 10% 그리고 48시간 후에는 5%의 반응율을 나타냈지만 사용가능범위에 해당되어 미더덕의 GAGs은 감작성 측면에서 안전성이 높은 원료로 0.3%이하 농도에서는 사용 가능하다고 판단되었다. 토끼를 이용한 안점막 자극시험에서는 미더덕과 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산 및 bovine trachea 콘드로이틴황산의 3.0% 적용시 모두 A.O.I.가 기준치 이하로 나타나 실제 사용시 눈에 자극성이 없음이 판명되었다. 토끼를 이용한 피부일차자극 시험에서는 미더덕 및 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산을 3.0% 및 1.5%는 무자극을 보였지만, 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산에서는 미약하게 보이던 피부반응이 미더덕 유래 crude 콘드로이틴황산에서는 3.0% 적용에서 다소 강한 반응을 보였다. 광독성 및 광감작성을 위한 UV 흡광 실험결과 미더덕 및 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산과 대조군으로서 사용한 표품 콘드로이틴황산 모두 자외선영역(280~420 nm)에서 흡광을 보이지 않아서 광독성 및 광감작성 시험을 시행하지 않았다. 실험동물을 사용하여 조사한 결과 화장품 원료로서의 미더덕 및 멍게 유래 crude 콘드로이틴황산은 3.0% 이내에서는 사용이 안전함이

증명되었고, 명계가 미더덕 유래의 콘드로이틴황산에 비교하여 생체반응에 나은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 벤처 및 중소기업기술개발지원(과제번호 02-PJ1-PG11-VN02-SV05-001)으로 수행된 과제의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 현

1. Cho WG. 1998. Cosmeceuticals in skin care. *J Soc Cosm Sci Korea* 24: 40-79.
2. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. 1997. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* 272: 13997-14000.
3. Volk E. 2003. Connective tissue Part 4: Glycosaminoglycans. //www.thinkmuscle.com/article/volk/connective04.htm.
4. Holger JM, Torben MP, Damsgaard TE, Poulsen JH. 1995. Demonstration of immunogenic keratan sulphate in commercial chondroitin 6-sulphate from shark cartilage. Implications for ELISA assays. *Clinica Chimica Acta* 236: 195-204.
5. Inge A, Heinegard D. 1975. Fractionation of proteoglycans from bovine corneal stroma. *Biochem J* 145: 491-500.
6. Shannon EM, Illic MZ, Handley CJ. 2002. Highly sulfated glycosaminoglycans inhibit aggrecanase degradation of aggrecan by bovine articular cartilage explant cultures. *Matrix Biology* 21: 429-440.
7. Feige JJ, Pirollet F, Polak B, Chambaz EM. 1982. Control of glycosaminoglycan metabolism by ACTH in bovine adrenocortical cells in primary culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* 28: 645-655.
8. Dodgson KS. 1961. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem J* 78: 312-319.
9. Ahn SH, Jung SH, Kang SJ, Jeong TS, Choi BD. 2003. Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 180-185.
10. Appraisal of the Safety of Drugs, Notice No. 1999-61, Korea Food & Drug Administration. Seoul.
11. Appraisal of the Safety of Functional Cosmetics, Notice No. 2001-60, Korea Food & Drug Administration. Seoul.
12. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association. 1991. *CTFA Safety Testing Guideline*. Washington, DC.
13. OECD guideline for testing of chemicals. 1987. Guideline 401, 404, 405, 406.
14. Draize JH. 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.
15. Magnusson B, Kligman AM. 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Inv Derm* 52: 268-276.
16. Chung YH, Yu IJ. 2001. Review of newly adopted OECD acute oral toxicity test guideline 420. *J Toxicol Pub Health* 17: 195-201.
17. Bae SE, Oh TK, Park SC. 1997. Skin irritation of natural dyes extracted from onion (*Allium cepa*). *Korean J Toxicol* 13: 161-165.

(2003년 9월 5일 접수; 2004년 2월 25일 채택)