

종대황추출물의 항자극 효과

김성우[†] · 김형배 · 이건국

코리아나화장품 송파 기술연구소
(2006년 11월 16일 접수, 2006년 11월 27일 채택)

Anti-irritation Effects of *Rheum undulatum* L. Extract

Sung Woo Kim[†], Hyeong Bae Kim, and Kun Kook Lee

Coreana Cosmetics SongPa R&D center, 204-1, Jeongchon-ri, Seonggeo-eup, Cheonan-si, Chungnam 330-833, Korea
(Received November 16, 2006; Accepted November 27, 2006)

요약 본 연구에서는 화장품에 빈번히 사용되고 있는 다양한 자극원에 대한 종대황추출물의 자극 완화효과를 알아보기 위한 연구에 관한 것이다. 종대황추출물의 각질형성세포에서의 항염증 효과를 조사하기 위하여, 배양된 인간 각질형성세포에서 분비되는 사이토카인인 IL-8과 TNF α 의 양을 측정하였다. 그 결과 종대황추출물은 농도 의존적으로 상기 사이토카인의 분비를 억제하였다. 사람 피부에서 3 mM methyl nicotinate에 의해 유발된 자극성 피부염의 항염증 효과를 평가한 결과, 종대황 추출물이 함유된 제품의 도포 부위에서 홍반이 유의하게 감소하였다. 인체접촉시험에서는 5.0% 락틱산이 함유된 제형에 종대황추출물을 첨가할 경우 우수한 자극 억제 효과를 보여주었다. 또한 사용성 시험을 실시한 결과, 종대황추출물을 함유한 O/W 에멀전에서 우수한 항자극 효과를 보임을 확인하였다.

Abstract: The aim of this study is to assess the anti-irritation activities of *Rheum undulatum* L. extract against various irritants. In order to investigate the anti-inflammation effects of *Rheum undulatum* L. extract on keratinocytes, we measured the quantities of interleukin 8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF α) secreted by cultured human keratinocytes. As the results, *Rheum undulatum* L. extract inhibited the secretion of these cytokines dosage-dependently. We also investigated the anti-inflammation effects of *Rheum undulatum* L. extract against irritant skin reactions induced by 3 mM Methyl nicotinate. The flush was significantly decreased by application of O/W emulsion containing *Rheum undulatum* L. extract. In the primary irritation test, when *Rheum undulatum* L. extract was included in O/W emulsion containing 5.0% lactic acid, its considerable anti-irritation effect was revealed. In an in-use test, we confirmed the excellent anti-irritation effect of O/W emulsion containing *Rheum undulatum* L. extract.

Keywords: *Rheum undulatum* L., anti-irritation, cosmetics, IL-8, TNF α

1. 서 론

최근, 민감성 피부가 증가함에 따라 화장품의 안전성이 매우 중요시 되고 있다. 1980년대부터 일본 여성을 대상으로 실시한 자신의 피부가 민감성 피부라고 생각하고 있는지 여부에 대한 양케이트 조사 결과에 의하면, 민감성 피부라고 인식하고 있는 여성의 비율이 1980년대에는 약 20%에 머물던 것이 1992년 조사에서는 약 33%, 1998년 조사에서는 약 43%, 2002년에는 50% 이상의 여성이 자신의 피부가 민감성 피부라고 인식하고 있는 것으로

집계되었다. 자신의 피부가 민감성이라고 인식하고 있는 대상자들에게 그 이유를 조사하여 본 결과, 화장품을 바꿀 때의 위화감, 화장품 사용 시 피부 트러블 경험 등과 같이 화장품 사용에 따른 부작용을 호소한 경우가 매우 높은 비율을 차지하였다[1]. 이와 같은 이유로 화장품 제조사들은 저자극 화장품 개발을 위해 낮은 자극의 원료 사용 및 배합 농도 결정, 다양한 자극 완화제 첨가 등의 방법을 이용하고 있다. 따라서 본 연구자들은 저자극성 화장품 개발에 이용 가치가 높은 자극완화제를 개발하고자 하였다.

염증반응은 생체 조직이나 세포가 외인적 또는 내인적 요인에 의해 손상을 받았을 때 이를 원상태로 회복시키

[†] 주 저자 (e-mail: 1@corena.co.kr)

Table 1. Formulas Used in This Experiments

Raw materials	Dosage (% w/w)							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Caprylic/Capric triglyceride	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Mineral oil	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Cetearyl alcohol & Cetearyl glucoside	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Glyceryl stearate & PEG-100 stearate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Polyacrylamide & C13-14 isoparaffin & laureth-7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Sodium lactate (60.0%)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Lactic acid	-	-	-	-	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Rheum undulatum</i> L. extract	-	1.0	2.0	5.0	1.0	2.0	5.0	-
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

려는 일련의 방어 목적으로 나타나는 것으로, 통증, 부종, 발적, 발열 등을 수반하게 된다[2]. 최근, 화장품 개발에 있어 피부 안전성 및 안정성이 우수하며 다양한 요인으로부터 피부를 보호해줄 수 있는 항염증 효과를 지닌 자극완화 소재의 중요성이 날로 높아지고 있어 우수한 효과의 자극완화 소재의 개발이 크게 요구되고 있다.

마디풀과(polygonaceae)의 종대황(*Rheum undulatum* L.)은 시베리아가 원산지이고 한국, 중국 및 일본에서 재배한다[3]. 대황은 담즙(膽汁) 및 체액(體液)의 분비를 약간 항진시키고, 약한 이뇨작용이 있으며[4], 한방에서는 사하약, 고혈압용약, 해열소염진통제, 피부질환용약 등에 배합하고 있다[3].

본 연구에서는 종대황추출물의 자극완화 효과를 시험하여 자극완화제로서의 이용 가능성을 검토하였으며, 다양한 시험에서 종대황추출물의 자극완화 효과가 검증되었다.

2. 실험 방법

2.1. 실험재료 및 기기

종대황은 서울경동시장 약재 구입상가에서 구입하였다. trypsin/EDTA, penicillin/streptomycin, Dulbeccos modified Eagle's medium (DMEM) 등은 Gibco (USA)사 제품, human interleukin-8 EIA kit과 human TNF α sandwich ELISA kit은 Chemicon (USA)사 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 기기로서 ELISA reader는 Molecular devices (USA)사 제품, 색차계는 Minolta (Japan)사의 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 나머지 시약들은 Sigma (USA)사 제품을 사용하였다.

2.2. 종대황추출물의 조제

국내산 종대황을 정제수로 세척한 후 건조하고, 작은

조각으로 파쇄한 뒤, 여기에 그 건조 중량의 5배의 70% 에틸알코올을 첨가하였다. 실온에서 5일간 추출한 후 300 메쉬 여과포로 여과하고, 다시 와트만 5번 여과지로 여과한 후, 회전 감압 증발기로 건조하였다. 건조된 녹두추출 파우더를 50% 1,3-부틸렌 글리콜에 용해하여 본 실험에 사용하였다.

2.3. 세포배양

각질형성세포(HaCaT, keratinocyte)는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였고, 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 DMEM, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.4. 과산화수소에 의해 유도된 염증관련 사이토카인(IL-8, TNF- α)의 발현 저해 효과

각질형성세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well의 밀도로 분주하고, 종대황추출물이 포함된 DMEM 배지로 교체하여 1 h 전처리 후, 자극원인 H₂O₂를 0.5 mM로 처리하여 24 h 배양한 후, 배양배지로 분비된 IL-8 또는 TNF- α 의 양을 Chemicon International사의 IL-8 EIA kit 또는 TNF- α sandwich ELISA kit을 사용하여 측정하였다.

2.5. 종대황추출물 함유 O/W 에멀전 제조

화장품에 빈번히 사용되고 있는 자극물질인 락틱산(lactic acid)과 종대황추출물을 함유하는 조성물을 제조하였다(Table 1). 5.0% 락틱산이 본 실험에서 자극원으로 사용되었으며, 1.0, 2.0, 5.0% 종대황추출물이 자극완화제로서 화장료 조성물에 적용되었다. #1은 negative control, #8은 자극원만을 포함하는 positive control이며, #2, #3, #4는 자극완화제만 포함하고, #5, #6, #7은 자극완화제와 자극원을 포함한다.

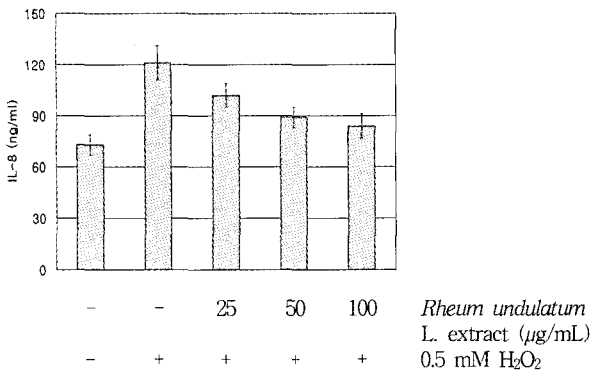


Figure 1. Inhibitory effects of *Rheum undulatum* L. extract on IL-8 release from human keratinocyte cells induced by H₂O₂.

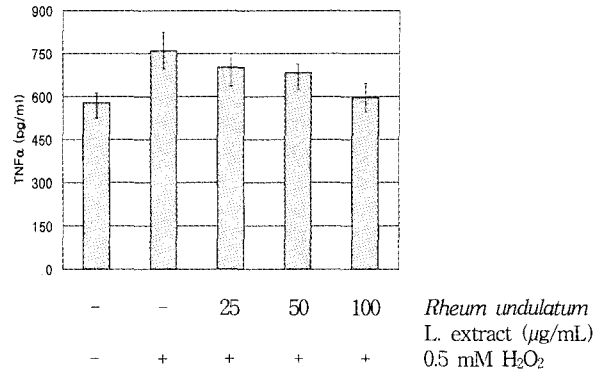


Figure 2. Inhibitory effects of *Rheum undulatum* L. extract on TNF- α release from human keratinocyte cells induced by H₂O₂.

2.6. 인체 피부시험 피험자

과거 알레르기성 질환이나 아토피 피부염 등 진황의 병력이 없는 건강한 성인 남녀를 대상으로 하였다. 검사 전 최소 일주일 동안 경구 부신피질 호르몬제나 항히스타민제, 항염제를 복용하지 않았으며, 검사부위에 국소 부신피질 호르몬제를 바르지 않았다. 20명의 피험자(남자 10명, 여자 10명)를 대상으로 실시되었으며, 연령분포는 21 ~ 35세, 평균 연령은 28세였다.

2.7. 인체 피부에서의 항염증 효과 시험

종대황추출물의 methyl nicotinate에 의해 유발되는 홍반의 억제 효과를 측정하였다. 전박을 70% 에틸알코올로 닦아내고 건조시킨 후, 종대황추출물을 함유한 O/W 에멀전을 시험 부위에 적용하였다. 20 min 후에 3 mM methyl nicotinate를 filter paper disc를 사용하여 10 µL 씩 시험부위에 적용하고 1 min 후 disc를 제거하였다. 피부 자극 완화 효과는 색차계를 이용하여 홍반 정도를 의미하는 a*값을 측정하였다. 피부 평가는 실내온도 23°C, 상대습도 55%의 항온항습 조건에서 측정하였다.

2.8. 인체 피부 철폐시험

피부 일차 자극을 평가하기 위한 인체 철폐시험을 the cosmetic, toiletry, and fragrance association (CTFA) 가이드라인에서 제시한 방법에 약간의 변형을 가하여 실시하였다[5]. 우선, 철폐 부위인 전박을 70% 에틸알코올로 닦아내고 건조시킨 후, 시험물질이 적용된 Haye's chambers (Haye's Service, Netherlands)를 시험 부위에 철폐하였다. 24 h 후에 철폐를 제거하고 30 min, 24 h, 그리고 48 h 후에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가 기준은 International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)의 판정 기준에 따랐으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 다음 계산

식으로부터 계산된 평균값으로 하였다[6,7].

$$\text{Mean Score} = \frac{\text{Grade} \times \text{No. of responses} \times 100 \times 1/3}{3(\text{Maximum grade}) \times 20(\text{Total subjects})}$$

※ Grade Score

-	0	No reaction
±	0.5	Weak positive reaction (erythema)
+	1	Moderate positive reaction (erythema)
++	2	Strong positive reaction (erythema, edema)
+++	3	Severe positive reaction (erythema, edema, vesicles)

2.9. Double-blind Usage Test

종대황추출물을 함유하는 조성물의 자극완화 효과를 최종적으로 평가하기 위하여 double-blind clinical usage test를 수행하였다. 21 ~ 35세의 30명의 여성 피험자를 대상으로 실시하였으며, 피험자들은 종대황추출물 함유 조성물 및 placebo를 하루에 최소 두 번, 아침과 저녁에 평상시 사용 조건으로 사용하게끔 한 다음, 자극 여부 및 강도를 1일 1회씩 설문지에 작성하도록 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 과산화수소에 의해 자극되는 각질형성세포의 사이토카인 분비 억제 효능 시험

종대황추출물의 항염증 기작을 연구하고자, 각질형성세포를 과산화수소로 염증반응을 자극하여 염증 유발 사이토카인인 IL-8과 TNF- α 가 발현되도록 하고, 종대황추출물 첨가 배양에 의한 상기 사이토카인의 분비량 변화를 측정하였다. 시험결과, 종대황추출물이 25, 50, 100 µg/mL로 첨가되었을 때 각질형성세포에서 생산된 IL-8의 수준은 각각 15.7%, 26.4%, 30.5% 감소하였다(Figure 1).

Table 2. Results of Human Patch Test with Various Formulas

Formulas	Results of evaluation (No. of subjects)								Mean score (n=20)	Assessment
	30 min				24 h					
	±	+	++	+++	±	+	++	+++		
#1	1	-	-	-	-	-	-	-	0.28	No irritation
#2	1	-	-	-	-	-	-	-	0.28	No irritation
#3	1	-	-	-	-	-	-	-	0.28	No irritation
#4	1	-	-	-	-	-	-	-	0.28	No irritation
#5	4	1	-	-	1	-	-	-	1.94	Slight irritation
#6	3	-	-	-	1	-	-	-	1.11	Slight irritation
#7	2	-	-	-	1	-	-	-	0.83	No irritation
#8	6	1	-	-	1	-	-	-	2.50	Moderate irritation

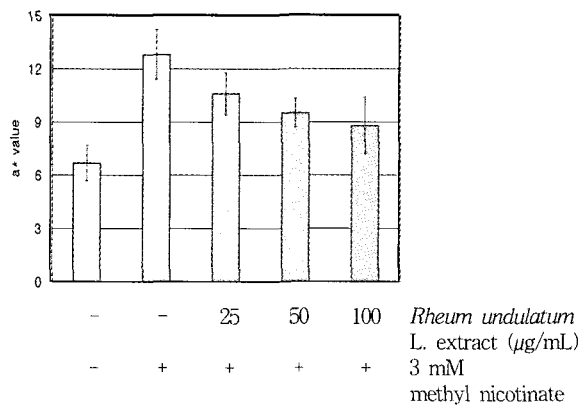


Figure 3. Changes in the a* values of spectrophotometer after inducing irritant contact dermatitis caused by methyl nicotinage.

또한 종대황추출물이 25, 50, 100 µg/mL로 첨가되었을 때 각질형성세포에서 생산된 TNF-α의 수준은 각각 7.6%, 10.1%, 21.7% 감소하였다(Figure 2). 따라서 종대황추출물은 각질형성세포의 과산화수소에 의해 유도되는 염증 발현 사이토카인의 분비를 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있었다.

3.2. Methyl nicotinate에 의해 유발된 홍반에 대한 항염증효과

각 시험부위에 종대황추출물 또는/그리고 락틱산을 함유하는 O/W 에멀전을 도포하고 3 mM methyl nicotinate를 피부에 1 min 적용하고 색차계 색차계를 이용하여 홍반 정도를 측정된 결과, O/W 에멀전이 도포되지 않은 대조군에서는 홍반지수가 크게 상승하였다(Figure 3). Methyl nicotinate가 처리된 여러 부위에 각각의 O/W 에멀전을 도포하고 하였다. 20 min 후, 홍반지수를 측정된 결과 종대황추출물이 25, 50, 100 µg/mL 함유된 O/W 에

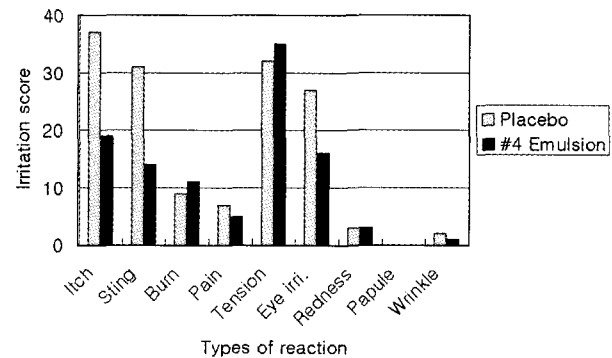


Figure 4. Types of reaction examined in in-use test.

멀전이 적용된 부위에서 홍반지수가 각각 17.2, 25.8, 31.3% 감소하여 종대황추출이 홍반에 대한 항염증 효과가 우수함을 알 수 있었다.

3.3. 락틱산에 대한 항자극효과

화장품에 빈번히 사용되는 자극원인 락틱산에 대한 종대황추출물의 피부 일차자극 완화 효과를 평가하기 위하여 인체 첩포시험을 실시하였다. 피부 일차 자극 정도는 크게 5 grade로 나누어 평가하였다. 0 ~ 0.99 (no irritation), 1.0 ~ 1.99 (slight irritation), 2.00 ~ 2.99 (moderate irritation), 3.00 ~ 4.99 (strong irritation), 5.00 ~ (severe irritation). 인체 첩포시험 결과는 Table 2에 나타내었다.

자극원과 종대황추출물을 모두 함유하지 않는 #1의 negative control에서는 0.28의 평균 피부 반응도를 나타내 자극이 거의 없는 것으로 확인되었다. 자극원인 5.0% 락틱산을 포함하는 #8의 positive control에서는 평균 피부 반응도가 2.50으로 비교적 높은 자극을 나타냈다. #2, #3, #4의 종대황추출물만을 함유하는 O/W 에멀전의 첩포 시험 결과로 볼 때, 5.0%까지의 종대황추출물 첨가는 추

가적인 자극을 유발하지 않음을 알 수 있었다. 자극원과 자극완화제가 함께 첨가된 #5, #6, #7의 결과에서 나타난 바와 같이 락틱산에 의한 피부 자극이 종대황추출물의 농도 의존적인 첨가에 비례하여 감소됨을 알 수 있었다.

3.4. 사용성 시험

사용성 시험(in-use test)은 제품의 안전성을 최종적으로 평가하는데 일반적으로 사용되어지는 방법이다. 따라서 본 연구에서도 종대황추출물의 자극완화 효과를 최종적으로 평가하기 위하여 종대황추출물을 함유하는 O/W 에멀전 #4 및 placebo를 20명의 피험자를 대상으로 4주간의 사용성 시험을 실시하였다.

Figure 4에 나타난 바와 같이 itching, stinging, burning, eye irritation 등의 9가지 자극 대부분에서 종대황추출물에 의해 자극이 완화되었으며, total irritation score를 148에서 104로 29.7% 감소시켜 전체적으로 우수한 자극 완화 효과를 보여주었다.

4. 결 론

화장품은 일상생활에서 늘 사용하는 것으로, 피부자극이 없는 안전한 제품의 개발이 필수적이다. 그러나 화장품 개발에 있어 계면활성제, 방부제, 향, 식물추출물 등 자극 유발이 예측되는 다양한 원료들이 필수 불가결하게 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 제품에 의해 유발되는 피부 자극을 최소화 할 수 있는 물질을 개발하고자 하였고, 사전 실험에서 스크리닝된 종대황추출물의 다양한 자극완화 효과 연구를 수행하였다.

염증 반응에서 발현 수준이 높아지는 사이토카인의 영향을 평가하기 위해 각질형성세포를 과산화수소로 자극하여 IL-8 또는 TNF- α 의 발현을 유도하고, 종대황추출물의 첨가 배양에 따른 영향을 시험한 결과, 종대황추출물에 의해 IL-8과 TNF- α 의 각질형성세포로부터의 분비

가 현저히 감소하였다.

또한 인체 시험에서의 피부자극 완화 효과를 시험하기 위해 methyl nicotinate 또는 락틱산으로 홍반을 유도하고, 종대황추출물 함유 O/W 에멀전을 적용한 결과 농도 의존적으로 종대황추출물에 의해 피부 자극이 감소하였다.

사용성시험에서도 9가지 자극에 평가 결과, 대부분의 자극 항목에서 종대황추출물 함유 O/W 에멀전에 의한 자극 완화효과가 나타났고, 전체 score 비교에 있어서도 현저한 자극 완화효과를 보였다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 자극완화효과가 있는 종대황추출물의 우수한 효능을 검증하였으며, 저자극 화장품 개발에 있어 종대황추출물의 활용 가치가 높을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. M. Itoh, The consideration and measures of sensitive skin from viewpoint of dermatologist, *Fragrance Journal*, 30(10), 11 (2002).
2. G. Dannhardt and W. Kiefer, Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects, *Eur. J. Med. Chem.*, 36, 109 (2001).
3. 한대석, *생약학*, 142, 동명사, 서울 종로구 (1998).
4. 박중희, 이정규, *약용식물도감*, 371, 신일상사, 서울 영등포구 (2000).
5. W. C. Waggoner, *Clinical safety and efficacy testing of cosmetics*, 8, 23, Marcel Dekker, Inc., New York (1990).
6. R. J. G. Rycroft, T. Menne, P. J. Frosch, J. D. Lepoittevin, *Textbook of contact dermatitis*, 435, Springer Verlag, Berlin (2001).
7. T. Fisher and H. Maibach, Finn chamber patch test technique, *Cont. Derm.*, 11, 137 (1984).