

화장품 소재로서의 흑마늘 추출물에 대한 안전성 평가 - 1차 피부자극 실험 및 감작성 중심으로 -

이현순¹ · 김선희^{2*}

¹고려대학교 식품영양학과 및 보건과학연구소

²수원과학대학 뷰티코디네이션과

Safety Evaluation of Black Garlic Extract for Development of Cosmeceutical Ingredients - Skin irritation and Sensitization Studies -

Hyun-Sun Lee¹ and Seon-Hee Kim^{2*}

¹Dept. of Food and Nutrition and Institute of Health Science, Korea University, Seoul 136-703, Korea

²Dept. of Beauty and Coordination, Suwon Science College, Gyeonggi-do 445-742, Korea

Abstract

We evaluated the anti-aging potential and safety of black garlic extract for cosmeceutical ingredient. Black garlic was made by spontaneous fermentation for 40 days at 60~70°C, 85~95% RH without any additives. The 10% black garlic extract had sweet odor, antioxidant activities and inhibitory activities of skin aging enzymes such as tyrosinase and elastase. The skin safety was performed to evaluate of potential toxicity using the primary irritation test and skin sensitization test. The black garlic extract did not show any adverse reactions such as erythema and edema on intact skin sites at primary irritation test, but on abraded sites, some experimental animals showed very slight erythema. So, the black garlic extract was classified as a practically non-irritating material based on the score 0.23 of primary irritation index. The skin sensitization study was tested by the guinea pig maximization test (GPMT) and Freund's complete adjuvant (FCA) with intradermal injection of 10% black garlic extract. The skin sensitization test showed no skin sensitization. The allergic sensitization depends on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). The concentration of IL-6 on challenged tissue of treated with black garlic extract was not significantly different with negative control group (saline treated group). Based on this study, the potential for black garlic as a cosmeceutical ingredient was proven.

Key words: black garlic, cosmeceutical, skin safety, skin irritation, sensitization

서 론

산업화 및 고령 인구의 증가에 따라 소비자 의식수준이 향상되면서 건강하고 여유로운 삶에 대한 욕구가 증가하고 있다. 이에 따라 “아름답게 나이를 먹는 것(successful aging)”을 실현할 수 있는 많은 과학적인 연구가 다양한 영역에서 활발히 진행되고 있다(1,2). 과거 화장품은 단순히 외적인 치장의 도구로 여겨졌으나 최근에는 증가된 여성의 사회진출, 고학력화, 개인의 가치관 존중 및 생활패턴의 변화에 따라 화장품에 대한 욕구도 단순히 아름답게 꾸미는 도구에서 고급화, 다양화되는 추세를 보이며, 점차 기능적 측면이 강조된 기능성 화장품(cosmeceuticals)의 수요가 폭발적으로 증가하고 있다(3). 이에 따라 기능성이 이미 알려진 많은 한약재나 식품이 기능성 화장품의 소재로 연구되고 있거나 제품으로 판매되고 있다(4,5).

마늘(*Allium sativum* L.)은 백합과(Liliaceae) 파속(*Allium*)에 속하는 식물로서 식품의 맛과 건강을 증진시키는 대표적인 식품 중 하나이다. 마늘에는 체내 신진대사를 촉진시키는 scordinine, 항암 및 혈전 생성의 예방 효과가 있는 ajoene 등이 있으며, 마늘의 주요 생리활성으로는 항균, 항암, 항바이러스, 항산화, 면역 증강, 항응고 기능과 관련해서 성인병 예방, 간기능 회복, 혈당 감소, 고지혈증 및 동맥경화증 개선 등 많은 생리활성 효과가 보고되고 있다(6-8). 최근 이러한 마늘의 다양한 생리활성이 보고되면서 마늘에 대한 관심이 고조되고 있으며 마늘 소비가 급증하고 있다. 흑마늘은 마늘의 자체 성분과 효소를 이용하여 발효되면서 마늘 내부까지 모두 흑색으로 변화하게 만든 것이다. 이러한 흑마늘은 마늘의 매운 맛이 감소되고, 점도는 높아지며, 유용한 생리활성 물질이 증가하게 되어(9) 새로운 기능성 소재로 다양한 분야에서 활용 가치가 높다고 평가되고 있다(10,11).

*Corresponding author. E-mail: kimsh@ssc.ac.kr
Phone: 82-31-350-2089, Fax: 82-31-350-2089

기능성 화장품 소재는 과거 화학적 합성품에서 최근에는 안전한 천연물 중심으로 연구되고 있다(12). 마늘은 강력한 항산화 효과로 인해 혈액 순환을 촉진하고 피부의 탄력성을 부여하는 기능이 있어 기능성 화장품 소재로의 가능성을 보이고 있다(6,13). 따라서 본 연구는 국내에서 생산되는 토종 마늘을 이용하여 개선된 마늘 형태인 흑마늘을 제조하고 이를 함유한 기능성 화장품에 대한 연구를 통해 한국인의 피부에 맞는 고기능성 제품을 개발하는데 있어 기초 자료를 마련하고자 실시되었다. 이에 본 연구에서는 흑마늘 추출물의 기능성 화장품 소재화 가능성을 *in vitro*에서 tyrosinase와 elastase의 저해 활성을 측정하여 미백과 피부 탄력성에 관련된 기능성을 평가하고, 기능성 화장품에 있어 가장 중요한 부분인 피부 안전성 시험을 자극에 의한 반응이 사람 피부와 유사한 guinea pig를 이용하여 1차 피부자극 시험 및 감각성 시험을 실시하여 화장품 소재로서의 흑마늘의 피부 안전성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용한 mushroom tyrosinase(167 units/mL), porcine pancreatic elastase type IV, N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide(SANA), Freund's complete adjuvant(FCA), dinitrochlorobenzene(DNCB), sodium lauryl sulfate(SLS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), dimethyl sulfoxide(DMSO), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid(ABTS)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 밖의 시약은 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

연구 재료

마늘은 경상북도 의성 지역에서 생산된 1등급 마늘을 지역농협에서 시판 중인 것을 구입하여 사용하였다. 마늘은 구입 즉시 냉장 보관하면서 박피하여 100 g씩 폴리에틸렌 필름으로 포장한 후 -70°C에서 보관하여 사용하였다. 흑마늘 제조는 첨가물 없이 60~70°C에서 85~95%의 상대 습도를 유지하면서 40일간 자연 숙성시켜 제조하였다. 흑마늘 추출물은 분쇄한 흑마늘을 증류수에 24시간 동안 실온에서 교반하여 추출시킨 후 15°brix까지 40°C에서 감압 농축시켜 보관하였다. 이렇게 만들어진 흑마늘 추출물(black garlic extract)은 생리식염수를 이용하여 10% 용액으로 만든 후 모든 실험에 사용하였다.

항산화 활성 측정 및 피부노화 보호효능 측정

흑마늘의 항산화 활성의 측정은 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼을 이용하여 각각의 라디칼을 소거하는 능력을 이용하여 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 Brand-Williams 등(14)의 방법으로, ABTS 라디칼을 이용한 라디칼 소거능

은 Re 등(15)의 방법에 의해 측정하였다. 피부노화 보호능은 tyrosinase 저해 활성 및 elastase 저해 활성을 측정하였으며 tyrosinase 저해 활성은 Mason과 Peterson(16)의 방법을 이용하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 70 µL에 시료 용액 20 µL와 mushroom tyrosinase 용액 30 µL을 가하고 30°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 DMSO 용액 100 µL를 가하고 20분 후 492 nm에서 흡광도를 측정하였으며 tyrosinase 활성 억제능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100$$

A: with tyrosinase but without sample, B: without sample and tyrosinase, C: with sample and tyrosinase, D: with sample but without tyrosinase

Elastase 저해 활성은 James 등(17)의 방법을 이용하여 측정하였다. 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)와 10 µg/mL porcine pancreatic elastase type IV를 각각 0.5 mL을 가하여 혼합한 후 25°C에서 20분간 반응시킨 후 0.8 mM SANA를 1.0 mL 가하여 37°C에서 반응시킨 다음, 214 nm에서 흡광도를 측정하였으며 elastase 활성 억제능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Elastase inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: with elastase but without sample

B: with sample and elastase

실험동물의 사육조건

본 시험에 사용한 동물은 건강한 수컷 Hartley guinea pig(350~420 g)를 (주)대한바이오링크(Dae Han Biolink Co., Eumseong, Korea)에서 구입하였다. 사육실의 사육조건은 온도 23±3°C, 습도 50±10%, 환기회수 15회/hr, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(08:00~20:00)으로 자동 유지되도록 하였다. 전 시험기간 동안 기니픽 사료(Purina Korea Co., Seoul, Korea)와 음수는 자유롭게 급식시켰으며, 기니픽은 스테인레스 스틸 사육케이저(26×42×18 cm)에서 사육 상자 당 1마리씩 개별 사육하였다. 본 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받은 후(승인번호 KUACUC-2010-106) '실험동물 관리 및 이용에 관한 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NRC)'에 맞추어 관리하면서 실시하였다.

1차 피부자극 시험(primary skin irritation test)

1차 피부자극 실험은 Draize 방법(18)으로 실시하였으며, 시료의 농도는 화장품 사용 예정량(1%)의 10배인 10%로 하여 실시하였다. 실험 시작 24시간 전에 clipper와 일반 면도기를 이용하여 제모 하여 제모에 의한 피부자극을 안전화시킨 후 다음날 사용하였다. 제모 한 10마리의 기니픽을 이용하여 각 동물의 등 부위를 약 1.5 cm×1.5 cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 4구획을 만들었다. 표시된 부위 중 오른

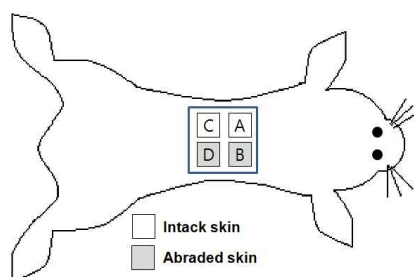


Fig. 1. Compartment of guinea pig skin according to treatment of black garlic extract. A, control site, intact skin; B, control site, abraded skin; C, treated with black garlic extract, intact skin; D, treated with black garlic extract, abraded skin.

Table 1. Score of skin irritation

Skin reaction	Score
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	4
Edema	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edge of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)	4

Table 2. Primary irritation index (P.I.I.) according Draze method

Classification	P.I.I.
Practically non-irritation	0.0~0.5
Slight irritation	0.6~2.0
Moderate irritation	2.1~5.0
Severe irritation	5.1~8.0

쪽 부위를 주사기 바늘을 이용하여 대각선 방향으로 각질층만 손상되고 진피는 손상되지 않으며 피가 나지 않을 정도의 찰과상을 내어 비찰과 피부 2개소와 찰과 피부 2개소로 나누었다(Fig. 1). Fig. 1의 A, B 구획은 대조물질(생리식염수)을, C, D 구획에는 10% 흑마늘 추출물을 각각 0.5 mL씩 천천히 도포하였다. 도포를 마친 후 시험부위 전체를 거즈로 덮고, 탄력붕대로 감싼 다음 3M(St. Paul, MN, USA) 종이테이프를 가장자리를 잘 고정하였다. 시험물질 도포 24시간 후 거즈를 제거하고 잔류물이 피부에 영향을 미치지 않도록 미온수로 씻어내었다. 세정을 마친 다음, 24시간 간격으로 72시간까지 관찰하면서 피부반응을 “의약품 등의 독성시험기준”의 “피부자극반응 평가표”(Table 1)에 따라 평가하여, 피부 1차 자극지수(primary irritation index, P.I.I.)를 산출하여, 자극성을 Table 2에 따라 판정하였다(19,20).

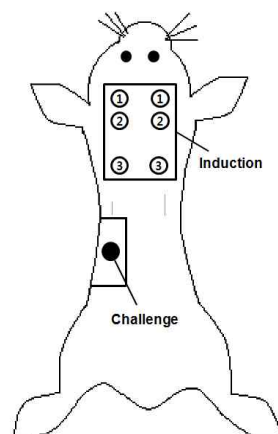


Fig. 2. Induction of skin sensitization and skin reaction in guinea pig. ①, intradermal injection of 0.1 mL distilled water + Freund's complete adjuvant emulsion (1:1); ②, intradermal injection of 0.1 mL sample; ③, intradermal injection of 0.1 mL sample + Freund's complete adjuvant emulsion (1:1).

피부 감작성 시험(skin sensitization test)

피부 감작성 실험은 Maximization Test법(21)으로 실시하였으며, 각 군당 기니픽 5마리씩을 사용하여 음성대조군(생리식염수), 양성대조군(DNCB) 및 흑마늘 추출물 처리군으로 나누어 수행하였다. 제모는 1차 피부자극 시험과 동일한 방법으로 수행하였다. 1차 감각(induction)을 위해, 제모한 기니픽의 등 부위 피부(2×4 cm)에 Fig. 2와 같이 표시한 후 각 부위에 FCA와 흑마늘 추출물, 음성대조군(생리식염수) 또는 양성대조군(DNCB)을 0.1 mL씩 각각 피내주사하였다. 1차 및 2차 감각 노출량은 화장품 사용 예정량(1%)의 10배인 10% 용액을 사용하여 감각시켰다. SLS 전 처치는 1차 감각 6일 후 시험물질에 의한 감각을 증강하기 위해 10%(w/v) SLS 함유 백색 바세린 0.5 g을 도포한 다음 24시간 후 SLS를 미온수로 씻어 내고 2차 감각을 실시하였다. 2차 감각은 1차 감각 1주 후 시험물질을 피내주사 했던 부위에 시험물질을 포함하는 패취(patch, 2×4 cm)를 부착하여 48시간 동안 폐쇄접포(occlusive with patch)하여 감각시켰다. 2차 감각 2주 후 야기(challenge)를 실시하였으며, Fig. 2의 야기부위에 부착하여 24시간 동안 폐쇄접포 하여 감각을 야기하였다. 흑마늘의 야기 농도는 화장품 사용예정량인 1%로 하였다. 24시간 야기 후 패취를 제거한 다음 미온수로 피부에 남아 있는 시험물질을 깨끗이 닦아낸 후 72시간까지 관찰하였다. 양성대조군인 DNCB는 감각 농도는 1.0%, 야기 농도는 0.1%로 적용하였다.

일반 증상의 관찰 및 체중측정

감작기간 중 매일 오전 10시와 오후 5시 일반적인 상태를 관찰 기록하였고, 매주 1회씩 체중을 측정하였다.

피부의 관찰 및 평가방법

야기를 위해 부착했던 폐쇄접포를 제거한 다음 24시간, 48시간 및 72시간에 “피부감작성반응 평가표”(Table 3)에 따

Table 3. Score of sensitization and maximization grade¹⁾

Sensitization score	Erythema reaction state	Edema formation
0	No reaction	No edema
1	Scattered mild redness	Slight edema
2	Moderate and diffuse erythema	Moderate edema
3	Severe erythema with scar formation	Sever edema

¹⁾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.

라 반응을 평가하였으며, 각 군에서 반응을 보이는 개체로 양성반응율(%) [양성동물수/전체동물수×100]을 구하고 피부감작성의 정도를 평가하였다.

피부 감각 부위의 cytokine 측정

피부 감작성 시험의 관찰이 종료된 후 각 동물의 야기된 조직을 동결시킨 후 마쇄한 조직을 phosphate buffered saline with Tween 20(PBST-20) buffer에 분산시킨 후 초음파 파쇄기로 파쇄 하여 현탁액을 만들고 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액의 Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6(IL-6)를 sandwich ELISA(R & D Inc., Minneapolis, MN, USA)법에 의해 측정하였다(22). 각 조직의 단백질 함량을 bicinchoninic acid(BCA, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)법으로 측정된 후 조직 g당 pg 농도로 표시하였다. 각각의 시험 방법은 각 제조사에서 제시한 방법에 따라 실시하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS ver 10.0(SPSS Inc., IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며, 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 평균의 표준 편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. ANOVA test 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하여 그룹간의 유의성을 나타내었다.

결과 및 고찰

흑마늘 추출물의 특징

10% 흑마늘 추출물의 pH는 약산성(5.6 ± 0.7)이었으나 이는 마늘 추출물(5.2 ± 1.4)과 유의적 수준에서 차이는 없었으며 특히, 마늘에 비해 마늘 특유의 향이 없었으며 높은 항산화 활성과 tyrosinase 및 elastase의 활성을 억제하는 효능을 가지고 있음을 알 수 있었다(Table 4). Shin 등(23)은 흑마늘이 마늘에 비해 DPPH에 대한 라디칼 소거능이 증가하는데 이것은 allyl mercaptan 및 methyl pyrazine 등과 같은 향기 성분은 열처리로 인해 새롭게 생성되고 allyl methyl sulfide 및 allyl alcohol 등과 같은 성분은 열처리로 인해 함량이 증가되기 때문이라고 보고하였다. Tyrosinase는 polyphenol oxidase의 일종이며 구리를 함유하는 효소로서 색소 세포에서 tyrosine을 DOPA로 전환시키고 효소적 산화 반응에 의해 단계적으로 dopamine, dopachrome으로 변환하여 melanin을 생합성하는 효소이다(24). 이와 같이 tyrosinase는 mel-

Table 4. Properties of 10% black garlic extract

pH	5.6 ± 0.7
Color	dark brown
Odor	odorless ~ weak sweet odor
Antioxidant activities	
ABTS radical scavenging activity	$92.0 \pm 1.2\%$
DPPH radical scavenging activity	$69.0 \pm 2.5\%$
Potential of skin anti-aging	
Inhibitory activity of tyrosinase	$50.6 \pm 3.8\%$
Inhibitory activity of elastase	$47.0 \pm 9.2\%$

Values are mean \pm SD (n=3).

anin 중합체를 생성하는 피부에 있는 주요 효소로 세포내 색소세포에서 활성화되어 melanin을 과잉 생산하게 되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소 침착이 일어나 피부 노화 및 손상을 초래하므로 tyrosinase 억제능이 우수한 흑마늘은 미백 관련 기능성 화장품의 소재로 높은 가능성을 나타낸다고 생각된다. 또한 elastase는 피부 각질층의 엘라스틴을 분해하여 피부의 탄력성을 소실시켜 피부의 노화를 일으키는 효소로 흑마늘 추출물이 elastase의 작용을 억제함으로써 피부주름 개선 능력을 가질 수 있을 것으로 예상된다.

일반 중독 증상

1차 자극을 평가하기 위하여 시험물질을 처리한 그룹의 동물에서는 시험물질에 의한 특이한 일반증상 및 사망의 예는 관찰되지 않았다. 피부 감각실험을 위하여 폐색칩포한 모든 개체에서 약간의 체중 감소가 있었으나(data not shown), 이는 고정에 의한 물리적인 스트레스에 의한 것으로 폐색칩포를 제거한 후에는 정상으로 회복하였다. 그러나 피부 감작성을 측정하기 위해 양성 대조물(DNCB)을 투여한 그룹에서는 피부에 중등도에 이르는 홍반과 부종이 관찰되었으며, 외부자극에 과민하게 반응하는 행동을 보였으나 이로 인한 사망은 관찰되지 않았다.

1차 피부자극(primary skin irritation)의 평가

화장품 사용 예정량의 10배인 10% 흑마늘 추출물을 찰과 부위와 비찰과 부위에 24시간 폐색칩포 후 칩포물을 제거한 다음 24, 48, 72시간째에 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타난 바와 같이 대조군(생리식염수)에서는 부종과 홍반이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 흑마늘 처리한 군의 찰과 영역에서 미비한 홍반이 관찰되었다. Draze 법에 의한 1차 피부자극지수(Primary irritation index, P.I.I.)를 산출한 결과 0.23이었다.



Skin reaction	Score of skin irritation (No.)												Mean score	P.I.I.		
	hr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
Control site	Intact skin	Erythema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Edama	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Abraded skin	Erythema	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Edama	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Treated site	Intact skin	Erythema	24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.1	0	0.23
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Edama	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Abraded skin	Erythema	24	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0.5	0.3	
		72	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0.3		
Edama	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Fig. 3. The evaluation on primary skin irritation of black garlic extract. Mean score=total score/ number of animal (10). P.I.I. (primary irritation index), Σ total score/ (animal No.×4).

Kang 등(25)의 보고에 의하면 현재 기능성 화장품 소재로 많이 사용되는 2500 IU의 레티놀 크림에서도 비찰과 부위에서는 홍반이나 부종이 없으나 찰과 영역에서 아주 가벼운 홍반이 관찰되어 P.I.I가 0.875로 나왔다고 보고하였다. 따라서 흑마늘 추출물은 P.I.I가 0.23의 자극은 관찰되었으나 이는 practically non-irritation(비자극성)에 해당하는 자극으로 피부자극이 거의 없음을 알 수 있었다.

피부 감작성 평가

모든 동물의 처리 부위를 시험물질을 야기처리 후 24, 48, 72시간째에 실시한 결과를 Fig. 4에 나타낸 것처럼 흑마늘 추출물을 처리한 군에서는 발적, 홍반, 부종 등이 전혀 관찰되지 않았고 반응의 빈도도 0%로 나타나 grade I으로 판정되었다. 양성대조군에서는 평균 반응 2.2 정도의 홍반과 부종이 모든 동물에서 관찰되었다. 야기된 동물의 조직의 TNF-α와 IL-6를 측정된 결과 TNF-α는 모든 처리군에서 유의적 차이가 관찰되지 않았으나 IL-6의 양은 양성대조군인 DNCB 처리군에서는 음성대조군보다 유의적으로 증가하였으나 흑마늘 처리군에서 음성대조군과 유의적 차이가 없었다(Fig.

5). 피부 감각반응은 일종의 알레르기 반응으로 항원(allergen)이 체내에 들어오면, 항원은 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)에 의해 처리되고, helper T세포에게 정보를 제공한다. 활성화된 T세포는 IL-4, IL-6, IL-13 등과 같은 사이토카인을 방출하고, B세포와 상호작용하여 allergen-specific IgE의 생산을 유도하여, 항원에 의해 재 노출 시 감각반응을 일으키게 된다(26). 흑마늘의 피부 감각정도를 측정된 결과 grade I 정도의 약한 접촉자극을 유도하며, 야기된 조직의 IL-6의 방출량에서도 음성대조군(생리식염수)보다 함량의 증가가 관찰되지 않는 것으로 보아 피부에 감각을 전혀 일으키지 않는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 흑마늘을 기능성 화장품 소재로 활용하기 위하여 그 기능성을 *in vitro*에서 tyrosinase 및 elastase 저해 활성을 측정된 결과 피부노화에 관여하는 두 효소의 활성을 모두 저해하였다. 흑마늘 추출물을 hartley계 기니피그 수컷을 사용하여 피부 1차 자극 실험을 실시한 결과 1차 피부자극지



Groups			Sensitization score					Mean response	Sensitization rate (%)	Evaluation grade (class)	
Name	Induction	Challenge	hr	1	2	3	4				5
Negative control	saline	saline	24	0	0	0	0	0	0	0	I (weak)
			48	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0		
Positive control (DNCB)	1%	0.1%	24	2	3	2	2	1	2.0	100	V (extreme)
			48	3	2	3	3	2	2.4		
			72	1	3	3	2	2	2.2		
Black garlic extract	10%	1%	24	0	0	0	0	0	0	0	I (weak)
			48	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0		

Fig. 4. The evaluation of contact allergenicity with maximization test.

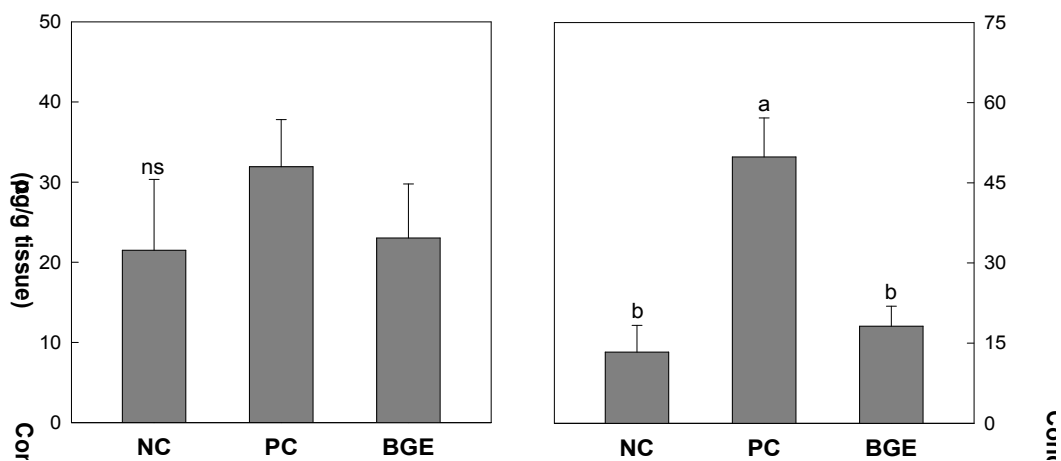


Fig. 5. Concentrations of TNF- α and IL-6 on challenged tissue of animal. Values are mean \pm SD for 5 number/group. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among groups by Duncan's multiple range test. ns=not significant.

수(P.I.I.)가 0.23으로 practically non-irritation(비자극성)에 해당하는 자극으로 피부 자극이 거의 없었음을 알 수 있었다. Maximization test법으로 피부 감작성을 확인한 결과 시험물질에 의한 홍반과 부종 등이 전혀 유발되지 않았다. 이상의 결과로부터 흑마늘 추출물에 대한 기니픽의 피부 감작

율은 0%로, 피부에 대한 피부 감작성이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 이러한 본 연구의 결과는 흑마늘 추출물이 기능성 화장품 소재로 피부노화를 억제하는 기능성과 안전성 확보된 소재임을 추정할 수 있었다.

문헌

1. Ryu SH, Moon GS. 2003. Antioxidative and antiaging effects of dietary yellow and black soybean in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 591-597.
2. Kim SW. 2002. Growth hormone replacement therapy in anti-aging. *Women's Health* 3: 179-192.
3. Park CG, Lee SP, Son ES. 2002. Cosmeceuticals. National IT Industry Promotion Agency. p 138-142.
4. Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. 2008. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 684-690.
5. Park KJ, Park SH, Kim JK. 2010. Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photo aging. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 42-46.
6. Kwon SK. 2003. Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. *J Appl Pharmacol* 11: 8-32.
7. Rao AR, Sadhana AS, Goel HC. 1990. Inhibition of skin tumors in DMBA-induced complete carcinogenesis system in mice by garlic (*Allium sativum*). *Indian J Exp Biol* 28: 405-408.
8. Samuel JK, Andrews B, Jebashree HS. 2000. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of *Allium sativum* bulb extract against *Trichophyton rubrum*, a human skin pathogen. *World J Microb Biot* 16: 617-620.
9. Yang ST. 2007. Antioxidative activity of extracts of aged black garlic on oxidation of human low density lipoprotein. *J Life Sci* 17: 1330-1335.
10. Yang ST. 2010. Effects of aged black garlic extract on ethanol induced hangover in rats. *J Life Sci* 20: 225-230.
11. Lee JO, Kim KH, Yook HS. 2009. Quality characteristics of cookies containing various levels of aged garlic. *J East Asian Soc Dietary Life* 19: 71-77.
12. Kim E. 2007. Phytochemicals and beauty food. *Food Sci Ind* 40: 3-8.
13. Chang B, Lee G. 2007. Literature review on the effect of human skin following garlic extraction. *J Beau Tricho* 3: 6-12.
14. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology* 28: 25-30.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
16. Mason HS, Peterson EW. 1965. Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim Biophys Acta* 111: 134-146.
17. James AEK, Timothy DW, Gordon L. 1996. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 35: 9090-9096.
18. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 82: 377-390.
19. Korea Food and Drug Administration. 2007. *Guideline for Toxicity* (KFDA Notification 2006-60). Seoul, Korea. p 258-263.
20. Rush RE, Bonnette KL, Douds DA, Merriman TN. 1995. Dermal irritation and sensitization. In *CRC Handbook of Toxicology*. 2nd ed. Derelanko MJ, Hollinger MA, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 105-162.
21. Magnusson B, Kligman A. 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Inv Derm* 52: 268-276.
22. Park CK, Kim H, Tu Q, Yu KW, Jeong HS, Lee HY, Jeong JH. 2009. Chemical composition and immunostimulating activity of the fermented Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) with mushroom mycelium by solid culture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1145-1152.
23. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 965-971.
24. Zhang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, Wei D. 2007. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22: 91-98.
25. Kang BC, Lee NR, Kwon E, Kang CG, Jeong HW, Park SY, Lee SK, Lee KH, Sung MW, Chung JH. 2002. Dermal and ocular irritation studies of retinal cream I·II in rabbits. *Laboratory Animal Research* 18: 177-183.
26. Harnett W, Harnett MM. 2008. Therapeutic immunomodulators from nematode parasites. *Expert Rev Mol Med* 10: e18.

(2010년 5월 4일 접수; 2010년 5월 13일 채택)