

다탐색(多探索) 법을 통한 저자극성 액체 세정제 조성물 개발

김 배 환[†] · 현 기 안 · 정 지 윤 · 윤 삼 숙 · 강 한 철 · 박 선 희* · 고 강 일* · 김 기 호*

CJ Lion(주) 베스트리빙연구소, *(주)바이올랜드 생명공학연구소
(2005년 2월 25일 접수, 2005년 3월 11일 채택)

A Low Irritant Liquid Cleanser Composition Developed by Multi-Screening Methods

Peter Kim[†], Ki-An Hyeon, Ji-Youn Chung, Sam-Sook Yoon, Han Chyul Kang,
Sun Hee Park*, Kang Il Ko*, and Ki Ho Kim*

R&D Center, CJ LION Corp., 636, Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul 152-050, Korea
*R&D Center, Bioland Ltd.

(Received February 25, 2005; Accepted March 11, 2005)

요 약: 세정제에 널리 상용화되어 있는 알킬에톡시설페이트 계의 음이온 계면활성제는 피부 흡착의 특성 때문에 충분히 헹구어 내지 않으면 피부에 잔존되어 자극의 원인이 되어 염증 반응을 일으키게 된다. 따라서 기존의 음이온 계면활성제를 대체 또는 보완하기 위해 기존의 계면활성제들을 단백질 변성 실험, 세포 독성 그리고 IL-1 α 측정을 통해 선별하였다. 본 연구는 저자극성의 음이온 또는 비이온, 양쪽성 이온의 14종의 계면활성제와 민감성 피부를 위해 제조된 13종의 기존 세정제 제품에 대한 세포 독성을 실시하여, 가장 독성이 낮은 계면활성제로 sodium laureth sulfate (음이온), sodium cocoyl isethionate (음이온), sodium lauroamphoacetate (양성이온), cocamidopropyl betaine (양성이온), alkyl polyglycoside (비이온)가 선택되었고 2종의 기존 세정제 제품을 비교 제형으로 선택하였다. 5종의 계면활성제를 20종의 formulation으로 제조하여 단백질 변성 (<3M SLS (13.2%)), 세포독성 실험 및 패치포 실험을 통하여 다시 5종을 선별하였다. 이들 제형을 진피 배양으로 세포독성 및 IL-1 α 방출량을 조사하여 가장 자극이 낮은 계면활성제 제형을 선택하였으며, 첨가된 계면활성제의 자극을 완화하기 위하여 항염과 보습 효과가 우수한 마치현 추출물(3%, 5%)과 fructan (3%, 5%)을 농도별로 첨가한 제형을 제조하여 가장 안전성이 뛰어난 농도를 선택하였다. 최종적으로 선택된 제형 5번을 3차원 세포 배양을 통한 인공피부를 이용하여 가장 자극이 낮게 나타난 기존의 제품들과 세포 독성 및 IL-1 α 방출량을 비교 조사하여 저자극성의 액체 세정제를 개발하였다.

Abstract: Alkyl ethoxy sulfate type surfactants, widely used in commercial cleansers, are easily adsorbed to skin to often cause skin irritation and inflammation if not thoroughly rinsed out. In order to replace or complement existing surfactants, we screened the existing surfactants through protein denaturation method, cell cytotoxicity assay and human IL-1 α assay, etc. Fourteen surfactants have been chosen from among low irritant anionic, cationic and/or zwitter-ionic ones and investigated for cell cytotoxicity in human fibroblast cell lines using monolayer culture with the thirteen commercially available cleansers for sensitive skin. From these results, we selected 5 surfactants and 2 commercial cleansers (names not shown), such as sodium laureth sulfate (anionic), sodium cocoyl isethionate (anionic), sodium lauroamphoacetate (zwitter-ionic), and cocamidopropyl betaine (zwitter-ionic), alkyl polyglycoside (non-ionic). 20 formulations were made out of 5 surfactants and five of them were chosen through a protein denaturation method (lower than 3 M sodium dodecyl sulfate solution (13.2%)), cell cytotoxicity and human patch test. These five selected formulations containing preservatives were compared to two selected commercial cleansers by cell cytotoxicity and human IL-1 α ELISA assay using dermal equivalent. Finally, we selected the best formulation. To this formulation, fructan (3% or 5%) or/and portulaca extract (3% or 5%) well known for its anti-inflammatory and moisturizing effects were added and investigated for cell cytotoxicity using dermal equivalent. In cytotoxicity assay using dermal equivalent, two formulations containing 5% fructan and 3% or 5% portulaca extract were less toxic than the others. In cytotoxicity assay and human IL-1 α ELISA using 3D culture, the selected formulation containing 5% fructan and 5% portulaca extract showed better efficiency than those of the others and 2 commercial cleansers. As a result, we could develop a low irritant and safe liquid cleanser.

Keywords: sensitive skin, low irritant, surfactant, portulaca extract, fructan

[†] 주 저자 (e-mail: bwkim@cjlion.net)

1. 서 론

민감성 피부는 자극성 또는 알레르기성 물질, 환경의 변화 등에 의한 외부적 인자와 내부적 인자에 의하여 정상인에 비하여 민감하게 반응하여 피부염이나 자극반응을 잘 일으키는 피부이다. 주로 알려지지 않거나 일종의 진단되는 민감성 피부는 특정 물질과의 접촉과 접촉물의 농도, 접촉시간, 외부 환경조건 등에 따라 여러 가지 형태의 반응을 나타낸다[1].

알러지성 피부, 예민성 피부, 염증성 피부, 모세 혈관 확장 피부, 접촉성 염증 피부 등이 이에 속하며 건조 피부, 아토피 피부 등은 민감성 피부의 대표적인 예이다. 또한 홍반(홍조), 피부건조, 피부거침, 피부자극, 알러지 반응 등은 민감성 피부의 매우 흔한 증세들이다. 최근에 '민감성'으로 표현되는 피부를 나타내는 어린이 및 어른의 숫자가 늘어나면서 피부에 자극이 낮은 세정제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[1].

세정제에 널리 상용화되어 사용되고 있는 음이온 계면활성제로는 고급 지방산 알코올 설페이트(higher fatty acid alcohol sulfate), 알킬설페이트(alkylsulfate), 알킬에테르설페이트(alkylethersulfate), 알파올레핀설페이트(alpha-olefin-sulfate) 등이 있으며 이들은 값이 저렴하고 기포의 발생 및 세정력이 우수하여 액체 세정제에 주원료로 사용되고 있다. 그러나 음이온 계면활성제들은 상대적으로 강한 피부 흡착력으로 인해 충분히 헹구어 주지 않을 경우 피부에 잔류하는 특성이 있어 자극의 원인이 되고 있다[2].

따라서, 기존 설페이트계 및 설포네이트계 음이온 계면활성제 전부 또는 일부를 대체할 수 있는 원료로 소듐 코코일 이세티오네이트(sodium cocoyl isethionate, SCI), 디소듐 라우릴 설포석시네이트(disodium lauryl sulfosuccinate, DLS), 아실-N-메틸타우레이트(acyl N-methyl taurate, AMT), 아실글루타메이트(acylglutamate, AG) 계통의 저자극성의 음이온 계면활성제를 이용하여 피부 자극을 낮추는 방법이 제시되고 있다[3-5].

또한 음이온 계면활성제가 갖는 피부 흡착 특성을 상쇄시키고 피부자극을 완화시키면서도 세정력과 기포특성을 향상시키기 위해 비이온 계면활성제와 양쪽성이온 계면활성제가 사용되고 있다. 이러한 용도의 계면활성제로는 지방산 알카놀 아마이드(alkanolamide), 알킬 폴리글리코사이드(alkyl polyglucoside) 등의 비이온 계면활성제와 알킬 베타인(alkyl betaine), 알킬기에 아미노기가 함유된 코코아미도프로필 베타인(cocoamidopropyl betaine) 등 베타인계의 양쪽성이온 계면활성제 등을 들 수 있다. 또한 최근 베타인계가 아닌 암포아세테이트(amphoacetate)계의 양쪽성 계면활성제도 그들의 온화한 피부 자극성으로 인해 주목 받고 있다[4-6].

이와 같이, 보다 저자극성 액체 세정제를 만들기 위한 여러 종류의 계면활성제들이 알려져 있으나 소듐 코코일 이세티오네이트(SDI), 디소듐 라우릴 설포석시네이트(DLS), 아실-N-메틸타우레이트(AMT), 아실글루타메이트(AG) 계통의 저자극 음이온 계면활성제와 비이온 및 양쪽성 계면활성제를 일정 비율의 조성 차이를 비교하여 피부자극이 완화된 액체 세정제를 개발하려는 연구는 부족한 실정이다. 따라서 이러한 계면활성제들의 피부 자극에 대한 특성을 파악하고 조성물의 조합을 통하여 피부자극성이 낮은 세정제 조성물에 대한 연구가 더욱 필요하다.

또한 일반적으로 세정제에 사용되는 계면활성제들을 저자극성으로 선택하더라도 완벽하게 자극을 없애는 것은 불가능하다. 본 연구에서는 이러한 물질들이 유발하는 자극을 다른 자극완화제를 첨가함으로써 극복할 수 있을 것이라 가정하고, 자극완화제로서는 여러 가지 종류의 천연물 성분이나 보습성분들 가운데 자극완화 및 보습 능력이 우수하다고 알려진 마치현 추출물[7,8]과 프릭탄[9-14]을 각각 사용하여 세정제의 잔존하는 자극을 제거하고자 시도하였다.

상기 조성물의 체계적인 선별을 통한 저자극성 액체 세정제 개발을 위하여 단백질 변성 실험, 폐침포 실험 및 단층 배양, 진피 배양(dermal equivalent), 3차원 생인공 피부(skin equivalent)를 이용한 MTT assay 그리고 염증 인자인 인터루킨-1 α 의 분비량 측정과 같은 다탐색법을 이용하여 실제 피부에서의 자극성을 확인하였고 연구 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험 방법

2.1. 세포 배양 및 세포 독성 실험

2.1.1. 단층 배양을 이용한 세포 독성 실험

사람 섬유아세포(human normal fibroblast, ATCC, CRL-2703)를 1×10^5 cell/mL로 24 well plate에 스테아 혈청(Gibco)이 10% 함유된 DMEM (dulbecco's modified eagle's media, Gibco)을 이용하여 접종한다. 1일 후 혈청이 2% 첨가된 새 DMEM 배지로 갈아주면서 시료를 농도별로 처리한다. 24 h 배양 후 배지를 제거하고 0.33 mg/mL MTT [3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma] 1 mL를 첨가하여 37°C에서 4 h 배양시킨다. 그 후 MTT를 제거하고 DMSO 1 mL를 첨가하여 상온에서 10 min 동안 용해시킨다. 완전히 용해되면 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

2.1.2. 진피 배양을 이용한 세포 독성 실험

타입 I collagen과 5배로 농축된 DMEM 배지, 그리고

Table 1. Compositions of Formulation 1 to 9 and Compared Formulation 1 to 3

| Surfactants | Formulation | | | | | | | | | Compared formulation | | | |
|-------------|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|---|---|----------------------|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 | 2 | 3 | |
| Anion | alkyl ether sulfate (3M) | | | | 12 | 12 | 12 | | | | 25 | 25 | 30 |
| | alkyl ether sulfate (5M) | 12 | 12 | 12 | | | | 8 | 8 | 8 | | | |
| | sodium cocoyl isethionate | 4 | | 4 | | 4 | | | | | | | |
| | disodium lauryl sufosuccinate | | 4 | | 4 | | 4 | | | | | | |
| | alsylglutamate | | | 4 | | 4 | | 4 | | | | | |
| Zwitter-ion | alkyl aminopropylbetain | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 8 | 8 | 8 | 10 | 10 | 15 |
| | alkyl polyglucosid | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | | |
| Non-ion | fatty acid-diethanolamide (CDE) | | | | | | | | | | 2 | | |
| | fatty acid-ethanolamide (CDE) | | | | | | | | | | | 2 | |
| D.W. | up to 100% | | | | | | | | | | | | |

Table 2. Compositions of Formulation 10 to 20 and Compared Formulation 4 to 7

| Surfactants | Formulation | | | | | | | | | | | Compared formulation | | | | |
|-------------|---------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------------------|----|----|----|----|
| | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| Anion | alkyl ether sulfate | 22 | 22 | 22 | 33 | 33 | 7 | 7 | 7 | 11 | 11 | 7 | 33 | 29 | 22 | 11 |
| | asyl-N-methyl taurate | 10 | | | | | 3 | | | | | | | | | |
| | sodium cocoyl isethionate | | 3 | | | | | 1 | | | | 1 | | | | |
| | alsylglutamate | | | 12 | | | | | 4 | | | | | | | |
| Zwitter-ion | alkyl amphotoacetate | 10 | 10 | 10 | 7 | 3 | 30 | 30 | 30 | 20 | 10 | 20 | 10 | 13 | 20 | 30 |
| | alkyl aminopropylbetain | | | | 3 | 7 | | | | 10 | 20 | 10 | | | | |
| D.W. | up to 100% | | | | | | | | | | | | | | | |

Raft buffer 완충용액(2.2% NaHCO₃, 200 mM HEPES, 0.05 N NaOH)을 7:2:1로 섞어 만든 용액과 사람 섬유아세포를 1×10^4 cell/mL의 밀도로 혼합하여 12 well plate에 넣어 인공진피를 제조한다. 이틀마다 한번 씩 Vit-C (50 µg/mL, Sigma)가 들어간 배지로 갈아 주면서 7일째 시료를 농도별로 처리하였다. 3일 배양 후 배지를 버리고 MTT (0.33 mg/mL) 1.5 mL을 첨가하여 37°C에서 4 h 배양시킨다. 그 후 MTT 용액을 버리고 DMSO 2 mL을 첨가하여 37°C에서 12 h 방치한다. 완전히 용해된 것을 확인한 후 96 well plate에 200 µL씩 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

2.1.3: 3차원 생인공피부를 이용한 세포 독성 실험

진피 제조는 진피 배양의 방법과 동일하나 인서트(insert, Milipore)에서 배양한다. 7일 동안 인서트에서 사람 섬유아세포를 키운 후 표피 세포인 케라티노사이트(표피 조직에서 분리한 normal keratinocyte)를 5×10^5 cells/cm²의 밀도로 진피 조직위에 얹어 7일간 더 배양한다. 그 후 인서트 내의 배지를 제거하여 표피 세포의 분

화를 유도한다. 분화된 표피 세포는 각질을 형성하고 14일 후 시료를 24 h 처리하여 시료에 의한 독성을 측정한다. 생인공 피부 배양 시에는 10% 소혈청이 첨가된 DMEM 배지와 K-SFM (keratinocyte-serum free medium, Gibco)을 1:1로 섞은 배지로 배양한다.

2.2. 단백질 변성 테스트

인산염 완충용액을 이용하여, 난백 알부민 0.5% 용액과 액체 세정제 조성물 5% 용액을 각각 만들어 이를 각각 10 mL씩 혼합하고, 40°C에서 24 h 후의 시료를 변성후의 용액으로 하여 액체 크로마토그래피법을 이용한다. 난백 알부민 0.5% 용액과 완충용액의 혼합액을 블랭크(blank)로 한다. 단백질 변성율이 클수록 피부 자극성이 높을 가능성이 큰 것으로 간주한다.

$$\text{단백질 변성율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{샘플피크}(peak)\text{면적}}{\text{블랭크 피크면적}}\right) \times 100$$

2.3. 폐접포 실험(Human Patch Test)

0.5% 세제 용액의 분산액을 힐탑 챔버(Hilltop chamber)

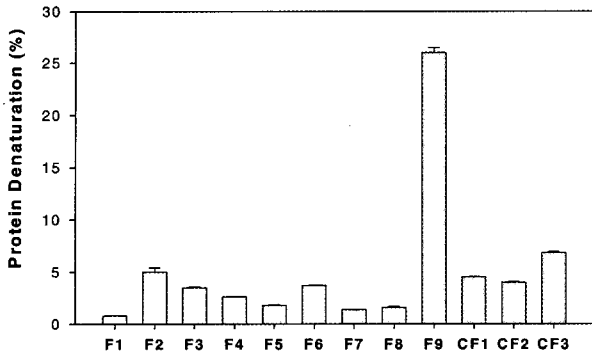


Figure 1. The test of protein denaturation from formulation 1 to 9 and from compared formulation 1 to 3: F1 ~ F9 = formulation 1 ~ 9, CF1 ~ 3 = compared formulation 1 ~ 3.

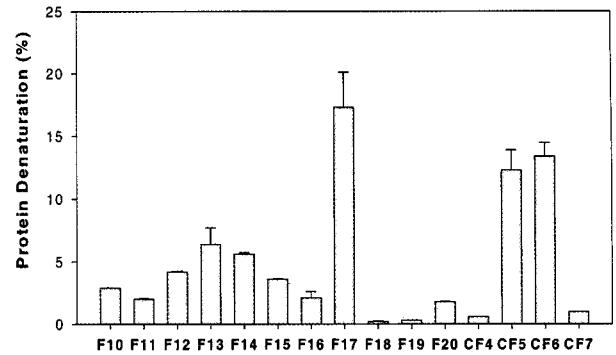


Figure 2. The test of protein denaturation from formulation 10 to 20 and from compared formulation 4 to 7: F10 ~ F20 = formulation 10 ~ 20, CF4 ~ 7 = compared formulation 4 ~ 7.

에 0.1 mL을 가하여 임의의 성인 남녀 20명의 팔 안쪽에 부착하고 약 24 h 경과 후 제거한다. 또한 피부 자극성이 있다고 알려진 알킬에테르설페이트 0.25%와 0.05%의 분산액을 보다 정확한 비교를 위해 같이 실험한다. 첩포 제거 후 피부를 흐르는 물에 씻은 후 30 min 경과 후 나타나는 홍반을 평가 기준에 의하여 판정하고 평균 자극값을 나타낸다. 20명의 피시험자에 대한 점수를 매긴 뒤, 아래와 같이 평균피부자극범위(average skin irritation range)를 계산하여 피부 자극 정도를 판단한다.

평균피부자극범위 =

$$\frac{\sum(\text{평가기준수치} \times \text{해당평가수치의인원수})}{(\text{총피검자} \times \text{최고평가기준수치})} \times 100$$

2.4. 인터루킨-1α의 분비량 측정

MTT 시약을 처리하기 직전, 배지를 수거하여 인터루킨-1α의 분비량 측정 실험에 사용한다. 사람 인터루킨-1α ELISA 키트(Endogen사)를 사용하였으며, 키트의 매뉴얼에 따라 동결 건조된 E. coli 유래의 재조합 사람 IL-1α를 표준물질로 사용하고, 상온에서 1 h 동안 사람 IL-1α 항체와 반응시킨 후 비오틴(biotin)이 결합된 2차 항체와 재반응시킨다. 그 후 Streptavidin-HRP (horse-radish peroxidase)를 30 min 처리 후 TMB (trimethylbenzidine)용액으로 기질 반응을 시킨 후 ELISA reader로 450 nm에서 측정한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 계면활성제와 기존 액체 세정제의 세포 독성

14개의 계면활성제와 13종의 기존 액체 세정제 상품을 단층 배양을 통한 MTT assay로 세포 독성을 측정하였

다(데이터 없음). 그 결과 독성이 작은 5개의 계면활성제와 2종의 액체 세정제 상품을 선택하였으며, 선택된 계면활성제는 소듐 라우릴 설페이트(음이온), 소듐 코코일 이세티오네이트(음이온), 소듐 라우로암포아세테이트(양쪽성 이온), 코코아미도프로필 베타인(양쪽성 이온), 그리고 알킬 폴리글리코시드(비이온)였다.

3.2. 계면활성제 제형에 대한 단백질 변성 실험, 세포 독성 및 첩포 실험

선택된 5개의 저자극성 계면활성제로 20종의 제형을 제조하였다. Table 1과 Table 2에 나타난 조성으로 각각 제형 1 ~ 20 및 비교제형 1 ~ 7의 세제 조성물을 제조하였다. Table 1은 알킬에테르설페이트와 알킬아미노프로필 베타인, 알킬폴리글리코시드, 지방산 알칸올 아마이드를 기본으로 제조된 제형 1 ~ 9 및 비교제형 1 ~ 3을 나타내었다. 비교제형 1 ~ 3은 일반적으로 액체 세정제로 많이 쓰이는 조성물을 참고로 하였다. Table 2는 알킬에테르설페이트와 알킬암포아세테이트, 알킬아미노프로필베타인을 기본으로 제조된 제형 10 ~ 20 및 비교제형 4 ~ 7을 나타내었다. 단위는 중량부이다.

Figure 1에서 알킬에테르설페이트의 피부 자극성을 감소시키기 위해 EO (ethoxylene oxide) 부가 물수를 늘린 제형 1 ~ 3은 제형 4 ~ 6에 비해 그리 큰 차이를 보이지 않고 모두 낮은 단백질 변성율을 나타내었으며, 또한 pH 조건에 의하여 음이온 계면활성제와 혼용하여 사용할 경우 피부 자극이 낮은 것으로 알려진 양쪽성 계면활성제인 알킬아미노프로필베타인의 양을 늘린 제형 7 ~ 9에서도 아실 글루타메이트를 쓴 제형 9를 제외하고는 모두 비교제형 1 ~ 3에 비해 비교적 낮은 단백질 변성율을 나타내었다.

Figure 2에서 음이온 계면활성제로 알킬에테르설페이트

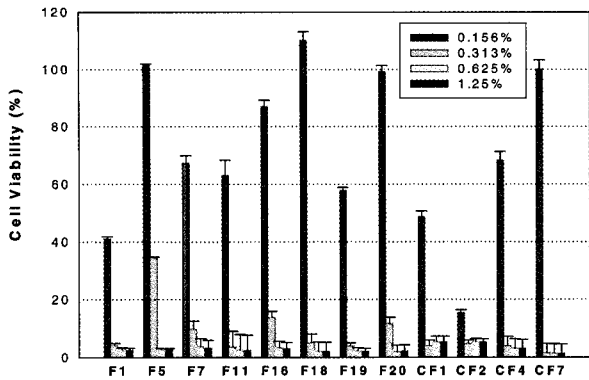


Figure 3. Cell cytotoxicity of formulations and compared formulations: F1 ~ F20 = formulation 1 ~ 20, CF1 ~ 7 = compared formulation 1 ~ 7.

를 사용한 비교제형 4~7에서는 양쪽성 계면활성제에 대한 음이온 계면활성제의 혼합비가 3 대 1(비교제형 4)과 1 대 3(비교제형 7)의 범위에서 비교적 자극수치가 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있다. 혼합비 3 대 1과 1 대 3에서 설페이트 계통의 음이온 계면활성제를 소듐 코코일 이세티오네이트, 아실-N-메틸타우레이트, 아실 글루타메이트 등의 저자극성 계면활성제로 알려진 음이온 계면활성제로 일부 대체한 제형 10~12 및 15~17의 경우, 혼합비 1 대 3에서 아실 글루타메이트를 쓴 제형 17을 제외하고는 모두 비교적 낮은 단백질 변성을 수치를 보인다. 또한 암포아세이트를 다른 양쪽성 계면활성제인 알킬아미노프로필베타인으로 부분 대체할 경우 역시 제형 13, 14, 18, 19 및 20에서와 같이 낮은 단백질 변성을 확인할 수 있다. 결과적으로 양쪽성 계면활성제인 암포아

세테이트를 이용하였을 때 음이온 계면활성제와의 일정한 혼합비 영역에서 매우 낮은 피부 자극을 보여줌을 알 수 있다.

위의 결과를 통해 여러 가지 액상 조성물 중에서 단백질 변성이 낮은 제형 8종과 비교제형 4종을 선택하여 좀더 피부에 근접한 결과를 얻기 위해 세포독성실험을 실시하였다. Figure 3에서 제형 농도 0.313%에서 대부분이 90% 이상의 세포독성을 보이나 제형 5, 16, 그리고 20은 다른 예와 비교 시 낮은 세포독성을 보이며, 0.156%를 고려하였을 때 제형 18과 비교제형 7도 비교적 낮은 세포독성을 나타낸다는 것을 보여준다.

세포독성이 낮은 제형 5, 16, 18, 20과 비교제형 7을 선택하여 실제 피부에서의 자극성을 알아보기 위해 폐첩포 테스트를 실시하였다. Table 4에서 나타난 바와 같이 제형 5, 16, 그리고 18이 모두 피부에 자극이 매우 적음을 알 수 있다.

세포 독성과 피부 자극이 적게 나온 제형 5, 16, 18, 20과 비교제형 7을 세포 배양에 의해 구축된 진피 배양에서의 세포 독성을 알아보기로 하였다. Figure 4의 결과에서 보듯이 희석 농도가 1.25%와 0.039%일 경우에는 거의 비슷한 결과를 보여 변별력이 없으나 0.156%일 경우에 제형 5와 16이 가장 낮은 세포 독성을 보이고 있다. 따라서 이 두 제형을 다음 실험에 선택하여 기존의 제품과 비교 실험하기로 했다.

3.3. 계면활성제 제형과 상용화된 액체 세정제와의 자극 비교

기존의 세정제 제품과 비교 실험하기 위해, 제형 5와 16에 대하여 진피 배양으로 세포 독성과 염증인자인 IL-1 α

Table 3. Marking of Human Patch Test

| Skin sensitization score | | | Classification |
|--------------------------|-------------|------|-----------------------------------|
| Response | Grade | Mark | |
| +++ | extreme | 2 | slightly irritant (≤ 10) |
| ++ | strong | 1.5 | |
| + | moderate | 1 | mild irritant (10.1 ~ 20) |
| + - | weak | 0.5 | moderate irritant (20.1 ~ 30) |
| 0 | no reaction | 0 | severely irritant (≥ 30.1) |

Table 4. Human Patch Test of Formulation 5, 16, 18, 20 and Compared Formulation 7

| | Formulation | | | | Compared formulation | Alkyl ether sulfate | | PBS |
|--------------------|-------------|----------|----------|------|----------------------|---------------------|----------|----------|
| | 5 | 16 | 18 | 20 | 7 | 0.25% | 0.05% | |
| Induction rate (%) | 9.2 | 5.3 | 9.2 | 10.5 | 11.8 | 9.2 | 6.6 | 6.6 |
| Classification | slightly | slightly | slightly | mild | mild | slightly | slightly | slightly |

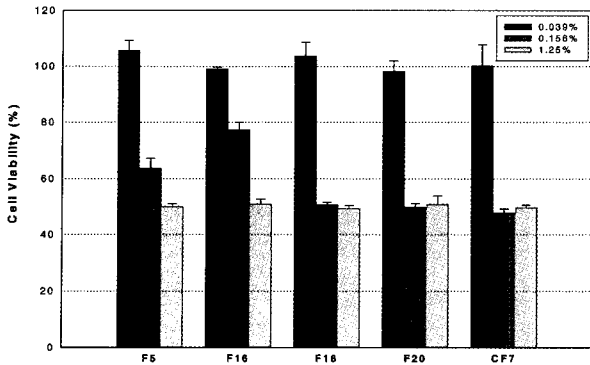


Figure 4. Cell cytotoxicity of formulation 5, 16, 18, 20 and compared formulation 7.

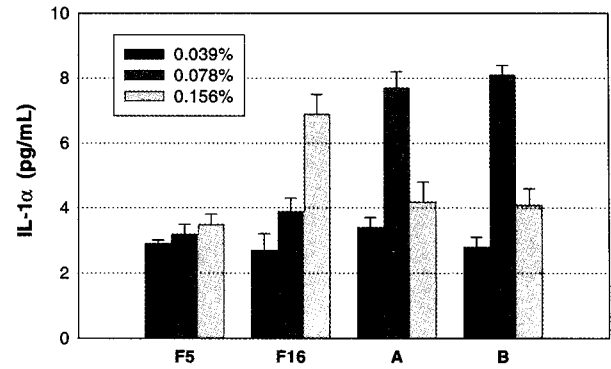


Figure 6. IL-1α measurement of formulation 5, 16 and commercial cleanser A and B.

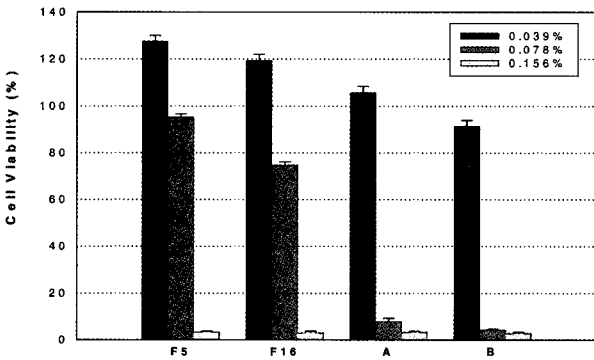


Figure 5. Cell cytotoxicity of formulation 5, 16 and commercial cleanser A and B.

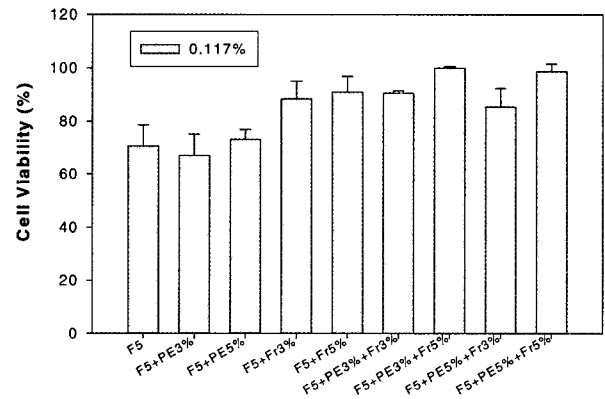


Figure 7. Cell cytotoxicity of formulation 5 with portulaca extract and/or fructan: F5 = formulation 5, PE = portulaca extract, Fr = fructan.

의 분비량을 측정하였다. 인터루킨-1α(interleukin-1α, IL-1α)는 전염증성조절인자(proinflammatory mediator)로 작용하는 세포간 신호물질(사이토카인)로, 피부가 자극성 물질에 노출되었을 때, 염증반응의 일환으로 대식세포, 단핵세포 등의 진입을 유도하기 위하여 골형성세포, 각질형성 세포, 간세포, 섬유아세포 등이 일시적으로 증가 생산한다. 또한 IL-1α는 상처의 재생피화(re-epithelialization)의 잠재적인 유도체로서 작용할 뿐만 아니라, 알리지 반응과 염증성 반응 조절인자로서 백혈구 운동을 촉진시키는 류코트리엔 B₄, 5-, 12-, 15-HETE (hydroxyeicosatetraenoic acid)같은 아라키돈산 리폭시게나제 대사 산물 생산을 증진시키는 것으로 알려져 있다[15,16]. 따라서 시험물질 처리 후에 IL-1α의 생성량을 측정하여 비교하면 염증 또는 자극의 정도를 간접적으로 측정하는 방법으로 사용될 수 있다. 실험 결과, 제형 5와 16은 기존 제품 A사 및 B사와 비교시 월등히 낮은 세포 독성을 보이고 있으며, 0.078%일 경우 제형 5는 거의 세포 독성을 보이지 않고 있다(Figure 5). 그리고 염증 유발 물질 분비 측정에서 대조구, 즉 아무것도 처리하지 않았을 경우의 농도가 3 pg/mL인 것을 감안한다면 제형 5의 경우는 상

당히 저자극의 제형임을 알 수 있다(Figure 6).

3.4. 마치현 추출물과 프럭탄의 세정제 제형에 대한 세포 독성 완화 및 항염 효과

메칠파라벤 0.05%가 첨가된 제형 5(농도는 0.117%)에 마치현 추출물과 프럭탄을 농도별로 첨가하여 세포 독성 실험을 하였다. 항염과 보습 효과가 뛰어난 마치현 추출물과 프럭탄을 첨가한 제형 5는 Figure 7에서와 같이 마치현 추출물 5%와 프럭탄 3% 또는 5%를 첨가했을 경우 세포 독성이 완전히 없어지는 것을 확인하였다. 그리고 제형 5번에 메칠파라벤 0.1%와 마치현 5%, 프럭탄 3% 또는 메칠파라벤 0.1%와 마치현 5%, 프럭탄 5%를 첨가한 제형을 실제 사람 피부와 매우 흡사한 조건에서의 세포 독성과 피부 자극 정도를 알아보기 위해 3차원 생인공 피부 모델을 이용하여 세포 독성과 염증인자인 IL-1α의 분비량을 기존 제품 A 및 B사와 비교하였다. Figure 8에서와 같이, 세포의 독성은 A사와 비교시 약 10% 높으나, 염증인자인 IL-1α 분비량의 경우, 마치현 추출물과

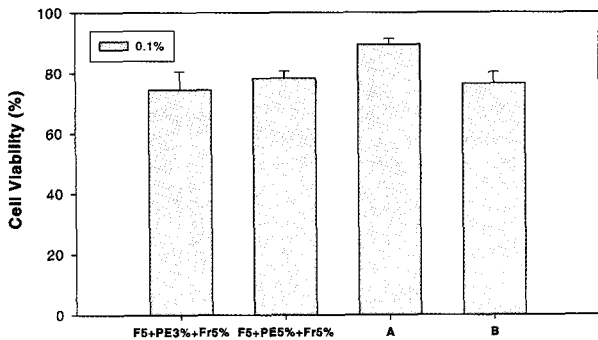


Figure 8. Cell cytotoxicity of formulation 5 with portulaca extract and fructan comparing with comercial cleanser A and B: F5 = formulation 5, PE = portulaca extract, Fr = fructan.

프럭탄이 첨가된 제형 5가 비슷한 세포 독성을 보인 B사보다 적게 분비되었으며, A사와 비슷한 수치를 보였다. 그리고 이 값은 대조구(54.3 pg/mL)와 비슷한 수치로 거의 피부자극이 없음을 알 수 있다(Figure 9).

4. 결 론

계면활성제 4종, 알킬에테르설페이트와 알킬아미노프로필베타인, 알킬폴리글리코시드, 지방산 알카놀 아마이드를 기본으로 제조된 제형 5번은 세포 독성과 염증 유발 인자인 IL-1 α 의 분비량 측정 비교 실험에서 다른 제형들보다 자극이 낮게 나왔으며, 13종의 기존 세정제 제품들 중에서 선택된 두 종의 저자극 세정제와 비슷한 결과를 보였다. 그리고 저자극의 계면활성제를 선택했다하더라도 그 자체가 자극원이기 때문에 자극완화 능력과 보습효과가 뛰어난 마치현 추출물과 프럭탄을 첨가하여 세정제에 의한 자극을 낮추는 실험을 실시하여, 마치현 추출물과 프럭탄을 각각 5% 첨가한 제형에서 계면활성제에 의한 자극을 완화시켰다. 이와 같이, 다탐색 법을 이용하여 저자극성을 가짐과 동시에 건조한 피부를 개선하고 가려움 및 염증을 완화 또는 예방할 수 있는 액체 세정제의 조성물을 개발하였다.

참 고 문 헌

1. T. Katsuyuki, H. Shotaro, and A. Masanori, Functional cosmetology, substantiation of cosmetics efficacy: recent progress and future promise, *Society of Cosmetic Chemists of Japan*, 64 (2003).
2. G. Imokawa and Y. Mishima, Cumulative effect of surfactants on cutaneous horny layers: adsorption onto human keratin layers *in vivo*, *Contact Der-*

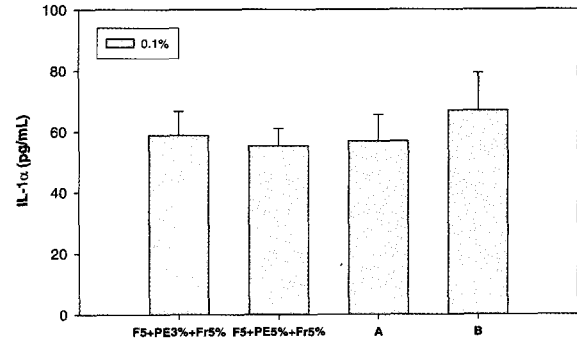


Figure 9. IL-1 α measurement of formulation 5 with portulaca extract and fructan comparing with commercial cleansers: F5 = formulation 5, PE = portulaca extract, Fr = fructan.

matitis, Dec., 5(6), 357 (1979).

3. E. Barany, M. Lindberg, and M. Loden, Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants, *Contact Dermatitis*, Feb., 40(2), 98 (1999).
4. J. R. Milton, Surfactants and interfacial phenomena, 20, *John Willey & Sons*, New York (1989).
5. D. Myers, Surfactants science and technology, 32, *VCH Publishers*, New York (1988).
6. K. Hill, W. von Rybinski, and G. Stoll, Alkyl polyglycosides, 71, *VCH Publishers*, New York (1997).
7. K. S. Mun, Components and uses of medical plants, 227, *Ilweolseogak*, Seoul, Korea (1999).
8. K. Chan, M. W. Islam, M. Kamil, R. Radhakrishnan, M. N. Zakaria, M. Habibullah, and A. Attas, The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea L.* subsp. *Sativa* (Haw.) Celak, *J Ethnopharmacol.* Dec., 73(3), 445 (2000).
9. G. D. Bonnett, I. M. Sims, R. J. Simpson, and A. J. Cairns, Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae, *New Phytologist*, 136, 11 (1997).
10. M. J. Pabst, Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*, *Infect. Immun.*, 15, 518 (1977).
11. K. Tanaka, T. Karigane, S. Fujii, T. Chinzaka, and S. Niagamura, Intermolecular fructosyl and levan biosyl transfers by levan fructotransferase of *Arthrobacter ureafaciens*, *J. Biochem. (Tokyo)*, 97, 1679 (1985).
12. R. Dedonder and C. Peaud-Lenoel, Studies on the levansucrase of *Bacillus subtilis*. I. Production of levans and levansucrase (levan-succharotransfructo-

- sidase) by cultures of *Bacillus subtilis*, *Bull. Soc. Chim. Biol.(Paris)*, **39**, 483 (1957).
13. A. Fuchs, Synthesis of levan by *pseudomonas*, *Nature (London)* **178**, 921 (1956).
 14. 이재섭, 양은경, 이정하, 김철호, 박수남, 이종원, 김기호, *Zymomonas mobilis*에 의해 생성된 Fructan (Levan)의 특성 및 화장품 원료로의 개발, *대한화장품학회지*, **28**(1), 186 (2002).
 15. Z. Ma, S. Ramanadham, J. A. Corbett, A. Bohrer, R. W. Gross, M. L. McDanel, and J. Turk, Interleukin-1 enhances pancreatic islet arachidonic acid 12-lipoxygenase product generation by increasing substrate availability through a nitric oxide-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **271**(2), 1029 (1996).
 16. S. Narayanan, A. Glasser, Y. S. Hu, and A. M. McDermott, The effect of interleukin-1 on cytokine gene expression by human corneal epithelial cells, *Exp. Eye Res.*, **80**(2), 175 (2005).