

양파로부터 추출한 천연염료의 피부자극성 시험

배순이* · 오태광 · 박승춘¹

한국과학기술원생명공학연구소, *한서대학교 의상디자인학과

Skin Irritation of Natural Dyes Extracted from Onion (*Allium cepa*)

Soon Ei Bae*, Tae Kwang Oh and Seung Chun Park¹

*Department of Fashion Design, Hanseo University, P. O. Box 360,
Daegokri, Haememyrn, Seosan, Chungnam, Korea

Microbial Enzyme RU, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejon, 305-600, Korea

(Received April 16, 1997)

(Accepted May 10, 1997)

ABSTRACT : This study was conducted to investigate the skin irritation by transdermal administration of the three dyes. These dyes were originated from onion by using extraction method. By the order of extraction from onion, A-dye was obtained from onion by using water at 90~100°C. B-dye was extracted from A-dye with ethylacetate. After ethylacetate extraction from A-dye, the lower layer named as C-dye. Twenty-four New Zealand white rabbits were divided into three groups. The each groups was consisted of two subgroups according to high dose (extracted dyes) and low dose (the 100-fold dilutions of A-, B- and C-dye). In primary skin irritation test of male New Zealand White rabbits, body temperature and weights were not significantly changed and blood cells were positioned in normal blood cell ranges of health rabbits. Primary irritation index was "0" in the test and control sites of all animals used in this study. By the results obtained in the present test, all dyes were evaluated as a non-irritant on the basis of the criteria of Draize.

Key Words : Skin irritatton, Onion, Natural dye, Extraction

I. 서 론

현대산업은 색감에 대한 산업이라 할 수 있을 만큼 많은 산업분야에서 색감의 선택은 성공의 열쇠라 할만큼 주요한 인자이다. 특히 의류분야에서 그 중요성은 더욱 부각되고 있으며 이러한 의류분야의 기초라 할 수 있는 염료개발은 시급한 과제이다. 염료는 크게 합성염료와 천연염료로 나눌 수 있다. 합성염료의 발견은 1856년 coaltar에서 처음 발견된 이래 수많은 합성염료가 개발되었다. 이러한 합성염료는 대량생산이 가능하여 염색산업에 이바지하여 왔으나, 환경적인 차원에서 그 사용은 환경오염을 불러일으키게 되었으며, 인체에 다량 노출시 독성을 유발할 가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 한편, 최근에 국내에서는 사장되어 가고 있는 천연염료와 염색기술을 발굴하여 국내 의류

산업 뿐만 아니라 국제적인 의류산업에서의 경쟁력의 확보를 위하여 천연염료의 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다.

천연염료의 종류는 매우 다양하나 동물성염료로서는 Cochinealkermes, La dye, Sepia 등이 중요한 염료로 알려져 있고, 식물성 염료로서는 울금(*Curcuma aromatica*), 홍화(*Carthamus tinctorious*, L), 양파(*Allium cepa*) 그리고 쑥(*Artemisia asiatica* Nakal) 등이 있으며, 이러한 식물성염료는 현재 많은 연구의 대상이 되고 있다(이, 1987; 1992). 천연염료를 산업화로 연결시키기 위해서는 대량생산이 가능하여야 한다. 그러므로 본 시험에 사용한 재료는 양파의 껍질에서 추출한 염료이므로 쉽게 재료를 획득할 수 있을 뿐만 아니라 환경보호차원에서 매우 유익한 소재라 할 수 있다. 그러나 천연염료에 대한 생산은 한계가 있으며, 이러한 한계의 단점을 보완하기 위하여 과학적인 연구를 시도하고 있다.

¹To whom all correspondence should be addressed.

양파는 백합과에 속하는 2년초 식물로서 가을에 50 cm 가량의 꽃자루가 뻗어 그 끝에 담녹색의 꽃이 된다. 원산지는 페르시아와 이란이라고 알려져 있지만 정확하지는 않다. 북부유럽에서는 옛날부터 황색염료로서 이용되어 모직물과 아마 면포 등의 염색에서 사용되어 왔다. 짙은 색을 염색하기 위해서는 반복염색을 통하여 색 조절을 할 수 있다(신 등, 1996). 이러한 경험의 염색방법을 산업화시키기 위해서는 과학적인 접근이 중요하고 이러한 실험을 진행하기 위해서는 1차 피부 자극의 독성 실험을 실시하여 천연염료의 개발 초기단계에서 실험자의 안전성을 확보하고 최종목표인 제품의 산업화를 신속하게 수행하고자 토끼에서 1차 피부 자극시험을 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질의 조제

시험물질은 섬유를 위한 염료 개발을 위하여 양파에서 추출한 천연염료를 개발초기 단계에서 피부자극독성시험을 실시함으로써 피부자극에 대한 안전성의 확보를 위하여 실시하였다. 시험물질은 양파의 외피 700 g에 증류수 1.5 l 넣고 90~100°C에서 1시간 동안 가열하여 1차 추출한 액상의 원료를 1 l을 얻었다(A-dye). 1차 액상원료를 다시 동량의 ethylacetate로 2차 추출한 지용성 원료(B-dye)와 추출되지 않은 수용액상의 원료(C-dye)를 갖고 시험을 실시하였다. 그리고 대조물질로는 양파를 추출할 때 사용한 수용액과 이 수용액을 추출한 ethylacetate와 하층에 있는 수용액 층을 각각 이용하였다. 시험물질의 성상은 아래 Table 1에 요약하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

5~7 주령의 New Zealand White, 수토끼(체중 1.85±0.13 kg)로서 snuffles, 설사, ear mite 감염 등의 유무를 확인한 후 임상적으로 건강한 수컷동물을 삼육실험동물 센터에서 구입하여 사용하였다. 동물의 순화 및 시

Table 1. Physico-Chemical property of natural dyes extracted from onion

Properties	Dyes		
	A-dye	B-dye	C-dye
Color	bright brown	dark brown	yellow
pH	4	4	4
Fastness	good	good	bad

험 전 기간 동안, 명진기계상사(서울)에서 제작한 자동 급수 및 자동배설물의 수세처리가 가능한 스테인레스 3단 케이지에 개별 수용하여 관리 및 관찰하였으며, 사료는 실험동물용 사료(천하제일사료(주)) 및 알파파 큐브(섬유질의 공급)를, 그리고 음수는 상수도를 자유로이 섭취시켰다. 약 2주간의 순화기간 동안 매일 일반 증상을 관찰하여 그 중 건강하고 피모상태가 양호한 동물을 선별하였다. 순화 및 시험기간 중 사육환경의 조건은 온도는 22±3°C, 12시간 명암주기, 조도는 170~280 Lux로 설정하였다.

3. 시험물질의 투여 및 투여량

시험물질의 적용 24시간 전에 동물용 전기 clipper로 토끼의 등 부위를 제모하고 한 마리의 토끼에 처치부와 대조부로 나누고 여기에 각각 비찰과 부위와 찰과 부위를 구분하여 모두 4구획을 설정한 후 시험을 실시하였다. 찰과 부위는 주사기 바늘 끝을 이용하여 井자 모양으로 표피에 출혈하지 않는 정도로 손상을 주어 찰과 상태를 만들었다. 시험물질 및 대조물질을 처치하기 위해 외과용 테이프로 사용되는 Microfoam(제조회사, 3 M)을 5 cm×5 cm로 만든 후 여기에서 2.5 cm×2.5 cm 크기의 사각형을 잘라 내어 생성된 창틀 모양을 피부에 접촉시키고, 중앙 부위에 형성된 이 창틀 모양에 거즈 3겹(2.5 cm×2.5 cm)을 고정시킨다. 시험물질 또는 대조물질 0.5 ml을 상기 4구획 중 지정된 곳의 거즈에 적하한다. 모든 시험물질(A-dye, B-dye and C-dye)의 농도는 원료와 원료를 100배 희석한 희석액을 사용하였다.

4. 임상증상 및 시험기간중 체중 측정

순화기간을 포함하여 시험물질 투여 후 시험기간인 일주일 동안 매일 사료소모량 및 음수량과 임상증상 관찰하고 사망여부를 확인하였다.

5. 체중 및 체온측정

체중 측정은 시험에 사용된 모든 토끼에 대하여 시

Table 2. Irritation rating for primary dermal reaction

Rating	Range of primary irritation index
Mild irritant	< 2
Moderate irritant	2 ~ 5
Severe irritant	> 5

시험물질 적용전, 적용후 7일째에 체중을 측정하였으며, 체온은 시험물질 적용전, 적용후 24시간, 7일째에 측정하였다.

6. 혈액학적검사

시험물질을 투여전과 투여후 7일째에 이징맥으로부터 채혈하였다. 채혈 즉시 EDTA 2K가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 적혈구(RBC) 수, 백혈구(WBC)수, 헤모글로빈(Hb)의 양과 PVC를 측정하였다.

7. 부검

시험물질 적용 후 7일째에 전신마취제(케타민, 유한양행)를 이징맥으로 투여하여 안락사를 시킨 후 부검하여 육안적으로 이상유무를 관찰하였다.

8. 시험물질의 적용부위 판정

시험물질을 투여하고 난 뒤 24시간째에 미온수로 시험물질을 잘 제거한 후 투여부위에 대해 홍반과 가피형성, 부종형성 등의 피부자극반응을 관찰하였다. 피부반응의 평가는 국립보건안전연구원 예규 94-3호 의약품 등의 독성시험기준(국립보건안전연구원, 1994)에 준하여 평가하였으며, 이 중에서 자극성의 정도 판정은 Draize의 제안에 따라 24시간 및 72시간만의 성적을 이용하여 1차자극지수(P.I.)를 구하였다(Draize, 1959; Obra *et al.*, 1992). 물질의 자극도의 구분은 Table 2에 표시한 기준에 따라 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

양파에서 얻어지는 천연염료는 오래 전부터 사용되어 왔던 염료로 안전성은 어느 정도 예견되어 있지만,

대량생산의 단계에서 여러 추출, 분리되는 과정을 거치는 동안 얻어질 수 있는 독성물질의 존재여부 확인을 위하여 1차 피부자극시험을 독성시험평가 기준에 따라 실시하였다.

1. 일반 임상 증상

양파로부터 추출하여 얻어진 3종류의 천연염료를 시험물질로하여 투여한 모든 군에서 시험물질로부터 기인된 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며, 시험기간동안 치사한 동물은 한 마리도 발견되지 않았다(Table 3).

2. 체중 및 체온 측정

시험기간 동안의 시험물질에 의한 체중변화는 시험물질 투여전과 시험물질 투여후 7일째 측정하였다. 그 결과, 3개의 시험구들간의 체중변화의 차이는 정상적인 성장율로서 시험물질에 의하여 영향을 받지 않는 것으로 생각되었다. 한편, 본 실험에서의 3종류의 천연염료를 투여한 group들간의 체중변화에 대한 유의성있는 결과는 확인할 수가 없었다. 한편, 시험물질에 의한 동물의 체온의 변화도 Table 4에서 나타낸 것처럼 시험물질 투여전과 투여후 모든 시험기간동안 모든 시험

Table 3. General clinical signs and death rate in the rabbits after applying test materials

Groups	Dyes	Sex	Dose (m)	Animal numbers	Clinical signs	Death rate
Group I		Male	0.5	4	Normal	0/4
Group II		Male	0.5	4	Normal	0/4
Group III		Male	0.5	4	Normal	0/4
Group IV		Male	0.5	4	Normal	0/4
Group V		Male	0.5	4	Normal	0/4
Group VI		Male	0.5	4	Normal	0/4

Group I: A-dye diluted as 100-fold with water; Group II: A-dye; Group III: B-dye diluted as 100-fold with ethylacetate; Group IV: B-dye; Group V: C-dye diluted as 100-fold with water; Group VI: C-dye.

Table 4. Body temperature (mean \pm sd) and weight changes (mean \pm sd) in the rabbits after applying test materials

Groups	Body temperature ($^{\circ}$ C)			Body weight (kg)		
	0 day	1 day	7 day	0 day	7 day	changes
group I	39.03 \pm 0.40	38.58 \pm 0.60	38.62 \pm 0.50	1.79 \pm 0.23	2.01 \pm 0.23	0.23 \pm 0.05
group II	39.03 \pm 0.40	38.42 \pm 0.22	38.63 \pm 0.11	1.93 \pm 0.04	2.16 \pm 0.05	0.22 \pm 0.08
group III	38.63 \pm 0.03	38.62 \pm 0.44	38.64 \pm 0.20	1.85 \pm 0.09	2.08 \pm 0.08	0.24 \pm 0.10
group IV	38.19 \pm 0.59	38.50 \pm 0.84	38.83 \pm 0.25	1.76 \pm 0.20	1.99 \pm 0.25	0.24 \pm 0.05
group V	38.62 \pm 0.01	38.61 \pm 0.38	38.87 \pm 0.25	1.90 \pm 0.07	2.11 \pm 0.07	0.21 \pm 0.02
group VI	38.51 \pm 0.47	38.17 \pm 0.28	38.28 \pm 0.23	1.85 \pm 0.13	2.08 \pm 0.11	0.23 \pm 0.04

The same as presented in table 3.

Table 5. Blood cell changes in the rabbits after applying test materials

Groups	Cell count							
	pre- (control)				post- (7 day)			
	RBC	PCV	WBC	Hb	RBC	PCV	WBC	Hb
group I	6.25±1.11	35.33±4.10	6.93±1.80	10.33±0.46	5.49±0.40	30.60±2.61	5.25±1.03	9.33±0.55
group II	5.90±0.25	36.33±1.72	5.35±0.96	10.70±0.43	5.39±0.76	31.90±5.07	5.93±2.44	10.00±0.76
group III	6.00±0.64	35.28±4.44	5.38±1.77	10.50±0.97	6.19±0.59	34.95±2.91	6.70±1.17	9.58±0.26
group IV	6.66±0.20	34.78±3.09	7.40±1.18	10.38±0.44	5.86±1.18	33.03±5.74	7.83±2.66	9.50±0.12
group V	6.00±0.64	35.28±4.44	5.38±1.77	10.50±0.97	6.19±0.59	34.95±2.91	6.70±1.17	9.58±0.25
group VI	6.52±0.37	39.00±1.73	7.78±2.06	11.1 ±0.66	6.33±0.76	35.75±3.85	7.18±0.50	9.80±0.31

The same as presented in table 3.

Table 6. Results of abraded skin reaction in rabbits after applying natural dye from onion

site	control site								test site									
	shange		erythema & eschar				edema				erythema & eschar				edema			
	phase (hrs)	intact		abraded		intact		abraded		intact		abraded		intact		abraded		
24		72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72		
group I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
group II	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Σ Mean score	0				0				0				0					
Total	0				0				0				0					
P.I.I. ^{b)}	0				0				0				0					
group III	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
group IV	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Σ Mean score	0				0				0				0					
Total	0				0				0				0					
P.I.I. ^{b)}	0				0				0				0					
group V	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
group VI	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Σ Mean score	0				0				0				0					
Total	0				0				0				0					
P.I.I. ^{b)}	0				0				0				0					

^{a)}Time after topical application.

^{b)}P.I.I.: primary irritation index=total/4.

군들은 정상 체온의 범위에 들었다.

3. 혈액학적 변화

양파에서 추출된 시험물질은 지용성 및 수용성의 혼합물질인 점을 감안할 때 많은 성분들이 피부를 통한 물질의 흡수를 예상할 수가 있어 흡수된 물질로 인한 혈액학적 변화를 알아보하고자 시험을 실시하였다. 그 결과 3 종류의 시험물질이 투여된 모든 그룹에서 실험 전과 실험 후의 혈액학적 변화는 인정할 수가 없었다. 또한 투여 후 모든 시험구에서 혈액학적 변화는 투여 전과 마찬가지로 혈액학적 수치의 정상 범주에 들었으며, 실험한 모든 동물은 임상적으로 모두 활발하고 건강한 상태를 보여 혈액학적 변화는 없는 것으로 사료되었다 (Table 5).

4. 투여부위 관찰

시험물질로 양파로부터 추출한 천연염료 3 종류를 토끼의 피부에 투여하여 홍반-가피 형성에 미치는 영향을 관찰하였다. 3 종류의 시험물질을 도포한 후 24시간째 비찰과부위와 찰과부위 모두에서 자극현상의 관찰을 찾아볼 수가 없었으며 부중에 미치는 영향도 관찰할 수가 없었다. 대조물질을 투여한 전 시험군의 찰과 및 비찰과 부위 모두에서 시험기간 동안 홍반-가피 또는 부중현상은 일례도 관찰되지 않았다. 한편 천연염료인 3종의 시험물질 적용 후 24, 72시간에서의 홍반-가피 및 부중 형성은 찰과 및 비찰과 부위 모두에서 관찰되지 않았다 (Table 6). 그러나, 시험기간 동안 특이한 사항은 group I과 group II에서 찰과부위의 상처부위가 대조물질이 투여된 찰과부위보다 천연염료가 투여된 찰과부위에서 빠른 상처의 치유를 보여주었으며, group III과 group IV에서도 같은 현상을 보였다. 그러나 group V와 group VI에서는 그러한 현상을 관찰할 수가 없었다. 이러한 결과를 갖고 추측하면, 양파에는 상처 치유 성분을 갖고있으며, 이러한 효과가 group

III과 group IV에서 나타난 것으로 보아 상처치유촉진 성분은 에틸아세테이트층에서 추출되므로 지용성인 성질을 갖는 것으로 생각되었다. 이러한 현상에 대한 연구는 계속적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 시험물질 '양파에서 추출한 섬유 염색을 위한 천연물질'에 대한 피부1차자극성을 보기 위해 24 마리의 백색토끼를 이용해서 국립보건안전연구원 예규 94-3 '의약품 등의 독성시험기준'에 준하여 피부자극성을 평가한 결과 시험물질에 기인한 일반 임상증상은 관찰할 수 없었으며 체중 및 체온에 미치는 변화도 없었다. 국소(피부1차) 자극성은 육안적으로 비찰과 피부와 찰과 피부에 있어서의 피부 반응을 시험물질을 적용한 후 24시간, 72시간째에 관찰하였으며, 특히 자극정도를 평가하기 위하여 1차 자극지수(primary irritation index; P.I.I.)를 시험물질 적용 후 "0"으로 나타나 양파에서 추출한 천연염료는 상기 시험용량에서 무자극성인 물질로 평가되었다.

참고문헌

- Draize, J.H. (1959): Dermal toxicity. In *Appraisal of Safety of Chemicals in Foods, Drugs, and Cosmetics*. Staff of the Division of Pharmacology, Food and Drug Administration. Department of Health, Education, and Welfare.
- Obara, S., Muto, H. (1992): Primary dermal and eye irritability tests of hydrophobically modified hydroxypropyl methylcellulose in rabbits. *J. Toxicol. Sci.*, **17**, 21-29.
- 국립보건안전연구원 (1994): 의약품 등의 독성 시험 기준. 국립보건안전연구원 예규 제94-3호 (1994.4.14.).
- 신인수, 홍경옥 (1996): 천연염색의 견뢰도 분석, 원광대학교 대학원보고서, **15**, 53-69.
- 이순섭 (1987): 고대 錦織문화의 연구, 한양전문대학회지, **10**, 445-475.
- 이순섭 (1992): 의복에 있어서 자연염색의 실용성연구 (1), 한양전문대학회지, **15**, 191-211.
- 이순섭 (1992): 의복에 있어서 자연염색의 실용성연구 (1), 한양전문대학회지, **15**, 389-405.