

녹두추출물의 자극완화 효과에 관한 임상 연구

안기웅[†] · 강태원 · 정지현 · 조병기

코리아나화장품 연구소

Clinical Studies on the Anti-Irritation Effects of Mung Bean (*Phaseolus aureus*) Extract in Cosmetics

Gi Woong Ahn[†], Tae Won Kang, Ji Hean Jeong, and Byoung Kee Jo

Coreana Cosmetics R&D Center, 204-1, Jeongchon-ri, Seonggeo-eup, Cheonan-si, Chungnam 330-833, Korea

요약 본 연구는 화장품에서 빈번히 사용되고 있는 다양한 자극원에 대한 녹두추출물의 자극완화 효과를 알아보기 위한 임상 연구에 관한 것이다. 녹두는 해독 작용이 탁월하여 예로부터 민간요법이나 화장료의 재료로 사용되어 왔다. 그러나, 녹두의 생물학적인 효능 및 구성 성분을 구체적으로 밝혀낸 연구는 전무한 실정이다. 우리는 기존의 연구를 통하여 녹두의 에탄올 추출물이 항산화 및 항염증 효과가 우수한 것을 확인하고 이러한 효능을 제공하는 유효물질인 비텍신(vitexin)과 이소비텍신(isovitexin)을 분리해낸 바 있다. 본 연구에서는 녹두추출물의 항염증 기작을 살펴보고자 흰쥐 복강 비만세포로부터의 항원 유도성 히스타민 유리 억제능 및 5-lipoxygenase 활성 억제능을 측정하였다. 그 결과 녹두추출물은 농도 의존적으로 히스타민 유리를 억제시켰지만 5-lipoxygenase 활성을 억제하는 효과는 나타내지 않았다. 또한, 현재 화장품에 널리 사용되고 있는 자극 유발 물질인 lactic acid, retinol, 방부제 등에 대한 녹두추출물의 자극완화 효과를 알아보기 위하여 다양한 임상 연구를 수행하였다. 20명의 피험자를 대상으로 실시한 인체 첩포시험 결과, 5.0% lactic acid, 4000 IU retinol, 1.0% Preservative mixture가 들어간 제형에 2.0% 녹두추출물을 첨가할 경우 각각 60%, 30%, 50% 정도의 우수한 자극 억제 효과를 보여주었으며, 주관적인 자극을 평가하는 피부 자극감시험 결과도 2.0% 녹두추출물을 함유하는 제형에서 약 50~30%의 자극완화 효과를 보여주었다. 마지막으로, 30명의 피험자를 대상으로 4주간 실시한 double-blind usage test 결과 역시 녹두추출물을 화장품에 사용하였을 경우 우수한 항자극 효과를 보임을 확인하였다.

Abstract: The aim of this study is to assess the anti-irritation activities of mung bean (*Phaseolus aureus*) extract against various irritants used in cosmetics. For its antidotal activity, mung bean has been used as a medicinal or cosmetic material since ancient times. However, there have been few reports describing the biological activities of these beans and no comprehensive surveys of the constituents. We obtained an ethanolic extract of mung bean and isolated the major constituents, such as vitexin and isovitexin. And we previously reported that the mung bean extract containing vitexin and isovitexin had excellent antioxidant and anti-inflammatory activities. To investigate the mechanisms of anti-inflammatory activity of mung bean extract, we examined the inhibitory effects on histamine release from rat peritoneal mast cells and lipoxygenase activity. Mung bean extract inhibited histamine release in a concentration dependent manner but showed no inhibitory activity in the 5-lipoxygenase assay. And, clinical studies were conducted to evaluate the anti-irritation effects of mung bean extract against various irritants used in cosmetics such as lactic acid, retinol, and preservatives. When 2.0% of mung bean extract was applied to cosmetic formulae containing each of irritants, it revealed considerable anti-irritation efficacy. Our results of the human patch test with 20 volunteers showed that this extract reduced skin irritations caused by 5.0% lactic acid, 4000 IU retinol, and 1.0% preservative mixture by about 60%, 30%, and 50% respectively. The stinging potential test for assessing subjective irritation also showed that the extract reduced the unpleasant sensations by about 50~30%. Finally, we performed a double-blind usage test with 30 subjects to compare formulae containing mung bean extract with placebo. From the results of questionnaires for 4 weeks of use, we confirmed the excellent anti-irritation effect of mung bean extract. Conclusively, we could discover new material that had anti-irritation effects and apply this mung bean extract to the final cosmetic products successfully.

Keywords: mung bean (*Phaseolus aureus*) extract, anti-irritation, clinical studies, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: gwahn@coreana.co.kr)

1. 서 론

식물이 다양한 활성 성분을 포함하고 있다는 것은 익히 알려진 사실이다. 많은 식물 추출물들이 통증완화, 해독, 해열, 방부, 수렴, 항염 등의 효능을 가지는 것으로 알려져 있으며[1], 약리 활성을 가지는 다양한 성분들이 식물에서 추출되었다. 현재 식물 추출물은 다양하게 이용되고 있으며, 화장품 성분으로서도 아주 유용하게 이용된다. 화장품 성분으로 쓰이는 식물 추출물의 대표적인 예가 녹두추출물이다.

녹두는 장미목 콩과의 한해살이풀로 줄기의 길이는 60~80 cm이다. 몸 전체에 갈색의 거친 털이 있고 잎은 어긋나며, 겹잎으로 긴 잎자루 끝에 3개의 작은 잎이 달린다. 꽃은 8월에 피며 황색이다. 꼬투리는 길이가 5~6 cm로 가늘고 길며 곁에 거친 털이나 돌기가 있다. 꼬투리 안에는 10~15개의 열매가 들어 있고 녹색 또는 갈색으로 그물같은 무늬가 있다[2]. 주성분은 녹말(53%)이며 단백질의 함량이 25~26%에 이르러 영양가가 높다. 녹두는 해독·해열작용이 있으며, 종기 등의 피부병 치료에 쓰이기도 하였다[3]. 또한 녹두분말은 먼지나 오염을 제거하기 위해 비누 대용으로 이용되기도 하였다.

그러나 녹두의 구체적인 생물학적 활성을 연구한 논문은 거의 없으며 구성 성분에 대한 연구도 거의 이루어지지 않았다. 현재까지 알려진 성분으로는 phaseol, phaseolin 유도체 및 몇 종류의 isoflavonoid가 있다[4,5].

우리는 기존의 연구를 통하여 녹두의 에탄올 추출물이 항산화 및 항염증 효과가 우수한 것을 확인하고 이러한 효능을 제공하는 유효물질인 비텍신(vitexin)과 이소비텍신(isovitexin)을 분리해낸 바 있다[6].

본 연구에서는 녹두추출물의 항염증 기작을 살펴보고, 현재 화장품에 널리 사용되고 있는 자극 유발 물질인 lactic acid, retinol, 방부제 등에 대한 녹두추출물의 자극 완화 효과를 알아보기 위하여 다양한 임상 연구를 수행하였다.

2. 실험 방법

2.1. 녹두추출물

국내산 녹두로부터 껍질을 제거하고 정제수로 세척한 후 건조하고, 작은 조각으로 파쇄한 뒤, 여기에 그 건조중량의 1~10배의 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.

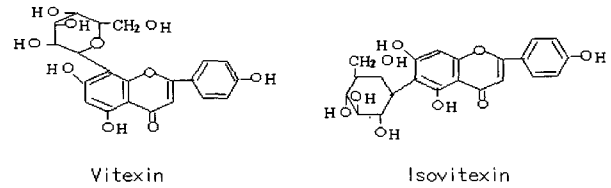


Figure 1. The structure of vitexin and isovitexin isolated from mung beans.

2.2. 비만세포로부터의 compound 48/80 유도성 히스타민 유리 억제 효능 시험

흰쥐의 복강에 존재하는 비만세포를 이용하여 녹두추출물의 항원 유도성 히스타민 분비 억제 효과를 측정하였다. 실험에 사용된 흰쥐는 male Slc, Wistar strain rat (160~220 g)으로 KFDA에서 구매하였으며, Sullivan *et al.* 방법[7]에 의해 비만세포를 얻었다. 비만세포의 순도는 Brayet *et al.*에 의해 제안된 방법에 의해 측정하였다[8]. 시험물질은 증류수 또는 에탄올에 녹여 비만세포에 적용하였으며, 시험물질 적용 10분 후에 compound 48/80 (0.02 mg/mL)을 첨가하였다. 혼합물을 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 얼음 위에 올려 반응을 멈추었다. 반응물을 2000 rpm으로 회전시킨 후 상층액의 히스타민 양을 Shoe *et al.* 방법[9]에 의해 측정하였다. 시험물질이 Compound 48/80에 의해 비만세포에서 분비되는 히스타민의 양을 감소시키는 정도를 측정하였으며, 대조군으로는 천식과 관련된 알러지 치료제인 Disodium cromoglycate (DSCG)가 이용되었다.

2.3. 자극원 및 녹두추출물을 함유하는 조성물 제조

화장품에 빈번히 사용되고 있는 다양한 자극 유발 물질에 대한 녹두추출물의 자극완화 효과를 평가하기 위하여 여러 가지 조성물을 제조하였다(Table 1). 5%의 lactic acid, 4000 IU retinol, 1.0% preservative mixture (methyl paraben (0.4%), propyl paraben (0.2%), phenoxyethanol (0.4%))이 본 실험에서 자극원으로 사용되었으며, 2.0% 녹두추출물이 자극완화제로서 화장료 조성물에 적용되었다. 제형#1은 negative control이며, #2, #3, #4는 자극원만 포함하는 positive control이다.

2.4. 인체 철폐시험

피부 일차 자극을 평가하기 위한 인체 철폐시험을 CTFA guideline에서 제시한 방법에 약간의 변형을 가하여 실시하였다[10]. 평소 피부 질환 및 알러지가 없는 20명의 피험자(남자 12명, 여자 8명)를 대상으로 실시되었으며, 연령 분포는 24세~34세, 평균 연령은 29세였다. 우선, 철폐 부위인 전박을 70% 에탄올로 닦아내고 건조시킨 후, 시험물질이 적용된 Finn chambers (Epitest Ltd Oy, Finland)

Table 1. Formulas Used in This Experiments

Raw Materials	Dosage(% w/w)						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Caprylic/Capric triglyceride	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
Cetearyl alcohol & Cetearyl glucoside	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
Polyacrylamide & C13-14 Isoparaffin & Laureth-7	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
Potassium hydroxide (10.0%)	-	7.0	-	-	7.0	-	-
Lactic acid	-	5.0	-	-	5.0	-	-
All-trans retinol	-	-	4000 IU	-	-	4000 IU	-
Preservative mixture	-	-	-	1.0	-	-	1.0
Mung bean extract	-	-	-	-	2.0	2.0	2.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

를 시험 부위에 철폐하였다. 24시간 후에 철폐를 제거하고 30분, 24시간, 48시간 후에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가 기준은 International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)의 판정 기준에 따랐으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다[11,12].

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

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)

2.5. 자극감 시험(Stinging Potential Test)

자극원 및 녹두추출물을 함유하는 조성물의 주관적 자극을 평가하기 위하여 자극감 시험을 수행하였다. Stinger는 steam generator (Vaporzone 707, Taiwan)를 사용하여 15분 동안 충분히 sweating 시키고 나서 충분한량의 시료를 손에 문혀 시험물질을 각각 왼쪽과 오른쪽의 코 주위(nasolabial fold) 및 뺨을 중심으로 강하게 비빈다. 20명의 피험자(남자 10명, 여자 10명)를 대상으로 실시하였으며 연령 분포는 23세~33세, 평균 연령은 29세였다. 피험자들은 주관적인 자극(stinging, itching, burning, etc)의 자극 정도를 평가하게 된다. 즉, 0= 자극 없음, 1= 자극 약간 있음, 2= 자극이 강함, 3= 자극이 매우 강함으로 표시한다. 또한, 적용 후 자극 반응이 나타나는 시간에 따

라 30초, 2.5분, 5분, 8분 등의 4 구분으로 나뉘었으며, 30초 이내에 나타나는 경우를 Intense stinging (4점), 2.5분 Mild stinging (3점), 5분 Moderate stinging (2점), 그리고 8분 이내에 나타나는 경우를 Delayed stinging (1점)으로 구분하여 평가하였다. 자극의 정도는 하기의 공식으로부터 계산된 자극양성율로 판정하였다.

$$\text{Response rate (\%)} =$$

$$\frac{\text{Response score} \times 100}{\text{Maximum score}(30 \times \text{total subjects} \times \text{No. of response})}$$

2.6. Double-blind usage test

녹두추출물을 함유하는 조성물의 자극완화 효과를 최종적으로 평가하기 위하여 Double-blind clinical usage test를 수행하였다. 23세~34세의 30명의 여성 피험자를 대상으로 실시하였으며, 피험자들은 녹두추출물 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. 비만세포로부터의 compound 48/80 유도성 히스타민 유리 억제 효능 시험

이미 본 연구진은 vitexin, isovitexin을 활성 성분으로 포함하는 녹두추출물이 mouse ear edema assay 시험 결과, 탁월한 항염증 효과를 보임을 보고한 바 있다. 이러한 항염증 효과는 녹두추출물의 우수한 항산화 효과에 의해 일부 설명되어질 수 있다. 본 연구에서는 이러한 항산화 작용 이외에 녹두추출물의 항염증 기작을 좀 더 밝히고자 비만세포로부터의 compound 48/80 유도성 히스타민

Table 2. Formula Used in Double-Blind Usage Test

Raw Materials	Dosage(% w/w)	
	Formula #8	Placebo
Panthenol	0.20	0.20
Betaine	4.00	4.00
Ethoxydiglycol	0.50	0.50
Methyl gluceth-20	0.80	0.80
PEG/PPG-17/6 copolymer	1.00	1.00
Glycerin	1.50	1.50
Ethanol	7.00	7.00
Methyl paraben	0.10	0.10
PPG-26 Buteth-26 & PEG-40	0.20	0.20
Hydrogenated castor oil		
Fragrance	0.06	0.06
Lactic acid (10.0%)	0.17	0.17
Mung bean extract	2.00	-
Total	100.00	100.00

유리 억제 효능 시험 및 5-lipoxygenase 활성 억제 효능 시험을 실시하였다. 시험 결과, 녹두추출물은 5-lipoxygenase assay에서는 활성 억제 효과를 보이지 않았으나 (date not shown), 히스타민 유리를 상당히 억제하는 효과를 보였다(Figure 2). 흰쥐 복강 비만세포로부터의 compound 48/80 유도성 히스타민 유리 억제 정도는 녹두추출물의 양을 50, 100, 200, 500 ug/mL으로 증가시키에 따라 16.2, 38.4, 60.1, 64.3%로 농도 의존적 증가 경향을 보였다. 또한 알러지 치료제로 널리 사용되고 있는 약물인 Disodium cromoglycate (DSCG)와 유사한 히스타민 유리 억제 효과를 지니고 있는 것을 알 수 있다.

3.2. 인체 첩포시험

Lactic acid, retinol, preservative 등과 같이 화장품에 빈번히 사용되는 자극원에 대하여 녹두추출물의 피부 일차 자극 완화 효과를 평가하기 위하여 인체 첩포시험을 실시하였다. 피부 일차 자극 정도는 크게 5 grade로

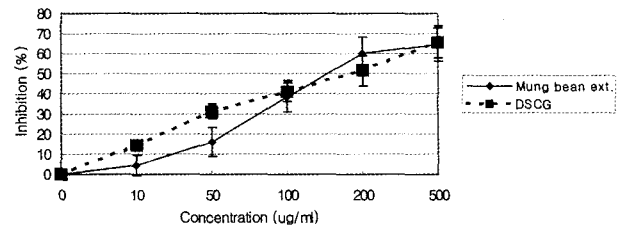


Figure 2. Inhibitory effects of mung bean extract on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80.

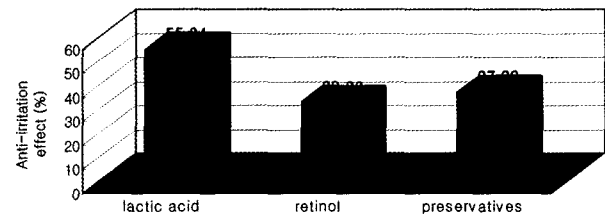


Figure 3. Anti-irritation effects of mung bean extract against irritants used in cosmetics.

나누어 평가하였다 0~0.99 (Grade I, no irritation), 1.0~1.99 (Grade II, slight irritatin), 2.00~2.99 (Grade III, moderate irritation), 3.00~4.99 (Grade IV, strong irritation), 5.00~ (Grade V, severe irritation). 인체 첩포시험 결과는 하기 Table 3 및 Figure 3에 제시하였다.

자극원 및 녹두추출물 모두를 포함하고 있지 않은 formula #1 (negative control)의 평균 피부 반응도는 1.11이었으며, 조성물 내의 2.0% 녹두추출물은 5.0% lactic acid에 대하여 formula #2의 평균 피부반응도 5.56을 formula #5의 평균 피부반응도 2.50으로, 4000 IU retinol에 대하여 formula #3의 평균 피부반응도 2.50을 formula #6의 평균 피부반응도 1.67로, 1.0% preservative mixture (methyl paraben (0.4%), propyl paraben (0.2%), phenoxyethanol (0.4%))에 대하여 formula #4의 평균 피부반

Table 3. Results of Human Patch Test with Various Formulas

Formulas	Results of evaluation (No. of subjects)												Mean Score (n=20)	Assessment	Grade
	30 mins				24 hrs				48 hrs						
	±	+	++	+++	±	+	++	+++	±	+	++	+++			
#1	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1.11	Slight irri.	II
#2	10	2	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	5.56	Severe irri.	V
#3	4	1	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	2.50	Moderate irri.	III
#4	9	1	-	-	3	-	-	-	2	-	-	-	4.44	Strong irri.	IV
#5	6	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2.50	Moderate irri.	III
#6	4	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1.67	Slight irri.	II
#7	7	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2.78	Moderate irri.	III

Table 4. Results of Stinging Potential Test with Various Formulas

Test Materials	Response score	Response rate (%) (n=20)	Anti-sting effect (%)
Formula #2	98	2.33	45.92
Formula #5	53	1.26	
Formula #3	57	1.36	27.94
Formula #6	41	0.98	
Formula #4	79	1.88	31.38
Formula #7	54	1.29	

응도 4.44를 formula #7의 평균 피부반응도 2.78로 감소시키는 것을 확인할 수 있다. 전체적으로 자극완화제로서 녹두추출물을 함유하는 조성물이 positive control과 비교해서 30~60%의 자극완화 효과를 보여주는 것을 알 수 있다.

3.3. 자극감 시험(Stinging Potential Test)

피부의 주관적 자극을 평가하기 위한 자극감 시험을 인체 첩포시험에 사용된 동일한 조성물에 대하여 실시하였다. Table 4에서 알 수 있듯이, 녹두추출물은 formula #2 (lactic acid 5.0%)의 자극양성을 2.33을 formula #5의 자극양성을 1.26으로, formula #3 (retinol 4000IU)의 자극양성을 1.36을 formula #6의 자극양성을 0.98로, formula #4 (preservative mixture 1.0%)의 자극양성을 1.88을 formula #7의 자극양성을 1.29로 감소시킴을 관찰할 수 있다. 전체적으로 녹두추출물을 포함한 제형이 positive control과 비교해서 30~50%의 자극완화 효과가 있음을 알 수 있다.

3.4. Double-blind usage test

Double-blind usage test는 제품의 안전성을 최종적으로 평가하는데 일반적으로 사용되는 방법이다. 따라서, 본 연구에서도 녹두추출물의 자극완화 효과를 최종적으로 평가하기 위하여 녹두추출물을 함유하는 조성물 formula #8 및 placebo를 30명의 피험자를 대상으로 4주간의 사용성 시험을 실시하였다. Figure 4~6은 double-blind usage test 결과를 보여준다.

Figure 4에 따르면, 2.0% 녹두추출물을 제품(skin lotion)에 적용하였을 때 total irritation score를 196에서 122로 감소시켜 약 37.8%의 자극 완화를 나타내었다. Figure 5는 제품 적용 기간에 따른 자극 발생 양상을 보여주고 있다. 일반적으로 제품 적용 초기에 높은 피부 자극을 보이다가 시간이 경과함에 따라 피부 자극이 감소하는 경향을 잘 나타내 주고 있다. 2.0% 녹두추출물이 포함된 제품에서 제품 적용 초기 단계의 자극을 많이 감

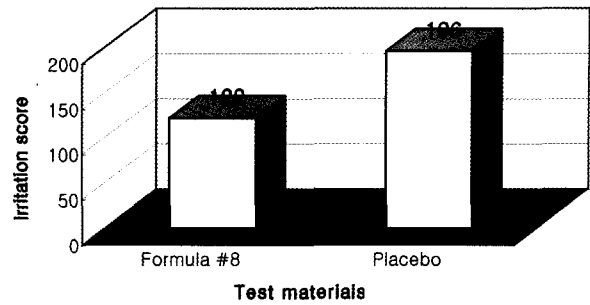


Figure 4. Total irritation scores of formula #8 containing 2% mung bean extract and placebo calculated from the daily questionnaires.

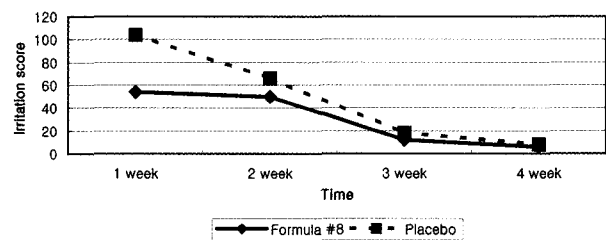


Figure 5. Irritation scores as a function of time.

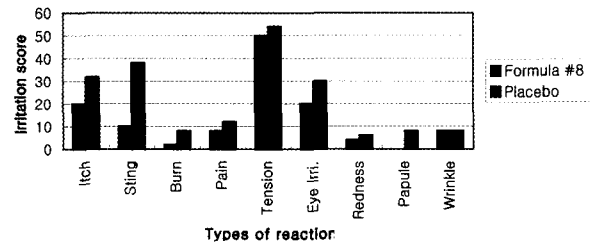


Figure 6. Types of reaction examined in this usage test.

소시킴을 확인할 수 있다. Figure 6은 itching, stinging, burning, eye irritation 등의 다양한 자극에 대한 녹두추출물의 우수한 자극완화 효과를 보여주고 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 녹두추출물의 항염증 기작을 살펴보고, lactic acid, retinol, preservatives 등과 같은 현재 화장품에 빈번히 사용되고 있는 자극 유발 물질에 대한 녹두추출물의 자극완화 효과를 알아보고자 다양한 임상 연구를 수행하였다.

시험 결과, 활성 성분으로 vitexin 및 isovitexin을 포함하는 녹두추출물을 피부 자극을 유발시키는 자극원을 포함하는 조성물에 적용함으로써 우수한 자극완화 효과를 확인할 수 있었다. 인체 첩포시험 및 자극감시험 결과, 녹

두추출물을 포함한 조성물이 자극원만을 포함하는 조성물에 비해 약 30~60% 정도의 우수한 자극완화 효과를 보여주었으며, Double-blind usage test 결과에서도 녹두추출물의 탁월한 자극완화 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 자극완화 효과는 녹두추출물의 항산화효과, 항염증 효과, 그리고 히스타민 유리 억제 효과 등으로 설명되어질 수 있다. 결론적으로, 본 연구를 통하여 화장품에 적용할 수 있는 우수한 자극완화 물질로 녹두추출물을 발견하였으며, 이와 같은 녹두추출물은 저자극 화장품을 개발하는데 큰 기여를 할 것으로 기대되어진다.

참 고 문 헌

1. P. Ody, Herbal Insights - A close look at active constituents of medicinal herbs. *SOFW Journal*. **121**, 8~11 (1995).
2. J. W. Purseglove, *Phaseolus aureus* in tropical crops: Dicotyledons. London: Longman. 290~294 (1974).
3. Z. Huh, Dong-Eu-Bo-Gam (1613). Namsadang, Seoul, 1109 (1966).
4. M. D. Woodward, New isoflavonoids related to kievitone from *Phaseolus Vulgaris*. *Phytochem* **18**, 2007~2010 (1979).
5. M. J. O'Neill, S. A. Adesanya, and M. F. Roberts, Isosojagol, A coumestran from *Phaseolus coccineus*. *Phytochem* **23**, 2704~2705 (1984).
6. B. J. Kim, J. H. Kim, M. Y. Heo, and H. P. Kim, Antioxidant and anti-inflammatory activities of the mung bean. *Cosmetic & Toiletries Magazine*. **113**, 71~74 (1998).
7. T. J. Sullivan, K. L. Parker, W. Stenson, and C. W. Parker, Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells I. Response to pharmacologic, metabolic, and physical stimuli. *J. Immunol.*, **114**, 1473~1479 (1975).
8. Bray, R. E., Van Arsdell, P. P. *In vitro* histamine release from rat mast cells by chemical and physical agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **106**, 255 (1961).
9. P. A. Shore, A. Burkhalter, and V. H. Cohn Jr., A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182~186 (1959).
10. CTFA safety testing guideline: the cosmetic, toiletry and fragrance association, Inc. Washington, D. C. 20023 (1991).
11. J. M. Lachapelle, Textbook of contact dermatitis. London : Springer Verlag (1992).
12. T. Fisher, H. Maibach, Finn chamber patch test technique. *Cont. Derm.*, **11**, 137~140 (1984).