

소루쟁이 뿌리 추출물(*Rumex crispus L.*)의 라디칼 소거능과 항균력 평가 및 화장품 적용 가능성에 관한 연구

박유진¹ · 양재찬^{2†}

¹목원대학교 화장품공학과, 대학원생

^{2,†}목원대학교 화장품공학과, 교수

(2024년 1월 29일 접수: 2024년 2월 26일 수정: 2024년 2월 27일 채택)

A Study on Antioxidant and Antibacterial Efficacy Evaluation and Cosmetic Application of *Rumex crispus L.* Root Extract

Yu-Jin Park¹ · Jae-Chan Yang^{2†}

^{1,2}Dept. of Cosmetics Engineering, College of Technology Sciences.

Mokwon University, Daejeon, 35349, South Korea.

(Received January 29, 2024; Revised February 26, 2024; Accepted February 27, 2024)

요약 : 본 연구는 소루쟁이 뿌리 추출물의 유효성 실험을 위해 항산화 활성 및 항균 효능을 확인하고 제형 안정성을 확인하였다. 항산화 활성으로는 DPPH radical scavenging, FRAP activity, ABTS⁺ radical scavenging, SOD-like activity를 진행하였으며 항균 활성 평가는 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* 균주에 대해 생육저해환과 최소저해농도를 평가하였다. 또한 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 스킨을 21일 동안 pH, 온도, 일광에 대한 경시 변화를 확인하였다. 항산화 평가 결과 0.0625-1mg/mL 농도에서 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 생육저해환의 경우 100mg/mL 농도에서 각 균의 생육저해환이 10.45±0.34, 9.77±0.59, 9.92±0.22, 10.08±0.12로 대조군인 Methyl paraben에 비해 우수한 항균력을 확인할 수 있었고 최소저해농도의 경우 100mg/mL 농도에서 *S. aureus*, *E. coli*에 대한 항균력을 확인하였다. 스킨의 pH 농도가 4.0, 6.0, 7.0에서 흡광도의 변화가 미미하였고, 4°C, 25°C, 40°C에서 온도가 높아질수록 변색되는 것을 확인하였다. 또한 스킨을 일광과 실온에서 보관했을 때 일광에서 변색이 일어난 것을 보아 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 화장품은 차광하여 저온 보관하면 변색을 방지 할 수 있을 것으로 추측된다. 본 연구 결과를 종합하였을 때 소루쟁이 뿌리 추출물은 항산화, 항균 활성을 기대할 수 있는 화장품 원료로 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

주제어 : 소루쟁이 뿌리 추출물, 활성산소종, 항원-항체 반응, 스킨 제형, 광 안정성

†Corresponding author

(E-mail: rabbit@mokwon.ac.kr)

*이 연구는 2023년 12월 목원대학교 박유진의 석사 졸업논문으로 제출한 것을 수정·보완하여 작성됨

Abstract : This study confirmed the antioxidant activity and antimicrobial efficacy and formulation stability for the effectiveness experiment of *Rumex crispus*, *L* root extract. For antioxidant activity, DPPH radical scavenging, FRAP activity, ABTS+ radical scavenging, and SOD-like activity were performed. Antimicrobial activity was evaluated for *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* strains. In addition, skin containing *Rumex crispus*, *L* root extract is checked over time for pH, temperature, and daylight for 21 days. As a result of antioxidant evaluation, it was confirmed that the activity increased in a concentration-dependent manner at a concentration of 0.0625–1 mg/mL. The clear zones of each bacterium at 100mg/mL concentrations were 10.45 ± 0.34 , 9.77 ± 0.59 , 9.92 ± 0.22 , and 10.08 ± 0.12 , which were superior to the control group Methyl paraben, and the antibacterial power of *S. aureus* and *E. coli* was confirmed at 100mg/mL concentration for MIC. There was little change in absorbance when the pH of the skin was 4.0, 6.0, and 7.0 and At 4°C, 25°C, and 40°C, it was discolored as the temperature increased. It was also observed that discoloration occurred when exposed to daylight. This is presumed to be able to prevent discoloration when it is shielded and stored at low temperatures. When the results of this study are summarized, *Rumex crispus*, *L* root extract is considered to have high value in use as a cosmetic raw material that can expect antioxidant and antibacterial activities.

Keywords : *Rumex crispus*, *L* root extract, Reactive Oxygen Species, Antigen-antibody reaction, Skin, Light Stability

1. 서론

피부는 체내 수분을 보유하고 신체의 외부 표면을 둘러싸고 있는 가장 큰 기관으로 성인 체중의 약 16%를 차지하며, 자외선에 의한 물리적 손상과 미생물과 같은 외부 침입 인자에 의한 생물학적 손상으로부터 신체를 보호하며 면역반응을 나타내는 필수적인 장벽기능을 수행하는 대표적인 장기이다. 인체의 피부는 화학 물질, 환경 오염, 자외선과 같은 외부 환경에 노출되면 활성산소를 증가시켜서 피부의 면역 기능을 저하하고, 여드름, 아토피성 피부염 유발 및 기미나 주름, 탄력 감소 등의 여러 기능 저하로 인한 노화가 촉진된다[1-3]. 따라서 피부의 노화를 촉진하는 활성산소를 과잉 생성되지 않게 효율적인 제거를 위해 적절한 항산화제를 사용해야 한다[4]. 또한 아토피 피부염 환자에 대한 면역학적인 관점에서 보면 *Staphylococcus*의 군락화가 피부에서 병변을 악화시킨다는 증거를 포함해 다양한 근거들이 아토피 피부염 환자의 피부에서 피부 표면 항원의 중요성을 강조하고 있다. 피부 표면에 존재하는 항원이 아토피 피부염 환자의 피부에서 영향을 미친다는 첫 번째 근거로는 아토피 피부염 환

자에서 존재하는 T세포가 특정 항원에 반응하여 증식한다[5,6]. 두 번째 근거로는 아토피 피부염 환자에서 allergen-specific IgE 과 allergen-reactive T cell이 존재해서 특정 항원에 대한 IgE-enhanced T cell response를 보인다는 것이다[7]. 이러한 항원들은 아토피 피부염 환자 피부에 항원을 도포하였을 때, 염증 반응을 유발한다는 보고와[8] 병의 중증도와 skin-colonized *S. aureus*의 accessory gene regulator groups의 변화도의 상관성이 있다는 보고들이 이를 뒷받침하고 있다[9]. 피부의 수분감소는 건조증과 여러 기능 저하로 이어지기 때문에 수분을 보충해 줄 수 있는 화장품을 사용해야 한다. 화장품은 “인체를 정결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 바르고 문지르거나 뿌리는 등 이와 유사한 방법으로 사용되는 물품으로써 인체에 대한 작용이 경미한 것”으로 정의되고, 기초화장품은 남녀노소를 불문하고 모든 계층이 사용하고 있으며 사용 용도에 있어서 얼굴에만 국한되는 것이 아닌 모발, 두피, 손, 발 그리고 신체 전신을 대상으로 각각의 특성과 효능에 맞춘 다양한 종류의 화장품이 등장하고 있다. 그러나 소비자의

니즈에 따라 화학적 원료의 비중을 줄이려는 경향이 강하며, 이로 인해 천연화장품에 관한 관심이 높아지고 있다. 화학적 물질에 빈번히 노출되는 현대인의 생활 속에서 민감한 피부와 아토피 피부염의 환자가 매년 증가하고 있으며 어린이뿐만 아니라 성인에 이르기까지 민감 및 아토피 피부 증상을 개인의 문제에 머물지 않고 사회적 관심을 기울여야 하는 문제로 대두되고 있다[10].

소루쟁이는 국내에서 자생하고 있는 마디풀과의 *Rumex* 속 식물이며 여러해살이풀로 습한 곳에서 잘 자라는 특징을 가지고 있다. 또한 어린 소루쟁이를 식용으로 사용하며, 한의학에서는 양제근(羊蹄根)라 하고 방광염, 쓸개 관련 질병, 담즙의 분비 장애, 비장 질환, 피부병 등을 비롯해 여러 종양이나 암에 대한 보조치료제로 사용하고 있다. 소루쟁이(*Rumex crispus L.*) 뿌리는 한방에서 양제근(羊蹄根), 우이대황(牛耳大黃)이라 하고, 대변조결(大便燥結), 황달(黃疸), 토혈(吐血), 기능성 자궁출혈(機能性 子宮出血), 개선(疥癬) 등에도 이용되고 있다. 잘 알려진 주요성분으로는 탄닌, 사포닌, 플라보노이드 등 안트라퀴논(anthraquinone)의 유도체가 존재한다고 보고되고 있다[11-14]. 선행 연구에 따르면 소루쟁이에 함유된 다양한 생리 활성물질에 항균 활성, 항산화 활성, 항염증 활성, 진통 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[15]. 본 연구에서는 소루쟁이 뿌리 추출물을 이용한 항염 평가와 화장품에 적용하기 위한 위해 소루쟁이 뿌리 추출물의 세포독성 평가, 항산화 평가, 항균 효능 그리고 제형 내 소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨의 안정성 평가를 진행하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 연구에서 사용된 시약으로는 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl), ABTS (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), potassium persulfate, TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine)는 Sigma-Aldrich(Saint Louis, USA)에서 구매하였고, Methanol, Ethanol, HCl (hydrochloric acid), Sodium acetate(Shinyo, Korea), Acetic acid, DMSO (Dimethyl sulfoxide), FeCl₃ (Kanto, Japan)는 Ducksan

(Ducksan General Science, Insan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. SOD-like activity kit는 DOGEN Bio Co. (seoul, Korea)를 사용하였다. 균 활성화 또는 배양에 사용한 배지는 Tryptic Soy Agar (TSA), Potato Dextrose Agar (PDA), Tryptic Soy Broth (TSB), Potato Dextrose Broth (PDB)는 Difco Lab. (Sparks, MD., USA)에서 구매하여 사용하였다. 8mm paper disc는 Advantec (Tokyo, Japan)에서 구매하여 사용하였다. 분석을 위해 사용한 기기는 Rotary evaporator (EYELA N-1110, EYELA, Korea), Micro plate reader (BioTek, USA), Clean bench (BF-1060C, B&NF Co, Korea), UB-10 pH/mV meter (Denver instrument, NY, USA), JSR Chamber (JSMI-04 CP 4 room, JSR Co. Japan), incubator (EYELA SLI-700, Rikakikai, Tolyo, Japan), Homo disper (T.K Homo Mixer Mark II, Tokushu kikakogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)등을 사용하였다.

2.2. 시료 추출

본 연구에서 사용된 소루쟁이 뿌리 추출물은 2022년 10월-11월경 경상북도 영천시에서 채취하여 건조한 것으로 천지가약초(서울, 대한민국)에서 구매하여 사용하였다. 소루쟁이 뿌리 300g을 수세 후 실온에서 건조시켜 믹서로 분쇄하여 사용하였다. 시료 중량의 10배에 해당하는 70% Ethanol을 첨가하고 4시간 동안 50°C에서 추출하였다. 이후 추출물을 3회 감압 필터 한 뒤에 50°C에서 농축하여 사용하였다.

2.3. 소루쟁이 뿌리 추출물의 항산화 효능평가

2.3.1. DPPH radical scavenging activity

본 연구에서는 Blois의 방법을 일부 변형하여 DPPH radical scavenging activity를 측정하였다[16]. DPPH radical scavenging activity 측정은 DMSO를 이용하여 소루쟁이 뿌리 추출물을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL 농도로 용해하여 사용하였고, 추출물을 96-well plate에 50 μL씩 분주하고, 0.2mM DPPH solution을 150 μL를 처리한 후, 28°C chamber에서 차광하여 30분간 반응시켰다. Ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였고, Micro plate reader를 이용하여 517nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다.

2.3.2. FRAP reducing/antioxidant power activity

본 연구에서는 Benzie의 방법을 변형하여 Ferrous-tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ)에서 Ferrous-tripyridyltridyl triazine으로 환원되는 환원력을 측정하였다[17]. DMSO를 이용하여 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL 농도로 용해하여 사용하였다. Sodium acetate와 acetic acid를 이용하여 300 mM acetate buffer solution (pH 3.6)을 제조하였다. TPTZ과 HCl을 혼합하여 10mM TPTZ solution을 제조하였다. 20 mM $FeCl_3$ solution은 $FeCl_3$ 와 HCl을 혼합하여 제조하였고, 제조된 Solution 시약은 10 : 1 : 1 (v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP working solution을 제조하여 사용하였다. 제조된 시료를 96-well plate에 50 μ L를 분주하고, working solution을 150 μ L를 처리하여 37°C chamber에서 차광하여 10분간 반응시켰다. Ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였고, Micro plate reader를 이용하여 595nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다.

2.3.3. ABTS⁺ radical scavenging activity

본 연구에서는 Miller의 방법을 변형하여 라디칼 소거 활성을 측정하였다[18]. 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM ABTS 을 정제수를 이용하여 제조한 후 1 : 1 (v/v)의 비율로 혼합한 후 상온에서 차광하여 24시간 동안 반응시켰다. 734nm에서 흡광도가 0.7 ± 0.05 가 되도록 Ethanol을 이용하여 희석하여 ABTS⁺ working solution을 제조하여 사용하였다. 추출물 시료를 96-well plate에 각 50 μ L씩 분주하였고, ABTS⁺ Working solution을 150 μ L를 처리하여 상온에서 차광하여 20분간 반응시켰다. Ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였고, Micro plate reader를 이용하여 734nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다.

2.3.4. SOD-like activity

Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 평가는 SOD assay kit를 사용하여 실험을 진행하였다. 96-well plate에 제조된 시료를 20 μ L 분주하고 WST(water soluble tetrazolium salt) solution을 200 μ L 분주하고 해당하는 Well에 증류수와 Dilution buffer를 20 μ L 씩 분주한 뒤 Xanthine oxidase 20 μ L 을 분주한 후 37°C chamber에서

20분간 반응시켰다. Ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였고, Micro plate reader를 이용하여 450nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다.

2.4. 소루쟁이 뿌리 추출물의 항균 효능평가

2.4.1. 시험 균주 및 배양

동결 보관된 균은 액체배지에 24시간 동안 활성화하여 계대 배양하였다. 4종의 세균 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Korea)에서 분양받았다. 세균은 TSB, TSA에 접종하여 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였고, 진균은 PDB와 PDA에 접종한 후 25°C incubator에서 48시간 동안 배양하였다.

2.4.2. 미생물 생육저해환 측정(Paper disc diffusion method)

S. aureus, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*는 1×10^6 cell/mL, 진균인 *C. albicans*는 1×10^5 cell/mL가 되도록 접종하여 사용하였다. 멸균한 면봉을 이용하여 한천 평판배지(Agar plate)에 균액을 고르게 도말하였다. 추출물은 DMSO를 이용하여 10, 50, 100, 200 mg/mL 농도로 용해하여 8mm paper disc에 35 μ L씩 분주하였다. 세균은 37°C incubator에서 24시간, 진균은 25°C에서 48시간 배양 후 생육저해환(Clear zone, mm)의 직경을 통해 항균 활성을 측정하였다.

2.4.3. 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration)

액체배지에 세균인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*는 1×10^6 cell/mL, 진균인 *C. albicans*는 1×10^5 cell/mL가 되도록 접종하여 사용하였다. 시험에 사용된 소루쟁이 뿌리 추출물은 DMSO로 용해하여 Stock solution을 제조한 후 균의 종류별로 새 액체배지와 단계희석 하여 사용하였다. 96-well plate에 최종농도가 1, 10, 50, 100, 200 mg/mL이 되도록 각 well 당 시료 100 μ L를 분주하고 균 희석액 100 μ L를 분주한 후 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 96-well plate를 37°C에서 72시간 동안 배양하며 배양 시작을 기준으로 3일 동안 24시간 주기로 흡광도를 측정하였으며 흡광도의 증가가 나타나지 않는 농도를 MIC로 설정하였다.

2.5. 소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨 안정성 평가

2.5.1. 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 스킨 제조
소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨의 처방은 Table 1과 같으며, pH를 4.0, 6.0, 7.0으로 조절하여 제조하였다. 가용화상을 자력 교반기를 이용하여 용해한 뒤 수상에 가용화 상을 첨가하고 Disper mix를 이용하여 1000 rpm 으로 2분 동안 교반한 다음 소루쟁이 뿌리 추출물 0.1g/mL 후첨하고 1000 rpm으로 2분간 교반하여 제조한 후 제형 안정성을 평가하였다.

2.5.2. pH에 대한 안정성 평가

소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨의 pH 변화에 따른 색소 안정성을 평가하기 위하여 제조된 스킨을 호일로 차광하여 25°C 항온조에서 보관하였다. 측정은 24시간 간격으로 21일 동안 Micro plate reader 450nm에서 3회 반복하여 흡광도의 변화를 측정하여 안정성을 평가하였다.

2.5.3. 온도에 대한 안정성 평가

소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨의 저장

온도에 따른 열에 대한 안정성을 평가하기 위하여 처방에 따라 pH 7.0로 조절하고 제조된 스킨을 호일로 차광하여 4°C, 25°C, 40°C 항온조에 보관하였다. 측정은 24시간 간격으로 21일 동안 Micro plate reader 450nm에서 3회 반복하여 흡광도의 변화를 측정하여 안정성을 평가하였다.

2.5.4. 일광에 대한 안정성 평가

소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨의 빛에 따른 영향을 알아보기 위하여 pH 7.0 처방으로 제조하여 실온과 일광에 노출시켜 시간 경시에 따른 흡광도를 비교하였다. Micro plate reader 450nm에서 21일 동안 24시간 간격으로 3회 반복하여 흡광도의 변화를 측정하여 안정성을 평가하였다.

2.6. 통계처리

본 연구의 실험은 각 3회씩 반복하여 시행한 값을 평균값으로 나타냈다. 각 항목의 실험 결과는 Student's t-test를 이용하였고, $p < 0.05$ 유의 수준에서 검증하였다.

Table 1. Formulation of skin containing *Rumex crispus L.* root extract with different pH conditions

INCI name	Sample 1 (pH 4.0)	Sample 2 (pH 6.0)	Sample 3 (pH 7.0)
D.I.Water	to 100	to 100	to 100
Glycerin	3.00	3.00	3.00
Dipropylene glycol	3.00	3.00	3.00
Butylene Glycol	2.00	2.00	2.00
D-Panthenol	0.30	0.30	0.30
Ethylenediamine tetraacetic acid tetrasodium salt	0.40	0.40	0.40
Citric acid	0.08	0.03	0.01
Sodium citrate	0.04	0.04	0.04
PEG-40 hydrogenated castor oil	0.15	0.15	0.15
Octyldodeceth-25	0.05	0.05	0.05
1,2-Hexandiol	2.00	2.00	2.00
<i>Rumex crispus L.</i> root extract	0.1	0.1	0.1

3. 결과 및 고찰

3.1. 소루쟁이 뿌리 추출물의 항산화 효능평가 결과

3.1.1. DPPH radical scavenging activity

DPPH radical assay는 간편하고 비용이 저렴한 항산화 실험법으로 가장 널리 이용되며 DPPH radical의 소거 활성을 측정하는 방법이다 [19]. DPPH는 항산화 물질과 반응하여 음이온 Radical이 소거되면서 보라색에서 노란색으로 탈색되는 원리로 항산화 활성을 측정하는 데 사용된다[20]. 소루쟁이 뿌리 추출물의 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL 농도의 DPPH radical scavenging activity를 확인한 결과 각각 27.03, 42.87, 74.80, 88.57%로 측정되었다. 소루쟁이 뿌리 추출물은 농도 의존적으로 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 선행 연구에서 분획물 n-Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol, 70% Ethanol과 비교하였을 때 70% Ethanol 추출 방법의 항산화 활성이 우수하였고, 대조군과 비교하였을 때 0.5mg/mL에서 비슷한 활성을 나타낸 것을 보아 기존 논문과 유사한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다[21].

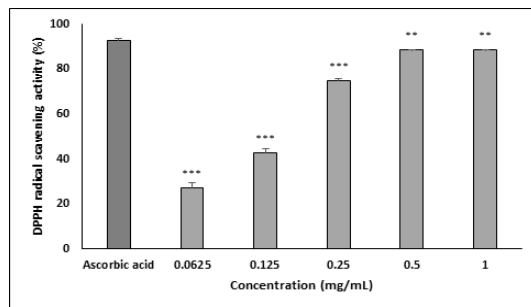


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%) of *Rumex crispus L.* root extract. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (Ascorbic acid : 50 μ g/mL, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$).

3.1.2. FRAP reducing/antioxidant power activity

FRAP assay는 항산화제와 상호작용을 하여 Fe^{3+} -TPTZ (iron[III]-2,4,6-tripyridyl-S-triazine)에서 파란색을 띠는 Fe^{2+} -TPTZ (ferrous-tripyridyltriazine)으로 환원시키게 된다[22]. 소루쟁이 뿌리 추출물의 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL 농도의 FRAP reducing/antioxidant power activity를 확인한 결과 각각 29.76, 48.47, 78.45, 118.18, 156.55%로 측정되었다(Fig. 2). 소루쟁이 뿌리 추출물은 농도 의존적으로 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. Eom(2012)의 연구에서 소루쟁이 뿌리 추출물은 대조군에 비해 낮은 활성을 나타냈고, 본 연구에서는 대조군보다 높게 나타났다[23]. 다른 선행 연구에서 추출 온도에 따른 환원력과 전자공여능이 온도가 높을수록 증가하는 것으로 나타나 본 연구에서 소루쟁이 뿌리 추출물을 70% Ethanol을 용매로 50°C에서 추출하여 높은 활성을 보이는 것으로 사료된다[24].

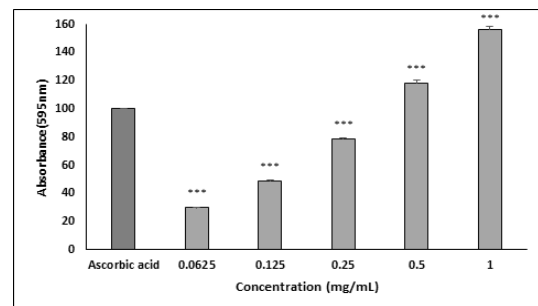


Fig. 2. FRAP reducing/antioxidant power activity (O.D 595nm) of *Rumex crispus L.* root extract. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (Ascorbic acid : 50 μ g/mL, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$).

3.1.3. ABTS⁺ radical scavenging activity

ABTS⁺ radical scavenging activity는 ABTS 시약과 Potassium persulfate가 실온의 암 상태에서

혼합하여 청록색의 ABTS⁺ 라디칼이 생성하며 시료의 항산화 물질과 반응하고 청록색이 무색으로 변화한 것을 흡광도를 측정한 방법이다[25]. 또한 수용성 및 지용성 항산화제를 모두 평가할 수 있다는 장점이 있다[26]. 소루쟁이 뿌리 추출물의 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL 농도의 ABTS⁺ radical scavenging activity를 확인한 결과 각각 24.29, 32.02, 56.92, 87.98, 98.86%로 측정되었다(Fig. 3). 소루쟁이 뿌리 추출물은 농도 의존적으로 높은 항산화 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 선행 연구에서 Ethanol 추출물이 Methanol 추출물보다 활성이 높았고, 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다[27]. 이는 본 연구에서 70% Ethanol로 추출하였을 때 농도 의존적으로 증가하는 결과와 유사하게 나타나는 것을 확인하였다.

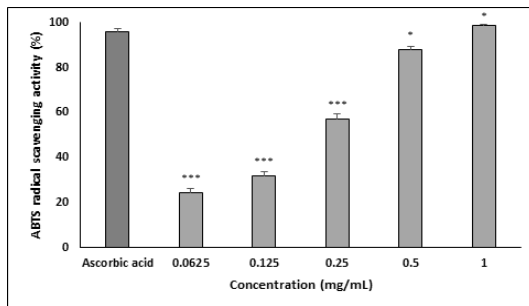


Fig. 3. ABTS⁺ radical scavenging activity (%) of *Rumex crispus L.* root extract. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (Ascorbic acid : 50 μ g/mL, Ascorbic acid : 50 μ g/mL, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$).

3.1.4. SOD-like activity

SOD(Superoxide dismutase)는 대표적인 항산화 효소로 세포의 대사 과정에서 생성되는 Superoxide radical(O₂⁻)과 같은 Reactive oxygen species(ROS)를 산소로 산화시켜주는 천연 항산화제로 알려져 있다[28]. 소루쟁이 뿌리 추출물의 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL의 농도의 SOD-like activity를 확인한 결과 각각 20.06%, 32.84%, 53.43%, 76.77%, 91.31%로 측정되었다(Fig. 4).

소루쟁이 뿌리 추출물은 농도 의존적으로 높은 활성을 나타내었다. 70% Ethanol로 추출한 선행 연구에서 0.0625–0.5 mg/mL 에서 각 11.33, 21.68, 40.82, 51.76%로 나타났고, 본 연구의 결과가 선행 연구보다 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 같은 용매를 사용했더라도 추출 온도에 따른 소거능의 차이로 사료된다[29].

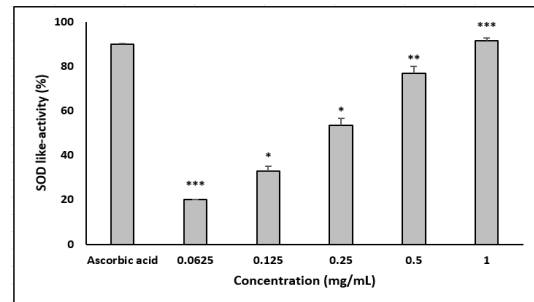


Fig. 4. SOD-like activity(%) of *Rumex crispus L.* root extract. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$).

3.2. 소루쟁이 뿌리 추출물의 항균 효능평가 결과

3.2.1. 미생물 생육저해환 측정(paper disc diffusion method)

본 연구에서는 세균 및 진균에 대한 소루쟁이 뿌리 추출물의 항균 효능을 평가하기 위하여 Clear zone (mm)을 측정하였다. 그 결과 *S. aureus*의 경우 50, 100, 200 mg/mL에서 각각 8.02 \pm 0.01mm, 9.77 \pm 0.59mm, 11.77 \pm 0.35mm의 생육저해환을 나타내었다. *S. epidermidis*의 경우 50, 100, 200 mg/mL에서 각각 8.07 \pm 0.03mm, 10.45 \pm 0.34mm, 12.46 \pm 0.17mm로 나타났으며, *E. coli*의 경우도 각각 8.48 \pm 0.28mm, 10.08 \pm 0.12mm, 12.09 \pm 0.37mm로 나타났다. *P. aeruginosa*의 경우 50, 100, 200 mg/mL에서 각각 8.24 \pm 0.26mm, 9.92 \pm 0.22mm, 12.27 \pm 0.37mm로 나타났으며, 반면 10 mg/mL 농도에서는 세균 4종인 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에서는 생육저해환을 확인할 수 없었다. 또한 진균인 *C. albicans*에서 소루쟁

이 뿌리 추출물의 모든 농도에서 생육저해환을 확인할 수 없었다(Table 2, Fig. 5). 이상의 결과는 진균에서는 특별한 항균력을 나타내지 않았지만, 세균 4종에 대한 항균 활성은 높은 것으로 판단된다. 하지만 진균을 제어하는 것이 화장품 품질에서 매우 중요하게 적용되어야 할 사항이므로 진균 활성에 효과적인 천연물을 소루쟁이 뿌리 추출물과 혼합하여 복합 추출물 형태가 되는 것이 바람직하다고 사료된다.

3.2.2. 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration)

최소저해농도인 MIC는 세균발육 저지에 필요한 최소농도를 말한다[30]. 본 연구에서는 96-well plate를 이용하여 소루쟁이 뿌리 추출물의 최소저해농도를 측정하였으며, 그 결과를 Table 3과 같이 나타내었다. 소루쟁이 뿌리 추출물의 *S. aureus*, *E. coli* 균주에 대한 최소저해농도는 100 mg/mL 농도에서 생육저해농도를 확인하였으며, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* 균주의 경우 뚜렷한 생육저해농도를 확인하지 못했다. 일반적으로 MIC는 균의 성장을 억제하는 것을 목적으로 평가하는 방법으로, 기존 천연물에 관한 MIC 연구로는 감초추출물, 오미자추출물, 차나무추출물 등이 있으며 그중에서 감초추출물은 5.0 mg/mL 농도에서 *S. aureus*, *S. epidermidis* 균주에 대해 항균력을 나타냈다. 차나무 종자 추출물은 5.0 mg/mL 농도에서 *C. albicans* 균주에 대

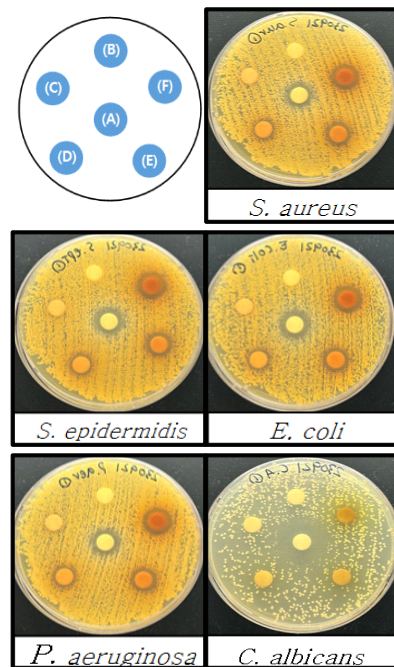


Fig. 5. The antimicrobial activity of *Rumex crispus L.* root extract, determined to clear zone of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*(A : Methyl Paraben, B : DMSO, C : 10mg/mL, D : 50mg/mL, E : 100mg/mL, F : 200mg/mL).

Table 2. Diameter of clear zone measurement of *Rumex crispus L.* root extract after 24h

Samples	Clear zone diameter (mm)					
	Concentration (mg/mL)	Organisms				
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Methyl paraben	100 mg/mL	9.16±0.42	9.82±0.19	9.85±0.39	10.49±0.55	18.58±1.48
DMSO		-*)	-	-	-	-
<i>Rumex crispus L.</i> root	10 mg/mL	-	-	-	-	-
	50 mg/mL	8.02±0.01	8.07±0.03	8.48±0.28	8.24±0.26	-
	100 mg/mL	9.77±0.59	10.45±0.34	10.08±0.12	9.92±0.22	-
	200 mg/mL	11.77±0.35	12.46±0.17	12.09±0.37	12.27±0.37	-

*) no inhibition

Table 3. Minimum inhibitory concentration of *Rumex crispus L.* root extract. for microbial(*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*)

strains	MIC (mg/mL)
	<i>Rumex crispus L.</i> root extract
<i>S. aureus</i>	100 mg/mL
<i>S. epidermidis</i>	-*)
<i>E. coli</i>	100 mg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>C. albicans</i>	-

*) no inhibition

해 우수한 항균력이 나타났으며 차나무 잎 추출물은 *P. aeruginosa* 균주에 효과적인 것으로 알려져 있다. 동일한 추출 방법과 비교했을 때 소루쟁이 뿌리 추출물과 혼합하여 사용했을 때 *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* 균에 대한 MIC를 확인할 수 있을 거라 사료된다[31,32].

3.3. 소루쟁이 뿌리 추출물을 첨가한 스킨의 안정성 평가

3.3.1. pH에 대한 안정성 평가

소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 스킨의 pH에 대한 안정성을 평가하기 위해 처방에 따라 pH 4.0, 6.0, 7.0로 조절하여 제조하였으며 차광시킨 후 21일 동안 25°C 챔버에 저장하면서 24시간마다 변색 정도를 Micro plate reader를 이용해 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, pH가 4.0, 6.0, 7.0 모두 흡광도의 변화가 미미한 것을 확인할 수 있었으며 pH가 낮을수록 변화가 가장 미미하였다(Figure 6). Han(2009)의 연구에 따르면 pH에 의한 소루쟁이 뿌리 추출물을 염색포에 적용하였을 때 알칼리측으로 갈수록 붉은색으로 변색되는 것을 확인할 수 있었다[33]. pH가 증가할수록 붉은색을 띠는 이유는 수산기를 가지는 퀴논류가 알칼리용액 내에서 혈적색으로 변색되는데, 퀴논환에 결합한 수산기가 산성으로 알칼리에 의한 염의 생성 때문이다[34]. 따라서 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 제품의 pH는 약산성을 유지하는 것이 변색 방지에 효과가 있을 것으로 사료된다.

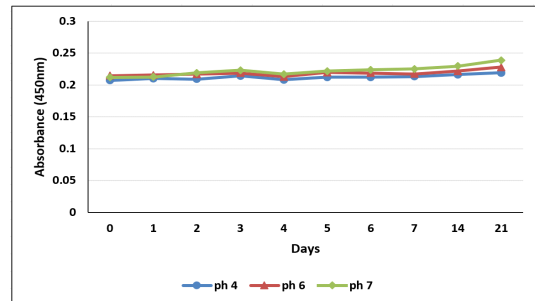


Fig. 6. Changes in absorbance by pH of skins containing *Rumex crispus L.* root extract.

3.3.2. 온도에 대한 안정성 평가

소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 스킨의 온도에 대한 안정성을 평가한 결과, 4°C, 25°C에서 보관하였을 때 흡광도의 변화는 미미하였으나, 40°C에 보관한 스킨의 경우 흡광도의 값이 48.82% 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 7). 소루쟁이 뿌리를 이용한 견직물의 천연염색의 Han(2009)의 연구에 따르면 염색온도가 높을수록 염색량이 증가하며 온도의 상승과 함께 색소의 분자운동이 활발해져 색이 진해지는 것을 확인하였다[26]. 따라서 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 제품은 저장 온도가 높을수록 노란색에서 붉은색으로 변색되는 것을 확인할 수 있었기 때문에 제품의 저장 온도는 저온에서 보관하는 것이 변색 방지에 효과가 있을 것으로 평가된다. 또한 화장품에서 천연물은 농도가 증가할수록 변색에 대한 안정성 하락이 증가하는 경우가 대부분이므로 소루쟁이 뿌리 추출물 또한 상온 이상의 온도에서 보관상의 주의가 필요하다.

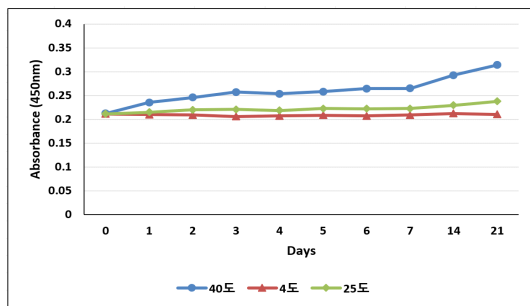


Fig. 7. Changes in according to storage temperature of skins containing *Rumex crispus L.* root extract.

3.3.3. 일광에 대한 안정성 평가

소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 스킨의 일광에 대한 안정성을 평가하기 위해 차광하지 않고 실온과 일광에 노출시켰다. 그 결과 실온에서 보관하였을 때 23.22% 증가하였으며, 일광에 노출시켰을 경우 43.6% 흡광도의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 8). 특히 대조군인 실온에서 보관하였을 경우 흡광도의 증가가 서서히 관찰되었고, 실험군인 일광의 경우 2일 차부터 급격한 색 변화와 함께 21일 차에서는 완전한 적색을 띠고 있었다. 이러한 결과는 실온에서 보관하더라도 차광하지 않았기 때문에 직사광선에 의한 변색이 일어났고 일광의 경우 시간이 경과할수록 빛에 의한 열로 인해 변색이 일어난 것으로 사료된다. 따라서 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 제품은 직사광선과 일광에 대해 불안정한 부분이 확인되어 실제 제품에 적용하였을 때 용기로 내용물을 차광하거나 변색 방지제를 처방에 사용하면 변색 방지에 효과가 있을 것으로 평가된다.

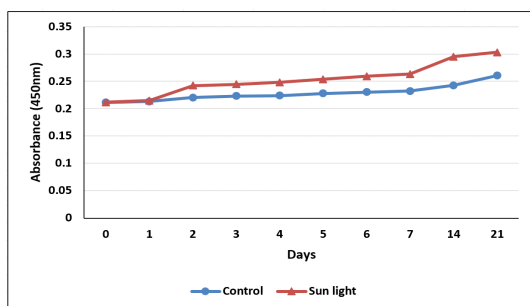


Fig. 8. Change of skins containing *Rumex crispus L.* root extract absorbance in light exposure.

4. 결론

소루쟁이에 함유된 다양한 생리 활성물질은 항산화, 항균 작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있다[15]. 그러나 화장품 소재로서의 연구는 미미한 수준으로 본 실험을 통해 화장품 소재로서의 가능성을 평가하였다. 소루쟁이는 다양한 항산화 화합물을 포함하는데, 특히 뿌리의 주요성분으로는 탄닌, 사포닌, 플라보노이드 등 안트라퀴논(anthraquinone)의 유도체가 존재한다[11-14]. 이러한 유효성분을 함유한 소루쟁이의 항산화 유효성 검증에 위해 DPPH radical scavenging activity, FRAP reducing/antioxidant power activity, ABTS⁺ radical scavenging activity, SOD-like activity를 평가하였다. 그 결과 소루쟁이 뿌리 추출물의 농도가 증가할수록 높은 항산화 화력을 나타내었다. 미생물 균주 5종 *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*을 이용하여 Paper disc method를 이용한 생육저해력 측정과 최소저해농도(MIC)를 진행하였다. 그 결과 소루쟁이 뿌리 추출물은 대조군인 Methyl paraben 100mg/mL에 비해 높은 항균력을 관찰할 수 있었다. 그러나 최소저해농도에서는 *S. aureus*, *E. coli* 균주 외에 항균 활성은 나타나지 않았다. Challenge test에서는 *S. aureus* 균주는 접종 7일 차에 균이 모두 사멸하였으며, *E. coli* 균주에 대해 Challenge test에서 91.53%로 100% 사멸하지 않는 것으로 나타나 *S. aureus*만 화장품 미생물 한도 시험법에 부합하는 것을 확인하였다. 그러나 *S. aureus*에서는 높은 항균을 나타내면서 *S. epidermidis*는 항균력을 나타내지 않았다는 것은 다른 부분으로 해석될 여지가 있다. Cooper D(2004)의 연구에 따르면 아토피 피부염 환자에서 IgE과 T세포가 존재해서 특정 항원에 관한 IgE-enhanced T cell response를 보이고[7], 이러한 항원들은 아토피 피부염 환자의 피부에 항원을 도포하였을 때, 염증 반응을 유발한다는 보고가 있다[8]. 병의 중증도와 Skin-colonized *S. aureus*의 Accessory gene regulator groups의 변화도의 상관성이 있다는 보고들이 이를 뒷받침하고 있다[9]. 본 연구의 항균 결과에 따르면 소루쟁이 뿌리 추출물은 *S. aureus*의 Accessory gene regulator groups를 조절하여 항염 효과를 기대할 수 있는 것으로 사료되며, *S. epidermidis*에서는 항균력이 없기에 마이크로바이옴 화장품 소재로 활용될 가치가 있다.

고 판단된다.

소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 가용화 제형인 스킨 경시 변화를 관찰하였을 때 pH에 따른 흡광도의 변화는 미미하였다. pH 7로 제조하여 4°C, 25°C, 40°C 챔버에서 저장하였을 때 색소의 안정성으로는 온도가 높을수록 노란색에서 붉은 색으로 변색되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 차광하지 않고 실온과 일광에서의 색 변화를 21 일 동안 관찰하였을 때 실온의 경우보다 일광에서 보관하였을 때 약 2배 변색됨을 확인하였다. 이는 소루쟁이 뿌리 추출물을 함유한 스킨은 시간이 경과함에 따라 차광, 저온의 조건에서 안정함을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하였을 때 천연소재인 소루쟁이 뿌리 추출물을 활용함으로써 항산화, 항균력을 이용한 피부 개선 효과를 기대할 수 있으며 화장품 천연소재로서의 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

References

1. M. A. Beaven, J. Rogers, J. P. Moore, T. R. Hesketh, G. A. Smith, J. C. Metcalfe, "The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells" *J. Biol. Chem*, Vol.259, No.11 pp. 7128-7136, (1984).
2. S. Han, H. Zhang, L. Qin, C. Zhai, "Effects of dietary carbohydrate replaced with wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) on insulin resistance in rats fed with a high-fat/cholesterol diet", *Nutrients*, Vol.5, No.2 pp. 552-564, (2013).
3. M. S. Mahmood, A. H. Gilani, A. Khwaja, A. Rashid, M. K. Ashfaq, "The *in vitro* effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitricoxide production", *Phytother Res*, Vol.17, No.8 pp. 921-924, (2003).
4. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, H. Sakurai, "Active oxygen scavenging activity of plants extracts", *Biol P harm Bull*, Vol.18, No.1 pp. 162-166, (1995).
5. L. F. Santamaria Babi, L. J. Picker, M. T. Perez Soler, K. Drzimalla, P. Flohr, K. Blaser, C. Hauser, "Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen", *The Journal of experimental medicine*, Vol.181, No.5 pp. 1935-1940, (1995).
6. F. L. van der Heijden, E. A. Wierenga, J. D. Bos, M. L. Kapsenberg, "High frequency of IL-4-producing CD4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin", *The Journal of investigative dermatology*, Vol.97, No.3 pp. 389-394, (1991).
7. D. Cooper, J. Hales, R. Camp, "IgE-dependent activation of T cells by allergen in atopic dermatitis: pathophysiologic relevance", *The Journal of investigative dermatology*, Vol.123, No.6 pp. 1086-1091, (2004).
8. P. Strange, L. Skov, S. Lisby, P. L. Nielsen, O. Baadsgaard, "Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis", *Archives of dermatology*, Vol.132, No.1 pp. 27-33, (1996).
9. H. Lomholt, K. E. Andersen, M. Kilian, "Staphylococcus aureus clonal dynamics and virulence factors in children with atopic dermatitis", *The Journal of investigative dermatology*, Vol.125, No.5 pp. 977-982, (2005).
10. G. Y Kim, S. S Han, S. H Lee, A. K Kim, "A Study on the comparson of skin effects by natural cosmetics and general cosmetics", *Asian J Beauty Cosmetol*, Vol.7, No.4 pp. 225-238 (2009).
11. J. A. Park, M. O Choi, "Antimicrobial Activity and Anti-inflammation Effect to the Human Skin Pathogens by the *Rumex crispus L.* Root Extracts", *The Korean Society for Aesthetics and Cosmetology*, Vol.9, No.2 pp. 9-16, (2011).
12. D. K. Kim, S. U. Choi, S. Y. Ryu, K. R. Lee, O. P. Zee, "Cytotoxic Constituents of

- Rumex japonicus”, *Yakhak Hoeji*, Vol.42, No.3 pp. 233–237, (1998).
13. S. W. Chang, I. H. Kim, T. J. Han, “Anthraquinone Productivity by the Cultures of Adventitious Roots and Hairy Roots from Curled Dock (*Rumex crispus*)”, *Korean J. Plant Tissue Culture*, Vol.26, No.1 pp. 7–14, (1999).
 14. S. W. Hwang, K. H. Park, S. H. Nam, M. S. Yang, T. J. Hwang, J. R. Lee, J. Lee, “Isolation of Anthraquinone Derivatives from The Root of *Rumex japonicus* H” *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, Vol.47, No.2 pp. 274–278, (2004).
 15. J. C. Kim , G. J. Choi , S. W. Lee , J. S. Kim , K. Y. Chung, K. Y. Cho, “Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew”, *Pest Management science*, Vol.60, No.8 pp. 803–808, (2004).
 16. M. S. Blois, “Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical”, *Nature*, Vol.181, No.4617 pp.1199–1200, (1958).
 17. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay”, *Analytical Biochemistry*, Vol.239, No.1 pp. 70–76, (1996).
 18. N. J. Miller, C. A. Rice–Evans, “Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay”, *Free Radical Research*, Vol.26, No.3 pp. 195–199, (1997).
 19. K. M. Yoo, D. O. Kim, C. Y. Lee, “Evaluation of different methods of antioxidant measurement”, *Food Sci Biotechnol*, Vol.16, No.2 pp. 177–182, (2007).
 20. I. G. Munteanu, C. Apetrei, “Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review”, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.22, No.7 pp. 3380 (2021).
 21. M. Uzun, L. O. Demirezer, “Anti-aging power of *Rumex crispus* L.: Matrixmetalloproteinases inhibitor, sun protective and antioxidant”, *Souyh African Journal of Botany*, Vol.124, pp. 364–371, (2019).
 22. R. Amarowicz, R. B. Pegg, “Natural antioxidants of plant origin”, *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol.90 pp. 1–81 (2019).
 23. T. K. Eom, E. K. Kim, J. S. Kim, “In Vitro Antioxidant, Antiinflammation, and Anticancer Activities and Anthraquinone Content from *Rumex crispus* Root Extract and Fractions”, *Antioxidants*, Vol.9, No.8 pp. 726, (2020).
 24. K. S. Jeong, “A Study on Antioxidant Activity of Ethanol Extract from *Rumex crispus* and Metal Adsorptivity of it’s Root”, *Journal of the Korea Academia–Industrial cooperation Society*, Vol.13, No.2 934–940, (2012).
 25. H. Y. Jang, C. E. Park, S. O. Lee, “Comparison of Antioxidant Capacity of Protein Hydrolysates from 4 Different Edible Insects”, *Korean journal of food science and technology*, Vol.51, No.5 pp. 480–485, (2019).
 26. H. R. Patricia, L. B. Baquero, H. R. Larrota, “Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity”, *Bioactive Compounds*, pp. 265–288, (2019).
 27. O. A. Idris, O. A. Wintola, A. J. Afolayan, “Phytochemical and antioxidant activities of *Rumex crispus* L. in treatment of gastrointestinal helminths in Eastern Cape Province, South Africa”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol.7, No.12 pp. 1071–1078, (2017).
 28. H. D. Hong, N. G. Kang, S. S. Kim, “Superoxide Dismutase-like Activity of Apple Juice Mixed with Some Fruits and Vegetables”, *Korean J. food Sci. Technol*, Vol.30, No.6 pp. 1484–1487, (1998).
 29. J. A. Park, “Physicochemical Characteristics

- of *Rumex crispus* Linne and Effect on the Skin Condition”, *Doctoral dissertation, Kwangju Women’s University*, (2011).
30. M. J. Jang, S. J. Cheon, H. Y. Kim, D. J. Kwoen, H. Y. Kim, S. H. Kim, J. T. Lee, “The Anti-Wrinkle and Whitening Effect of Extracts of *Castanea crenata* Inner Shell”, *Journal of Life Science*, Vol.21, No.5 pp. 734-738, (2011).
 31. K. S. Kim, M. J. Ryu, “Physiological Activity of the *Glycyrrhiza uralensis* Extracts as a Cosmetic Product”, *Asian J Beauty Cosmetol*, Vol.15, No.1 pp. 11-22, (2017).
 32. W. H. Yoon, J. H. Choi, K. H. Lee, C. H. Kim, “Antimicrobial and Antitumor Activities of Seed Extracts of *Camellia sinensis* L.”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.37, No.1 pp. 108-112, (2005).
 33. M. R. Han, J. S. Lee, “Natural Dyeing of Silk Fabrics with *Rumex crispus* L. Root”, *J. Kor. Soc. Cloth Ind*, Vol.11, No.1 pp. 166-173, (2009).
 34. K. Z. Hayashi, “Plant Pigments – Guidelines for Experiments and Research”, *Yoken-do Hall*, pp. 649, (1988).