

Grapefruit 종자추출물의 안전성 검사

고경혁 · 이근희* · 조성환*[†]

경상대학교 의과대학 병리학교실

*경상대학교 식품공학과

A Safety Test on Grapefruit Seed Extract

Gyung-Hyuck Ko, Keun-Hoi Lee* and Sung-Hwan Cho*[†]

**Dept. of Pathology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

Effects of grapefruit seed extract on the lethality, the primary skin irritation, and the acute eye irritation potentials were evaluated in rats. The acute oral LD₅₀ of GFSE for Sprague-Dawley derived rats was 3.75g/kg with 95% confidence limits of 2.55 and 5.52g/kg. Patch application to the intact and abraded skin of rabbits led to mild to moderate erythema and no or mild edema. Application to the eyes of rabbits led to severe corneal opacity, iritis, conjunctival erythema, edema, and discharge.

Key words : grapefruit seed extracts, acute oral toxicity, skin irritation

서 론

Grapefruit 종자추출물(Grapefruit seed extract : 이하 GFSE라 칭함)은 광범위한 범위의 병원성 및 부패성 미생물에 대한 뚜렷한 항균성을 보이는 것으로 보고되고 있으며 (1-14) 그 활용범위가 검토되고 있다. GFSE를 살균소독제, 식품보존료, 의약품, 수의약품 등으로 사용하기에 앞서 이 물질의 안전성 여부를 검사할 필요가 있다는 것은 당연하다. 따라서 본 연구에서는 우선 흰쥐를 대상으로 경구 투여시 GFSE의 급성 경구 독성 여부를 알아보고자 하였으며, 또한 토끼를 대상으로 피부와 눈에 대한 국소 독성 여부를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Grapefruit 종자추출물의 조제

본 실험에 사용한 grapefruit 종자추출물은 전보 (1,2)에 준하여 추출, 조제하였다.

급성 경구 독성 시험

무게가 150~200g 가량 되는 Sprague-Dawley계 흰쥐 60마리를 1군당 암수 각각 5마리씩 6군으로 나누어, 1군 부터 5군의 흰쥐에게 GFSE를 흰쥐 무게 1kg당 0.9ml (1.0mg), 1.9ml (2.1mg), 3.8ml (4.3mg), 7.5ml (8.5mg), 15.0ml (17.0mg)씩 위관 (gastric tube)을 통해 각각 투여하였다. 제 6군은 대조군으로서 흰쥐 무게 1kg당 식염수 15.0ml씩을 투여하였다. 약물을 투여하기 18시간 전 부터는 먹이를 주지 않았다. 약물을 투여한 후 흰쥐들을 암수 및 군별로 사육통에 넣고 실험동물사료 (삼양 유지사료)를 주어 14일간 사육하였다. 약물을 투여한 날은 흰쥐를 자주 관찰하여 죽거나 또는 이상한 몸의 자세, 이상한 꼬리의 위치, righting reflex의 소실, 무기력증, 경련, 진전 (tremor), 행동의 변화, 수면, 타액 및 눈물 콧물 양의 변화, 배설물 성상의 변화, 먹이 소비량의 변화, 털의 일어섬 등과 같은 전신적인 독성 증상이 나타나는가를 관찰하였다. 다음날 부터는 하루에 2번 이상 흰쥐를 관찰하였다. 흰쥐가 죽으면 즉시 무게를 단 후에 부검하여 육안적인 병변이 있는지를 확인하고 폐, 간, 비장, 신장, 위, 장을 적출하여 광학현미경으로 관찰하였다. 8일 후에 살아남은 흰쥐들의 무게를 측정

[†]To whom all correspondence should be addressed

하였고, 14일 후에 살아 남은 흰쥐는 무게를 달고 희생시켜 마찬가지로 부검하고 주요 장기를 적출하여 현미경으로 관찰하였다. LD₅₀와 95% confidence range는 Litchfield와 Wilcoxon의 방법 (15)으로 계산하였다.

피부 자극 시험

무게가 2~3kg 가량 되는 수컷 흰토끼 6마리의 등쪽 털을 모두 제거하고 약물을 도포할 부위 4군대를 선정하였다. 그 중 한 군대에 GFSE 0.5ml를 떨어뜨리고 즉시 2.5×2.5cm의 크기로 자른 가아제를 덮고 약물의 증발을 막기 위해 같은 크기의 비닐로 덮은 다음 테이프 고정하였다. 또 한 군대는 주사 바늘로 긁어 피가 나지않는 범위내에서 최대한 깊게 상처를 낸 뒤에 마찬가지로 방법으로 GFSE를 도포하였다. 나머지 두 군대는 각각에 대한 대조군으로서 GFSE 대신 식염수를 도포하였다. 24시간 뒤에 비닐과 거즈를 제거하고 약물 도포 부위에 병변이 생겼는지, 생겼다면 얼마나 심한지를 관찰하였다. 그 후 14일간 사육하면서 매일 약물 도포 부위를 관찰하여 병변의 변화 양상을 관찰하였다. 피부 병변의 평가는 국립보건안전연구원 예규 제10호(1988년 10월 29일 제정) 의약품 등의 독성시험 기준에 의거하였다. 즉, 홍반에 대해서는 홍반이 전혀 없는 경우를 0점, 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 홍반을 1 점, 분명한 홍반을 2점, 약간 심한 홍반을 3점, 홍당무색의 발적을 보이는 심한 홍반을 4점으로 하였다. 부종에 대해서는 부종이 전혀 없는 경우를 0점, 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 부종을 1점, 뚜렷하게 부어올라서 병변부가 분명히 구별될 경우의 가벼운 부종을 2 점, 약 1mm 정도 부어오르는 보통 정도의 부종을 3 점, 1mm 이상 부어오르고 노출 부위 밖에 까지 확장된 상태의 심한 부종을 4점으로 하였다.

안점막 자극 시험

무게가 2~3kg 가량 되는 흰토끼 9마리 중 6마리의 우측 눈에 GFSE 0.1ml씩 떨어뜨린 후 매일 관찰하여 어떠한 병변이 얼마나 심하게 생겼는지를 평가하였다. 좌측 눈은 대조군으로 사용하였다. 나머지 3마리의 우측 눈에도 GFSE를 0.1ml 떨어뜨린 다음 20~30초 후 미온수로 1분간 세척하고 마찬가지로 방법으로 관찰하였다. 병변의 평가는 국립보건안전연구원 예규 제10호 의약품 등의 독성시험 기준에 의거하였다. 즉, 각막 혼탁의 정도에 대해서는 화농이나 혼탁이 없는 경우를 0, 분산 또

는 밀집된 혼탁이 있으나 홍채의 말단이 명확히 관찰되는 경우를 1, 반투명한 부분이 쉽게 관측되며 홍채의 말단이 약간 불명확한 경우를 2, 각막이 진주빛이며 홍채의 말단이 관찰되지 않고 동공의 크기가 가파스로 관측되는 정도를 3, 각막이 불투명하여 홍채가 관찰되지 않는 경우를 4로 하고, 혼탁된 각막의 범위에 대해서는 1/4 이하를 1, 1/4 이상 1/2 미만을 2, 1/2 이상 3/4 미만을 3, 3/4 이상을 4로 하여, 각막 혼탁의 정도를 A, 혼탁의 범위를 B로 할때 각막의 병변을 A×B×5로 점수화 하였다. 홍채에 대해서는 정상을 0, 현저한 주름이나 충혈, 증장이 있으나 빛에 대한 반응은 있는 경우를 1, 출혈이나 심한 파괴가 관찰되거나 빛에 대한 반응이 없는 경우를 2로 하여 여기에 5를 곱한 값을 홍채 병변의 점수로 하였다. 결막의 발적에 대해서는 발적이 없는 경우를 1, 몇몇 혈관이 명확히 충혈된 경우를 1, 넓은 심홍색 색조를 보이는 경우를 2, 넓은 선홍색으로 변한 경우를 3으로 하고, 결막의 부종에 대해서는 부종이 없는 경우를 0, 약간의 증장이 있는 경우를 1, 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 증장이 있는 경우를 2, 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 증장이 있는 경우를 3, 눈이 반 이상 감길 정도의 증장이 있는 경우를 4로 하고, 배출물에 대해서는 배출물이 없는 경우를 0, 약간의 배출물이 있는 경우를 1, 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물이 있는 경우를 2, 눈주위의 상단 부위를 적시는 배출물이 있는 경우를 3으로 하여, 발적의 정도를 A, 결막 부종의 정도를 B, 배출물의 정도를 C로 할때 결막의 병변을 (A+B+C)×2로 점수화 하였다. 눈에 대한 GFSE의 독성은 위와같이 계산된 각막, 홍채, 결막 병변의 점수를 모두 더한 값으로 하였다.

결과 및 고찰

급성 경구 독성 시험

GFSE를 투여하였을 때 2주일 동안의 흰쥐의 치사율은 Table 1과 같으며 이를 근거로 계산한 50% 치사량(LD₅₀)은 3.35ml/kg이며 95% 신뢰 한계는 2.28~4.93ml/kg이었다. GFSE의 비중은 1.12이므로 이를 무게로 환산하면 LD₅₀는 3.75g/kg이며 95% 신뢰 한계는 2.55~5.52g/kg이다. 수컷 흰쥐의 경우만을 보면 LD₅₀는 3.0ml/kg (3.4g/kg)이고 95% 신뢰 한계는 1.9~4.7ml/kg (2.1~5.3g/kg)이었으며, 암컷 흰쥐만을 보면 LD₅₀는 3.9ml/kg (4.4g/kg)이고 95% 신뢰 한계는 2.2~7.0ml/kg (2.5~7.8g/kg)이었다. 이러한 수치는 국립보건안전연구원 예규 제10호에 의한 저독성의 기준 5g/kg에는 미치지

Table 1. The mortality rates of rats during the 14 days after administration of grapefruit seed extract

Dose (mg/kg)	Time of death					
	Hours		Days			
Control	3.5	4	1	2	3	14
Control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2.1	0/10	0/10	1/10(0/5)	1/10	1/10	1/10
4.3	0/10	0/10	4/10(2/5)	4/10	6/10(4/5)	6/10
8.5	0/10	0/10	9/10(5/5)	10/10	10/10	10/10
17.0	2/10(2/5)	3/10(3/5)	10/10	10/10	10/10	10/10

* Values are number of animals dead/number of animals tested, cumulative

Values in the parentheses are number of male animals dead/number of male animals tested, cumulative

Table 2. The changes of average body weight in dead rats

Dose (mg/kg)	Start	Time of death
2.1 (N=1)	188	179.0
4.3 (N=6)	168.3±16.1	150.1±27.7
8.5 (N=10)	183.8±18.7	175.1±19.1
17.0 (N=10)	173.7±24.7	167.0±24.1
Total N=27	176.8±20.6	166.7±23.9

Table 3. The changes of average body weight in surviving rats

Dose (mg/kg)	0 day	8 days	14 days
Control (N=10)	181.8±17.1	217.6±22.6	231.3±28.6
1.0 (N=10)	193.5±25.7	228.0±17.9	240.9±24.1
2.1 (N=9)	178.9±22.9	206.5±31.3	216.1±28.0
4.3 (N=4)	182.8±26.9	181.7±24.9	196.8±29.3

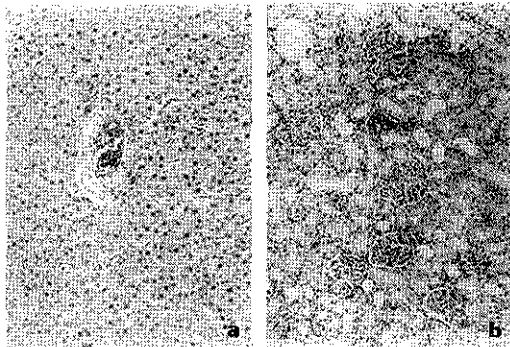


Fig. 1. No specific changes in the liver (a) and the kidney (b) of a rat treated with 17mg of grapefruit seed extract (group 5).

Hematoxylin-Eosin stain, ×100

못한다. 죽은 흰쥐는 모두 GFSE를 투여한 후 3일 이내에 죽었고, 실사를 하였으며, 사육통 구석에서 쪼그린 자세를 취하였고, 무기력하였으며, 먹이를 먹지 않았다. 기타 다른 독성 증상은 관찰되지 않았다. 죽은 흰쥐를 부검한 결과 모두에서 위가 확장(gastric dilatation)되어 있었으며 그 안에 황색의 액체가 들어 있었다. 살아남은 흰쥐들의 행동은 정상이었으며, 14일 후 희생시켜 부검한 결과 육안적 병변은 관찰되지 않았다. 주요 장기를 적출하여 현미경 표본을 만들어 관찰한 결과 죽은 흰쥐와 살아남은 흰쥐 모두에서 GFSE와 관련된 것으로 생각되는 병변은 관찰되지 않았다. 다량의 GFSE를 흰쥐에 경구 투여했을 때 흰쥐가 죽는 원인은 탈수

증이라고 생각된다. 왜냐하면 죽은 흰쥐 모두에서 설사가 관찰되었으며 죽었을 때의 몸무게가 실험 시작시에 비해 평균 10.1g(5.7%; 95% 신뢰 구간 6.3~13.9g) 감소되었기 때문이다(Table 2). 또한 육안 및 현미경 검사상(Fig. 1), 탈수증 이외에 사망의 원인이 될만한 소견이 관찰되지 않았다. GFSE를 kg당 0.9ml(1.0mg) 또는 1.9ml(2.1mg)를 투여한 군에서의 2주일 동안의 몸무게의 증가는 대조군과 차이가 없었다(t-test, $p > 0.05$) (Table 3). 반면 kg당 3.8ml(4.3mg)를 투여한 군에서 살아남은 흰쥐의 무게는 제 8일에는 실험 시작 시에 비해 0.6% 감소하였다(대조군과의 비교 t-test, $p < 0.01$). 그러나 제 8일부터 14일까지의 몸무게의 증가율은 대조군이 나 0.9ml(1.0mg) 또는 1.9ml(2.1mg)를 투여한 군에서와 차이가 없었다(t-test, $p > 0.05$).

피부 자극 시험

흰토끼의 피부에 GFSE를 도포하고 1, 3, 7, 14일 후에 관찰한 결과는 Table 4와 같다. 즉, 피부에 생긴 병변의 심한 정도는 정상 피부와 찰과상을 입힌 피부에서 같았으며, GFSE를 도포한 후 1일째의 홍반 점수는 평균 2.67(총 가능 점수 4.0)이었고, 3일째는 2.0, 7일 이후에는 1.0이었다. 부종 점수는 1일 부터 7일 까지 평균 0.17(총 가능 점수 4.0)이었으며, 14일에는 0이었다. 대조군으로 사용한 부위에서는 실험 기간 전반에 걸쳐 홍반이나 부종이 관찰되지 않았다.

Table 4. Primary skin irritation scores in rabbits following a patch application of grapefruit seed extract to the rabbits

Symptoms	Time (day)	Rabbit number						Average
		1	2	3	4	5	6	
Erythema Intact skin	1	3	3	3	2	3	2	2.67
	3	2	2	2	2	2	2	2.0
	7	1	1	1	1	1	1	1.0
	14	1	1	1	1	1	1	1.0
Abraded skin	1	3	3	3	2	3	2	2.67
	3	2	2	2	2	2	2	2.0
	7	1	1	1	1	1	1	1.0
	14	1	1	1	1	1	1	1.0
Edema Intact skin	1	0	1	0	0	0	0	0.17
	3	0	1	0	0	0	0	0.17
	7	0	1	0	0	0	0	0.17
	14	0	0	0	0	0	0	0
Abraded skin	1	0	1	0	0	0	0	0.17
	3	0	1	0	0	0	0	0.17
	7	0	1	0	0	0	0	0.17
	14	0	0	0	0	0	0	0

Table 5. Eye irritation scores in rabbits following application of grapefruit seed extract

Group	Time (day)	Cornea		Iris	Conjunctiva			Total score
		Opacity	Area		Hyperemia	Swelling	Discharge	
Not washed group (n=6)	1	4.0	4.0	2.0	3.0	4.0	3.0	110.0
	2	4.0	4.0	2.0	3.0	4.0	3.0	110.0
	3	4.0	4.0	2.0	3.0	4.0	3.0	110.0
	4	4.0	4.0	2.0	3.0	4.0	2.83	109.7
	7	4.0	4.0	2.0	3.0	3.67	2.67	108.7
	10	3.67	4.0	2.0	2.33	2.83	2.17	98.0
Washed group (n=3)	13	3.5	4.0	2.0	1.5	0.67	1.67	87.7
	1	4.0	4.0	1.0	3.0	4.0	3.0	105.0
	2	3.0	4.0	1.0	3.0	4.0	3.0	85.0
	3	3.0	4.0	1.0	2.67	4.0	2.67	83.7
	4	2.67	4.0	1.0	2.67	4.0	2.67	77.0
	7	2.0	4.0	0.67	1.67	1.67	0.67	51.3
	10	1.67	4.0	0	0.67	0	0	34.7
13	1.0	4.0	0	0	0	0	20.0	

안점막 자극 시험

원토끼의 안점막에 GFSE를 점안한 후 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13일에 관찰한 결과는 Table 5와 같다. 즉, GFSE를 점안한 후 1, 2, 3일째의 눈의 병변의 점수는 110(총 가능 점수 110)이었으며, 4일째는 평균 109.7, 7일째는 평균 108.7, 10일째는 평균 98.0, 13일째는 평균 87.7으로 병변의 정도가 매우 심하였다. GFSE를 점안한 후 20~30초 후에 물로 세척한 군의 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13일째의 눈의 병변의 점수는 각각 평균 105.0, 85.0, 83.7, 77.0, 51.3, 34.7, 20.0으로 13일 까지 병변이 계속 관찰되었

으나 세척하지 않은 경우에 비해 병변의 정도가 훨씬 덜 하였다. 따라서 GFSE는 눈에 대한 독성이 강하므로 GFSE가 눈에 들어갔을 때에는 즉시 물로 씻어내야 할 것이다.

이상의 결과를 종합하여 보면, GFSE를 원토끼에 경구 투여했을 때의 50% 치사량(LD₅₀)은 3.75g/kg로서, 식품보존료로 사용되고 있는 sorbic acid 7.4g/kg, potassium sorbate 4.2g/kg, dehydroacetic acid 1.33g/kg, sodium benzoate 2.7g/kg, salicylic acid 1.3g/kg, diphenyl 3.5~5.0g/kg, sodium propionate 2.6g/kg에 비교하여 볼 때 비교적 안전한 천연추출물임을 알 수 있으며,

GFSE의 흰토끼의 피부에 대한 독성 또한 비교적 약한 편이었으나 눈에 대한 자극성이 있는 것으로 나타났다.

요 약

광범위한 천연항균제로 그 활용이 고려되고 있는 grapefruit 종자추출물의 안전성을 검토하기 위하여 급성 경구독성, 피부자극 및 급성 안점막 자극시험을 수행하였다. 실험 흰쥐에 대한 급성 LD₅₀값은 3.75g/kg 이었으며, 피부에 대한 독성은 약한 편으로 부종 등의 병변이 거의 생기지 않았으나 눈에 대한 자극성이 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1993년도 한국학술진흥재단의 자유공모 과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 자몽종자추출물이 *Penicillium islandicum*의 생육 및 독소성분 skyrin 합성에 미치는 저해효과. 한국농화학회지, 33, 169 (1990)
2. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 수산물에 대한 Grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화 효과. 한국수산학회지, 23, 289 (1990)
3. 최종덕, 서일원, 조성환 : Grapefruit 종자추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지, 23, 297 (1990)
4. 조성환, 주인생, 서일원, 김재욱 : 어묵에 처리한 Grapefruit 종자추출물의 보강효과. 한국식품위생학회지, 6, 67 (1991)
5. 조성환, 이현철, 서일원, 김재욱, 장영상, 신재익 : Grapefruit 종자추출물을 이용한 밀감의 저장효과. 한국식품과학회지, 23, 614 (1991)
6. 조성환, 정덕화, 서일원, 이현숙, 황보혜, 박우포 : Grapefruit 종자추출물을 이용한 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 Aflatoxin 생성억제 효과. 한국식품위생학회지, 7, 15 (1992)
7. 조성환, 서일원, 전상수, 라택균, 정수근, 강동훈 : 천연항균성 물질을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 살균 및 독소생성 억제효과. 한국식품위생학회지, 7, 99 (1992)
8. 조성환, 이상열, 서일원, 이근희 : 농축산물 및 그 가공제품의 자연식물성 항균제를 이용한 저장효과. 농업과학논문집(농업산학협동편), 35, 275 (1993)
9. 조성환, 서일원, 이근희 : 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구-저장중 병리적 장애 방지를 중심으로-. 한국농화학회지, 36, 265 (1993)
10. 조성환, 김기욱, 이근희 : 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구-Grapefruit 종자추출물로 부터 활성물질의 분리를 중심으로-. 한국농산물저장유통학회, 1, 1 (1994)
11. 조성환, 정진환, 류중호 : 천연항균제처리를 병용한 과채류의 자연저온저장 기술개발에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 23, 315 (1994)
12. 강동훈, 전상수, 정덕화, 조성환 : 남해안연안에 분포되어 있는 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장 및 Grapefruit seed extract 처리에 의한 항균 효과. 한국식품위생학회지, 9, 141 (1994)
13. 김희연, 정나은, 채대엽, 이동철, 김재원, 조성환, 이상열 : 자몽 추출물로 부터 분리된 항균성 Chitinase의 특성. 한국식물병리학회지, 10, 277 (1994)
14. Harich, J. : DF-100. U.S. Patent 1,354, 818 (1985), FDA No.R-0013982 (1982)
15. Litchfield, Jr. Jt. and Wilcoxon, F. : A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol Exper Ther.*, 96, 99 (1949)

(1995년 6월 2일 접수)