



토끼에서 레몬그라스(*Cymbopogon citratus*) 정유의 일차피부자극시험

신진영¹ · 박승춘² · 김기현³ · 신동호¹ · 김성호¹ · 김종춘¹
¹전남대학교 수의과대학, ²경북대학교 수의과대학, ³(주)바이오미스트

Primary Dermal Irritation Study of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil in Rabbits

Jin-Young Shin¹, Seung-Chun Park², Ki-Hyun Kim³, Dong-Ho Shin¹, Sung-Ho Kim¹ and Jong-Choon Kim¹

¹College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757

²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701

³Biomist Co., Daejeon 305-764, Korea

Received July 5, 2005; Accepted August 10, 2005

ABSTRACT. The present study was carried out to investigate the skin irritation potential of lemon grass essential oil in rabbits. A volume of 0.5 ml of test article was applied to intact and abraded skins, respectively, for 24 h in 6 healthy male New Zealand White rabbits. Parameters measured during 72 h observation period were mortality, clinical signs, body weight changes, and local irritation. All rabbits showed severe edema at both 24 h and 72 h after the application of test article. These animals also showed very slight to severe erythema and/or slight eschar formation at both 24 h and 72 h. The edema and erythema induced by lemon grass essential oil were recovered on day 7 of additional 11-day recovery period, but the eschar formation was not recovered at the end of recovery period. On the other hands, there were no treatment-related adverse effects on clinical sign, body weight and gross finding in rabbits. Based on these results, it was concluded that a single dermal application of the undiluted lemon grass essential oil caused very slight to severe edema, erythema and eschar formation in rabbits and showed a primary irritation index score of 5.63 indicating severe irritation. The results of this study strongly suggest that lemon grass essential oil should be used with care and in highly diluted forms especially when directly applied to the skin.

Keywords: Lemon grass essential oil, Dermal irritation study, Primary irritation index, Rabbits.

서 론

최근 축산업의 집단지화 및 대규모화는 가축이 병원체에 노출될 가능성과 질병전파의 위험성을 증가시키고 있으며, 이로 인해 질병을 예방하고 치료하기 위한 항생제의 사용량은 크게 증가하고 있다. 그러나 광범위 항생제의 사용은 다양한 부작용과 항생제 내성균의 출현, 축산물의 항생제 잔류 등 여러 가지 문제점을 유발하고 있는 것이 현실이다. 따라서 최근에는 항생제를 사용하지 않은 축산물

에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있어 축산분야에서의 항생제 사용을 제한하는 움직임과 함께 항생제를 대체할 효소제나 미생물제, 유기산제, 식물추출물, 식물정유(essential oil) 등에 대한 연구개발이 크게 증가하고 있다(정 등, 2003).

식물정유는 고대시대로부터 의약품이나 식품, 음료, 화장품, 향료, 향기요법(aromatherapy) 등 다양한 용도로 사용되어왔다. 레몬정유는 주로 레몬(*Citrus limonum*)이나 레몬유칼립투스(*Eucalyptus citriodora*), 레몬그라스(*Cymbopogon citratus*), 레몬은매화(*Backhousia citriodora*), 레몬버베나(*Lippia citriodora*), 레몬밤(*Melissa officinalis*) 등으로부터 추출한다. 주 성분은 geraniol과 neral를 포함하는 citral로써(Onawunmi *et al.*, 1984;

Correspondence to: Jong-Choon Kim, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr

Brophy *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2000), 향균과 항진균, 항암 및 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있어(Bankole *et al.*, 2005; de Sousa *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2004), 산업적 활용가치는 매우 크다고 할 수 있다. 본 연구팀에서는 최근 향균 및 항진균 활성이 있는 정유조성물을 개발하였으며(김과 최, 2001; 김과 최, 2002), 이를 이용하여 축산분야에서 화학합성 향균제를 대체할 수 있는 고효율의 천연소독제와 향균제 개발을 진행하고 있다. 그러나 이들 물질을 상품화하기 위해서는 먼저 신뢰성 있는 독성 평가가 수행되어야 하나 레몬그라스 정유에 대한 안전성평가는 국내외적으로도 거의 수행된 바가 없어 이에 대한 연구가 시급히 요구되고 있다. 정유를 함유하고 있는 허브식물의 사용은 자연 유래의 특성으로 인해 합성화학물질에 비해 비교적 안전한 것으로 인식되고 있지만 이들 역시 다양한 부작용을 유발한다는 것은 잘 알려져 있다(Deng, 2002).

본 연구는 레몬그라스 정유에 대한 안전성평가의 일환으로 피부노출에 의한 피부자극성을 조사하기 위해 식품의약품안전청의 "의약품등의독성시험기준(1999)"에 준하여 일차피부자극시험을 수행하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 4개월령의 New Zealand White 계통의 수컷토끼를 화인실험동물센터(나주)로부터 구입하여 1주일간의 순화 및 검역을 거친 후 시험에 공시하였다. 본 계통의 토끼는 피부자극시험에 일반적으로 많이 사용되는 종으로서, 동일한 조건하에서 사람 피부보다 예민하게 반응하며 또한 비교적 풍부한 시험 기초자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다. 입수 시 8마리(체중, 2,183~2,412 g)를 구입하여 피부에 이상이 없고 건강한 6마리(체중, 2,251~2,463 g)를 선발하여 시험에 이용하였다. 사육조건은 온도 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기횟수 12~15회/시간, 조명 150~300 Lux로 12시간(인공조명, 오전 8시~오후 8시)으로 하였으며, 순화, 검역 및 시험기간 동안 3단 4열의 사육상자대에 배열된 스테인레스제 사육상자(420W × 500L × 300H mm)에 개체별로 수용하였다. 사육상자에는 시험번호와 동물번호를 기재한 개체식별카드를 부착하였다. 사료는 토끼용 고형사료(퓨리나 코리아, 평택)를, 물은 상수도수를 자유섭취 시켰다.

시험물질

본 시험에 사용한 레몬그라스 정유는 (주)바이오미스트

(대전)로부터 공급받아 사용하였으며, 공급된 원제를 사용하여 시험하였다. 성분분석 결과, 본 시험에 사용된 레몬그라스 정유는 geranial 41.7%, neral 31.1%, geraniol 2.2%, myrcene 2.2% 및 기타 22.8%로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

시험군의 구성 및 시험물질의 적용

시험물질을 적용하기 위해 적용 전날에 동물의 배부(가로세로 약 15 cm씩)를 동물용 전기제모기로 제모 하였다. 동물의 척추를 중심으로 좌우 각각 2개소(각각 찰과 및 비찰과 부위, 2.5 cm × 2.5 cm 크기)를 설정하여, 좌측구획은 무처리 대조구획으로, 우측구획은 시험물질을 적용하는 처치구획으로 정하여 시험하였다. 찰과는 주사침을 이용하여 표피만 손상되고 출혈이나 진피에 손상이 가지 않을 정도로 "#" 모양으로 실시하였다. 투여 당일 오전에 레몬그라스 정유 원제를 우측의 찰과부위 1개소와 비찰과부위 1개소에 각각 0.5 ml을 적용하였고, 대조구획에는 처치를 하지 않았다. 적용 후 처치구획 및 대조구획을 거즈로 덮은 후 비자극성 테이프로 잘 고정하여 24시간 동안 적용시켰다. 시험물질을 적용하고, 24시간 경과 후 잔류하는 시험물질을 제거하기 위해 미온수로 적용부위를 부드럽게 세정해 주었다.

일반증상 및 사망의 관찰

검역 및 순화기간에는 매일 1회씩 모든 동물에 대해 관찰하였고, 시험물질 적용기간에는 투여 전과 후에 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰하였다. 단, 이상증상이 발생되면 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

체중측정

동물 입수 시와 시험물질 적용 전, 적용 후 1일 및 3일째에 개체별 체중을 측정하였다.

적용부위의 관찰 및 자극성의 평가

적용부위의 피부반응 평가는 식품의약품안전청의 "의약품등의독성시험기준(1999)"에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다. 24시간 동안 시험물질을 적용한 후 패취를 제거하여 24시간째(패취제거 직후) 및 72시간째(패취제거 후 48시간째)에 유발된 홍반(erythema)과 가피(eschar), 부종(edema) 등의 자극성 반응을 관찰하였다. 모세혈관의 울혈에 의한 피부 발적 등 여러 가지 원인으로 인하여 혈액에 의해 피부에 나타난 적색반응은 홍반으로 평가하였고, 부식작용 또는 괴저에 의하여 생긴 피부조직의 부육상태는 가피로 하였으며, 체액이 피하조직에

축적되어 부여오른 것은 부종으로 평가하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 일차피부자극지수(Primary Irritation Index, PII)의 산출방법에 따랐다(Draize *et al.*, 1944; Patrick and Maibach, 1989). 본 시험에서는 시험물질 적용 후 72시간까지도 피부자극성이 인정되어 관찰기간을 추가로 11일간 연장하여 적용 후 14일까지 회복성 여부를 평가하였다.

결 과

일반증상 및 사망률

일반증상을 관찰한 결과(Table 1), 시험물질의 적용에 기인된 일반증상과 사망은 인정되지 않았다.

체중변화

시험기간 중 체중변화를 관찰한 결과(Table 2), 적용 후 1일째의 체중이 적용 전 체중에 비해 경미한 감소가 인정되었으며, 적용 후 3일째에는 회복되는 경향이 인정되었다.

피부자극성의 평가

시험물질 적용 후 24시간 및 72시간째에 적용부위의 자극성을 평가한 결과는 Table 3에 요약하였다. 모든 동물의 무처리 대조구획에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으나 시험물질 처치구획에서는 다양한 피부자극반응이 관찰되었다. 부종은 시험물질 적용 후 24시간 및 72시간째에 모든 동물의 찰과 및 비찰과 부위에서 심한 정도

Table 1. Mortality and clinical signs of rabbits treated with lemon grass essential oil

Summary of mortality and clinical sign	
No. of rabbits examined	6
Appears normal (%)	6 (100)

Table 2. Body weight changes of rabbits treated with lemon grass essential oil

Animal No.	Days after treatment		
	0	1	3
1	2412	2398	2420
2	2277	2256	2195
3	2350	2348	2363
4	2463	2417	2371
5	2394	2367	2390
6	2251	2244	2308
Mean \pm SD	2357.8 \pm 81.62	2338.3 \pm 72.58	2341.2 \pm 80.54

로 관찰되었다. 홍반과 가피형성의 경우, 적용 후 24시간째에는 찰과부위 4례와 비찰과부위 2례에서 아주 경미한 홍반이 관찰되었으며, 적용 후 72시간째에는 모든 동물의 찰과 및 비찰과부위에서 분명한 홍반에서부터 가피형성까지 다양한 정도로 자극성이 인정되었다. 피부자극성의 회복성 유무를 관찰하기 위해 적용 후 14일까지 관찰기간을 연장하여 피부반응을 관찰한 결과, 부종과 홍반은 10일째부터 회복성이 인정되었으나 가피형성은 시험물질 적용 후 14일까지도 완전히 회복되지 않았다. 상기 결과를 이용하여 Draize(1944)법에 따라 일차피부자극성 정도를 평

Table 3. Results of skin reaction of rabbits treated with lemon grass essential oil

Sites	Control site								Test site								
	Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema				
Change	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		
Phases	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	
Time (h)																	
Animal No.																	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	4	4	4	4	4
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	3	4	4	4	4
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	4	4	4	4
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3	4	4	4	4
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	4	4	4	4	4
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	4	4	4	4
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33	2.50	0.67	3.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Total score	0								22.50								
PII ^{a)}	0								5.63								

Erythema was scored as follows: no erythema = 0, very slight erythema (barely perceptible) = 1, well-defined erythema = 2, moderate to severe erythema = 3, and severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth) = 4. Edema formation was scored as follows: no edema = 0, very slight edema (barely perceptible) = 1, slight edema (edges of area well-defined by definite raising) = 2, moderate edema (raised approximately 1 mm) = 3, and severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure) = 4.

^{a)}Primary Irritation Index = total score/4.

가한 결과, 레몬그라스 정유의 일차피부자극지수는 5.63으로 산출되었다.

고 찰

최근 식물정유의 다양한 효능이 새롭게 밝혀지면서 정유를 포함한 허브산업이 치료효능과 기능성을 증진시키는 대체의학의 한 축으로써 그 이용가치가 크게 증가하고 있다. 그러나 다양한 생리활성을 가진 식물정유를 산업화하기 위해서는 이들에 대한 생리활성성분의 검색뿐만 아니라 신뢰성 있는 독성평가로 안전성을 확보하는 것이 필수적으로 요구된다(Choi *et al.*, 2002). 본 시험에서는 레몬그라스 정유의 일차피부자극성 잠재력을 평가하기 위해 New Zealand White계 토끼를 이용하여 시험한 결과, 레몬그라스 정유는 심한 자극성 물질(severe irritating agent)로 나타났다.

일반증상을 관찰한 결과, 레몬그라스 정유의 피부적용은 토끼의 일반증상과 사망률에 어떠한 부작용도 유발하지 않는 것으로 나타났다. 이전 시험의 연구결과에 따르면, *Origanum vulgare* Linne로부터 추출한 oregano oil을 토끼에 피부적용하면 다양한 독성증상과 함께 약 33%의 사망률을 나타내었다(Shin *et al.*, 2005). 이러한 결과는 레몬그라스 정유는 oregano oil에 비해 경피적용에 의한 독력이 현저히 약하다는 것을 암시해 준다. 시험물질 적용 후 1일째에 관찰된 경미한 체중의 감소는 시험물질의 적용에 의한 독성소견이라기 보다는 시험물질의 경피적용에 의한 물리적 스트레스에 기인된 것으로 사료되며, 적용 후 3일째에는 정상적인 체중증가가 인정되었다.

적용부위의 피부반응을 관찰한 결과, 적용 후 24시간 및 72시간째에 모든 동물의 찰과 및 비찰과 부위에서 부종과 홍반 및 가피형성이 아주 경미한 정도에서부터 심한 정도로 관찰되었다. 이들 자극성 소견들의 회복성 유무를 평가한 결과, 부종과 홍반은 회복성이 인정되었으나 가피형성은 시험물질 적용 후 14일까지도 완전히 회복되지 않았다. 상기 결과를 이용하여 Draize(1944)법에 따라 일차피부자극성 정도를 평가한 결과, 레몬그라스 정유의 일차피부자극지수는 5.63으로 산출되었으며 원제는 심한 자극성 물질로 나타났다. 식물정유 중 일부는 사람 및 동물에서 피부자극성과 피부감작성(dermal sensitization)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 최근 Craig *et al.*(2005)의 연구에 의하면, 포트 오르포드 히말라야삼목 오일(Port-Orford-cedar oil)의 일차피부자극지수는 3.3이고 olive oil과 1:1로 희석 시 0.625로 감소한다고 한다. 서양 노간주나무 오일(Western juniper oil)의 일차피부자극지수는 2.7이고, 5% 희석용액은 0.3, 그리고 0.5% 희

석용액은 무자극성으로 확인되었다. 마우스를 이용한 local lymph node assay에서 50%의 서양 노간주나무 오일은 양성반응을 나타내었으나 5% 이하의 희석용액과 50% 이하의 포트 오르포드 히말라야삼목 오일은 과민성반응을 나타내지 않았다고 한다. 본 시험에서 평가된 레몬그라스 정유의 피부자극성은 상기한 두 물질의 원제와 본 연구실에서 이전에 평가한 oregano oil의 일차피부자극지수 2.79(Shin 등, 2005)와 비교할 때 각각 다소 강한 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 레몬그라스 정유는 상기한 다른 식물성 정유에 비해 약 2배 정도의 강한 자극성을 나타내어 사용 시 적절한 희석이 필요함을 암시해 준다. 한편 식물정유와 그 성분들은 세포막 손상을 유발하여 항균작용을 나타내며, 피부에 적용 시 세포손상이 피부염증의 발생기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hayes and Markovic, 2002; Prashar *et al.*, 2003; Prashar *et al.*, 2004). 향기요법이나 조미 및 방향산업에 폭 넓게 사용되는 라벤더 오일의 경우, 이러한 작용기전으로 인해 피부노출 시 일본인에서는 약 13.9%의 빈도로 접촉성피부염이 발생하는 것으로 보고된 바 있다(Sugiura *et al.*, 2000). 따라서 식물정유나 이들 성분들을 산업화하기 위해서는 세포독성과 피부염, 피부자극성 등의 독성잠재력을 평가하여 안전성을 확보하는 연구가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

결론적으로 New Zealand White 토끼에 레몬그라스 정유의 피부적용은 부종과 홍반 및 가피형성을 유발하며, 이들 피부자극성 영향은 적용 후 14일까지도 완전히 회복되지 않았다. 레몬그라스 정유의 일차피부자극지수는 5.63으로써 심한 자극성물질로 평가되어 사용 시에는 세심한 주의가 필요하며, 경피적용 제제로 개발하기 위해서는 피부에 대한 저자극성 또는 무자극성 용량의 산출이 필요한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 농림기술개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김기현, 최영신 (2001): 항균 및 항진균작용이 있는 정유 조성물 (대한민국 특허 제 0285781호), 2001년 1월 6일.
- 김기현, 최영신 (2002): 유물 및 기록물의 소독을 위하여 허브 정유를 이용한 소독방법 및 소독장치(대한민국 특허 제 0330963호), 2002년 3월 20일.
- 식품의약품안전청 (1999): 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 1999-61호, 식품의약품안전청, 서울.
- 신진영, 신동호, 김성호, 배춘식, 박승준, 김기현, 배주현, 김종춘

- (2005): 토끼에서 oregano 오일의 일차 피부 자극시험. 대한수의학회지, **45**, 39-43.
- 정해근, 방진기, 성낙술, 김성민 (2003): 자원식물의 기능성 정유 성분 이용고찰. 한작지, **48**, 41-48.
- Bankole, S.A., Joda, A.O. and Ashidi, J.S. (2005): The use of powder and essential oil of *Cymbopogon citratus* against mould deterioration and aflatoxin contamination of "egusi" melon seeds. *J. Basic. Microbiol.*, **45**, 20-30.
- Brophy, J.J., Goldsack, R.J., Fookes, C.J.R. and Forster, P.I. (1995): Leaf oils of the genus *Backhousia* (Myrtaceae). *J. Essent. Oil Res.*, **7**, 237-254.
- Choi, D.W., Kim, J.H., Cho, S.Y., Kim, D.H. and Chang, S.Y. (2002): Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. *Toxicology*, **181-182**, 581-586.
- Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H. and Sawamura, M. (2000): Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161.
- Craig, A.M., Karchesy, J.J., Blythe, L.L., Gonzalez-Hernandez, M.D.L. and Swan, L.R. (2005): Toxicity studies on western juniper oil (*Juniperus occidentalis*) and Port-Orford-cedar oil (*Chamaecyparis lawsoniana*) extracts utilizing local lymph node and acute dermal irritation assays. *Toxicol. Lett.*, **154**, 217-224.
- de Sousa, A.C., Alviano, D.S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano, C.S. and Gattass, C.R. (2004): *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 677-681.
- Deng, J.F. (2002): Clinical and laboratory investigations in herbal poisonings. *Toxicology*, **181-182**, 571-576.
- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390.
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E. and Mandrell, R.E. (2004): Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6042-6048.
- Hayes, A.J. and Markovic, B. (2002): Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 535-543.
- Onawunmi, G.O., Yisak, W.A. and Ogunlana, E.O. (1984): Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J. Ethnopharmacol.*, **12**, 279-286.
- Patrick, E. and Maibach, H.I. (1989): *Dermatotoxicology in Principles and Methods of Toxicology*. (A.W. Hayes, Ed.) Raven Press, New York, pp. 383-406.
- Prashar, A., Hili, P., Veness, R.G. and Evans, C.S. (2003): Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, **63**, 569-575.
- Prashar, A., Locke, I.C. and Evans, C.S. (2004): Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.*, **37**, 221-229.
- Sugiura, M., Hayakawa, R., Kato, Y., Sugiura, K. and Hashimoto, R. (2000): Results of patch testing with lavender oil in Japan. *Contact Dermatitis*, **43**, 157-160.