J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 4, pp. 377~382 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

염화벤자코늄과 구연산을 주성분으로 하는 살균 소독제 라미아-킬에 대한 급성경구독성 및 피부자극성 시험에 관한 연구

차춘남[1] · 이여은[2] · 손송이 · 유창열[3] · 박은기[4] · 최현주[5] · 김석 · 이후장*

경상대학교 수의과대학 생명과학연구원, [1]경상대학교 산업시스템공학부 공학연구원
[2]경상대학교 보건대학원 환경보건학과, [3]경남도립남해대학 인터넷정보학과,
[4]고신대학교 의과대학, [5]인제대학교 임상병리학과, 고령자라이프디자인연구소

Acute Oral Toxicity and Skin Irritation Studies on Lamia-Kill® Composed of Benzalkonium Chloride and Citric Acid

Chun-Nam Cha[1], Yeo-Eun Lee[2], Song-Ee Son, Chang-Yeol Yoo[3], Eun-Kee Park[4], Hyunju Choi[5], Suk Kim, and Hu-Jang Lee*

Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea
[1]Engineering Research Institute, Department of Industrial Systems Engineering, Gyeongsang National University, 900 Gajwa-dong, Chinju 600-701, Korea
[2]Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health, Gyeongsang National University, Chinju 660-751, Korea
[3]Department of Computer Information, Gyeongnam Provincial Namhae College, Namhae 668-801, Korea
[4]Department of Medical Humanities and Social Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan 602-703, Korea
[5]Elderly Life Redesign Institute, Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea
(Received November 1, 2011/Revised November 9, 2011/Accepted November 15, 2011)

ABSTRACT - This test was performed to evaluate the acute oral toxicity and skin irritation of Lamia-Kill®, disinfectant, containing 20% benzalkonium chloride and 10% citric acid. In acute oral toxicity, Lamia-Kill® was orally administered at dose levels of 2,000, 1,000, 500, 250 and 0 mg/kg body weight. After single oral administration to both sexes of SD rats, the rats were observed for 14 days. In primary skin irritation test, New Zealand white rabbits were dermally treated with Lamia-Kill® for 24 hr and observed for 3 days. All rats treated with Lamia-Kill® were induced no toxic signs in mortalities, clinical findings, body weights and gross findings. Also, the disinfectant did not induce any adverse reactions such as erythema and edema on intact skin sites for the most part rabbits, but on abraded skin sites, some rabbits showed very slight erythema on 24 hr after topical application. With the results of this study, Lamia-Kill® have no effect on acute toxicity and side effect in SD rats and was classified as a practically non-irritating material based on the score 0.50 of primary irritation index.

Key words: Disinfectants, Benzalkonium chloride, Citric acid, Acute oral toxicity, Skin irritation

살균소독제인 라미아-킬(Lamia-Kill®)은 염화벤잘코늄(200 g/L)과 구연산(100 g/L)을 주요 성분으로 하는 살균 및 살바이러스 소독제로서, 가축 사육 농장에 상재하는 병원성 세균, 바이러스 및 기생충의 살균 소독, 그리고 도축장과 축산물판매장의 살균 및 소독을 목적으로 생산된 제품이다.

염화벤잘코늄은 양이온 계면활성제로서 소독제, 보존제, 그리고 안정제로 광범위하게 사용되고 있다. 일부 의약품의 경우에는 낮은 농도의 염화벤잘코늄을 보존제 혹은 안정제로 사용하고 있으며[1], 높은 농도의 염화벤잘코늄은 소독제로 사용되고 있다[2]. 강력한 살균소독제인 염화벤잘코늄은 농축산, 식품 그리고 의료분야 등에서 사용되고 있으며, Gram (+)균, Gram (-)균, 곰팡이, 그리고 바이러스 등에 살균력을 갖고 있는 것으로 알려져 있다[3]. 염화벤잘코

*Correspondence to: Hu-Jang Lee, Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea
Tel: 82-55-751-6642, Fax: 82-55-751-5803
E-mail: hujang@gsnu.ac.kr

늄의 살균작용 기전은, 세균의 세포막을 분리시켜 세포의 투과성을 저해시키고, 세포질 벽의 보존성을 저해시켜 세포질의 유실을 유도하는 것으로 알려져 있다[4-6].

4급암모늄계 살균소독제인 염화벤잘코늄은 부식성이 없고, 독성이 낮으며, 세척효과가 있어 식품가공기구에도 많이 사용되고 있다[7]. 최근, 가금류나 어류 가공장에서 분리된 *Pseudomonas spp*., *Staphylococcus spp*., *Listeria monocytogenes* 중 10-30%가 염화벤잘코늄에 대해 내성을 나타낸다고 보고된 바 있으나[8-10], Kim et al.[7]의 연구결과에서는 *Salmonella spp*.와 *Listeria monocytogenes* 모두 염화벤잘코늄에 감수성이 매우 높은 것으로 나타났다.

구연산은 세균, 식물, 무척추동물 그리고 포유류 등에 광범위하게 존재하는 중요한 유기산 중의 하나이다. 유기산은 안전하고 무독하며, 살아있는 동물의 체내에서 TCA 회로에 참여하여 중간산물로 ATP를 만드는데 중요한 물질이다. 구연산은 식품첨가제, 제약, 그리고 기타 산업에서 산미제, 풍미제, 항산화제 그리고 제품 개선제 등으로 사용되고 있다[11]. 구연산은 세균 등의 세포벽을 통과함으로써 높은 살균효과를 갖고 있어서, 1-3%의 농도에서도 *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp*. 그리고 *Listeria monocytogenes* 등을 억제하는 효과를 갖는 것으로 보고되고 있다[12-13].

Oxford et al.[14] 연구에 따르면, 인플루엔자 바이러스에 대하여 염화벤잘코늄과 구연산을 주요 성분으로 한 소독제가 강력한 살바이러스 효과를 나타낸 것으로 보고하였다.

미국환경보호청 (EPA)은, 구연산을 미국 식품의약품안전청(FDA)이 식품에 제한 없이 사용할 수 있는 안전한 물질로 분류한 것과 같이, 전한 물질로 분류하고 있으며, 최근에는 살균제, 살바이러스제, 그리고 살곰팡이제 등으로 제품 등록이 되어 있는 것으로 보고하였다[15].

본 연구에서는 염화벤잘코늄 20%와 구연산 10%의 합제인 살균 소독제, 라미아-킬에 대하여, 국립수의과학검역원 고시 제2009-18호, “동물의약품 등 독성시험지침”[16]에 기초하여 급성경구독성 및 피부자극성 시험을 통해 안전성을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험물질

본 시험에 사용된 실험물질은 (주)한국스테비아에서 공급받은 주성분이 염화벤잘코늄과 구연산인 라미아-킬 용액을 사용하였다. 물질은 노란색의 액제로서 사용기간 동안 실온에 보관하였고, 투여 시, 부형제인 멸균증류수를 사용하여 조제하였다.

실험동물

급성경구독성시험을 위해 6주령의 Sprague-Dawley계 랫드(체중; 수컷 122-137 g, 암컷, 113-128 g)와, 피부자극성 평가를 위해 건강한 수컷 New Zealand White Rabbit(2.6-3.2 kg)을 (주)샘타코(용인)에서 구입하여 시험에 사용하였다. 실험동물은 사육실 및 실험실 환경에서 1주간 적응시킨 후 시험에 사용하였다.

사육환경

온도는 25 ± 2°C, 상대습도 50 ± 10%, 조명시간 12시간 (오전 7시 점등 오후 7시 소등), 환기횟수 10~13회/hr 및 조도 150~200 Lux로 설정된 경상대학교 부설 중앙동물실험실에서 사육하였다. 사육환경 모니터링을 위하여 온·습도는 매시간 측정하였으며, 기타 환경은 정기적으로 측정하였다. 사료는 실험동물용 랫드사료 ((주) 삼양사, 서울)와 토끼사료 ((주) 퓨리나코리아, 서울)를 자유 급여하였다. 랫드는 5마리씩, 순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (400 × 250 × 180 mm)에, 백색토끼는 한 마리씩, 철망케이지 (600 × 400 × 450 mm)에 넣어 사육하였다.

급성경구독성시험

실험물질의 투여용량은 예비실험을 통하여 결정하였다. 실험물질은 암·수 각각 군당 10마리씩으로 하여, 250, 500, 1,000, 2,000 mg/kg의 용량으로 경구투여용 카데터를 이용하여 강제 급여하였다. 약제투여 후, 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

실험물질 투여 후, 익일부터 14일까지는 매일 1회 이상씩 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 실험동물의 체중은 약제 투여 당일, 약제투여 후, 1, 3, 6, 9, 12, 14일에 각각 측정하였다. 실험동물 부검은 약제 투여 14일째 CO_2로 마취를 시킨 다음, 방혈치사 후 실시하였다.

피부자극성 평가

시험개시 24시간 전에 토끼의 등을 상처가 생기지 않도록 전기제모기와 면도기를 이용하여 털을 제거하였다. 시

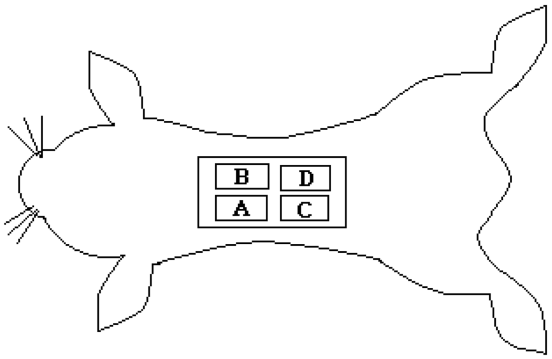

Fig. 1. Compartment of rabbit skin according to treatment of Lamia-Kill®. A, control site, intact skin; B, control site, abraded skin; C, treatment (Lamia-Kill®) site, intact skin; D, treatment (Lamia-Kill®) site, abraded skin.

험 당일 제모한 등에 척추의 좌우 약 2 cm 떨어진 부위에 전후 약 4 cm 거리를 두고 각각 두 부위씩 2.5 × 2.5 cm의 사각형을 그려 표시해 두었다. 표시된 네 부위 중 오른쪽 두 부위를 주사기 바늘을 이용하여 대각선 방향으로 각질층만 손상되고 진피는 손상되지 않으며 피가 나지 않을 정도의 찰과상을 내었다(Fig. 1).

토끼의 앞쪽 두 부위 (찰과 및 비찰과 부위) 는 대조부위로 하였고, 나머지 두 부위는 라미아-킬 0.5 ml를 피부에 골고루 도포하고, 시험부위 전체를 3겹의 거즈로 덮고, 탄력붕대로 감싼 다음 3 M 종이테이프로 가장자리를 잘 고정하였다.

실험물질 도포 24시간 후 거즈를 제거하고 피부에 영향을 미치지 않도록 잔류 실험물질을 미온수로 씻어내었다. 실험물질 도포 부위를 세정한 후 4-5시간, 24시간 및 72시간 후에 피부반응을 "동물용의약품 등의 독성시험기준" 상의 "피부자극반응 평가표"(Table 1)에 따라 평가하여[16], 피부 1차 자극지수(primary irritation index, P.I.I.)를 산출하여 (Table 2), 자극성을 판정하였다[16,17].

Table 1. Grading Scale of skin irritation

Description	Score
Erythema and eschar formation	
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
Edema	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edge of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)	4

Table 2. Response categories of irritation in rabbit

Category	P.I.I.[1)]
Negligible	0 - 0.5
Slight irritation	0.6 - 2.0
Moderate irritation	2.1 - 5.0
Severe irritation	5.1 - 8.0

[1)]P.I.I., primary irritation index.

통계학적 분석

결과에 대한 통계적 처리는 Sigma plot (Systat Software Inc., USA)을 이용하여 student's t-test로 실시하였으며, $p < 0.05$일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

급성경구독성시험

Table 3은 실험물질의 농도별 경구투여 후, 증상들을 관찰한 것을 정리한 것이다.

실험물질 투여군의 경우, 이상증상은 관찰되지 않았으며, 암·수 모두 실험물질 투여군에서 사망동물 또한 관찰되지 않았다. 따라서 라미아-킬의 개략의 치사량(minimal lethal dose)은 암·수 모두 2,000 mg/kg 이상인 것으로 추정되었다.

Fig. 2는 실험물질 투여 암·수 랫드의 체중변화를 나타낸 것이다. 암·수 모두 전 실험물질 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 시험 전 기간 동안 아무런 임상증상도 관찰되지 않았다. 따라서 무관찰부작용량 (no observed adverse effect level, NOAEL) 역시 암·수 모두 2,000 mg/kg 이상이었다.

염화벤잘코늄 17% 함유 제품에 대한 Material Safety Data Sheet에 따르면[18], 랫드에 있어서 급성경구독성은 LD_{50}가 1,412 mg/kg으로 보고하고 있다. 또한, 99.5% 구연산에 대한 Material Safety Data Sheet에 따르면[19], 랫드에 있어서

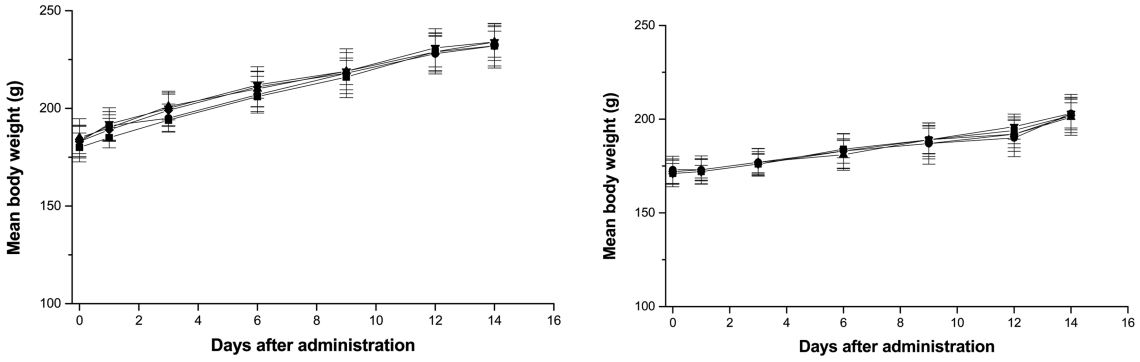

Fig. 2. Changes in body weights of male (A) and female (B) rats orally administered with Lamia-Kill. ■, control; ▲, 250 mg/kg; ●, 500 mg/kg; ▼, 1,000 mg/kg; ◆, 2,000 mg/kg.

Table 3. Clinical signs of rats orally administered with Lamia-Kill

Signs observed	Groups				
	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg
Male					
Appears normal	10/10[1)]	10/10	10/10	10/10	10/10
Weakening	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Increase of locomotor activity	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Decrease of locomotor activity	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Salivation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Soiled perineal region	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Contused wound	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Death	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female					
Appears normal	10/10				
Weakening	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Increase of locomotor activity	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Decrease of locomotor activity	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Salivation	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Soiled perineal region	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Contused wound	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Death	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

[1)]No. of animals with the sign/No. of animals examined

Table 4. The evaluation on skin irritation of Lamia-Kill

Skin reaction				Animal						Total score	Mean score	Total of mean	P.I.I.[3)]
				1	2	3	4	5	6				
Control sites	Erythema & eschar	A[1)]	24[2)]	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
		B	24	0	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Edema	A	24	0	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
		B	24	0	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
Treated sites	Erythema & eschar	A	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0.50	0.50
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
		B	24	0	1	0	1	0	1	3	0.50		
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Edema	A	24	0	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		
		B	24	0	0	0	0	0	0	0	0		
			72	0	0	0	0	0	0	0	0		

[1)]A, intact; B, abraded.
[2)]Time after topical application.
[3)]P.I.I., primary irritation index.

급성경구독성은 LD_{50}가 3,000 mg/kg으로 보고하고 있다. 염화벤잘코늄의 Material Safety Data Sheet의 결과와 비교하여, 본 연구 결과의 LD_{50}은 높은 값을 나타내었는데, 이는 라미아-킬에 함유된 구연산과 부형제의 영향에 의해 독성이 완화된 것으로 추정된다.

피부자극성 평가

라미아-킬 도포 24시간 후, 거즈를 제거하고 피부에 영향을 미치지 않도록 잔류 실험물질을 미온수로 씻어낸 다음, 3일간의 관찰기간 동안 실험물질 도포로 인한 특이한 일반증상 및 사망 예는 관찰되지 않았다.

살균소독제, 라미아-킬 도포 후 도포부위의 잔류 실험물

질을 미온수로 씻어낸 다음, 24시간 후 관찰결과, 찰과부위에서 약간의 홍반과 부종이 관찰되었으나, 이후에는 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다. 또한, 대조부위와 비찰과부위에서는 어떠한 피부반응도 관찰 할 수 없었다(Table 4).

이러한 관찰결과로부터 피부 1차 자극지수(P.I.I.)를 산출한 결과, 살균소독제인 라미아-킬의 P.I.I.는 "0.50"으로 "비자극성 물질"로 평가되었다. 따라서 토끼를 이용한 피부 1차자극성 시험에서 본 살균소독제, 라미아-킬은 접촉성 피부염을 일으키지 않는 것으로 확인되었다.

한편, 염화벤잘코늄 17% 함유 제품에 대한 Material Safety Data Sheet에 따르면[18], 피부자극성 평가를 수행한 결과 약한 피부자극성을 나타내었다고 보고하였다. 이는 본 연구에서 사용한 라미아-킬의 성분 중 염화벤잘코늄의 농도 20% 보다 다소 높은 농도이다. 그러나 본 시험에서는 라미아-킬의 피부자극성이 매우 약해 비자극성물질로 평가되었다. 이는 앞서 급성독성시험의 결과와 같이 라미아-킬에 함유된 구연산과 부형제의 영향으로 피부자극성이 완화된 것으로 추정된다.

이상의 연구 결과를 종합해 볼 때, 염화벤잘코늄과 구연산을 주성분으로 하는 살균소독제, 라미아-킬은 임상적용 시 본 약제에 의한 랫드의 급성경구독성이 LD_{50} 2,000 mg/kg 이상과, 토끼에서 피부자극 1차 지수가 0.50으로 급성독성 및 자극성에 의한 부작용을 유발하지 않을 것으로 사료된다.

요 약

살균소독제, 라미아-킬(benzalkonium chloride(20%), citric acid(20%))에 대하여 랫드와 토끼를 이용하여 급성경구독성과 피부 자극성 평가를 각각 수행하였다.

랫드에 라미아-킬 2,000 mg/kg 농도를 최고농도로 하여 단회 투여 후, 14일간 관찰한 결과, 사망, 이상증상 및 체중변화 등은 관찰되지 않아, 라미아-킬의 LD_{50}은 2,000 mg/kg 이상으로 추정되었다. 토끼의 등 부위의 털을 제거하고 찰과부위와 비찰과 부위에 여러 농도로 라미아-킬을 도포한 후, 피부 자극성을 확인한 결과, 라미아-킬의 1차 자극지수가 0.50으로 비자극성 물질로 분류되었다.

따라서, 본 연구를 통하여, 라미아-킬은 급성경구독성 시 안전한 물질이며, 피부 자극성을 야기하지 않는 물질로 평가되었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008338)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Fan, T. and Wall, G.: Determination of benzalkonium chloride in ophthalmic solutions containing tyloxapol by solid phase extration and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 1172-1174 (1993).
2. American College of Toxicology (ACT).: Final report on the safety assessment of benzalkonium chloride. *J. Am. Col. Toxicol.*, **8**, 589-625 (1989).
3. Frier, M.: Derivatives of 4-Amino-quinaldinium and 8-Hydroxyquinoline. I*n*: *Inhibition and destruction of the microbial cell*, Hugo, W.B. (ed.), Academic Press, London, pp. 107-120 (1971).
4. Denyer, S.P.: Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **36**, 227-245 (1995).
5. Kanazawa, A., Ikeda, T. and Endo, T.: A novel approache to mode of action of cationic biocides: morphological effect on antibacterial activity. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 55-60 (1995).
6. Salton, M.R.J.: Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability. *J. Gen. Physiol.*, **52**, 277S-252S (1968).
7. Kim, H., Yoon, H., Choi, H., Jeon, D., Eom, M., Sung, J., Park, N., Won, S., Kim, N., Sung, D., Kwak, H., Kwon, K. and Lee, Y. Evaluation on efficacies of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp*. *J. Fd Hyg. Safety*, **22**, 132-136 (2007).
8. Heir, E., Sundheim, G. and Holck, A.L.: Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of resistance plasmid pST 827. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 149-156 (1995).
9. Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. and Rorvik, L.M.: Occurrence of and apossible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **62**, 57-63 (2000).
10. Langsrud, S. and Sundheim, G.: Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomanas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J. Appl. Bacteriol.*, **82**, 705-712 (1997).
11. Xiea, X.L., Hub, Y.H., Wanga, L.L., Chenc, C.Q., Huangb, Q.S., Zhoub, H.T. and Chenb, Q.X.: Inhibitory kinetics of citric acid on β-N-acetyl-d-glucosaminidase from prawn (*Litopenaeus vannamei*). *Fish Shellfish Immunol*., **29**, 674-678 (2010).
12. Laury, A.M., Alvarado, M.V., Nace, G., Alvarado, C.Z., Brooks, J.C., Echeverry, A. and Brashears, M.M.: Validation of a lactic acid- and citric acid-based antimicrobial product for the reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on beef tips and whole chicken carcasses. *J. Food Prot*., **72**, 2208-1111 (2009).
13. Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M. and Labadie, J.: Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol*., **86**, 469-476 (1999).
14. Oxfrod, J.S., Potter, C.W., McLaren, C. and Hardy, W.: Inactivation of influenza and other viruses by a mixture of virucidal compounds. *Appl. Microbiol.*, **21**, 606-610 (1971).
15. Environmental Protection Agency(EPA). Registration eligibil-

ity document: Citric acid. EPA, Washington D.C., pp. 2-5 (1992).
16. 국립수의과학검역원: 동물용의약품 등 독성시험지침, 고시 제2009-18호, 국립수의과학검역원, 안양 (2006).
17. Rush, R.E., Bonnette, K.L., Douds, D.A. and Merriman, T.N.: Dermal irritation and sensitization. I*n CRC Handbook of toxicology*, 2nd Ed. (Derelanko, M.J. and Hollinger, M.A. eds.) CRC Press, Boca Raton, pp. 105-162 (1995).
18. Material Safety Data Sheet. Benzalkonium chloride solution 17% MSDS. SciencLab.com, Inc., Huston, pp. 4 (2010).
19. Avogadro. Material Safety Data Sheet. Citric acid. Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, pp. 2-3 (2000).