J. Fd Hyg. Safety 11(1), 17 - 24(1996)

파라옥시안식향산류 보존료 병용시의 유전적 안전성 평가

윤여표 · 임일호 · 이정석 · 김대병* · 허문영**,†
*충북대학교 약학대학, *국립보건안전연구원, **강원대학교 약학대학*

Genotoxicity Study of Combinations of P-Oxy Benzoic Acids

Yeo-Pyo Yun, Il-Ho Lim, Jung-Suk Lee, Dae-Byung Kim*, Moon-Young Heo,†**
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongiu, 361-763, Korea
**National Institute of Safety Research,Seoul 122-020, Korea*
***College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

ABSTRACT -- The genotoxicity of combinations of four p-oxybenzoic acids (methyl paraben, ethyl paraben, isopropyl paraben, butyl paraben) and benzoic acid had been evaluated. The *in vitro* Ames test using *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537) and the *in vivo* micronucleus assay using mouse peripheral blood were performed. Methyl paraben plus benzoic acid, ethyl paraben plus benzoic acid, and ethyl paraben plus butyl paraben slightly increased the frequency of micronucleated reticulocytes in the high doses, but were negative in Ames test with *Salmonella typhimurium* with and without rat liver microsomal activation. The other combinations tested were negative in Ames test and did not show any clastogenic effect in micronucleus test. These results suggest that genotoxicity can produced by the combinations of p-oxybenzoic acid.

Key words □ P-oxybenzoic acids, Ames test, Micronucleus test, Genotoxicity

현대 산업사회의 발달과 함께 우리 인간은 자의적 타의적으로 식품첨가물등에 노출이 불가피하게 되었고 이들 화학물질에 대한 노출은 생체기능에 변화를 가져오고 유전적인 영향을 미치게 된다. 따라서 이들 물질의 유전독성에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다. 유전독성시험은 발암성시험의 예비검색법으로서 화학물질의 유전자에 미치는 영향을 단기간에 볼 수 있는 시험이다. 특히, 인위적으로 화학물질에 대한 감수성을 높인 Salmonella를 이용한 Ames Test[1]는 DNA상해를 단시간에 검출할 수 있는 우수한 방법이다. 한편 결손, 삽입, 또는 전좌등 비교적 큰 단위의 DNA변화는 염색체 수준에서의 검출이 가능하다. OECD의 유전독성에 관한 Guideline[2]은 화학물질의 변이원성 유무를 알기 위해서는 적어도 두 가지 이상의 유전학적 지표인 유전자 돌연변이와 염색체이상에 해당하는 시험법을 적용하는 것이다. 우리나라에서도 유전독성 평가를 위해서 세균을 이용한 유전자 돌연변이 시험과 설치류를 이용한 소핵시험 및 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상 시험을 채용하고 있다.[3]

식품첨가물 중 대표적인 보존료인 파라옥시안식향산 유도체들은 현재 이들 물질을 단독으로 사용하기 보다는 2가지 이상 혼합해서 사용하는 경향이 높아지고 있다. 이들 보존료에 대한 유전독성자료는 개개의 물질에 대한 보고는 있으나 2가지 이상 혼합할 때의 유전적 영향에 대한 평가는 전무한 실정이다.[4] 따라서, 본 연구에서는 개개의 성분에 대한 유전독성이 충분히 검증되지 아니하였고 특히 2종 이상을 혼합하여 사용하는 경우 그 유전독성에 대한 연구보고 사례가 전무한 파라옥시안식향산 유도체들인 methyl paraben, ethyl paraben, isopropyl paraben, butyl paraben 및 benzoic acid과 이들 혼합물에 대하여 유전적 안전성을 평가하고자 했으며, 이를 위하여 *in vitro* 시험인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였고, *in vivo*시험으로 ICR 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

재료 및 방법

Salmonella를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames Test)

시험용 균주 -- 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA

† Author to whom correspondence should be addressed.

98, TA100, TA1535, TA1537균주는 한국화학연구소로부터 입수하였으며 그 유전적 특성은 Table 1과 같았다. 각 균주는 Maron & Ames원저[1]에 제시된 방법에 따라, 본 시험에 앞서 ① Histidine 요구성 ② Crystal violet 감수성 ③ UV 감수성 ④ Ampicillin 내성 ⑤ 자발 복귀변이 빈도 등의 유전독성을 확인하였다. 각 균주는 -70℃의 DMSO 동결 보존으로부터 직접 15 m*l*의 2.5% Nutrient broth에 접종하여 120 rpm, 37°C 에서 약 10~12시간 진탕배양한 후 시험에 사용할 균 현탁액으로 하였다.

배지 — 1) Minimal glucose agar medium : 유전독성 검색용의 배지로서 Vogel-Bonner medium E에 1.5% Bacto-Difco agar와 2% glucose를 함유하였다. Plate당 용량은 25 m*l*이며 plate는 γ선 멸균제품(Corning 100 mm × 20 mm)를 사용하였다. Vogel-Bonner medium E(50×)의 liter당 조성은 다음과 같았다.

Warm distilled water (45°C)	670 m*l*
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
Citric acid monohydrate	100 g
K_2HPO_4	500 g
$NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$	176 g

2) Top agar : 0.6% Difco agar와 0.5% NaCl을 함유한다. 사용에 앞서 microwave oven에서 녹인 후 top agar 100 m*l* 당 10 m*l*의 0.5 mM L-histidine HCl/biotin용액을 첨가하여 사용하였다.

3) Nutrient broth : 시험용 균주의 액체배양에 사용하며 Oxoid nutrient broth No. 2를 2.5% 함유한다. 이상 각 배지의 멸균은 고압증기멸균(121°C, 15 min)하였다.

S-9 mix의 조제 — *In vitro* 대사활성화를 위하여 S-9분획을 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 국립안전연구원에서 생산 및 사육한 SPF SD계 rat(male, 8주령, 약 200 g)에, corn oil에 희석시킨 Aroclor 1254(200 mg/m*l*)를 1회 복강내 투여(500 mg/kg)하여 4일째 경추탈구에 의하여 도살하였다. 간을 적출하고 간 중량의 3배량의 냉각한 0.15 M KCl용액에 넣어 균질화하고, 9,000 g에서 10분간 원심분리 후 그 상등액을 S-9분획으로 하였다. 이상의 모든 과정은 고압 증기 멸균한 용액과 초자류를 사용하여 무균적으로 행하였고, 조제한 S-9분획 0.1 m*l*를 Top agar와 함께 유전독성 검색용 배지에 plating하여 무균성을 확인하였다. S-9 mix의 조성은 다음과 같았다. 보조인자로서 8 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.33 mM KCl, 5 mM glucose-6-phosphate-di-Na, 4 mM NADP-di-Na Salt들을 0.05 M phosphate buffer(pH 7.4) 1 m*l*에 녹이고 한곳에 모아 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 1 m*l*를 가하여 5 m*l*로 만든 후 S-9 분획 0.5 m*l*를 가하여 전체를 5.5 m*l*로 만들어 사용했다. 보조인자는 0.05 M phosphate buffer(in ice, pH 7.4)에 0.45 μm filter로 filtration(멸균)하여 4시간 이내에 사용했다.

예비독성 시험 — TA100을 사용하여 DMSO를 용매로 S-9 mix를 넣을 때와 안넣었을 때로 구분하여 최고용해 농도로부터 공비 3의 7단계로 세포독성시험을 실시하여 최적농도를 정했다.

복귀돌연변이 시험 — 예비독성 시험에서 결정된 최적 농도로 TA98과 TA100, TA 1535, TA1537에서 실험하였다. 분주용 한천을 고압증기멸균하고 약 50°C로 냉각시킨후, 100 m*l*의 한천에 대하여 10 m*l*의 0.5 mM L-histidine/Biotin을 가하여 항온 수조내에서 45°C으로 유지했다. S-9mix를 제조하여 고정용량분주기(예 BCL Cat. No 1053-0.5 m*l*)에 넣어 빙냉보존했다. 시험물질을 칭량하여 독성시험에 의해 결정된 용량으로 희석했다. 모든 시험조작은 갈색광원이 설치된 클린벤치내에서 수행했다. 멸균시험관에 균배양액 0.1 m*l* 및 시험물질(최대 0.1 m*l*)를 넣었다. 이상의 내용물을 진탕기로 혼합하여 고형배지에 부었다. 샤알레 표면에 한천이 고루 전개되도록 평판을 회전시켰다. 연한천이 굳은후 평판을 뒤집어 37°C에서 48시간 배양했다. 모든 시험은 2매의 평판을 사용했다. 수작업으로 평판상의 집락을 계수했다. 복귀변이집락의 수는 2매의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이 유발성의 판정은 용매대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내었으며 또한 용량의 의존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다. 음성대조물질은 용매인 DMSO를 사용하였고, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용여부에 따라 Benzo(a)pyrene, Sodium azide, 9-Aminoacridine 등을 사용하였다.

Table 1. Genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* in Ames test.

Strain	Genetic characteristics	Reference[1]
TA98	hisD3052, rfa, ΔuvrB, pkM101	Maron & Ames
TA100	hisG46, rfa, ΔuvrB, pkM101	Maron & Ames
TA1535	hisG46, rfa, ΔuvrB,	Maron & Ames
TA1537	hisG3076, rfa, ΔuvrB,	Maron & Ames

Mouse 소핵시험(Mouse Micronucleus Test)

시액 — 1) Acridine orange 용액 : Acridine orange(AO)를 3차 증류수에 1 mg/m*l* 농도로 용해시켜 냉장실에서 보관하여 사용하였다.

2) MMC 용액 : Mitomycin C 1 mg/kg 용량으로 주사용 증류수에 용해시켜 조제하였다. Mouse 25 g 기준으로 0.1

ml가 되도록 하여 1 ml 주사기를 사용하여 복강투여하였다.

3) 단일검체용액의 조제 : Table 2에서 나타낸 benzoic acid 및 paraben류의 LD_{50}[5]을 참고로 하여 투여량기준을 임의로 정한 benzoic acid(LD_{50} 2.7 g/kg), methyl paraben(LD_{50} 3.0 g/kg), ethyl paraben(LD_{50} 2.5 g/kg), propyl paraben(LD_{50} 3.7 g/kg), butyl paraben(LD_{50} 0.95 g/kg)를 마우스에 0.1 ml/25 g투여시 LD_{50}의 1/2이 되도록 현탁액으로 제조한 것을 고농도의 단일검체용액으로 사용하였다. 또한 이것을 10배 희석한 것을 저농도의 단일검체용액으로 사용하였다.

4) 혼합검체용액의 조제 : 3)에서 조제한 단일검체용액의 두가지를 마우스에 0.1 ml/25 g투여시 LD_{50}의 1/4씩이 되도록 혼합하여 고농도의 2종 혼합검체용액으로 사용하였고 이것을 10배 희석한 것을 저농도의 2종 혼합검체용액으로 사용하였다. 또한 5가지의 검체를 모두 마우스에 0.1 ml/25 g투여시 LD_{50}의 1/10씩이 되도록 혼합하여 고농도의 5종 혼합검체용액으로 사용하였고 이것을 10배 희석한 것을 저농도의 5종 혼합검체용액으로 사용하였

Table 2. The LD_{50} values of benzoic acid and parabens.[4]

Compound	LD_{50}(g/kg, p.o.)
Benzoic acid	2.0~2.7 g/kg (rabbit, rat)
Methyl paraben	3.0 g/kg (dog, rabbit)
Ethyl paraben	2.5~5.0 g/kg (mouse, rabbit)
Isopropyl paraben	3.7 g/kg (mouse, rabbit)
Butyl paraben	0.95 g/kg (mouse)

Table 3. Mutagenic effects of BP and IP in *Salmonella typhimurium*.

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS+ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	143±5	17±2	15±1
		-	53±4	140±6	16±3	13±1
BP						
	125	+	62±6	170±9	20±2	24±2
	62.5	+	60±4	165±5	18±1	22±2
	31	+	57±5	161±8	19±2	17±1
	15.5	+	57±3	150±7	17±1	16±2
	125	-	60±4	172±8	18±2	22±2
	62.5	-	56±4	163±5	17±2	19±1
	31	-	57±3	162±9	16±4	18±2
	15.5	-	56±2	158±6	18±3	16±3
IP						
	125	+	59±5	150±8	20±3	19±2
	62.5	+	55±3	147±9	19±4	17±3
	31	+	56±5	145±7	16±4	15±3
	15.5	+	54±7	145±10	17±4	16±2
	125	-	57±5	152±5	19±3	20±3
	62.5	-	56±3	148±8	20±4	18±1
	31	-	57±4	147±6	17±3	17±2
	15.5	-	54±7	145±9	17±4	17±3
SA	0.5	-		1230±46	445±30	
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] BP: Butyl Paraben, IP: Isopropyl Paraben, SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene, 9-AA: 9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

Table 4. Mutagenic effects of MP and EP in *Salmonella typhimurium*.

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS+ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	143±5	17±2	15±2
		-	53±4	140±6	16±3	13±1
MP						
	125	+	59±5	152±4	28±4	18±2
	62.5	+	57±4	146±7	25±3	17±3
	31	+	56±5	148±6	20±4	16±1
	15.5	+	57±7	146±5	19±3	16±1
	125	-	57±6	150±9	26±3	19±2
	62.5	-	58±4	145±6	23±4	16±5
	31	-	56±5	144±5	20±5	15±3
	15.5	-	57±3	147±4	18±4	15±1
EP						
	125	+	65±5	155±10	22±3	28±3
	62.5	+	62±4	151±8	20±3	25±3
	31	+	60±4	149±10	18±2	24±2
	15.5	+	59±6	144±7	18±1	22±3
	125	-	63±3	155±9	20±3	27±2
	62.5	-	60±2	152±7	19±1	23±3
	31	-	59±7	145±5	19±2	22±2
	15.5	-	56±5	144±4	18±3	20±1
SA	0.5	-		1230±46	445±30	
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] MP: Methyl Paraben, EP: Ethyl Paraben, SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene, 9-AA:9- minoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

Table 5. Mutagenic effects of BA in *Salmonella typhimurium*.

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS+ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	143±5	17±2	15±1
		-	53±4	140±6	16±3	13±1
BA						
	125	+	62±4	150±8	22±3	18±3
	62.5	+	61±5	147±9	20±3	17±3
	31	+	58±8	145±9	17±5	17±1
	15.5	+	54±3	144±10	18±2	16±2
	125	-	61±4	152±6	21±3	17±2
	62.5	-	61±6	150±7	21±4	17±4
	31	-	56±1	146±8	18±5	16±2
	15.5	-	55±3	144±5	17±3	17±4
SA	0.5	-	1230±46	445±30		
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] BA: Benzoic Acid, SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a) pyrene, 9-AA: 9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

다.

실험 동물 — 숫놈 ICR마우스(20~30 g, 6~8주)를 사용 하였다. Group당 5 마리씩 하여 온도를 20~25°C, 사료와 물은 자유롭게 공급하였다. 사료는 삼양유지사료(주) 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 사용하였다.

실험 방법[6] - 1) 투여방법 및 표본관찰 : 검체용액을 25 g 기준 0.1 ml를 경구투여한 후 48 h 경과 후 마우스 꼬리정맥으로부터 채취한 말초혈액을 A.O. coated slide glass위에 5 ul를 떨어뜨린 후 cover glass 로 덮어 혈액을 균일하게 한 후 cell이 안정될 때 까지 3시간 방치후 현미경으로 관찰한다. 대조군으로 negative control은 olive oil을 경구투여하였고 positive control은 기지의 소핵유발물질인 mitomycin C 1 mg/kg을 복강투여하였다. 소핵생성빈도의 관찰은 마우스 꼬리정맥에서 얻은 peripheral blood의 sample preparation 1개당 1000개의 망상적혈구(reticulocyte, RET)를 관찰하여 그 중의 소핵을 가진 망상적혈구(micronuclated reticulocyte, MNRET)의 갯수를 산출한 것을 소핵생성빈도로 하였다.

2) 통계처리 : 유의성 검정의 통계처리는 Cochran Armitage경향검정법[7]을 이용하였다.

Table 6. Mutagenic effects of BP+IP and BP+MP in *Salmonella typhimurium*

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS+ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	144±5	16±3	15±2
		-	54±4	142±6	14±2	14±1
BP+IP						
	125	+	60±5	149±5	19±6	17±2
	62.5	+	65±6	153±4	24±4	22±3
	31	+	61±8	151±7	22±4	20±2
	15.5	+	57±4	150±6	20±2	18±4
	125	-	58±3	148±6	18±3	18±2
	62.5	-	62±2	150±9	20±4	19±2
	31	-	58±4	153±9	20±2	18±3
	15.5	-	58±2	148±7	18±3	16±2
BP+MP						
	125	+	61±4	152±7	19±2	19±3
	62.5	+	62±3	157±5	23±4	23±3
	31	+	59±4	152±5	22±2	18±1
	15.5	+	57±2	151±6	21±4	17±2
	125	-	60±2	146±4	18±5	20±1
	62.5	-	63±3	153±8	19±1	22±3
	31	-	61±5	149±7	17±3	17±2
	15.5	-	58±6	147±3	18±2	18±1
SA	0.5	-	1230±	445±30		
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] BP+IP: Butyl Paraben + Isopropyl Paraben, BP+MP: Butyl Paraben + Methyl Paraben SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene, 9-AA: 9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

결과 및 고찰

전 세계적으로 가장 많이 사용되는 방부제는 benzoic acid나 그 염, paraben류 (p-hydroxybenzoates), sorbates, propionates, SO_2, sulfites, nitrites, nitrates, dehydro acetates 등이다. 그 중 nitrites, nitrates, dehydroacetates를 제외하고는 대부분의 물질이 GRAS(FDA승인)이다.[8] Sodium benzoate와 p-hydroxybenzoic acid의 alkyl ester인 paraben들은 비교적 안전하다고 알려져서 사용빈도가 증가하고 있다. methyl paraben의 경우 마우스에 1% 용액의 vaginal infusion[9]과 2.5 mg의 피하주사,[10] 사료에 2%, 또는 8%의 보

Table 7. Mutagenic effects of BP+EP and BP+BA in *Salmonella typhimurium*.

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS+ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	144±5	16±3	15±2
		-	54±4	142±6	14±2	14±1
BP+EP						
	125	+	65±3	149±6	21±2	17±3
	62.5	+	68±4	152±7	22±2	20±2
	31	+	63±5	148±8	19±3	17±3
	15.5	+	60±4	147±9	17±2	16±2
	125	-	63±4	150±4	18±3	16±3
	62.5	-	66±3	153±8	21±5	19±2
	31	-	60±3	148±9	20±3	16±1
	15.5	-	61±5	146±10	18±5	15±3
BP+BA						
	125	+	58±6	153±7	18±2	19±2
	62.5	+	60±4	154±8	19±1	17±3
	31	+	60±2	148±6	18±2	15±2
	15.5	+	59±3	145±8	17±3	16±2
	125	-	60±4	155±9	17±4	18±3
	62.5	-	63±3	154±8	19±2	17±3
	31	-	60±3	150±4	18±3	17±2
	15.5	-	58±6	148±5	15±2	16±1
SA	0.5	-	1230±46	445±30		
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] BP+EP: Butyl Paraben + Ethyl Paraben, BP+BA: Butyl Paraben + Benzoic Acid PSA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a) pyrene, 9-AA:9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

Table 8. Mutagenic effects of IP+MP and IP+EP in *Salmonella typhimurium*.

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS+ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	144±5	16±3	15±2
		-	54±4	142±6	14±2	14±1
IP+MP						
	125	+	62±3	152±3	20±3	16±2
	62.5	+	63±4	150±4	22±1	20±2
	31	+	69±4	148±7	16±2	21±4
	15.5	+	60±4	146±6	17±3	19±2
	125	-	61±5	150±5	19±2	15±3
	62.5	-	60±3	152±7	23±5	19±2
	31	-	58±2	150±9	20±1	17±1
	15.5	-	58±4	148±9	18±5	15±3
IP+EP						
	125	+	58±3	153±6	15±2	14±2
	62.5	+	57±2	160±9	19±3	18±3
	31	+	60±3	150±10	18±1	17±2
	15.5	+	56±4	147±6	18±4	16±3
	125	-	60±3	150±7	14±4	16±3
	62.5	-	61±3	155±11	18±2	16±3
	31	-	59±4	152±7	20±4	16±2
	15.5	-	58±6	146±4	18±3	15±1
SA	0.5	-	1230±46	445±30		
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] IP+MP:Isopropyl Paraben + Methyl Paraben, IP+EP:Isopropyl Paraben+Ethyl Paraben SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene 9-AA:9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

존료를 먹인 rat에서 발암성이 나타나지 않았다.[11] Ethyl paraben은 사료 중 2% 농도에서 rat의 경우와 sodium ethyl paraben 10% 용액을 rat의 수명동안 1.0 ml/week로 피하주사 했을 때 발암성이 없었다고 보고된 바 있다.[10] Butyl paraben도 rat에 있어 기형 유발성이 없었고[12] 대부분의 paraben들은 체내에서 신속히 가수분해되어 포합반응을 통해 뇨로 배설되어 낮은 독성을 나타낸다.[13]

그러나 이렇게 널리 사용되는 보존료들이 단독으로 사용되었을 때의 안전성에 대해서는 많은 자료와 보고를 통해 입증이 되고 있으나 여러가지 보존료를 섞어서 사용할 때의 안전성문제에 있어서는 아직 많은 자료를 접하기 힘든 것이 사실이다.[14] 따라서 파라옥시안식향산 유도체들인 methyl paraben, ethyl paraben, isopropyl paraben, butyl paraben, benzoic acid의 병용시의 유전적 안전성을 검색하기 위해 *in vitro* 시험인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였고, *in vivo*시험으로 ICR 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

먼저 파라옥시안식향산 유도체들과 그들의 혼합물들의 돌연변이 유발성 여부를 검색하기 위해 히스티딘 영양요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537균주를 이용하여 복귀돌연변이시험인 Ames test를 실시하였다. 직접법 및 대사활성법으로 각각 15.5, 31, 62.5,

Table 9. Mutagenic effects of IP+BA and MP+EP in *Salmonella typhimurium*

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS⁺ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	144±5	16±3	15±2
		-	54±4	142±6	14±2	14±1
IP+BA						
	125	+	60±3	149±6	20±3	16±3
	62.5	+	63±4	154±7	22±2	18±2
	31	+	59±5	155±10	17±1	16±3
	15.5	+	56±2	147±7	17±2	14±2
	125	-	58±4	150±8	18±2	15±3
	62.5	-	61±3	151±9	21±5	19±3
	31	-	60±5	149±5	21±3	16±1
	15.5	-	56±4	147±8	18±5	13±2
MP+EP						
	125	+	58±5	146±9	17±2	15±2
	62.5	+	62±6	155±9	19±4	18±3
	31	+	60±4	154±7	20±2	19±2
	15.5	+	59±4	150±6	16±2	17±3
	125	-	60±7	150±4	16±3	16±3
	62.5	-	61±3	157±10	19±2	21±3
	31	-	63±4	152±7	20±4	17±2
	15.5	-	57±3	148±3	17±2	18±1
SA	0.5	-	1230±46		445±30	
B(a)p	2.0	+	165±			
9-AA	50	-				250±14

[1] IP+BA: Isopropyl Paraben + Benzoic Acid, MP + EP: Methyl Paraben + Ethyl Paraben SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene 9-AA:9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

Table 10. Mutagenic effects of MP+BA and EP+BA in *Salmonella typhimurium.*

Sample[1]	Dose (μg/plate)	S-9[2]	HIS⁺ reverants/plate, Mean±SD			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control		+	55±3	144±5	16±3	15±2
		-	54±4	142±6	14±2	14±1
MP+ BA	125	+	70±3	146±5	18±3	16±2
	62.5	+	73±4	152±8	19±2	18±1
	31	+	82±8	155±10	21±4	19±4
	15.5	+	73±4	153±9	20±2	17±3
	125	-	64±4	146±5	17±3	17±3
	62.5	-	72±3	148±8	17±2	20±2
	31	-	73±4	149±5	19±2	18±1
	15.5	-	68±5	146±7	18±3	18±3
EP+BA						
	125	+	72±5	152±4	20±3	21±3
	62.5	+	69±4	149±7	19±3	19±5
	31	+	65±5	146±9	17±4	19±2
	15.5	+	66±4	146±10	18±2	17±3
	125	-	69±3	151±3	18±3	19±3
	62.5	-	67±4	150±5	17±1	17±2
	31	-	65±5	147±9	17±3	17±1
	15.5	-	64±6	145±3	16±2	17±3
SA	0.5	-	1230±46		445±30	
B(a)p	2.0	+	165±12			
9-AA	50	-				250±14

[1] EP + BA: Ethyl Paraben + Benzoic Acid, SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene 9-AA:9-Aminoacridine

[2] S-9(-): without S-9 mix., S-9(+): with S-9 mix.

125 μg/plate 시험물질군 및 음성, 양성대조군으로 시험군을 설정하여 시험하였다. 예비독성시험에서 결정된 최고 농도로 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도 0.125 mg/plate를 공비 2로 4단계로 설정하여 평판법으로 실험하여 Table 3-10의 결과를 얻었다. 대사활성계 적용 여부에 상관없이 파라옥시안식향산 유도체들과 그들의 혼합물들은 4개 시험균주 모두에서 복귀돌연변이 콜로니 수의 증가가 관찰되지 않아서 음성의 결과로 판정하였다. 본 실험결과, 대사활성계 적용 여부에 상관없이 이들 유도체 5종과 이들의 병용시 15.5~125 μg/plate의 농도 범위에서 4개 시험균주 모두에서 복귀돌연변이 콜로니 수의 증가가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건하에서는 시험균주에 대해 His⁺로의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

한편, benzoic acid 와 paraben들의 단독 또는 병용투여시 소핵유발빈도를 알아보기 위한 소핵시험에서는 본 물질들이 이미 비교적 안전한 물질로 알려져있기 때문에 고용량으로 시험하였다. 먼저 1개 compound의 LD_{50} 1/2과 1/20씩을 각각 투여하는 개별시험에서는 대부분 유의성 있는 소핵증가가 나타나지 않았다(Table 11). 그러나 ethyl paraben만이 유의성있는 증가($P<0.005$)가 나타났다. 2개의 compound를 LD_{50} 각각 1/4과 1/40씩이 되도록 섞어서 투여하는 조합시험에서는 benzoic acid와 methyl paraben을 조합한 것이 유의성있는 증가($P<0.005$)를 나타냈고, benzoic

Table 11. The frequencies of MNRETs in the single compound.

Test compound[1]	Dose[2]	MNRETs/1000RETs individual value	Mean SE
olive	-	0, 0, 3, 1,0	0.8±0.58
oil	1.0 mg/kg	12,16,19, 9,16	13.8±1.43
MMC	high	0, 1, 0, 3, 3	1.2±0.58
BA	low	2, 2, 1, 3, 0	1.6±0.51
	high	1, 1, 0, 1, 4	1.4±0.68
MP	low	0, 2, 1, 2, 2	1.4±0.40
	high	3, 2, 3, 1, 5	2.8±0.66[3]
EP	low	3, 2, 3, 1, 5	1.6±0.68[3]
	high	1, 0, 0, 1, 1	0.6±0.25
IP	low	0, 0, 0, 1, 1	0.4±0.24
	high	2, 2, 1, 1, 2	1.6±0.25
BP	low	0, 1, 3, 1, 1	1.2±0.49

[1] MMC: mitomycin C, BA: Benzoic acid, MP: Methyl Paraben, EP: Ethyl Paraben, IP: Isopropyl Paraben, BP: Butyl Paraben

[2] Each p-hydroxy benzoates and benzoic acid were administered perorally at high dose(LD_{50} x 1/2) and low dose (LD50 x 1/20), respectively.

3 P < 0.01 (Cochran armitage Analysis.)

acid와 ethyl paraben 조합투여는 P<0.05 수준에서, ethyl paraben과 butyl paraben 조합투여는 P<0.01 수준에서 각각 유의성 있는 증가를 보였다. 그 밖의 2개의 compound를 조합한 경우에는 유의성있는 증가가 없었다(Table 12). 마지막으로 5개 compound를 LD_{50} 1/10과 1/100씩이 되도록 섞어서 모두 조합투여한 경우에는 유의성있는 소핵증가가 없었다(Table 13). 개별시험에서 ethyl paraben만이 유의성있는 소핵 생성 증가를 나타내었으나 본 시험농도가 실제 사용량이 아닌 매우 높은 용량이므로 안전성이 없다고 판단하기 힘들다. 조합시험에서는 2가지 compound를 병용투여시 소핵생성이 개별투여시 보다도 더 유의성 있는 증가를 보였다. 그러나 투여된 용량이 대단히 높은 용량이므로 안전성이 없다고 볼 수는 없으나 병용투여시 소핵 생성의 증가라는 측면에서 볼 때는 좀 더 연구가 필요하다고 생각된다.

최근들어 여러가지 식품에 benzoic acid나 paraben 들이 단독 또는 병용으로 첨가되고 있지만 이들이 안전하게 사용되고 있다고만은 볼 수 없다. 그러나 이들 보존료에 대한 연구는 충분히 이루어지고 있지않으며 자료 또한 많지 못한만큼 본 연구에서 실시하지못한 3가지,4가지 compound 조합투여시의 유전독성에 대해서도 연구가 필요하

Table 12. The frequencies of MNRETs in the combination of two compounds

Test compound[1]	Dose[2]	MNRETs/1000RETs individual value	Mean±SE
BA+MP	high	2, 3, 1, 3, 3	2.4±0.40[3]
	low	3, 3, 0, 2, 1	1.8±0.58[3]
BA+EP	high	1, 0, 4, 3, 2	2.0±0.71[3]
	low	1, 0, 1, 2, 1	1.0±0.32[3]
BA+IP	high	1, 1, 3, 0, 1	1.2±0.49
	low	0, 1, 2, 0, 1	0.8±0.37
BA+BP	high	3, 0, 1, 2, 1	1.4±0.51
	low	2, 1, 3, 3, 1	2.0±0.45
MP+EP	high	1, 2, 3, 1, 1	1.4±0.25
	low	0, 1, 2, 1, 2	1.2±0.37
MP+IP	high	3, 1, 0, 2, 1	1.4±0.51
	low	2, 1, 0, 0, 0	0.6±0.40
MP+BP	high	2, 2, 2, 1, 0	1.4±0.40
	low	2, 1, 0, 1, 0	0.8±0.37
EP+IP	high	0, 2, 1, 1, 3	1.4±0.51
	low	0. 2. 1. 1. 0	0.8±0.37
EP+BP	high	4, 1, 0, 5, 4	2.8±0.97[4]
	low	3, 2, 0, 1, 2	1.6±0.51[4]
IP+BP	high	2, 2, 4, 1, 0	1.8±0.66
	low	2, 3, 2, 1, -	2.0±0.41

[1] MMC: mitomycin C, BA: Benzoic acid, MP: Methyl Paraben, EP: Ethyl Paraben, IP: Isopropyl Paraben, BP: Butyl Paraben

[2] Tow p-hydroxy benzoates and benzoic acid were administered orally at high dose (LD_{50}×1/4 each) and low dose (LD_{50}×1/40 each), respectively.

[3] P<0.05 (Cochran Armitage analysis)

[4] P<0.01 (Cochran Armitage analysis)

Table 13. The frequencies of MNRETs in the combination of five compounds

Test compound[1]	Dose[2]	MNRETs/ 1000RETs in-	Mean±SE
BA+MP+EP+ IP+BP	high	1, 4, 0, 3, -	2.0±0.91
	low	2, 2, 4, 2, 2	2.4±0.40

[1] MMC: mitomycin C, BA: Benzoic acid, MP: Methyl Paraben, EP: Ethyl Paraben, IP: Isopropyl Paraben, BP: Butyl Paraben

[2] Four p-hydroxy benzoates and benzoic acid were administered orally at high dose (LD_{50}×1/10 each and low dose (LD_{50}×1/100 each), respectively.

다고 본다. 그러므로 본 연구결과인 소핵시험과 Ames test시험만으로는 유전독성에 관한 결론을 내리기에는 부족하다고 판단되나 발암성시험을 위한 예비시험과정이라는 측면에서 의의가 있다고 본다. 추후 유전독성에 관한 좀더 명확한 결론을 내리기 위해서는 염색체이상시험 등을 추가로 시행하여 포괄적인 결과로부터 결론을 내려야 한다고 사료된다.

국문요약

파라옥시안식향산 유도체들인 methyl paraben, ethyl paraben, isopropyl paraben, butyl paraben 및 benzoic acid의 병용시의 유전적 안전성을 검색하기 위해 *in vitro* 시험인 ***Salmonella typhimurium***을 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였고, *in vivo*시험으로 ICR 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 시험결과, 소핵시험에서 methyl paraben과 benzoic acid, ethyl paraben과 benzoic acid, ethyl paraben과 buthyl paraben병용시에 소핵생성빈도가 다소 증가하였으나 Ames test에서는 대사활성계 적용 여부에 상관없이 모두 4개 시험균주 모두에서 음성의 결과가 나타났다. 본 시험결과는 이들 보존료들의 병용시에 유전독성의 유발가능성이 있음을 나타내주고있다고 보여진다.

참고문헌

1. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
2. OECD: Data interpretation guides (DIGs) (Provisional), DIG18, Mutagenicity pp58-60 (1984).
3. 국립보건안전연구원: 독성시험표준작업지침서(1993).
4. FAO Nutr. Meet. Rep. Ser. No. 40 WHO/FOOD. Add., 67, 29, 19 (1967).
5. 일본후생성: 식품첨가물공정서해설서(제5판)
6. Hayashi, M. T., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr: An application of acridine orange fluorescent stainning to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **105**, 253-256 (1983).
7. 林眞: 小核試驗, Scientist社, 東京(1991).
8. U.S. Food and Drug Administration: Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Title 21. Code of Federal Regulation. Part 172. Office of the Federal Register. General Services Administration, Washington, D.C. (1983).
9. Boyland, E., Charles, R.T. and Gowing, N.F.C.: The induction of tumors in mice by intravaginal application of chemical compounds. *Br.J.Cancer*, **15**, 252-256 (1961).
10. Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives: p-hydroxy benzoate, ethyl, methyl, propyl esters. In: Toxicological Evaluation of Some Food Additives Including Anticaking Agents, Antimicrobials, Antioxidants, Emulsifiers anf Thicking Agents. World Health Organization, Geneva (1974).
11. Mattews, C.: p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives II. Acute and chronic toxicity in dogs, rat, and mice. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, **45**, 260-267 (1956).
12. Larsson, K.S. and Bostrom, H.: Teratogenic action of salicylates related to the inhibition of mucopolysaccharide synthesis. *Acta Paediatr. Scand.* **54**, 43-48 (1965).
13. World Health Organization: Specifications for the Identity and Purity of Food Additives and Their Toxicological Evaluation: Some Emulsifiers and Stabilizers and Certain Other Substances. Tech. Rep. Ser. World Health Organization No. **373**. FAO/WHO, Geneva (1967).
14. World Health Organization: Evaluation of the Toxicity of a Number of Antimicrobials and Antioxidants. Sodium Benzoate. Tech. Rep. Ser. World Health Organization No. **228**, 28-30. FAO/WHO, Geneva (1962).