J. Fd Hyg. Safety 21(2), 100–106 (2006)

에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸 파라벤의 *In Vitro* 검색시험 연구에서의 내분비독성

이성훈 · 김선중 · 박정란 · 조은혜 · 안남식 · 박준석 · 황재웅 · 정지윤[1] · 이영순 · 강경선†

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, [1]공주대학교 산업과학대학 특수동물학과

Oestrogenic Activity of Parabens *In Vitro* Estrogen Assays

Sung-Hoon Lee, Sun-Jung Kim, Jung-Ran Park, Eun-Hye Jo, Nam-Shik Ahn, Joon-Suk Park, Jae-Woong Hwang, Ji-Youn Jung[1], Yong-Soon Lee, and Kyung-Sun Kang†

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

[1]Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Chung-nam, Korea.

(Received May 11, 2006/Accepted June 18, 2006)

ABSTRACT – The use of underarm and body care cosmetics with oestrogenic chemical excipients (particularly the parabens) and the hypothesized association with breast cancer incidence, particularly in women. It is noted that the type of cosmetic product is irrelevant (e.g. antiperspirant/deodorant versus body lotion, moisturizers or sprays versus creams) and attention must focus on issues of actual exposure to chemicals through continued dermal application of body care products and the endocrine/hormonal activity and toxicity of the chemicals in the formulations. To evaluate the estrogenic activities of parabens such as ethylparaben, butylparaben, propylparaben, isobutylparaben and isopropylparaben, we used recombinant yeasts containing the human estrogen receptor [Saccharomyces cerevisiae ER + LYS 8127], human breast cancer MCF-7 cell lines and human estrogen receptor α and β. In E-screen assays, isopropylparaben is the most estrogenic paraben, and in ER competition assay, isobutylparaben is the most estrogenic paraben. We evaluated isopropylparaben was most active in the recombinant yeast assay, followed by propylparaben, ethylparaben, isobutylparaben and butylparaben. Results from this study demonstrate that parabens are observed in human endocrine system. Therefore, we have shown that the parabens is induced the estrogenic activities similar to 17β-estradiol and Bisphenol-A.

Key words: ethylparaben, butylparaben, propylparaben, isobutylparaben, isopropylparaben, estrogenic effect, endocrine disruptor

서 론

파라벤은 파라옥시안식향산 에스텔으로 명명된 알킬기에 따라 에틸파라벤, 이소프로필파라벤, 부틸파라벤, 이소부틸파라벤 등이 있고, 땀냄새 제거제, 발한억제제, 냄새제거용 방향제, 스킨크림 등 수많은 화장품에 방부제로 첨가되고 있는 화학물질이다[1,2]. 그동안 비교적 안전하며 가격이 저렴하여 세계 많은 나라에서 널리 이용되어 왔으나, 최근 영국에서 발표한 연구결과에서 유방암 세포에서 파라벤의 농도가 정상인들에 비해 월등히 높음을 HPLC를 통해 확인하여 파라벤이 체내의 세포조직 내부에 축적될 수 있음을 입증하였다[3]. 또한, 파라벤이 여성 호르몬의 일종인 에스트로젠과 유사한 작용을 수행할 수 있음이 입증되었음을 감안할 때 파라벤이 내분비계를 교란하는 장애물질로 작용할 수 있음을 시사한다[2,4–6]. 실제로 파라벤은 1990년대 말에 남성 정자 수의 감소 등 여성화 촉진을 유발할 수 있음을 시사한 연구결과가 공개되기도 했었다[7,8]. '응용독성학誌'의 편집을 총괄하고 있는 필립 하비 박사도 "화장품에 사용되는 각종 화학물질과 에스트로젠의 관련성, 그리고 유방암 유발가능성 등을 좀 더 면밀히 평가하기 위한 후속연구가 수반되어야 할 것"이라고 하였다[9].

FDA에 의하면, 미국의 경우 세정제의 77%와 화장품류의 99%가 파라벤류를 함유하고 있으며, 0.32%의 메틸파라벤과 프로필파라벤이 0.07%의 부틸파라벤과 벤질 파라벤이 파라벤 함유 화장품에서 검출되었다고 한다. 게다가 제약품의 경우 최대 1% w/w의 파라벤이 함유되기도 한다고 보고되고

†Author to whom correspondence should be addressed.

있다[10]. 유럽의 경우, 하루 섭취량을 보면, 유아의 경우 하루 동안 1~1 6mg/Kg의 파라벤을 섭취하고 있으며, 2세 이상의 어린이의 경우 하루에 4~6 mg/Kg을 섭취한다고 보고되었다[11]. 따라서 유럽의 경우, 의약품에서 최고 허용농도가 1% 이상 첨가되지 못하도록 하고 있다. 유럽식품안전청은 2004년 EFSA (유럽연합 식품안전청) 보고서에 "식품첨가물, 착향료, 가공보조제 및 식품 접촉물질에 관한 과학 자문 위원회, p-hydroxybenzoates의 안전성 평가 실시"를 발표한 적이 있다. 식품첨가물, 착향료, 가공보조제 및 식품접촉물질에 관한 유럽의 과학자문위원회는 식품중 파라벤 사용의 안전성에 관한 의견을 요청한 바 있으며, 또한 파라벤은 1994년에 유럽 식품과학위원회(SCF)에서 평가하여 메틸, 에틸, 프로필 파라벤 및 이의 염을 포함한 총 ADI를 잠정적으로 0~10 mg/Kg bw로 설정한 바 있다[10]. 동 위원회는 장기간 독성실험 및 생식실험을 통해 현재 설정된 잠정 ADI를 완전 ADI로 전환하였지만, 프로필파라벤의 ADI에 대해서는 NOAEL값이 명확하지 않아 ADI 사용을 권고하지 않고 있다고 한다. 일본의 경우도 하루 최대허용섭취량을 10 mg/Kg/day로 설정해 놓고 있다[10].

본 연구팀에 의한 선행 결과를 보면 부틸파라벤의 경우 내분비계 장애 및 독성 작용이 나타날 가능성이 있다고 판단되어[12] 현재 사용되는 모든 파라벤류를 *in vitro* 시스템에서 다양한 시험을 통하여 파라벤류의 내분비계 장애작용을 평가하는 것에 본 연구의 목적이 있다.

재료 및 방법

시약 및 재료

실험물질로 에틸파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤, 이소부틸파라벤, 이소프로필파라벤 (Sigma-aldrich)이 사용되었고 양성대조군으로 [2,3,6,7-H3]estradiol (Sigma-aldrich)(이하 E2)과 Bisphenol-A (이하 BPA) (Sigma-aldrich)이 사용되었다.

실험방법

MCF-7세포를 이용한 파라벤류의 E-Screening 시험 – 5% Fetal Bovine Serum (FBS)(Gibco)과 1%의 PSN antibiotic mixture (Gibco)가 첨가된 Phenol red-free D-media를 공급하여 유방암세포인 MCF-7세포를 5% CO_2, 37°C 인큐베이터(Sanyo)에서 배양하였다. 시험에 사용되는 MCF-7 세포는 6-well culture plate (Nunc)에서 배양하고, 물질처치 전 5% dextran coated charcoal-stripped FBS (Hyclone)와 0.3% PSN antibiotic mixture가 포함된 D-media로 호르몬적 영향을 배제하였고 물질처치 시, 5% dextran coated charcoal-stripped FBS (Hyclone)와 1% PSN antibiotic mixture에 물질을 원하는 농도로 희석하여 3일간 배양하였다. 그 기간 동안 시험물질이 포함된 배지를 한번 교체해주고, 처치 3일째, 0.1N의 NaOH (Sigma)를 처치하여 DNA content를 spectrophotometer (Beckman)를 이용하여 OD 260 nm 값을 측정하였다[13].

파라벤류의 ER 상경적 결합시험 – 이 시험법은 E2와 비교하여 ERα와 ERβ에 반응하는 시험물질의 RBA (relative binding affinities)값을 측정하기 위해 실시하였다. ER에 대한 시험물질의 시험관내 상경적 결합력을 측정하기 위해 EPA에서 권고하는 ERα와 ERβ competition binding assay kit (Panvera)를 사용하여 생산자의 권고 실험과정에 의해 시험하였다. 시험에 사용된 각 파라벤류 농도의 범위는 10^{-3} M부터 4배씩 연속 희석하여 2×10^{-10} M까지가 되도록 하였고 양성대조군으로 사용된 E2은 10^{-6} M부터 4배씩 연속희석하여 2×10^{-10} M까지의 범위가 사용되었다. 검출기로는 형광-편광분석기 (Tecan)를 이용하여 각 농도에 대한 편광값(Polarization)을 구하였고 100% 억제값으로 10^{-5} M E2에서의 편광값을 사용하고 Origin6.0 통계 프로그램을 사용하여 IC_{50}을 구하였다[14].

ER와 리포터 유전자인 β-galactosidase가 도입된 효모재조합검색시험법을 이용한 파라벤류의 에스트로젠성 평가 – Saccharomyces cerevisiae ER+ LYS 8127 (YER)을 성장배지에 넣은 후, shaking incubator (300 rpm)에서 증식시킨다. 이 효모는 각각 CUP1 metallothionine promoter와 hER 유전자를 포함하는 vector와 리포터시스템으로 estrogen response element, β-gal 유전자를 안정적으로 발현하였다. S. cerevisiae ER+ LYS 8217은 3.35 g/ml yeast nitrogen base, 2% dextrose, 30 μg/ml L-lysine-HCl, 35 μ/ml L-histidine-HCl를 포함하는 성장배지에서 유지하고, 성장배지

Table 1. Proliferative effect of parabens

Compound	C_{max}[a]	RPP[b]	RPE[c]
17β-estradiol	1×10^{-9}	1	100%
butyl paraben	1×10^{-5}	1×10^{-4}	82.07%
propyl paraben	1×10^{-5}	1×10^{-4}	88.53%
ethyl paraben	1×10^{-4}	1×10^{-5}	83.26%
isobutyl paraben	1×10^{-5}	1×10^{-4}	94.09%
isopropyl paraben	1×10^{-5}	1×10^{-4}	103.87%
bisphenol-A	1×10^{-8}	1×10^{-1}	91.85%

C_{max}[a] is the concentration of the test compound giving maximal proliferation

RPP[b](relative proliferative potency) is the ratio of the Cmax of the test compound to that of 17β-estradiol.

RPE[c](relative proliferative effect) is the ratio of maximal cell yield of the test compound to that of 17β-estradiol, expressed as a percentage.

에 20% glycerol 을 첨가하여 -80°C 이하에서 보존하였다. 효모가 증식하면 신선한 배지로 적정 희석한 후 500 uM $CuSo_4$를 첨가한 다음, 50 ml 튜브에 적정량을 분주하였다. 각각의 물질을 처치하여 shaking incubator에서 18시간 배양한 후, 신선한 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 96-well plate에 100 ul씩 분주하였다. 각 well에 Z buffer를 100ul씩 분주하고 20분 후 발색정도를 microplate ELISA reader를 이용하여 420 nm와 590 nm를 이용하여 측정하였다[4,5,13,15]. 모든 자료의 통계는 SAS를 이용하여 ANOVA 분석 후, Dunnett't test를 유의수준 5%에서 분석하였다.

결과 및 고찰

MCF-7세포를 이용한 파라벤류의 E-Screening 시험

MCF-7세포의 증식시험은 각 파라벤류와 양성대조군으로써 E2와 BPA를 처치한지 3일후에 측정되었다(Table 1). E2는 음성대조군 (배양배지)에 비해 10^{-9} M에서 2.5배의 세포증식 효과를 보였고 BPA는 10^{-8} M에서 2.2배의 세포증식 효과를 보였다. 5종류의 파라벤류 중에서 이소부틸파라벤, 이소프로필파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤은 E2에 비해 10,000배정도 낮은 세포증식 능력을 보였고 에틸파라벤은

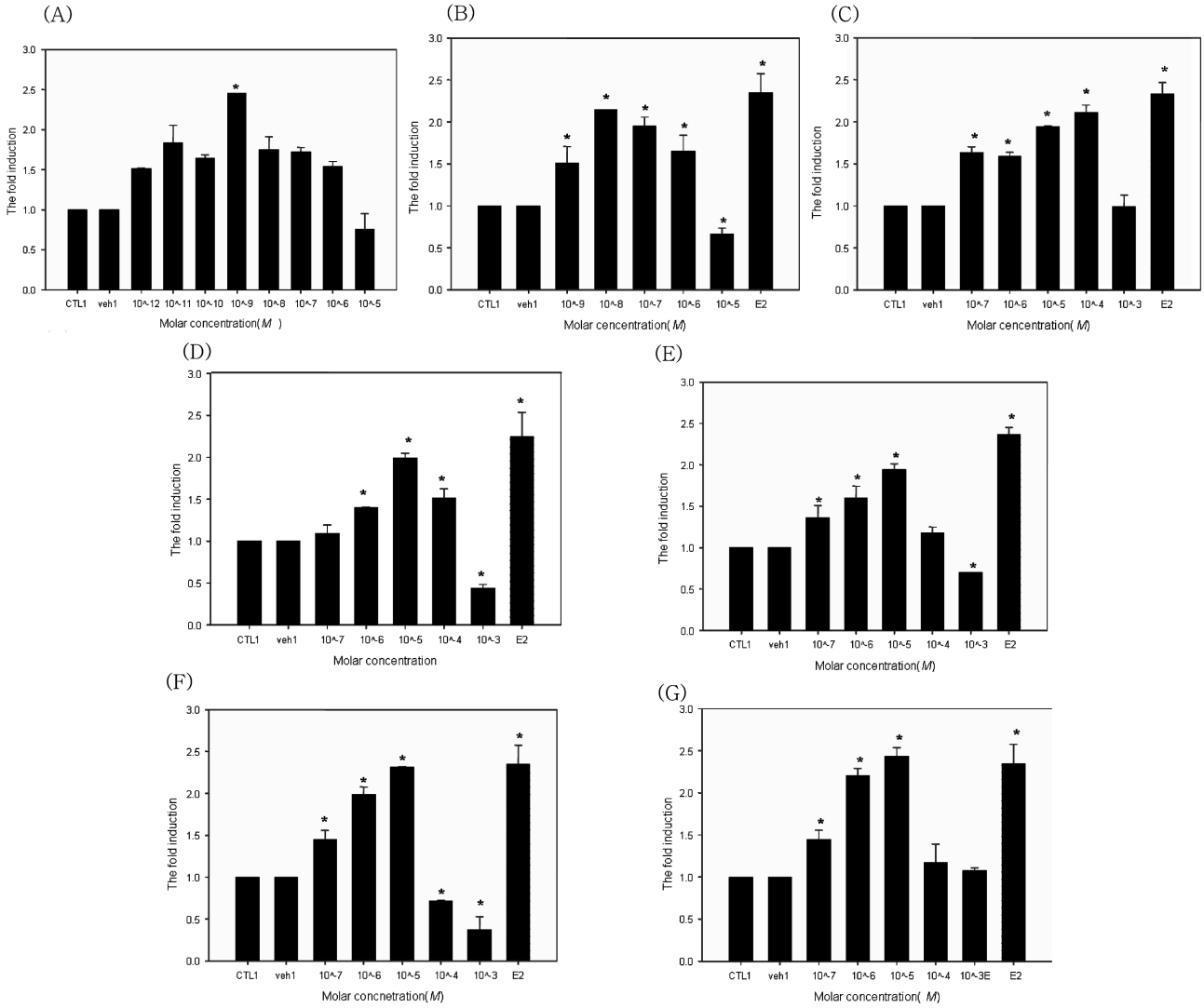

Fig. 1. Proliferation of MCF-7 proliferation treated with E2 (17β-estradiol) (A), BPA (B),ethylparaben (C), propylparaben (D), butylparaben (E), isobutylparanben (F), isopropylparaben (G). Cell number after treat ment of cells for 3 days with the indicated concentrations of chemicals is expressed as fold induction relative to that of cells treated with vehicle (0.1% ethanol) alone (1.0). E2 of (B)~(G) is expressed as fold induction value at E2 10-9M. each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control : * P<0.05.

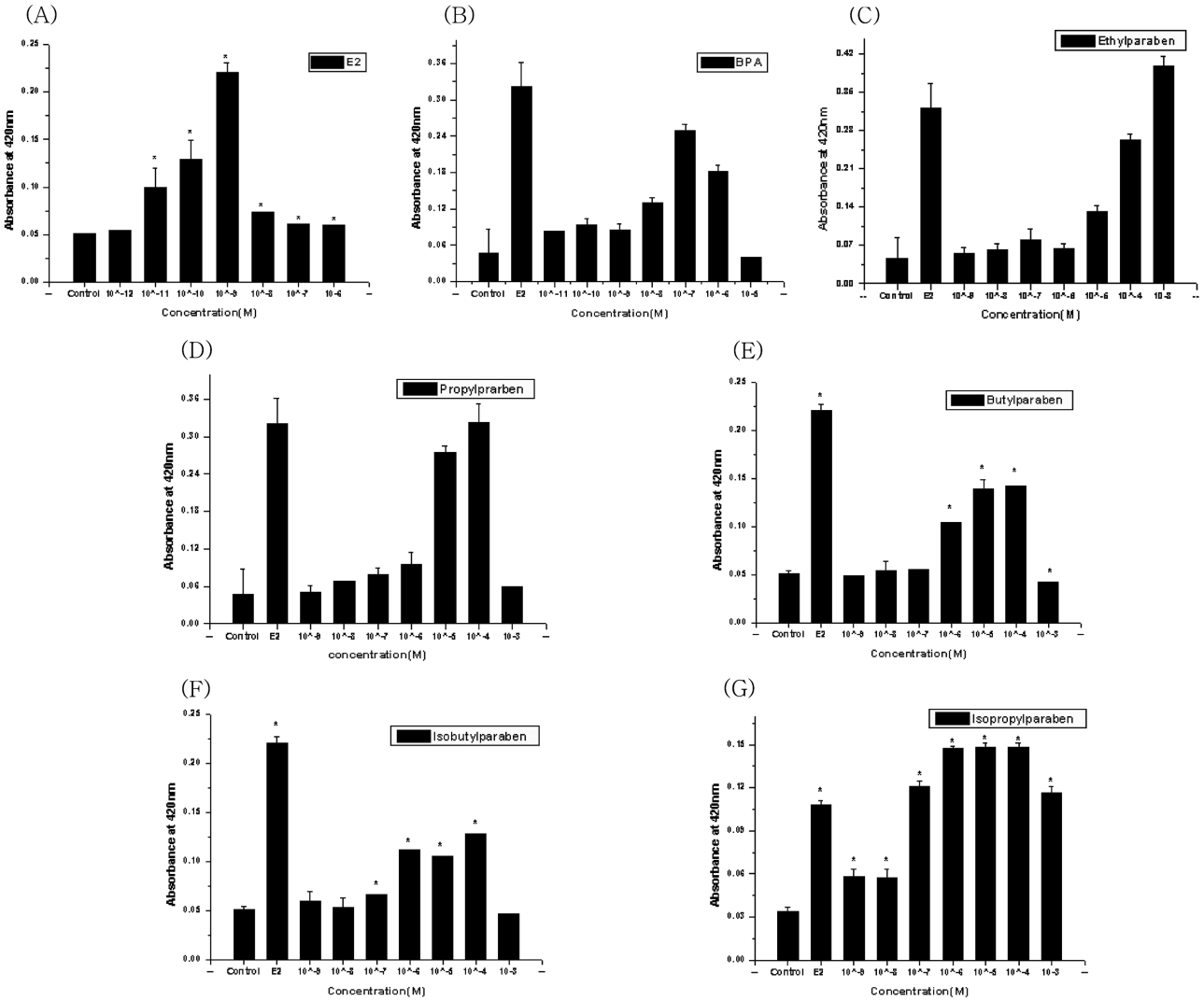

Fig. 2. Estrogenic activity of E2 (17β-estradiol) (A), BPA (B), ethylparaben (C), propylparaben (D), butylparaben (E), isobutyl - paranben (F), isopropylparaben (G) in Yeast recombinant assay. Each absorbance value is detected after treatment of yeast with the indicated concentrations of chemicals is expressed as absorbance value at 420 nm. E2 of (B)~(G) is expressed absorbance value at E2 10-9M. each point is mean of three determinations and significant differences as compared with control : * *P*<0.05.

100,000배정도 낮은 세포증식능을 보였다. 또한 이소부틸파라벤, 이소프로필파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤은 10^{-4} M에서 에틸파라벤은 10^{-4} M에서 Cmax값을 나타냈고 파라벤류가 가지는 E2에 대한 상대적 증식 효과 (RPE)는 이소프로필파라벤>이소부틸파라벤>프로필파라벤>에틸파라벤>부틸파라벤 순으로 관찰되었다(Fig 1).

파라벤류의 ER 상경적 결합시험

사람 ER α와 β에 대한 시험물질의 시험관 내 상경적 결합력을 측정하여 증식억제농도인 inhibitory concentration 50% (IC_{50})과 E2와 비교하여 ERα와 ERβ에 반응하는 시험물질의 RBA(relative binding affinities)값을 측정하였다 (Table 2). 양성대조군으로써 ERα와 ERβ에 E2의 IC_{50}값은 각각 4.29×10^{-9} M, 9.13×10^{-9} M이였고 파라벤들의 IC_{50}값은 1.94×10^{-7} M~1.33×10^{-4} M 이였다. 파라벤류가 갖는 ERα에 대한 E2와의 상대적 결합력 (RBA)은 이소부틸파라벤>부틸파라벤>프로필파라벤=이소프로필파라벤>에틸파라벤의 순서로 나타났고 ERβ에 대한 RBA는 이소부틸파라벤>부틸파라벤>이소프로필파라벤≥프로필파라벤>에틸파라벤의 순이였다. 또한 이소부틸파라벤의 E2 수용체와 결합능력은

Table 2. Relative binding affinity of parabens to human ERα and ERβ

	ERα		ERβ	
Compound	IC_{50}[a]	RBA[b]	IC_{50}[a]	RBA[b]
17β-estradiol	4.29×10^{-9}	100	9.13×10^{-9}	100
butyl paraben	1.73×10^{-5}	0.025	1.95×10^{-5}	0.047
propyl paraben	2.33×10^{-5}	0.018	3.66×10^{-5}	0.025
ethyl paraben	1.27×10^{-4}	0.003	1.33×10^{-4}	0.007
isobutyl paraben	4.51×10^{-7}	0.952	1.94×10^{-7}	0.471
isopropyl paraben	2.46×10^{-5}	0.017	3.06×10^{-5}	0.030
bisphenol-A	3.70×10^{-7}	0.333	5.00×10^{-5}	-

Each value was the mean of triplicate determinations in more three experiments.
[a]IC_{50} is the concentration of the compound that inhibits binding of 17β-estradiol to ER by 50%
[b]RBA was calculated by the equation (IC_{50} of 17β-estradiol/IC_{50} of competitor)×100

E2 보다 100배 (ERα), 200배 (ERβ)가량 낮은것을 확인할 수 있고 BPA보다는 ERα에서 3배가량 높은 결합능력을 보였다[16].

ER와 리포터 유전자인 β-galactosidase가 도입된 효모재조합검색시험법을 이용한 파라벤류의 에스트로젠성 평가

사람의 ER을 도입한 효모에서 VIT promoter와 reporter (luc or CAT)를 재조합하여 파라벤이 ER에 결합하는 정도를 시험하여 내분비계 장애작용을 검색하였다. E2는 음성대조군 (배양배지)에 비해 10^{-9} M에서 7배 정도의 에스트로젠성이 보였고 BPA는 10^{-7} M에서 6배 정도의 에스트로젠성이 보였다. 10^{-9} M의 E2를 양성대조군으로 사용하였고 5종류의 파라벤류 중에서 이소프로필파라벤은 10^{-5} M, 이소부틸파라벤, 부틸파라벤, 프로필파라벤은 10^{-4} M에서, 에틸파라벤은 10^{-3} M에서 Cmax값을 타나내었다. 파라벤류가 가지는 E2에 대한 상대적인 에스트로젠성은 에틸파라벤>이소부틸파라벤>부틸파라벤>프로필파라벤>이소프로필파라벤 순으로 나타났다.

Table 3. Estrogenic activity of parabens in the Yeast Screen

Compound	EC_{50}a	C_{max}[b]
17β-estradiol	1×10^{-10}	1×10^{-9}
butyl paraben	1×10^{-6}	1×10^{-4}
propyl paraben	1×10^{-6}	1×10^{-4}
ethyl paraben	1×10^{-5}	1×10^{-3}
isobutyl paraben	1×10^{-5}	1×10^{-4}
isopropyl paraben	1×10^{-9}	1×10^{-5}
bisphenol-A	1×10^{-10}	1×10^{-7}

Each value was the mean of triplicate determinations.
[a]EC_{50} is the concentration of the test compound giving half-maximal estrogenic activity.
[b]C_{max} is the concentration of the test compuond giving maximal estrogenic activity.

감사의 말씀

본 연구는 식약청으로부터 연구비를 지원받았습니다 (KFDA-04132-EDS-311). 아울러, 2006년도 한국학술진흥재단의 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다(KRF-005-E00076).

국문요약

ER와 리포터 유전자인 β-galactosidase가 도입된 효모재조합검색시험법[17]을 이용하여 파라벤류의 내분비계 장애작용을 검색하였다. 양성대조 시험물질로 앞의 시험법들과 동일하게 E2와 BPA를 설정하여 파라벤류의 에스트로젠성을 비교분석 하였다. E2의 경우 10^{-9} M에서 가장 활성이 높게 관찰되었고, BPA의 경우 10^{-7} M에서 에스트로젠성이 가장 높았다. 파라벤의 경우 이소프로필파라벤이 10^{-9} M에서 10^{-3} M까지 시험하였을 때, 농도 의존적으로 에스트로젠성이 증가하였으며, 10^{-9} M의 경우 가장 강력한 에스트로젠성을 보였다. 또한 양성대조군인 E2와 비교하였을 때, 10^{-7} M에서 10^{-3} M까지의 이소프로필파라벤은 오히려 E2보다 높은 내분비계 장애작용이 검색되었다. 이소프로필파라벤을 제외한 나머지 파라벤류의 경우 10^{-4} M과 10^{-5} M의 프로필파라벤과 10^{-3} M과 10^{-4} M의 에틸파라벤에서 에스트로젠성이 관찰되었다. 또한 MCF-7 세포주는 사람의 유방암 세포이면서 ERα가 존재하여 에스트로젠 또는 에스트로젠 유사물질이 ER와 반응하여 세포의 성장을 유도하게 된다. 이번 연구에서 파라벤의 시험 이전에 이미 내분비계 장애물질로 널리 알려진 BPA와 체내에 존재하는 강력한 에스트로젠이면서 BPA보다 활성이 1000배정도 높다고 알려진 E2를 양성대조군으로 설정하여 MCF-7 세포의 성장을 관찰하였다. 72시간동안 BPA와 E2를 다양한 농도로 MCF-7 세포에 노출한 후 DNA 양을 측정하였더니, E2의 경우 10^{-9} M에서 대조군보다 약 2.5배의 세포성장을 관찰할 수 있었으며, BPA의 경우 10-8M에서 대조군 보다 약 2.2배의 세포성장을 관찰할 수 있었다. 에틸파라벤

의 경우 10^{-7} M에서 10^{-4} M까지 농도 의존적으로 MCF-7 세포의 성장을 증가시켰고, 10^{-4} M이 대조군에 비해 세포 성장이 약 2.2배에 달하여 양성대조군과 비슷하면서 높은 에스트로젠 유사반응을 보였다. 프로필파라벤, 부틸파라벤, 이소부틸파라벤과 이소프로필파라벤의 경우 10^{-5} M의 농도에서 2배 이상의 세포성장이 유도되었고, 이소프로필파라벤의 경우 RPE값이 약 104%에 이르는 등, 내분비계 장애작용이 검색되었다. 한편, 본 연구팀은 ER에 대한 파라벤의 시험관 내 상경적 결합력을 측정하기 위해 ERα와 ERβ competition binding assay kit를 사용하여 시험하였다. 이 시험법은 E2와 비교하여 파라벤류의 ERα와 ERβ에 반응하는 시험물질의 RBA(relative binding affinities)값을 측정하였다. 파라벤의 ERα 상경적 결합시험의 경우. E2의 IC_{50}의 값이 4.29×10^{-9}이었고, 이소부틸파라벤의 경우 4.51×10-7에 달하여 RBA값이 0.952가 계산되었다. 이전 연구에 의해 밝혀진 BPA의 경우 RBA값이 0.333인데 반하여, 이소부틸파라벤은 약 3배가 높은 내분비계 장애작용이 검색되었다[16]. 파라벤의 ERβ 상경적 결합시험의 경우. ERα와 마찬가지로 이소부틸파라벤이 1.94×10-7M의 IC50값을 가지면서 RBA값이 0.471이 계산되었다. 이것은 파라벤이 ERα와 β 모두와 결합을 할 수 있고 E2와 경쟁적으로 결합을 할 수 있으며 이는 내분비계를 방해할 수 있다는 것을 다시 한번 뒷받침 해주고 있다. 덧붙여 본 연구팀의 결과는 이소부틸파라벤의 경우 경쟁적으로 결합하는 능력 또한 내분비계교란물질로 잘 알려진 BPA만큼의 능력을 가지고 있는 것으로 나타났다. 결론적으로 *in vitro*적 방법으로 파라벤류들의 에스트로젠성을 측정한 결과 이미 보고된 연구와 비슷하게 화학 구조적으로 더 길거나 분지된 알킬기를 가지는 파라벤일수록 에스트로젠성이 더 강하게 나타났다[2,18]. 따라서, 식품이나 화장품 등의 보존제로 사용되는 이 화학물질의 과다한 노출은 정상적인 내분비계에 큰 영향을 미칠 가능성이 있다고 판단된다.

참고문헌

1. Rastogi S.C., Schouten A., de Kruijf N. and Weijland J.W. : Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* **32**(1), 28-30 (1995)
2. T. Okubo., Y. Yokoyama., K. Kano. and I. Kano : ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERα and ERβ and PR. *Food and Chemical Toxicology* **39**, 1225-1232 (2001)
3. Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J. and Pope G.S. : Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* **24**(1), 5-13 (2004)
4. Routledge., J. Parker., J. Odum., J. Ashby. and J. P. Sumpter. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* **153**, 12?19 (1998)
5. Nishihara., J. Nishikawa., T. Kanayama., F. Dakeyama., K. Saito., M. Imagawa., S. Takatori., Y. Kitagawa., S. Hori and H. Utsumi : Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science* **46**, 282?298 (2000)
6. Andersen : Final report on the safety assessment of isobutylparaben and isopropylparaben. *Journal of the American College of Toxicology* **14**, 364?372 (1995)
7. S. Oishi : Effects of propyl paraben on the male reproductive system. Food and Chemical Toxicology 40, 1807-1813 (2002)
8. Song B.L., Li H.Y. and Peng D.R. : in vitro spermicidal activity of parabens against human spermatozoa. *Contraception* **39**(3), 331-5 (1989)
9. Harvey P.W. and Darbre P. : Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? *J. Appl. Toxicol.* **24**(3), 167-76 (2004)
10. Soni M.G. and Taylor S.L. : Greenberg N.A., Burdock G.A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology* **40**(10), 1335-73 (2002)
11. Elder R.L. : Final Report on the safety assessment of methylparaben, ethyl -paraben, propylparaben, and butyl -proben. *J. Am. Coll. Toxicol.* **3**, 147-209 (1984)
12. Kang K.S., CHE J.H., oung RYU D.Y.,, Kim T.W., LI G.X. and LEE Y.S. Decreased Sperm Number and Motile Activity on the F1 Offspring Maternally Exposed to Butyl p-Hydroxybenzoic Acid (Butyl Paraben). *J. Vet Med Sci* **64**, 227-35 (2002)
13. Park, J.S., Lee, B.J., Kang, K.S., Tai, J.H., Cho, J.J., Cho, M.H., Inoue T. and Lee, Y.S. : Hormonal effects of several chemicals in recombinant yeast, MCF-7 cells and uterotrophic assays in mice. *J. Microbiol. Biotechnol* **10**, 293-299 (2000)
14. Bolger R., Wiese T.E., Ervin K., Nestich S. and Checovich W. : Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ. Health Perspect* **106**(9), 551-557 (1998)
15. Edwin J. Routledge., J. Parker., J. Odum., J. Ashby., and J. P. Sumpter. : Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. Toxicology And Applied *Pharmacology* **153**, 12-19 (1998)
16. Han D.H., Denison M.S., Tachibana H. and Yamada K. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by

flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(7), 1479-1487 (2002)
17. Kang K.S., Cho S.D. and Lee Y.S. : Additive estrogenic activities of the binary mixtures of four estrogenic chemicals in recombinant yeast expressing human estrogen receptor. *J. Vet. Sci.* **3**(1), 1-5 (2002)
18. Routledge E. J. and Sumpter, J.p. : Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 3280-3288 (1997)