

황토유황합제의 pH차이에 따른 급성독성평가

백민경* · 심창기¹ · 이제봉 · 오진아 · 정미혜² · 김두호 · 김민정¹ · 지형진¹ · 최은지 · 조현조

농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, 유기농업과¹, 농자재평가과²

(Received on September 15, 2012. Revised on September 29, 2012. Accepted on October 14, 2012)

Acute Toxicity Evaluation of Loess-sulfur Complex in different pH

Min-Kyoung Paik*, Chang-Ki Shim¹, Je-Bong Lee, Jin-Ah Oh, Mi-Hye Jeong², Doo-Ho Kim, Min-Jeong Kim¹, Hyeong-Jin Jee, Eun-Ji Choi and Hyeon-Jo Cho

Chemical Safety Division, ¹Organic Agriculture Division, ²Agro-Material Safety Evaluation Division, National Academy of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Abstract Loess-sulfur complex has been widely used as an environmental friendly organic materials for insecticides and fungicides in crop cultivation. However, there are high concerns about skin and eye irritation for farm workers due to the high alkaline properties of loess-sulfur complex. The acute toxicity evaluation was conducted with three samples of loess-sulfur complex in different pH (pH 9, 10, 11) in order to supply the evidentiary data for selecting the optimal product among the test materials. The results of acute oral toxicity using rats showed LD₅₀ of over 2,000 mg/kg b.w. for all three samples of loess-sulfur complex. The calculated acute dermal LD₅₀ of all tested materials was over 4,000 mg/kg b.w.. The Skin and eye irritation indicated that all tested materials have no irritation. Consequently, it was suggested that loess-sulfur complex be low in acute toxicity at all different pH values (pH 9~11).

Key words Loess-sulphur complex, Acute toxicity, pH

서 론

우리나라 친환경유기농산물 산업은 급속히 확대되어 친환경유기농 인증면적이 2010년 기준 15,518 ha로 2001년 대비 약 100배의 성장을 보이고 있으며(Ahn, 2010), 이에 따른 친환경유기농자재 수요도 급속히 늘어 2012년 3월 기준 목록공시된 제품이 1,370 품목(토양개량 및 작물생육용자재 610 품목, 작물병해충관리용자재 338 품목 등)에 달하고 있다. 그럼에도 불구하고 농민·소비자의 43%가 '사용중인 농자재의 효과가 저조하여 피해를 보았다', 54%는 사용 농자재의 품질에 대해 '믿을 수 없거나 나쁜 편'이라고 응답함에 따라 추가적인 친환경유기농자재 제품 개발의 필요성을 느끼고 있는 것으로 나타났다(Ahn, 2010).

황토유황합제는 벼, 과수 등에 살충 및 살균효과를 위해

서 우리나라 민간에서 자가제조하여 널리 사용하고 있는 친환경유기농자재임에도 불구하고, 농가에서 자가제조한 황토유황합제의 제조시 pH가 13 정도로 알칼리성이 매우 강하며 2,000배로 희석하여도 산도 변화가 없어 작물의 신초나 꽃을 고사시키는 약해를 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서, 황토유황합제의 안정적인 사용을 위해 산도 교정과 함께 농업자의 피부 및 안점막에 자극이 없는 제품의 개발이 시급한 상황이다.

유황은 산소족 원소로 인체의 14대 구성 원소이며 모든 동식물에 반드시 필요한 필수 영양소이자 토양의 7대 성분 중 하나이지만, 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 부작용을 초래할 수 있다고 보고되고 있다(Coghlin, 1944; Kandylyis, 1984). 이러한 독성의 우려에도 불구하고 유황은 친환경유기농자재의 원료로서 우리나라와 미국에서 사용이 허용되어 있으며(OMRI, 2012), 우리나라에서 친환경유기농자재로 목록공시된 제품 중 유황을 함유하고 있는 제품은 2012년 7월 현재 총 26종으로 주로 과일류 및 과채

*Corresponding author

Tel: +82-31-290-0526, Fax: +82-31-290-0506

E-mail: mink1114@korea.kr

류의 흰가루병, 잎오갈병을 대상으로 하고 있다.

최근 유행을 농자재인 작물 생육용 또는 토양개량제로 이용하기 위한 제독법에 대한 연구가 활발히 진행되어 제독방법에 대한 다수의 특허가 출원되고 있으며(Huh and Jeong, 2007; Park, 2011), 유행 시비를 통해 생산된 과채류, 마늘의 품질 증진이나 병방제 작용에 대한 연구들(Jung, 2008; Kim et al., 2011)이 국내에서도 진행되어 오고 있다. 그러나, 제독유행에 대한 인축 급성독성시험은 제한적으로 진행되어 왔다(Kim et al., 2008; Lee et al., 2010).

한편, 병해충관리용 친환경유기농자재의 공시 및 품질인증 기준은 2011년 10월 친환경농업육성법 시행규칙 제25조 제1항 관련항 [별표 12]를 신설하면서 기존 독성분자의 기준을 강화하여 급성경구 및 경피독성시험 외에도 안점막자극 및 피부자극시험에 대한 시험항목이 추가되었다. 친환경농업육성법의 인축독성시험엔 농약관리법 시행령 [별표 1] 및 농촌진흥청장이 고시한 농약의 등록기준을 준용하고 있어 강산 또는 강알카리성 제품(pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상)은 피부자극 및 안점막자극성시험에서 제외된다. 이는 향후 친환경유기농자재 개발을 위해서 약효 및 약해에 대한 품질보증뿐 아니라 안전성 확인이 필수적으로 선행되어야 한다는 것을 의미하는 것이다.

본 연구에서는 작물의 약해를 저감하기 위해 pH 조정하여 제조한 황토유행합제 3종(pH 9, pH 10, pH 11)의 인축 급성독성시험을 시행하여 인체 안전성을 확인함으로써 친환경유기농자재 개발시 최적의 제품 선정에 기초자료로 활용하고자 하였다. 급성독성시험으로는 급성경구 및 급성경피시험과 함께, 피부자극성 및 안점막자극성시험을 시행하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 시험에서는 황토유행합제의 pH 차이(pH 9, pH 10, pH 11)에 따른 급성독성평가를 수행하기 위하여 농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과로부터 시험물질을 제공받아 사용하였다. 시험에서 사용된 황토유행합제는 유행분말:가성소다:황토:물의 비율이 25:18:0.5:30의 비율로 제조되었으며 25%의 유행을 함유하고 있다. 본 제품은 작물에 사용시 1,000배 희석하여 사용하므로 작물에 사용되는 희석액의 유행함량은 0.025 % 였다. 황토유행합제의 pH의 조정을 위해서 현미식초(pH 2.5)를 20~55 mL 첨가하여 조제하였다. 제조된 pH 조건을 본 급성독성시험에 정확히 적용하기 위하여 시험 당일 제조된 제품을 사용함으로써 제품간 pH 차이를 유지하였다.

실험동물

모든 시험은 '국립농업과학원 동물실험윤리위원회'의 승

인(승인번호: NAAS 1208) 후 수행하였다. 급성경구독성평가를 위해 7주령의 Sprague-Dawley 랫드 암컷(한림실험동물연구소, 경기)를 1주일간 순화시킨 후 무작위추출법으로 군당 3마리 씩 분류하였다. 급성경피독성평가에서는 7주령 Sprague-Dawley 랫드 수컷(한림실험동물연구소, 경기)을 1주일간 순화시킨 후 무작위추출법으로 5마리 씩 선별하였다. 피부자극성 및 안점막자극성평가에서는 체중 1.46 ± 0.11 kg의 New Zealand White Rabbit 암컷(한림실험동물연구소, 경기)을 각 시험 당 3마리씩 사용하였다.

사육환경

온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 13-18 /h, 조명시간 12시간(오전 6시-오후 6시) 및 조도 200-300 Lux로 설정된 '농촌진흥청 국립농업과학원 농자재평가과 동물사육실'에서 사육하였다. 시험기간 중 사료는 랫드용 및 토끼용 고행사료(한림실험동물연구소, 경기)를, 음용수는 수돗물을 자유급식하였다.

급성경구독성시험

급성경구독성시험은 실험동물수를 최소로 사용하는 OECD test guideline 423(TG 423)인 급성독성등급법으로 수행하였다. 우리나라에서 유행을 함유하고 있는 목록공시된 제품 중 1,000배 희석액을 사용하는 제품의 급성경구독성치는 5,000 mg/kg b.w. 이상인 점을 감안하여, 본 시험의 시작용량을 2,000 mg/kg b.w.로 선정하여 투여하였다. 시험물질 처리 전 일정시간 금식 후 최대용량인 2,000 mg/kg b.w.으로 강제 경구투여하여 반수이상 생존하면 추가로 2,000 mg/kg b.w.으로 확인하여 반수이상 생존하면 $LD_{50} > 2,000$ mg/kg b.w.으로 실험을 종료하였다. 또한 시험물질 투여 후 14일간 시험동물에 대해 육안으로 임상관찰 및 체중을 측정하였으며, 시험종료 후 모든 시험동물을 부검을 통해 주요 장기의 육안적 소견을 관찰하였고 외관상이나 내부 장기의 이상이나 병변을 관찰하였다. 친환경유기농자재의 LD_{50} 을 통한 급성독성구분은 농약의 등록기준을 준용하도록 규정되어 있으며, 우리나라 농약관리법 시행령 제20조제3항 관련[별표1] '독성 및 잔류성정도별 농약 등의 구분'에 근거하였다.

급성경피독성시험

급성경피독성시험은 농약관리법 제5조 제1항 제3호 관련 '인축독성 시험기준과 방법'(농촌진흥청 고시 제 2012-37호)에 근거하여 수행하였다. 우리나라에서 유행을 함유하고 있는 목록공시된 제품 중 1,000배 희석액을 사용하는 제품의 급성경피독성치가 4,000 mg/kg b.w. 이상인 점, 그리고 농약관리법에서 액상 시험물질의 기초시험시 처리량이 4,000 mg/kg b.w.인 점을 감안하여, 3종의 황토유행합제에 대한 급성경피독성시험의 처리량을 4,000 mg/kg b.w.로 선정하

였다. 시험물질 처리 하루 전 랫드의 등 부위를 제모하였으며, 시험물질 처리 24시간 후 증류수를 이용하여 시험물질을 제거하였다.

시험물질 처리 후 14일간 시험동물에 대해 육안으로 임상 관찰을 시행하였으며, 시험종료 후 모든 시험동물을 부검을 통해 주요 장기의 육안적 소견을 관찰하였고 외관상이나 내부 장기의 이상이나 병변을 관찰하였다. 반수이상의 생존이 확인되면 시험을 종료하였으며, 산출된 LD₅₀ 값으로 독성을 구분하였다.

피부자극성시험

피부자극성시험은 농약관리법 제5조 제1항 제3호 관련 ‘인축 독성 시험기준과 방법’(농촌진흥청 고시 제 2012-37호)에 근거하여 수행하였다. 물질처리 24시간 전에 전기 면도기를 이용하여 15 × 15 cm 정도의 넓이로 제모하여 제모에 의한 피부자극을 안전화시킨 후 시험하였다. 군별로 3마리의 제모한 토끼의 척추를 중심으로 2구획을 만들고 처리 부위를 표시하였으며, 표시된 부위 중 오른쪽에는 시험물질을, 왼쪽에는 대조물질(생리식염수)을 0.5 mL씩 각각 처리하였다(Fig. 1). 시험물질은 거즈 6 cm²(2 cm × 3 cm)의 면적에 처리하여 시험부위에 도포한 후 비자극성 테이프로 고정하였다. 시험물질 도포 4시간 후 거즈를 제거하고 증류수로 세정한 후 1시간, 24시간, 48시간, 72시간에 홍반 및 가피 형성, 부종 정도에 대한 피부반응을 관찰하였다. 피부반

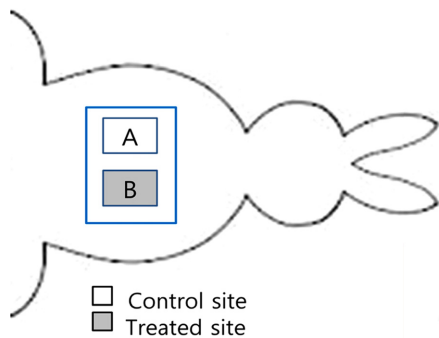


Fig. 1. Compartment of rabbit skin according to treatment of loess-sulfur complex. A, control site; B, treated site with loess-sulfur complex.

Table 1. Irritation index of skin and eye

Classification	Skin (P.I.I. ^a)	Eye (I.A.O.I. ^b)
Practically non-irritation	≤ 1.0	≤ 10
Slight irritation	~2.0	10.1~30.0
Moderate irritation	2.1~5.0	30.1~60.0
Severe irritation	5.1~8.0	≥ 60.1

^aP.I.I.: Primary irritation index.

^bI.A.O.I.: The index of acute ocular irritation.

응은 ‘피부반응의 평가표’에 따라 평가하여, 피부 1차 자극 지수(P.I.I.: Primary irritation index)를 산출하였다(Rush et al., 1995). 3종의 황토유황합제에 대한 피부자극성 수준은 우리나라 ‘농약 및 원제의 등록기준’(농촌진흥청 고시 2012-13호)의 제3조제2항제3호 관련 [별표4] ‘농약의 인축 독성 시험성적서 검토기준’에 근거하여 자극성을 구분하였다(Table 1).

안점막자극성시험

안점막자극성시험은 농약관리법 제5조 제1항 제3호 관련 ‘인축 독성 시험기준과 방법’(농촌진흥청 고시 제 2012-37호)에 근거하여 수행하였다. 시험물질을 군당 3마리의 암컷 토끼에 처리하였으며, 토끼의 한쪽 눈 하안검에 0.1 mL씩 처리하였다. 무처리한 다른 쪽 눈은 대조군으로 사용하였다. 시험물질 처리 후 1시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 안점막 자극 정도를 관찰하였으며, 각각 각막, 홍채, 결막에 대한 임상반응에 대해 ‘안반응의 평가표’에 따라 평가하여 안점막 자극 지수(A.O.I.: Acute Ocular Irritation Index)를 산출하였다. 시험물질에 대한 안점막자극성 수준은 피부자극성 판정과 같이 ‘농약 및 원제의 등록기준’(농촌진흥청 고시 2012-13호) 중[별표 4] ‘농약의 인축독성 시험성적서 검토기준’에 근거하여 자극성을 구분하였다(Table 1).

결과 및 고찰

급성경구독성

황토유황합제 3종의 급성경구독성 시험을 위해 OECD TG 423 방법으로 랫드 암컷을 이용하여 시험하였으며, 기초시험으로 2,000 mg/kg b.w.을 시작약량으로 경구 투여를 시행한 결과 시험물질 투여 후 14일 동안 모든 시험군에서 사망을 관찰할 수 없었다. 또한, 시험기간 동안 임상적인 이상증상이 관찰되지 않았으며, 시험종료 후 모든 시험동물을 부검한 결과에서도 외관상이나 내부 장기에 어떠한 육안적 이상소견이나 병변이 발견되지 않았다.

또한, 급성독성유무를 판단의 근거가 되는 시험동물의 체중증가율(Shin et al., 2005)을 살펴보기 위해 시험기간 동안 2일 간격으로 체중을 측정하고 결과 모든 시험군에서 시험물질 투여 후 일정하게 체중이 증가하였으며 체중 증가량 또한 차이가 없었다(Fig. 2).

기초시험의 결과를 근거로, 다시 2,000 mg/kg b.w.으로 확인시험을 기초시험과 동일한 방법으로 시행한 결과 기초 시험과 동일하게 3종의 시험물질 처리군에서 모두 사망동물 및 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 pH 9, 10, 11인 황토유황합제 3종에 대한 경구 LD₅₀의 수준은 적어도 2,000 mg/kg b.w.을 상회하는 IV급(저독성)으로 판정하였다. 따라서, 본 시험에서 pH의 차이가 나는 황토유황합제 3종의

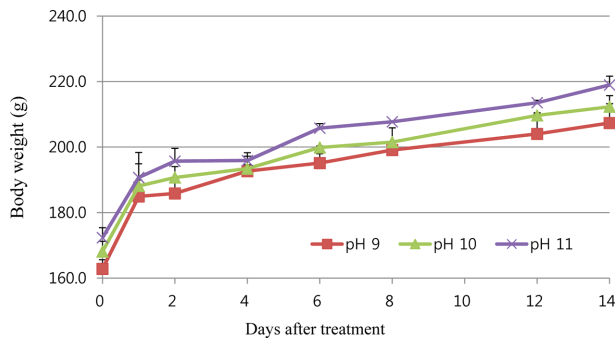


Fig. 2. Body weight changes in rats after single oral administration of test materials with loess-sulfur complex.

급성독성시험 결과 ‘III급(보통독성) 이하’로 규정된 친환경 유기농자재의 공시 및 품질인증 기준(농촌진흥청 고시 제 2011-28호)를 충족하며, pH 9~11의 범위에서는 독성구분에서 차이가 나지 않는 것으로 판정되었다.

유황의 경우 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 부작용을 초래하므로 물리적·화학적 방법으로 제독되어 유해 성분이 확실하게 제거 되지 않을 경우 신장과 대장활동에 영향을 미칠 수 있으며, 동물에게 섭취시키는 것 역시 지나칠 경우 동물에게 병을 초래할 수 있다는 실험 결과들이 보고된 바 있다(Barretine and Ruffin, 1958; Bouchard and Conrad, 1973). 본 시험에서 시행된 급성경구시험의 결과만으로 친환경유기농자재용으로 제조된 황토유황합제에서 유황의 독성에 제거되었는지 여부에 대해서 확인 할 수는 없으나, 유황을 25% 함유하는 황토유황합제의 관행 제조법을 통해 생산된 제품은 급성경구독성 결과 저독성으로 평가되어 친환경유기농자재의 안전성기준에 적합한 것으로 판단된다.

급성경피독성

3종의 황토유황합제를 이용하여 랫드에 대해 급성경피독성 시험을 진행한 결과, 시험물질 각각 4,000 mg/kg b.w. 농도로 도포 후 관찰기간 14일 동안 모든 시험군에서 사망동

물이 없었으며 임상적인 특이증상이 관찰되지 않았다.

농약관리법 제5조 제1항 제3호 관련 ‘인축 독성 시험기준과 방법’(농촌진흥청 고시 제 2012-37호)에 근거하여 황토유황합제와 같은 액상 시험물질의 경우 최대용량인 4,000 mg/kg b.w.에서 반수 이상 생존하면 LD₅₀을 4,000 mg/kg b.w. 이상으로 분류하고 있다. 따라서, 본 연구에서 시험된 3종의 황토유황합제에 대한 경피 LD₅₀은 pH 차이에 관련 없이 모두 4,000 mg/kg b.w. 이상으로 분류되는 IV급(저독성)으로 구분되었다. 따라서, 급성경피독성 시험 결과 또한 ‘III급(보통독성) 이하’로 규정된 친환경유기농자재의 공시 및 품질인증 기준(농촌진흥청 고시 제 2011-28호)을 충족하는 것으로 확인되었다.

피부자극성

3종의 황토유황합제에 대한 피부자극성 시험을 수행한 후 임상증상 및 체중변화는 Table 2에, 피부자극성 결과는 Table 3에 나타내었다. 시험물질을 처리한 동물에서 폐사 및 기타 임상증상은 시험 전기간을 통해 관찰되지 않았으며, 체중증가율도 일정하게 나타났다.

토끼를 대상으로 피부에 실험시료 3종을 노출 한 후 나타날 수 있는 피부자극성을 평가하기 위해 시료 적용 부위의 관찰은 시료 적용 후 1시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 피부자극성을 검사하고, 피부반응 평가표에 따라 점수를 산출하였다. 음성대조군으로 사용된 증류수를 도포한 부위에서는 홍반 및 가피, 부종이 전혀 형성되지 않아 관찰 결과로부터 산출한 P.I.I. 수치가 0으로 비자극성의 결과를 보였다 (Table 3).

황토유황합제 중 pH 9와 pH 10인 시험물질을 도포한 시험동물의 경우 음성대조군과 유사하게 시험물질을 처리한 부위에서 홍반 및 가피, 부종이 전혀 관찰되지 않아 P.I.I.가 0으로 비자극성으로 분류되어 피부자극이 거의 없음을 알 수 있었다. 황토유황합제 pH 11인 시험물질의 경우 육안으로 겨우 식별할 정도의 아주 가벼운 홍반 및 부종이 관찰되었으나, 일시적인 현상으로 24시간 후에는 상처가 거의 회

Table 2. Clinical signs and body weight changes of rabbits treated with loess-sulfur complex

Irritation test	Treatment materials	Dose (mL)	Body weight gain (kg)		Clinical signs	Death rate
			Day 0	Day 7		
Dermal irritation	pH 9	0.5	1.54 ± 0.05 ^{a)}	1.68 ± 0.05	Normal	0/3
	pH 10	0.5	1.55 ± 0.06	1.66 ± 0.10	Normal	0/3
	pH 11	0.5	1.56 ± 0.07	1.64 ± 0.06	Normal	0/3
Ocular irritation	pH 9	0.1	1.33 ± 0.10	1.45 ± 0.07	Normal	0/3
	pH 10	0.1	1.38 ± 0.04	1.48 ± 0.06	Normal	0/3
	pH 11	0.1	1.40 ± 0.04	1.51 ± 0.04	Normal	0/3

^{a)}Values were expressed as mean ± S.D.

Table 3. Skin irritation of New Zealand white rabbits treated with loess-sulfur complex (n = 3)

Test material	Scoring time	Score of skin irritation				Total score	Mean score	P.I.I. ^{b)}	Rating
		1 hr	24 hr	48 hr	72 hr				
Negative control ^{a)}	Erythema	0	0	0	0	0	0	Non-irritation	
	Edema	0	0	0	0	0	0		
pH 9	Erythema	0	0	0	0	0	0	Non-irritation	
	Edema	0	0	0	0	0	0		
loess-sulfur complex	pH 10	Erythema	0	0	0	0	0	Non-irritation	
		Edema	0	0	0	0	0		
pH 11	Erythema	0	0	0	0	0	0	Non-irritation	
	Edema	0.7	0	0	0	0	0		

^{a)}Distilled water.

^{b)}P.I.I.: Primary irritation index = total score/2.

복되어 홍반 및 부종이 소멸되는 것으로 나타났다. 따라서 24, 48, 72시간의 관찰을 통해 산정되는 P.I.I.가 0으로 나타나 pH 11인 황토유황합제 또한 비자극성 분류됨으로써 피부자극이 거의 없는 것으로 확인되었다.

또한, 본 시험에서 사용된 황토유황합제는 1차 피부자극 지수인 P.I.I.가 '1 이하'로 규정된 친환경유기농자재의 공시 및 품질인증 기준(농촌진흥청 고시 제2011-28호)을 충족하며, 이는 pH 9~11의 범위에서는 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서, 황토유황합제는 피부에 대한 자극성이 낮으며 pH 차이에 따른 자극성의 차이가 나지 않아 유효성분함량에 대한 살균충 효능 및 약해 저감 분야가 검증된다면 자극성 없는 친환경유기농자재로서의 활용가능성이 있다고 생각된다.

한편, pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 강산이나 강알칼리성 물질의 경우 피부자극성이 높아(OECD, 1992) 우리나라에서 농약제품으로의 등록에 부적합하지만, 본 시험에서는 제한 범위인 pH 11.5에 근접한 pH 11의 황토유황합제도 전혀 자극성이 나타나지 않는 비자극성으로 분류되었다. 이상의 산도 제한은 피부 부식성(skin corrosion)에 대한 시험의 결과를 통해 법적으로 규제하기 위한 분류이다(EC, 2000). 또한, 피부자극(skin irritation)과 44종 화학물질들의 pH에 대한 상관관계를 살펴본 연구 결과에 의하면 'pH 4.5 이하 또는 pH 9.2 이상'의 물질은 피부자극성을 가지는 것으로 나타나 실제 자극성에 대한 제한이 더 엄격한 것으로 보고하고 있어(Worth and Cronin, 2001), 우리나라 피부자극성 시험에 대한 제품의 pH 제한 범위의 타당성을 검토할 필요성이 있을 것으로 생각된다.

안점막자극성

황토유황합제 3종에 대한 안점막자극성 시험을 수행한 후 임상증상 및 체중변화를 Table 4에 나타내었으며, 시험물질

처리 후 1시간, 24시간, 48시간, 72시간 췌 각각 각막, 홍채, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수로 표시한 결과는 Table 4와 같다.

황토유황합제 중 pH 9와 pH 10인 시험물질을 처리하고 시간경과에 따라 안구의 외관모습을 각막의 혼탁 및 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등을 기준으로 관찰한 결과 어떠한 이상소견도 확인되지 않아 급성안점막지수인 I.A.O.I.가 0으로 비자극성에 해당하는 자극으로 안점막자극이 거의 없음을 알 수 있었다.

반면, pH 11인 황토유황합제의 경우 관찰 1시간 후 홍채의 반응에서 충혈이 나타나고, 결막의 발적으로 일부 혈관이 충혈되고 결막부종이 안검의 부분적 외전을 동반하게 현저히 관찰되어 1시간째 평균 안점막자극지수(M.I.O.I.: Mean index of ocular irritation)가 5로 나타났다. 이러한 안점막 이상반응은 24시간 경과 후 일부 소멸되어 홍채의 충혈이 회복되었으며, 결막의 부종만 약간 관찰되는 정도로 호전되어 24시간 췌 M.I.O.I.가 1.33으로 감소하였다. 이상의 안점막에 대한 병리소견은 시험물질 처리 후 48시간 이후로는 모두 소멸되어 M.I.O.I.가 0으로 확인되었으며, pH 11인 황토유황합제에서도 처리 후 1시간과 24시간에서 M.I.O.I.가 5와 1.33으로 경미한 자극성이 있었으나, Table 1의 안점막자극성의 분류상 무자극으로 구분되었다.

이는 친환경유기농자재의 공시 및 품질인증 기준에서 M.I.O.I.가 '10 이하' 규정되어 있는 조건을 충족하며, pH 9~11 범위에서는 안점막자극성이 동일 분류인 저자극성으로 평가되어 유효성분함량에 대한 살균 및 살충 효능과 약해 결과만 검증된다면 자극성 없는 친환경유기농자재로서의 활용가능성이 있다고 생각된다.

한편, 피부자극성과 마찬가지로 안점막자극성시험 또한 pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 강산이나 강알칼리성 물질이 자극성을 가짐으로(OECD, 1992) 우리나라에서 농약제

Table 4. Eye irritation of New Zealand white rabbits treated with loess-sulfur complex (n = 3)

pH of tested material	Scoring time	Score of eye irritation			M.I.O.I. ^{a)}	I.A.O.I. ^{b)}	Rating
		Corena	Iris	Conjunctiva			
pH 9	1 hr	0	0	0	0	0	Non-irritation
	24 hr	0	0	0	0		
	48 hr	0	0	0	0		
	72 hr	0	0	0	0		
	7 Day	0	0	0	0		
pH 10	1 hr	0	0	0	0	0	Non-irritation
	24 hr	0	0	0	0		
	48 hr	0	0	0	0		
	72 hr	0	0	0	0		
	7 Day	0	0	0	0		
pH 11	1 hr	0	0.33	1.67	5	5	Non-irritation
	24 hr	0	0	0.33	1.33		
	48 hr	0	0	0	0		
	72 hr	0	0	0	0		
	7 Day	0	0	0	0		

^{a)}M.I.O.I. : Mean index of ocular irritation (the amount of total score/tested animal No.).

^{b)}I.A.O.I. : The index of acute ocular irritation (max among MIOI during observation and the day-7).

품으로의 등록에 부적합하다. 그러나, 본 시험에서는 제한 범위인 pH 11.5에 근접한 pH 11의 황토유황합제의 안점막 자극이 비자극성으로 분류되었다. 그러나, 안점막자극(eye irritation)과 30종 화학물질들의 pH에 대한 상관관계를 살펴본 연구 결과에 의하면 ‘pH 4.3 이하 또는 pH 8.4 이상’의 물질은 안점막자극성을 가짐으로써 산도의 제한기준이 더 낮았으며(Worth and Cronin, 2001), 이는 우리나라의 안점막자극성 시험의 부적합 기준과도 차이가 났다. 따라서, 향후 우리나라 안점막자극성 시험에 대한 제품의 pH 제한 범위에 대한 타당성 검토가 추가적으로 이루어질 필요가 있을 것이다.

본 연구에서는 pH 9~11인 황토유황합제 3종의 급성독성 시험 4종(급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성 및 안점막자극성시험)을 수행하여 친환경유기농자재의 제품 안전성에 대해 시험을 수행하였다. 그 결과 모든 시험물질의 급성경구독성 LD₅₀은 2,000 mg/kg b.w. 이상, 급성경피독성 LD₅₀은 4,000 mg/kg b.w. 이상으로 저독성이었다. 또한 피부 및 안점막자극성의 경우도 저독성으로 분류되었다.

이상의 실험결과를 종합하여 황토유황합제는 pH 9~11의 범위에서는 급성독성이 거의 없으므로 직접적으로 피부 및 안구에 접촉하여도 어떠한 자극이나 이상반응을 보이지 않음에 따라 친환경유기농자재로서의 공시 및 품질인증을 위한 요건에 부합되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 친환경유기농자재로서 황토유황합제의 제품 활용에 대한 가능성

을 시사하는 것으로 생각된다.

그러나 본 연구의 결과는 황토유황합제가 약효 및 약해를 보이는 제품으로의 개발을 선행해서 제조된 시험물질을 이용해 시험한 것으로, 제조방법 및 사용 원료, 제조비율에 대한 변화에 대한 모든 결과를 예측하는 자료로 활용되기에 부적절 할 수 있다. 또한, 황토유황합제의 특성상 제조 후 시간경과에 따라 pH의 변화가 급격히 발생함에 따라 제조 후 경과시간이 장기화 되거나 다른 pH 범위에서의 제품으로 개발될 경우 독성시험에 대한 시험을 추가로 시행하여야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008953 및 PJ907121022011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

Literature Cited

- Ahn, I. (2010). Setting of evaluation criteria for safety management of organic farming materials in the major OECD nations. Rural Development Administration (RDA) annual report. Korea.
- Barretine, B. F. and B. G. Ruffin (1958) Salt and gypsum as regulators of cottonseed meal intake, Miss. State Univ.,

Agri. Sta. Inform. Sheet. pp. 587.

Bouchard, R. and H. R. Conrad (1973) Sulphur requirement of lactating dairy cows. Utilization of sulphates, molasses and lingnin-sulfonate. J. Dairy Sci. 56:1429~1434.

Choi, G. H. and C. H. Kim. (2002) Growth inhibition of extract from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines, Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 22(4):348~351.

Coghlin, C. L. (1944) Hydrogen sulfide poisoning in cattle, Can. J. Comp. Med. 8:111~113.

EC (2000) Commission Directive 2000/33/EEC of 25 April 2000 Adapting to technical progress for the 27th time council directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances. Annex I. B40 Skin corrosion. Official Journal of the European Communities L136A, 91~97.

EPA (1991) Sulfur RED facts, Pesticides and Toxic Substances (7508W), 738-F-91-110.

Huh J. H. and J. K. Jeong (2007) Soil improver using base compounds extracted from natural minerals and nontoxic sulfur and a method for preparing the same, Patent of South Korea 1020070032719.

Jung, J. W. (2008) Effects of Sulphur Application on the Growth characteristics of fruit vegetable. Kangwon National University.

Kandyliis, K. (1984) Toxicology of sulfur in ruminants. J. Dairy Sci. 67:2179~2187.

Kim, W. S., K. W. Lee, C. G. Lee, J. J. Choi, H. D. Lee, W. M. Yoo and K. C. Kyung (2011) Effects of Sulfur Spray in Northern-type Garlic (*Allium Sativum* L.), Kor. J. Hort. Sci. echnol. 29 (suppl. I). pp. 65.

Kim, D. W., H. S. Lee and C. E. Jung (2008) Toxicity of the lime sulfur as a flower thinner ofapple the honey bee, *Apis mellifera* L. and other pollinators, Korean J. Apiculture. 23(1):43~50.

Lee, J. I., H. K. Min, J. W. Lee, J. D. Jeong, Y. J. Ha, S. C. Kwack and J. S. Park (2009) Changes in the Quality of Loin from Pigs Supplemented with Dietary Methyl Sulfonyl Methane during Cold Storage, Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 29(2):229-237.

Lee, J. S., J. K. Kwon, S. H. Han, I. J. An, S. J. Kim, S. H. Lee, Y. S. Park, B. K. Park, B. W. Kim, S. K. Kim, I. H. Kim, C. S. Choi and J. Y. Jung (2010) Toxicity Study of Detoxification Sulphur at 3 Months Post-treatment in Rats, J. Fd Hyg. Safety. 25(3):263~268.

OECD (1992) OECD Guideline for the testing of chemicals No. 404. Acute dermal irritation/corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development: Paris.

OMRI (Organic Materials Review Institute) (2012) OMRI Product List(web edition) www.omri.org

Pakr K. H. (2011) A liquified mixing method of sulfur and EM(Effective Micro Organism) for preventing epidemic and exterminating of insect pests, and thereof a composite, Patent of South Korea 1020110042295.

Rush, R. E., K. L. Bonnette, D. A. Douds and T. N. Merriman (1995) Dermal irritation and sensitization. In CRC Handbook of Toxicology: 2nd ed. Derelanko MJ, Hollinger MA, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Shin, J.Y., K.H. Kim, C.S. Bae, S.H. Kim, D.H. Shin and J.C. Kim (2005) Acute toxicity evaluation of lemon grass (*Cymbopogon citrates*) essential oil in rats. Laboratory Animal Research. 21(2):122~128.

Worth, A.P. and M. Balls (2001) The importance of the prediction model in the validation of alternative tests. Alternatives to Lavouratory Animals. 29:135~143.

Worth, A. P. and M. T. D Cronin (2001) The use of pH measurements to predict the potential of chemicals to cause acute dermal and ocular toxicity. Toxicology. 169:119~131.

황토유황합제의 pH차이에 따른 급성독성평가

백민경* · 심창기¹ · 이제봉 · 오진아 · 정미혜² · 김두호 · 김민정¹ · 지형진¹ · 최은지 · 조현조

농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, 유기농업과¹, 농자재평가과²

요 약 황토유황합제는 우리나라에서 농작물 생산에 살균살충작용을 가지는 것으로 알려져 친환경유기농자재로 널리 사용되고 있으나, 알칼리성이 강하여 작물에 약해를 보일 뿐 아니라 농업자의 피부 및 안점막에 자극성이 있는 것으로 보고되고 있어 제품으로서의 안전성에 대한 우려가 높다. 본 연구에서는 작물의 약해를 저감하기 위해 pH를 조정하여 제조한 황토유황합제 3종(pH 9, pH 10, pH 11)의 인축 급성독성시험을 시행하여 인체 안전성을 확인함으로써 친환경유기농자재 개발시 최적의 제품 선정에 기초자료로 활용하고자 하였다. 랫드를 이용한 급성경구독성시험 결과 황토유황합제는 LD₅₀이 2,000 mg/kg b.w. 이상이었으며, 급성경피독성시험 결과 또한 모두 4,000 mg/kg b.w. 이상인 저자극성으로 분류되었다. 피부 및 안점막자극성 시험 결과에서도 모두 저자극성으로 구분되었으며 pH 9~11 범위에서 제품간 독성분류의 차이는 나타나지 않았다.

색인어 황토유황합제, 급성독성, pH