

랫드에 경구투여한 에틸파라벤의 독물동력학 모델링

김판기†

용인대학교 산업환경보건학과

Toxicokinetic Modeling of Ethyl Paraben Administered Orally in Rats

PanGyi Kim†

Department Occupational and Environmental Health, Yongin University

ABSTRACT

Objectives: The internal dose of ethyl parabens is important in order to evaluate the risk of this chemical. However, there are little PK model data for parabens to apply this. This experiment attempted PK modeling to ascertain PK values.

Methods: Twenty mg/kg ethyl paraben was administered orally to Sprague-Dawley rats at the same point in time. The rats were sacrificed at times 0, 15, 30 and minutes, and 1, 2, 4, 8, 12, 24 hours after oral gavage. Blood and urine were collected and pretreated for analysis. Accuracy, precision and LOD (limit of detection) were calculated for this analysis. Ethyl paraben, detected by HPLC-MS, was applied to PK modeling using Berkeley Madonna.

Results: This study showed 100.1-103.7% accuracy, 1.4-3.7% precision and a 1.0 ng/mL limit of detection. Orally administered ethyl paraben reached maximum concentration after 30 minutes of dosing in serum and urine of rats. The concentrations were 2,354 ng/mL in serum and 386,000 ng/mL in urine samples. These peak concentrations were excreted after one hour of intubation over 12 hours. For the pharmacokinetic parameters of ethyl paraben revealed using Berkeley Madonna, the absorption rate was 5.539/hour, the excretion rate was 0.048/hour, the half-life was 14.441 hours and AUC was 481,186 ng hour/mL.

Conclusion: Orally administered ethyl paraben was absorbed rapidly in rats and excreted in urine. This chemical, ethyl paraben, accumulated in the body but was excreted over 12 hours after dosing.

Keywords: C_{max} , Ethyl paraben, Pharmacokinetics, Rat, Serum, t_{max} , Urine

I. 서 론

파라벤은 p-hydroxybenzoic acid의 에스테르류로서 1930년대 이래로 다양한 생활용품의 보존제로 사용되고 있다. 파라하이드록시벤조산 에스터는 단일 물질이 아니라 파라하이드록시 벤조산에 에틸 알코올, 메틸, 프로필, 부틸 알코올 등이 반응하여 형성된 물질의 총칭이다(F. Castelain and M. Castelain 2012).

파라벤류는 6종(메틸 파라벤(methyl paraben), 에

틸 파라벤(ethyl paraben, Fig. 1), 프로필 파라벤(n-propyl paraben), 이소프로필 파라벤(isopropyl paraben), 부틸 파라벤(n-butyl paraben), 이소부틸 파라벤(isobutyl paraben)이 흔히 사용되고 있다. 파라

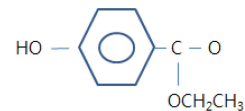


Fig. 1. Chemical structure of ethyl paraben.

†Corresponding author: Department Occupational and Environmental Health, Yongin University, Gyeonggi, 449-714, Korea. Tel: +82-31-8020-2752, Fax: +82-31-8020-2886, E-mail: pangyikim@gmail.com
Received: 15 October 2014, Revised: 20 October 2014, Accepted: 23 October 2014

Table 1. Physico-chemical properties of ethyl paraben

Chemicals	CAS No.	M.W. (g/mole)	logK _{ow}	Solubility (g/100g at 25°C)	Boiling point (°C)	Melting point (°C)
Ethyl 4-hydroxybenzoate (Ethyl paraben; EP)	120-47-8	166.17	2.39	(1) Methanol-115	297~298	115~118
				(2) Ethanol-70		
				(3) Propylene glycol-25		
				(4) Peanut oil-1		
				(5) Acetone-84		
				(6) Benzene-1.65		
				(7) Ether-43		
				(8) Carbon tetrachloride-0.9		
				(9) Water-8.85X10+2		

벤은 낮은 농도에서도 곰팡이에 대한 살균작용이 효과적으로 나타나는데, 에스테르 그룹의 사슬길이가 길어질수록 살균활성이 증가하지만 수용성은 감소한다. 다른 물질과 섞여도 특이한 색이나 냄새가 없으며, 특히 구조적으로 안정되어 있어 다른 물질과의 혼합에도 그 성질이 변하지 않는 장점이 있다(Aubert *et al.* 2012). 에틸파라벤의 이화학적 특성을 Table 1에 제시하였다.

파라벤은 물질마다 약간의 차이가 존재하지만, 세균, 효모, 곰팡이들의 생장을 억제하는 작용으로 인하여, 식품, 화장품, 약품의 보존 기간을 연장하는 목적의 보존제로 광범위하게 사용되고 있어, 사람은 파라벤 복합물질에 다양하게 노출되고 있는 실정이다.

우리나라에서 에틸파라벤은 화장품에서 단일물질로 0.4% 까지 허용(식품의약품안전처, 2013a)이 되고 있으며, 1962년 다음과 같은 식품에 사용이 허용(식품의약품안전처, 2013b)되었는데, 캡슐,잼에 1.0 g/kg, 망고치트니, 간장류 0.25 g/kg, 식초, 기타음료 0.1 g/L, 소스 0.2 g/kg, 과실채소에 0.012 g/kg 까지 사용되고 있다. 식품 중 부틸, 이소부틸, 프로필, 이소프로필 파라벤은 2009년 12월에 지정이 취소되었다. 의약품은 내용액제류에 0.01% 이하, 안과용 제품에 0.05% 이하, 주사제류에 0.05~0.8%, 연고제류 0.05~0.2%가 허용되고 있으며, 1일 허용총량을 10 mg/kg으로 규정(식품의약품안전처, 2013c)하고 있다.

현재 내분비계 교란물질을 포함하는 다양한 독성물질의 생체노출에 대해 인체 노출평가 및 주요 노출경로를 찾는 연구를 수행하고 있으나, 전일적(holistic)인 관점에서의 인체 노출량을 산정하는 데 있어 제한점들이 지적되고 있다. PBPK 모델은 개발된 모델에 인

체 모니터링 결과를 적용해 외적 노출량(external exposure concentration)을 산출할 수 있으므로, 이러한 제한점을 극복하기 위한 대안으로 권장되고 있다.

다양한 화학물질의 노출에 대한 체내 주요 장기에서의 용량을 추정하기 위하여PBPK 모델을 활용하며, 이러한 경우를 forward dosimetry 기법이라 부른다. 반대의 경우 즉, 체내 장기에서의 화학물질 수준을 알고 있을 경우, 노출량에 대한 정보를 추정하는 모델의 활용을 reverse dosimetry 라고 한다. 이러한 reverse dosimetry 기법을 활용하여 인체 모니터링 자료를 바탕으로 노출량을 산정하는 여러가지 방법론이 개발되고 있다.

외국에서는 메틸렌 클로라이드(methylene chloride; Andersen *et al.*, 1997), 2-부톡시에탄올(2-butoxyethanol; Franks *et al.*, 2006), 비닐 클로라이드(vinyl chloride; Clewell *et al.*, 2001), 클로르포름(chloroform; Yang *et al.*, 2010), 퍼클로레이트(perchlorate; McLanahan *et al.*, 2013), 아크릴아마이드(acrylamide; Tardiff *et al.*, 2010) 등의 PBPK 모델을 개발하여 일부는 이 모델을 이용한 인체 노출평가를 수행하였다. 국내의 경우 납(KFDA, 2004), 비스페놀 A(Shin *et al.*, 2004), 아크릴아마이드(KFDA, 2012)의 PBPK 모델을 개발하였고, 일부의 경우 인체모니터링 결과를 PBPK 모델에 적용하여 인체 노출평가를 수행하였다.

그러나, 정작 사용량이 증가하고 있는 파라벤류에 대해서는 국내외에서 PBPK 모델 개발 및 인체 노출평가로의 활용이 진행되고 있지 않을 뿐 아니라, 기초가 되는 PK 모델개발도 지지부진한 실정이다. 이에 본 연구에서는 파라벤 노출평가에 활용될 수 있는 외적노출량을 산출하기 위한 전 단계

로써, 동물을 이용하여 PK 모델을 개발하고, 노출 평가 활용의 기초자료를 제공하고자 본 연구를 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물과 시료채취

에틸 파라벤(제조사: Aldrich, 순도: 99%) 투여용액은 생리식염수(70%)와 에탄올 용매(30%)에 용해하여 제조하였다. 경구 투여 후 체내동태를 확인하기 위한 파라벤의 투여용량은 20 mg/kg 였으며, 총 24마리에 노출시켰다. 동물실험을 위하여 동물실험윤리위원회 심의를 필하였다(승인번호 YUIACUC-2013-05).

실험동물은 Sprague-Dawley 계 랫드(6주령, 150-170 g)를 대사 케이지(metabolic cage)에 1마리씩 넣고 온도 23±2°C, 습도 50~60%에 적응시킨 후 시험에 사용하였다. 실험 실시 24시간 전부터 물만 공급하면서 절식토록 하였다.

경구투여 0(투여 전), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12시간이 지난 후에 시료를 수집하였다. 디에틸에테르

(diethyl ether)를 이용하여 마취시킨 후, 매 지정 채취시간마다 물질별로 3마리씩 무작위로 선정하여 혈액 및 소변 시료를 수집하였다. 심장채혈로 수집한 혈액 시료의 경우 13,000 rpm에서 원심분리한 후 혈청을 수집하였으며, 혈액 및 소변 시료는 분석 시까지 -20°C에 보관하였다.

2. 시료의 전처리 및 분석

원심분리한 혈청시료는 내부표준물질과 β-glucuronidase를 첨가한 후 37°C에서 18시간 인큐베이션 하였으며, acetonitrile 첨가 후 원심분리 및 시린지 필터로 여과를 진행하였다. 뇨 시료는 내부표준물질과 acetonitrile을 첨가한 후 원심분리 및 시린지 필터로 여과를 진행하였다.

시료분석을 위해 Agilent사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1100 series HPLC와 triple quadrupole tandem mass spectrometer (API 4000, Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 기기의 분석조건은 Table 2, 3과 같았다.

생체시료 중 분석물질의 정량 분석에 이용되는 분

Table 2. LC-MS/MS conditions for determination of ethyl paraben

Parameters	Conditions
Column	Imtakt CD C ₁₈ , 2.0×7.5 mm, 3.0 μm
Mobile phase	A : 0.1% acetic acid in water B : 0.1% acetic acid in acetonitrile
flow rate	200 μl/min (isocratic mode, A:B=10:90)
Injection volume	5 μl
Ionization mode	ESI negative
Curtain gas	25 psi
Gas temperature	400°C
Ion spray voltage	-4500 V
Ion source gas 1	40 psi
Ion source gas 2	60 psi
Collision gas	6

Table 4. The parameters and equations of oral dosed one-compartment model for pharmacokinetics in ethyl paraben

Parameters	Equations
Cp _t	$Cp_0 \times Ka (e^{-Ke \times t} - e^{-Ka \times t})$
Ke	$\ln(Cp_1/Cp_2) / (t_2 - t_1)$
T _{1/2}	$\ln 2 / Ke$
AUC	$Cp_1 \times Ka / (Ka - Ke)$
CL	D / AUC
V _d	CL / Ke

A: Amount (ng), AUC: Area under the curve, C: Concentration (ng/L), CL: Clearance (mL/hr), D: Dose (mg/kg), t: Time (hr), V_d: Volume of distribution (mL), Ke: Elimination rate constant (/hr)

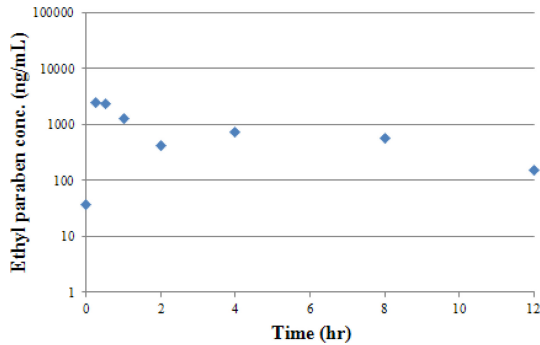
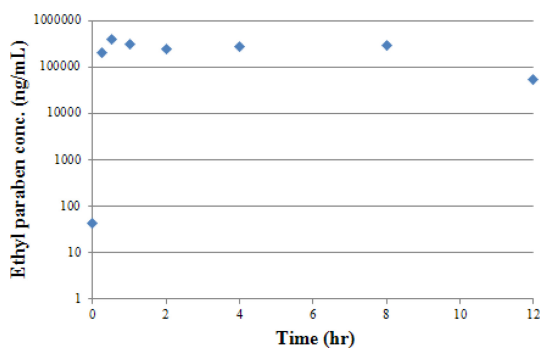
Table 3. MS/MS parameters for determination of ethyl-paraben and deuterium labelled internal standard

Compounds	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP	CE	EP	CXP
Ethyl paraben (EP)	165	92	-60	-32	-10	-15
Ethyl paraben_d4	169	96	-55	-34	-10	-7

Note. -DP : Declustering Potential, V, -CE : Collision Energy, V, -CXP : Collision Cell Exit Potential, V
-Q1 : Precursor ion mass, m/z, -Q3 : Daughter ion mass, m/z

Table 5. Method validation results for analysis of ethyl paraben treated rat serum and urine.

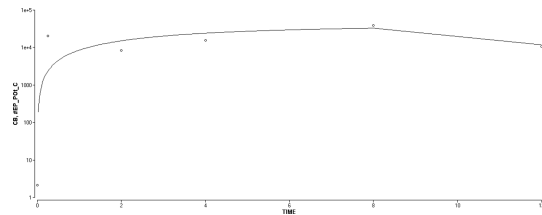
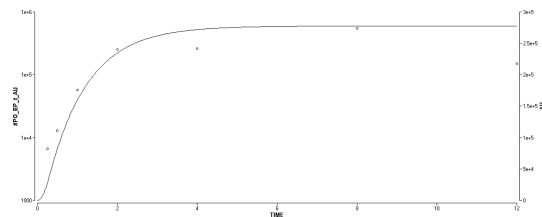
Paraben	Accuracy (%)			Precision (RSD,%)			LOD (ng/mL)
	Low	Medium	High	Low	Median	High	
EP	103.7	100.1	100.5	3.7	1.4	1.9	1.0

**Fig. 2.** Toxicokinetic profile of ethyl paraben in rat serum after oral administration.**Fig. 3.** Toxicokinetic profile of ethyl paraben in rat urine after oral administration.

석방법이 선택적이고 감도가 우수하며 믿을만하고 재현성이 있다는 것을 증명하는 신뢰성 확보를 위하여 각 분석물질에 대한 검출한계(limit of detection, LOD), 정확도(accuracy), 정밀도(precision)를 확인하였다.

3. PK 모델링

Berkeley Madonna 프로그램을 사용하여 랫드 경구투여에 의한 PK 모델을 완성시키고, Table 5에 제시된 식에 따라 K_a , K_e , clearance (CL_r), volume of distribution (V_d), 반감기($t_{1/2}$)를 산출하였다.

**Fig. 4.** Pharmacokinetic modeling of oral administered ethyl paraben in serum.**Fig. 5.** Pharmacokinetic modeling of oral administered ethyl paraben in urine.

III. 결 과

1. 분석방법의 타당성 평가

동물 생체시료의 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 결과는 Table 6과 같다.

정확도 평가에서 저용량은 103.7%, 중간용량 100.1%, 고용량은 100.5%를 나타내어 모두 매우 양호한 정확도를 나타내었다. 정밀도 평가에서 저용량 3.7%, 중간용량 1.4%, 고용량 1.9%로 매우 우수한 정밀도를 나타내었으며, 검출한계는 1.0 ng/mL 였다.

2. 실험동물을 이용한 에틸파라벤의 동태

경구노출 시 SD 랫드 혈액과 뇨 시료에서 시간별 농도변화는 Fig. 2, 3에 제시하였다. 혈청내 에틸파라벤 수준은 투여 15분후에 최고치(2,588 ng/mL) 수준으로 상승하였으며, 30분후에도 높은 수준(2,354 ng/mL)을 보였다. 이후 1시간 후부터 농도(1,303 ng/mL)

Table 6. The PK model parameters of ethyl parabens exposed orally in rat

	Ka (/hr)	Ke (/hr)	t _{1/2} (hr)	AUC	CL _t	Vd (mL)
EP	5.539	0.048	14.441	481188.06	6.67*F	138.89*F/Kc

가 감소하였으며, 8시간(593 ng/mL)까지 완만하게 감소하는 특성을 보였다.

노중 에틸파라벤 수준은 투여 15분후에 높은 수준(199,320 ng/mL) 수준으로 상승하였으며, 30분후에 최고 수준(386,100 ng/mL)을 보였다. 이후 1시간 후부터 농도(295,680 ng/mL)가 감소하였으며, 12시간(53,233 ng/mL)까지 완만하게 감소하는 특성을 보였다.

3. PK 모델을 이용한 에틸파라벤의 동태

Berkeley Madonna 프로그램을 이용한 PK profile은 Figs. 4, 5에 제시하였다.

산출된 경구 및 정맥노출 시 PK model parameter를 Berkeley Madonna를 이용하여 산출하였으며, Table 6에 나타내었다. 흡수속도는 5.539/hr, 배설속도는 0.048/hr, 반감기 14.441시간(14시간 26분), AUC 481,188.06 ng h/mL, 청소율은 6.67*F로 산출되었으며, 분포용적은 138.89*F mL 로 계산되었다.

IV. 토 의

이 연구는 경구 노출된 에틸파라벤의 흡수, 분포, 배설을 파악하기 위하여 수행된 사전 보고가 거의 없는 연구결과이다. 파라벤 종류 중 메틸과 에틸파라벤은 일부 사용이 허가되어 있으나, 프로필과 부틸 파라벤은 식품에서의 사용이 취소되었다. 이 연구에서 생산된 에틸파라벤 경구 노출에 의한 PK 결과는 작은 분자량 화학물질의 전형적인 특성을 나타내고 있었다.

Aubert 등(2012)은 메틸, 프로필, 부틸 파라벤을 각각 100 mg/kg을 경구, 피하, 피부 흡수토록 하여, SD 랫드 혈장내 농도를 분석한 결과를 보고 하였는데, 메틸파라벤은 숫컷 동물에서 t_{max}가 1시간 이었으며, AUC 82,153 ng eq h/mL, C_{max}는 26,592 ng eq/mL 였다. 프로필 파라벤은 숫컷 랫드에서 t_{max}가 0.5시간 이었으며, AUC 58,344 ng eq h/mL, C_{max}는 11,432 ng eq/mL로 보고하였다. 이 연구는 에틸파라벤은 대상으로 하지 않았으나, 본 실험에서 20 mg/kg을 투여

한 결과 숫컷 랫드에서 에틸파라벤은 혈청내에서 C_{max}는 2,354 ng/mL, t_{max}가 0.5시간으로 t_{max}가 동일한 결과였으나, 이때의 투여수준의 차이에 따른 상당한 차이를 나타내었다.

Aubert 등의 결과에 의하면 파라벤 100 mg/kg경구 노출에 의한 C_{max}와 AUC 값은 메틸파라벤 > 프로필파라벤 > 부틸파라벤의 순이었다. 생체이용성이 높은 작은 분자량 화학물질을 경구 투여하였을 때 나타나는 전형적인 형태가 t_{max}가 신속하게 나타나는 것인데, 본 연구에서도 30분 이내의 t_{max} 값을 보였다.

Frederiksen 등(2008)은 에틸파라벤 100, 200, 400 mg/kg의 용량으로 랫드 임신기간동안(임신 7일~21일) 투여하고 혈장, 양수 등의 생체내 농도를 분석하여 보고하였다. 이 보고에서 모체의 혈장 중 100 mg/kg 투여군에서 평균 2,023 ng/mL가 검출되었음을 보고하였다. 모체 조직과 태아조직이 생성되고, 양수 등의 체액이 있음을 감안하더라도 본 연구의 검출량에 비하여 낮은 수준이 검출되고 있는데, 암수 동물에 대한 동태특성의 차이에 기인하는 것으로 판단된다.

정확한 PK 모델링을 위하여 필요한 투여량에 대한 배설총량을 추정하기 위하여 대변, 케이지, 털, 혈액, 각종 주요장기 등에 대하여 광범위하게 분석되어야 할 필요가 있다. 아울러, 인체 독성이 거의 나타나지 않은 화학물질의 노출량으로부터(현재 사용량 수준) 인체 PK 모델을 개발하는 연구가 진행될 필요가 있다.

V. 결 론

이 연구는 에틸파라벤의 흡수, 분포, 배설 특성을 확인하기 위하여 실험동물을 대상으로 수행되었다. Sprague-Dawley 계 랫드를 사용하였으며, 에틸파라벤 20 mg/kg 용량을 경구투여 하였으며, 투여 후 15, 30분과 1, 2, 4, 8, 12시간에 혈액과 노를 채취하여 생체시료 중 에틸파라벤을 분석하였으며, 이를 바탕으로 Berkeley Madonna 프로그램을 이용하여 모델링하였다. 이 연구에 사용된 분석법의 정확도는

100.1~103.7%, 정밀도는 1.4~3.7(RSD, %)였으며, 검출한계는 1.0 ng/mL 였다. 에틸파라벤은 투여 직후 신속하게 흡수가 이루어졌으며, 투여 후 30분에 혈중, 뇨중 최고 농도에 도달하였다. 이때 혈청 내 농도는 2,354 ng/mL 였으며, 뇨중 농도는 386,000 ng/mL 였다. 에틸파라벤은 주로 뇨를 통하여 12시간까지 천천히 배설되고 있었다. Berkeley Madonna 를 이용한 모델링에서 흡수속도 5.539/h, 배설속도 0.048/h 였으며, 반감기는 14.441 시간으로 산출되었고, AUC 481,186 ng h/mL 로 산출되었다.

이 연구는 에틸파라벤의 노출량을 확인하기 위한 reverse dosimetry를 방법의 일환으로, 흡수, 분포, 배설 등의 기초자료를 제공하는데 의의가 있다.

감사의 글

본 연구는 2011년 용인대학교 교내학술연구비 지원과 2013년 KFDA 13162유해물776지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Andersen ME, Clewell HJ 3rd, Gearhart J, Allen BC, Barton HA. Pharmacodynamic model of the rat estrus cycle in relation to endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health*. 1997; 52(3): 189-209.
2. Aubert N, Ameller T, Legrand JJ. Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(3-4): 445-454.
3. Castelain F, Castelain M. Parabens: a real hazard or a scare story?. *Eur J Dermatol*. 2012; 22(6): 723-727.
4. Clewell HJ, Gentry PR, Gearhart JM, Allen BC, Andersen ME. Comparison of cancer risk estimates for vinyl chloride using animal and human data with a PBPK model. *Sci Total Environ*. 2001; 274(1-3): 37-66.
5. Franks SJ, Spendiff MK, Cocker J, Loizou GD. Physiologically based pharmacokinetic modelling of human exposure to 2-butoxyethanol. *Toxicol Lett*. 2006; 162(2-3): 164-173.
6. McLanahan ED, White P, Flowers L, Schlosser PM. The use of PBPK models to inform human health risk assessment: case study on perchlorate and radioiodide human lifestage models. *Risk Anal*. 2013; 34(2): 356-366.
7. Frederiksen H, Taxvig C, Hass U, Vinggaard AM, Nellemann C. Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicol Sci*. 2008; 106(2): 376-383.
8. Shin BS, Kim CH, Jun YS, Kim DH, Lee BM, Yoon CH, et al. Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *J Toxicol Environ Health A*. 2004; 67(23-24): 1971-1985.
9. Tardiff RG, Gargas ML, Kirman CR, Carson ML, Sweeney LM. Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(2): 658-667.
10. Yang Y, Xu X, Georgopoulos PG. A Bayesian population PBPK model for multiroute chloroform exposure. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2010; 20(4): 326-341.
11. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Paraben biological monitoring of school children. Osong: National Institute of Food and Drug Safety Evaluation Press; 2012.
12. Ministry of Food and Drug Safety. The regulation for cosmetics ingredient. No 2013-2. Osong: Ministry of Food and Drug Safety Press; 2013a.
13. Ministry of Food and Drug Safety. Food additives criteria and standard. No 2013-184. Osong: Ministry of Food and Drug Safety Press; 2013b.
14. Ministry of Food and Drug Safety. The guideline for evaluation of medicinal drug registration and authorization. No 2013-216. Osong: Ministry of Food and Drug Safety Press; 2013c.