



## 인체 간세포주 HepG2 및 발광박테리아를 활용한 유기인계 난연제와 그 혼합물의 독성 스크리닝

김선미<sup>1\*</sup> , 강경희<sup>1</sup> , 김지윤<sup>1</sup> , 나민주<sup>1,2</sup> , 최지원<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 화학안전연구센터, <sup>2</sup>한국과학기술원(KAIST) 바이오및뇌공학과

## Toxicity of Organophosphorus Flame Retardants (OPFRs) and Their Mixtures in *Aliivibrio fischeri* and Human Hepatocyte HepG2

Sunmi Kim<sup>1\*</sup>, Kyounghee Kang<sup>1</sup>, Jiyun Kim<sup>1</sup>, Minju Na<sup>1,2</sup>, and Jiwon Choi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemical Safety Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT),

<sup>2</sup>Department of Bio and Brain Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST)

### ABSTRACT

**Background:** Organophosphorus flame retardants (OPFRs) are a group of chemical substances used in building materials and plastic products to suppress or mitigate the combustion of materials. Although OPFRs are generally used in mixed form, information on their mixture toxicity is quite scarce.

**Objectives:** This study aims to elucidate the toxicity and determine the types of interaction (e.g., synergistic, additive, and antagonistic effect) of OPFRs mixtures.

**Methods:** Nine organophosphorus flame retardants, including TEHP (tris(2-ethylhexyl) phosphate) and TDCPP (tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate), were selected based on indoor dust measurement data in South Korea. Nine OPFRs were exposed to the luminescent bacteria *Aliivibrio fischeri* for 30 minutes and the human hepatocyte cell line HepG2 for 48 hours. Chemicals with significant toxicity were only used for mixture toxicity tests in HepG2. In addition, the observed EC<sub>x</sub> values were compared with the predicted toxicity values in the CA (concentration addition) prediction model, and the MDR (model deviation ratio) was calculated to determine the type of interaction.

**Results:** Only four chemicals showed significant toxicity in the luminescent bacteria assays. However, EC<sub>50</sub> values were derived for seven out of nine OPFRs in the HepG2 assays. In the HepG2 assays, the highest to lowest EC<sub>50</sub> were in the order of the molecular weight of the target chemicals. In the further mixture tests, most binary mixtures show additive interactions except for the two combinations that have TPhP (triphenyl phosphate), i.e., TPhP and TDCPP, and TPhP and TBOEP (tris(2-butoxyethyl) phosphate).

**Conclusions:** Our data shows OPFR mixtures usually have additivity; however, more research is needed to find out the reason for the synergistic effect of TPhP. Also, the mixture experimental dataset can be used as a training and validation set for developing the mixture toxicity prediction model as a further step.

**Key words:** Organophosphorus flame retardants (OPFRs), mixture toxicity, concentration addition (CA), *Aliivibrio fischeri*, HepG2, cytotoxicity

Received April 7, 2023

Revised April 20, 2023

Accepted April 21, 2023

### Highlights:

- Mixture toxicity and the type of interactions were tested for several OPFRs in HepG2 cells.
- In HepG2 assays, the highest to lowest EC<sub>50</sub> were in the order of the molecular weight of the target chemicals.
- Most binary mixtures show additive interactions, with the exception of two mixtures with TPhP (triphenyl phosphate).

### \*Corresponding author:

Chemical Safety Research Center,  
Korea Research Institute of Chemical  
Technology (KRICT), 141 Gajeong-ro,  
Yuseong-gu, Daejeon 34114, Republic of  
Korea

Tel: +82-42-860-7182

Fax: +82-42-860-7183

E-mail: skim@kRICT.re.kr

## 1. 서 론

유기인계 난연제(organophosphate flame retardants, OPFRs)는 물질의 연소를 억제하거나 완화하기 위해 건축자재, 플라스틱

소재로 만든 가구 및 제품류에 다양하게 첨가되는 화학물질이다. 브롬계 난연제의 대체제로 활발히 사용됨에 따라 전 세계적으로도 다양한 종류의 유기인계 난연제가 실내 환경 중에서 검출되며, 이에 따라 인체 노출 우려도 커지는 상황이다.<sup>1)</sup>



우리나라에서는 2012년 안산, 안양 지역의 30가구를 대상으로 한 연구가 가장 처음으로 보고된 집먼지 중 OPFRs 모니터링 결과이다.<sup>2)</sup> 분석대상 20종의 OPFRs 중 9종의 OPFRs가 모든 시료에서 검출되었으며, TBOEP (tris(2-butoxyethyl) phosphate), TCEP (tris(2-chloroethyl) phosphate)가 가장 높은 수준으로 검출되었다. 이후 2019년 수원, 전주, 군산 지역의 집먼지 총 85개 시료에서 7종의 유기인계 난연제를 분석한 연구에서는 TEHP (tris(2-ethylhexyl) phosphate), TCPP (tris(1-chloro-2-propyl) phosphate), TPhP (triphenyl phosphate) 순으로 높은 평균 검출 수준(각각 1,600, 1,500, 1,200 ng/g)을 보였다.<sup>3)</sup> 해당 연구에서 검출 수준을 활용한 노출평가 결과, 일일 경구 체중당량 섭취량은 어린이에서 중앙값 63~150 mg/kg bw/day, 고노출값 610~1,500 mg/kg bw/day로 나타났으며 모든 물질에서 독성참고치(Reference dose, RfD)를 넘는 경우는 없었다. 2021년에 수집된 시료 분석 결과로, 서울 및 경기 지역의 106가구의 실내 먼지 시료에서 유기인계 난연제를 분석한 또 다른 연구의 경우, 분석대상 18종의 OPFR 중 9종의 OPFRs가 70% 이상의 검출율을 나타냈다.<sup>4)</sup> 해당 연구에서 검출율이 높은 OPFRs 중 중앙값 기준 높은 값을 보인 물질은 TCPP, EHDPHP (2-ethylhexyl diphenyl phosphate), TPhP 순이었다. 최근 발표된 유럽 3개국의 집먼지 분석결과 연구에서도 TBOEP, TCPP는 가장 높게 검출되는 물질들이었으며, 이외에도 우리나라에서의 검출패턴과 비슷하게 TPhP, TDCPP (tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate), EHDPHP, TCEP 등이 자주 검출되는 편이었다.<sup>5)</sup>

유기인계 난연제류는 다시 방향족, 염소계열, 알킬계열 등 서로 다른 작용기가 첨가된 인계난연제로 나뉘며,<sup>6)</sup> 이 중 염소계열이 첨가된 chloroalkyl 작용기는 기능성이 우수하여 다른 유기인계 난연제류에 비해 많이 사용되는 편이다. 예를 들어 TCPP는 EU REACH 등록자료 기준으로 대상 OPFRs 중 가장 높은 유통량(10,000~100,000 tonnes per year in 2018)을 기록하고 있다.<sup>7)</sup> 이와 함께 독성 실험 결과도 염소계열 작용기가 첨가된 인계 난연제에 대해 가장 많이 보고되고 있다. TDCPP는 제브라피쉬를 이용한 신경발달독성 실험에서 5일간 노출 시 10 mM의 노출농도에서 발달저해영향을 보였으며<sup>8)</sup> 또 다른 5일간의 노출 실험에서 제브라피쉬의 도파민 시그널링을 유의하게 저해하는 것이 관찰되었다.<sup>9)</sup> TCEP와 TBOEP, TnBP (tri-n-butyl phosphate)를 5일간 제브라피쉬에 노출시키고 다양한 신경발달영향을 관찰한 다른 연구에서는 locomotor behavior의 저해 등 정상적인 발달 반응을 저해하는 것으로도 나타났으며, 살충제인 클로로피리포스와 독성기전이 비슷하게 관찰되었다.<sup>10)</sup> TCP (tricyesyl phosphate), TDCPP, TPhP를 이용한 실험에서는 H295R 세포주와 제브라피쉬 성어 노출실험 모두에서 테스토스테론과 에스트로겐 호르몬의 농도가 유의하게 변화하여 내분비계 교란 영향이 있음도 보고되었다.<sup>11)</sup> 간세포주를

이용한 간 독성영향을 살펴본 연구들도 보고되었는데, TDCPP의 경우 간독성과 유전독성 영향을 나타내었고,<sup>12)</sup> 간 세포주에 TCPP를 노출시켜 오믹스 기법을 적용해 독성영향을 파악한 결과 간세포 독성을 보이는 것으로 나타났다.<sup>13)</sup>

한편 방향족 인계난연제(arylated OPFRs) 중 하나인 TPhP는 할로알킬계 인계난연제와 함께 pentaBDE의 대체제로 가장 많이 사용되는 물질로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 해당 물질은 앞선 연구에서 독성이 보고된 바 있으며,<sup>11)</sup> 이와 함께 갑상선호르몬 교란 영향이 있음이 GH3와 FRTL-5 세포주를 이용한 *in vitro* 실험을 통해 보고되기도 했다.<sup>14)</sup> 다양한 유기인계 난연제를 항안드로겐성 등 내분비계 교란 영향을 *in vitro* 실험으로 확인한 또 다른 연구에서는 TPhP가 항안드로겐성 뿐 아니라 갑상선호르몬 교란 가능성이 있음을 보고하였다. 특히 염소계 난연제에 비해 갑상선호르몬 운반단백질인 transthyretin (TTR) 결합력은 방향족 인계난연제가 더 높은 것으로 나타났다.<sup>6)</sup>

이와 같이 유기인계 난연제류 물질들은 생활 속에서 일반인 구에게 노출되며, 다양한 물질들이 건강영향을 일으킬 가능성이 보고되어 왔다. 또한 유기인계 난연제류는 난연 역할을 위해 그 자체로 제품에 혼합 사용되거나,<sup>7)</sup> 환경 중으로 배출되면서 수용체인 인간에게 복합적으로 노출되고 있다. 따라서 다른 화학물질과 동시에 노출되어 간 독성 또는 내분비계 교란영향을 일으킬 가능성도 존재한다. 화학물질의 동시 노출에 따른 혼합독성은 혼합물 간 상호작용(interaction)을 고려해야 하는데, 아직까지는 혼합독성 실험결과가 많이 보고되지 않아 상호작용을 고려하여 위해성평가에 활용되는 경우는 극히 드물다.<sup>15)</sup> 또한 실생활에서는 10종 이상의 화학물이 복합 혼합물(complex mixture)의 형태로 동시에 수용체에 노출되고 있으나,<sup>16)</sup> 혼합독성 실험자료는 실험의 용이성과 예측모델의 가용성 때문에 대부분 2종 조합에 대한 정보만이 존재한다.<sup>17)</sup> 향후 혼합물의 위해성평가를 위해서는 실제 노출상황을 고려한 보다 많은 혼합독성 데이터, 특히 복합 혼합물의 실측독성값 및 상호작용에 대한 정보가 지속적으로 생산될 필요가 있다.

본 연구에서는 인체 간세포주 HepG2와 발광박테리아를 활용하여 유기인계 난연제류 물질들의 단일물질 독성 스크리닝 및 혼합물의 독성을 확인하고자 하였다. 이를 위해 국내 실내먼지 중 검출자료를 기반으로 검출율이 높은 유기인계 난연제 9종을 시험대상으로 선정하고, 단일물질의 독성자료를 먼저 생산하였다. 다음 단계로 유의한 독성값이 도출된 물질들의 2종 조합 실험 및 복합 혼합물 조합 실험을 진행하고, 혼합물의 독성값 및 혼합물 간 상호작용 분류 결과를 제시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험대상 물질 선정

국내 집먼지 분석 연구들을 바탕으로 검출빈도와 농도가 높

은 주요 유기인계 난연제 9종(TEHP, TDCPP, EHDPHP, TPhP, TCEP, TnBP, TEP [triethyl phosphate], TCPP, TBOEP)을 선정하였다.<sup>2-4)</sup> 대상 물질의 CAS 등록번호와 물질명을 다음 Table 1에 나타내었으며, 분자량 낮은 순으로 정렬하여 제시하였다. 대상물질 중 TCPP는 Shanghai iChemical Technology (Shanghai, China), TCEP, TDCPP, TEHP는 Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), 그 외 난연제류는 Sigma-aldrich (Burlington, MA, United States)에서 구매하였다.

## 2. 발광박테리아 독성실험

생태독성 스크리닝을 위해 해양 발광박테리아인 *Aliivibrio fischeri*를 활용하였다. 발광박테리아는 BioTox™ LumoPlate™ Ultimate Matrix Kit (EBPI, Ontario, Canada)를 구매하여 판매처에서 제시하는 시험법에 따라 진행하였다. 독성 실험은 ISO 21338 방법(Kinetic Luminescent Bacteria Test)에 준해 수행하였으며, 발광도 측정장비는 Centro XS3 LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Germany)를 이용하였다. 실험 진행 기간에는 참조물질로 Zinc Sulfate Heptahydrate (CAS No. 7446-20-0)를 함께 노출시켜 정도관리를 수행하였으며 참조물질 노출 시의 EC<sub>50</sub> 범위가 1~10 mg/L로 일정하게 산출됨을 확인하였다. 대상물질들은 먼저 1,000 µM을 최고농도로 실험한 후, 최고농도에서도 성장저해 영향이 유의하게 나타나지 않은 물질들을 대상으로 15 mM까지 높여 재실험을 진행했다. 모든 실험은 2배씩 희석하여 8개 농도군으로 노출시킨 후, 30분 노출시키며 발광도를 측정하였다.

## 3. HepG2 세포배양 및 세포독성실험

HepG2 세포(hepatoma cell line, 300198)는 인체 간암세포에서 유래된 세포주로, 간독성 연구 및 약물대사 관련 연구에 활발히 사용되고 있는 세포주이다. 유기인계 난연제를 포함한 난연제는 식품 및 집먼지를 통한 경구 노출이 가장 큰 기여도를

차지하므로,<sup>1)</sup> 경구 노출을 통한 흡수 및 대사 가능성을 고려하여 간세포주를 활용하였다. 또한 HepG2 세포주는 독성연구에 오랜 기간 활용이 되어와 생물학적 기전 관련 정보가 많고, 기존 혼합독성 연구와도 비교하기 수월하다는 장점이 있다. 세포주는 CLS (Cell Lines Service, Germany)사에서 분양 받아 배양하였다. 세포는 500 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WelGENE Inc., Korea, LM001-05)에 10% fetal bovine serum (FBS, Atlas, USA, FP-0500-A)과, 1% penicillin-streptomycin (PE-ST, Gibco, USA, 15070063)을 첨가한 배지를 이용하여 100×25 mm 원형배양접시(Corning, NY, USA)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하며 배양하였다.

노출용 세포는 배양액을 배낸 후 Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS, Gibco, 14190144)를 이용하여 1회 세척하고, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 1~2분간 처리하여 원심분리기(2,000 rpm, 4 mins)로 침전시켰다. 침전 후 추출된 세포는 세포 계수기(Cell counter, Invitrogen, USA)를 이용하여 세포 수 계산 후, 96 well plate에 1.5×10<sup>5</sup>/mL의 농도로 100 µL씩 분주하였다. 24시간 배양 후, 배양액을 제거하고 대상 물질을 각 well 당 100 µL씩 분주하여 48시간 동안 노출시켰다. 실험 진행 기간에는 참조물질로 Doxorubicin (CAS No. 23214-92-8)을 함께 노출시켜 정도관리를 수행하였으며, 참조물질 노출 시의 EC<sub>50</sub> 범위가 0.2~0.8 µM 사이에서 일정하게 산출됨을 확인하였다. 대상물질들은 용해도에 따라 1,000 µM 또는 3,000 µM을 최고농도로 노출시켜 2배씩 희석하여 8개 농도군으로 노출시켰다. 모든 실험은 서로 다른 세포 계대를 사용하여 독립 3반복 시행하였으며 실험에 사용한 세포 계대는 2~7세대까지의 세포주를 사용하였다. 세포 생존율을 확인하기 위해서는 Cell Counting Kit-8 (CCK-8 (tetrazolium salt), Dojindo, Kumamoto, Japan)을 10 µL씩 96 well plate에 분주한 후, CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 배양하여 450 nm 파장에서 Microplate Reader (Infinite®, Tecan Co, Switzerland)로 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Target organophosphate flame retardants in this study

No.	Chemicals	Abbreviation	CAS No.	MW (g/mol)
1	Triethyl phosphate	TEP	78-40-0	182.15
2	Tri-n-butyl phosphate	TnBP	126-73-8	266.31
3	Tris (2-chloroethyl) phosphate	TCEP	115-96-8	285.49
4	Triphenyl phosphate	TPhP	115-86-6	326.28
5	Tris (1-chloro-2-propyl) phosphate	TCPP	13674-84-5	327.57
6	2-Ethylhexyl diphenyl phosphate	EHDPHP	1241-94-7	362.41
7	Tris (2-butoxyethyl) phosphate	TBOEP	78-51-3	398.47
8	Tris (1,3-dichloropropyl) phosphate	TDCPP	13674-87-8	430.89
9	Tri (2-ethylhexyl) phosphate	TEHP	78-42-2	434.64

#### 4. 독성데이터 분석

발광박테리아 독성실험에서 측정된 발광도 데이터 및 HepG2 세포주 독성실험에서 측정된 흡광도 데이터는 대조군의 발광도 및 흡광도 값을 100%로 환산하여 대상물질의 노출 농도별로 발광박테리아의 성장저해율(Eq. 1)과 HepG2 세포주의 세포생존율(Eq. 2-1, 2-2)을 계산하였다.

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \frac{\text{Lumi}(\text{treatment}) - \text{Lumi}(\text{blank})}{\text{Lumi}(\text{Control}) - \text{Lumi}(\text{blank})} \times 100 (\%)$$

(Eq. 1)

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Abs}(\text{treatment}) - \text{Abs}(\text{blank})}{\text{Abs}(\text{Control}) - \text{Abs}(\text{blank})} \times 100 (\%)$$

(Eq. 2-1)

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - \text{Cell viability (\%)}$$

(Eq. 2-2)

성장저해율과 세포생존율 데이터는 SigmaPlot® (14.5, Systat Software Inc., CA, USA) 프로그램을 활용한 비선형 회귀 분석으로 용량-반응 곡선을 도출하였다. 반복군 데이터를 모두 포함한 물질별 데이터셋을 3-parameter 로지스틱 회귀분석으로 Sigmoid 함수에 적합시키고, SigmaPlot에서 제시하는 Sigmoid,

Logistic, Gompertz, Hill, Chapman 5개의 모델 중 잔차의 제곱합(Residual Sum of Squares)이 최소화되는 모델을 선정하였다. 이후 선정된 모델에 맞는 용량-반응 곡선을 그리고, 수식 역산을 통해 EC<sub>10</sub> (10% Effect Concentration), EC<sub>50</sub> (50% Effect Concentration) 값을 각각 산출하였다.

#### 5. 혼합노출 디자인 및 결과 분석

HepG2 세포주 혼합독성 실험을 위한 혼합물은 독성등가 혼합물(equitoxic mixture)로 디자인하였다.<sup>18,19)</sup> HepG2 세포주 독성실험에서 EC<sub>50</sub> 값이 1,000 μM 이하에서 도출된 경우, 2중 조합은 EC<sub>50</sub> 수준으로 혼합하여 EC<sub>100</sub> (100% Effect concentration)부터 노출시킬 수 있도록 제조하였다. 즉 노출군 중 최고 농도군은 (EC<sub>50</sub> of A+EC<sub>50</sub> of B)이 되도록 하였으며, 이후 희석 배수 2로 8개 농도군을 제조하여 노출시켰다. 복합 혼합물은 EC<sub>10</sub> 값이 도출된 모든 물질을 EC<sub>10</sub> 수준으로 혼합하였다. 즉 EC<sub>10</sub> 수준 A~G의 7개 물질의 혼합물의 경우, (EC<sub>10</sub> of A~G)가 최고농도가 되도록 제조하고 이후 2배씩 희석하여 8개 농도군으로 노출시켰다. 이하 혼합독성 실험은 단일물질 독성실험과 동일한 과정으로 진행하였다. 발광박테리아 실험에서는 유의한 독성값이 도출된 물질 수가 4종이었으나, 그중 2종만이 1,000

**Table 2.** Observed EC<sub>x</sub> values of selected nine OPFRs in the luminescent bacteria and HepG2 assays

Assays	Chemicals	EC <sub>50</sub>		EC <sub>10</sub>		Dose-response curve models				
		(μM)	(mg/L)	(μM)	(ug/L)	Model	R <sup>2</sup>	α	β	γ
Aliivibrio fischeri	TEP	>100,000		NA		NA				
	TnBP	284.1	75.65	137.0	36.48	Chapman	0.989	101.2	0.006995	4.784
	TCEP	9,082.4	2,592.9	7,055.7	2,014.3	Chapman	0.980	99.75	0.000591	147.6
	TPhP	>60,000		NA		NA				
	TCPP	5,868.1	1,922.2	4,028.2	1,319.5	Chapman	0.913	100	0.000637	28.83
	EHDPHP	>50,000		NA		NA				
	TBOEP	>500		NA						
	TDCPP	438.85	178.89	370.13	155.87	Chapman	0.639	99.95	0.01747	1,478
	TEHP	>40,000		NA		NA				
HepG2	TEP	>1,000		NA		NA				
	TnBP	270.5	72.05	167.4	44.58	Sigmoid	0.981	98.90	46.72	269.5
	TCEP	>1,000		NA		NA				
	TPhP	288.0	93.98	53.32	17.40	Logistic	0.961	87.47	-1.385	233.9
	TCPP	306.6	100.4	175.8	57.59	Chapman	0.937	100.9	0.001	5.399
	EHDPHP	327.0	118.5	86.71	31.42	Gompertz	0.965	96.56	194.2	245.7
	TBOEP	308.6	123.0	119.9	47.76	Sigmoid	0.995	99.19	85.59	307.2
	TDCPP	617.8	266.2	142.2	61.28	Logistic	0.940	971.3	-1.125	8,240.9
	TEHP	878.4	381.8	265.8	115.5	Gompertz	0.858	493.5	1,150.7	1,831.6

All dataset was applied nonlinear regression method with 3-parameter sigmoidal models (Sigmoid, Logistic, Chapman, Weibull, and Gompertz). The final model equations in Table 2 are below:

Sigmoid:  $f = a / (1 + \exp(-(x-x_0)/b))$ ; Logistic:  $f = \text{if}(x < 0, \text{if}(b < 0, 0, a), \text{if}(b > 0, a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b), a \times \text{abs}((x/x_0)^{\text{abs}(b)}) / (1 + (\text{abs}(x/x_0)^{\text{abs}(b)}))))$ ; Chapman:  $f = a \times (1 - \exp(-b \times x))^c$ ; Gompertz:  $f = a \times \exp(-\exp(-(x-x_0)/b))$ .



μM 이하의 EC<sub>50</sub> 값을 보였다. 2종 조합의 경우 독성도가 혼합물의 제조 시 EC<sub>50</sub> 값의 두배까지 용해시킨 농축액을 제조해야 하는데, 농축액 제조 시 용해도를 초과하는 경우가 많아 발광 박테리아 실험에서는 혼합독성 실험을 진행하지 않았다.

혼합물 노출실험 결과 도출된 EC<sub>50</sub> 및 EC<sub>10</sub> 값은 실측독성값(Observed EC<sub>x</sub>)으로 보고, 상호작용 분류를 위해 예측독성값과 비교하였다. 예측독성값은 물질 간 상호작용이 없음을 가정하고 독성을 합산하는 모델인 농도상가모델(CA Model, Concentration Addition Model)<sup>20</sup>로 아래 식에 따라 EC<sub>50</sub> 및 EC<sub>10</sub> 값을 예측하였다.

$$EC_x (\text{mixture}) = \left( \sum_{i=1}^n \frac{P_i}{EC_{x,i}} \right)^{-1} \quad (\text{Eq. 3})$$

Eq. 3에서 EC<sub>x</sub> (mixture)는 혼합물이 X%의 독성효과를 나타낼 것으로 계산되는 농도, P<sub>i</sub>는 혼합물 내의 성분 i의 구성비(relative fraction), EC<sub>x,i</sub>는 성분 i가 x%의 독성효과를 나타내는 농도이다. 다음으로는 예측독성값과 실측독성값을 다음과 같이 비교하여 MDR (Model deviation ratio)를 계산하였다.<sup>21</sup>

$$\text{MDR} = \frac{\text{Predicted } EC_x \text{ of mixture}}{\text{Observed } EC_x \text{ of mixture}} \quad (\text{Eq. 4})$$

위 식에서 예측독성값에 비해 실측독성값이 더 낮은 경우 MDR은 1 이상으로 도출되며, 상가작용에 비해 더 독성이 높아진 것이므로 상승작용이 나타난 것으로 분류할 수 있다. 다만 실험값의 오차를 고려하여 2배 이상인 경우를 유의한 상승작용이 있는 것으로 판단하였으며, 길항작용도 마찬가지로 2배 이상 독성이 낮아지는 경우로 결정하였다. 즉, MDR≤0.5: 길항작용(Antagonism), 0.5<MDR<2: 상가작용(Additivity), MDR≥2: 상승작용(Synergism) 기준에 따라 상호작용을 분류하여 제시하였다.

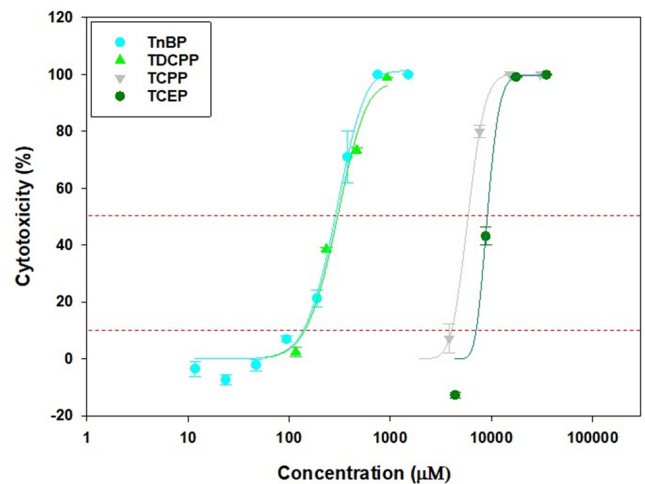
### III. 결과 및 고찰

#### 1. 유기인계 난연제 단일물질 실험결과

발광박테리아 독성실험에서는 시험대상 난연제 9종 중 4종에서 EC<sub>50</sub> 값이 도출되었다(Table 2, Fig. 1). EC<sub>50</sub> 값 기준으로 독성이 가장 높은 물질은 TnBP, TDCPP, TCPP, TCEP 순으로 나타났다(TnBP의 EC<sub>50</sub>: 284.1 μM, 75.65 mg/L). TBOEP는 500 μM 노출 시 50% 이상의 성장저해를 나타내었으나, 바로 다음 낮은 농도에서 유의한 성장저해율이 관찰되지 않고 (250 μM에서 성장저해율 0%) 유의한 결과가 2개 농도군만 남

아, 용량-반응 곡선과 EC<sub>50</sub> 값을 도출하지 않았다. 본 연구에서의 TnBP의 EC<sub>50</sub> 값은 기존에 보고된 상업적 TCPP mixture의 발광박테리아 실험의 EC<sub>50</sub> 값(71.5 mg/L)과 유사했다.<sup>22</sup> 다만 본 연구에서 TCPP의 EC<sub>50</sub> 값은 1,922 mg/L로 기존 연구<sup>22</sup>와 비교해볼 때 상대적으로 독성이 낮게 나타났는데, 해당 연구에서 독성실험에 사용한 TCPP mixture는 상용 mixture (Tris(chloropropyl)phosphate)로, 구성성분에 차이에 의해 결과가 상이할 가능성이 있다. 즉, 본 연구에서 대상물질로 사용한 TCPP는 상용 TCPP mixture의 구성성분 중 하나인 Tris (1-chloro-2-propyl) phosphate로, 구성성분 중 66%가 본 연구의 대상 TCPP이므로(<https://www.sigmaaldrich.com/KR/ko/>

(A)



(B)

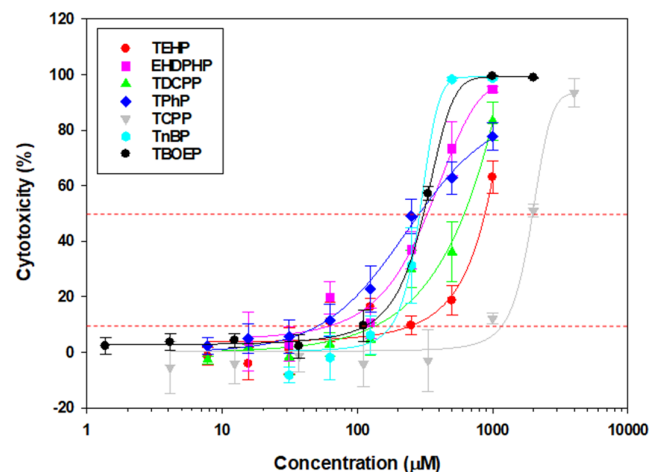


Fig. 1. The dose-response curves of single OPFRs in (A) the luminous bacteria and (B) HepG2 cell lines. Red dotted lines represent 10% and 50% cytotoxic effect levels.

product/sial/32952 [accessed 3 April 2023]), 다른 TCPP 이성체에 의한 독성영향이 크게 작용했을 수 있다.

HepG2 세포주 독성시험에서는 시험대상 난연제 7종 중 5종에서 EC<sub>50</sub> 값이 도출되었으며, EC<sub>50</sub> 값 기준으로 독성이 가장 높은 물질은 TnBP, TPhP, TCPP, TBOEP, EHDPHP, TDCPP, TEHP 순이었다(TnBP의 EC<sub>50</sub>: 270.5 μM, 72.1 mg/L). TCEP와 TEP는 1,000 μM에서도 유의한 세포독성이 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 1). 독성값이 도출된 물질 7종의 EC<sub>50</sub> 값 순위는 분자량 순위와 반대 순서로 나타나, 분자량이 낮을수록 독성이 높은 것으로 나타났다. TCPP를 정상 간세포주(L02 cells)에 노출시킨 실험에서는 24시간 노출 후 세포 증식이 대조군 대비 유의하게 낮아진 농도를 1,000 μM로 보고하였으며<sup>13)</sup> 우리 연구에서는 306.6 μM로 나타나 더 민감한 값이 도출되었다. HepG2 세포독성실험에서 TCEP, TDCPP, TPhP의 EC<sub>50</sub> 수준을 약 600, 50, 80 μM 수준에서 보고한 다른 연구도 있었다.<sup>23)</sup> 같은 HepG2 세포를 이용해 TDCPP 독성을 보고한 다른 연구에서는 72시간 후 100~400 μM 사이의 농도군에서 유의

한 생존율 감소를 보였다.<sup>12)</sup> 본 연구에서 TCEP, TDCPP, TPhP의 EC<sub>50</sub>은 각각 >1,000, 617.8, 288 μM로 나타나 우리 연구에서 사용한 HepG2 세포주의 독성반응이 전반적으로 덜 민감한 것으로 보이나, 경향성은 같았다. 또한 Saquib 등<sup>12)</sup>의 연구는 72시간 노출이고 우리 연구는 48시간 노출임을 고려할 때, 해당 연구와 우리 연구에서의 독성 영향은 다소 비슷하게 나타난 것으로 보인다.

한편 여러 문헌 및 데이터베이스를 활용하여 대체난연제류의 유해성을 분류한 연구에서는 기존 *in vitro* 데이터베이스인 ToxCast를 이용하여 독성의 정도를 분류하여 제시하였는데, 해당 연구에서 가장 독성이 높을 것으로 분류된 물질은 TPhP, EHDPHP, TDCPP였으며, 중간 정도로 분류된 물질은 TBOEP, TCPP, TnBP, TEHP였다.<sup>24)</sup> 독성이 상대적으로 낮을 것으로 분류된 물질은 TCEP, TEP로, 본 연구에서 보고한 HepG2 시험 결과가 기존 연구에서의 시험 결과가 비슷한 경향을 보였음을 알 수 있었다.

**Table 3.** The observed and predicted EC<sub>50</sub> values of tested EC<sub>50</sub>-level binary mixtures, EC<sub>10</sub> value of tested EC<sub>10</sub>-level seven mixture, MDR values, and types of interaction (unit: μM)

EC <sub>50</sub> mixture	EC <sub>50</sub> (observed)	EC <sub>50</sub> (predicted)	MDR	Type
TEHP+TDCPP	424.93	748.08	1.760	Additivity
TEHP+EHDPHP	579.54	602.67	1.040	Additivity
TEHP+TPhP	372.79	583.21	1.564	Additivity
TEHP+TnBP	578.85	574.45	0.992	Additivity
TEHP+TCPP	859.35	592.49	0.689	Additivity
TEHP+TBOEP	573.50	593.46	1.035	Additivity
TDCPP+EHDPHP	569.22	472.37	0.830	Additivity
TDCPP+TPhP	210.69	452.91	2.150	Synergism
TDCPP+TnBP	252.21	444.16	1.972	Additivity
TDCPP+TCPP	476.32	462.19	0.970	Additivity
TDCPP+TBOEP	348.51	463.17	1.329	Additivity
EHDPHP+TPhP	323.04	307.50	0.952	Additivity
EHDPHP+TnBP	184.01	298.75	1.624	Additivity
EHDPHP+TCPP	303.69	316.78	1.043	Additivity
EHDPHP+TBOEP	168.35	317.76	1.887	Additivity
TPhP+TnBP	169.14	279.29	1.651	Additivity
TPhP+TCPP	212.69	297.32	1.398	Additivity
TPhP+TBOEP	110.63	298.29	2.696	Synergism
TnBP+TCPP	557.13	288.57	0.518	Additivity
TnBP+TBOEP	310.11	289.54	0.934	Additivity
TCPP+TBOEP	505.82	307.58	0.608	Additivity
EC <sub>10</sub> mixture	EC <sub>10</sub> (observed)	EC <sub>10</sub> (predicted)	MDR	Type
Seven OPFRs	175.31	144.45	0.824	Additivity

In all binary mixtures, single OPFRs were included as each chemical's EC<sub>50</sub> levels. For example, the TEHP+TDCPP mixture has 878.4 μM of TEHP and 617.8 μM of TDCPP.

## 2. 유기인계 난연제 2종 및 7종 혼합물 실험결과

HepG2 세포주에서의 단일물질 독성시험 결과를 기반으로 혼합물을 제조하여 노출실험을 수행한 후, 각 조합별로 용량-반응 곡선을 도출하였다(Table 3, Fig. 2). 2종 조합 혼합물 노출 결과, 가장  $EC_{50}$  값이 낮게 나타난 조합은 TPhP와 TBOEP 혼합물이었다. 다음으로는 EHDPHP와 TBOEP 혼합물, TPhP와 TnBP 혼합물, EHDPHP와 TnBP 혼합물 등이 그 뒤를 이었다. 이 외에도 주로 TnBP, TPhP가 함유된 혼합물의 독성이 높은 편으로 나타나, 단일물질 상태에서의 높은 독성이 혼합물 독성에도 기여한 것으로 보인다.

2종 조합 및 복합 혼합물(7종 조합) 22종의 혼합물 실험 결과, 20종의 조합이 0.5~2 사이의 MDR 값을 나타내었다(Table 3). 따라서 유기인계 난연제류의 혼합독성 작용방식은 대부분 농도상가 모델(CA Model)을 잘 따르는 것으로 보인다.  $EC_{50}$  값을 기준으로 계산한 MDR 값이 1이면 예측된 혼합물의  $EC_{50}$  값이 실측값과 동일하다는 의미이며, 본 연구에서는 MDR 범위가 0.518~1.972로 도출되었다. 이와 같이 0.5~2 사이의 MDR을 갖는 혼합물의 구성성분들은 서로 같은 독성작용방식(Mode of Action, MoA)을 가지므로, 농도와 독성이 비례하여 혼합 시에도 작용한 것으로 해석할 수 있다.<sup>21)</sup> 다만 본 연구나 기존의 혼합독성 연구에서 주로 사용하는 MDR 0.5~2 기준은 실험값의 편차를 고려하기 위한 범위이므로, 좀더 적극적으로 상호작용을 분류할 필요가 있다면 0.5에 가깝게 나타난 조합인 TnBP와 TCPP (MDR=0.518), TCPP와 TBOEP (MDR=0.608), TEHP와 TCPP (MDR=0.689) 혼합물은 길항작용 가능성이 있는 것으로 분류해볼 수 있다. 또한 MDR 값이 2를 초과하지 않았지만 2에 가깝게 나타난 혼합물은 TDCPP와 TnBP (MDR=1.972), EHDPHP와 TBOEP (MDR=1.887), TEHP와

TDCPP (MDR=1.760)로 상승작용을 일으킬 가능성이 높은 것으로 나타났다.

7종의 유기인계 난연제를 혼합한  $EC_{10}$  혼합물의 MDR 값은 0.824로 나타나, 여러 유기인계 난연제류가 혼합되면서 2종 혼합물에서 나타난 상승작용 효과가 희석되어 상가작용 모델에 더 잘 맞는 결과가 나타난 것으로 해석할 수 있다. 복합 혼합물일수록 다양한 화학물질들로 구성되어 서로 다른 독성 기전이 작용할 가능성이 높아지므로, 기전이 다른 경우에 적용하는 반응상가 모델(Independent Action Model, IA Model)로 혼합독성을 예측하는 것이 적합할 수도 있다.<sup>25)</sup> 그러나 한편으로는 상호작용의 절대 다수를 차지하는 농도상가 모델을 따르는 조합의 경우의 수가 더욱 많아지기 때문에, 반응상가 또는 상승, 길항작용 등의 효과가 오히려 발휘되기 힘들 수 있다. 같은 이유로 기존 문헌에서도 복합 혼합물과 같은 의미인 Multicomponent mixtures의 경우 농도상가를 가정하는 것이 가장 적합하다고 제안한 바 있다.<sup>21)</sup> 또한 복합 혼합물의 경우 단일물질은 더 낮은 수준으로 존재하여 독성영향이 낮을 수밖에 없는데, *in vitro* 실험결과를 활용하여 농도상가 및 반응상가 모델을 검증한 연구에서 혼합물의 구성성분별 독성영향이 30% 이하인 경우 대부분 두 모델의 예측값과 실측값이 비슷하게 나타났다는 결과를 제시하였다.<sup>26)</sup> 이러한 기존 연구결과들은 모두 복합 혼합물이 상가작용 모델을 따르는 것이 합리적임을 보여주며, 우리 연구에서의 유기인계 난연제 7종 혼합물 실험 결과 나타난 상가반응을 뒷받침해주는 결과이기도 하다. 다만 복합 혼합물(Complex mixture, multicomponent mixture)에 대한 실험 결과나 검증 결과는 아직 부족하기 때문에 실측값과 예측값을 비교하는 검증 차원의 연구들이 더 필요할 것이다.

본 연구의 2종 조합 혼합물 독성실험 결과, 일부 혼합물에서 상승작용이 일어나 예측된 독성보다 실제독성이 더 높게 나타났다. 2개 조합에서 MDR이 2 이상으로 나타났으며, TDCPP와 TPhP 혼합물의 MDR은 2.150, TPhP와 TBOEP 혼합물의 MDR은 2.696으로 도출되었다(Table 3). 혼합물의 용량-반응 곡선은 상승작용을 보인 2개 조합에 대해서만 별도로 제시하였다(Fig. 3). MDR 값이 가장 높게 나타난 TPhP와 TBOEP 혼합물의 경우, 실측된 용량-반응 곡선이 예측된 용량-반응 곡선 대비 앞쪽에 그려져, 전 농도구간에서 독성의 상승효과가 있었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이에 비해 TDCPP와 TPhP의 혼합물은 대부분의 농도구간에서 상승작용을 나타내었으나, 세포독성이 20% 이하인 구간에서는 상승작용 효과가 없는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 기존 연구에서는 낮은 독성을 보이는 농도 수준에서 상승작용이 더 크게 나타났다는 연구 결과도 있어,<sup>20)</sup> 기존 연구와 우리 연구에서의 결과는 혼합물의 상호작용이 노출되는 농도에 따라 서로 상이하게 나타날 수 있음을 보여준다.

이처럼 농도상가 모델을 벗어나 상승작용이 일어난 혼합독

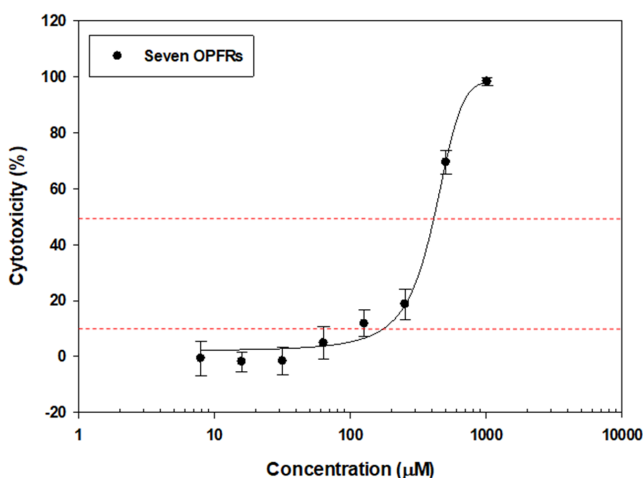
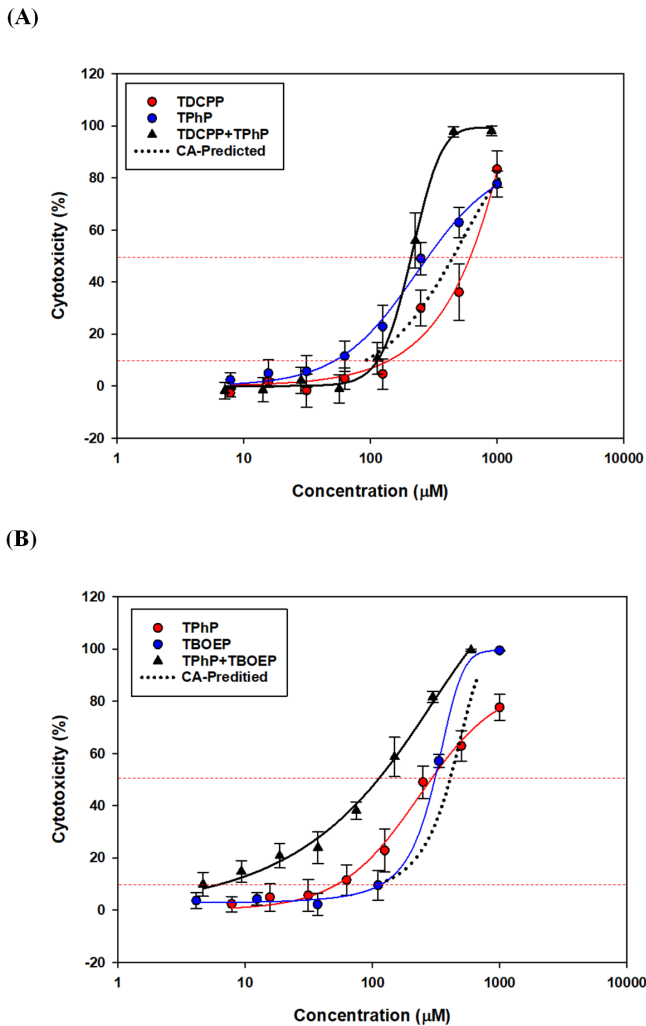


Fig. 2. The dose-response curve of  $EC_{10}$ -level seven OPFRs mixture in HepG2. Red dotted lines represent 10% and 50% cytotoxic effect levels.



**Fig. 3.** The dose-response curves of  $EC_{50}$ -level binary mixtures depict synergistic interaction. (A) TDCPP and TPhP mixture, (B) TPhP and TBOEP mixture. Black dotted lines represent predicted dose-response curves of mixtures in concentration addition (CA) model, and red dotted lines represent 10% and 50% cytotoxic effect levels.

성 결과를 보인 조합은 생물학적 기전에 의해 그 독성이 크게 나타난 것일 수 있으므로, 이를 해석하기 위한 별도의 연구가 필요하다. 현재까지 HepG2 등 세포주를 활용하여 혼합독성값을 제시한 논문은 매우 부족하며, 혼합독성실험 논문에서도 혼합물의  $EC_{50}$  등의 독성값을 정량적으로 제시하는 경우는 많지 않아 비교가 어려운 상황이다. 다만 최근 연구에서 HepG2를 활용하여 비스페놀류, 파라벤류, 방향족탄화수소류, 과불화화합물류 및 유기인계 난연제류에 해당하는 13종의 화학물질들을 2종씩 조합하여 혼합독성을 확인한 결과가 보고되었다.<sup>23)</sup> 해당 문헌에서 78종의 혼합물 중 유의한 상승작용을 보인 조합은 우리 연구에서의 실험결과와 동일한 조합인 TDCPP와 TPhP 혼합물이었으며, 이들 혼합물에 노출된 HepG2 세포의 RNA sequencing 및 대사체 분석 결과 항산화유전자 활성화

및 퓨린 및 피리미딘 대사 억제를 통해 세포독성에서의 상승작용을 보인 것으로 나타났다. 여기서 TDCPP는 비스페놀류, 방향족탄화수소류 등 다른 물질들과 혼합할 경우 오히려 길항작용을 나타내는 경우가 많았음을 볼 때,<sup>23)</sup> 상승작용을 일으키는 주요 원인은 TPhP 물질로 보인다. TBOEP는 해당 연구에서는 대상 물질이 아니어서, TPhP와의 혼합물 실험결과가 없어 비교할 수 없었으나, 우리 연구에서 상승작용을 보인 2종의 조합에 모두 TPhP가 포함되어 있었으므로 기존 연구와 마찬가지로 TPhP가 상승작용을 일으킨 것으로 해석할 수 있다.

본 연구는 실생활에서 자주 노출되는 유기인계 난연제 9종을 대상으로 HepG2에서 혼합물 독성실험을 수행하고, 독성값과 함께 정량적인 상호작용 계산 결과를 제공해 혼합독성 예측모델 개발에 필요한 데이터로서 의미가 있다. 특히, 독성등가 혼합물 실험데이터는 수많은 농도별 조합은 실제 실험에 적용하기 어려운 상황에서 다양한 농도의 조합을 한번의 솔루션 제조로 살펴볼 수 있다는 점에서 장점이 있는 데이터이다. 또한 상승작용을 보인 조합과 복합 혼합물과 같이 변수가 많은 조합의 경우, 독립 3반복 기본실험 외의 추가적인 독립 실험을 더 수행하여 신뢰성 있는 데이터를 생산했다는 것도 본 연구의 강점이다. 세포주 실험은 계대나 시기가 달라질 경우 독성값의 차이가 크게 나타날 수 있는데, 단일물질 실험 대비 혼합물의 실험결과를 정량적으로 비교하기 위해서는 실험결과의 편차를 최대한 줄이기 위해 노력할 필요가 있기 때문이다.

그러나 HepG2 세포주만으로는 간독성 또는 일반독성에 대한 영향만을 해석할 수 있기 때문에, 해당 데이터를 다양한 건강영향에 적용하는데는 어려움이 있을 수 있다. 또한 급변 연구에서는 유기인계 난연제류만을 대상으로 혼합물을 제조하여 다양한 구조나 특성을 반영한 독성자료를 생산하지 못했다. 실제 환경이나 제품에서 사용되는 성분 혼합물의 유해성 평가에 활용하거나, 복합 혼합물의 신뢰성 있는 독성예측모델을 구축하기 위해서는 2종 조합 뿐 아니라 복합 혼합물 수준의 더 다양한 실험데이터를 생산하는 후속 연구가 필요할 것이다.

## IV. 결 론

본 연구에서는 생활 속에서 자주 노출될 가능성이 높은 9종의 유기인계 난연제를 선정하고, 발광박테리아 및 인체간세포주 HepG2를 활용해 독성실험을 수행하였다. 발광박테리아 실험에서는 유의한 독성값이 4종에서만 도출되었으나, HepG2에서는 7종 유기인계 난연제에 대해 용량-반응 곡선 및  $EC_{50}$  값과  $EC_{10}$  값을 도출할 수 있었다. 다음으로는 7종의 유기인계 난연제의 2종 및 7종 조합 혼합물을 제조하여 혼합독성 실험값을 생산하였다. 혼합물 성분 간 상호작용 판단을 위한 MDR 값은 0.518~2.696 범위까지 도출되었으며,  $EC_{50}$  수준 조합에서 농도상가작용은 91% (20개), 상승작용은 9% (2개)로 나타났다.



혼합독성 실험에서 상승작용(synergism)을 보인 조합은 TPhP와 TBOEP 혼합물, TPhP와 TDCPP 혼합물이었으며, 이들의 상승작용 원인 해석을 위해서는 독성기전을 고려한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 생산된 용량-반응 곡선 모델에 대한 정보와 실험결과는 혼합물의 독성 예측 모델 개발용 트레이닝 및 검증 자료로 연구에 활용될 수 있다. 또한 유기인계난연제류 및 생활속 화학물질의 혼합독성에 대한 지식을 제공하여 실생활에서 일어나는 혼합 노출에 대한 위해성평가에 도움이 될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 화학물질·제품 안전설계 기술구축(과제번호 KK2352-10) 및 화학소재 빅데이터 플랫폼 구축(과제번호 KK2351-10) 과제의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 초기 시험법 구축 시 HepG2 세포주 배양에 도움 주신 한국화학연구원 조희영 책임연구원님, 김현영 선임연구원님, 상가작용 모델을 활용한 예측값 도출에 도움 주신 서명원 선임연구원님께 감사드립니다.

## Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## References

1. Ma Y, Stubbings WA, Cline-Cole R, Harrad S. Human exposure to halogenated and organophosphate flame retardants through informal e-waste handling activities - a critical review. *Environ Pollut*. 2021; 268(Pt A): 115727.
2. Li W, Wang Y, Asimakopoulos AG, Covaci A, Gevao B, Johnson-Restrepo B, et al. Organophosphate esters in indoor dust from 12 countries: concentrations, composition profiles, and human exposure. *Environ Int*. 2019; 133(Pt A): 105178.
3. Gwon HR, Oh HJ, Chang KH, Isobe T, Lee SY, Kim JH, et al. Occurrence, distribution, and potential exposure risk of organophosphate flame retardants in house dust in South Korea. *Sci Total Environ*. 2021; 770: 144571.
4. Dyson. Dyson global dust study. Available: <https://dysoncyclone.com/c/oboddo9k> [accessed 8 December 2022].
5. de la Torre A, Navarro I, Sanz P, de Los Angeles Martínez M. Organophosphate compounds, polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in European indoor house dust: use, evidence for replacements and assessment of human exposure. *J Hazard Mater*. 2020; 382: 121009.
6. Rosenmai AK, Winge SB, Möller M, Lundqvist J, Wedebye EB,

- Nikolov NG, et al. Organophosphate ester flame retardants have antiandrogenic potential and affect other endocrine related endpoints in vitro and in silico. *Chemosphere*. 2021; 263: 127703.
7. European Chemicals Agency. Draft screening report: an assessment of whether the use of TCEP, TCPP and TDCP in articles should be restricted. Available: <https://echa.europa.eu/documents/10162/df7715f2-e413-8396-119b-63f929bcde0c> [accessed 28 March 2023].
8. Dishaw LV, Hunter DL, Padnos B, Padilla S, Stapleton HM. Developmental exposure to organophosphate flame retardants elicits overt toxicity and alters behavior in early life stage zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Sci*. 2014; 142(2): 445-454.
9. Oliveri AN, Ortiz E, Levin ED. Developmental exposure to an organophosphate flame retardant alters later behavioral responses to dopamine antagonism in zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol*. 2018; 67: 25-30.
10. Sun L, Xu W, Peng T, Chen H, Ren L, Tan H, et al. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol*. 2016; 55: 16-22.
11. Liu X, Ji K, Choi K. Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish. *Aquat Toxicol*. 2012; 114-115: 173-181.
12. Saquib Q, Al-Salem AM, Siddiqui MA, Ansari SM, Zhang X, Al-Khedhairi AA. Organophosphorus flame retardant TDCPP displays genotoxic and carcinogenic risks in human liver cells. *Cells*. 2022; 11(2): 195.
13. Li F, Wang L, Ji C, Wu H, Zhao J, Tang J. Toxicological effects of tris(2-chloropropyl) phosphate in human hepatic cells. *Chemosphere*. 2017; 187: 88-96.
14. Kim S, Jung J, Lee I, Jung D, Youn H, Choi K. Thyroid disruption by triphenyl phosphate, an organophosphate flame retardant, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae, and in GH3 and FRTL-5 cell lines. *Aquat Toxicol*. 2015; 160: 188-196.
15. Kim MI, Kim SM, Shin JH. Global emerging environmental issues. In: Kho YL, Kim KT, Kim MI, Kim JS, Kim CS, Kim HH, et al. Environmental health practice. Seoul: Shinkwang; 2023.
16. Groten JP, Feron VJ, Sühnel J. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22(6): 316-322.
17. De Zwart D, Posthuma L. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environ Toxicol Chem*. 2005; 24: 2665-2676.
18. George TK, Liber K, Solomon KR, Sibley PK. Assessment of the probabilistic ecological risk assessment-toxic equivalent combination approach for evaluating pesticide mixture toxicity to zooplankton in outdoor microcosms. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003; 45(4): 453-461.
19. Backhaus T, Faust M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environ Sci Technol*. 2012; 46(5): 2564-2573.
20. Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat Toxicol*. 2001; 56(1): 13-32.
21. Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ. How well can we predict the tox-

- icity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr Environ Assess Manag.* 2007; 3(3): 364-372.
22. Antonopoulou M, Vlastos D, Dormousoglou M, Bouras S, Varela-Athanasatou M, Bekakou IE. Genotoxic and toxic effects of the flame retardant tris(chloropropyl) phosphate (TCPP) in human lymphocytes, microalgae and bacteria. *Toxics.* 2022; 10(12): 736.
23. Zhang Y, Liu M, Peng B, Jia S, Koh D, Wang Y, et al. Impact of mixture effects between emerging organic contaminants on cytotoxicity: a systems biological understanding of synergism between tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate and triphenyl phosphate. *Environ Sci Technol.* 2020; 54(17): 10722-10734.
24. Bajard L, Melymuk L, Blaha L. Prioritization of hazards of novel flame retardants using the mechanistic toxicology information from ToxCast and Adverse Outcome Pathways. *Environ Sci Eur.* 2019; 31: 14.
25. Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol.* 1939; 26(3): 585-615.
26. Escher B, Braun G, Zarfl C. Exploring the concepts of concentration addition and independent action using a linear low-effect mixture model. *Environ Toxicol Chem.* 2020; 39(12): 2552-2559.

#### 〈저자정보〉

김선미(선임연구원), 강경희(연구원), 김지윤(연구원),  
나민주(학생연구원), 최지원(연구원)