

산업보건

Ethylene oxide에 폭로에 의해 형성된 헤모글로빈 adduct의 분석에 관한 연구

안혜실*, 신호상, 이진현

충남 공주시 신관동 공주대학교 환경과학과

충남 공주시 신관동 공주대학교 환경교육과

〈초록〉

A gas chromatography/electron impact mass spectrometric assay method was developed for the determination of Hb-adduct, 2-(hydroxyethyl)valine (HEVal), of ethylene oxide(EO). Globin was separated from hemoglobin by acid iso-propanol and ethyl acetate, then HEVal was isolated as PFPITH-HEVal by Edman degradation. PFPITH-HEVal was silylated with N-methyl-N-(tert-butyl-dimethylsilyl)trifluoroacetamide(MTBDMSTFA)-NH₄I (1000:4) under catalysis of dithioerythritol. The detection limit of the assay was 5.8 pmol/g based upon assayed hemoglobin of 0.1g. Two groups of mice were exposed to EO for 0.5 and 1.0 hr/day, respectively at 400ppm during 4 weeks. As the result, the adduct levels increased according to the exposure time with the linearity of 0.7011 and 0.8914, respectively. HEVal was very valuable as biomarker for the exposure of EO. In human, HEVal was analyzed until 8.33 pmol/mg.

1. 서론

Ethylene oxide(EO)의 대부분은 여러 가지 화학물질의 중간생성물이다. 그 대상 화학물질의 예로는 제빙방지, 석유, 병 및 필름의 제조에 사용되는 polyethylene terephthalate polyester, 비이온화 계면활성제, 글리콜에틸류, 에탄올아민류 및 콜린 등이 있다. 또한 미생물에 대한 소독이나 혹은 훈증소독에 이용되며 특히 병원에서 열에 약한 의료기구의 소독을 위한 냉 멸균 방법으로 널리 사용된다. International Agency for Research on Cancer (IARC)에서는 EO를 사람에서 발암이 확인된 물질인 그룹 1로 분류하였다. EO는 guanosine의 N-7 position DNA에 공유 결합됨으로서 N-7-hydroxyethylguanine과 같은 DNA adducts를 형성하여 돌연변이를 일으키며, 혈액 내 단백질인 valine과 결합하여 2-hydroxyethylvaline(HEVal)과 같은 Hb adducts를 형성하

여 DNA 및 Hb의 제 기능을 저하하여 발암을 일으키게 된다.

따라서 본 연구에서는 HEVal의 기존 분석방법인 Edman degradation method에 추가적으로 TMS 유도체방법을 도입하여 GC/MS를 이용하여 GC/MS/MS의 검출한계 수준인 수 pmol/g까지 분석하였다. 실제 시료 적용을 위해 2그룹의 mice에 400ppm의 EO를 각각 0.5hr 및 1hr으로 폭로하여 Hb-adduct의 형성수준을 비교하였으며 실제 일반 사람의 글로빈에 형성된 EO-Hb-adduct도 동일한 분석법으로 분석하였다.

2. 재료 및 방법

시약 및 표준물질은 모두 분석용 grade를 Sigma, Fluka 또는 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다. EO의 헤모글로빈 adduct 및 내부표준물질은 Rydberg(1993)을 참고하여 본 연구실에서 합성하였으며 GC-FID에 의해 99.8% 이상의 순도를 확인한 후 사용하였다.

실험동물은 약 20g의 Female ICR mouse 45마리를 다물 과학에서 공급받아 일주일동안 실험실에서 적응시킨 후 대조군과 실험군(두 그룹)으로 나뉘 4주 동안 실험을 실시하였다. 대조군은 4주 동안 cage에서 물과 사료를 자유롭게 주면서 관리하였다. 두개의 실험군은 매일 같은 시각(오전 10시)에 400ppm-공기와 ethylene oxide의 비-으로 폭로시키되, 폭로시간을 각각 0.5시간, 1시간으로 달리하였다. 폭로 실험은 4주 동안 주 5일간 실시하였다. 사람 시료는 무작위로 선택된 일반 주민의 혈액으로 아래의 방법대로 진행하였다.

실험을 위해 4주 동안 매주 각 실험군에서 5마리씩 무작위로 선택하여 diethylether로 마취시킨 후 해부하여 심장에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 곧바로 4°C에서 1000g로 20분간 원심분리기로 혈장 및 혈구를 분리하여 -80°C에서 실험 전까지 보관하였다.

혈액 내 글로빈 분리는 Mowrer et al., (1986)에서 제시한 방법을 참조하였다. 분리된 글로빈은 감압건조기에서 하루 동안 완전히 건조시켰으며, 분석하기 전까지 -75°C에서 보관하였다.

Edman degradation 방법(Tornqvist et al., 1986)을 참고하여 글로빈에서 HEVal을 추출하였으며, 완전 건조 후, 0.3mg의 dithoerythritol을 함유한 MTBDMSTFA-NH4I (1000:3) 30 μ l로 재 용해시켜 가열에 의해 TMS-유도체 반응을 시켰다. 시간 및 온도에 따른 반응감도를 테스트하여 최적의 조건을 잡았다.

EO에 의해 피폭된 mice의 (헤모)글로빈 adduct의 분석은 Agilent 6890/5973N gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)를 사용하였다. 정량 분석은 특성이온(Characteristic ion)만을 선택하여 분석하는 Selected Ion Monitoring (SIM) 방법을 사용하였다.

HEVal의 검량선은 대조군 글로빈 50mg에 HEVal을 각각 12.42-1242pmol/mg이 되도록 첨가하고, ISTD(HEVal-d4)는 모든 시료에 621pmol/mg이 되도록 첨가한 후, 실제시료와 동일한 분석법으로 분석하였다. 각각의 농도별로 표준물질과 ISTD의 피크면적 비를 구하여 검량선을 작성하였으며, 실제시료에서 검출된 HEVal의 정량은 HEVal과 ISTD(HEVal-d4)와의 피크면적 비를 구하여 검량선에 대입하여 농도를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

HEVal의 검량선의 직선성은 0.999이상으로 매우 좋았으며, 실제 글로빈 시료 50mg에서 검출한계는 0.0058pmol/mg 까지 가능하였다.

분리된 글로빈 시료를 완전건조 한 후 무게를 정확히 달아 추출 및 유도체 등의 일련의 분석방법을 거쳐 헤모글로빈 adduct인 HEVal을 검출하였다. 그 결과, 실제 시료에서 검출된 화합물은 표준물질의 피크와 분해이온 및 머무름 시간이 동일하였다.

4주 동안 400ppm의 농도로 매일(5day/week) 0.5시간, 1시간씩 폭로된 흰쥐의 글로빈에서 검출된 Hb-adducts(HEVal)의 농도는 각각 167.6-512.2pmol/mg, 631.1-2264.5pmol/mg로 증가하였으며, 선형계수 R2는 각각 0.7011, 0.8914로 매우 유의하게 증가하였다.

20명의 사람 혈액에서 분리한 글로빈시료에서 검출된 HEVal은 0.13에서 최고 8.33 pmol/mg 수준으로 검출되었다.

4. 결론

EO는 헤모글로빈의 글로빈단백질의 필수아미노산인 valine과 결합하여 2-(hydroxy-ethyl) valine을 형성하는데, 이는 결합력이 아주 강하여 잘 회복되지 않으며, 혈액의 수명이 끝날 때까지(약 120 days) 혈액 내에 존재하게 되며 그 기능을 저하시킨다. 따라서 혈액 내의 글로빈을 분리하여 HEVal을 분석함으로써 EO의 폭로여부 및 피폭 정도를 예측할 수 있으며, DNA-adducts의 농도와 상호 비교 분석하여 발암의 정도를 예측하고, 또한 이 시기에 폭로를 중단하면 암으로 진행되는 확률을 크게 낮출 수 있다.

연구 결과에서 4주 동안 매일 동일한 시간으로 폭로하였을 때 형성된 HEVal의 농도 변화는 각각의 실험군 (0.5hr, 1hr)에서 매우 유의한 수준으로 증가하였다. 또한 무작위로 추출된 일반 사람의 혈액 분석 결과는 검출되지 않은 시료부터 최고 8.33 pmol/mg 수준까지 검출되었다.

본 연구에서 확립한 분석법은 GC/MS/EI를 이용하여 기존의 고가장비인 GC/MS/MS/NICI를 사용하여 얻을 수 있는 검출한계수준까지 가능하였으며, 이는 EO에 의해 실제 산업장에서 피폭되는 경우뿐만 아니라, 담배 또는 일상생활에서 오염되어 형성된 Hb-adduct까지 분석이 가능하였다.

〈참고문헌〉

- IARC, Ethylene oxide, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 60, 1994, p.73-213
- J. Mowrer, M. Tornqvist, S. Jensen and L. Ehrenberg, Toxicol. Environ. Chem. 11, 1996, 215-231.
- K. Y. Wu, S. Y. Chiang, T. H. Huang, Y. S. Tseng, Y. L. Chen, H. W. Kuo, C. L. Hsieh, Mutation

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 559, 1-2, 2004, p.73-82.

M. Törnqvist, J. Mowrer, S Jensen, L. Ehrengerg, 1986, Anal. Biochem. 154, p.255-266.

National Institute for Occupation Safety and Health, National Occupational Exposure Survey: Sampling Methodology, NIOSH, Cincinnati, 1990, p.98-102.

P. J. Boogaard, P. S. J. Rocchi, N. J. van Sittert, Int Arch Occup Environ Health, 72, 1999, p.142-150.

P. Rydberg, B. Luning, C. A. Wachtmeister and M. Tornqvist, Acta Chemica Scandinavica 47, 1993, p.813-817.