

## 염소산화에 의한 에스트로겐성 화학물질의 활성저감

### Decrease of Activity of Estrogenic Chemicals by Chlorination

이병천<sup>1,\*</sup> · 이상협<sup>1</sup> · 龜井 翼<sup>2</sup> · 眞柄 泰基<sup>2</sup>

Byoung-cheun Lee<sup>1,\*</sup> · Sang-hyup Lee<sup>1</sup> · Tasuku Kamei<sup>2</sup> · Yasumoto Magara<sup>2</sup>

1 한국과학기술연구원 환경공정연구부 수질환경 및 복원연구센터

2 日本 北海道大學大學院 工学研究科 都市環境工学専攻 環境衛生工学講座

(2004년 12월 20일 논문 접수; 2005년 1월 31일 최종 수정논문 채택)

#### Abstract

The effects of chlorination on the elimination of three estrogenic chemicals such as  $17\beta$ -estradiol (E2), nonylphenol (NP) and bis-phenol A (BPA) were investigated using yeast two-hybrid assay (YTA), estrogen receptor competition assay (ER-CA), and high-performance liquid chromatography/mass spectrometer (LC/MS). Results of YTA, ECA and the analysis of LC/MS indicated that the estrogenic activity of above mentioned three endocrine disruptors were significantly reduced as the result of chlorination. The decrease in estrogenic activity paralleled with decrease in estrogenic chemicals under the influence of free chlorine. One common characteristic of estrogenic chemicals is the presence of a phenolic ring. Considering that a phenolic ring is likely to undergo some sort of transformation in aqueous chlorination solution, the above mentioned results may be applied to the rest of the other estrogenic chemicals in natural waters.

**Key words:** Estrogenic chemicals, Yeast two-hybrid assay, LC/MS, Chlorination

**주제어:** 에스트로겐성 화합물, 효모 two-hybrid법, LC/MS, 염소산화

#### 1. 서론

환경 중에 존재하는 수많은 화학물질 중 호르몬계와 생식계에 대한 영향은 수중생물, 동물 심지어 인간에게까지도 미칠 수 있다. 따라서 종종 환경호르몬으로 불리어지는 에스트로겐성 화학물질은 암, 세대유지의 혼란, 등 그 외에도 다양한 영향을 미치는 것

을 고려하면 그 영향은 더욱 커질 것이다(Fry, 1995; Sumpter, 1995; Toppaari, et. al., 1996; Folmar, et. al., 1996). 에스트로겐성 화학물질들은 전형적인 에스트로젠인  $17\beta$ -estradiol(E2)와 어떤 화학적 구조의 유사성을 항상 가지는 것이 아니며 내분비교란물질 중의 다른 그룹이다. 그러나 유사한 반응을 메커니즘을 통하여 agonist 또는 antagonist 반응을 불러일으킬 수 있다(Zachabewski, 1997). 결과적으로 에스트로겐성

\*Corresponding author Tel : +82-2-958-5850, FAX : +82-2-958-5839, E-mail : skychen@hanmail.net (Lee, B.-C.)

화학물질들은 에스트로젠 수용체(Estrogen Receptor, ER)에 대한 결합능력과 에스트로젠 반응을 유발하는냐에 따라 정해 질 수 있다. 비록 phthalate esters, PCBs, 농약, 등 많은 화합물들이 에스트로젠 활성을 포함하고 있는 것으로 나타났으나(Hriss, et. al., 1997), 지금까지 수행된 연구결과에 의하면 하수처리장 유출수, 강물에서 확인되는 주요한 에스트로젠성 물질은 E2, bis-phenol A(BPA), nonylphenol(NP)인 것으로 나타났다. 이러한 강물들의 일부는 수돗물 공급을 위한 수원으로 이용되고 있었다. 비록 염소를 이용한 소독이 급속모래여과 시스템의 주요한 공정중의 하나로서 미생물에 대한 리스크 대책으로 실행되어 온 반면 Trihalomethanes(THMs), Dichloroacetic acid와 같은 발암성 소독 부산물(disinfection by-products, DBPs) 생성을 유도하여 화학적으로 암 리스크를 일으키기도 한다. 그렇지만, 염소 소독에 의한 에스트로젠 활성의 제거효과를 고려한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 이 연구에서는 염소 소독에 따라 에스트로젠 활성을 강하게 유발하는 E2, NP 및 BPA의 에스트로젠 활성이 증가 또는 감소하는지를 Yeast two-hybrid assay(rat의 에스트로젠 수용체와 co-activator로서 TIF2 사용)을 이용하여 수행하였다(Nishikawa, et. al., 1999). YTA를 이용하여 평가된 에스트로젠 화합물이 Human ER와 같은 다른 수용체와 유사한 수용성을 나타내는지 아닌지를 estrogen receptor competition assay(ER-CA)로도 동시에 실행하여 평가하였다. 에스트로젠화합물의 공통적인 특성중의 하나는 페놀 고리를 가지고 있으며, 염소용액에 의하여 페놀 고리가 몇 가지 종류로 전환되기 쉽다는 것이다. 따라서 염소 소독에 의한 BPA, NP, 그리고 E2의 에스트로젠활성의 평가는 환경수에 대하여서도 적용될 수 있을 것으로 평가된다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 화학물질 실험

위에서 언급한바와 같이 본 연구에서 사용된 에스트로젠성 화학물질은 BPA(Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan), NP(Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan), 그리고 E2(Wako Chemicals Industries, Ltd.,

Osaka, Japan)를 선정하였다. 또한 실험에 사용된 화학물질들은 메탄올을 용매로 하여  $10^{-1}$  M(BPA),  $10^{-2}$  M(NP),  $10^{-3}$  M(E2) 표준용액으로 조제하였으며 시료는 4°C에 보관하였다. 표준용액은 염소산화 직전에 증류수로 희석하였다.

### 2.2. 염소산화

차아염소산나트륨(Wako Chemicals Industries, Ltd., Osaka, Japan)이 염소산화제로 사용되었다. 염소산화반응은 빈 공간이 없는 밀폐된 갈색병을 정지시킨 상태에서 실행되었다. 염소주입량 등의 반응조건은 각각 해당되는 그림에 나타났다. 또한 일정한 반응시간이 끝난 후에는 시료를 최대 1000배까지 농축시킨 후 단계 희석하여 분석하였다. YTA(Nishikawa, et. al., 1999)과 ECA(Panvera, 1999) 분석을 위하여 시료에 아스코르빈산(ascorbic acid)을 물질수지의 양보다 과다하게 주입하여 반응을 정지시켰다. 염소농도는 DPD colorimetric법으로 측정되었다(AWWA, 1995).

### 2.3. 시료의 용출

Sep Pak C18카트리지(Waters, USA)를 메탄올로 용리하여 염소산화 전후의 시료에 대하여 흡착하여 용출하였다. 회수된 물질은 YTA, ER-CA, 그리고 LC/MS로 측정하기 위해 메탄올로 용해시켰다.

### 2.4. Yeast two-hybrid assay

실험대상 화학물질들에 대한 에스트로젠 활성은 YTA로 측정되었다. 이 Assay는 두 단백질 즉, 호르몬 수용체(rat의 ER- $\alpha$ )와 co-activator(TIF2) 상호간의 리간드결합에 기초를 두고 있으며 호르몬 활성은 분비되는  $\beta$ -galactosidase의 농도레벨로 측정된다. 환경수에 대한 에스트로젠 활성은 원래의 측정방법으로는 환경수중에 공존하는 화합물질의 방해 작용으로 검출기 곤란하기 때문에 수정된 YTA가 사용되었다(Zachabewski, 1997). 실험방법으로서 효모세포를 30의 SD배지에서 16시간 동안 배양하여 전배양액을 만들었다. 이 전배양액에 SD배지를 첨가하여 30°C에서 4시간 배양한 후 배양액의 흡광도를 595nm에서 측정하여 효모의 균체량을 분석하였다. 그리고 원심분리로 상등액을 버리고난 후의 남은 세포는 1 mg/mL Zymolyase 20T를 주입하여 37°C에서 15분간

배양함으로써 효소로 세포벽을 파괴하였다. 여기에 4 mg/mL o-nitrophenyl-β-D-galactoside(ONPG) 용액을 첨가하여 혼합하여 30°C에서 30분간 정치하여 발색 반응시킨 후 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 96wells의 micro plate로 분취하여 흡광도 420 nm에서 발색량을 측정하고 570nm에서 불순물에 의한 산란 흡수량을 micro plate reader(BIO RAD, Model 550, USA)로 측정하여 아래와 같은 식으로 에스트로겐활성(Estrogenic activity)을 측정한다. 결과는 에스트로겐 비활성 값으로 평가하였으며, 양성대조로는 10<sup>-4</sup> M E2를 사용하여 그 활성값을 100%로 하였을 때 이에 대한 측정시료의 비를 비활성 값으로 하였다. 또한 효모의 증식률(Proliferation rate of yeast, %)은 아래 식으로 계산된다.

$$\text{Estrogenic activity} = \frac{(OD_{420} - 1.75 \times OD_{570})}{OD_{595} \times t \times v} \times 1000$$

t: 반응시간(min), v: 배양액 부피(mL)

$$\text{Proliferation rate of yeast} = \frac{\text{absorbance at 595nm after incubation for 4hr}}{\text{absorbance at 595nm before incubation}} \times 1000$$

### 2.5. Estrogen receptor competition assay

ER-α, β competitor assay kit(Pan Vera Inc., Madison, USA)는 NP, BPA, 및 E2와 같은 에스트로겐활성을 가지는 화합물질과 형광표식 된 에스트로겐 결합물질과의 결합성을 조사하기 위하여 이용되었다. 이 kit는 사람의 에스트로겐 수용체(Estrogen Receptor-α, β)에 대한 에스트로겐 화합물의 친화력을 평가하는데 필요한 시약으로 구성되어 있다. 형광표식 되어 있는 분자량이 큰 물질(ES2) 및 분자량이 작은 시료를 ER(estrogen receptor)와 경쟁적으로 결합(競合反應)시킨다. 형광표식 된 분자량이 큰 물질과 ER이 결합하면 분자량이 큰 복합체를 만들기 때문에 높은 편광도를 나타내고, 반면에 분자량이 작은 시료와 ER이 결합하면 형광표식 된 물질이 단독으로 존재하므로 분자량이 작게 되어 낮은 편광도를 나타낸다. 아래의 모식도에 나타낸 것과 같이 측정시료의 분광도 변화는 ER에 대한 측정시료의 상대적인 친화성에

따라 결정된다. 따라서 편광도가 낮은 값을 나타내면 시료 중에 에스트로겐성 화학물질이 많이 존재한다는 것을 가리키고, 반대로 시료 중에 에스트로겐성물질의 농도가 낮게 존재하면 ER가 형광표식 물질과 결합하여 높은 편광도를 나타내게 된다.

$$\begin{aligned} & \text{Test compounds} + \text{ES2/ER-}\alpha \text{ or } \beta \text{ [high polarization]} \rightarrow \\ & \text{Test compounds/ER-}\alpha \text{ or } \beta + \text{ES [low polarization]} \end{aligned}$$

### 2.6. LC/MS분석

LC/MS 장치는 HP1100MSD(HEWLETT PACKARD, USA)를 이용했다. MS의 이온화법은 Negative-ESI(electro spray ionization mode)법을 사용하여 E2, NP 그리고 BPA의 반응생성물을 확인하고 정량화하였다. 칼럼은 역상으로 5μm ZORBAX Eclipse XDB-C18(HP, USA)(2.1mm × 150mm 칼럼)을 사용하였다. 이동상은 주로 50%(volume)의 0.1mM HCOONa로 시작하여 30분 시점에서 100% 메탄올로 점차적으로 바꾸었다. 칼럼온도는 40°C, 유속은 0.2ml/min, 주입량은 10μl로 하였다. Fraction collector(Advance type SF-3120, Advantec Toyo, Tokyo, Japan)는 염소산화로 생성된 반응생성물의 특성을 파악하기 위하여 이용되었다.

## 3. 결과 및 토론

### 3.1. 염소산화 시간에 따른 에스트로겐활성과 독성의 영향

Fig. 1~Fig. 3에는 BPA, NP, 및 E2의 염소산화 시간에 따른 에스트로겐활성의 감소 효과를 나타냈다. 염소산화 후 시료를 1000배까지 농축시켜 단계회석하여 분석을 수행하였으며 에스트로겐활성의 저감은 반응시간에 크게 의존하는 것으로 나타났다. 10<sup>-6</sup> M, NP, 및 10<sup>-7</sup> M E2의 에스트로겐활성은 유리염소를 10분, 1.5mg/L의 상대적으로 낮은 주입량으로 감소 폭이 적었다. 반대로 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 10<sup>-5</sup> M BPA의 경우에는 10분간 상대적으로 높은 7.5mg/L 농도의 유리염소 주입으로 에스트로겐활성을 충분히 감소시켰다. Fig. 1에는 BPA를 3분 동안 염소산화를 시킨 결과, 에스트로겐 부생성물의 형성을 초래하여 초기의 BPA보다 에스트로겐성 활성이

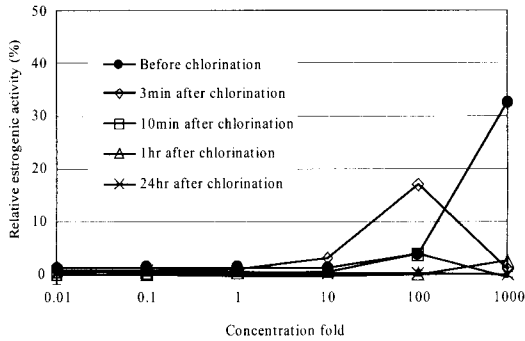


Fig. 1. Effect of chlorination time on the elimination of estrogenic activity induced by of BPA ( $10^{-5}$  M)(chlorine dose: 7.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

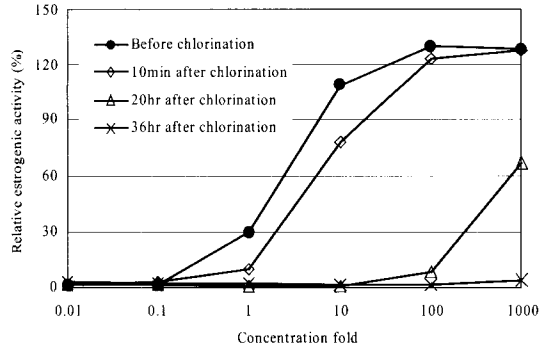


Fig. 3. Effect of chlorination time on the elimination of estrogenic potential induced by of E2( $10^{-7}$  M)(chlorine dose: 1.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

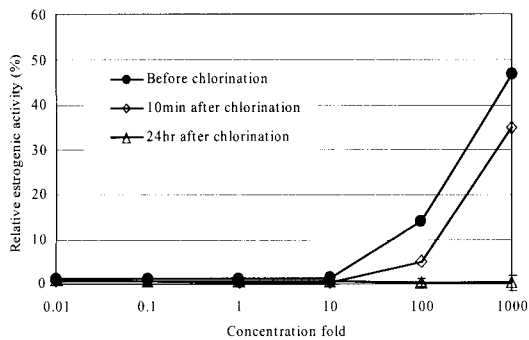


Fig. 2. Effect of chlorination time on the elimination of estrogenic potential induced by of NP( $10^{-6}$  M)(chlorine dose: 1.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

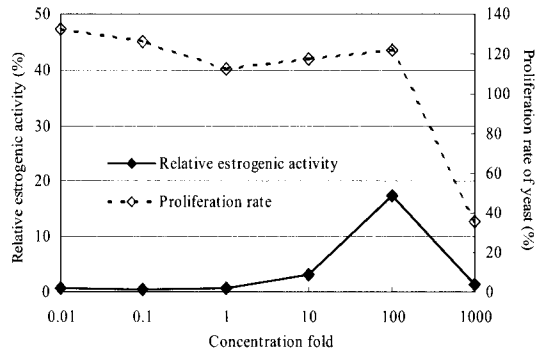


Fig. 4. Relative estrogenic activity and yeast proliferation after 3 min chlorination of BPA ( $10^{-5}$  M). (chlorine dose: 7.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

조금 증가되는 결과를 얻었다. 이때 다시 증가한 에스트로겐활성은 유리염소의 존재 하에서는 불안정하여 추가적으로 염소산화 시킨 결과 에스트로겐활성이 감소하였다. 이러한 결과들로부터 반응부생성물은 불충분한 염소산화(불충분한 반응시간 및 염소주입농도)의 결과로 형성되는 것을 나타내고 있다. Fig. 3에서와 같이 염소산화에 의한 E2의 에스트로겐활성을 어떤 농축배율에서도 완전히 저감시키기 위해서는 1.5mg/L의 초기 염소주입농도에서 36hr 이상 요구되는 것으로 나타났다. 임계 C × T(자유염소농도와 반응시간의 곱)값은 나타나지 않았지만 에스트로겐활성과 독성의 감소는 C × T 값에 비례하는 것이 명백해졌다. Fig. 4에는  $10^{-5}$  M의 BPA를 3분 동안 염소산화 시킨 후 시료를 1000배까지 농축시켜(원수의 부피/흡착 후 용매로 탈착시킨 후의 최종부피) 단계회석

한 에스트로겐 활성이 명백하게 감소하는 것과 동시에 반응부생성물에 의한 독성의 영향으로 효모 증식을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 5에는 증류수에 대한 결과로서 시료에 염소첨가로 인해 야기될 수 있는 오염물에 의해 발생할 수 있는 효모 증식의 저해 또는 에스트로겐활성은 일어나지 않는 것이 명백해졌다.

유기물 또는 화학물질의 염소산화에 의하여 유기화합물을 형성하는 것은 유리염소에 의하여 일어난다는 것은 잘 알려져 있다. 이때 E2, BPA, 및 NP로부터 야기되는 에스트로겐활성을 감소시키는 우세한 효과가 산화반응 또는 치환반응 중에서 한 가지 반응만을 구체적으로 언급하는 것은 불가능하다. 그렇지만 에스트로겐활성을 저감시키기 위하여 오존산화 효과를 고려하는 문헌(Kamata, 2001)에서는 E2, BPA, 및

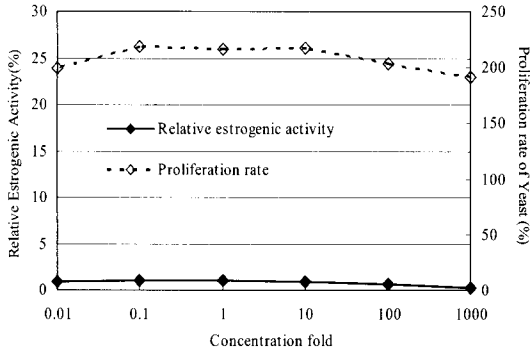


Fig. 5. Relative estrogenic activity and yeast proliferation after 3 min chlorination (7.5mg as Cl/L, for 3min) of purified water used for spiking BPA ( $10^{-5}$  M).

NP로부터 야기되는 에스트로겐활성의 감소는 주로 치환반응보다는 산화반응이 주요 역할을 한다고 제안하였다.

대부분 에스트로겐 화학물질들은 화학 구조적으로 페놀 고리를 포함하고 있으며 그 페놀 고리는 염소산화된 수용액에서 어느 정도 산화를 하기 쉬우며 수환경 중의 대부분의 에스트로겐화학물질들은 정수처리장에서 사용되는 염소 주입농도(약 1-7mg/L)에 의해 파괴될 것으로 나타났다(BC Lee, 2004).

### 3. 2. ER-CA

염소산화에 의한 BPA, NP, 및 E2의 에스트로겐활성이 감소되는지 확인하기 위하여 인간의 ER- $\alpha$ , - $\beta$ 를 이용하는 ER-CA법으로 염소산화 전후의 시료에 대하여 비교하였다. rat ER- $\alpha$ 에 의한 ER-CA는 이 연구과정상 유효하지 않기 때문에 인간의 ER- $\alpha$ 를 사용하여 친화성을 평가하는데 이용되었다. 그러므로 향후 연구로는 에스트로겐 화학물질과 인간 ER- $\beta$  또는 rat의 ER- $\alpha$  사이에서 친화성면에서의 차이를 밝힐 필요가 있는 것으로 판단된다. 예비실험을 통하여 인간의 ER- $\beta$ 를 사용하여 얻어진 endpoint는 ER- $\alpha$ 에 의한 결과와 거의 유사하였으므로 ER- $\beta$ 의 사용으로 얻어진 결과만으로 이 논문에 나타냈다.

Fig. 6~Fig. 8에 나타난 바와 같이 BPA, NP, 및 E2의 염소산화의 결과 에스트로겐 활성이 감소하는 것과 같이 ER에 대한 친화성도 24hr의 염소산화의 효과로 크게 감소되었다. Fig. 6의 BPA를 10분간 염

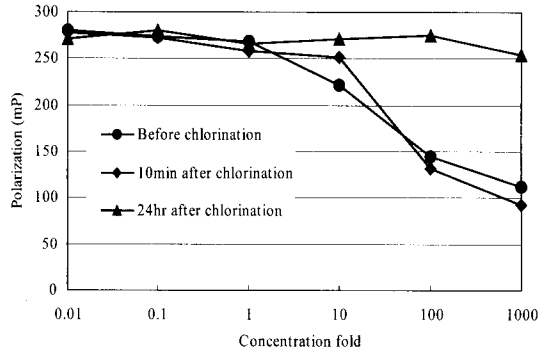


Fig. 6. Effect of chlorination time on the affinity of BPA to ER- (chlorine dose: 7.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

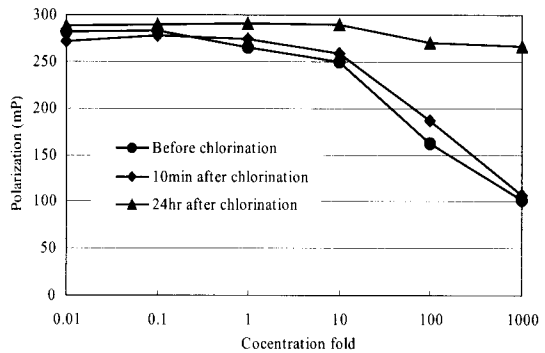


Fig. 7. Effect of chlorination time on the affinity of NP to ER- (chlorine dose: 1.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

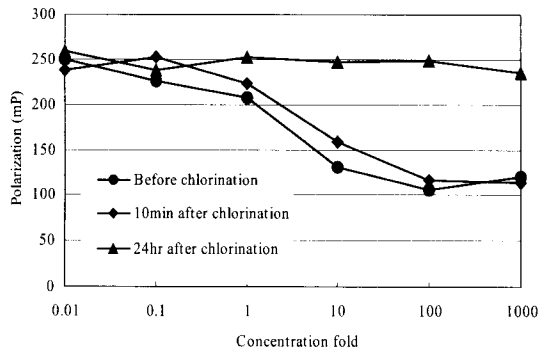


Fig. 8. Effect of chlorination time on the affinity of E2 to ER- (chlorine dose: 1.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C).

소산화 시킨 후 농축배수가 100배, 1000배에서의 편광도가 약간 증가한 것은 ER와 염소산화 부생성물 사이의 경합 친화성이 약간 증가하는 것을 가리킨다. 그러나 Fig. 1에 나타난 것과 같이 염소산화 10분 후

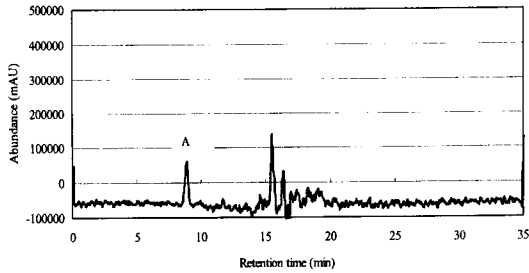


Fig. 9. TIC chromatogram for BPA ( $10^{-5}$  M) before chlorination (Peak A indicates the presence of BPA).

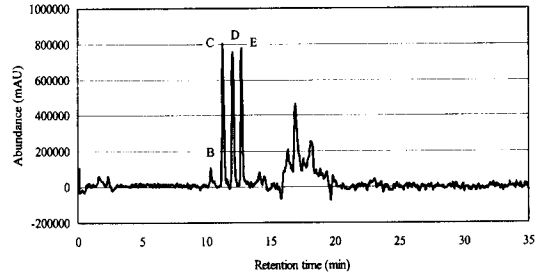


Fig. 10. TIC chromatogram for BPA ( $10^{-5}$  M) after chlorination (Peaks B, C, D, E indicate the formation of chlorination by-products from BPA). (chlorine dose: 7.5mg/L, pH: 7.0, temperature : 20°C).

에 증가한 에스트로겐활성 값은 주목할만한 값은 아니었다.

### 3.3. 염소산화물

Fig. 9와 Fig. 10에는 BPA의 염소산화 전후의 LC/MS 크로마토그램을 각각 나타내었다. 그리고 Table 1~3에는 염소산화에 따라 형성된 BPA, NP, 및 E2의 산화반응생성물과 LC/MS에 의하여 분리하여, 각 화합물의 quasi-molecular ions( $M-H$ )<sup>-</sup> ( $m/z$ )와 함께 각각의 주요 피크를 체류시간에 따라 나타내었다. 즉, Fig. 9의 BPA피크 A가 염소산화로 Fig. 10의 B, C, D, E와 같은 BPA 염소산화 부생성물 피크를

형성하는 것을 볼 수 있다. 이러한 데이터로부터 유리염소의 영향으로 에스트로겐 화학물질이 감소함에 따라 에스트로겐활성도 같이 감소하고 있음을 입증하고 있다. NP와 BPA의 경우에는 trichloro-phenol ( $m/z$  197)과 같은 일부의 반응부생성물이 24시간 반응 후에도 나타나고 있다. 그렇지만 이러한 BPA, NP, 및 E2의 24시간 반응 후의 염소산화 부생성물의 에스트로겐 반응성은 나타나지 않았다.

Table 3에 나타낸 바와 같이 반응시간 10분으로 E2를 분해하는데 불충분한 것으로 나타났다. 즉, ESI

Table 1. Retention time and molecular ions of reaction products formed as the results of chlorination of BPA ( $10^{-5}$  M) (chlorine dose: 7.5 mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C)

Sample	Concentration fold <sup>a</sup>	Retention time(min)	$m/z$	Abundance	Assignment
Before chlorination	1	8.87	227	92000	BPA
3min after chlorination	1	10.33	261	65000	Cl <sub>1</sub> <sup>b</sup>
		11.29	295	380000	Cl <sub>2</sub> <sup>b</sup>
		12.06	329	290000	Cl <sub>3</sub> <sup>b</sup>
		12.74	365	280000	Cl <sub>4</sub> <sup>b</sup>
10min after chlorination	1	12.86	331	21000	
		13.71	365	400000	Cl <sub>4</sub> <sup>b</sup>
		16.12	525	58000	
		16.12	253	60000	
		16.12	262	22000	
1 hr after chlorination	1	12.73	365	265000	Cl <sub>4</sub> <sup>b</sup>
		14.66	525	135000	
24 hr after chlorination	10	11.25	195	75000	
			197	66000	2,4,6-TCP
		17.72	336	68000	

<sup>a</sup> Volume of raw water/volume after adsorption and desorption with solvent.

<sup>b</sup> The numerical suffix in Cl<sub>1</sub> - Cl<sub>4</sub> indicates the number of chlorine atoms present in chlorinated BPA.

**Table 2.** Retention time and molecular ions of reaction products formed as the results of chlorination of NP ( $10^{-6}$  M) (chlorine dose: 1.5mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C)

Sample	Concentration fold <sup>a</sup>	Retention time (min)	m/z	Abundance	Assignment
Before chlorination	1	20.86	219	220000	NP
10min after chlorination	10	20.86	219	135000	NP
		21.72	253	86000	Cl <sub>1</sub> <sup>b</sup>
		22.62	287	120000	Cl <sub>2</sub> <sup>b</sup>
24 hr after chlorination	10	7.38	237	24000	2,4,6-TCP
		9.09	197	45000	
			195	20000	
		9.36	225	29000	

<sup>a</sup> Volume of raw water/ volume after adsorption and desorption with solvent.

<sup>b</sup> The numerical suffix in Cl<sub>1</sub> - Cl<sub>4</sub> indicates the number of chlorine atoms present in chlorinated NP.

**Table 3.** Retention time and molecular ions of reaction products formed as the results of chlorination of E2 ( $10^{-7}$  M) (chlorine dose: 1.5 mg/L, pH: 7.0, temperature: 20°C)

Sample	Concentration fold <sup>a</sup>	Retention time (min)	m/z	Abundance	Assignment
Before chlorination	1	10.06	271	82000	E2
10min after chlorination	100	10.10	271	18000	E2
		10.58	355	65000	
		12.71	305	85000	
		13.10	369	60000	
20hr after chlorination	100	9.93	355	200000	
			401	100000	
		11.60	389	28000	
36hr after chlorination	100	10.44	355	225000	
			401	105000	

<sup>a</sup> Volume of raw water/ volume after adsorption and desorption with solvent.

로 측정된 E2의 quasi-molecular ion (M-H)<sup>-</sup> m/z 271은 10분 후에도 완전히 분해 되지 않고 검출되어 에스트로겐활성을 유발시키는 결과를 초래하고 있다. Table 3에서 가리키는 바와 같이 반응시간 20hr과 36hr 이후에서 나타나는 m/z 355와 401 이온은 E2의 염소산화반응의 부생성물이다.

#### 4. 결 론

1. E2, NP, 및 BPA의 염소 산화반응에 관한 이 연구로부터 염소는 에스트로겐활성 저감하는데 효과적이라는 결론을 얻었다.

2. 염소산화에 의한 자유염소의 영향으로 에스트로겐성 물질의 감소 또는 다른 물질로의 전환으로 에스

트로겐활성이 감소하였다.

3. 이 연구 결과로부터 폐놀 고리를 가지는 E2, NP, BPA 이외의 다른 에스트로겐 화학물에도 염소산화가 적용될 수 있을 것이다.

4. 이러한 발견으로부터 염소산화가 부생성물을 생성한다는 문제점이 있는데 반하여 에스트로겐 활성의 감소와 살균효과 같은 이점을 가지는 것으로 나타났다.

#### 참고문헌

Fry D.M. (1995) Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals, *Environ Health Perspect*, **31**, pp. 165-71.

- Sumpter J.P. (1995) Feminized responses in fish to environmental estrogens, *Toxicol Letter*, **82-83**, pp.737-42.
- Toppiari J., et al. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens, *Environ Health Perspect*, **104**, pp. 741-803.
- Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette L.J. Jr. (1996) Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant, *Environ Health Perspect*, **104**, pp. 1096-101.
- Zachabewski T. (1997) In vitro bioassays for assessing estrogenic substances, *Environ Sci Technol*, **31**, pp. 613-623.
- Hriss A.C., Henttu P., Parker G.M., Sumpter P.J. (1997) The estrogenic activity of phthalate esters in vivo. *Environ Health Perspect*, **105**, pp.802-811.
- Gillesby E.B., Zacharewski R.T. (1998) Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment, *Environ Toxicol Chem*, **17**, pp. 3-14.
- Committee for the problem of endocrine disrupting chemicals. (1999) *Proceedings of the first seminar for endocrine disrupting chemicals*. Oct. 29, Tokyo, (in Japanese).
- B.C. Lee (2004) The evaluation of estrogenic activity of Nakdong River basin and its control by water treatment processes, *Doctoral dissertation*, Hokkaido University, Japan.
- Kamata M. (2001) Evaluation of estrogenic activity of natural water by Yeast two-hybrid system, *Doctoral dissertation*, Hokkaido University, Japan, 2001 (in Japanese).
- Nishikawa J., Saito K., Goto J., Dakeyama F, Matsuo M, Nishihara T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **154**, pp.76-83.
- Panvera. (1999) Protocol for estrogen receptor  $\alpha$ - $\beta$  competitor assay, available on <http://www.panvera.com>.
- AWWA; APHA & WEF. (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, *19th ed. Washington, DC: American Public Health Association*.