

에틸렌옥사이드에 폭로된 흰쥐의 혈액에 형성된 헤모글로빈 부가체에 대한 연구

이진현[†] · 신호상 · 안혜실
공주대학교 사범대학 환경교육과

A Study on Formation of Hemoglobin Adduct in Blood of Mice Inhaled with Ethylene Oxide

Jin-Heon Lee[†] · Ho-Sang Shin · Hye-Sil Ahn

Department of Environmental Education, Kongju National University
(Received March 14, 2006/Accepted March 31, 2006)

ABSTRACT

Ethylene oxide is a genotoxic carcinogen with widespread uses as industrial chemical intermediate and gaseous sterilant. 2-hydroxyethylated N-terminal valine in Hb is a good biomarker for biological monitoring of ethylene oxide exposure, because of its stability. For measuring the hemoglobin adduct formed by exposure of ethylene oxide, we studied the determination of (N-2-hydroxy-ethyl)valine(HEV) in hemoglobin adduct by using GC/MS. Firstly we synthesized HEV with 2-amino-ethanol and bromoisovaleric acid(BIVA) and confirmed it with GC/MS-FID. Its fragmentations were m/z 116(base ion, M+ -45) and m/z 130(M+ -31). For measuring HEV with higher sensitivity, we use derivatives which were PFPITH(pentafluorophenylisothiocyanate) and TBDMS(tributyltrimethylsilylation) by using Edman procedure. Its fragmentation were m/z 425(M+ -57), m/z 383(M+ -99) and m/z 172(M+ -310) by using GC/MS. We did biological monitoring for mice inhalation exposure with 400 ppm ethylene oxide. The concentrations of hemoglobin adduct were 168 ± 3.8 and 512 ± 04 (nmol g-1 globin) at 0.5 hr/day 400 ppm ethylene oxide inhalation exposure group, and 631 ± 17 and 2265 ± 9.4 (nmol g-1 globin) at 1.0 hr/day 400 ppm ethylene oxide inhalation exposure for 1 and 4 weeks, respectively. We confirmed that (N-2-hydroxy-ethyl)valine(HEV) of hemoglobin was a good biomarker for biomonitoring of ethylene oxide exposure, and can measured with derivatives such as PFPITH(pentafluorophenylisothiocyanate) and TBDMS(tributyltrimethylsilylation) by using GC/MS.

Keywords: ethylene oxide, (N-2-hydroxy-ethyl)valine(HEV), hemoglobin adduct, GC/MS

I. 서 론

에틸렌옥사이드(ethylene oxide)를 상업적으로 사용하기 시작한 것은 1920년대부터이다. 에틸렌옥사이드가 반응성이 매우 강하기 때문에, 오늘날 강력한 살충제와 살균제로 가장 많이 사용하고 있으며, 에틸렌 글리콜과 같은 각종 유기화학물질들을 합성하는데 중간체와 원료로서 다양하게 사용하고 있다. 특히 화장품, 계면활성제, 글리콜에테르, 연료첨가제, 브레이크 유환유의 원료로 사용될 뿐만 아니라 폴리에스테르 수지, 각종 유화

제, 플라스틱류, 광택제 등의 원료로 사용하고 있다. 또한 에틸렌옥사이드는 살균력이 있기 때문에 병원에서 의료기구의 소독시에 사용되고 있다(Landrigen, 1992). 특히 우리나라에서는 열에 약한 고무장갑, 정교한 수술기구, 주사기, 전기기구, 내시경, 신생아 침대, 마취기구 등에 많이 사용되고 있다(김과 박, 1980; 김 등, 1993). 에틸렌옥사이드의 생산량이 미국에서 매년 약 60-70억 파운드인 것으로 보고되고 있으며(Sullivan & Krieger, 1992), 우리나라에서 에틸렌옥사이드의 사용량이 연간 약 30만 2천톤으로 추정하고 있다(조, 1996).

에틸렌옥사이드는 혈액세포에 영향을 주어 백혈병의 원인이 되고 있고, 간장, 신장, 폐, CNS에 각종 암을 발생시키는 중요한 발암물질로 밝혀졌다. 따라서 많은 국가에서는 에틸렌옥사이드의 암 발생을 예방하기 위하

[†]Corresponding author : Department of Environmental Education, Kongju National University
Tel: 82-41-850-8814, Fax: 82-41-850-8810
E-mail : ejhl@kongju.ac.kr

여 생체지표(biomarker)를 개발과 이를 통한 생체모니터링프로그램을 개발하는 연구에 많은 노력을 기울이고 있다. 미국 산업위생전문가협회(ACGIH)에서는 에틸렌옥사이드를 A2 발암물질로 분류하여 관리하고 있고(ACGIH, 2002), 미국 환경청(US EPA, 1985)와 국제암연구기관(IARC)에서는 인체발암 가능물질(probable human carcinogen)로 구분하여 관리하고 있다.

우리나라에서도 울산, 여천, 대산 등의 석유화학공단에서 부타디엔을 비롯한 각종 유기화학물질을 수십만톤 생산하여 각종 합성고무와 합성수지를 생산하는 원료로 사용하고 있다. 그리고 석유화학공단지역의 대기 중에서 부타디엔과 에틸렌옥사이드 등이 검출되고 있다(남 등, 1999; 최 등, 1998; 남 등, 1998). 그러나 우리나라에서는 때때로 이들 물질의 폭로농도에 대하여 보고하고 있을 뿐, 이들 알케계 발암물질에 의한 암 예방을 위한 연구에는 아직까지 거의 없는 상태이기 때문에, 근로자들과 주민들이 이들 물질에 거의 무방비 상태로 노출되고 있는 실정이라서 이에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

선진국에서는 알케계 발암물질의 생체노출에 의하여 형성되는 부가체(adducts)를 특이적인 생체지표로 활용하여 암 발생을 예방하기 위한 연구에 많은 노력을 기울이고 있다. 그러나 우리나라에서는 공단지역의 대기 중에 존재하는 일부 알케계 발암물질의 농도를 측정하여 보고하는 연구에 한정되어 있고(남 등, 1999; 최 등, 1998; 남 등, 1998), 알케계 발암물질의 생체노출에 의한 암 예방대책을 위한 연구는 전혀 수행되지 않고 있는 실정이다. 따라서 우리나라에서도 석유화학공단에서 근로자들과 지역 주민이 높은 농도로 폭로되고 있는 알케계 발암물질의 암 발생을 예방하기 위하여, 이들 물질의 생체지표로 활용할 수 있는 부가체(adducts)의 연구에 많은 지원이 요구된다고 생각한다.

발암물질이 인체에 폭로된 후에 형성되는 헤모글로빈 부가체와 DNA 부가체와 같은 생체지표(biomarkers)를 측정하는 방법들 중에서 효소를 이용한 생화학적 ^{32}P -postlabeling 방법은 분자적 차원의 부가체 연구에 획기적인 전환점을 가져왔다. 그 동안의 연구는 주로 방사능 물질을 부착한 발암물질을 실험동물에 투여한 후에 표적장기에 형성된 부가체를 측정하였기 때문에 사람을 대상을 직접 모니터링할 수 없었고 다만 보조적인 수단으로 사용되었다. 그러나 채취한 시료의 헤모글로빈과 DNA에 방사능 물질을 부착시키는 postlabeling 방법이 개발됨에 따라 사람의 장기시료를 채취하여 그 속에 형성된 DNA adducts를 모니터링할 수 있게 되었다(Gupta *et al.*, 1982; Guta, 1985; Reddy & Randerath,

1986; Lee & Sjin, 2004; 이 등 2000; 2002, 2003).

그러나 발암물질에 의하여 생체에 형성되는 헤모글로빈 부가체와 DNA adducts를 정확하게 측정하기 위해서는 방사능물질(γ - ^{32}P [ATP])을 사용해야 한다는 한계점이 여전히 상존하고 있다. 더욱이 우리나라는 방사능 물질을 외국에서 수입하여 공급하고 있고, 방사능 물질을 취급하기 위해서는 관련법규에 의하여 복잡한 장비와 시설을 갖춰서 유지해야 되는 한계점이 DNA adduct 측정실험을 어렵게 만들고 있다. 따라서 발암물질의 생체지표로 사용하는 DNA adducts를 방사능물질을 사용하지 않고 높은 감도로 측정할 수 있는 효과적인 측정방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

특히 혈액 중에 있는 적혈구 세포의 생존기간은 약 120일 정도(사람)이기 때문에 이 기간 동안에 노출된 것을 파악하는데 매우 유용하다(Nico *et al.*, 1993). 따라서 본 연구에서는 알케계 발암물질인 에틸렌옥사이드가 생체에 폭로되었을 경우에 형성되는 헤모글로빈 부가체에서 생체지표(biomarker)로 활용할 수 있는 물질을 확인하여 GC/MS로 측정하고, 실험동물에 에틸렌옥사이드를 노출시킨 이후에 대상 생체지표를 측정하여, 확인된 물질이 에틸렌옥사이드의 노출에 대한 생체지표로 활용할 수 있는지 여부를 확인하는 것을 연구 목적으로 설정하였다.

II. 연구방법

1. 실험재료

Ethylene oxide (EO), bromoisovaleric acid (BIVA), formamide, trimethylsilyl imidazole (TMS-I), ammonium iodide (NH₄I), N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) and N-methyl-N-(tributylidimethylsilyl) trifluoroacetamide(MTBDMSTFA)은 Aldrich 제품(St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, 2-Aminoethanol (AE)은 Across-Organic 제품(Geel, Belgium)을 사용하였다. Pentafluorophenylisothiocyanate(PFPITC)은 Fluka 제품(Buchs, Switzerland)을 사용하였으며, 2-aminoethanol-d₄ (AE-d₄)은 CDN(Quebec, Canada)으로부터 구입하였다.

Analytical grade of sodium carbonate, sodium hydroxide, sodium sulfate, aqueous ammonia, hydrochloric acid은 모두 Aldrich사의 잔류농약 분석용급으로 사용하였으며, diethylether, toluene, acetone, ethyl acetate and isopropanol Merck사의 용매를 사용하였다. 그 외에 사용된 각종 화학약품들은 시그마와 머크 제품의 순도와 비슷한 수준으로 사용하였다.

Table 1. Experimental design with female mice for inhalation exposure

Group	Exposure of ethylene oxide		Number of mouse	Sampling of blood			
	level	time		1st week	2nd week	3rd week	4th week
Control	0.0 ppm	0	15	3	3	3	3
Experiment 1	400 ppm	0.5 hr/day	25	5	5	5	5
Experiment 2	400 ppm	1.0 hr/day	25	5	5	5	5
Total			65	13	13	13	13

2. 동물실험 방법 및 설계

실험에 사용한 동물은 ICR계 암컷 마우스이었다. 체중이 약 20 g인 마우스를 대한바이오링크(Chongju, South Korea)에서 70마리를 공급받아 실험실에서 약 1주일 동안 적응시키었다. 실험기간동안에 실험실의 환경조건은 실내온도 20°C, 상대습도가 30~70%, 조도시간이 오전 06:00에서 오후 18:00이었으며, 에틸렌옥시드가 호흡기로 폭로되는 동안에는 급식을 시키었고, 그 이외의 시간에는 물과 음식을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험을 위하여 실험설계는 Table 1과 같이 하였다. 3개의 그룹, 대조군, 400 ppm(0.5 hr 노출) 및 400 ppm(1 hr 노출) 폭로군으로 나누었는데, 대조군에 15마리, 실험군에 각각 25마리의 마우스를 무작위로 추출하여 배치하였고, 1주일에 2회씩 체중을 측정하였다. 실험동물에게 에틸렌옥시드를 호흡기로 폭로시켰는데, 1주일에 5일씩 4주 동안 폭로시켰다.

에틸렌옥시드를 호흡기로 폭로시키기 위하여 액화된 부타디엔과 공기(99.999%)를 혼합할 수 있는 회색장치를 사용하였다. 액화된 에틸렌옥시드의 용기에서 흘러 나오는 에틸렌옥시드의 용량을 압력조절기로 유량을 조절하고, 공기탱크도 압력조절기로 유량을 조절하여 400 ppm의 에틸렌옥시드 기체를 만든 후에 챔버에서 실험동물에게 노출시키었다. 에틸렌옥시드와 공기의 유량은 폭로시마다 bubble meter로 측정하여 유량조절계의 유량을 점검하였다. 노출 챔버에 공기를 5±2 l/min 정도 유지하여 챔버의 공기가 시간당 5~7회 정도 교환 되도록 하였다.

혈액은 폭로시킨 후 1주일 이 지날 때마다 채취하여 총 4회 채취하였는데, 혈액채취는 헤파린으로 처리한 주사기를 사용하여 마취시킨 마우스의 심장에서 채취하였다. 각 실험군마다 5마리에서 혈액을 채취하였는데, 채취된 혈액은 곧바로 원심분리에 의하여 적혈구를 분리한 후 -75°C에서 분석하기 전까지 보관하였다.

3. GC/MS의 분석조건

물질의 측정을 위하여 사용한 분석기기는 6890/5973

Table 2. GC-MS conditions for the analysis of adduct formed by ethylene oxide exposure

Parameter	Conditions
Column	HP-5MS(Cross-linked 5%phenylmethylsilicon, 30 m×0.25 mmI.D.×0.25 µm F.T)
Carrier	He at 1.0 ml/min
Oven temp.	10°C/min 100°C(1 min)→280°C post run 300°C(3 min)
Injector type	pulse splitless mode
Injector temp.	280°C
Transfer line	280°C

GC/MS(Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA)이었고, 검출기는 Agilent 6890 Gas Chromatography (GC)에 direct interface로 연결된 5973 MSD를 사용하였다. 모든 시료는 HP 7673A auto-sampler를 사용하여 GC에 주입하였으며 data system으로는 HP GG1701AA MSD Chemstation을 이용하였다.

이온화에 사용한 전자에너지는 70 eV이었고, electron multiplier는 auto tune 값보다 200 V 더 증가시켜 사용하였다. dwell time은 100 sec로 조절하였고, 전처리된 시료들을 분석하기 위하여 질량 스펙트럼상의 특성이온(characteristic ion)만을 선택하여 분석하는 selected ion-monitoring(SIM) 방법을 이용하였다. 자세한 GC/MS의 분석 조건들은 Table 2와 같다.

4. GC/MS에 의한 헤모글로빈 부가체의 정량적 측정

혈액 내 글로빈 분리는 Mowrer *et al.*(1986)을 참조하였다. 실험동물에서 분리한 혈구세포에 동일한 부피의 0.9% NaCl 용액을 첨가하여 혼합한 후 재 부상시키는 세척을 3회 반복하였다. 세척된 혈구에 증류수 및 냉동실에 보관한 0.5% HCl을 함유하고 있는 isopropanol을 첨가하여 섞어준 후 (혈구:증류수:isopropanol, 1:1.5:11) 4°C에서 3000 g로 30분간 원심 분리 하였다. 상청액을 새 시험관에 옮기고 냉동실에 보관된 ethyl acetate(EA)를 천천히 가하면서 글로빈을 침전시켰다. 글로빈을 EA로 두 번, n-pentane으로 한번

씻어준 후 감압건조기에서 하루 동안 완전히 건조시켰다. -75°C 에서 분석하기 전까지 보관하였다.

글로빈에서 HEVal의 분리는 Edman degradation 방법(Törnqvist *et al.*, 1986)을 참고하였다. 건조된 글로빈 50 mg에 내부표준물질 HEVal-d4를 첨가하여 골고루 섞어준 후, formamide 2 ml를 넣어 글로빈을 녹이고 1M NaOH 40 μl 를 넣어 pH를 7정도로 조절하였다. 단백질 사슬의 말단에 있는 HEVal을 분리하기 위해 PFPITC를 10 μl 첨가하고 마개를 잘 닫은 후 실온에서 하룻밤 동안 섞어주었다. 다음 날 45°C 의 가열기에 넣고 90분간 반응시킨 후 ethylether(EE) 4 ml로 추출하는 것을 두 번 반복하고 EE층을 모아서 질소가스로 건조시켰다. 잔유물은 toluene 3 ml로 녹이고, 증류수, 0.1M potassium carbonate, 다시 증류수의 순서로 각각 한번씩 정제하였다. 최종 toluene 층을 질소가스로 건조시킨 후 유도체화전까지 P_2O_5 -KOH가 들어있는 데시케이터에 최소한 30분간 넣어 두어 수분을 완전히 건조시켰다. 전처리한 시료에 0.3 mg의 dithioerythritol을 함유한 MTBDMSTFA-NH₄I(1000:3) 50 μl 로 재 용해시켜 80°C 에서 60분간 반응시킨 후 GC/MS-SIM으로 분석하였다.

III. 헤모글로빈 부가체를 형성하고 있는 에틸렌옥사이드의 대사물질(표준물질) 합성방법

1. N-(hydroxyethyl)valine(HEV)의 합성과정

BIVA(540 mg, 2.98 mmol)과 2-AE(1430 μl , 23.75 mmol)을 재빨리 마개로 막을 수 있는 유리시험관에 넣고 360 μl 의 증류수를 넣은 후 유리 마개로 잘 닫은 후 37°C 에서 하루 동안 반응시켰다. 실온에서 식힌 후 acetone 약 18 ml를 천천히 가하면서 흰색의 결정을 침전시켰다. acetone을 여과하여 얻은 흰색 침전물을 1M HCl 약 3.6 ml에 용해시킨 후 증류수로 미리 씻어준 Dowex 50 ion exchanger column에 부하하여 2M ammonia water 21.6 ml로 용출시켜 정제하였다. 용출된 ammonia water를 감압 농축기로 건조시키고 잔유물을 증류수 1.5 ml로 재 용해시킨 후 acetone : ethanol(2:1, v/v)을 천천히 가하면서 흰색 결정을 침전시켰다. 침전된 흰색 결정은 GC-FID 및 GC-MS로 순도 및 구조가 확인된 후 표준물질로 사용되었다.

2. HEV-pentafluorophenylisothiohydration(PFPITH)

합성과정

글로빈 가수분해는 Edman degradation 방법(Törnqvist

et al., 1986)을 참고하였다. 건조된 글로빈 50 mg에 내부표준물질 HEVal-d4를 첨가하여 골고루 섞어준 후, formamide 2 ml를 넣어 글로빈을 녹이고 1M NaOH 40 μl 를 넣어 pH를 7.0 정도로 조절하였다. 단백질 사슬의 말단에 있는 HEVal을 분리하기 위해 PFPITC를 10 μl 첨가하고 마개를 잘 닫은 후 실온에서 하룻밤 동안 섞어주었다. 다음 날 45°C 의 가열기에 넣고 90분간 반응시킨 후 ethylether(EE) 4 ml로 추출하는 것을 두 번 반복하고 EE층을 모아서 질소가스로 건조시켰다. 잔유물은 toluene 3 ml로 녹이고, 증류수, 0.1M potassium carbonate, 다시 증류수의 순서로 각각 한번씩 정제하였다. 최종 toluene 층을 질소가스로 건조시킨 후 유도체화전까지 P_2O_5 -KOH가 들어있는 데시케이터에 최소한 30분간 넣어 두어 수분을 완전히 건조시켰다.

3. HEV-PFPITH-tributyldimethylsilylation(TBDMS) 유도체화 물질의 합성

전처리한 시료에 0.3 mg의 dithioerythritol을 함유한 MTBDMSTFA-NH₄I (1000:3) 30 μl 로 재 용해시키고 가열에 의해 반응시켰다. 시간 및 온도에 따른 반응감도를 테스트하여 최적의 조건을 잡았다.

4. 유도체화 에틸렌옥사이드 부가체의 표준용액의 제조

유도체화된 표준물질을 합성한 후, 표준용액은 합성한 표준물질을 10 mg(또는 10 μl , 단 d=1일 때)을 정확하게 측정하는 다음, 메탄올 10 ml에 녹여 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm)이 되도록 조제하였다. 경우에 따라 메탄올로 적절히 희석하여 혼합표준액을 만들어 사용하였다. 실험과정에서 사용한 모든 표준 원액 및 표준액과 혼합액은 밀봉하여 -20°C 의 암소에서 보관하여 사용하였다.

IV. 연구결과 및 고찰

1. N-(hydroxyethyl)valine(HEV)의 합성결과

합성된 N-(hydroxyethyl)valine을 확인하기 위하여 EI-MS로 측정하였다. N-(hydroxyethyl)valine의 mass spectrum은 Fig. 1과 같이 m/z 116(base ion, M+45), m/z 130(M+31)의 fragmentation을 보였다. 내부표준물질로 사용된 N-(hydroxyethyl-d4)valine는 Fig. 2와 같이 m/z 120(base ion, M+45), m/z 132(M+33)의 fragmentation을 보였다.

2. HEV-PFPITH-TBDMS 유도체의 합성 결과

N-(2-Hydroxy-3-butenyl)valine를 Edman degradation

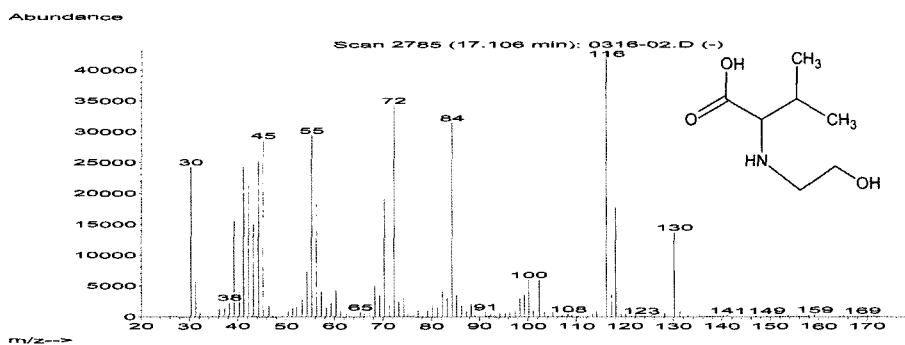


Fig. 1. Mass spectrum of N-(hydroxyethyl)valine.

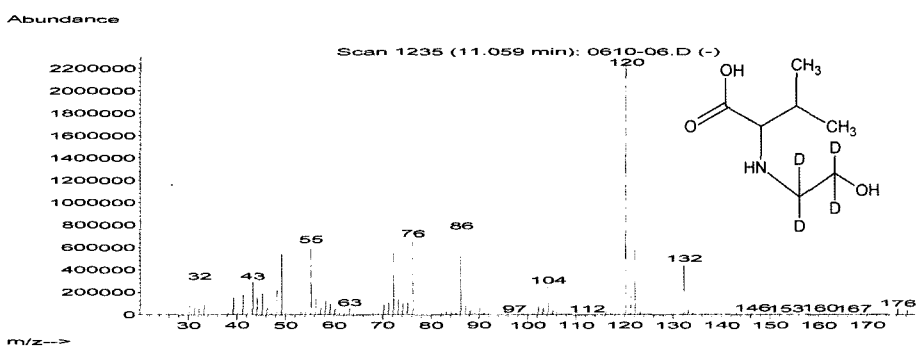


Fig. 2. Mass spectrum of N-(hydroxyethyl-d4)valine.

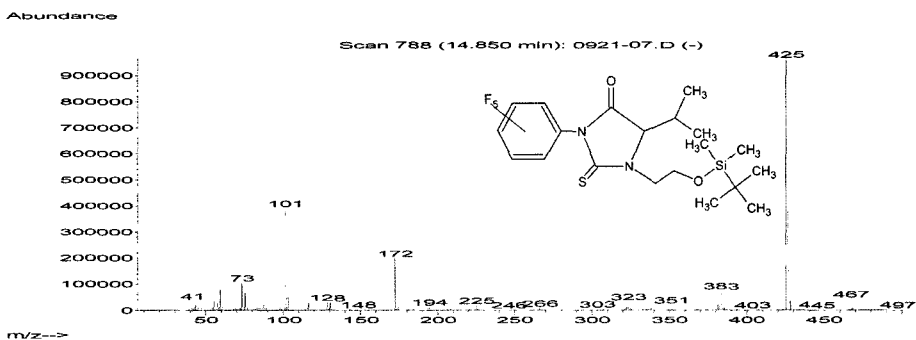


Fig. 3. Mass spectrum of N-(hydroxyethyl)valine-PFPITH-TBDMS.

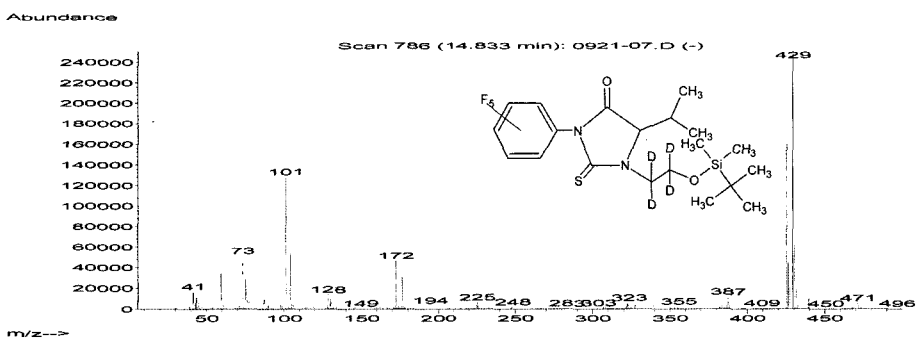


Fig. 4. Mass spectrum of N-(hydroxyethyl-d4)valine-PFPITH-TBDMS.

method에 따라 합성하여 얻은 N-(hydroxyethyl)valine-PFPITH에 감도를 증가시키기 위해 TBDMS로 유도체화시켜 합성된 N-(hydroxyethyl)valine-PFPITH-TBDMS를 EI-MS로 측정 한 결과 m/z 425(M+57), m/z 383 (M+99), m/z 172(M+310)의 fragmentation을 보였다. Fig. 3과 Fig. 4는 각각 N-(hydroxyethyl)valine-PFPITH-TBDMS와 N-(hydroxyethyl-d4)valine-PFPITH-TBDMS의 mass spectrum이다. 따라서 HEV를 GC/MS로 측정하는데 있어서 PFPITH와 TBDMS를 유도체로 활용하는 것이 매우 효과적인 것을 확인할 수 있다.

3. 에틸렌옥사이드에 호흡기로 노출된 마우스의 체중변화

4주 동안(5 days/week) 에틸렌옥사이드에 호흡기로 폭로된 마우스의 체중변화는 Table 3과 같다. 실험동물의 체중이 첫 주부터 대조군에 비하여 크게 낮게 나타났다. 이것은 에틸렌옥사이드에 대한 초기노출이 흰쥐의 생체리듬에 큰 충격으로 영향을 주었기 때문이라고 생각된다.

4. 에틸렌옥사이드에 노출된 흰쥐의 헤모글로빈에서 형성된 HEV의 농도

에틸렌옥사이드에 호흡기로 폭로된 흰쥐에서 혈액을 채취한 후에 헤모글로빈에서 에틸렌옥사이드의 대사물로 형성되어 있는 N-(2-hydroxy-ethyl)valine(HEV)를 GC/MS로 측정 한 결과가 Table 4와 같다.

에틸렌옥사이드로 하루에 400 ppm(0.5 hr) 호흡기 폭로되었을 때 HEV농도는 첫째 주에 167.6 pmol/mg globin이었는데 2주, 3주 및 4주째에는 170.0, 353.0 및 512.2 pmol/mg globin으로 증가하였다. 또한 400 ppm(1.0 hr)의 에틸렌옥사이드에 호흡기 폭로되었을 때

HEV 농도는 첫째 주에 631.1 pmol/mg globin이었는데 2주, 3주 및 4주째에는 1023.8, 1520.4 및 2264.4 pmol/mg globin으로 증가하였다.

V. 결 론

에틸렌옥사이드는 발암물질인데도 불구하고, 화학물질을 만드는 산업장에서 중간대사물질로 많이 사용하고 있을 뿐만 아니라 병원 등과 같이 소독을 필요로 하는 장소에서 가스상 살균제로 많이 사용하고 있어서 근로자와 일반주민들이 쉽게 노출되고 있다.

발암물질인 에틸렌옥사이드에 노출되었는지의 여부를 확인하기 위한 생체모니터링 방법으로 여러 가지가 제시되었지만, 에틸렌옥사이드 대사물질이 헤모글로빈과 안정적인 결합을 하고 있기 때문에 이것을 생체지표로 활용할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 에틸렌옥사이드에 노출되었을 경우에 혈액에 있는 헤모글로빈에서 형성하고 있는 (N-2-hydroxy-ethyl)valine를 GC/MS로 측정하여, 이것을 에틸렌옥사이드의 노출여부를 확인하는 생체모니터링에 생체지표로 활용할 수 있도록 연구하였다.

본 연구에서는 에틸렌옥사이드를 생체모니터링하는데 필요한 생체지표를 GC/MS로 측정하기 위하여 헤모글로빈에서 에틸렌옥사이드 대사물질로 형성되는 (N-2-hydroxy-ethyl)valine를 표준물질로 합성하였다. 표준물질은 BIVA(bromoisovaleric acid, 540 mg, 2.98 mmol)와 2-AE(2-Aminoethanol, 1430 µl, 23.75 mmol)를 사용하여 합성하였고, GC/MS로 확인한 결과에서 fragmentation은 m/z 116(base ion, M+45)와 m/z 130(M+31)로 나타났다. 그리고 이것을 GC/MS로 안정적으로 그리고 높은 감도로 측정하기 위하여

Table 3. Changes of body weights in female mice inhalation exposure with ethylene oxide for 4 weeks

Inhalation exposure	Weeks								
	1st		2nd		3rd		4th		
Control	28.24 ± 1.78	28.57 ± 2.23	29.05 ± 1.51	29.30 ± 1.68	29.30 ± 1.62	30.88 ± 2.54	31.80 ± 1.18	32.33 ± 2.07	
400 ppm	0.5 hr	19.70 ± 0.90	23.27 ± 1.27	23.71 ± 0.94	24.01 ± 1.67	24.35 ± 1.44	26.11 ± 1.78	25.86 ± 1.59	25.89 ± 1.91
	1.0 hr	21.4 ± 1.14	23.7 ± 1.17	24.0 ± 0.99	24.3 ± 1.06	24.6 ± 1.12	27.0 ± 1.22	26.7 ± 1.51	26.6 ± 1.81

Table 4. The levels of N-(2-hydroxy-ethyl)valine(HEV) separated from hemoglobin of female mice inhalation exposure with ethylene oxide (5 days/week)

Inhalation exposure	Weeks				
	1st week	2nd week	3rd week	4th week	
Control	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Ethylene oxide (400 ppm)	0.5 hr	167.6 ± 43.8	170.0 ± 64.4	353.0 ± 110.4	512.2 ± 104.4
	1.0 hr	631.1 ± 217.7	1023.8 ± 242.5	1520.4 ± 256.4	2264.5 ± 99.4

N.D. ; No Detection

PFPTH(pentafluorophenylisothiocyanate)와 TBDMS(tributyldimethylsilylation)로 유도체화시키었다. GC/MS로 확인된 fragmentationdms m/z 425($M+57$), m/z 383($M+99$) 그리고 m/z 172($M+310$) 등이었다.

또한 확인된 물질을 생체모니터링을 위한 생체지표로 활용할 수 있는지의 여부를 검증하기 위하여 400 ppm의 에틸렌옥사이드를 흰쥐에게 호흡기로 하루 0.5시간과 1.0시간씩 4주 동안 노출시키었다. 하루 0.5시간씩 노출시킨 흰쥐에서 형성된 헤모글로빈 부가체 농도는 첫주와 4주째에 각각 168 ± 43.8 와 512 ± 104 (nmol g-1 globin)로 나타났고, 하루 1.0시간씩 노출시킨 흰쥐에서 형성된 헤모글로빈 부가체의 농도는 첫주와 4주째에 각각 631 ± 217 와 2265 ± 99.4 (nmol g-1 globin)로 나타났다.

결론적으로 에틸렌옥사이드에 노출되었을 때 헤모글로빈에 형성된 (N-2-hydroxy-ethyl)valine (HEV)는 매우 좋은 생체지표로 활용할 수 있고, PFPTH(pentafluorophenylisothiocyanate)와 TBDMS(tributyldimethylsilylation)를 유도체로 활용하면 GC/MS로 쉽게 측정할 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10288-00) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- ACGIH : TLVs and BEIs, Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices, ACGIH Publication, 1989, 1999.
- Gupta, R. C. : Enhanced sensitivity of ^{32}P -postlabeling analysis of aromatic carcinogen-DNA adducts. *Cancer Res.*, **45**, 5656, 1985.
- Gupta, R. C., Reddy, M. V. and Randerath, K. : ^{32}P -postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092, 1982.
- Landrigen, P. J. : Environmental and Occupational Medicine, Little, Brown and Company, Boston, 1033-1039, 1992.
- Lee, J. H. and Shin, H. S. : Measurement of Hemoglobin adducts in female mice inhaled with 1,3-butadiene by using GC/MS. *Kor. J. Env. Hlth.*, **30**(4), 301-307, 2004.
- Mowrer, J., Törnqvist, M., Jensen, S. and Ehrenberg, L. : Edman degradation applied to hemoglobin for monitoring occupational exposure to alkylating agents. *Toxicol. Environ. Chem.*, **11**, 215-231, 1986.
- Nico, J. V. S., Gerard, D. J. B., Erik, W. N. V. V. and Henk, V. D. W. : Monitoring occupational exposure to ethylene oxide by determination of hemoglobin adducts. *Environmental Health Perspectives*, **99**, 217-220, 1993.
- Reddy, M. V. and Randerath, K. : Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ^{32}P -postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, **7**, 1543, 1986.
- Sullivan, J. B. and Krieger, G. R. : Ethylene oxide-Hazard material toxicology, clinical principles of environmental health. Williams & Wilkins, 1078-1085, 1992.
- Shin, U. S. and Lee, J. H. : A study on its separated from DNA adducts of Blood lymphocytes in rats exposed orally with 3,3'-dichlorobenzidine(DCB) by GC/MS-SIM. *Korean Journal of Environmental Health*, **28**(4), 6-11, 2002.
- Törnqvist, M., Mowrer, J., Jensen, S. and Ehrenberg, L. : Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. *Anal. Biochem*, **154**, 255-266, 1986.
- U S EPA : Mutagenicity and carcinogenicity assessment of 1,3-butadiene. Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington DC, EPA/600/8-85/004F, 1985.
- 김영기, 박명희 : 병원내 감염에 대한 연구. *대한병리학회지*, **14**(1), 55-59, 1980.
- 김진숙, 이성은, 정해원 : Ethylene oxide가스에 폭로된 근로자들의 염색체 이상빈도와 백혈구중 Glutathion-S-Transferase 활성도 수준. *한국역학회지*, **15**(2), 212-221, 1993.
- 남병현, 윤미정, 이진홍 : 여천공단지역의 유해 대기 오염물질에 대한 확률론적 위해도 분석. *충남대학교 환경연구*, **16**, 41-47, 1998.
- 남병현, 윤미정, 이진홍 : 울산공단지역의 대기 중 휘발성 유기화합물에 대한 위해성 평가. *한국산업안전학회지*, **14**(2), 103-108, 2000.
- 이진현, 신호상, 장미선 : 디클로로벤지딘에 폭로된 흰쥐의 간장세포와 방광상피세포에 형성된 DNA adducts의 P^{32} -postlabeling과 GC/MS-SIM에 의한 분석. *한국환경위생학회지*, **28**(1), 21-30, 2002.
- 이진현, 신호상, 김양호, 노재훈, 이범규 : GC/MS-SIM과 P^{32} -postlabeling 방법에 의한 염료와 안료를 제조하는 사업장 근로자들의 방광암 조기발견을 위한 biomarker 개발에 관한 연구. *한국환경위생학회지*, **26**(1), 36-44, 2000.
- 이진현, 이범규 : 디클로로벤지딘으로부터 대사물질의 합성과 분리방법에 대한 연구. *한국환경위생학회지*, **29**(2), 50-55, 2003.
- 정미홍, 이용환 : Ethylene oxide 폭로 근로자들의 혈액학적 소견. *대한보건협회지*, **23**(2), 117-127, 1997.
- 조항진 : Ethylene, *Chemical Annal*, 67-68, 1996.
- 최원욱, 김윤신, 박태술, 전준민 : 공단지역 유해대기 오염물질에 대한 인체 유해도 평가에 대한 연구. *환경과 산업의학*, **7**(1), 1-13, 1998.