

## Bisphenol A와 DEHP의 혈중농도와 성조숙증 환아와의 상관성에 관한 연구

한은정 · 임옥경 · 정재연 · 백선영 · 김연제\*

한국과학기술연구원, 에너지환경연구본부, 환경기술연구단  
(2008. 8. 19. 접수, 2008. 10. 6. 승인)

### The study of relationship between the concentrations of Bisphenol A and DEHP in human plasma and precocious puberty

Eunjung Han, Okkyoung Yim, Jaeyeon Chung, Sunyoung Baek and Yunje Kim\*

Environmental Technology Research Center, Korea Institute of Science and Technology,  
P.O.Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea

(Received August 19, 2008, Accepted October 6, 2008)

**요 약:** Bisphenol A (BPA)와 di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)는 내분비계 장애 물질로써, 분해되지 않고 인체의 지방 및 조직에 농축되며 인체 내에 독성을 가지고 있어 상당한 문제점을 안고 있는 물질이다. 본 연구에서는 GC/MSD를 이용하여 성조숙증 환아와 정상 대조군의 혈장 내 BPA와 DEHP의 농도 분포도를 비교 분석하여 그 상관성을 조사하였다. BPA의 경우, 성조숙증 환아가 정상 대조군에 비해 낮은 혈중 농도 분포도를 보였고, DEHP는 성조숙증 환아에서 대조군에 비해 높은 혈중 농도 분포도를 보였다. 우리나라 성조숙증 환아의 경우에 대한 이 두 물질의 혈중 농도 분포도를 비교 검토해 볼 때, BPA는 성조숙증에 연관성이 낮거나 또는 없으며 DEHP는 성조숙증에 어느 정도 연관이 있으며 혈중농도 분포도는 성조숙증 환아의 경우가 대조군 보다 45%정도 높게 나타났다.

**Abstract:** Bisphenol A (BPA) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) is the considerably hazardous materials, endocrine disrupting chemicals (EDCs), which is accumulated to the human's fat and tissue. We studied the relationship between the concentrations of BPA and DEHP in the precocious puberty and the normal controls using GC/MSD. BPA concentrations of the precocious puberty are lower than that of normal controls. But DEHP concentrations of the precocious puberty are higher than that of normal controls. From these results, BPA is not related to the precocious puberty. Otherwise, DEHP is somewhat related to the precocious puberty and the concentrations of the precocious puberty are approximately 45% higher than that of normal controls.

**Key words :** Bisphenol A, DEHP, precocious puberty, GC/MSD

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-958-5805 Fax : +82-(0)2-958-5805

E-mail : yjkim@kist.re.kr

## 1. 서 론

내분비계 장애물질이란 환경에 노출된 화학 물질이나 환경 내에 존재하는 물질이 체내에 유입되어 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 물질로서, 천연호르몬과는 달리 쉽게 분해되지 않고 인체의 지방 및 조직에 농축되는 성질을 가지고 있다.

Bisphenol A (BPA)는 polycarbonate plastic과 epoxy 수지의 단량체로서, polycarbonate plastic과 이들의 수지 제조 시 기본 원료로 사용되고 있다. BPA의 에스트로겐 활성이 1936년 처음 보고 되었는데, 이 물질이 생물체 내에 유입되면 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐과 유사한 작용을 한다고 보고된 바 있으며, BPA의 에스트로겐 활성능력은 에스트라다이올 보다 10,000-100,000배 정도 낮음에도 불구하고 동물의 생식계에 영향을 주는 것으로 보고되어 있다.<sup>1,2</sup> Zoeller 등의 연구에 따르면, BPA가 세포 기능과 감상선 호르몬 작용을 방해하고, BPA의 인체 혈중 농도는 자궁 장애와 유산 등의 질병과도 연관이 있다고 보고하고 있다.<sup>3-6</sup>

한편, 플라스틱 제조 시 가소제로 폭넓게 사용되고 있는 di-2-ethyl hexyl phthalate (DEHP)는 장난감, 비닐 바닥재, 의료 장비 및 식품 포장지 등의 기본 원료로 사용되고 있다. DEHP는 호흡, 식수, 음식을 통해서 사람에게 흡수되며 식품의 포장지와 의약품에 의해서도 사람에게 흡수된다고 보고되어 있다.<sup>7</sup> Woodward는 DEHP가 peroxisome을 증식시켜 간암을 유발한다고 보고하였으며, Oishi 등은 생식 기능 저하를 유발시킨다고 하였다.<sup>8,9</sup> 또한 Agarwal은 호르몬 분비의 감소, 생식 번식 기능의 감소 및 태아 독성 등을 일으킨다고 보고 하였으며, 면역력이 약한 성장기 어린이들에게 조기 성숙을 유발 할 수 있다고 보고하였다.<sup>10,11</sup> 성조숙증은 2차 성장이 빨리 나타나는 증상으로, 여아의 경우 8세 미만, 남아의 경우 9세 미만에 발생된다. 또한 성장 발육 촉진, 성호르몬 증가 증상들이 나타난다. Colon 등은 성조숙증 환아와 대조군의 혈장 시료를 비교 분석한 결과, phthalate ester 계열의 물질들이 성조숙증은 68%, 대조군은 17% 검출되었다. 특히, DEHP 경우에는 성조숙증 환아의 혈중 내 평균 농도가 대조군에 비해 6배 정도 높은 것으로 보고한 바 있다.<sup>12</sup> 그러나 아직 국내에서는 성조숙증 환아에서 내분비계 장애물질의 정상수치도 확립되어 있지 않고, 현재까지의 연구들은 성조숙증 환아에서 내분비계 장애물질을 분석한 연구는 아직까지는 없다.

본 연구에서는 내분비계 장애물질인 BPA와 DEHP의 혈장 내 농도 분포도를 비교 검토하여 우리나라의 성조숙증 환아와 정상인과의 상관관계를 알아 보고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 측정기기 및 실험기구

시료분석을 위해 Agilent (Palo Alto, CA, USA)사의 6890 기체 크로마토그래피에 5973 질량검출기를 직접 연결한 Gas chromatography/Mass selective detector (GC/MSD)를 사용하였다. 진탕 추출을 위해서 IKA (Staufen, Germany)사의 HS501D shaker 및 원심분리를 위한 Heraeus (Hanau, Germany)사의 Varijuge-F를 각각 사용하였고, 시료 혼합을 위해서는 Scientific industry (Bohemia, USA)사의 vortex mixer를, 시료 농축을 위해서는 Zymark (Hopkinton, MA, USA)사의 Turbovap LV evaporator 및 Heidolph (Schwabach, Germany)사의 WB 2000 진공증발기를 사용하였다. 유기층 수거를 위해 사용한 Freezer는 LAUDA (lauda-konogshofen, Germany)사의 ecoline RE112였다.

### 2.2. 시약 및 시료

#### 2.2.1. 시약

본 연구에 사용된 BPA와 DEHP 표준물질과 정량분석용 내부표준물질 bisphenol B (BPB)는 Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) 사제로써 표준시료 10 mg을 메탄올 10 mL에 녹여 1000 µg/mL 표준용액으로 만들고 이것을 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

제단백에 사용된 acetonitrile과 추출 시 사용된 diethyl ether는 HPLC 등급으로 J.T. Baker (Phillipsberg, MT, USA)사제이며 효소 가수분해에 사용된 β-glucuronidase/arylsulfatase는 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)사제를 사용하였다. GC/MSD 분석을 위해 사용한 유도체화 시약은 1% trimethylchlorosilane 이 함유된 N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA/1%TMCS)로써 Sigma사제를 사용하였다.

#### 2.2.2. 혈장 시료의 채취

서울에 위치한 의료원로부터 8-11세 여아로부터 채취한 혈장 100개를 공급받았다. 채취된 시료는 실험에 사용되기 전까지 2-3°C의 냉장상태로 보관하였다. 100개의 시료 중 50개는 성조숙증 환아, 그리고 50개는 정상 대조군의 혈장이었다.

### 2.3. 실험방법

#### 2.3.1. 시료 전처리

혈장 1 mL에 내부표준물질 BPB 10 µg/mL 용액을 50 µL 첨가 한 후, 단백질을 제거하기 위해 acetonitrile 2 mL을 첨가하였다. 이것을 잘 혼합한 후, 450 G에서 5분간 원심분리 한 뒤 상등액을 취하여 질소가스로 완전히 증발시켰다. 그 잔류물에 0.2 M acetate buffer (pH5.0~5.5) 1 mL과 *Helix pomatia*에서 분리 추출한 β-glucuronidase/arylsulfatase 50 µL을 넣고 55°C에서 3시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 후 잔류물에 diethyl ether 5 mL을 가한 다음 shaker를 사용하여 10 분간 진탕 시켜 추출하였다. 이 혼합용액을 450 G에서 5분간 원심분리하고 -20°C의 냉각기를 이용하여 유기층을 수거한 뒤 질소 가스로 완전히 증발 시킨 후 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, silica gel 및 KOH가 들어 있는 데시케이터에서 30분 동안 방치하여 수분을 제거하였다. 여기에 BSTFA/1%TMCS를 50 µL을 가하여 80°C에서 30분 동안 유도체화 반응을 시킨 후 vial에 옮겨 GC/MSD에 2 µL을 주입하였다. 이 때 사용된 GC/MSD의 분석조건은 Table 1과 같다.

#### 2.3.2. 기기분석 방법

유도체 반응 후 Table 1에 나타낸 기기분석 조건에 따라 분석물질을 분리하였다. Scan mode를 선택하여 각 물질의 질량 스펙트럼을 확인한 다음 특성이온을 선택하여 selective ion monitoring (SIM) mode에 따라

Table 1. Instrumental conditions for GC/MSD

GC conditions			
Column : Ultra-2 (cross-linked 5% phenylmethylsiloxane, 0.2 mm I.d. × 25 mm length × 0.11 µm film thickness)			
Carrier gas : He at 0.8 mL/min			
Oven temperature program :			
Rate (°C/min)	Temp. (°C)	Hold (min)	
	150	1	
10	220	0	
5	260	5	
30	320	2	
Run time : 25 min			
Injection volume : 2 µL			
Injection port temperature : 280°C			
Transfer line temperature : 280°C			
MS conditions			
Ion source temperature : 230°C			
Scan range : 50~400 m/z			
SIM selected ion(m/z) : 149, 167, 357, 371, 372			
Solvent delay : 5 min			

분석하였다. 이때 사용된 특성이온은 BPA의 m/z 372와 357 이온, DEHP의 m/z 149와 167 이온, 그리고 내부표준물질 BPB의 m/z 371와 357 이온을 선택하여 검출하였다.

#### 2.3.3. 회수율과 바탕실험

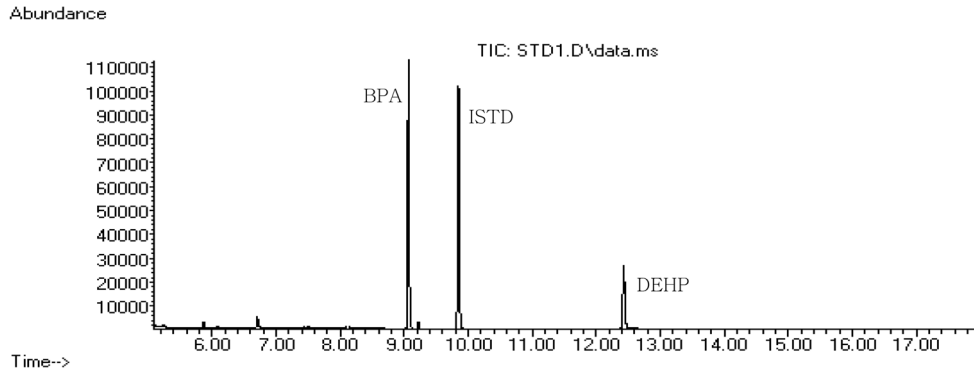
분석 방법에 대한 분석물질의 회수율과 재현성은 Blank plasma에 표준물질 BPA와 DEHP를 혈중농도 50 ng/mL이 되도록 첨가하여 5회 반복시험 하였다. 한편, 분석물질인 BPA와 DEHP는 공기, 호흡, 식수 그리고 플라스틱 사용 등으로 오염이 되는 물질로서 분석하려는 물질에 미치는 오염 정도를 사전에 파악하기 위해 바탕실험을 실시하였다. 바탕시료는 blank plasma 1 mL에 내부표준물질을 첨가하여 동일한 시료 전처리 방법 및 검출 법으로 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

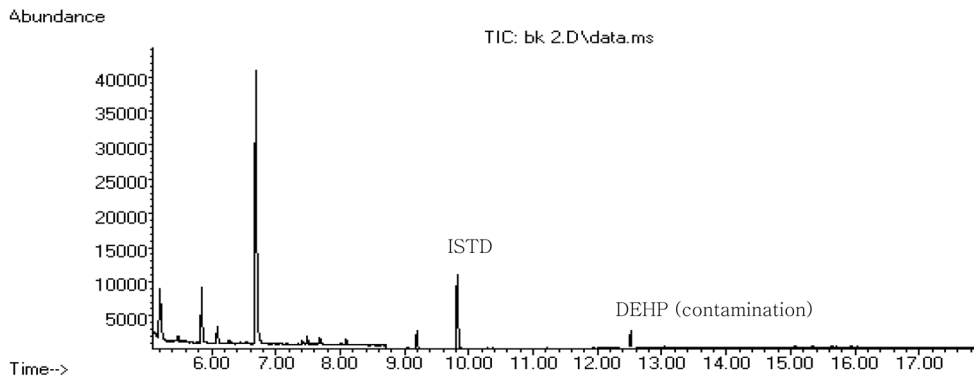
### 3.1. 혈장에서의 BPA와 DEHP의 검출

혈장에 함유된 BPA와 DEHP가 방해물질의 영향 없이 분석이 가능한지를 확인하기 위해서 blank plasma에 표준용액 BPA와 DEHP를 혈중농도 50 ng/mL이 되도록 첨가한 시료와 실험실에서의 교차 오염을 파악하기 위한 blank plasma 시료를 전처리하여 GC/MSD로 분석하여 얻어진 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, BPA의 경우에는 방해물질의 영향 없이 용리 되었으나 DEHP의 경우 극소량이 함께 용리 되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 DEHP는 시료 전처리 과정에서 사용되는 기구로부터 기인 되는 것이며, 봉우리가 정량 분석에 영향을 미칠 만큼 많은 양이 검출되지 않아 확립된 기기 분석법을 그대로 사용하기로 하였다. BPA와 DEHP 및 내부표준물질 (BPB)의 머무름 시간은 각각 9.011 min, 12.34 min 그리고 9.78 min 이었으며 이들의 질량 스펙트럼은 Fig. 2와 같다. 유도체화 반응을 거쳐 2개의 OH 기가 OTMS 기로 치환된 BPA의 모분자 [M]<sup>+</sup>이온의 m/z 372 그리고 메틸기가 떨어져 나간 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>이온의 m/z 357이 검출되었다. DEHP는 모분자 [M]<sup>+</sup>이온의 m/z 390, [M-C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>]<sup>+</sup>이온의 m/z 167 그리고 [M-C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>O]<sup>+</sup> 이온의 m/z 149가 검출되었다. 내부표준물질 BPB는 유도체화 반응을 거쳐 2개의 OH 기가 OTMS 기로 치환되어 모분자 [M]<sup>+</sup>이온의 m/z 386, [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>이온의 m/z 371 그리고 [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>이온의 m/z 357이 검출되었다. 정량 분석을 위하여 GC/MSD의

(a) Standard



(b) Blank plasma



(c) Spiked plasma

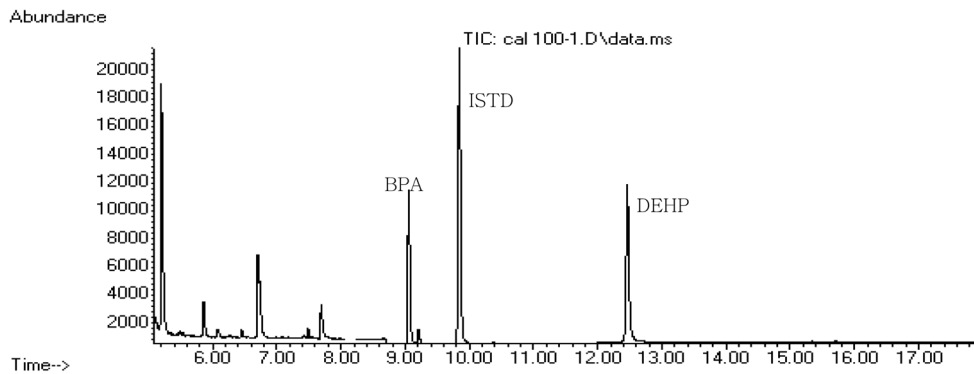


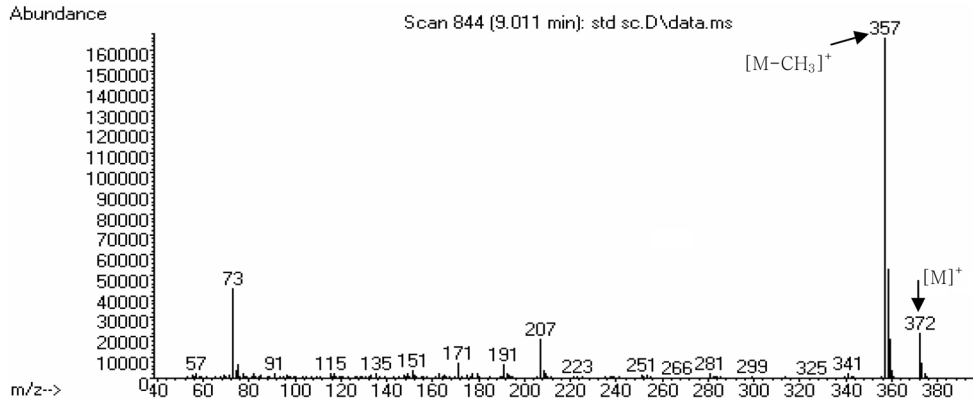
Fig. 1. Total ion chromatogram of BPA and DEHP from standards, blank and plasma sample to be spiked standard and internal standard by SIM Mode in GC/MSD.

SIM mode를 사용하였으며, BPA는  $m/z$  372와 357 이온, DEHP는  $m/z$  149와 167 이온, 그리고 내부표준물질 BPB는  $m/z$  371와 357이온을 선택하여 검출하였다. 한편, 시료 중 가장 높은 혈중농도를 나타내는 시료로부터 SCAN mass spectrum을 얻어 정성확인을 하였다.

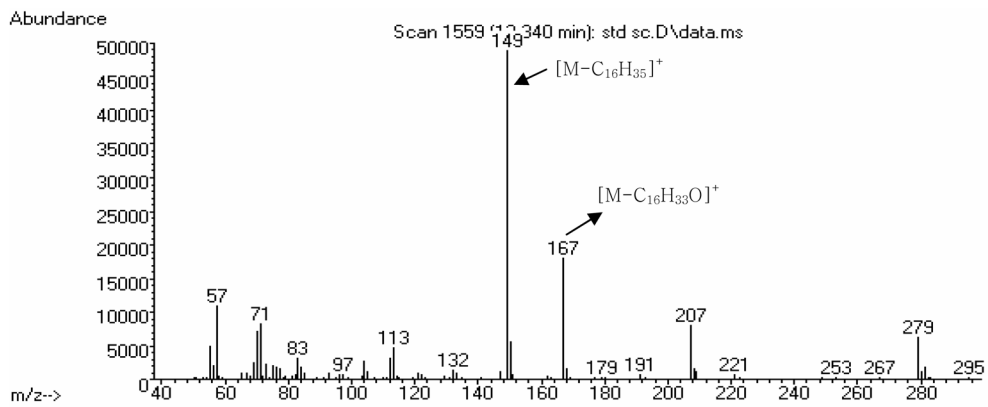
### 3.2. 회수율 및 재현성

정량 분석을 하기 위해서 확립한 시료 전처리 방법 및 기기 분석법의 유효성을 점검하기 위하여 회수율과 재현성을 점검하였으며 이들의 결과는 Table 2에 나타내었다. 이들의 결과는 BPB에 대한 BPA와

(a) Mass spectrum of BPA



(b) Mass spectrum of DEHP



(c) Mass spectrum of ISTD (BPB)

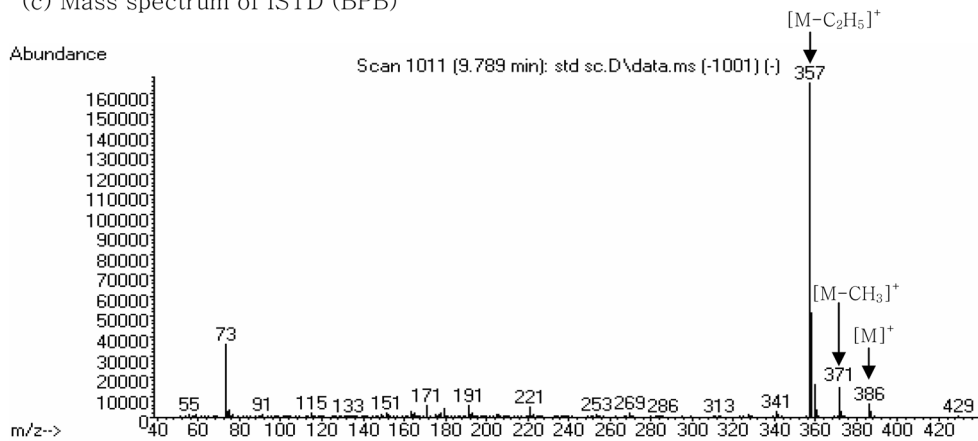


Fig. 2. Mass spectra of BPA, DEHP and ISTD.

DEHP의 면적비로 산출하였으며, 회수율은 BPA 5.39% 및 DEHP 7.12%로써 비교적 양호한 결과를 보였다. 102.91% 및 DEHP 92.45% 그리고 재현성은 BPA

Table 2. Recovery and reproducibility of BPA and DEHP in human plasma n=5

	Recovery (%)	Reproducibility (%)
BPA	102.91	5.39
DEHP	99.13	7.12

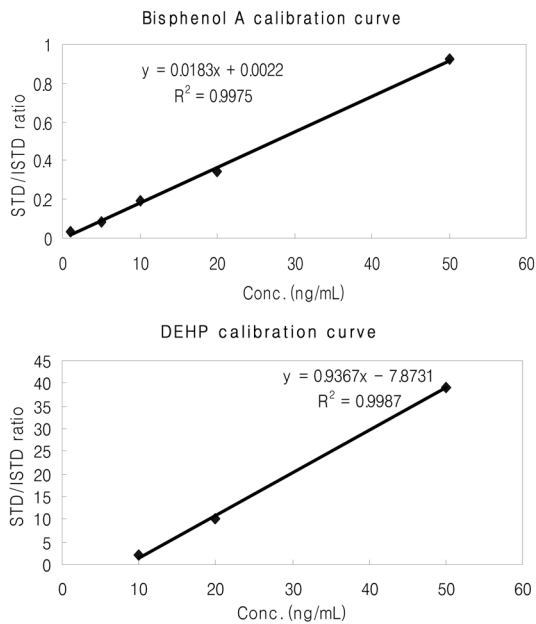


Fig. 3. Calibration curves of BPA and DEHP in human plasma.

### 3.3. 검량선 작성

시료의 정량 분석을 위하여 BPA와 DEHP의 검량선을 작성한 결과는 Fig. 3과 같다. BPA는 혈장 내 농도 범위를 1~50 ng/mL에서 작성하였으며 response factor ( $R^2$ )는 0.9975를 나타내었고, DEHP는 혈장 내 농도 범위를 20~100 ng/mL에서 작성하였으며 response factor ( $R^2$ )는 0.9993을 나타내어 두 물질에 대한 검량선은 비교적 양호한 직선성을 보였다.

### 3.4. 성조숙증 환아와의 상관성 검토

서울에 위치한 의료원의 도움으로 모니터링 대상 혈장시료로 대조군의 50개 시료 및 성조숙증 환아의 50개 시료를 공급받아 앞서 확보된 분석 방법으로 연구를 수행하였다.

이들은 앞서 확립된 시료 전처리 방법 및 기기 분석법으로 BPA 및 DEHP의 혈중농도를 분석하였으며, 이들 각각의 농도에 대한 분포도는 Fig. 4에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이, BPA의 경우 성조숙증

환아와 정상 대조군의 혈장 내 농도 범위는 각각 불검출~124.06 ng/mL 및 불검출~68.50 ng/mL이었으며, 비록 단 한 개의 시료에서 성조숙증 환아의 혈중농도가 정상 대조군보다 높게 나타나기도 하였다. 하지만, 혈중농도 분포에 대한 농도 평균선을 보면 성조숙증 환아의 혈중농도 평균선이 정상 대조군의 혈중농도 평균선에 비해 낮게 나타났다. 1936년 보고 자료에 의하면, BPA는 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐과 유사한 작용을 한다는 보고가 있기 때문에,<sup>1</sup> 성조숙증과 어느 정도 연관성이 있는 것으로 예상되었으나, 성조숙증 환아와 대조군의 혈중농도에 대한 분포도에 따르면, 성조숙증 질환에 대한 상관성이 낮거나 또는 없는 것으로 판단되었다.

한편 DEHP의 경우, 성조숙증 환아와 정상 대조군의 혈장 내 농도 범위는 각각 7.10~309.60 ng/mL, 불검출~386.62 ng/mL를 나타냈다. 정상 대조군이 성조숙증 환아에 비해 일부 시료에서 DEHP의 혈중 농도가 거의 비슷하거나 다소 높게 나타나기도 하였지만, 혈중농도에 대한 분포도에서의 농도 평균선을 보면 성조숙증 환아의 혈중농도 평균선이 정상 대조군의 혈중농도 평균선에 비해 전체적으로 높게 나타났다. 특히, 농도 분포가 높아질수록 성조숙증 환아의 혈중농도가 정상 대조군의 혈중농도에 비해 현격한 차이를 보였다.

따라서 BPA와 DEHP의 혈중농도 분포도를 비교해 본 결과, BPA는 성조숙증과 연관성이 낮거나 또는 없는 것을 확인 할 수 있었으며, DEHP는 성조숙증과 어느 정도 연관성이 있다는 것을 알 수 있었다. 특히 DEHP는 높은 혈중농도 범위에서 성조숙증 환아가 정상 대조군 보다 큰 차이를 보이는 농도 분포를 나타냈다. Colon 등은 DEHP의 경우, 성조숙증 환아의 혈중 평균농도가 대조군에 비해 6 배정도 높게 나타났다고 보고되어 있었다.<sup>13</sup> 그러나 본 연구에서 1.5 배 정도 높은 수준으로 나타난 것은 우리나라의 경우 DEHP 오염 정도가 외국에 비해 다소 낮기 때문으로 추측되며, 따라서 DEHP와 성조숙증 환아와의 연관성을 판단하기에는 외국의 경우보다는 다소 어려움이 있다는 것을 간접적으로 파악할 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 GC/MSD를 이용하여 성조숙증 환아와 정상 대조군의 혈장에서 BPA와 DEHP의 농도 분포도를 비교 분석하여 그 상관성을 조사하였다. BPA

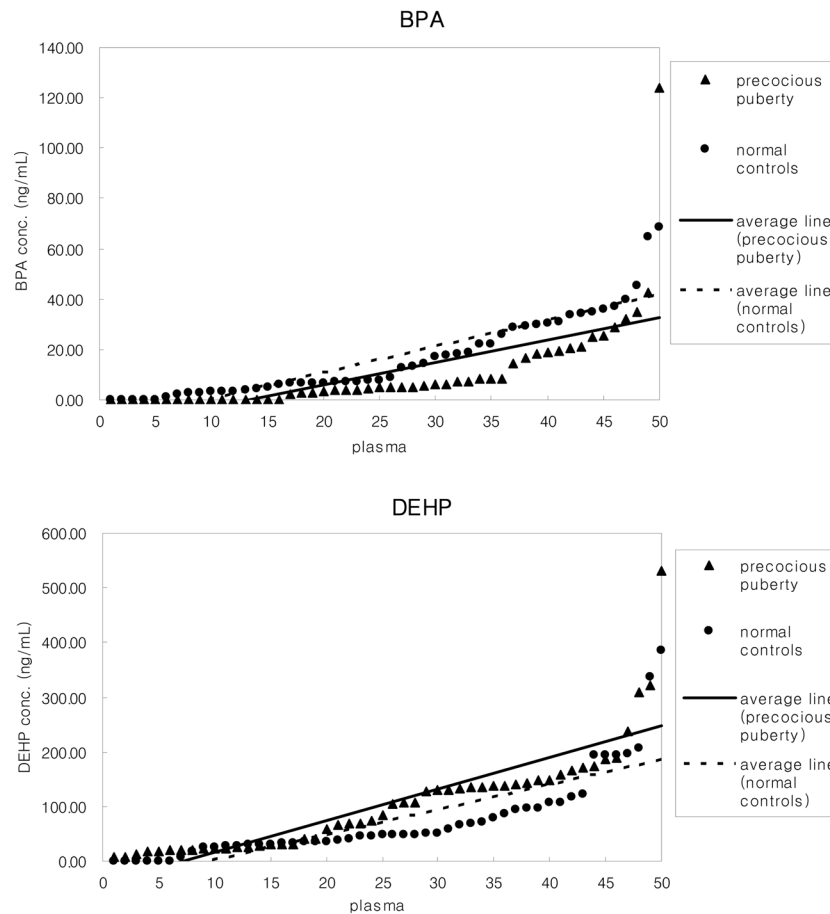


Fig. 4. Distribution charts and average curves of the concentrations of BPA and DEHP in human plasma.

의 경우, 성조숙증 환아의 혈중농도 분포도에 대한 농도 평균선이 대조군의 혈중농도 분포도에 대한 농도 평균선 보다 낮게 나타났으며, DEHP의 경우에는 성조숙증 환아의 혈중농도 분포도에 대한 농도 평균선이 대조군의 혈중농도 분포도에 대한 농도 평균선 보다 높게 나타났다. 이 두 물질의 혈중농도 분포도를 볼 때, BPA는 성조숙증에 대한 영향이 낮거나 또는 없었으나 DEHP는 성조숙증 질환에 어느 정도 연관성이 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 성조숙증 환아의 평균 혈중농도는 대조군의 평균 혈중농도보다 1.5 배 정도 높게 나타났다.

다만, 본 연구는 제한된 시료로부터 비교 검토한 결과이며, 성조숙증 환아의 혈중농도가 대조군보다 6 배 정도 높게 나타난 외국의 연구 사례를 비교해 볼 때, BPA와 DEHP에 대한 성조숙증 환아와의 연관성에 대한 보다 신뢰성 있는 결과를 얻기 위해서는 더 많은

시료를 대상으로 연구가 이루어져야 할 것으로 판단 된다.

#### 참고문헌

1. E. C. Dodds and W. Lawson, *Nature*, **137**, 996-996 (1936).
2. N. R. Lazer, *Adv Material Processes*, **147**, 43-45(1995).
3. R. T. Zoeller, R. Bansal and C. Parris, *Endocrinology*, **146**, 607-612(2005).
4. Y. B. Wetherill, C. E. Petre, K. R. Monk, A. Puga and K. E. Knudsen, *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 515-524(2002).
5. M. Sugiura-Ogasawara, Y. Ozaki, S. Sonta, T. Makino and K. Suzumori, *Hum. Reprod.*, **20**, 2325-2329(2005).
6. G. Berkowitz, *Hum. Reprod.*, **21**, 565-566(2000).
7. D. A. Key, D. G. Wallace, T. B. Kepler and R. B. Conolly,

- Toxicol Sci*, **49**, 172-185(1995).
8. K. N. Woodward, *Him Exp Toxicol*, **9**, 397-401(1990).
9. S. Oishi, S. P. Serivastava, G. B. Singh and P. K. Seth, *Toxicol Lett*, **36**, 297-308(1987).
10. D. K. Agarwal, S. Eustis, J. C. Lamb, J. R. Real and W. I. M. Kluwe, *Environ Health Perspect*, **65**, 343-350 (1986).
11. K. Shiota and S Mima, *Arch Toxicol*, **56**, 263-266 (1985).
12. I. Colon, D. Caro and C. J. Bourdony, *Environ Health Perspect.*, **108**, 895-900(2000).