

흰쥐에서 톨루엔이 요중 벤젠 대사 물질인 phenol과 S-phenylmercapturic acid 배설에 미치는 영향

연세대학교 대학원 보건학과, 연세대학교 의과대학 산업보건연구소¹⁾

문종국 · 김치년¹⁾ · 노재훈¹⁾

— Abstract —

Effect of Toluene on Phenol and S-phenylmercapturic Acid Excretion as Urinary Metabolites of Benzene in Rats

Jong Kook Moon, Chi-Nyon Kim¹⁾, Jae Hoon Roh¹⁾

*Department of Public Health, The Graduate School, Yonsei University
Institute for Occupational Health, College of Medicine, Yonsei University¹⁾*

Objectives : This study was conducted to provide accurate exposure evaluation of workers in a biologically monitored state who were simultaneously exposed to benzene and toluene. For the purpose of this study, an animal experiment was conducted.

Methods : The following concentrations of solvents were administered orally to Sprague-Dawley rats : benzene at 2.26 mg/kg body weight (equivalent concentration to the 2.5 ppm, Threshold Limit Value-ShortTerm Exposure Limit, in the USA) and 9.02 mg/kg body weight (equivalent concentration to the 10 ppm, Threshold Limit Value-TimeWeighted Average in Korea), simultaneously with toluene at 106.42 mg/kg body weight (equivalent concentration to the 100 ppm, Threshold Limit Value-TimeWeighted Average, in Korea).

Results : The following results were obtained from the analysis of reading taken at 3hour intervals of S-phenylmercapturic acid (SPMA) and phenol concentration in urine metabolites of benzene after oral administration for 30 hours.

1. The concentrations of phenol and SPMA in urine were markedly decreased in the initial phase of the mixed group (both benzene and toluene administered group) as compared with the benzeneonly administered group, and the concentrations were slightly elevated with elapsed time.

2. The total excreted amounts of phenol and SPMA in urine decreased in the mixed group compared with the benzene-only group, and these decreases were more remarkable at the benzene administration concentration of 9.02 mg/kg than at 2.26 mg/kg.

3. The urinary excretions of phenol and SPMA were delayed in the case of the mixed group, and the extent of the delay was dependent on the amount of benzene administration.

Conclusions : Benzene metabolism was suppressed by toluene, and hence the excretion of phenol and SPMA as urinary metabolites of benzene was delayed. This result will have applications in the interpretation of results from future biological monitoring of workers exposed to mixed solvents. We should not underestimate the importance of carefully interpreting the results of biological monitoring data when workers are exposed to mixed benzene and toluene.

Key Words : Benzene, Toluene, Phenol, S-phenylmercapturic acid, Biological monitoring, Exposure assessment of benzene

서 론

벤젠(benzene)은 산업분야에서 널리 활용되는 물질로서 전체 사용량의 10 %는 가솔린에 포함되어있다(RIVM, 1988). 과거에는 용제로 주로 사용되었지만 최근에는 화학실험실과 페인트, 접착제, 페인트 제거제의 원료로 이용하고 있다(Mara와 Lee, 1978; Windholz 등, 1983; Gilman 등, 1985). 벤젠에 근로자들이 장기간 노출되면 재생 불량성 빈혈(Rozman 등, 1979; Green 등, 1981; Medinsky 등, 1994)이나 백혈병(Vigliani와 Saita, 1964; Aksoy 등, 1974)과 같은 조혈기 장애가 나타난다. 또한 고농도의 벤젠은 흰쥐의 골수세포에 세포유전학적 독성도 일으킨다 (Roh 등, 1987). 이러한 독성 때문에 미국 산업위생협회(American Conference of Governmental Industrial Hygienist, ACGIH)에서는 벤젠을 확인된 발암성물질(A1)로 정하고 8시간 시간가중평균 노출기준(Threshold Limit Value - Time Weighted Average, TLV-TWA)을 0.5 ppm으로 선정하였으며 단시간 노출기준(Threshold Limit Value-Short Term Exposure Limit, TLV-STEL)은 2.5 ppm으로 매우 엄격하게 권고하고 있다(ACGIH, 2002). 우리나라의 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준(노동부, 1998)에서는 벤젠을 발암성 추정물질(A2)로 하여 8시간 시간가중평균 노출기준을 10 ppm으로 정하고 있으나 단시간 노출기준은 설정되어 있지 않아 미국보다 엄격하지는 않다. 그러나 최근 노동부에서는 벤젠의 노출 기준을 1 ppm으로 강화할 예정이다.

벤젠은 피부흡수 가능물질(skin notation)로 알려져 있어(ACGIH, 2002) 근로자들의 노출평가를 실시할 때 단순히 공기중 벤젠을 포집하여 분석하는 방법만으로는 불충분하며 생물학적 모니터링(biological monitoring)을 함께 활용하는 것이 바람직하다. 벤젠은 체내에 유입되면 hepatic cytochrome P-450 2E1에 의하여 빠르게 산화된 후(Lindstrom 등, 1997) ring-hydroxylation, ring-open 반응 그리고 glutathione과의 포합반응의 대사과정을 거친다(Snyder와 Hedli, 1996; Medeiros 등, 1997; Dor 등, 1999; Nedelcheva 등, 1999;

Sukhodub와 Padalko, 1999). 일반적으로 생물학적 모니터링분야에서 벤젠의 요중 대사물질로 사용하는 지표들은 페놀(phenol), S-phenylmercapturic acid(이하 SPMA) 그리고 trans, trans-muconic acid이다. 우리나라에서는 유해인자별 특수건강진단 검사항목(노동부, 1997)에서 요중 페놀을 설정하고 미국 산업위생협회의에서는 SPMA와 trans, trans-muconic acid를 생물학적 노출지표(biological exposure index, BEI)로 권고하고 있다(ACGIH, 2002).

실제로 근로자들이 작업장에서 벤젠에 노출될 때는 단일 물질이 아니라 다른 유기용제와 함께 노출되는 경우가 대부분이다. 근로자들이 산업활동을 하면서 벤젠과 함께 노출되는 유기용제 중에 가장 대표적인 물질은 톨루엔(toluene)이다. 톨루엔은 벤젠 대사에 영향을 미쳐 요중 대사물질의 배설농도를 변화시킬 수 있다. 벤젠과 동시 노출 가능성이 높은 톨루엔은 벤젠대사를 촉진한다는 연구도 있었지만(Pathiratne 등, 1986) 대부분의 연구에서는 억제한다고 하였다(Ikeda 등, 1972; Andrews 등, 1977; Purcell 등, 1990). 이러한 내용은 벤젠대사의 첫 번째 산화과정에 관여하는 효소인 CYP 2E1을 톨루엔이 억제하여 요중 페놀과 SPMA의 배설을 지연시킬 가능성이 있다는 것을 의미한다. 그러므로 근로자들을 대상으로 생물학적 노출지표를 적용할 때는 벤젠이외의 다른 화학물질에 의하여 SPMA나 페놀의 배설량이 어떻게 변하는지 평가하는 것이 반드시 필요하다. 그러나 기존에 발표된 연구들은 벤젠 노출농도에 따라 용량-반응 관계가 좋은 생물학적 지표를 찾아내거나(William 등, 1996; Medeiros 등, 1997) 요중 대사물질 분석에 관한 연구들이 대부분이다(Einig 등, 1996; Angeror 등, 1998).

따라서 본 연구는 벤젠과 톨루엔에 동시 노출되었을 때 톨루엔이 벤젠대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 벤젠과 톨루엔을 투여한 후 시간 경과에 따라 요중으로 페놀과 SPMA이 배설되는 양상을 관찰하여 벤젠의 농도에 따라 톨루엔이 벤젠대사에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 한다.

Table 1. Experimental groups and doses of organic solvents administered

Reagents & doses(mg/kg)	Number of rats
Control	6
Benzene 2.26	6
Benzene 2.26 + Toluene 106.42	6
Benzene 9.02	6
Benzene 9.02. + Toluene 106.42	6
Total	30

대상 및 방법

1. 실험대상

생후 7-8 주이고, 체중이 230±10 g인 30마리의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 계통 보존실에서 품질검사를 거친 후 SPF(Specific Pathogen Free) 동물 실험실(Divisiion of Laboratory Animal Medicine, Medical Research Center, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea)에서 사육 및 실험을 실시하였다.

벤젠 및 톨루엔 경구 투여량은 미국 산업위생협회의 노출기준(ACGIH, 2002)과 우리나라의 화학물질 및 물리적인자의 노출기준(노동부, 1998)을 이용하여 결정하였다. 벤젠은 우리나라의 8시간 시간가중평균 노출기준인 10 ppm과 미국 산업위생협회의에서 권고하는 단시간 노출기준인 2.5 ppm에 해당하는 수준을 이용하였다. 벤젠과 동시 투여하는 톨루엔은 우리나라의 8시간 시간가중평균 노출기준인 100 ppm에 해당하는 용량을 사용하였다. 경구 투여량 환산은 흰쥐의 호흡량(Guyton, 1947), 체중 그리고 유기용제의 체내 흡수율(Dean, 1978)을 고려하여 (1), (2) 및 (3)식에 의해 계산하였다. 벤젠은 기중 농도 10 ppm에 해당하는 9.02 mg/kg body weight와 2.5 ppm에 해당하는 2.26 mg/kg body weight로 계산되었다. 그리고 톨루엔은 기중 농도 100 ppm에 해당하는 106.42 mg/kg body weight를 결정하였다.

$$D = \frac{K \cdot V \cdot M \cdot C}{L \cdot W} \dots \dots \dots (1)$$

$$V = \text{Respiratory Volume (cc/min)} \times 60 \times 8 \dots (2)$$

Respiratory

$$\text{Volume} = 2.1 \times (\text{Body weight, g})^{\frac{3}{4}} \dots (3)$$

(cc/min)

D : 경구투여 용량(mg/kg body weight)

K : 유기용제의 체내 흡수율

V : 흰쥐의 8시간 호흡량(l)

M : 유기용제의 분자량(g)

C : 유기용제의 단시간 허용농도(ppm)

L : 기체상수(22,400 cc)

W : 흰쥐의 체중(kg)

실험 동물군은 벤젠 단독 투여군, 벤젠과 톨루엔 동시 투여군이며 대조군은 corn oil만을 투여한 군이다 (Table 1). 실험동물은 실험군 당 흰쥐 6마리로 모두 30마리를 사용하였다. 벤젠 및 톨루엔은 corn oil로 희석하여 1 ml/kg body weigh로 경구 투여하였다. 투여방법은 비교적 쉽고 안전한 curved ball-tipped gastric inoculation needle을 사용하였다(Baker 등, 1979).

실험 일주일 전부터 흰쥐를 대소변 분리가 가능한 metabolism cage에 넣고 사료와 음료를 자유롭게 섭취시켰다. 벤젠 및 톨루엔을 투여하기 24시간 전부터 흰쥐의 소변을 채취하여 유기용제 투여전 소변으로 사용하였다. 시료 채취시간은 예비실험을 통하여 결정하였으며 유기용제 투여후 3시간 간격으로 30시간까지 각각 소변을 채취하였다. 소변의 증발을 최소화하기 위하여 마개가 달린 urine collection vessel을 이용하였다.

Table 2. Gas chromatograph/flame ionization detector operating conditions for phenol

Descriptions	Conditions
Instrument	HP 6890 series plus
Detector	Flame ionization detector
Column	Ultra-2(30m × 0.32mm ID × 0.3 μm, HP, USA)
Temperature	Injection port : 250 °C Detector: 250 °C Column oven : 180 °C
Carrier gas	N ₂ , 1 ml/min
Injection volume	1.0 μl
Split ratio	5 : 1

Table 3. Gas chromatograph/mass selective detector operating conditions for methylated S-phenylmercapturic acid

Descriptions	Conditions
Instrument	HP 5890 series II - HP 5972
Detector	HP 5972 mass selective detector
Column	Carbowax 20M(25m × 0.32 mm ID × 0.3 μm, HP, USA)
Temperature	Injection port : 250 °C Detector: 280 °C Column oven : 120 °C for 3 min 7 °C/min → 220 °C for 13min
Carrier gas	He 1.0 ml/min
Injection volume	1.0 μl
Split ratio	Splitless mode

2. 실험방법

1) 요중 페놀의 전처리 및 분석

벤젠 대사물질인 페놀은 Kawai와 Horiguchi (1979)의 방법으로 isopropyl ether로 추출하여 가스 크로마토그래프/불꽃이온화 검출기(Gas chromatograph/Flame ionization detector, HP 6890 series plus, USA, 이하 GC/FID)로 분석을 하였다(Table 2). 검출 확인은 가스 크로마토그래프/질량선택검출기(Gas chromatograph/Mass Selective Detector, HP 5890/MSD 5972, USA, 이하 GC/MSD)를 이용하였다.

2) S-Phenylmercapturic acid의 전처리 및 분석
벤젠의 요중 대사물질인 SPMA의 분석은 디아조메탄으로 메틸화를 하여 GC/MSD로 분석을 하였다(Angerer 등, 1998). 소변시료의 전처리는 일정량의

소변에 내부표준물질 용액(o-phthalic acid)을 가한 후 ethyl acetate를 첨가한 다음 20분간 흔들여 주고 1,500 rpm으로 4분간 원심분리하여 유기용매층을 추출한다. 추출한 유기용매층을 감압증발기(vacuum evaporator)에서 40 °C로 가온하며 유기용매를 증발 건조시킨다. 증발잔류물을 메탄올 1.5 ml에 녹인 후 마개달린 시험관에 옮긴다. 디아조메탄/에테르 용액 1.5 ml를 가하여 상온에서 1시간 가량 메틸화시키고 반응이 끝난 용액의 상등액을 GC/MSD에 주입하여 분석하였다(Table 3).

3) Creatinine 분석

요중 대사물질의 분석농도를 보정하기 위하여 요중 크레아티닌을 분석하였다. 요중 크레아티닌의 정량분석은 소변을 증류수로 10배 희석하여 여과한 후 HPLC/UV로 분석하였다.

Table 4. Concentration of urinary phenol after benzene-toluene administration

Time	Control	Bz 2.26 mg/kg	Bz 2.26 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg	Bz 9.02 mg/kg	Bz 9.02 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg
0 hr	2.62±0.49	4.69±2.00	2.82±0.60	2.41±0.38	1.69±0.72
3 hrs	6.74±1.10	37.26±5.63**	9.45±0.88	68.54±4.78 [#]	3.66±1.42
6 hrs	2.82±0.60	16.40±3.15	11.27±3.96	45.99±2.66 [#]	14.89±1.86
9 hrs	3.04±0.59	13.17±5.36	11.31±2.77	22.69±1.98 [#]	26.57±3.38
12 hrs	5.86±0.53	4.00±0.47**	7.75±1.69	9.96±1.32 [#]	16.75±4.56
15 hrs	2.86±0.63	1.98±0.61**	4.06±1.09	3.70±0.11 [#]	7.18±1.46
18 hrs	3.55±0.42	3.73±0.67*	4.88±1.91	3.57±0.31 [#]	8.63±3.20
21 hrs	3.18±0.40	3.37±1.10	3.43±0.84	2.68±0.28 [#]	3.68±0.53
24 hrs	1.87±0.46	4.17±1.32*	1.74±1.30	1.90±0.21	2.83±0.82
27 hrs	2.01±0.25	2.15±0.45*	3.39±0.63	1.69±0.11	3.44±2.25
30 hrs	2.41±0.38	3.00±1.01	2.75±1.46	2.03±0.16	3.31±2.42

Unit: mg/g creatinine, N=6

** , P<0.01; * , P<0.05 by Wilcoxon signed rank test for Bz 2.26 mg/kg and Bz 2.26 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg

[#] , P<0.01; [^] , P<0.05 by Wilcoxon signed rank test for Bz 9.02 mg/kg and Bz 9.02 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg

3. 통계학적 분석

벤젠 단독 투여군과 벤젠-톨루엔 동시투여군간의 시간별 요중 SPMA와 페놀의 농도가 차이가 있는가를 검정하기 위하여 Wilcoxon signed rank test를 실시하였다. 모든 자료분석은 SAS 통계 패키지를 이용하였다.

결 과

1. 톨루엔이 요중 페놀의 배설에 미치는 영향

유기용제가 포함되지 않은 corn oil 만을 투여한 대조군의 요중 페놀 농도는 시간에 따라 큰 변화 없이 1.87-6.74 mg/g creatinine이었다. 벤젠을 2.26 mg/kg으로 단독 투여한 군의 최고 요중 페놀 농도는 투여후 3시간에서 32.76 mg/g creatinine이었으며 벤젠 2.26 mg/kg과 톨루엔 106.42 mg/kg을 동시 투여한 군의 최고 요중 페놀 농도는 투여후 9시간에서 11.31 mg/g creatinine이었다 (Table 4). 벤젠 투여량 2.26 mg/kg에서는 투여후 3시간에서 요중 페놀 농도가 벤젠-톨루엔 동시 투여군보다 벤젠 단독 투여군에서 유의하게 높았으며 (P<0.01) 그후 12시간에서 18시간까지는 벤젠 단독 투여군 보다 벤젠-톨루엔 동시 투여군의 요중 페놀 배설농도가 통계학적으로 유의하게 높았다

(P<0.05).

벤젠 9.02 mg/kg으로 단독 투여한 군의 최고 요중 페놀 농도도 투여후 3시간에서 68.54 mg/g creatinine이었으며 벤젠 9.02 mg/kg과 톨루엔 106.42 mg/kg을 동시 투여한 군의 최고 요중 페놀 농도도 투여후 9시간에서 26.75 mg/g creatinine이었다 (Table 4). 벤젠 투여량 9.02 mg/kg에서는 투여후 3시간, 6시간까지는 요중 페놀 농도가 벤젠-톨루엔 동시 투여군보다 벤젠 단독 투여군에서 유의하게 높았으며 (P<0.01) 그후 9시간에서 21시간까지는 벤젠 단독 투여군보다 벤젠-톨루엔 동시 투여군의 요중 페놀 배설농도가 통계학적으로 유의하게 높았다 (P<0.05).

벤젠 단독 투여군 (최고 농도 도달시간 3시간)보다 벤젠과 톨루엔 동시 투여군들의 요중 페놀이 최고 농도에 도달하는 시간 (최고 농도 도달시간 9시간)이 연장되었으며 투여후 초기에는 벤젠 단독 투여군의 요중 페놀 농도가 높다가 12시간 이후에는 오히려 벤젠-톨루엔 동시 투여군의 요중 페놀 농도가 높은 경향을 보였다. 이것은 톨루엔이 요중 페놀 배설시간을 지연시켰다고 사료된다.

벤젠 단독 투여군 및 벤젠과 톨루엔 동시 투여군의 시간에 따른 요중 페놀의 누적 배설량은 벤젠과 톨루엔 동시 노출군에서 벤젠의 단독 투여군보다 요중으로 배설되는 페놀 총량이 감소하였다(Fig. 1).

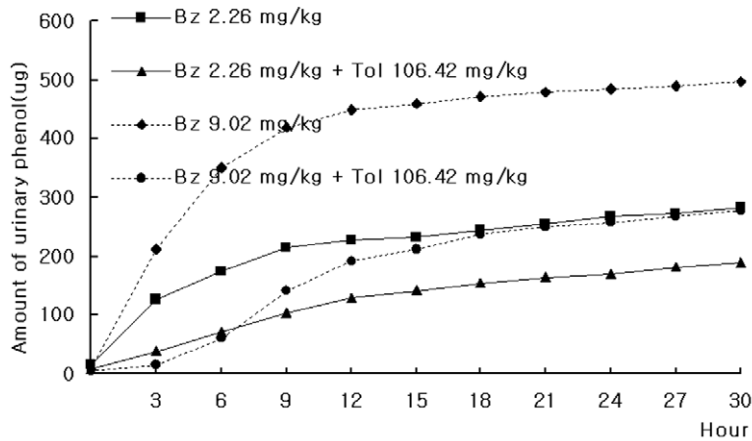


Fig. 1. Cumulative excretion amounts of urinary phenol after benzene-toluene administration.

Table 5. Concentration of urinary S-phenylmercapturic acid after benzene-toluene administration

Time	Control	Bz 2.26 mg/kg	Bz 2.26 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg	Bz 9.02 mg/kg	Bz 9.02 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg
0 hr	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
3 hrs	N.D	5.45±1.19*	0.98±0.30	2.32±0.81 [#]	0.87±0.35
6 hrs	N.D	4.16±2.38**	2.43±2.15	12.27±4.06 [#]	2.18±0.45
9 hrs	N.D	1.50±0.68	0.8±0.04	3.28±1.04 [#]	1.22±0.64
12 hrs	N.D	0.75±0.33	0.49±0.22	1.56±0.46	1.45±0.12
15 hrs	N.D	0.32±0.07*	0.53±0.22	0.38±0.12 [#]	0.92±0.24
18 hrs	N.D	0.13±0.03	0.25±0.15	0.10±0.03	0.14±0.11
21 hrs	N.D	0.10±0.01**	0.22±0.07	0.02±0.02	1.06±0.98
24 hrs	N.D	0.09±0.01**	0.14±0.04	0.01±0.01 [#]	0.45±0.12
27 hrs	N.D	0.09±0.01	0.12±0.02	0.01±0.01	0.21±0.19
30 hrs	N.D	0.13±0.04	0.14±0.14	0.01±0.02 [#]	0.13±0.03

Unit: mg/g creatinine, N=6, N.D, not detected

** , P<0.01; * , P<0.05 by Wilcoxon signed rank test for Bz 2.26 mg/kg and Bz 2.26 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg

[#] , P<0.01; [‡] , P<0.05 by Wilcoxon signed rank test for Bz 9.02 mg/kg and Bz 9.02 mg/kg + Tol 106.42 mg/kg

톨루엔에 의한 요중 페놀 배설량 감소는 벤젠 투여 용량 2.26 mg/kg보다 9.02 mg/kg의 투여 용량에서 확실하게 나타났다.

2. 톨루엔, 2 요중 S-phenylmercapturic acid의 배설에 미치는 영향

Corn oil 만을 투여한 대조군에서는 요중 SPMA가 모든 시료 채취시간에서 검출되지 않았다. 벤젠

2.26 mg/kg을 단독으로 투여한 군의 최고 요중 SPMA 농도는 투여후 3시간에서 5.45 mg/g creatinine이었으며 벤젠 2.26 mg/kg과 톨루엔 106.42 mg/kg을 동시 투여한 군의 최고 요중 SPMA 농도는 투여후 6시간에서 2.43 mg/g creatinine이었다(Table 5). 벤젠 투여량 2.26 mg/kg에서는 투여후 3시간, 6시간에서 요중 SPMA 농도가 벤젠-톨루엔 동시 투여군보다 벤젠 단독 투여군에서 유의하게 높았으며(P<0.05) 그후 15시간, 21

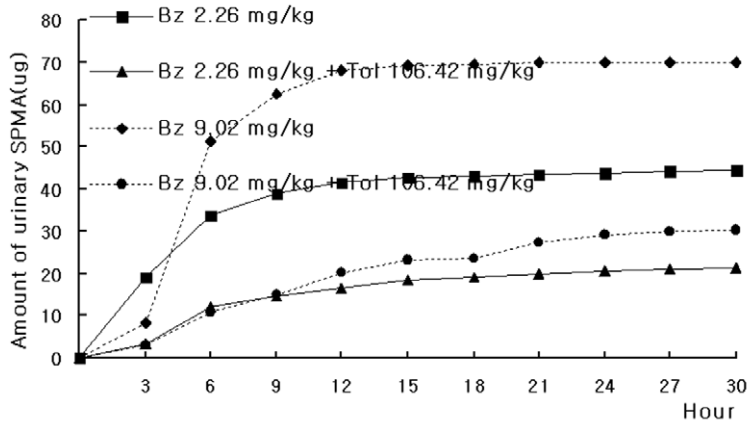


Fig. 2. Cumulative excretion amounts of urinary S-phenylmercapturic acid after benzene-toluene administration.

시간, 24시간에서는 벤젠 단독 투여군 보다 벤젠-톨루엔 동시 투여군의 요중 SPMA의 배설농도가 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.05$).

벤젠 9.02 mg/kg으로 단독 투여한 군은 투여후 6시간에서 12.27 mg/g creatinine이었으며 벤젠 9.02 mg/kg과 톨루엔 106.42 mg/kg을 동시 투여한 군의 최고 요중 SPMA 농도는 투여후 6시간에서 2.18 mg/g creatinine이었다(Table 5). 벤젠 투여량 9.02 mg/kg에서는 투여후 3시간에서 9시간까지 요중 SPMA 농도가 벤젠-톨루엔 동시 투여군보다 벤젠 단독 투여군에서 유의하게 높았으며 ($P < 0.01$) 그후 15시간, 24시간, 30시간에서는 벤젠 단독 투여군 보다 벤젠-톨루엔 동시 투여군의 요중 SPMA의 배설농도가 통계적으로 유의하게 높았다 ($P < 0.01$).

벤젠 투여량이 2.26 mg/kg인 경우 단독 투여시에는 최고 농도가 3시간이었고 톨루엔과 동시 투여했을 때는 3시간이 연장되어 투여후 6시간에서 최고 농도가 되었다. 그러나 벤젠 투여량이 9.02 mg/kg에서는 단독 투여한 경우와 톨루엔과 동시 투여한 경우 모두 6시간에서 최고 농도가 되었다. 투여후 초기에는 벤젠 단독 투여군의 SPMA의 배설농도가 높다가 15시간 이후에는 오히려 벤젠-톨루엔 동시 투여군의 요중 SPMA의 배설농도가 높은 경향을 보였다. 이러한 현상은 톨루엔이 요중 SPMA의 배설을 지연시켰다고 사료된다.

벤젠 단독 및 벤젠과 톨루엔 동시 투여한 후 시간 경과에 따라 나타난 요중 SPMA의 누적 배설양상은 벤젠과 톨루엔 동시 투여군에서 벤젠 단독 투여군보다 SPMA가 요중으로 배설되는 총량이 감소하였다 (Fig. 2). 톨루엔에 의한 SPMA의 감소양상은 벤젠의 투여 용량 9.02 mg/kg에서 투여 용량 2.26 mg/kg보다 확실하게 나타났다.

고 찰

벤젠은 독성이 매우 높아 최근에 와서는 근로자들에 대한 노출기준이 엄격해지는 경향이 있으며 이에 따라 정확한 노출평가에 대한 관심이 고조되고 있다. 벤젠은 피부흡수 가능 물질이므로(노동부, 1998; ACGIH, 2002) 생물학적 모니터링을 이용한 노출평가가 필요하다. 실제로 근로자들이 작업장에서 벤젠에 노출될 때는 단일 물질로 노출되는 경우는 거의 없으며 다른 물질들과 함께 노출되는 경우가 대부분이다. 그러나 생물학적 지표로 사용하는 페놀(노동부, 1998)과 SPMA가 벤젠과 함께 노출되는 물질에 의하여 어떠한 영향을 받는지 평가한 연구는 미흡하다.

벤젠이 체내에 흡입되면 1차적으로 산화과정을 거치고 요중 페놀과 SPMA가 생성되기 때문에 두 물질의 생성과정 초기는 같은 대사 경로이다. 이때의 산화과정은 CYP 450 2E1에 의하여 벤젠이 ben-

zene oxide와 benzene oxepin으로 빠르게 전환된다(Lindstrom 등, 1997). 이후의 폐놀 생성기전은 benzene oxide의 자연적인 재배열에 의하여 이루어지고 포합체 형태로 소변에 배설되기 때문에 (Kenyon 등, 1998) 폐놀 생성에 영향을 크게 주는 인자는 벤젠의 산화과정에 관여하는 CYP 450 2E1의 활성도이다. SPMA는 benzene oxide의 형태에서 glutathione과 포합체를 형성하여 배설되기 때문에(Dor 등, 1999; Nedelcheva 등, 1999) SPMA의 생성에 영향을 주는 인자는 산화과정에 관여하는 CYP 450 2E1와 glutathione 농도이다.

톨루엔이 벤젠 대사물질인 요중 폐놀과 SPMA의 생성에 영향을 미친 결과를 살펴보면, 벤젠을 2.26 mg/kg으로 단독 투여한 군에서는 요중 SPMA와 폐놀이 3시간에서 가장 높은 농도를 보였지만 벤젠 2.26 mg/kg과 톨루엔 106.42 mg/kg을 동시 투여한 군에서는 요중 SPMA는 6시간 그리고 요중 폐놀은 9시간에서 최고 농도로 나타나 요중 대사물질들의 최고 농도 도달시간이 늦어졌다. 또한 벤젠을 2.26 mg/kg으로 투여한 군의 요중 폐놀의 배설 반감기의 평가에서도 단독 투여군은 2.8시간, 톨루엔 동시 투여군은 3.7시간이었으며 요중 SPMA의 반감기는 단독 투여군은 1.5시간이었고 톨루엔 동시 투여군은 2.1시간으로 배설 반감기가 두 물질 모두에서 길어졌다. 벤젠 9.02 mg/kg 단독 투여 군인 경우는 요중 폐놀은 3시간, 요중 SPMA는 6시간에 최고 농도로 나타났고 톨루엔 동시 투여 군은 요중 폐놀이 9시간, 요중 SPMA는 6시간에서 최고 농도로 나타나 톨루엔과 동시 노출되는 경우 요중 폐놀은 최고 농도로 나타나는 시간이 늦어졌지만 SPMA의 경우는 최고 농도시간이 단독 투여군과 같게 나타났다. 그러나 벤젠을 9.02 g/kg으로 투여한 군의 요중 폐놀의 배설 반감기를 평가한 결과에서는 단독 투여군은 1.6시간, 톨루엔 동시 투여군은 3.1시간이었으며 요중 SPMA의 반감기는 단독 투여군은 1.1시간이었고 톨루엔 동시 투여군은 2.3시간으로 배설 반감기가 두 물질 모두에서 지연되는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 톨루엔이 벤젠 대사의 초기과정인 산화과정에 관여하는 CYP450 2E1을 억제하기 때문에 나타난 현상이다(Ikeda 등, 1972; Andrews 등, 1977; Purcell 등, 1990). 노재훈 등(1988)은 산업장에서 단시간 허용농도에 해당하는 톨루엔과

벤젠을 흰쥐를 대상으로 동시 투여한 것이 벤젠을 단독 투여한 것 보다 요중 폐놀이 감소하였고 최고 농도에 이르는 시간도 지연되어 본 연구와 일치하였다.

벤젠과 톨루엔 동시 투여군은 벤젠의 단독 투여군에 비하여 요중으로 배설되는 폐놀 및 SPMA의 총량(amount)이 감소하였으며 이러한 현상은 벤젠 투여용량 9.02 mg/kg에서 2.26 mg/kg보다 확실하게 나타났다. 이러한 현상은 흰쥐에게 벤젠을 과량(9.02 mg/kg) 경구 투여하여 일부가 혈액으로 흡수되지 않고 소화기관을 통해서 배설되어 나타난 결과일 수도 있다. 또한 벤젠이 체내에 유입되면 산화과정이 빠르게 진행되어 benzene oxide와 benzene oxepin으로 평형이 된 후(Lindstrom 등, 1997) 서로 다른 대사과정을 거쳐 3가지 형태의 대사물질이 나타나기 때문에(Snyder와 Hedli, 1996; Medeiros 등, 1997; Dor 등, 1999; Nedelcheva 등, 1999; Sukhodub와 Padalko, 1999) 폐놀과 SPMA이 생성되는 대사경로 이외에 다른 경로로 많은 양이 이동되어 나타날 수도 있다. 첫 번째 대사물질의 형태는 ring-hydroxylated metabolites로 폐놀과 hydroquinone, catechol 그리고 이 두 물질의 hydroxylation의 산물인 1,2,4-trihydroxybenzene이 포함되며 ethereal sulfates와 glucuronides의 포합체형태로 소변에 배설된다(Parke와 Williams, 1953; Kenyon 등, 1998). 폐놀의 형성은 에폭사이드(epoxide)의 자연적인 재배열에 의해 이루어지고 hydroquinone과 catechol은 폐놀의 hydroxylation에 의해 생성된다(Sawahata와 Neal, 1983; Gilmour 등, 1986). 또한 catechol은 다른 경로를 통하여 benzene trans-dihydrodiol이 dehydrogenase에 의해 산화가 되어 형성된다(Jerina와 Daly, 1974; Bentley 등, 1976; Vogel 등, 1980). 두 번째 ring-opened metabolites의 생성은 epoxide를 거쳐 trans, trans-muconaldehyde가 되고(Latriano 등, 1986) 이 물질이 산화되어 trans, trans-muconic acid와 6-hydroxy-trans, trans-2,4-hexadienoic acid가 형성된다(Kirley 등, 1989). 세 번째의 대사물질들은 추가적인 해독과정의 마지막 단계인 glutathione과 포합되어 N-acetyl-S-(2,5-dihydroxyphenyl)-L-cysteine과 S-phenyl mercapturic acid가 생성된다. 따라서 벤젠의 독성 및 생물학적모니터링의 기초자료를 위하여 요중 폐

늘과 SPMA로 대사되지 않은 벤젠에 대한 대사과정을 관찰하는 연구가 지속적으로 필요하다.

벤젠의 기중농도가 5 ppm 이상인 경우에만 비 노출군 보다 분명하게 높게 나타나고(Dor 등, 1999) 벤젠 노출농도가 10 ppm 또는 그 이상의 농도에서 생물학적 지표로 적당하다고 알려져 있는(Boogaard 등, 1996; Van Sitter 등, 1993; Lauwerys 등, 1979) 요중 페놀을 이용하여 노출평가를 실시할 때 근로자들이 작업장에서 톨루엔과 동시 노출되거나 음주습관에 의하여 낮은 평가를 할 수가 있다. 또한 낮은 농도의 벤젠 노출에서도 용량-반응의 타당성이 높아 생물학적 지표로 적당하다고 알려져 있는(Van Sittert 등, 1993; Ghittori 등, 1995; Boogaard 등, 1996; Dor 등, 1999) SPMA의 경우도 생물학적 모니터링을 실시할 때 톨루엔의 영향으로 벤젠의 노출평가가 낮아질 수 있다.

앞으로의 연구에서는 음주습관과 톨루엔의 노출기간에 따라 요중 페놀과 SPMA 배설의 차이를 확인할 필요가 있다. 또한 미국 산업위생협회의에서 생물학적 지표로 새로이 추가한 trans, trans-muonic acid는 페놀과 SPMA의 대사기전과 다르고 음식물, 흡연 그리고 톨루엔에 많은 간섭을 받으므로(Dor 등, 1999) 이 분야에 대한 충분한 연구가 이루어져야 한다.

요 약

목 적 : 벤젠 노출 근로자들을 대상으로 톨루엔에 동시 노출되는 상태에서 생물학적 모니터링을 실시할 때 노출평가의 정확성을 높이기 위하여 실시하였다.

방 법 : 벤젠은 미국 산업위생협회의에서 권고하는 단시간 노출기준인 2.5 ppm에 해당하는 2.26 mg/kg body weight와 우리 나라의 8시간 시간가중평균 노출기준인 10 ppm에 해당하는 9.02 mg/kg body weight의 용량으로 경구 투여하였다. 동시 투여하는 톨루엔은 우리 나라의 8시간 시간가중평균 노출기준인 100 ppm에 해당하는 106.42 mg/kg body weight로 결정하였다. 경구투여후 시간대별로 요중 벤젠 대사물질인 SPMA와 페놀을 가스 크로마토그래피와 질량분석기로 측정하였다.

결 과 : 벤젠과 톨루엔을 동시에 투여한 군의 요중 페놀과 SPMA 배설농도가 초기에는 벤젠 단독 투여

군에 비하여 크게 감소하였다가 시간 경과에 따라 약간 높아졌다.

벤젠과 톨루엔 동시 투여군의 요중 페놀 및 SPMA의 배설 총량이 벤젠 단독 투여군에 비하여 감소하였으며 이러한 현상은 벤젠 투여용량 9.02 mg/kg에서 2.26 mg/kg보다 뚜렷하였다.

톨루엔을 동시에 투여한 경우에는 요중 페놀 및 SPMA의 배설이 전반적으로 지연되었으나 이러한 영향은 벤젠 투여용량에 따라 달랐다.

결 론 : 톨루엔이 벤젠의 요중 대사물질인 페놀과 SPMA의 배설을 감소 시켰음을 알 수 있다. 따라서 이러한 결과는 산업장에서 근무하는 벤젠 노출 근로자들을 대상으로 생물학적모니터링을 실시할 때 톨루엔에 동시 노출된다면 이의 결과가 실제보다 낮은 수준으로 평가될 수 있음을 유의해야 한다.

참고문헌

- 노동부. 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준 (고시 제97-65호). 1998.
- 노재훈, 신동천, 박정균, 문영한, 정호근. 단시간 허용농도의 toluene이 benzene대사에 미치는 영향. 예방의학회지 1988;21(1):152-162.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Threshold limit values and biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati, OH, 2002.
- Aksoy M, Erdem S, Dincol T, Hepyuksel T, Dincol G. Chronic exposure to benzene as a possible contributory etiologic factor in Hodgkin's disease. Blut 1974;28:293-298.
- Andrews LS, Lee EW, Witmer CM, Kocsis JJ, Snyder R. Effect of toluene on the metabolism, disposition, and hemopoietic toxicity of 3H benzene. Biochem Pharmacol 1977;26:293-300.
- Angerer J, Schildbath M, Kramer A. Gas chromatographic method for the simultaneous determination of s-p-toluylmercapturic acid and s-phenylmercapturic acid in human urine. J Anal toxicol 1998;21:211-214.
- Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. The laboratory rat (Vol. II): Research application. American college of laboratory animal medicine series, Academic press, New York, 1979.
- Bentley P, Sschassmann H, Sims P, Oesch F. Epoxides derived from various polycyclic hydro-

- carbons as substrates of homogeneous and microsomal epoxide hydratase. A general assay and kinetic properties. *Eur J Biochem* 1976; 69: 97-103.
- Boogaard PJ, van Sittert NJ. Biological monitoring of exposure to benzene: A comparison between S-phenylmercapturic acid, trans, trans-muconic acid, and phenol. *Occup Environ Med* 1995; 52: 611-620.
- Boogaard PJ, van Sittert NJ. Suitability of S-phenyl mercapturic acid and trans-trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1151-1157.
- Bore THJ, Backer HJ. Diazomethane. *Org Synth* 1950; 30: 16.
- Dean B. Genetic toxicology of benzene, toluene, xylene and phenols. *Mutation Res* 1978; 47: 75-97.
- Dor P, Dab W, Empeur-Bissonnet P, Zmirou D. Validity of biomarkers in environmental health studies: The case of PAHs and benzene. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29(2): 129-168.
- Einig T, Dunemann L, Dehnen W. Sensitive gas chromatographic method for determination of mercapturic acids in human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996; 687: 379-385.
- Gilman AG, Goodman LA, Gilman A. The Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics, 7th ed. New York MacMillan Publishing Co 1985.
- Ghittori S, Maestri L, Fioretino ML, Imbriani M. Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 67: 195-200.
- Gilmour SK, Kalf GF, Synder R. Comparison of the metabolism of benzene and its metabolite phenol in rat liver microsomes. *Adv Exp Med Biol* 1986; 197: 223-235.
- Green JD, Synder CA, Lobue J, Goldstein BD, Albert RE. Acute and chronic dose-response effect of benzene inhalation on the peripheral blood, bone marrow and spleen cells of CD-1 male mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 59: 204-214.
- Guyton AC. Management of the respiratory volumes of laboratory animals. *Am J Physiol* 1947; 150: 70-77.
- Ikeda M, Ojtsuji H, Imamura T. In vivo suppression of benzene and styrene oxidation byco-administered toluene in rats and effects of phenobarbital. *Xenobiotica* 1972; 2: 101-106.
- Jerina DM, Daly JW. Arene oxides: a new aspect of drug metabolism. *Science* 1974; 185: 573-582
- Kawai T, Horiguchi S. On the amount of phenol normally excreted in the urine in male Japanese. *Jap J Ind Health* 1979; 21: 376-377.
- Kenyon EM, Seaton MJ, Himmelstein MW, Asgharian B, Medinsky MA. Influence of gender and acetone pretreatment on benzene metabolism in mice exposed by nose-only inhalation. *J Toxicol Environ Health* 1998; 55(6): 421-43.
- Kirley TA, Goldstein BD, Maniara WM, Witz G. Metabolism of trans,trans-muconaldehyde, a microsomal hematotoxic metabolite of benzene by purified yeast aldehyde dehydrogenase and mouse liver soluble fraction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 100: 360-367.
- Latriano L, Goldstein BD, Witz G. Formation of muconaldehyde, an open-ring metabolite of benzene, in mouse liver microsomes: an additional pathway for toxic metabolites. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1986; 83: 8356-8360.
- Lauwerys R. Human biological monitoring of industrial chemicals. I. Benzene. Luxembourg: Commission of the European Communities, 1979.
- Lindstrom AB, Yeowell-O'Connell K, Waidyanatha S, Golding BT, Tornero-Velez R, et al. Measurement of benzene oxide in blood of rats following administration of benzene. *Carcinogenesis* 1997; 18(8): 1637-1641.
- Mara SJ, Lee SS. Assessment of human exposures to atmospheric benzene. Research Triangle Park, North Carolina, US Environmental Protection Agency (EPA/450/378-031), U.S.A., 1978.
- Mathews JM, Etheridge AS, Matthews HB. Dose-dependent metabolism of benzene in hamsters, rats, and mice. *Toxicological Science* 1998; 44(1): 14-21.
- Medeiros AM, Bird MG, Witz G. Potential biomarkers of benzene exposure. *J Toxicol Environ Health* 1997; 51(6): 519-539.
- Medinsky MA, Schlosser PM, Bond JA. Critical issues in benzene and metabolism: the effect of interactions with other organic chemicals on risk assessment. *Environ Health Perspect* 1994; 102 suppl: 119-124.
- National Institute of Safety and Health (NIOSH). A NIOSH technical report: Guidelines for air-

- sampling and analytical method development and evaluation. DHHS (NIOSH) publication. Cincinnati, Ohio, 1995: 65-66.
- Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Tichavska B, Tynkova L, et al. Metabolism of benzen inhuman liver microsomes : individual variations in relation to CYP2E1 expression. Arch Toxicol 1999;73(1):33-40.
- Parke DV, Williams RT. Studies in detoxication 49: The metabolism of benzene containing [14C]benzene. Biochem J 1953; 54: 231-238.
- Pathiratne A, Puyer RL, Brammer JD. A comparative study of the effects of benzene, toluene and xylene on their in vitro metabolism and drug-metabolizing enzyme in rat liver. ToxicolAppl Pharmacol 1986;78:489-490.
- Purcell KJ, Cason GH, Gargas ML, Andersen ME, Travis CC. In vivo metabolic interactions of benzene and toluene. Toxicol Lett 1990;42 :141-152.
- RIVM. Integrated criteria document on benzene. Bilthoven, The Netherlands, National Institute for Public Health and Environmental Protection, 1988:138 (Report No. 758476003).
- Roh JH, Moon YH, Kim KY. The cytogenetic effects of benzene and toluene on bone marrow-cells in rats. Yonsei Med J 1987;28(4):297-309
- Rozman C, Woessner S, Saez-Serrania J. Acute erythromyelosis after benzene poisoning. ActaPharmacol 1979;48:249-256.
- Sawahata T, Neal RA. Biotransformation of phenol to hydroquinone a catechol by rat liver microsomes. Mol Pharmacol 1983; 23: 453-460.
- Sukhodub AL, Padalko VI. Age-dependent changes in rat liver microsomal membranestructure and functions under benzene treatment. Mechanisms of Aging and Development1999: 106(3):273-82.
- Snyder R, Hedli CC. An overview of benzene metabolism. Environ Health Perspect1996: 104:1165-1171.
- Van Sitter NJ, Boogaard PJ, Beulink GD. Application of the urinary S-phenylmercapturic acidtest as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. Br J Ind Med1993 :50(5):460-469.
- Vigliani EC, Saita G. Benzene and leukemia. N Eng J Med 1964;271:872-876.
- Vogel K, Bentley P, Platt KL, Oesch F. Rat liver cytoplasmic dihydrodiol dehydrogenase. J Biol Chem 1980: 255: 9621-9625.
- William E, Bechtold, Michael R. Strunk. S-phenylcysteine in Albumin as a benzene biomarker. Environ Health Perspect 1996;104:1147-9.
- Windholz M, Budavari S, Blumetti RF, Otterbein ES. The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 10th ed. Rahway, New Jersey, Merck and Co., Inc.,1983:151.