

흰쥐의 적출 간 관류법을 이용한 벤지딘 대사에 관한 연구

연세대학교 의과대학 산업보건연구소, 보건과학대학 산업환경학과*

배문주 · 노재훈 · 조영봉* · 김춘성 · 전미령 · 김치년

— Abstract —

The study on the metabolism of benzidine in the isolated perfused rat liver

Mun Joo Bae, Jae Hoon Roh, Young Bong Cho*, Choon Sung Kim,
Mi Ryoung Chun, Chi Nyon Kim

*Institute for Occupational Health, College of Medicine, Department of Industrial Environment & Health,
College of Health Science*, Yonsei University*

Benzidine, an aromatic amine used primarily in the manufacture of azo dyes, is recognized as a urinary bladder carcinogen in humans. In rats, mice, and hamsters, chronic exposure to benzidine resulted in tumors of the liver. The present study was undertaken to suggest analyzing the metabolites of benzidine with the optimal condition, identify the metabolites of benzidine, and observe time variance of the metabolites in the isolated perfused rat liver. N-acetylbenzidine was synthesized by acetylation of benzidine with acetic anhydride and separated by thin layer chromatography(TLC) and high performance liquid chromatography(HPLC). To analysis benzidine and the metabolites of benzidine, HPLC operating condition has been optimized by means of preliminary experiment. The mobile phase consisted of acetonitrile(37%) in phosphate buffer, flow rate maintained at 1.0 ml/min. Optimal detective conditions were electrochemical detector(ECD) at 0.75 V for benzidine and N-acetylbenzidine and ultraviolet detector(UVD) at 287 nm for N,N'-diacetylbenzidine. The separation system was composed of a guard column and a separation column(Polymer C18, 4.6 × 250 cm) at a temperature of 40°C. The perfusion system was equilibrated for 30 minutes before addition of benzidine to the perfusate. Samples of the perfusate were collected at time intervals(0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min) during the 2 hour perfusion. Before analyzing samples by HPLC/ECD/UVD, samples had been treated with sep-pak. Samples of perfusate analyzed by HPLC/ECD/UVD and the metabolites of benzidine in the isolated perfused rat liver were N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine. Benzidine metabolized over 60% during the initial 30 minutes of perfusion, extensively by 1 hour, and was undetectable in the perfusate. N-acetylbenzidine increased by 30 minutes of perfusion,

※ 본 연구는 1995년도 연세대학교 산업보건연구소의 연구비로 이루어졌음.

Abbreviations used are : BZ, benzidine; ABZ, N-acetylbenzidine; DABZ, N,N'-diacetylbenzidine

declined. N,N'-diacetylbenzidine increased the 0-90 minutes period, remained constant during the 90 - 120 minutes period.

Key Words : Isolated liver perfusion, High Performance Liquid Chromatography, Electrochemical detector, Ultraviolet detector, Benzidine, N-acetylbenzidine, N,N'-diacetylbenzidine

I. 서 론

벤지딘과 벤지딘계 염료의 주요 생산은 프랑스, 인도, 폴란드, 한국으로 알려져 있으며(Meal 등, 1981), 방향족 니트로 아미노 화합물에 의한 직접성 비노기계 종양은 1895년 독일의 Rehn이 처음 보고한(Rehn, 1895) 후 계속된 연구에 의해 벤지딘이 주원인으로 평가되었다. 1974년부터 미국산업안전보건청(Occupational Safety and Health Administration, 이하 OSHA)에서는 벤지딘에 대한 허용폭로농도(permissible exposure limit, PEL)없이 인체 발암물질로 벤지딘을 취급하고 있으며, 제조, 가공, 그리고 재포장, 보관된 벤지딘의 무게 또는 용량으로 적어도 0.1%정도를 함유하고 있는 벤지딘, 고체, 액체 혼합물은 엄중한 통제를 미국산업안전보건청의 기준에서 요구하고 있다. 그리고 국립산업안전보건연구원(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)의 기준도 미국산업안전보건청의 기준과 동일하다. 벤지딘은 우리나라 노동부와 미국정부산업위생전문가협회(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH)에서도 허용농도의 규정없이 발암성 물질(A₁)으로 정하고 있다(OSHA, 1974; NIOSH, 1988; ACGIH, 1989; 노동부, 1991).

벤지딘은 주로 호흡기, 소화기를 통하여 흡수되며 특히 피부와 눈접촉으로도 많은 양이 흡수된다(Meal 등, 1981). 벤지딘에 급성 폭로되면 호흡곤란, 방광내 염증, 피부염을 야기시킬 수 있으며 만성 폭로시 적색뇨, 빈뇨, 배뇨곤란 등을 일으킨다고 알려져 있다. 그리고 벤지딘 사용 사업장에서는 높은 방광암 발병이 확인되었다(NIOSH, 1988).

서구 선진국에서는 1970년경부터 이미 벤지딘을 발암물질로 규정하여 사용을 금지시켰으며, 일본에서도 1972년부터 제조와 취급이 금지되었으나 우리

나라에서는 1950년에 황화염료인 국방색 및 흑색염료를 생산한 것이 유기합성 염료생산의 시초가 된 이후, 벤지딘에 대한 체계적인 연구가 필요함에도 벤지딘에 대한 연구는 극히 미흡한 실정이다.

이미 선진 외국에서는 많은 연구가 진행되어, Birner 등(1990)은 벤지딘 및 벤지딘계 염료를 투여하여 혈중 대사물질을 확인하였고, 흰쥐, 생쥐 등을 대상으로 한 동물실험에서 벤지딘에 만성적으로 폭로시키면 간에 종양이 발생하는 것을 관찰하였다(Haley, 1975; Nelson 등, 1982). Morton 등(1979)은 균질화된 간을 사용하여 벤지딘 대사물질을 관찰하였다. 그리고 벤지딘이나 아세틸벤지딘을 흰쥐와 생쥐에 투여하여 더욱이 구아노신 아세틸벤지딘을 관찰하였다(Martin 등, 1982).

그리고 이전의 연구결과로 종(species)에 따라서 벤지딘의 대사물질과 영향이 다르게 나타났는데, Morton 등(1980)에 따르면 흰쥐, 생쥐 등에서는 간이 표적기관이며 반면에 개와 토끼에서는 벤지딘이 가장 약한 발암성을 나타내고 원숭이에서는 발암성을 보여주지 않는다고 제안하였다.

현재 우리나라 작업환경측정 시료를 분석하기 위해서 고성능액체크로마토그래피와 자외선검출기를 이용하는 NIOSH의 분석방법(NIOSH, 1989)을 사용하고 있다. 하지만, 생물학적모니터링에 대한 연구로는 노재훈 등(1995)이 염료공장의 작업자를 대상으로 생물학적 모니터링에 관한 연구를 보고한 것이 유일하며 거의 전무한 상태이고 체계적인 분석방법에 대한 자료가 극히 부족한 실정이다. Manning 등(1985)은 벤지딘계 아조염료인 Direct Black 38을 아조 환원효소로 대사시켜서 대사물질인 벤지딘, 4-아미노비페닐(4-aminobiphenyl), 아세틸벤지딘, 아세틸아미노비페닐(acetylaminobiphenyl)을 기체크로마토그래피 질량분석기로 분석하였고, Lakshmi 등(1990)은 벤지딘을 개에 투여하여 대사물질과 대사형태를 고성능 액체크로마토그래피와 전기화학검출기를 이용하여 분석하였다. 그러므로

벤지딘 대사에 대한 체계적인 연구와 벤지딘을 최적으로 분석하기 위한 방법이 제안되어야 할 것이다.

벤지딘 대사 연구에 있어 여러 종에 따른 벤지딘의 영향과 대사물질은 다르게 나타나는 것을 알 수 있으며, 종에 따른 벤지딘의 영향과 대사물질을 정량적으로 규명하는 연구는 벤지딘의 독성연구에 있어서 필요하다. 특히 흰쥐에서 표적기관이 되고 있는 간에서의 벤지딘 대사를 관찰하기 위해서 많은 장점을 가지는 적출 간 관류법을 이용하는 것이 유용하다고 사료되며, 벤지딘 대사물질을 동시에 최적의 조건에서 분석하기 위해 고성능액체크로마토그래피와 자외선검출기, 그리고 전기화학검출기를 동시에 연결한 후 분석하고자 한다.

본 연구에서는 적출관류법을 이용하여 흰쥐의 간에서 벤지딘의 대사과정을 관찰하며 구체적인 연구의 목적은 다음과 같다.

첫째, 벤지딘과 벤지딘 대사물질 분석의 최적조건을 제안하고,

둘째, 적출 간 관류법을 통해서 대사된 벤지딘의 대사물질을 확인하며,

셋째, 벤지딘 대사물질의 시간적 변화를 관찰한다.

I. 실험재료 및 방법

1. 실험재료 및 용량

생후 8주에서 10주가 경과하고 체중이 240 ± 10 g 정도인 Sprague-Dawley계 흰쥐 30마리를 실험 동물로 하였으며 실험을 시작하기 일주일 전부터 실험동물의 사육장내 환경을 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $65 \pm 5\%$ 로 낮과 밤을 일정하게 유지하여 사육시켰다. 본 실험에 사용한 시약은 분석용 특급 시약을 그대로 사용하였으며 고성능액체크로마토그래피 용리액으로 사용한 아세토니트릴 등의 용매는 크로마토그래피용(Baker)으로 초음파 처리를 한 후 사용하였다. 그리고 시판이 안되는 아세틸벤지딘의 표준물질은 합성을 하여 사용하였다.

흰쥐의 간에 관류시키는 벤지딘의 관류농도는 Lynn 등(1983)의 연구를 참고로 하여 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 관류농도로 결정하였다.

관류액은 Krebs-Ringer의 중탄산 완충용액으로 NaCl 118mM, KCl 5.0mM, CaCl_2 2.5mM,

KH_2PO_4 1.2mM, NaHCO_3 2.5mM, MgSO_4 1.2mM, Glucose 5.0mM, BSA(Bovine Serum Albumin) 0.1%으로 제조한 후, 인산과 탄산나트륨을 이용하여 관류액의 수소이온농도를 7.4로 조정하여 사용하였다.

2. 측정기기

표준물질을 사용하기 위하여 합성한 아세틸벤지딘을 다른 벤지딘동족체와 분리하기 위하여 사용된 얇은막 크로마토그래피는 silicagel 60 F₂₅₄(20 × 20 cm, 0.5 mm)(Merk)를 이용하여 UV lamp(Spectrolite)를 파장 254 nm로 하여 검출하였다. 벤지딘과 벤지딘대사물질의 자외-가시광영역의 최대 흡수 파장을 얻기 위하여 사용된 분광광도계는 UV-VIS 160A(Shimadzu)를 이용하였다.

벤지딘과 벤지딘대사물질 분리를 위해서 사용된 고성능액체크로마토그래피는 307 pump, 306 pump, 811C dynamic mixer, 805 manometric module, 831 temperature regulator, 401C dilutor, 231 sampling injector, 20~100 μ loop Reaodyne injector, 712 FC204 fraction collector(Gilson)가 장착되어 있고 가스제거기(Gastorr, T-103)를 사용하였다. 검출기로는 두 파장 동시 검출이 가능한 119 UV/VIS detector와 142 electrochemical detector(Gilson)를 사용하였다. 본 연구에서 사용된 분리관은 Polymer C18(4.6×250 mm, 6 μ m) 분리관으로 보호관을 연결하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 아세틸벤지딘의 합성

아세틸벤지딘을 합성하기 위해서 Birner 등(1990)의 아세틸벤지딘 합성방법을 변형하여 벤지딘을 에테르에 녹인 후, 교반하면서 아세트산 무수물을 용액의 색이 순간적으로 흰색이 될 때까지 서서히 첨가한 다음 흰색 침전을 여과하고 에테르로 세척한 후, 상온에서 건조시켰다. 건조시킨 생성물을 메탄올에 용해시켜 얇은막 크로마토그래피를 이용하여 분리한 아세틸벤지딘을 끓여 모아 메탄올에 재용해시켜 여과하고 여액을 고성능액체크로마토그래피로 분석하였다. 표준 시료는 분취기로 분취하여 얇은막 크로마토그래피로 다시 확인후 사용하였다.

Table 1. Reversed phase high performance liquid chromatography operation condition

| Description | Condition |
|----------------|--|
| Column | Polymer C18(4.6 mm × 250 mm, 6 μm) |
| Mobile phase | ACN:phosphate buffer(pH 6.0) = 37:63 |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Detection I | UV detector at 287 nm (0.02 AUFS) at 295 nm (0.02 AUFS) |
| Detection II | ECD at 0.75 V (10 nA/V) |
| Column temp. | 40 °C |
| Injection Vol. | 20 μl |

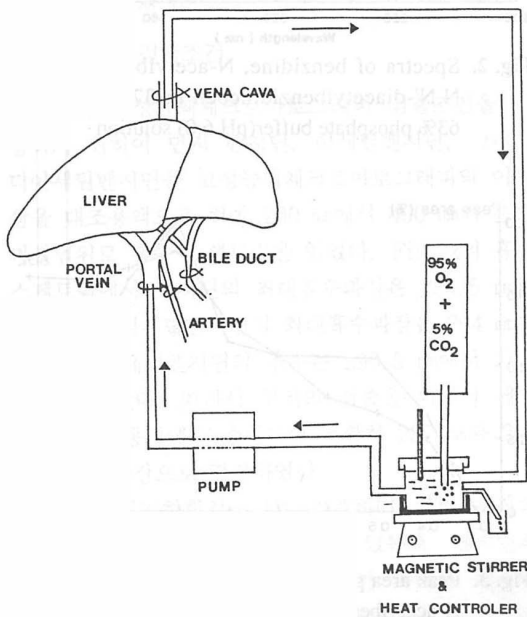


Fig. 1. Liver perfusion layout

2) 고성능액체크로마토그래피의 분석조건

벤지딘과 벤지딘대사물질을 최적의 조건으로 분리하기 위하여 이동상으로 사용할 용매와 유속 등을 결정하는 예비실험을 하였다. 벤지딘과 벤지딘대사물질을 자외선검출기로 검출하기 위한 자외선영역의 최대흡수파장은 아세토니트릴 : 인산염 완충용액 (pH 6.0) = 37 : 63을 대조용액으로 하여 200~400 nm 범위의 벤지딘과 벤지딘대사물질의 스펙트럼을 얻은 후 결정하였다. 벤지딘과 벤지딘대사물질을 전기화학검출기로 검출하기 위한 최적의 전위값을

결정하기 위해서 각 전위값별로 피크면적을 관찰하여 최적의 전위값을 결정하였다.

분리조건은 예비실험결과를 토대로 가장 좋은 분리도를 보인 Table 1의 이동상의 조성과 유속을 분리조건으로 하였다.

3) 적출 간 관류법(liver perfusion)

관류액은 Krebs-Ringer 중탄산 완충용액을 사용하였으며 관류액은 온도 37℃로 유지시켜 주고 95% 산소와 5% 이산화탄소를 계속 폭기시키면서 사용하였다. 관류액의 유속은 분당 20 ml로 하였다.

흰쥐의 간 적출은 먼저 마취제인 염산케타민으로 마취한 후, 등쪽이 바닥을 향하도록 위치시켜 사지를 수술대 위에 고정시켰다. 복부 전면을 75% 알콜로 세척, 치골로부터 가슴 상부에 걸쳐 복부 정중선 절개를 한 후, 신장정맥 앞의 하대정맥(inferior vena cava)에 헤파린(heparin)용액을 주사하였다. 그리고 주사부위 앞부분의 하대정맥을 절찰하였다. 그 다음에 관류액이 채워진 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tube, 1.3 mm)를 간문맥(hepatic portal vein)에 삽입하였다. 흉곽과 흉강을 절개하여 노출시켜 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tube, 1.3 mm)를 흉정맥(thoracic vena cava)에 삽입하였다. 간에 연결된 튜브에 펌프를 연결하여 관류시켰다. 간과 관류장치간의 평형을 유지하기 위하여 30분간의 평형시간을 두었고, 30분 정도가 경과한 후에 벤지딘용액을 관류액에 첨가하여 간에 관류시켰다. 전체적인 적출 간 관류장치의 개요는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

4) 시료의 채취 및 전처리 방법

간효소의 활성도를 고려하여 벤지딘을 관류시킨

시간 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120분에 시료를 채취하여 분석시료로 하였다.

시료 12 ml를 50 ml 비이커에 넣고 온도 100℃에서 30분동안 가열한 후, 상온으로 시료를 냉각시켰다. 그리고 1N 인산과 1N 탄산나트륨을 사용하여 시료의 수소이온농도를 8.0으로 조정하였다. 그 다음에 시료를 2900 rpm에서 30분동안 원심분리를 하였다. sep-pak 처리는 메탄올 3 ml, 증류수 5 ml를 분당 1 ml의 유속으로 흘려준 후, 원심분리한 상등액 시료 10 ml를 분당 1 ml의 유속으로 흘려준 다음 증류수 10 ml를 분당 1 ml의 유속으로 흘려준다. 그리고 메탄올 2 ml를 분당 1 ml의 유속으로 시료를 용출시킨 후 여과하여 분석시료로 하였다. 그리고 sep-pak을 이용한 전처리에서의 회수율을 평가하기 위하여 회수율시험을 하였다. 회수율시험은 기지농도의 벤지딘과 벤지딘대사물질들을 sep-pak을 이용하여 전처리한 후, 고성능액체크로마토그래피로 분석하여 산출한 농도를 기지농도와 비교하여 회수율을 구하였다.

III. 결 과

1. 아세틸벤지딘의 합성

벤지딘 용액에 미량의 아세트산 무수물을 첨가하여 생성된 침전물을 표준물질 벤지딘, 디아세틸벤지딘과 함께 얇은막 크로마토그래피로 Table 2와 같이 전개용매를 달리하여 분리하였다. 전개용매를 100% 에틸아세테이트를 사용하여 분리한 것이 가장 좋은 분리도를 보였으며, 표준물질 디아세틸벤지딘의 이동비와 생성물의 이동비를 비교하여 보았을 때 생성물 안에는 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘이 공존하는 것을 알 수가 있었다. 그리고 얇은막 크로마

토그래피로 디아세틸벤지딘과 분리한 아세틸벤지딘을 고성능액체크로마토그래피로 분석한 결과 아세틸벤지딘의 피크면적비가 97.8%로 나타났으며 고성능

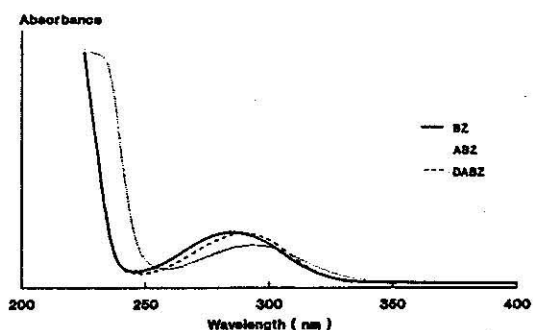


Fig. 2. Spectra of benzidine, N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine in 37% ACN and 63% phosphate buffer (pH 6.0) solution

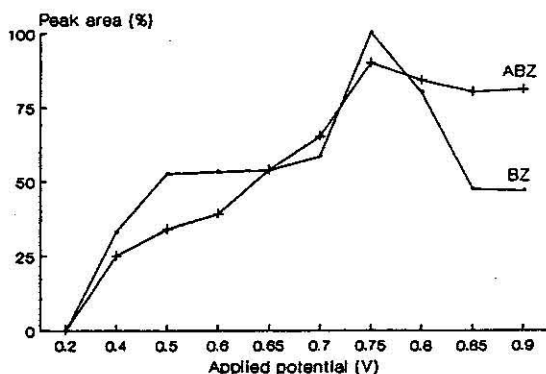


Fig. 3. Peak area percent versus potential for benzidine, N-acetylbenzidine

Peak area were measured after making multiple injections at increasing potentials.

The concentrations of BZ and ABZ was 20 $\mu\text{g/ml}$ in DMSO. Mobile phase contains 37% ACN and 63% phosphate buffer (pH 6.0) solution.

Table 2. Separation of benzidine, N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine by thin layer chromatography

| Absorbents and solvents | R_f for | | |
|--|-----------|------|------|
| | BZ | ABZ | DABZ |
| (A) silicagel and 100 % ethyl acetate | 0.52 | 0.38 | 0.23 |
| (B) silicagel and chloroform : acetone (9:1) | 0.19 | 0.12 | 0.02 |
| (C) silicagel and chloroform : ethyl acetate (5:1) | 0.17 | 0.11 | 0.05 |
| (D) silicagel and MIBK : 2-propanol (4:1) | 0.65 | 0.61 | 0.56 |

Table 3. Peak area of benzidine, N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine

| | Detection | | |
|------|-----------|--------|-------------|
| | 287 nm | 295 nm | ECD(0.75 V) |
| BZ | 499602 | 463507 | 1678902 |
| ABZ | 201069 | 210677 | 282330 |
| DABZ | 413417 | 408746 | |

The concentrations BZ, ABZ, and DABZ were 6 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, and 3 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

액체크로마토그래피에서 용리된 아세틸벤지딘을 분취기, 얇은막 크로마토그래피를 이용하여 순수화시킨 후 사용하였다.

2. 최적의 검출조건

최적의 고성능액체크로마토그래피 검출조건을 결정하기 위하여 먼저 벤지딘, 아세틸벤지딘, 그리고 디아세틸벤지딘을 고성능액체크로마토그래피의 이동상을 대조용액으로 하여 200 nm에서 400 nm의 흡수파장범위로 흡수 스펙트럼을 얻었다. Fig. 2의 흡수 스펙트럼에서 벤지딘의 최대흡수파장은 284.5 nm로 나타났고, 아세틸벤지딘의 최대흡수파장은 294 nm이었다. 디아세틸벤지딘의 경우는 290.5 nm에서 가장 높게 나타났다. 따라서 최적의 검출을 위해서 세가지 물질을 동시에 검출하기에 적합한 287 nm와 295 nm를 검출파장으로 결정하였다.

그리고 전기화학검출기로 검출하기 위한 최적의 전위값은 Fig. 3으로 결정할 수 있는데, 벤지딘과 벤지딘대사물질을 동시에 검출하기 위해서 최적의 전위값인 0.75 V로 결정하였다.

3. 대사물질의 분리

Fig. 4는 벤지딘과 벤지딘대사물질의 표준물질을 최적의 분리조건과 3종류의 검출조건으로 분석한 크로마토그램이다. 벤지딘, 아세틸벤지딘, 그리고 디아세틸벤지딘의 머무름 시간은 각각 8, 10, 14분으로 나타났으며, 좋은 분리도를 보여 주었다.

Table 3은 검출기에 따른 각각의 검출 대상물질에 대한 검출능을 평가하기 위하여 벤지딘, 아세틸벤지딘 그리고 디아세틸벤지딘의 피크 면적을 비교한 것으로, 전기화학검출기에서는 디아세틸벤지딘이 검출되지 않았으며 벤지딘과 아세틸벤지딘의 피크 면적이 자외선검출기보다 전기화학검출기에서 더 크

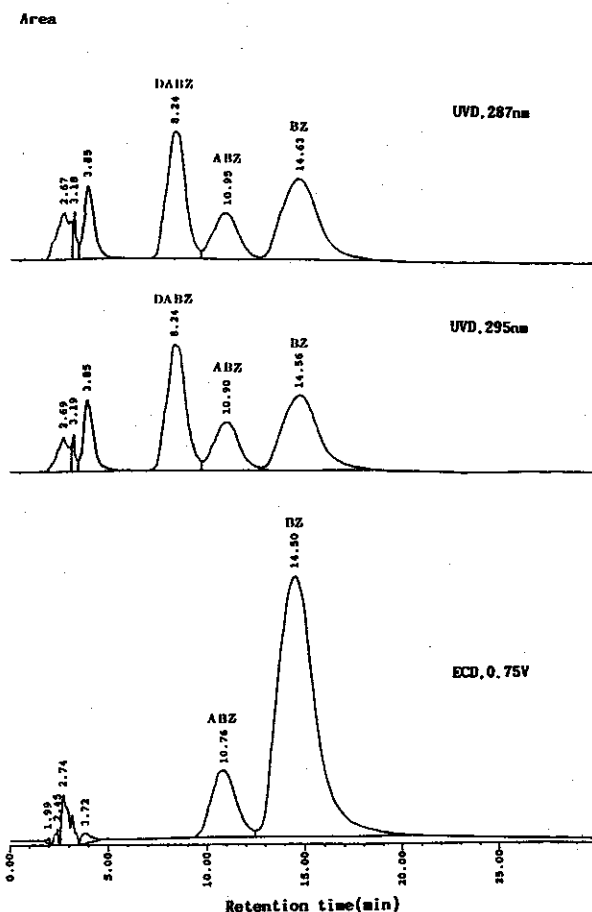


Fig. 4. Chromatogram of benzidine, N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine by HPLC separation

The separation system was composed of a guard column and a separation column(4.6 \times 250 mm) at a temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$.

The eluting solution was 37% ACN and 63% phosphate buffer(pH 6.0) and the flow rate was 1.0 ml/min.

게 나타났다. 자외선검출기에서는 벤지딘과 디아세틸벤지딘의 피크면적이 파장 295 nm보다 287 nm에서 더 크게 나타났으며, 아세틸벤지딘은 295 nm에서의 피크면적이 287 nm에 비해서 더 크게 나타났다.

그러므로 벤지딘과 아세틸벤지딘은 전기화학검출기로, 그리고 디아세틸벤지딘을 자외선검출기 287 nm로 검출하는 것이 최적의 검출조건을 만족시킨다.

따라서, 본 실험에서는 각각의 검출 대상물질에 대하여 최대의 검출능을 발휘할 수 있는 두 종류의 검출기를 동일 분석시료를 동시에 분석할 수 있도록 연결하여 사용하였다.

4. 벤지딘의 대사

원주의 간을 적출하여 벤지딘을 함유한 관류액을 관류시키고 관류시간별로 관류액을 채취, 전처리한 후, 자외선검출기 287 nm와 전기화학검출기를 검출 조건으로 하는 고성능액체크로마토그래피 분석결과,

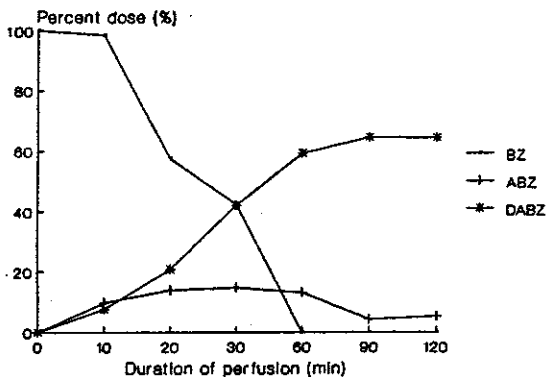


Fig. 5. The metabolites of benzidine in the perfusate

벤지딘과 벤지딘대사물질인 아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘이 표준물질과 같은 머무름시간을 보여 벤지딘대사물질임을 알 수가 있었다.

Fig. 5는 관류액에 있어서 관류시간에 따른 벤지딘, 아세틸벤지딘, 그리고 디아세틸벤지딘과 투여된 벤지딘의 몰농도백분율을 표현한 것인데, 관류시간 30분까지 벤지딘은 빠르게 대사되며 관류시간 60분부터는 벤지딘을 관류액에서 검출할 수 없었다. 아세틸벤지딘 몰농도비는 관류시간 30분까지 증가하다가 감소하는 경향을 보여 주었고 디아세틸벤지딘의 농도는 0분부터 90분까지 계속 증가하다가 90분부터는 일정한 몰농도비를 보여 주고 있었다. 또한, 관류시간 90분과 120분을 보면 계속해서 감소하던 아세틸벤지딘이 약간 증가하는 경향을 보여주고 있다. Table 4는 벤지딘과 벤지딘대사물질의 관류액에서의 몰농도를 나타낸 것인데, Fig. 5에서와 같이 벤지딘과 아세틸벤지딘, 그리고 디아세틸벤지딘의 농도 증감을 보여주고 있다.

IV. 고 찰

본 실험에서는 벤지딘과 아세틸벤지딘은 전기화학검출기로 분석하였고, 전기화학검출기로 검출이 되지 않는 디아세틸벤지딘은 자외선검출기를 이용하여 분석하였다. 즉, 동일 시료가 먼저 전기화학검출기를 통과하면서 분석이 되고 계속해서 자외선검출기로 흘러 분석하였다. 즉, 두 종류의 검출기로 동일 분석시료를 동시 분석한 것이다. 전기화학검출기의 분석원리는 최대 전위값에서 적당한 전류를 걸어주

Table 4. Concentration of benzidine, N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine in the perfusate

unit : $\times 10^{-3}$ mmole/l

| Time (min) | Metabolites (mean \pm S.D.) | | |
|------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| | BZ | ABZ | DABZ |
| 0 | 5.445 \pm 0.441 | 0.000 \pm 0.000 | 0.000 \pm 0.000 |
| 10 | 5.364 \pm 0.356 | 0.532 \pm 0.006 | 0.420 \pm 0.047 |
| 20 | 3.127 \pm 0.466 | 0.758 \pm 0.060 | 1.130 \pm 0.159 |
| 30 | 2.307 \pm 0.512 | 0.803 \pm 0.341 | 2.283 \pm 0.327 |
| 60 | 0.000 \pm 0.000 | 0.718 \pm 0.058 | 3.221 \pm 0.460 |
| 90 | 0.000 \pm 0.000 | 0.236 \pm 0.072 | 3.506 \pm 0.365 |
| 120 | 0.000 \pm 0.000 | 0.286 \pm 0.093 | 3.497 \pm 0.494 |

어 벤지딘의 두 아민기가 산화과정을 통해 이민화되는 것인데, 디아세틸벤지딘의 경우에는 두개의 아세틸기가 막고 있어 산화가 이루어져 이민화되는 과정이 불가능하다. 따라서, 디아세틸벤지딘을 정량하기 위해서 자외선검출기를 사용하였다. Lakshmi 등(1990)의 연구에서도 자외선검출기와 질량분석계를 이용하여 디아세틸벤지딘을 검출할 수 있었지만, 동일 분석시료를 두 종류의 검출기를 동시에 연결하여 분석하지는 않았다. 하지만, 본 실험에서는 벤지딘과 아세틸벤지딘에 검출능이 뛰어난 전기화학검출기와 디아세틸벤지딘에 검출능이 월등한 자외선검출기를 동시에 연결하여 동일 분석시료를 최적의 검출조건에서 분석이 가능하도록 하였다. 그리고 좀더 정확한 분석 결과를 얻으려면, $[^3\text{H}]$ 나 $[^{14}\text{C}]$ 와 같은 방사능동위원소로 표지한 벤지딘을 적출한 간에 관류시켜, 고성능 액체크로마토그래피로 분리하고 섬광계수기와 같이 감도가 뛰어난 검출기를 사용해야 할 것으로 생각된다.

간에서 벤지딘의 주 대사경로는 벤지딘의 두개의 질소에서 일어나는 아세틸화 반응이다. 즉, 벤지딘이 아세틸화되어 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘으로 대사되는 두 단계반응이다. 여기에 관여하는 효소는 N,N'-아실트랜스퍼라제이고 보조 효소인 acetyl-CoA에 의해서 촉진되는 데, 이 보조 효소의 활성도는 기니아피, 생쥐 그리고 흰쥐 순으로 감소하는 경향이 있다. 또한 기니아피를 제외하고 모든 종에 있어서 두번째 아세틸화 단계보다 첫번째 아세틸화 단계가 상당히 빠르게 진행된다고 Morton 등(1979)은 제안하였으며 간균질액을 이용한 *in vitro* study로 벤지딘이 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘, 그리고 디아세틸벤지딘이 히드록시화된 히드록시디아세틸벤지딘으로 대사되는 것을 확인하였다. 본 실험결과, 벤지딘 대사물질로 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘이 확인되었다. 관류시간별 벤지딘 대사물질의 농도비율을 보면, 아세틸벤지딘의 농도는 관류시간 초기에는 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보였고, 디아세틸벤지딘의 농도비율은 계속 증가하다가 일정한 농도비율을 나타내었다. 즉, 벤지딘은 관류시간 1시간까지 벤지딘 대사물질로 완전히 대사되며, 관류시간 60분부터는 주 대사물질이 디아세틸벤지딘이 되었다. 그러므로 Morton 등(1979)의 연구에서 관찰된 바와 같이 아세틸화 반응은 벤지딘에서

아세틸벤지딘, 그리고 디아세틸벤지딘으로 일어나는 것을 알 수 있다. 하지만 히드록시디아세틸벤지딘은 관찰할 수 없었다. 그리고 벤지딘은 간에서 빠르게 대사되기 때문에 투여량의 60% 이상이 관류시간 30분까지 대사되었다. 이 결과로 벤지딘의 반감기가 상당히 짧은 것을 알 수가 있다. Lynn 등(1983)의 고성능액체크로마토그래피/자외선검출기를 이용한 적출 간 관류연구에서는 관류시간 60분까지 아세틸벤지딘이 디아세틸벤지딘으로 거의 대사되지만, 120분까지 투여된 벤지딘에 비해 약 5%수준으로 아세틸벤지딘이 계속적으로 존재하였다. 이것은 디아세틸벤지딘에서 아세틸기이탈반응(deacetylation)이 부분적으로 일어나 아세틸벤지딘이 존재하는 것으로 제안하고 있다. 고성능액체크로마토그래피/자외선검출기/전기화학검출기를 이용한 본 실험에서도 관류시간 30분까지 계속 증가하다가 점차 감소하였으며, 120분까지 아세틸벤지딘은 Lynn 등(1983)의 연구에서 보다는 높은 수준으로 일정하게 검출할 수 있었다. Fig. 5에서 관류시간 120분에서의 결과를 보면 관류액에 투여된 벤지딘이 아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘으로 대사되는 비율이 69.47 %로 약 30% 정도가 부족한 것을 알 수가 있다. 이것은 벤지딘이 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘을 포함한 여러 대사물질로 대사되어 관류액과 간조직, 그리고 담즙관에 분포되어지는데 본 실험에서는 관류액에서의 벤지딘 대사물질중 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘만을 분석하였다. 그러므로 부족한 30%는 분석되지 않은 그외의 대사물질과 간조직 그리고 담즙관에 분포되어 있는 것으로 추정된다.

본 연구에서는 벤지딘을 관류시킨 적출 간 관류법을 통해 벤지딘의 대사물질인 아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘을 확인하였는데, 이것은 N,N'-아실트랜스퍼라제에 의한 아세틸화 반응의 결과이고, 벤지딘의 반감기는 매우 짧기 때문에 대사가 빠르게 진행되며 관류시간 60분부터는 디아세틸벤지딘이 주 대사물질로 관찰되었다. 디아세틸벤지딘은 벤지딘이나 히드록시디아세틸벤지딘에 비해서 발암성이 낮지만 발암물질로 Morton 등(1981)은 제안하고 있는데 앞으로의 연구에서는 디아세틸벤지딘의 독성에 대한 연구가 동물실험등을 통하여 활발하게 진행되어야 할 것으로 생각되며, Morton 등(1979)이 *in vitro* study를 통해서 또 하나의 벤지딘 대사물질로 제안

한 히드록시디아세틸벤지딘, 즉 cytochrome P-450에 의한 산화반응으로 생성되는 벤지딘 대사물질을 in vivo study에서 확인하는 연구가 앞으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 벤지딘 대사물질의 동시분석을 위한 최적의 분석조건을 결정하였으며, 적출 간 분류법을 이용하여 벤지딘의 대사물질의 변화를 관찰하였다.

벤지딘 대사물질의 검출은 각 대상물질에 대하여 최대의 검출을 보인 두 종류의 검출기를 동시에 사용하였다. 즉, 동일 시료가 전기화학검출기를 통과한 후 즉시 자외선검출기로 흐르도록 하여 검출하였다.

본 실험에서 벤지딘 대사물질은 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘으로 나타났으며 다른 대사물질은 확인되지 않았다.

벤지딘 대사물질의 시간적 변화를 보면, 벤지딘은 30분까지 60%이상이 대사되었으며, 1시간에서는 검출할 수 없었다. 아세틸벤지딘은 30분까지 계속해서 증가하다가 점차 감소하는 결과를 보여 주었으며, 120분까지 일정한 수준으로 존재하였다. 그리고 디아세틸벤지딘은 관류시간 초반부터 계속 증가하여 60분부터는 주 대사물질이 되며, 90분부터는 거의 일정한 수준을 보여 주었다. 관류액에 함유된 벤지딘이 120분까지 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘과 같은 대사물질 형태로 회수되는율은 약 70%이었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 벤지딘 대사물질의 정량은 자외선검출기와 전기화학적검출기를 동시에 사용하는 것이 적절하며, 적출 간 분류법을 통한 벤지딘 대사물질은 아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘으로 확인되었다. 그리고 벤지딘은 반감기가 매우 짧기 때문에 대사가 빠르게 일어나고 디아세틸벤지딘은 반감기가 상대적으로 길다. 따라서 앞으로의 연구에서는 디아세틸벤지딘의 독성을 평가하는 연구가 수행되어야 하며, 염료가 환원반응을 통해 벤지딘이 되고 인체에서 발암성 물질인 4-아미노비페닐이 되는 과정을 Cerniglia 등(1986)은 제안하고 있는데 적출한 간에 벤지딘만을 관류시킨 본 실험에서는 4-아미노비페닐이 관찰되지 않았지만 Direct Blue 6, Direct Black 38, 그리고 Direct Brown 95와 같은 벤지딘계 염료를 적출한 간에 관류시켜 벤지딘계

염료의 대사물질을 확인하여 다양한 발암성 발현과정을 발견해 가는 연구도 추진되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

노동부. 유해물질의 허용농도 : 노동부고시 제 91-21호, 노동부, 1991

노재훈, 안연순, 김규상, 김치년, 김현수. 염료제조 사업장 근로자의 벤지딘 폭로. 대한산업의학회지 1995 ; 7(2) : 103-109

ACGIH. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices for 1989-1990. Cincinnati, OH, ACGIH, 1989

Birner G, Albrecht W, and Neutmann HG. Biomonitoring of aromatic amines III : Hemoglobin binding of benzidine and some benzidine congeners. Arch Toxicol 1990 ; 64 : 97-102

Cerniglia CE. Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black 38 by human intestinal microflora. Mutation Research 1986 ; 175: 11-16

Haley JS. Benzidine revisited: a review of the literature and problems associated with the use of benzidine and its congeners. Clin Toxicol 1975 ; 8 : 13-42

Lakshmi VM, Mattammal MB, Spry LA, Kadlubar FF, Zenser TV, Davis BB. Metabolism and disposition of benzidine in the dog. Carcinogenesis 1990 ; 11(1) : 139-144

Lynn RK, Garvie-gould C, Milam DF, Scott KF, Eastman CI, Rodgers RM. Metabolism of the human carcinogen, benzidine, in the isolated perfused rat liver. Drug Metabolism and Disposition 1983 ; 11(2) : 109-114

Manning BW, Cerniglia CE, and Federle TW. Metabolism of the Benzidine-Based Azo Dye Direct Black 38 by Human Intestinal Microbiota. Applied and Environmental Microbiology 1985 ; 50 : 10-15

Martin CN, Beland FA, Roth RW, Kadlubar FF. Covalent binding of benzidine and N-acetylbenzidine to DNA at the C-8 atom of deoxyguanosine in vivo and in vitro. Cancer Res 1982; 42: 2678-2696

Meal PE, Cocker J, Wilson HK, Gilmour JM. Search for benzidine and its metabolites in urine of workers weighing benzidine-derived dyes. Br J Ind Med 1981 ; 38 : 191-193

Morton KC, King KM, and Baetcke KP. Metabolism of Benzidine and subsequent nucleic acid binding and mutagenicity, Cancer Res 1979 ; 29 : 3107-3113

Morton KC, Beland FA, Evans FE, Fullerton NF, Kadlubar FF. Metabolic activation of N-hydroxy-N,N'-diacetylbenzidine by hepatic sulfotransferase, *Cancer Res* 1980 ; 40 : 751-757

Morton KC, Ching YW, Garner CD, Shirai T. Carcinogenicity of benzidine, N,N'-diacetylbenzidine and N-hydroxy-N,N'-diacetyl benzidine for female CD rats. *Carcinogenesis* 1981 ; 2 : 747-752

Nelson CJ, Baetcke KP, Frith CH, Kodell RL, Schieferstein G. The influence of sex, dose, time, and cross on neoplasia in mice given benzidine dihydrochloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982 ; 64 : 171-186

NIOSH. Occupational safety and health guideline for benzidine potential human carcinogen. Cincinnati, OH, 1988

NIOSH. NIOSH manual of analytical methods (method NO 5509), 3rd ed, Pub NO 84-100, Cincinnati, OH, 1989

Rehn L. Blasengeschwulste beim fechs in-azbeitem. *Arch Klin Chri* 1895 ; 50 : 588-600

U.S. Department of Labor. Occupational Safety and Health Administration: 29 CFR 1910.1010. Washington DC., USDL, 1974