

벤지딘 및 벤지딘계 염료(Direct Black 38)의 요중 대사물질에 관한 연구

연세대학교 의과대학 산업보건연구소

노재훈 · 원종욱 · 김치년 · 김현수 · 전미령

— Abstract —

A study on the urinary metabolites of benzidine and benzidine based dye(Direct Black 38)

Jaehoon Roh, Jonguk Won, Chi Nyon Kim, Hyeunsoo Kim and Miryoung Chun

Institute for Occupational Health, Yonsei University College of Medicine

Benzidine is recognized as a urinary bladder carcinogen in humans. The use of benzidine in industries was prohibited because of its carcinogenicity, but, production and usage of benzidine-based dye was still permitted in most countries. This study was performed to compare the excretory patterns of urinary metabolites between benzidine-based dye(Direct Black 38) and benzidine in rats.

Benzidine-based dye was administered orally at the doses of 0.3, 0.5, 0.7 mmol/kg and benzidine was administered orally at the doses of 0.2, 0.4, 0.6 mmol/kg into Sprague-Dawley rats. To analyze benzidine and its metabolites, the high performance liquid chromatography with an electric chemical and ultraviolet detector were used. N-acetylbenzidine, N,N'-diacetylbenzidine and 4-aminobiphenyl were identified in the urine of the rats receiving dye and benzidine. The excreted amount of the urinary benzidine from dye was almost 1/10 of that from benzidine. Excretion rates of metabolites were more prolonged in the dye receiving group than those of the benzidine group. Peak concentration time of urinary N,N'-diacetylbenzidine was more prolonged than other metabolites in both groups. The excreted amount of N-acetylbenzidine was more than the others in both group.

These results suggested that N-acetylbenzidine may be an useful Biological exposure index for benzidine-based dye.

Key Words : benzidine, benzidine-based dye, biologic monitoring, N-acetylbenzidine

※ 본 연구는 1994년도 연세의대 교수연구비 및 산업보건연구소 연구비로 이루어졌음

I. 서 론

벤지딘 및 벤지딘계 염료는 현재 200여종 이상이 상품화되어 산업장에서 널리 사용되고 있으며 Direct Black 38과 같은 직접아조염료(Direct azo dyes)인 경우 염료의 생산과정, 종이 및 직물의 염색과정 그리고 고무, 합성수지, 가죽제조업, 수성잉크 생산에 널리 이용되고 모발염색 및 미술분야에서도 사용된다 (Thomas, 1978; Keith와 Walters, 1992). 그러나 벤지딘은 독성이 매우 높아 이미 오래전부터 선진외국의 경우 발암물질로 평가되었으며 (Rehn, 1895) 이러한 이유로 제조 및 취급규제를 엄격히 하고 있다 (노동부, 1991 ; 노동부, 1993; NIOH, 1988; ACGIH, 1995).

벤지딘계 아조염료의 경우는 이 염료를 제조하거나 사용하는 근로자들의 소변에서 벤지딘의 대사물질이 검출되는데, 이것은 벤지딘계 아조염료가 체내에 흡수되면 아조결합이 끊어져, 벤지딘과 같은 대사과정을 거쳐 벤지딘 대사물질로 배출되는 것으로 많은 보고가 있었다 (Meal 등, 1981; Dewan 등, 1988). 벤지딘계 염료를 사용한 염색공장 근로자들에게서 방광암 발생이 6.8 배 증가한 것으로 보고되어 (Yoshida, 1971) 발암성이 제기된바 있다 (NCL, 1978).

우리나라는 1950 년부터 황화염료인 국방색 및 흑색염료를 생산한 것이 유기합성염료 생산의 시초가 되어 현재까지 벤지딘 및 벤지딘계 염료를 취급하고 있으며 프랑스, 인도, 폴란드와 함께 벤지딘 및 벤지딘계 염료의 생산국으로 알려져 있다 (Meal 등, 1981). 벤지딘에 의한 암발생 잠복기간이 30여년 정도로 추정되어 현재 우리나라에서의 벤지딘계 염료의 제조 및 사용기간이 암발생 시기와 비슷하여 이 분야에 종사하는 근로자들의 암발생 가능성을 배제할 수 없다. 이러한 이유로 벤지딘과 벤지딘계 염료의 독성발현 및 생체내 대사의 상호연관성에 대하여 많은 연구가 있었고, 국내의 연구는 빈약하지만 흰쥐의 적출간을 이용하여 벤지딘 및 벤지딘계 아조염료(Direct Black 38)의 간에서의 대사를 연구한 바 있다 (배문주 등, 1995; 원종욱 등, 1996).

근로자들에 대한 폭로량을 파악하기 위해서는 정확한 작업환경평가가 중요하다. 그러나 작업환경측

정의 경우는 작업환경 자체만을 고려하고 작업량 및 작업강도와 호흡량 등이 고려되지 않기 때문에 실제로 근로자들에게 폭로되는 정도와 상이할 수 있다. 물론 작업환경측정도 중요하지만 근로자의 실제 폭로량을 파악한다는 의미에서 최근에는 작업환경모니터링 (environmental exposure monitoring)과 생물학적모니터링 (biological exposure monitoring)을 이용하여 작업환경을 평가하는 방법이 여러 가지 유해화학물질에 대해서 고려되고 있다. 특히 벤지딘은 피부로도 많은 양이 흡수된다고 알려져 있기 때문에 이에 대한 주의를 강조하고 있다 (Meal 등, 1981; ACGIH, 1995). 또한 벤지딘계 아조염료도 피부에 접촉되면 박테리아와 같은 미생물등에 의하여 아조결합이 분해되고 벤지딘으로 흡수가 된다. 따라서 이러한 특징으로 볼 때 근로자들의 폭로량 평가시 호흡기부위의 개인시료포집방법 (personal air sampling)만으로 노출평가를 하는것은 문제가 있어 생물학적모니터링과 함께 병행하여 이루어져야 한다. 벤지딘 및 벤지딘계 염료의 생물학적모니터링에 관한 국내의 연구는 벤지딘계 아조염료를 제조하는 사업장 근로자들을 대상으로 작업환경평가와 함께 소변시료에서 대사물질을 관찰 (노재훈 등, 1995) 하였으나 이분야에 대한 기초적 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 벤지딘 및 벤지딘계 아조염료에 노출되는 경우 소변시료를 이용한 생물학적 모니터링에 대한 기초적인 자료를 제공하는 것이다. 이를 위하여 이번 실험에서는 흰쥐에 벤지딘계 염료를 경구 투여하였을 때 벤지딘계염료의 대사물질인 모노아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘, 4-아미노비페닐과 벤지딘이 시간경과에 따라 배설량이 어떻게 변하는지를 알아보고자 한다. 또한 이들 물질 가운데 생물학적 모니터링에 적합한 대사물질이 어떤 것인지를 알아보고자 한다.

본 연구의 구체적 목적은 다음과 같다.

첫째, 벤지딘 및 벤지딘계 염료의 생물학적모니터링을 위하여 요중 대사물질의 최적의 시료 전처리방법과 HPLC분석방법을 정립한다.

둘째, 벤지딘계 염료가 벤지딘으로 대사되어 배설되는지를 확인한다.

셋째, 벤지딘과 벤지딘계 염료를 흰쥐에 각각 경구투여 후 시간에 따른 요중 대사물질들의 배설량을

관찰하여 벤지딘과 벤지딘계 염료의 배설양상 차이점을 비교 평가한다.

넷째, 벤지딘과 벤지딘계 염료를 투여용량을 다르게 경구투여 한 후 용량-반응관계를 대사물질별로 파악하여 생물학적 지표로서의 유용성을 평가한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료 및 용량

생후 9-11 주가 경과되고 체중이 $210 \pm 15\text{g}$ 인 건강한 Sprague - Dawley계 흰쥐 35마리를 대상으로 하여 실험하였으며 실험 시작하기 일주일 전부터 사육장내 환경을 온도는 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 그리고 습도는 $65 \pm 5\%$ 로 일정하게 유지하고 자유롭게 음식물을 섭취하도록 하였다. 본 실험에서 사용한 시약은 분석용 특급 시약을 그대로 사용하였으며 HPLC용 용매는 크로마토그래피용 제품으로 사용하였다. 그리고 시판되지 않는 표준 대사물질인 모노아세틸벤지딘은 합성하여 사용하였다. 흰쥐에 투여된 벤지딘과 염료 다이렉트 블랙 38의 투여 용량은 LD_{50} 값인 200mg/kg 을 고려하여 투여량을 결정하였다. 투여방법은 벤지딘과 염료 다이렉트 블랙 38을 1,2-프로파니디올(1,2-propanediol)에 녹여 일정량을 gavage로 경구투여하였다(Birner등, 1990). 대조군은 1,2-프로파니디올만을 실험군과 같은 양으로 0.25ml 를 투여 하였으며 5마리의 흰쥐를 사용하였다. 또한 벤지딘 투여 실험군은 0.2, 0.4, 0.8 mmol/kg 그리고 염료 투여 실험군은 0.3, 0.5, 0.7 mmol/kg 로 하여 각각 5마리를 사용하였다.

2. 측정기기

표준물질로 사용하기 위하여 합성한 아세틸벤지딘을 다른 벤지딘동족체와 분리하기 위하여 사용된 얇은막 크로마토그래피(TLC)는 silicagel 60 F254($20 \times 20\text{ cm}$, 0.5 mm)이고 UV lamp를 파장 254 nm 로 하여 검출하였다. 벤지딘과 벤지딘대사물질의 자외-가시광영역의 최대 흡수파장을 얻기 위하여 사용된 분광광도계는 UV-VIS 160A(Shimadzu)를 이용하였다.

벤지딘과 벤지딘대사물질 분리를 위해서 사용된 HPLC(Gilson)는 가스제거기와 시료분취기 그리고 분리관 오븐을 연결하였으며 두 파장 동시 검출 및

스펙트럼분석이 가능한 UV/VIS 검출기와 전기화학검출기(ECD)를 연결하여 동시 검출이 가능하도록 하였다. 사용된 분리관은 C18($4.6 \times 250\text{ mm}$, 5 m , YMC)으로 같은 종류의 보호관을 연결하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 모노아세틸벤지딘(MAB)의 합성

표준물질로 사용된 모노아세틸벤지딘의 합성은 실온에서 에테르에 벤지딘을 녹인 후 무수초산을 결정이 생기는 순간까지 가하면서 교반하여 준다. 반응이 끝난 후에 용액을 여과하여 침전물을 완전 건조시킨다. 건조시킨 생성물을 메탄올에 녹여서 Silica gel(60F-254)로 분리하여 여과($0.45\mu\text{m}$, Filter)한 후 여액을 진공증발기로 모노아세틸벤지딘을 합성하였다. 그리고 용리액을 에틸아세테이트로하여 TLC로 확인 하고 HPLC로 분리하여 분취기로 모아서 다시 TLC로 머무름 계수값을 비교확인 한 후에 표준물질로 사용하였다(Birner등, 1990).

2) 소변시료의 채취 및 전처리방법

시료의 채취는 벤지딘 투여군, 염료 투여군 그리고 대조군을 대소변을 분리시키는 장치가 설치된 대사우리(metabolic cage)에 넣고 물과 사료를 자유로이 섭취시키면서 72 시간 까지 4 시간 간격으로 소변시료를 채취하여 HPLC 분석시료로 사용하였고 일부는 크레아티닌(creatinine)분석에 사용하였다. 요중 대사물질인 모노아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘, 4-아미노비페닐과 벤지딘의 HPLC 분석을 위한 시료전처리는 소변 1 ml 를 사용하였는데 부족한 경우에는 증류수로 희석하여 사용하였으며 $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (2.5 M , $\text{pH } 9$) 완충용액 1 ml 를 가하여 소변을 알칼리화하고 디에틸에테르 1 ml 씩 2 회 추출하였다. 추출된 디에틸 에테르층에 0.5 M 과염소산 1 ml 를 가하여 역추출하여 수층을 0.45 m 필터로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

3) 요중 대사물질의 정량

요중 대사물질의 HPLC분석에서 벤지딘, 모노아세틸벤지딘 그리고 4-아미노비페닐의 검출은 선택성과 감도가 좋은 전기화학검출기(ECD)를 예비실험

을 통하여 각각의 가장 좋은 전위값들 중에서 세가지 대사물질들의 정량을 최적의 상태로 동시에 할수 있고 안정화에 용이한 0.7 V로 결정하였다. 전기화학검출기(ECD)에 검출이 안되는 디아세틸벤지딘은 이동상을 대조액으로 하여 스펙트럼을 관찰한 결과 최대 흡수파장인 287 nm를 검출기 측정파장으로 하여 모든 대사물질이 동시에 정량이 가능하도록 하였다. 이동상(mobile phase)으로는 메탄올과 0.01M 암모늄아세트이트를 40 : 60의 비율로 하여 0.9 ml/min의 유속으로 하여 역상 액체크로마토그래피법으로 실험하였다(Table 1).

III. 연구 결과

1. 모노아세틸벤지딘의 합성과 표준물질의 크로마토그램

벤지딘 용액에 미량의 아세트산 무수물을 첨가하여 생성된 침전물을 표준물질인 벤지딘, 디아세틸벤지딘과 함께 얇은 막크로마토그래피로 분리하였다. 전개용매는 100% 에틸아세트산을 이용하였으며 이때 머무름 계수는 벤지딘은 0.74, 아세틸벤지딘 0.57, 디아세틸벤지딘 0.43이었다(Table 2).

Fig. 1은 벤지딘과 벤지딘대사물질의 표준물질을 최적의 분리조건과 3종류의 검출조건으로 분석한 크로마토그램이다. 벤지딘, 아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘 그리고 4-아미노비페닐의 머무름 시간은 각각 6.6분, 7.6분, 11.8분, 42.2분 이었고, 모두 잘 분리되었다.

2. 경구투여 후 경과시간에 따른 요중 대사물질의 배설량의 변화

벤지딘을 0.2, 0.4, 0.6 mmol/kg 그리고 벤지딘

계염료(Direct Black 38)는 0.3, 0.5, 0.7 mmol/kg의 용량별로 경구투여한 후 소변을 4 시간 간격으로 72 시간까지 채취하여 요중 벤지딘, 모노아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘 그리고 4-아미노비페닐을 HPLC로 각각 분석을 하였다.

벤지딘 투여군에서는 요중 벤지딘 및 모노아세틸벤지딘은 모든 투여용량이 0-4 시간사이에서 최고의 배설량을 나타내어 빠르게 배설이 되는 것을 알수 있었다. 디아세틸벤지딘은 투여용량 0.2 mmol/kg

Table 2. Separation of BZ, ABZ and DABZ by TLC

Material	Rf
Benzidine	0.74 ± 0.028
Acetylbenzidine	0.57 ± 0.045
Diacetylbenzidine	0.43 ± 0.007

BZ ; benzidine, ABZ ; acetylbenzidine,

DABZ ; diacetylbenzidine,

TLC ; thin layer chromatography

Rf ; retardation factor

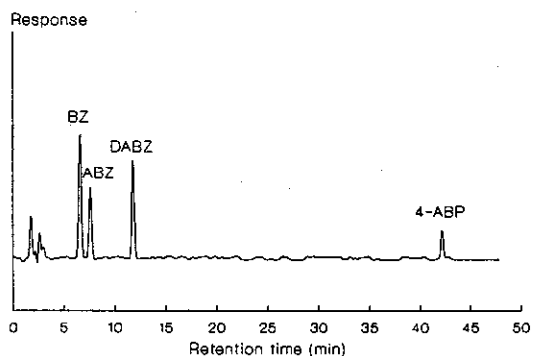


Fig. 1. Chromatogram of BZ, ABZ, DABZ, and 4-ABP by HPLC

Table 1 Operating condition of HPLC/ECD/UV

Description	Condition
Column	C18 (4.6 mm × 25 cm, 5 μm)
Mobile phase	0.01M Ammonium acetate : Methanol(40 : 60)
Flow rate	0.9 ml/min
Detector I.	ECD at 0.7 V (10 nA / V)
Detector II.	UVD at 287 nm (0.02 AUFS)
Column Temp.	40 °C
Injection vol.	20 μl

Table 3. Concentration of urinary metabolites after administration of benzidine

unit : mg/g creatinine

Duration (Hour)	0.2 mmol/kg			Dose 0.4 mmol/kg			0.6 mmol/kg		
	BZ	ABZ	DABZ	BZ	ABZ	DABZ	BZ	ABZ	DABZ
4	8.89±2.24	12.72±2.27	0.09±0.03	8.87±4.74	10.17±1.04	0.42±0.69	18.76±10.84	20.64±9.11	1.38±1.46
8	4.44±1.03	6.60±4.22	1.52±2.4	5.85±4.14	7.42±4.22	0.35±0.24	5.93±3.42	12.01±6.49	2.40±2.21
12	1.93±1.60	6.38±2.51	1.03±1.1	4.75±2.39	7.07±3.54	1.30±0.83	6.47±4.35	10.18±4.16	3.13±2.44
16	0.70±0.56	4.96±1.66	1.24±0.86	1.35±1.90	5.14±2.47	2.12±2.43	1.94±1.12	9.23±0.58	3.18±2.77
20	0.80±0.47	1.84±0.78	0.87±0.61	1.66±0.15	3.87±1.64	1.14±0.78	1.81±1.18	8.82±1.40	3.01±4.63
24	0.54±0.14	1.89±0.71	0.84±0.94	1.51±0.18	3.51±1.81	0.89±0.99	1.81±0.92	7.25±2.75	2.87±2.75
28	0.42±0.31	1.11±0.38	0.2±0.17	1.13±1.56	2.97±1.96	0.95±0.16	1.24±0.71	6.03±2.02	1.27±0.72
32	0.33±0.24	0.96±0.39	0.49±0.33	0.99±1.06	2.16±0.69	0.61±0.42	1.59±1.12	5.44±1.06	1.02±0.35
36	0.32±0.23	0.91±0.18	0.67±1.15	1.15±1.59	1.62±0.68	0.62±0.42	1.44±1.60	4.43±0.21	1.10±0.98
40	0.35±0.16	0.57±0.40	0.72±1.07	0.52±0.89	1.46±0.49	0.76±0.95	0.77±0.62	3.99±0.59	0.52±0.16
44	0.41±1.58	0.77±1.33	0.14±0.05	0.25±0.15	1.23±0.02	0.50±0.32	0.37±0.26	3.11±2.44	0.77±0.88
48	0.13±0.12	0.28±0.19	0.03±0.01	0.52±0.73	1.27±1.69	0.37±0.29	1.80±0.09	2.11±1.06	0.60±0.33
52	0.22±0.32	0.29±0.21	0.03±0.02	0.16±0.03	0.79±0.41	0.29±0.16	2.77±4.79	1.30±1.16	0.36±0.27
56	0.13±0.11	0.45±0.26	0.03±0.02	0.23±0.02	0.55±0.39	0.03±0.02	0.26±0.18	0.24±0.11	0.15±0.07
60	0.12±0.08	0.39±0.68	0.04±0.04	0.03±0.04	0.16±0.09	0.12±0.19	0.84±0.97	0.71±1.31	0.12±0.08
64	0.07±0.05	0.05±0.03	0.00±0.00	0.13±0.08	0.12±0.28	0.11±0.01	0.06±0.07	0.00±0.00	0.27±0.04
68	0.03±0.04	0.04±0.03	0.02±0.01	0.06±0.07	0.06±0.09	0.03±0.10	0.60±0.69	0.45±0.89	0.13±0.23
72	0.05±0.05	0.04±0.03	0.03±0.01	0.04±0.03	0.05±0.03	0.04±0.09	0.21±0.37	0.24±0.49	0.01±0.01

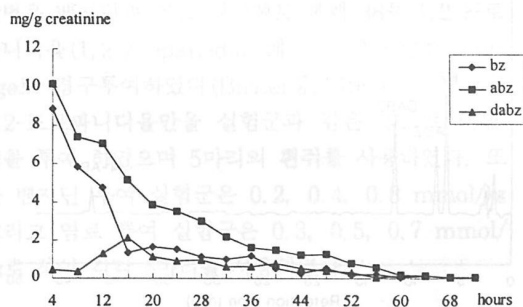


Fig. 2. Concentration of urinary metabolites after administration of 0.4 mmol of benzidine

에서는 4-8 시간 그리고 0.4 mmol/kg와 0.6 mmol/kg에서는 12-16 시간에서 최고값을 나타냈다. 4-아미노비페닐은 시간에 따른 변동이 없이 극미량으로 정량이 되었다. 24시간 동안 배설된 양은 투여량에 따라 벤지딘이 75.5% - 87%, 아세틸벤지딘은 70.8% - 85.4% 그리고 디아세틸벤지딘이 58.4% - 71.6%였다(Table 3, Fig. 2). 대조군에서는 어떤 대사물도 검출할 수 없었다.

벤지딘계류 투여군은 요중 대사물질이 모든 투

여용량에서 12-16 시간과 16-20 시간에서 최고의 배설량을 나타내어 전반적으로 벤지딘 투여군 보다 요중 배설속도가 느리게 나타났다. 4-아미노비페닐은 벤지딘 투여군과 같은 양상으로 시간에 따른 큰 변동 없이 극미량으로 0-72시간 검출 되었다. 24시간 동안 배설된 양은 투여량에 따라 벤지딘이 51% - 67%, 아세틸벤지딘은 56.6% - 67.1%, 디아세틸벤지딘은 41.8% - 48.3%가 배설되었다(Table 4, Fig. 3).

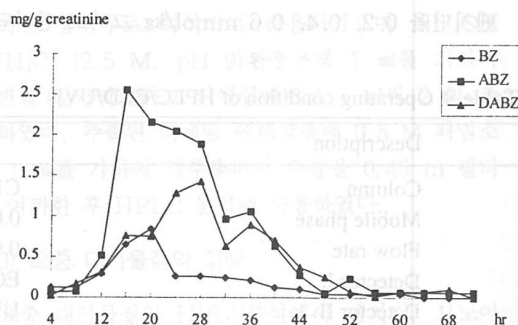


Fig. 3. Concentration of urinary metabolites after administration of 0.5 mmol of Direct black 38

Table 4. Concentration of urinary metabolites after administration of benzidine based dye(Direct black 38)

unit : mg/g creatinine

Duration (Hour)	0.3 mmol/kg			Dose 0.5 mmol/kg			0.7 mmol/kg		
	BZ	ABZ	DABZ	BZ	ABZ	DABZ	BZ	ABZ	DABZ
4	0.15±0.03	0.12±0.07	0.03±0.02	0.21±0.10	0.15±0.09	0.03±0.02	0.12±0.06	0.06±0.03	0.02±0.01
8	0.13±0.04	0.10±0.06	0.12±0.06	0.14±0.03	0.11±0.03	0.13±0.04	0.12±0.03	0.07±0.04	0.17±0.05
12	0.14±0.16	0.15±0.10	0.22±0.08	0.17±0.03	0.23±0.08	0.11±0.01	0.29±0.09	0.51±0.22	0.31±0.10
16	0.19±0.08	0.87±0.39	0.40±0.06	0.29±0.11	1.07±0.59	0.66±0.37	0.65±0.16	2.55±1.06	0.76±0.16
20	0.13±0.05	1.53±0.50	1.11±1.56	0.49±0.10	1.56±0.28	0.45±0.25	0.84±0.52	2.15±0.19	0.75±0.41
24	0.06±0.01	0.83±0.16	1.09±0.60	0.14±0.02	0.97±0.36	1.91±1.09	0.26±0.13	2.04±0.43	1.28±0.29
28	0.10±0.15	0.65±0.20	0.93±0.01	0.09±0.05	0.66±0.33	0.96±0.41	0.26±0.17	1.88±0.48	1.42±0.08
32	0.10±0.13	0.50±0.13	0.56±0.27	0.13±0.08	0.49±0.26	0.63±0.37	0.24±0.05	0.96±0.24	0.63±0.40
36	0.10±0.14	0.48±0.09	0.72±0.11	0.15±0.10	0.58±0.25	0.93±0.51	0.21±0.12	1.05±0.33	0.89±0.01
40	0.08±0.05	0.36±0.20	0.38±1.07	0.13±0.08	0.39±0.24	0.34±0.13	0.12±0.13	0.63±0.36	0.70±0.60
44	0.14±0.16	0.20±0.12	0.14±0.08	0.10±0.07	0.38±0.33	0.25±0.14	0.10±0.06	0.27±2.10	0.37±0.21
48	0.09±0.05	0.00±0.00	0.06±0.09	0.09±0.08	0.03±0.17	0.09±0.03	0.04±0.02	0.05±0.03	0.25±0.14
52	0.06±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00	0.04±0.03	0.02±0.01	0.04±0.09	0.04±0.08	0.23±0.13	0.07±0.04
56	0.05±0.03	0.00±0.00	0.12±0.06	0.06±0.03	0.04±0.02	0.08±0.06	0.05±0.01	0.06±0.08	0.01±0.01
60	0.05±0.08	0.00±0.00	0.10±0.15	0.04±0.03	0.46±0.02	0.07±0.05	0.00±0.03	0.06±0.03	0.07±0.53
64	0.00±0.00	0.00±0.00	0.06±0.04	0.00±0.00	0.03±0.02	0.08±0.01	0.00±0.00	0.06±0.03	0.07±0.04
68	0.00±0.00	0.00±0.00	0.06±0.03	0.00±0.00	0.03±0.02	0.02±0.01	0.00±0.00	0.06±0.03	0.10±0.16
72	0.00±0.00	0.00±0.00	0.07±0.04	0.00±0.00	0.03±0.02	0.03±0.01	0.00±0.00	0.06±0.03	0.00±0.00

2. 요중 대사물질들의 배설량

벤지딘 투여군에서 72시간 동안 요중으로 배설된 대사물질의 총량과 각각이 차지하는 비중을 Fig. 4에 표시하였다. 4가지 대사물질 가운데 모노아세틸

벤지딘이 0.3624 - 0.6405 mol(33.16 % - 49.69 %)로 가장 많이 배설되었으며 벤지딘은 0.2499 - 0.4303 mol(31.56 % - 33.38 %), 디아세틸벤지딘은 0.1382 - 0.2149 mol(14.68 % - 18.41 %)로 배설이 되었다. 4-아미노비페닐은 0.0033 -

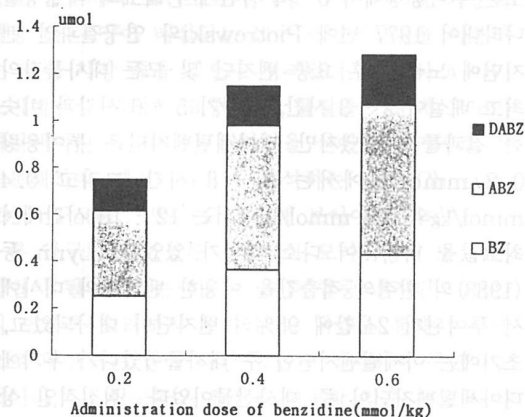


Fig. 4. Cumulative amount of urinary metabolites in 72 hours after oral administration to difference dose of benzidine

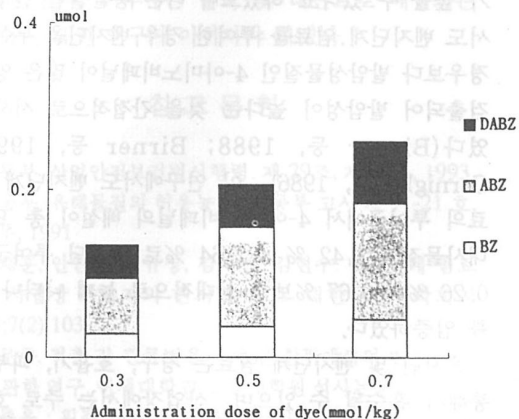


Fig. 5. Cumulative amount of urinary metabolites in 72 hours after oral administration to difference dose of dye

0.0050 mol(0.26 % - 0.67 %)로 극미량이 검출되어 그래프에는 표시되지 못했다.

벤지딘계염료 투여군에서 72시간 동안 요중으로 배설된 대사물질의 총량과 각각 차지하는 비중을 Fig. 2에 표시하였다. 벤지딘 투여군과 마찬가지로 모노아세틸벤지딘이 0.0660 - 0.1373 mol(48.14 % - 55.67 %)로 가장 많은 양이 배설되었으며 디아세틸벤지딘은 0.0393 - 0.0734 mol (24.13 % - 28.67 %), 벤지딘은 0.0284 - 0.0456 mol(17.54 % - 20.71 %)로 배설이 되었다. 그리고 4-아미노비페닐은 0.0034 - 0.0037 mol(1.42 % - 2.64 %)로 극미량이 검출되었다(Fig. 5).

IV. 고 찰

산업이 발전함에 따라 고농도로 단시간에 발생되는 재해성 중독보다는 만성적으로 저농도에 노출되어 발생하는 직업병이 사회적으로 더 큰 문제가 되고 있으며 특히 발암물질에 장기간 노출이되는 위험을 연구검토하는 일이 매우 중요하게 되었다. 벤지딘은 $C_{12}H_{12}N_2$ 로 무색 혹은 연한 적색 크리스탈 물질로 대량으로 급성노출시 호흡곤란, 방광내 염증, 피부염을 야기시키며 만성적인 노출이 되면 적색뇨, 빈뇨, 배뇨곤란 및 방광암을 일으킨다고 알려져 있다. 또한 1978 년 미국의 국립 암 연구소(National Cancer Institute, NCI)에서는 동물실험을 통하여 벤지딘 자체보다 벤지딘계 염료가 암 발생의 위험도가 높을 수 있다고 하였으며 다른 동물실험 연구에서도 벤지딘계 염료를 투여한 경우 벤지딘을 투여한 경우보다 발암성물질인 4-아미노비페닐이 많은 양이 검출되어 발암성이 높다는 것을 간접적으로 시사하였다(Birner 등, 1988; Birner 등, 1990; Cerniglia 등, 1986). 이 연구에서도 벤지딘계 염료의 투여군에서 4-아미노비페닐의 배설이 총 요중 대사물질의 1.42 % - 2.64 %로 벤지딘 투여군의 0.26 % - 0.67 %보다 상대적으로 높게 나타나 이를 입증하였다.

벤지딘 및 벤지딘계 염료는 경구, 호흡기, 피부를 통해서 흡수될 수 있으며, 산업장에서는 주로 호흡기나 피부로 흡수되고 있다. 벤지딘은 주로 간에서 아세틸화 반응을 통해 모노아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘, 4-아미노비페닐 등으로 대사된다(Morton

등, 1979; Lynn 등, 1983). Lynn 등(1983)은 방사성 동위원소를 이용하여 벤지딘의 대사물질을 20여가지 밝혔지만 주 대사산물은 위의 4가지였다. 최근의 연구에 따르면 벤지딘과 N-아세틸벤지딘은 간에서 글루크로나이드 결합체(glucuronide conjugate)를 형성하는데 이 물질은 pH 5.3 에서 반감기가 4-5분으로 매우 짧다. 이 글루크로나이드 결합체가 소변을 통해서 배설되는데 산성인 소변에서 다시 일급아민으로 가수분해되고, 방광에서 활성화되어 방광암을 유발하는 것으로 추정된다(Babu 등, 1992). 따라서 소변에서 벤지딘이나 벤지딘 대사물질인 N-아세틸벤지딘이 배설되는 양을 측정하는 것은 생물학적 모니터링으로서 뿐아니라 방광암 발생의 위험성을 추정하는데도 도움이 될 것으로 생각된다.

벤지딘계 염료는 간의 cytochrome P-450 계열의 환원 효소에 의해서 벤지딘으로 대사되는 것으로 알려져 있다(Cerniglia 등, 1982; 1986). Chung 등(1990)은 방대한 양의 문헌 고찰을 통해 장내세균이 방향족 아민의 아조결합을 환원시킬 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 벤지딘계 염료를 투여한 군에서 배설된 벤지딘은 염료의 대사산물로 생각된다. 많은 연구들에서 벤지딘계 염료가 벤지딘으로 대사된다고 보고하고 있기 때문에 벤지딘계 염료를 취급하는 근로자에 대해서도 작업환경을 관리할 필요가 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 벤지딘 투여군의 경우 요중 4-아미노비페닐을 제외하고 벤지딘 및 모노아세틸벤지딘이 모든 투여용량에서 0 - 4 시간에서 최고의 배설량을 나타내어 1977 년에 Piotrowski의 연구결과인 벤지딘에 노출된 후 요중 벤지딘 및 모든 대사물질의 최고 배설이 2 - 3 시간, 반감기 5 - 6 시간과 비슷한 결과를 나타냈지만 디아세틸벤지딘은 투여용량 0.2 mmol/kg에서는 4 - 8 시간 그리고 0.4 mmol/kg와 0.6 mmol/kg에서는 12 - 16 시간에서 최고값을 나타내어 다소 차이가 있었다. Lynn 등(1983)의 원저의 적출간을 이용한 벤지딘의 대사에서 투여된지 2시간에 95%의 벤지딘이 대사되었고, 초기에는 아세틸벤지딘이 주 대사물이었다가 후기에 디아세틸벤지딘이 주 대사산물이었다. 직접적인 상관관계를 논하기는 쉽지 않지만 이를 미루어 디아세틸벤지딘의 배설 시간이 더 늦은 것을 설명할 수 있다. 벤지딘계 염료 투여군은 요중 대사물질이 모든

투여용량에서 12 - 16 시간과 16 - 20 시간에서 최고의 배설량을 나타내어 전반적으로 벤지딘 투여군보다 요중 배설속도가 느리게 나타났다. 이것은 벤지딘계 염료가 우선 벤지딘으로 대사된 후 다시 벤지딘이 모노아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘, 4-아미노비페닐 등으로 대사되기 때문으로 생각된다. 또한 벤지딘이나 벤지딘계 염료의 대사물이 최고로 배설되는 시간이 서로 차이를 보이는 것은 이 물질의 생물학적모니터링을 실시함에 있어 최적의 소변 시료 채취 시기가 서로 다를수도 있다는 가능성을 내포하고 있다.

72 시간 동안 배설된 대사물의 총량은 투여량에 비해 증가하는 추세를 보였으며 벤지딘이나 벤지딘계 염료 모두에서 N-아세틸벤지딘이 제일 많은 비중을 차지하였다(Tabel 1, 2). 또 벤지딘 투여군에서 24시간 동안 배설된 대사물의 총량은 72시간 동안 배설된 양에 비해서 벤지딘의 경우 평균 81.5%, 아세틸벤지딘 77%, 디아세틸벤지딘은 66.7% 이었다. 염료 투여군에서는 벤지딘 60.6%, 아세틸벤지딘 60.6%, 그리고 디아세틸벤지딘은 46.1%가 24 시간 동안 배설되었다. 이 사실로 보아 근로자가 폭로되는 양이 매우 소량일 것으로 생각되기 때문에 대사물질의 검출을 높이기 위해서 소변을 모을 경우 24시간 동안 소변을 모은다면 벤지딘의 경우 80% 이상, 염료의 경우 60%이상의 대사물질이 배설되어 소기의 목적을 달성할 수 있을 것으로 생각된다.

또한 벤지딘 및 벤지딘계 염료의 생물학적 모니터링을 근로자의 소변으로 실시할 경우 대사물 가운데 가장 많은 양이 배설되는 N-아세틸벤지딘을 사용하는 것이 가장 좋을 것으로 생각된다. 그러나 4-아미노비페닐을 제외한 요중 대사 물질들 가운데 모노아세틸벤지딘과 디아세틸벤지딘을 산이나 알카리로 가수분해하여 벤지딘화하여 분석하는 방법(Charles, 1990; Peter, 1984)도 고려해 보아야 할 것이다.

본 연구의 제한점은 생물학적 모니터링의 또 다른 방법이 될 수 있는 시간에 따른 혈중 벤지딘 대사물의 변화를 고려하지 못한 것과 답즙을 통해서 대변으로 배설되는 양에 대한 실험을 실시하지 못했다는 것이다. 이 연구들은 환취를 이용할 경우 시료의 양이 매우 적을 뿐 아니라 쥐에게 스트레스를 최소화하기 위해서 동시에 시행하기는 어려울 것으로 생각된다. 다만 별도의 후속 연구가 있어야 할 것이다.

V. 요약 및 결론

본 연구는 벤지딘 및 벤지딘계 염료의 생물학적 모니터링 방법을 모색하고자 수행되었다. 이를 위해서 환취에 벤지딘을 0.2, 0.4, 0.6 mmol/kg, 그리고 벤지딘계 염료 Direct Black 38을 0.3, 0.5, 0.7 mmol/kg를 경구 투여하여 72시간 동안 4시간 간격으로 소변으로 배설되는 양을 정량분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 벤지딘과 벤지딘계 염료 투여군 모두에서 벤지딘, N-아세틸벤지딘, 디아세틸벤지딘, 4-아미노비페닐이 대사물질로 검출되었다.
2. 벤지딘과 염료 투여군 모두에서 배설된 대사물질의 총량 가운데 N-아세틸벤지딘이 제일 많았다.
3. 벤지딘 투여군에서 벤지딘과 N-아세틸벤지딘은 4시간에 최고로 배설되었고, 이후 급격히 감소하는 양상을 보였으며 디아세틸벤지딘은 농도에 따라 4 - 16시간에 최고로 배설되었다.
4. 염료 투여군에서는 벤지딘 투여군 보다 대사물이 배설되는 시간이 늦어서 12 - 20 시간에 각 대사물질의 배설이 최고를 이루었다.

이상의 결과에서 벤지딘계 염료가 대사되어 발암성 물질로 전환됨을 알 수 있어 향후 벤지딘계 염료를 취급하는 근로자와 작업장에 대한 엄격한 관리가 있어야 할 것이며, 벤지딘 및 벤지딘계 염료의 생물학적 모니터링에는 N-아세틸벤지딘이 적합한 것으로 생각된다. 이후에는 혈액 및 대변으로 배설되는 대사물에 대한 연구가 이어져야 하겠다.

참 고 문 헌

- 노동부. 산업안전보건법시행령. 제 29조, 제 30조. 1993
 노동부. 유해물질의 허용농도: 노동부 고시 제 91-21 호. 노동부, 1991
 노재훈, 안연순, 김규상, 김치연, 김현수. 벤지딘계 염료 제조 사업장 근로자의 벤지딘 폭로. 대한산업의학회지 1995;7(2):103
 배문주. 적출 간 관류법을 이용한 환취에서의 벤지딘 대사에 관한 연구. 연세대학교 보건대학원 석사논문. 1995
 원종욱: 환취 적출간 관류법을 이용한 벤지딘계 염료 Direct Black 38의 대사. 연세대학교 대학원 보건학과 석사논문 1996

ACGIH: Threshold limit value for chemical sub-

stances and physical agents and biological exposure indices for 1995-1996. Cincinnati, OH, 1995

Babu SR, Lakshmi VM, Hsu FF, Zenser TV, Davis BB : Role of N-glucuronidation in benzidine-induced bladder cancer in dog. *Carcinogenesis* 1992; 13:1235

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

Birner G, Neumann HG : Biomonitoring of aromatic amines II: Hemoglobin binding of monocyclic aromatic amines. *Arch Toxicol* 1988;62:110

Cerniglia CE, Freeman JP, Franklin W, Pack LD : Metabolism of azo dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethylbenzidine and 3,3'-dimethoxybenzidine to potentially carcinogenic aromatic amines by intestinal bacteria. *Carcinogenesis* 1982;3:1255

Cerniglia CE, Zhuo Z, Manning BW, Federle TW, Heflich RH : Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black 38 by human intestinal microflora. *Mutation Res* 1986;175:11

Charles E : Analysis of urine to monitor exposures to benzidine, O-dianisidine, O-tolidine and 4,4'-methylenedianiline. *Appl Occup Environ Hyg* 1990;6(11):953

Chung KT, Stevens SE Jr, Cerniglia CE : The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Review in Microbiology* 1992;18(3):175

Dewan A, Jani JP, Patel JS, Gandhi DN, Variya MR, Ghodasara NB : Benzidine and its acetylated metabolites in the urine of workers exposed to direct black 38. *Archives of Environmental Health* 1988;43:-269

Lynn RK, Garvie-Gould C, Milam DF, Scott KF,

Eastman CL, Rodgers RM : Metabolism of the human carcinogen, benzidine, in the isolated perfused rat liver. *Drug Metabolism and Disposition* 1983;11(2):109

Meal PF, Cocker H, 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

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

National Cancer Institute : 13-week subchronic toxicity studies of direct blue 6, direct black 38 and direct brown 95 dyes. *Carcinogenesis Technical Report* 1978, NO. 78-1358

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

Peter M : NIOSH manual of analytic methods. 3rd ed., US Department of Health and Human Services, 1984

Piotrowski JK : Exposure tests for organic compounds in industrial toxicology. U.S Government Printing Office, Washington, D.C., 1977;81-85

Rehn L : Blasengeschwulste Beim fechs in-azbeitern. *Arch Klin Chro* 1985;50:588

Thomas AW : Direct Black 38, Direct Blue 6, Direct Brown 95, benzidine derived dyes. *Am Ind Hyg Assoc* 1978;39:18

Yoshida O, Harada T, Miyagawa M, Kato T : Bladder cancer in workers of the dyeing industry. *Igaku No Ayumi* 1971;79:421