

적출 흰쥐 간 관류법에 의한 이황화탄소 대사에 관한 연구

연세대학교 보건과학대학 산업환경학과 · 연세대학교 의과대학 산업보건연구소*

조영봉 · 배문주* · 최흥순 · 노재훈*

— Abstract —

A Study on the Metabolism of Carbon Disulfide by Isolated Rat Liver Perfusion

Young Bong Cho, Mun Joo Bae, Hong Soon Choi, Jae Hoon Roh.

*Department of Industrial Environmental & Health, College of Health Science, Yonsei University
Institute Occupational Health, College of Medicine, Yonsei University.**

The purposes of this study are the identification and determination of metabolites in the isolated rat liver perfusate of carbon disulfide by two-dimensional thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography for understanding the metabolism of carbon disulfide. 2-Thio-thiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) was synthesized by the reaction of carbon disulfide and cysteine, and confirmed by two-dimensional thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography, UV spectroscopy, and IR spectroscopy. The absorbance of UV detector for the simultaneous determination of TTCA and thiocarbamide was 254 nm although their maximum spectra were 273 nm and 237 nm, respectively. Two kinds of the developing solvent in the two-dimensional thin-layer chromatography were 2-butanol : 80% HCOOH : H₂O (7 : 2 : 1) as the first developing solvent and 2-propanol : H₂O (4 : 1) as the second developing solvent. After perfusion of carbon disulfide (8274.23 μ mol), the amount of TTCA and thiocarbamide of the perfusate (100 μ l) were 12.02 - 16.43 μ mol and 5.25 - 8.15 μ g, respectively. The mean amount of them were 14.08 μ mol and 6.41 μ mol respectively, and the former was 2.20 times greater than the latter. For conforming the mechanism of formations of TTCA and thiocarbamide in vivo, we have to clarify whether the reactions between carbon disulfide and ammonia, ammonium salts, amides, cysteine, cystine, or proteins will be formed in vitro.

Key Words : Carbon disulfide, 2-Thio-thiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA), Thiocarbamide, Isolated liver perfusion, HPLC, TLC,

※ 본 연구의 일부는 1992년도 연세대학교 학술연구비로 이루어졌음.

I. 서론

이황화탄소는 인건사, 셀로판지, 사염화탄소, 농약제조업 및 고무공업 등 각종 제조업에서 널리 이용되고 있으며 지방, 파라핀, 올리브유, 야자수 등의 추출용제로도 사용되어 왔다(Zenz, 1978). 이황화탄소에 오랜기간 동안 폭로되면 중추신경에 독성을 나타내어 큰 장애를 주며(Mancuso 등, 1972; Seppalainen 등, 1974; Hanninen 등, 1978; WHO, 1979), 만성중독이 오랜기간 지속되면 신경계통에 영구적인 손상과 심장혈관계통에 장애를 준다는 보고도 있다(Tiller 등, 1968; Tolonen 등, 1979; WHO, 1979). 특히 티오카바마이드(Thiocarbamide)에 대한 발암성도 보고되었으며(Doull 등, 1978) 근래 우리나라에서도 인건사 제조업에서 근무하는 근로자에게서 이황화탄소 중독사례가 보고되어 커다란 사회문제가 된 바 있다.

이황화탄소의 요증 대사물질에 대한 동정 및 확인에 관한 연구도 많이 발표되었는데 Pergal 등(1972)은 이황화탄소에 폭로된 근로자들의 소변에서 대사물질인 2-mercapto-2-thiazolinone-5와 티오카바마이드를 적외선 분광계(infrared spectrometry, 이하 IR)와 질량 분석계(mass spectrometry)로 확인하였으며 더 많은 양의 티오카바마이드가 배설되었다고 발표했다. Doorn 등(1981)은 인건사 제조과정에서 이황화탄소에 폭로된 근로자들의 소변내에서 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid(이하 TTCA)를 ^1H -핵자기공명 분광계(^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy, 이하 NMR)와 가스 크로마토그래피/질량분석 검출기(gas chromatography/mass spectrometry)로 확인하였으며 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, 이하 HPLC)로 정량분석하였다(Doorn 등, 1981b; Rosier 등, 1982). 우리나라에서도 흰쥐를 이용한 연구에서 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, 이하 HPLC)를 이용하여 요증에서 TTCA와 티오카바마이드의 동시분석법(김치년 등, 1992)과 대사물질 분석을 발표한 바 있으며(조영봉 등, 1993), 또한 흰쥐의 혈중 이황화탄소의 생체내 대사에 관한 연구도

보고된 바 있으며(조명화 등, 1993), 최근에는 TTCA를 생물학적폭로지표(Biological exposure index)로 이용하고 있다.

그러나 생체내에서 TTCA 및 티오카바마이드의 생성기전은 아직 명확하게 밝혀진 바 없음으로 본 연구에서는 우선 그 대사를 관장하는 간의 기능을 검토하기 위하여 혈액을 완전히 제거한 흰쥐의 간을 이용하는 적출 간 관류법에 의한 그 생성여부와 대사물질을 HPLC와 얇은막크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, 이하 TLC)로 확인하는데 본 연구의 목적이 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

생후 9-11주가 경과되고 체중이 $250 \pm 10\text{g}$ 인 Sprague-Dawley계 흰쥐 5마리를 실험동물로 하였으며 실험을 시작하기 일주일 전부터 실험동물의 사육장내 환경을 $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $65 \pm 5\%$ 로 낮과 밤을 일정하게 유지하였다. 실험동물의 사료는 삼양사 제품을 사용하였고 음료수는 5차 증류수로 하여 자유롭게 섭취하게 하였다. 본 실험에 사용한 시약은 분석용 특급 시약을 그대로 사용하였으며 HPLC 용리액으로 Aldrich사 제품으로 초음파 처리(ultrasonication)를 한 후 사용하였다. 그리고 시판이 안되는 표준물질 TTCA는 합성하여 사용하였다(조영봉 등, 1992).

2. 측정기기

표준물질로 사용하기 위하여 합성한 TTCA의 구조확인인 Shimadzu사 제품의 IR 435 spectrophotometer를 이용하여 적외선 스펙트럼(infrared spectrum)을 구하고 ^1H -핵자기공명 스펙트럼(이하 ^1H -NMR 스펙트럼)은 Varian사 제품의 EM-360L spectrometer로 수행하였다. 그리고 얇은막 크로마토그래피(thin-layer chromatography, 이하 TLC)는 Merk사 제품의 Silicagel 60F-254로 하여 검출은 UV-lamp(Spectroline사제)를 이용하였다.

HPLC는 Gilson사 제품으로서 305 pump 3대, 805 manometric module, 811B dynamic mixer, 20 μl loop readyne 712 injector로 이루어

했으며 검출기는 Gilson사 제품의 112 UV/VIS detector를 사용하였다. 분리관은 Waters사 제품의 μ Bondapak™ C18 (4.5mm×25cm)와 Dupont사 제품의 Zorbax NH₂ (4.0mm×25cm)을 이용하였고 자료정리 및 HPLC 작동은 Gilson사 제품의 system interface module을 이용하여 IBM 32bit computer와 Epson printer를 HPLC에 연결하여 사용하였다. 자외선 흡수스펙트럼은 Shimadzu사 UV-VIS 160A spectrophotometer를, 간관류장비로는 Keun-a mechatronics사의 KASP 005-150MT syringe pump와 Gilson사의 peristaltic pump를 사용하였다.

3. 실험방법

가) TTCA합성 및 확인

실온에서 증류수 30 ml속에 Sodium hydroxide (4.0g, 0.1mol)와 L-cysteine (4.8g, 0.04mol)를 잘 혼합한 후 CS₂ (4.6g, 0.06mol)을 적가하여 준다. 이 혼합물을 실온에서 20시간 동안 잘 교반하여 진한 염산을 가한 후, ethyl acetate로 추출한 다음 용매를 날린 잔사를 6N-염산으로 3회 재결정하여 TTCA를 얻었다. 그리고 순도는 UV spectroscopy, IR spectroscopy, ¹H-NMR 스펙트럼, HPLC 및 TLC를 이용하여 확인한 후 사용하였다

Table 1. Column, solvent component and flow rate in HPLC condition

Type	Flow rate(ml/min)	Column	Solvent Component
1	1.0	NH ₂	50 mM KH ₂ PO ₄ : Acetonitrile (1 : 4)
2	0.8	NH ₂	Water (100%)
3	0.8	NH ₂	Water : Acetonitrile (4 : 1)
4	0.8	OD(C18)	Acetonitrile (100%)
5	1.0	OD(C18)	Water (100%)
6	1.5	OD(C18)	Water : Methanol (4 : 1)

Table 2. HPLC operation condition

Description	Condition
Column	(1) μ Bondapak™ C18 (4.5 mm X 25 cm) (2) Zorbax NH ₂ (4.0 mm X 25 cm)
Mobile phase	Type 1- Type 6
Detector	UV detector (254 nm)
Injection vol.	10-100 μ l
Chart speed	0.5 cm/min

(조영봉 등, 1992).

나) TTCA와 티오카바마이드의 분리를 위한 HPLC 작동조건

C18-Column과 NH₂-Column을 각각 HPLC에 연결하고, 5차증류수에 TTCA와 티오카바마이드를 녹여서 만든 시료를 분석하기 위한 다양한 용리액과 작동조건은 Table 1과 Table 2와 같다.

다) 적출 간 관류법(Isolated liver perfusion)

관류액은 Kerbs-Ringer 중탄산 완충용액 (pH 7.4)을 사용하였으며 관류액은 37℃로 유지하면서 95% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스를 계속 폭기시키면서 분당 20ml의 유속으로 관류하였다.

흰쥐를 염산케타빈으로 마취한 후, 등쪽이 바닥을 향하도록 하고 사지를 수술대 위에 고정시키고 복부 중앙선을 절개한 후 하대정맥(inferior vena cava)에 헤파린 용액을 주사한 다음, 관류액이 채워진 폴리에틸렌튜브(polyethylene tube, 외경 1.3mm)를 간문맥(hepatic portal vein)에 삽입하였다. 흉곽과 흉강을 절개하여 폴리에틸렌 튜브를 흉정맥(thoracic vena cava)에 삽입하고 묶은 다음, 간문맥에 삽입된 튜브에 펌프를 연결하여 관류액을 순환시켰다. 간과 관류장치간의 평형을 유지하기 위하여 약 20분간 관류한 액은 폐기한 후, 관류액을 1시간동안 순환시키는 과정에서 이산화탄소를 syringe pump로 유속 0.05ml/min으로 간문맥에 연결된 튜브를 통해 약 10분 정도 투여한 후(총투여량, 8274.23 μ mol), 관류액 전액(200ml)을 채취하여 전처리용 시료로 하였다.

라) 적출 간 관류 대사물질의 전처리 및 HPLC분석
시료에 4N 염산으로 pH 1.5 - 2.0 으로 조정하고

진공농축하여 약 10ml로 한 후 10ml 에틸아세테이트를 가하여 1시간 동안 중탕한 다음 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취한다. 수층액에 10ml 에틸아세테이트를 다시 가하여 같은 방법으로 재추출하여 상등액을 취하여 전후액을 합하여 진공증발 건조시킨 후 메탄올 5ml로 녹여 여과한 후 분석시료로 사용하였다.

마) 이차원 TLC(Two-dimensional TLC)에 의한 확인

라) 항에서 전처리한 분석시료와 티오카바마이드 및 TTCA의 표준 수용액을 동일 TLC판(20cm×20cm)에 점적한 후 충분히 건조시킨 다음 1차전개 용매 2-butanol : 80% HCOOH : H₂O(7 : 2 : 1) 전개하고 충분히 건조한 후 90도 회전하여 2차전

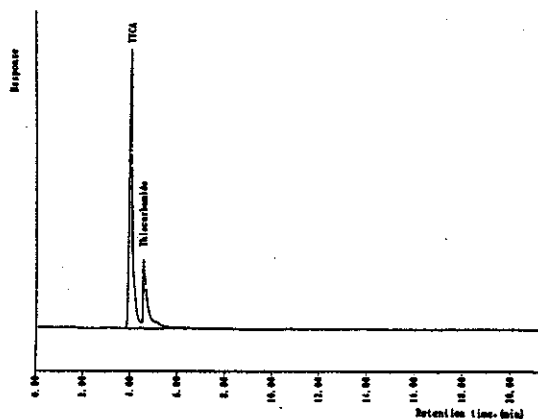


Fig. 1. Chromatogram of TTCA and Thiocarbamide by HPLC

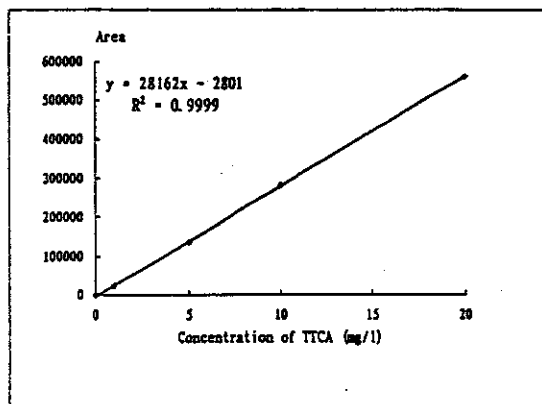


Fig. 2. Calibration curve of TTCA

개용매 2-propanol : H₂O(4 : 1)로 전개한 후 충분히 건조시킨 후 UV lamp(254nm)로 분석시료의 크로마토그램과 TTCA 및 카바마이드의 표준 수용액의 크로마토그램의 R_f값을 비교하였다(Figure 5).

III. 실험성적

1. HPLC에 의한 TTCA 및 티오카바마이드 분석

Table 1 및 Table 2에 열거한 다양한 용리액과 컬럼중에서 용리액으로는 증류수(100%), 컬럼은 NH₂컬럼을, 용리액의 유속은 0.8ml/min으로 하고, UV detector의 파장을 254nm로 하여 분석하면 TTCA 및 티오카바마이드의 크로마토그램의 중첩이 없는 4.05분과 4.62분의 머무름시간을 각각 얻었으며, 검량선의 감도 및 분석시간과 분석비용면에서 기 발표된 보고(김치년 등, 1992)와 유사한 결과를 얻었다(Figure 1, Figure 2, Figure 3).

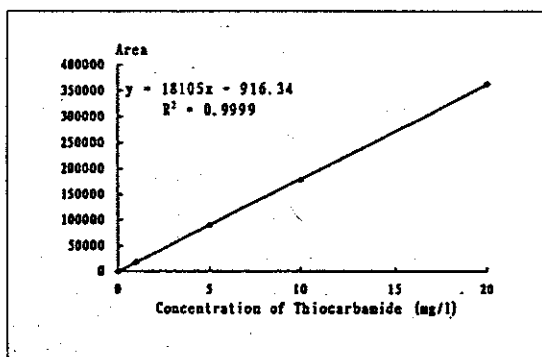


Fig. 3. Calibration curve of Thiocarbamide

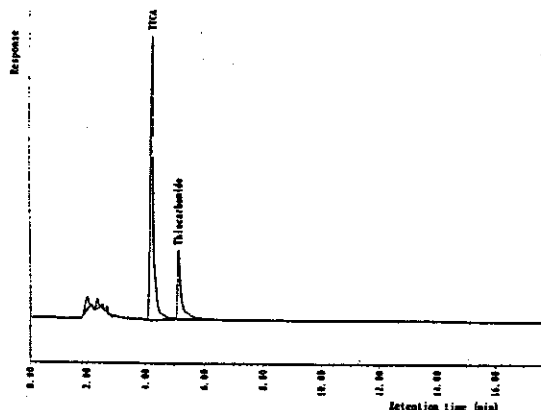


Fig. 4. Chromatogram of perfusate by HPLC

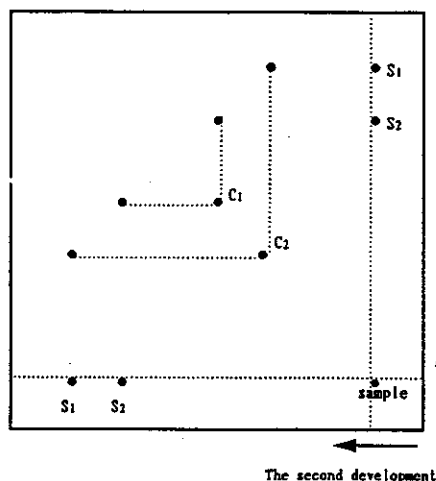


Fig. 5. Chromatogram of TTCA and Thiocarbamide in perfusate by two-dimensional TLC

S₁ : Thiocarbamide

S₂ : TTCA

C₁ : Chromatogram of Thiocarbamide

C₂ : Chromatogram of TTCA

The first developing solvent :
2-butanol:80% HCOOH:H₂O=7:2:1

The second developing solvent :
2-propanol:H₂O=4:1

The first development

The second development

2. HPLC에 의한 관류액(시료) 중의 TTCA 및 티오카바마이드의 분석

시료 중의 TTCA 및 티오카바마이드는 낮은 농도이므로 비교적 큰 100 μ l sample loop를 사용하고 UV detector의 파장을 254nm 으로 하여 분석용 시료로 분석한 결과 분석용 시료 중의 불순물의 크로마토그램과 TTCA와 티오카바마이드의 크로마토그램과의 중첩이 없으며 Figure 4와 같은 크로마토그램을 얻었으며, 총시료(8274.23 μ mol) 중 TTCA와 티오카바마이드의 평균농도는 각각 14.08 μ mol과 6.41 μ mol 으로서 그 비율은 평균 2.20대 1을 보여주고 있다(Table 3).

3. 이차원 TLC에 의한 관류액(시료) 중의 TTCA 및 티오카바마이드의 확인

20cm \times 20cm의 TLC판을 사용하여 1차 전개용매와 2차 전개용매를 사용하고, 분석용시료(sample)와 TTCA(S₂) 및 티오카바마이드(S₁)를 각각 소량씩을 점적하고 말린 다음 전개한 후 UV lamp를

비추어 나타나는 시료(sample)의 크로마토그램(C₁, C₂)의 R_f값과 TTCA 표준품의 크로마토그램의 R_f값이 각각 동일하게 나타났다.

IV. 고 찰

Pergal(1972)과 Doorn(1981)은 각각 이황화탄소에 폭로된 근로자의 요중에서 티오카바마이드와 TTCA를 확인하였다고 발표한 바 있었으나 TTCA 및 티오카바마이드의 생성기구에 대한 보고는 발표된 바 없으며 그 분석법에 대한 연구도 별로 없다.

TTCA 및 티오카바마이드는 최대흡수파장이 각각 273nm와 237nm이나 동시분석을 위하여 254nm를 채택하고 있었으나 개별분석을 위하여 최대흡수파장을 선택하는 것이 미량분석에 있어서 바람직 하였으며, 평균 생성량에 있어서는 티오카바마이드보다 TTCA가 평균 2.20배 정도 많은 양으로서 TTCA는 14.08 μ mol 이고 티오카바마이드가 6.41 μ mol으로 합계 20.49 μ mol으로 이황화탄소의 투여량(8274.27 μ mol)의 약 0.25% 정도로서 대부분의 이황화탄소는 간조직에 결합된 상태로 있다가 대사물형태로 저장되어 있다가 서서히 배출될 것으로 생각된다.

그리고 티오카바마이드의 생성량이 적은 것은 조직 중에 이황화탄소와 반응하여 티오카바마이드를 생성

Table 3. Concentration TTCA and Thiocarbamide in Perfusate

	unit : (μ mol)					
	1	2	3	4	5	mean
TTCA	15.08	12.02	16.43	14.35	12.50	14.08
Thiocarbamide	6.83	5.78	8.15	6.04	5.25	6.41
TTCA / Thiocarbamide	2.21	2.08	2.02	2.38	2.38	2.20

시키리라고 생각되는 암모니아와 같은 화학적인자가 적은량으로 존재하는데 기인하는 것으로 추측된다.

따라서 TTCA 및 발암성 물질인 티오카바마이드의 생성기구를 규명하기 위하여는 세포벽과 세포내용물을 분리한 다음 각각의 물질에 대하여 이황화탄소와 반응시킴은 물론 암모니아, 암모늄화합물, 아미노산아마이드, 시스테인, 시스틴, 혈액단백질과 이황화탄소를 각각 반응시켜 얻은 반응물의 확인이 선행됨으로서 이루어질 것이며 나아가서 이황화탄소에 의한 중독의 예방과 치료제 개발에 도움이 되리라 본다. 특히 티오카바마이드의 발암성으로 보아 그간 고농도의 이황화탄소에 폭로된 근로자에 대한 암발성을 면밀히 추적함은 물론 사전예방과 조기 치료에 대한 배려가 있어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

적출 간관류법에 의한 이황화탄소 관류액에서 TTCA와 티오카바마이드의 생성이 HPLC 와 이차원 TLC로 분석한 결과 표준품과 동일한 머무름시간과 R_f 값을 나타냄으로서 동일물질임을 확인하였다.

HPLC에 의한 TTCA 및 티오카바마이드의 동일 분석을 위한 최적의 조건은 컬럼은 NH_2 컬럼을, 용리액의 유속은 0.8ml/min, UV detector의 파장을 254nm가 최적의 조건이었으며, 평균 생성량에 있어서는 티오카바마이드보다 TTCA가 평균 2.20 배 정도 많은 양으로서 TTCA는 $14.08\mu\text{mol}$ 이고 티오카바마이드가 $6.41\mu\text{mol}$ 으로 합계 $20.49\mu\text{mol}$ 으로 이황화탄소의 투여량($8274.23\mu\text{mol}$)의 약 0.25% 정도로서 대부분의 이황화탄소는 간조직에 결합된 상태로 있든가 대사물형태로 저장되어 있다가 서서히 배출될 것으로 생각된다. 이황화탄소의 대사물질인 티오카바마이드의 생성기구는 아직 알려져 있지 않지만 추측컨대 관류액중의 미량 흔재할 수 있는 암모니아, 간조직내에 있는 암모니아 또는 단백질 또는 아미노산의 아마이드와의 반응에 의하여 생성될 수 있으리라 생각된다. 따라서 이황화탄소와 암모니아, 단백질 및 아미노산의 아마이드와의 화학적반응에 의한 티오카바마이드의 생성여부와, 이황화탄소와 시스테인, 시스틴 및 단백질

과의 반응에 의한 TTCA생성 여부를 추후에 확인하여야 할 것이다.

VI. 참고문헌

조영봉, 김치년, 노재훈. HPLC를 이용한 요중 이황화탄소 대사물질 분석에 관한 연구. 보건과학잡지(연세대학교 보건과학) 1993; 3(3): 1993

김치년, 문영한, 노재훈, 조영봉. 이황화탄소의 요중대사물질에 관한 연구. 대한산업의학회지 1992; 4(2): 133-143

조명화, 김치년, 이경중, 문영한, 노재훈, 조영봉. 이황화탄소를 경구투여한 흰쥐의 혈중 이황화탄소에 관한 연구. 대한산업의학회지 1993; 5(2): 218-222

조영봉, 김치년, 안찬목. 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic acid(TTCA)의 합성. 이황화탄소 대사물질. 보건과학 논집(연세대학교 보건과학대학) 1992; 2(1): 61-65

Doorn R van, Vanhoorne M, Vertin PG. Identification and determination of 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic acid in urine of worker exposed to carbon disulfide. Arch Environ Health 1981; 47: 51-58

Doull J, Klassen CD. Casarett and Doull's toxicology. 2nd ed, Philadelphia, Saunders 1980 Hannine H, Nurminen M, Tolonen M. Psychological test as a indicator of excessive exposure to carbon disulfide. Scand J Psychol 1978; 19: 163-174

Hanninen H, Nurminen M, Tolonen M, Matelin T. Psychological test as a indicators of excessive exposure to carbon disulfide. Scand J Psychol 1978; 19: 163-174

Mancuso TF, Loke BZ. Carbon disulfide as a cause of suicide: Epidemiological study of viscose rayon workers. J Occup Med 1972; 14: 595-606

Pergal M, Vukojevic N, Djuric D. Isolation and Identification of thiocarbamide. Arch Environ Health 1972; 25: 42-44

Rosier J, Vanhoorne M, Grosjean R, Walle E, Billemont G, Peteghem C. Preliminary evaluation of urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) levels as a test for carbon disulfide. Int arch Occup Environ Health 1982; 51: 159-167

Sepapaleinen AM, Tolonen M. Neurotoxicity of long term exposure to carbon disulfide in the viscose rayon industry: A neurophysiological study. Work Environ Health 1974;

Tiller JR, Schilling RSF and Morris JN. Occupational toxic factor in mortality from coronary heart disease. Br Med J 1968; 4: 407-411

Tolonen M, Nurminen M, Hernberg S. Ten-year coro-

nary mortality of workers exposed to carbon disulfide. criteria 10. Geneva; WHO, 1979; 1-75
Scand J Work Environ Health 1979; 5: 109-114 Zenz C. Occupational Medicine, Chicago; Year Book
WHO. Carbon disulfide from environmental health medicine publisher 1978; 1013-1015