

1,2,4-트리메틸벤젠에 피폭된 노동자의 뇨 중 3,4-디메틸히푸르 산과 크레아티닌의 정량

임정미 · 장재연* · 이용문** · 강종성#

충남대학교 약학대학, *이주대학교 의과대학, **충북대학교 약학대학

(Received September 11, 1997)

Determination of 3,4-Dimethylhippuric Acid and Creatinine from the Urine of Workers Exposed to 1,2,4-Trimethylbenzene

Jeong-Mi Lim, Jae-Yeon Jang*, Yong-Moon Lee**
and Jong-Seong Kang#

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

*School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

**College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chongju 360-763, Korea

Abstract—Creatinine and 3,4-Dimethylhippuric acid (3,4-DMHA), a glycine conjugate of 1,2,4-trimethylbenzene (1,2,4-TMB) were determined in the urine of workers exposed to 1,2,4-TMB vapor. The best condition for the simultaneous determination of 3,4-DMHA and creatinine by high performance liquid chromatography was obtained by reverse phase C₁₈ column (4.6×150 mm, 5 μm) as stationary phase and 20% acetonitrile in 20 mM phosphate buffer (pH 3.0) containing 4 mM sodium octylsulfate (SOS) as mobile phase. The recovery of 3,4-DMHA spiked to blank urine in the range of 1~5 μg/ml was about 96%. The concentration of urinary 3,4-DMHA of workers had a positive correlation with the environmental level of 1,2,4-TMB (r=0.866). The data suggest that urinary 3,4-DMHA concentration is a useful biological index for 1,2,4-TMB exposure.

Keywords □ 3,4-dimethylhippuric acid, biological index, creatinine, 1,2,4-trimethylbenzene, HPLC.

Trimethylbenzene(TMB)는 coal tar나 원유의 정제로부터 얻어지며 용매나 페인트 등의 신너로 또는 색소, 화장품, 의약품의 원료로 사용되고 있다. 동물실험에서 보고된 이들 성분의 급성독성효과는 일차적으로 점막 자극과 더불어 폐내에 침착된 경우에는 화학성 폐렴을 일으키고, 고농도의 증기상 성분은 중추신경계 억제를 유발시키는 것이 확인되었다.^{1,2)} 인체노출과 관련하여 1,3,5-TMB 30%와 1,2,4-TMB 50%를 함유하는 일명 "Fleet-X-DV-99"라는 용제에 수년간 노출된 작업자에서 신경과민, 긴장, 초조 및 천식성 기관지염의 증상이

보고 되었다. 그밖에도 이 물질에 장기간 피폭된 사람은 두통, 어지러움, 집중력 상실, 수면장애, 졸리움 등의 중추신경 작용을 나타내었다.³⁻⁵⁾ 이와 같은 연구들을 토대로 이들 세가지 이성질체 각각 및 총 TMB에 대한 시간가중 허용기준치(Threshold Limit Value-Time Weight Average: TLV-TWA)는 현재 미국⁶⁾과 일본⁷⁾ 및 우리나라에서 모두 25 ppm으로 규정하고 있다.

그러나 유해물질의 폭로경로가 호흡에 의한 흡입뿐만 아니라, 피부를 통해 흡수되는 물질의 경우에는 공기시료를 채취하여 유해물질의 환경농도를 측정하는 것만으로는 유해물질에 대한 노출량을 제대로 평가하기 어렵다. 특히 산업장에서 개인 보호구를 착용함으로써 실제 유기용제의 폭로량이 낮아지는 경우에는 환경조

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5928 (팩스) 042-823-6566

사의 결과가 작업자들에 대한 유해물질에 대한 노출량을 효율적으로 설명하지 못하게 된다. 이러한 제한점을 해결하기 위해서 생물학적 감시(biological monitoring)의 필요성이 대두되었는데 이것은 특정시간에 생물학적 시료(노, 혈액, 호기 등)내에서 화학물질 자체나 대사물질을 측정함으로써 화학물질에 대한 전반적인 노출을 평가하는 방법이다.⁶⁾ 현재 많은 화학물질의 생물학적 감시방법들이 개발되고 있으나 TMB의 경우는 아직까지 그 방법이 정립되지 않은 실정이다.

TMB는 3가지 이성질체, 즉 1,2,3-TMB, 1,2,4-TMB 및 1,3,5-TMB로 구성되고 주요 성분은 1,2,4-TMB이다. 이들 이성질체 중 1,2,4-TMB는 동물실험 결과 대부분이 이의 glycine 포함체인 3,4-dimethylhippuric acid(3,4-DMHA)로 대사되는 것이 확인되었고⁸⁻¹⁰⁾, 이것은 노중 3,4-DMHA의 농도가 1,2,4-TMB의 환경농도에 대한 중요한 생물학적 지표가 될 수 있다는 사실을 시사해주고 있다. 한편, 이러한 지표물질의 노중 배설량을 측정하기 위해서는 하루동안 배설된 노를 합하여 분석하는 것이 효과적이나 실험설계상 많은 어려움이 따르므로 1회분의 노를 이용하는 것이 일반적이다. 이 때 노량에 따라 지표물질의 농도가 변화하므로 체내에서 노로 일정한 속도로 배설되고 있는 크레아티닌을 동시 분석하여, 크레아티닌의 양(g)에 대한 지표물질의 양(mg)으로 지표물질의 배설정도를 표현하는 것이 일반적이다.^{12,13)} 노중 3,4-DMHA 및 크레아티닌은 주로 HPLC에 의해 분석되었는데¹¹⁻¹⁴⁾ 분석조건 설정에 대한 체계적인 설명이 미비하여 광범위한 시료의 분석에 응용하기가 어렵다. 노나 혈액과 같은 생체시료중에는 많은 종류의 방해물질이 공존하고 있어서 분석의 최적조건을 찾기 위하여는 이동상의 pH, 이온쌍 시약의 종류 및 농도, 용매의 강도 등이 시료의 분리도 및 머무름시간에 미치는 영향을 종합적으로 검토하여야 한다. 본 논문에서는 1,2,4-TMB에 피폭된 노동자의 노중 3,4-DMHA와 크레아티닌을 방해물질의 영향을 최소로 하여, 동시에 분석할 수 있는 HPLC의 최적 조건을 설정하였다.

실험방법

시약 및 기기 - 3,4-DMHA, 크레아티닌, 3(또는 4)-methylhippuric acid(MHA), hippuric acid(HA), sodium hexylsulfate(SHS), sodium octylsulfate

(SOS), sodium decylsulfate(SDS), sodium acetate, sodium phosphate 등은 Sigma제품을 사용하였으며, 그의 산, 알칼리 및 유기 용매는 국내외의 특급시약을 사용하였다. HPLC system은 Shimadzu LC-10AD 펌프, Shimadzu SPD-M10AVP 다이오드 어레이 검출기, Rheodyne 7725i 주입기로 구성되었으며 기기와 컴퓨터간의 연결은 CBM-10A communication bus module을 이용하였다.

시료채취 - 페인트 도장작업을 하면서 TMB에 노출되고 있는 노동자를 대상으로 작업이 종료될 때 노를 채취하였다. 각 노동자는 보호장구를 착용한 경우와 아닌 경우를 구분하였으며, 각 작업장의 TMB 농도는 따로 측정하였다. 채취한 노는 혈청분리관에 넣어 -70°C에서 사용할 때까지 보관하였다.

시료처리 - 냉동보관된 노시료를 상온에서 완전히 녹인 후 에펜도르프 튜브에 취하고 여기에 10배의 메탄올 혼액(1:1)을 가하여 3000 g에서 5분간 원심분리시켰다. 이 액 10 µl를 HPLC에 주입하였다.

시료측정조건 - HPLC의 고정상으로 Inertsil ODS-3(4.6×150 mm, 5 µm), 유속 1 ml/min, 주입량 10 µl로 HPLC를 시행하였으며 다이오드 어레이 검출기는 매초 220~400 nm로 스캔하였고, 정량은 246 nm에서 얻은 크로마토그램을 이용하였다. 이동상의 적합한 조성을 결정하기 위하여 인산과 초산완충액으로 pH를 조절하였으며, 이온쌍의 종류 및 농도를 변화시키면서 실험하였다.

결과 및 고찰

이동상의 조성이 머무름시간에 미치는 영향 - 이동상의 pH가 머무름 시간에 미치는 영향을 보기 위하여 여러가지 pH에 대한 머무름시간을 관찰하였다(Fig. 1). pH 4 이상에서는 전반적으로 분리가 좋지 않았고, pH가 낮아짐에 따라 머무름시간이 길어졌다. 예외적으로 크레아티닌의 경우는 pH 3.5이하에서는 오히려 머무름시간이 감소하였는데 이것은 크레아티닌이 약한 염기이기 때문에 풀이된다. pH 3 이하에서의 HA와 크레아티닌의 유출순서는 pH 3.5 이상에서는 서로 바뀌어서 나타났다. 전반적인 분리도는 pH 3 이하에서 양호했지만 pH 2.5에서는 분리시간이 증가하였으므로 일상분리는 pH 3에서 시행하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

아세트오니트릴의 함량에 따른 머무름시간은(Fig. 2),

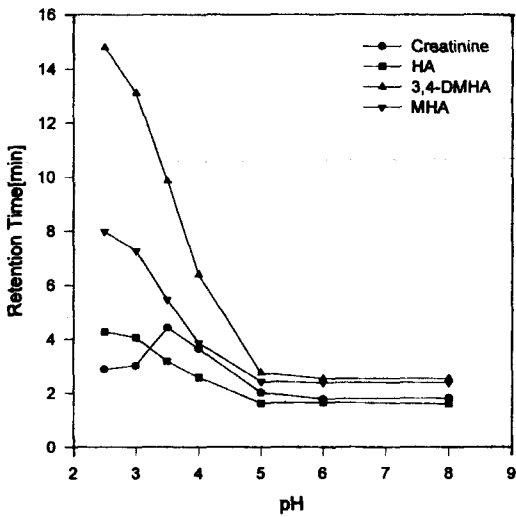


Fig. 1—Effect of pH of the mobile phase on the retention time of creatinine, DMHA, HA and MHA. Mobile phase : 20% acetonitrile in 20 mM phosphate buffer containing 4 mM SOS.

아세트니트릴의 함량이 감소할수록 분리능이 증가하였지만 15%이하에서는 분리시간이 급격히 증가하였다. 아세트니트릴의 함량이 20%정도면 분리능의 손실도 적고 분리시간도 15분 이내로 양호하였다.

이온쌍시약의 종류에 따라 머무름시간은 다소 변화하였

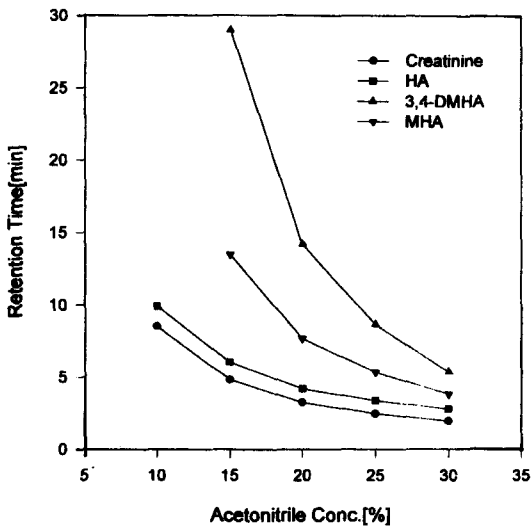


Fig. 2—Effect of acetonitrile concentration of the mobile phase on the retention time of creatinine, DMHA, HA and MHA. Mobile phase : acetonitrile in 20 mM phosphate buffer (pH 3) containing 4 mM SOS.

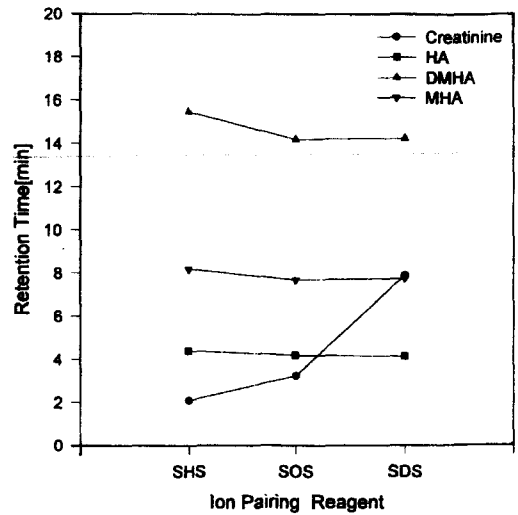


Fig. 3—Effect of ion pairing reagents of the mobile phase on the retention time of creatinine, DMHA, HA and MHA. Mobile phase: 20% acetonitrile in 20 mM phosphate buffer (pH 3) containing 4 mM of SHS, SOS or SDS.

다(Fig. 3). 전반적으로 이온쌍시약의 탄소수가 증가함에 따라 각 물질의 머무름 시간이 약간 감소하는 경향을 보였지만 크레아티닌의 경우는 반대 현상을 보였다. SDS를 사용했을 경우는 MHA와 크레아티닌이 겹쳐서 나타났고 SHS를 사용했을 경우 크레아티닌의 머무름 시간이 너무 짧아서 앞쪽의 방해 물질의 영향을 받았다. 본 조건에서 가장 적합한 이온쌍 시약은 SOS로 판단되었다.

이온쌍시약인 SOS의 함량이 증가할수록 크레아티닌의 머무름시간은 약간씩 증가하였으나 그의 물질의 머무름시간은 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 4). SOS함량이 2 mM이하에서는 크레아티닌의 머무름시간이 짧아져서 앞쪽의 방해물질과 겹쳤고, SOS의 농도가 8 mM이상에서는 크레아티닌이 HA와 겹쳐서 정량이 불가능하였다. 이 실험에서 적합한 SOS의 농도는 4 mM내외였다.

이상의 실험에서 노중 3,4-DMHA 및 크레아티닌의 동시분석에 적합한 이동상의 조성은 4 mM SOS를 함유하는 20% 아세트니트릴-20 mM 인산완충용액(pH 3.0)이었으며, Fig. 5는 이 조건으로 TMB에 피폭된 사람의 뇨와 피폭되지 않은 사람의 뇨를 분석한 크로마토그램이다. 3,4-DMHA 및 크레아티닌을 다른 물질의 방해를 받지않고 분석할 수 있었다.

노중 3,4-DMHA의 회수시험 - 3,4-DMHA가 전

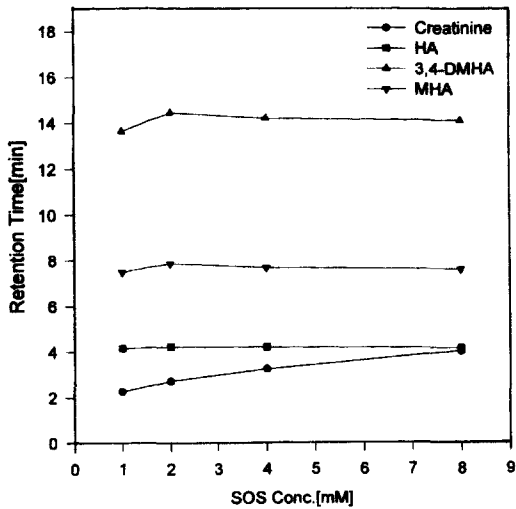


Fig. 4—Effect of SOS concentration of the mobile phase on the retention time of creatinine, DMHA, HA and MHA. Mobile phase : 20% acetonitrile in 20 mM phosphate buffer (pH 3) containing SOS as ion pairing reagent.

혀 검출되지 않은 바탕뇨에 3,4-DMHA 일정량을 가한 후 회수율을 측정 한 결과 회수율이 93% 이상이었다

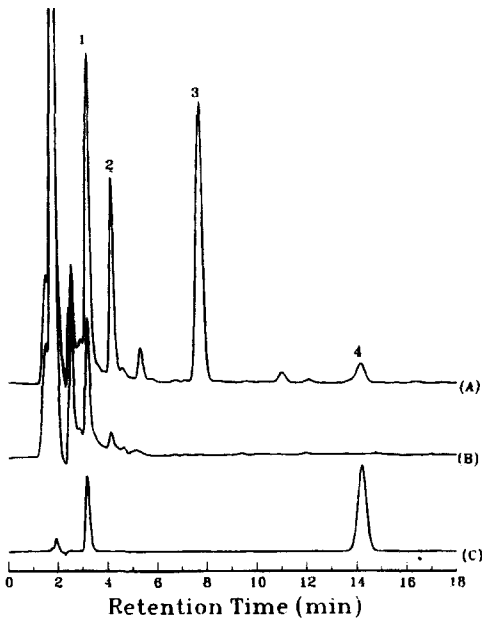


Fig. 5—Chromatograms of the urine of a worker exposed to 1,2,4-TMB (A), the blank urine (B), and standard solution of creatinine and 3,4-DMHA (C). Peaks : 1) creatinine, 2) HA, 3) MHA, 4) 3,4-DMHA.

Table I—Evaluation of the recovery and precision for the assay of 3,4-DMHA in human urine

Amount Spiked (µg/ml)	Amount Recovered (µg/ml)	Recovery (%)	CV (%)
1	0.96	95.7	2.08
5	4.80	95.9	1.14
10	9.38	93.8	2.05
100	93.36	93.4	0.45

(Table I). 특히 일상분석농도인 1~5 µg/ml 범위에서는 회수율이 96% 정도로 노 중 3,4-DMHA의 회수는 문제가 없는 것으로 나타났다.

검량선 작성 - 3,4-DMHA (0.1~100 µg/ml)와 크레아티닌 (20~1000 µg/ml)에 대한 검량선은 양호한 직선성을 보였고, 상관계수값은 각각 0.9997, 0.9947이었다. 검출한계는 3,4-DMHA는 0.05 µg/ml (0.5 ng), 크레아티닌은 1 µg/ml (10 ng)으로 노 중에서 이들 물질을 정량하기에 충분하였다.

TMB 환경농도와 DMHA의 농도관계 - Fig. 6은 TMB에 노출된 노동자의 노 중 3,4-DMHA의 농도를 보인 것으로 1,2,4-TMB의 환경농도와 노 중 3,4-DMHA의 농도가 대체로 직선성을 보이고 있다. 직선의 관계식은 $y = 3.16x + 0.99$ 로 Fukaya 등¹²⁾의 $y = 15.9x + 12.4$, Ichiba 등¹³⁾의 $y = 10.4x + 7.0$ 와는 상당한 차이를 보였다. 이는 이 논문에 인용된 노동자들이 페인트 도

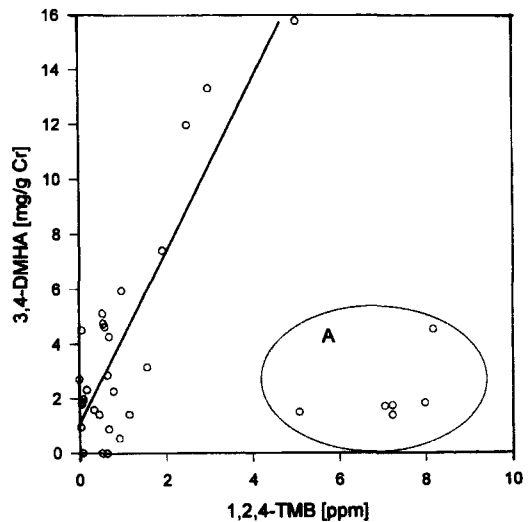


Fig. 6—Correlation between the 1,2,4-TMB vapor level and the urinary concentration of 3,4-DMHA. The data from the worker group with safe-guard are plotted in circle A.

장작업을 하면서 TMB이외에도 xylene, ethylbenzene 등 유사한 유기용제에도 동시에 노출되고 있기 때문에 이들 물질간의 상호작용에 의한 것, 또는 1,2,4-TMB의 피폭농도가 0~5 ppm으로 Fukaya 등(0~30 ppm)이나 Ichiba 등(3~8 ppm)의 경우 보다 월등히 낮은 것 등에 기인할 수도 있을 것으로 보여진다.

한편 A원 내의 6개의 자료는 보호장구를 착용한 노동자의 것으로, 보호장구를 착용하지 않은 경우보다 노출 3,4-DMHA의 농도가 월등히 낮음을 알 수 있어 보호구 착용으로 인한 체내흡수량의 감소를 잘 설명하고 있다. 보호장구를 착용한 경우를 제외한 자료의 상관계수는 0.866으로 양호한 직선성을 보이고 있어, 환경농도에 대응하는 정확한 값은 추가적인 연구가 필요할 것이지만 노출 3,4-DMHA가 1,2,4-TMB 피폭에 대한 생물학적 모니터링의 지표로서의 효용성이 크다는 것이 확인된 것으로 보여진다.

결 론

1,2,4-TMB에 피폭된 노동자의 노출 3,4-DMHA와 크레아티닌을 동시분석할 수 있는 HPLC 조건은 고정상으로 역상인 C₁₈칼럼, 이동상으로 4 mM SOS를 함유하는 20% 아세토니트릴-20 mM 인산완충용액(pH 3.0) 이었다. 바탕노에 1~5 µg/ml의 3,4-DMHA를 가했을 때의 회수율은 96%정도로 양호하였다. 1,2,4-TMB의 환경농도와 노출 3,4-DMHA의 농도는 직선성을 나타내었고(r=0.866) 이것은 노출 3,4-DMHA의 농도가 1,2,4-TMB의 피폭에 대한 생물학적 지표가 될 수 있음을 보여준다.

감사의 말씀

이 논문은 충남대학교 약학대학 의약품개발연구소 및 대우조선의 지원으로 수행되었음.

문 헌

1) Korsak, Z. and Rydzynski, K. : Neurotoxic effects of acute and subchronic inhalation exposure to trimethylbenzene isomers (pseudocumene, mesitylene, hemimellitene) in rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **9**, 341 (1996).

2) Korsak, Z., Swiercz, R. and Rydzynski, K. : Toxic effects of acute inhalation exposure to 1,2,4-trimethylbenzene (pseudocumene) in experimental animals. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **8**, 331(1995).

3) Indulski, J. A., Sinczuk-Walczak, H., Szymczak, M. and WesoLowski, W. : Neurological and neurophysiological examinations of workers occupationally exposed to organic solvent mixtures used in the paint and varnish production. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **9**, 235 (1996).

4) Jarnberg, J., Johanson, G. and Lof, A. : Toxicokinetics of inhaled trimethylbenzenes in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**, 281 (1996).

5) Triebig, G., Schaller, K. H. and Weltle, D. : Neurotoxicity of solvent mixtures in spray painters. I. Study design, workplace exposure, and questionnaire. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **64**, 353 (1992).

6) American Conference of Governmental Industrial Hygienists : Threshold limit value and biological exposure indices for 1996. ACGIH, Cincinnati (1996).

7) Japan Association of Industrial Health : Recommended occupational exposure limits. *Jpn. J. Ind. Health* **33**, 277 (1991).

8) Zahlsten, K., Nilsen, A. M., Eide, I. and Nilsen, O. G. : Accumulation and distribution of aliphatic (n-nonane), aromatic (1,2,4-trimethylbenzene) and naphthenic (1,2,4-trimethylcyclohexane) hydrocarbons in the rat after repeated inhalation. *Pharmacol. Toxicol.* **67**, 436 (1990).

9) Huo, J. Z., Aldous, S., Campbell, K. and Davies, N. : Distribution and metabolism of 1,2,4-trimethylbenzene (pseudocumene) in the rat. *Xenobiotica* **19**, 161 (1989).

10) Cerf, J., Potvin, M. and Laham, S. : Acidic metabolites of pseudocumene in rabbit urine. *Arch. Toxicol.* **45**, 93 (1980).

11) Stahlbom, B., Jarnberg, J., Soderkvist, P. and Lindmark, D. : Determination of dimethylhippuric acid isomers in urine by high-performance liquid chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **69**, 147 (1997).

12) Fukaya, Y., Saito, I., Matsumoto, T., Takeuchi,

- Y. and Tokudome, S. : Determination of 3,4-dimethylhippuric acid as a biological monitoring index for trimethylbenzene exposure in transfer printing workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**, 295 (1994).
- 13) Ichiba, M., Hama, H., Yukitake, S., Kubota, M., Kawasaki, S. and Tomokuni, K. : Urinary excretion of 3,4-dimethylhippuric acid in workers exposed to 1,2,4-trimethylbenzene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **64**, 325 (1992).
- 14) Busini, S., Bavazzano, P. and Occhiato, E. : High-performance liquid chromatographic determination of 3,5-dimethylhippuric acid in the occupational exposure to trimethylbenzenes. *J. Chromatogr.* **577**, 180 (1992).