



4-Tert-Octylphenol의 랫드에서의 조직분포 및 독성동태에 관한 연구

강미경¹ · 안미령³ · 정혜주² · 최선옥² · 최홍석³ · 양지선³ · 이음복⁴ · 유태무³ · 손수정²

¹국립독성연구원 독성연구부, ²국립독성연구원 유효성연구부,
³식품의약품안전청 의약품평가부, ⁴전남대학교 약학대학

Tissue Distribution and Toxicokinetics of 4-Tert-Octylphenol in Rats

Mi Kyung Kang¹, Mee Ryung Ahn³, Hye Joo Chung², Sun Ok Choi², Hong Serk Choi³,
Ji Sun Yang³, Yong Bok Lee⁴, Tae Moo Yoo³ and Soo Jung Sohn²

¹Department of Toxicological Research,

²Department of Pharmacology, National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704

³Department of Drug Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704

⁴Department of Pharmacy, Chunnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Received March 27, 2004; Accepted June 29, 2004

ABSTRACT. 4-Tert-octylphenol (OP) is a surfactant additive widely used in the manufacture of a variety of detergents and plastic products. OP can disrupt endocrine function in humans and animals. This study was carried out to obtain toxicokinetic parameters of OP in male Sprague-Dawley (SD) rats. Male rats were administered with OP by single oral application of 200 mg/kg body weight. Blood, urine and tissues samples were taken at several time intervals after administration. Analysis of samples for OP was performed by column-switching high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, we examined tissue distribution and accumulation of OP after single oral application of 50, 100, and 200 mg/kg, single intravenous injection of 1, 5 and 10 mg/kg or daily application of 50 mg/kg for 14 consecutive days. After single oral administration of 200 mg/kg, C_{max} of 213 ± 123 ng/ml was reached within the first 1.3 hr (T_{max}) in the plasma. AUC was calculated for 1,333 ± 484 ng · hr/ml. The final elimination half-life of plasma was longer than that of urine, but urinary clearance was lower than oral. A very small fraction of OP (Fe < 0.0017%) was excreted in urine within 24 hr. These results indicated that the major excretion route of OP was not urine. The mean maximal tissue distribution of OP was observed at 6 hr after treatment and slowly decreased time-dependently. High OP concentrations were detected in fat at 24 hr. The OP in fat was slowly released with longer elimination half-life and lower clearance than that of other tissues. OP was not accumulated in the liver following single oral application but 14-day oral treatments resulted in two-fold accumulation. It was probably due to the saturation of detoxification pathways. On the other hand, the mRNA expression of cytochrome P450 isoforms except CYP2C11 was not affected by OP at any dose. The expression of CYP2C11 mRNA decreased in a dose-dependent manner. This result suggests that OP changes expression of the male-specific cytochrome P450 isoforms in rat liver, and these changes are closely related to the toxic and estrogenic effect of OP.

Keywords: 4-Tert-octylphenol (OP), Toxicokinetic, Column-switching HPLC, Distribution.

서 론

잉크, 니스, 공업용 클리닝활성제 등으로 광범위하게 사

용되고 있는 alkylphenol ethoxylates는 유암세포를 활성화 시키며, 생식기능 저하, 기형, 성장장애 및 암 등을 유발할 수 있다고 보고되고 있어 최근 내분비계 장애물질로 분류되고 있다(Talmage, 1994; White *et al.*, 1994; Routledge and Sumpter, 1997). Alkylphenol ethoxylates의 분해 산물중 하나인 4-tert-octylphenol(octylphenol, OP)은 4-alkylphenol 중에서 가장 강력한 에스트로겐 작용을 나타

Correspondence to: Soo Jung Sohn, Department of Toxicological Research, National Institute of Toxicological Research, KFDA, Nokbun-dong, Eunpyong-gu, Seoul 122-704, Korea
Email: receptacle@hanmail.net

내는 비이온성 지용성 물질로, 인체축적시 내분비 조절기구에 영향을 미칠 수 있다(Soto *et al.*, 1991). 또한 17- β -estradiol과 경쟁적으로 에스트로젠 수용체와 결합하여 에스트로젠의 전사 활성을 촉진시킨다는 보고도 있어(White *et al.*, 1994), *in vitro* 및 *in vivo* system에서 OP의 에스트로젠 효과에 대한 다양한 연구가 수행되어지고 있다(Jobling *et al.*, 1996; Routledge and Sumpter, 1997).

그러나 이들 연구는 OP에 대한 내분비계 장애물질로서의 환경시료중 위해성 평가를 위한 모니터링과 작용기전 및 독성 시험법 개발에 대한 보고에 불과하며, OP에 의한 내분비계 장애 및 암 발생에 미칠 수 있는 정도는 아직 논쟁의 대상이 되고 있다. 또한 생체 내 축적으로 인한 내분비 조절기구에 영향을 미칠 수 있다는 보고가 있으나(Soto *et al.*, 1991; Pedersen and Hill, 2000b), 이를 뒷받침할만한 충분한 독성동태 연구는 아직 미비한 실정이다.

독성동태 연구는 생체에 투여된 독성물질들의 생체 내 흡수, 분포, 대사 및 배설을 정량적인 분석 평가하고 안전성 평가 연구에 적용시키는 연구분야(Yacobi *et al.*, 1989)로, 내분비계 장애물질 등의 독성동태 연구는 이들 물질의 독성과 생체 노출정도의 상관관계를 규명함으로써 독성발현기전을 예측하고 노출시 치료 방안에 대한 기본정보를 제공해 줄 수 있다. 따라서 독성물질의 발현 기전과 직접적으로 관련이 있는 체내동태에 관한 연구의 중요성이 인식되고 있다.

한편, OP와 같은 내분비계 장애물질은 생체에 흡수된 후 혈액 및 체내 조직 중에 극히 낮은 농도로 분포되어 독성을 나타내므로 복잡한 생체 시료의 전처리 과정 및 미량 분석 방법의 확립이 절실히 요구되고 있다(Clark *et al.*, 1992; Pedersen *et al.*, 2000a). 따라서 OP의 미량 분석을 위한 생체 시료의 전처리 과정 및 Gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS) 분석 방법이 제시되고 있으며(Tsuda *et al.*, 1999), Sohn *et al.*(2001)은 GC/MS를 이용하여 혈장에서의 OP의 체내동태 파라미터를 조사하였다. 그러나 GC/MS를 이용한 생체시료의 미량 분석 방법은 derivatization 유도를 위한 많은 시간 소요뿐만 아니라 복잡한 전처리 과정이 요구된다(Bolz *et al.*, 2000). 최근에는 liquid chromatographic/mass spectrometry(LC/MS)를 사용한 OP의 분석 연구가 진행되고 있으나(Ferguson *et al.*, 2000; Petrovic and Barcelo, 2001), 이들 연구 역시 혈장이나 조직과 같은 생체시료가 아닌 수중 환경 시료에 국한되어 있다.

따라서 본 연구에서는 미량으로 노출되어 체내 독성을 나타내는 OP의 체내 독성 동태 및 조직 분포에 대한 정

보를 얻고자, 생체시료 전반에서의 생체시료 전처리 방법 및 column-switching HPLC를 이용한 생체 시료의 정량적 분석방법을 확립하고, 수컷 SD 랫드에 OP를 정맥 및 경구투여한 후 혈액, 조직 및 뇨를 채취하여 OP의 흡수, 조직 내 분포, 뇨 배설 등의 체내동태 특성을 규명하고 대사 효소에 미치는 영향을 평가함으로써 내분비계장애물질의 체내동태 연구모델을 제시하여 독성발현기전의 예측 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

시약

4-*Tert*-octylphenol(OP)은 Supelco(USA)에서 구입하였으며, methyl-*tert*-butyl ether(MTBE), diethyl ether 및 methanol은 Aldrich(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 4-(heptyloxy)phenol(HP)와 acetonitrile, potassium phosphate, sodium sulfate 및 propylene glycol은 Sigma(USA)에서, heparine sodium은 녹십자(Korea)에서 구입하여 사용하였다. Rat cythchrome P450 competitive RT-PCR kit는 Takara사(Japan) 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 HPLC 등급을 사용하였다.

기기 및 기구

HPLC는 UV 검출기가 부착된 Shiseido Nanospace SI-1(Japan)을 사용하였으며, 전기식 지시저울은 Sartorius analytical balance(USA), 원심분리기는 Jouan(USA), shaker는 Yamato shaker Model SA31(Japan)를 사용하였다. 그 외 Spectrophotometer(Varian Co., Australia), PCR(Perkinelmer Co., U.S.A.), Image analyzer(Vilber Lourmat Co., France)등을 사용하였다.

실험동물

국립독성연구원 실험동물자원실의 청정동물실에서 사용된 약 220~290 g의 수컷 Sprague-Dawley 랫드(6주령)를 사용하였다. 순화기간동안 폴리카보네이트 케이지에 각각 5마리씩 수용하였으며, 실험동물용 고품사료(퓨리나 코리아 방사선처리용 실험용 랫드 사료)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물사육조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 조명주기 조건을 유지하였다. 실험동물은 검체 투여 전 약 12~16시간 동안 절식시킨 후 실험에 사용하였으며, 각 실험군당 5마리를 실시하였다.

단회투여 후 시간 경과에 따른 혈액, 조직 및 뇨 채취

OP의 체내동태 파라미터를 알아보기 위하여 랫드의 대퇴동맥과 정맥에 카테터(Polyethylene tube 50, Becton

Dickinson, USA)를 삽입하고 200 mg/kg OP를 단회 경구 투여하였다. 경구 투여 후 각각 0, 0.05, 0.08, 0.17, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 6, 12 및 24시간에 대퇴동맥에서 700 μ l 혈액을 채혈하고 3000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다.

한편, 200 mg/kg OP를 SD 랫드에 경구투여하고, 각각 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 12 및 24시간 간격으로 전혈시킨 후 간, 지방, 신장 및 고환을 적출하고 생리식염수로 세척하여 무게를 측정하였다. 또한 대사케이지를 이용하여 3시간 간격으로 누적된 뇨를 채취하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 수거된 뇨의 고형물을 제거하고 상등액만을 획득하여 양을 측정하였다. 각 조직 및 뇨 시료는 -70°C에 보관하였다.

단회투여 및 조직 채취

단회투여시 OP의 체내분포를 알아보기 위하여 수컷 SD 랫드에 정맥(1, 5, 10 mg/kg) 및 경구(50, 100, 200 mg/kg) 투여하였다. 정맥투여 후 6시간째, 경구 투여 후 24시간째에 전혈시켜 각 조직(간, 신장, 지방 및 고환)을 적출하였다. 적출된 조직은 생리식염수를 이용하여 세척한 후, 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

장기투여 및 조직채취

50 mg/kg OP를 수컷 SD 랫드에 14일 동안 1일 1회씩 경구투여하고, 최종투여 후 24시간째에 각 조직(간, 신장, 지방 및 고환)을 채취하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 시험기간 동안 실험동물의 체중변화와 사료 섭취량을 매일 측정하였다.

시료 전처리 및 4-tert-octylphenol 농도 측정

각 조직(1 g) 및 혈장(200 μ l)에 내부표준물질로 HP를 가한 후(간 및 지방, 5 mg/ml; 신장 및 고환, 2.5 mg/ml; 혈장, 1 μ g/ml) MTBE 5 ml을 첨가한 다음, 조직의 경우 호모게나이저로 1분 동안 분쇄하고 shaker를 이용하여 20분 동안 추출하였다. Na_2SO_4 를 첨가한 후 4°C, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 유기 용매층을 분리한 후 8 ml의 유리 바이알에 옮겼다. 분리된 유기층은 질소가스하(45°C)에서 증발 건조시킨 후 잔사에 아세토니트릴 200 μ l를 가하여 용해하였다. 뇨시료는 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 내부표준물질(HP, 500 ng/ml)을 첨가하였다.

검량선 작성을 위한 OP의 농도는 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ng/ml이었으며, 정상 개체로부터 채취한 혈장과 조직에 표준용액 및 내부표준물질을 가하고, 이

후 추출과정은 채취된 생체시료와 동일하게 실시하였다.

HPLC의 분석

혈장, 조직 및 뇨에 존재하는 OP의 농도는 Shisheido사의 Nanospace SI-1 HPLC를 사용하여 column-switching법으로 분석하였다. HPLC는 펌프와 automatic sample injector, UV 검출기로 구성되었으며, UV 검출기의 파장은 220 nm로 고정하여 사용하였다.

시료는 전처리 컬럼(Capcell Pak MF Ph-1, 4.0 \times 20 mm I.D., particle size 5 μ m, Shisheido, Japan)을 통과시켜 단백질을 제거하고, 중간 컬럼(Capcell Pak C18 MG, 2.0 \times 35 mm I.D., particle size 5 μ m, Shisheido, Japan)으로 농축시켰다. 그 후 분석 컬럼(Capcell Pak C18 MG, 1.5 \times 150 mm I.D., particle size 5 μ m, Shisheido, Japan)에 통과시켜 분리하였다. 이 때 전처리 이동상은 50 mM 인산완충액(pH 6.8)과 아세토니트릴 혼합액(70 : 30, v/v, pH 6.8)을 사용하였으며, 분석 이동상은 아세토니트릴과 물 혼합액(62 : 38, v/v)을 사용하였다. 각 이동상의 유속은 전처리 이동상의 경우 500 μ l/min이었으며, 분석 이동상은 120 μ l/min이었다.

언어진 HPLC 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 OP의 피크면적비를 구하여 미리 작성한 각각의 검량선으로부터 혈장, 조직 및 뇨 중의 OP 농도를 정량하였다.

RT-PCR을 이용한 약물 대사효소의 mRNA 발현 측정

OP를 단회(50, 100, 200 mg/kg) 및 장기(50 mg/kg, 14일) 경구투여 한 SD 랫드의 간 조직으로부터 Trizol 용액을 이용하여 total RNA를 분리한 후, denaturation 94°C, annealing 56°C, elongation 72°C의 온도 조건에서 24 cycle 동안 RT-PCR을 수행하여 약물대사효소 cytochrom P450의 isotype인 CYP1A1, 1A2, 2B1/2, 2C11, 2E1, 3A1, 3A2, 4A1의 mRNA 발현을 측정하였다.

파라미터 분석

정량 분석된 자료들은 WinNonlin(Scientific Consultin Inc., Cary, NC) 프로그램을 이용하여 혈중 농도 곡선하면적(AUC), 최고 혈중농도(Cmax), 최고 혈중농도 도달시간(Tmax) 및 청소율(Cl) 등의 체내동태 파라미터들을 구하였다.

결 과

시료중의 4-tert-octylphenol chromatogram

OP 투여군의 HPLC 분석 chromatogram은 Fig. 1과 같

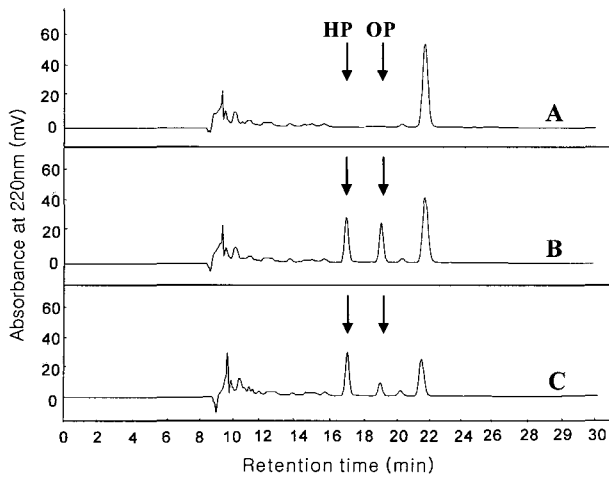


Fig. 1. Representative chromatograms extracted from (A) blank rat plasma, (B) rat plasma spiked with 4-*tert*-octylphenol ($t_R=19.2$ min, 1000 ng/ml) and heptylphenol (I.S.; $t_R=17.1$ min), (C) rat plasma obtained 1hr after a 200 mg/kg oral dose.

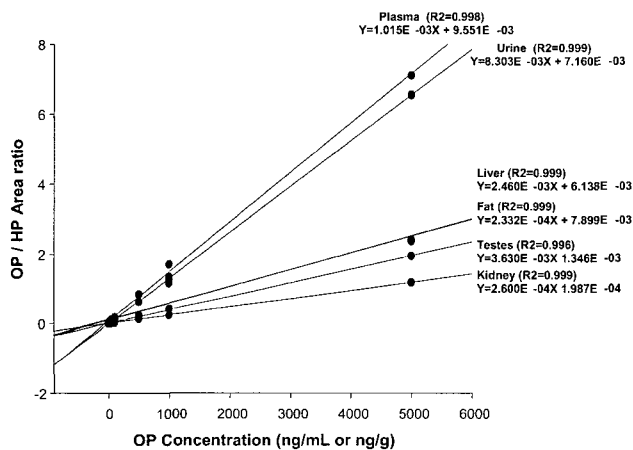


Fig. 2. A standard curve used in the analysis of 4-*tert*-octylphenol in the plasma, liver, kidney, fat, testis and urine of male SD rats ($n=5$).

다. 혈장, 조직 및 뇨를 분석한 결과 머무름시간(Retention time)은 내부표준물질인 HP가 17.1분이었고, OP은 19.2 분이었다. 본 연구에서 OP와 내부표준물질인 HP를 HPLC를 이용하여 분석시 분석감도가 5 ng/ml로서 생체시료 중에 미량으로 존재하는 OP의 정량 분석이 가능하였으며, 혈액, 조직 및 뇨에 대한 검량선의 상관계수가 0.998~0.999로 분석 농도 범위에서 높은 직선성을 나타내었다 (Fig. 2).

경구투여시 4-*tert*-octylphenol 흡수

수컷 SD랫드에 OP 200 mg/kg를 단회 경구 투여 후 시간대별로 혈액을 채취하여 혈장 OP 농도를 측정하였다

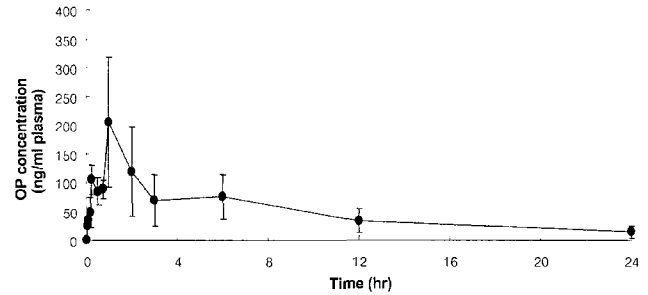


Fig. 3. Mean arterial plasma concentration-time profiles of 4-*tert*-octylphenol after 3 min oral administration of 200 mg/kg ($n=5$) to rats. Bars represent standard deviation.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of 4-*tert*-octylphenol obtained after single oral administration of 200 mg/kg in the plasma of Sprague-Dawley rats

Parameter	Value
Body weight (g)	229 ± 35
Cmax (ng/ml) ^a	213 ± 123
Tmax (hr) ^b	1.3 ± 0.5
CLz/F (ml/hr/kg) ^c	166 ± 62
T1/2 (hr) ^d	6.3 ± 3.4
AUC (ng · hr/kg) ^e	1,333 ± 484

Data are expressed as the mean ± SD of five rats per group.

^aMaximum plasma concentration.

^bTime to reach the Cmax.

^cOral clearance.

^dFinal elimination half life.

^eArea under the plasma concentration-time curve.

(Fig. 3). 혈중 OP의 농도는 증가와 감소의 반복적인 변화가 일어나면서 경구투여 후 1.25 ± 0.5시간(Tmax)에 평균 최고 혈중농도(Cmax) 213 ± 123 ng/ml에 도달하였다. 혈중 OP 농도는 서서히 감소하여 24시간째에는 14.3 ± 10.8 ng/ml이 검출되었다. 이 때 혈중 농도 곡선하면적(AUC)는 1,333 ± 484 ng · hr/ml 이었다. 경구 투여 후 독성 동태학적 파라미터는 Table 1에 요약하였다.

조직중의 4-*tert*-octylphenol 분포

시간대별 각 조직(간, 신장, 지방 및 고환) 중의 OP 농도는 Fig. 4에 나타내었다. 모든 조직중의 OP 농도는 시간 경과에 따라 증가와 감소의 반복적인 변화가 일어나면서 경구투여 후 6시간째에 최고 분포 농도에 도달하였다. 이 때 간장, 신장, 지방 및 고환 등 각 조직에서의 OP 최고농도(Cmax)는 각각 3.2 ± 1.9, 3.9 ± 1.9, 3.0 ± 0.6 및 1.2 ± 0.5 ug/g이었다. 그 후 조직 내 OP 분포량은 시간에 따라 감소되어 24시간 후에는 간과 신장에서 각각 0.8 ± 0.7 및 0.2 ± 0.2 ug/g의 분포 농도를 나타내었다. 지방 조직의 경우, 다른 조직과는 달리 느린 청소율과 긴 반감기가 관찰되었다(Table 2). 따라서 지방 조직의 최고

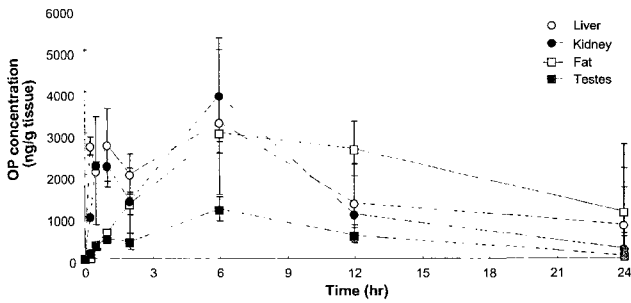


Fig. 4. Mean Tissues concentration-time profiles of 4-tert-octylphenol after 3 min oral administration of 4-tert-octylphenol. Liver (○, n=5), Kidney (●, n=5), Fat (□, n=5) and Testis (■, n=5). Bars represent standard deviation.

Table 2. Toxicokinetic parameters of 4-tert-octylphenol obtained after single oral administration of 200 mg/kg in the liver, kidney, fat and testis of SD rats

Parameter	Tissues			
	Liver	Kidney	Fat	Testis
Cmax (mg/ml) ^a	3.2 ± 1.9	3.9 ± 1.9	3.0 ± 0.6	1.2 ± 0.5
Tmax (hr) ^b	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
CLo (ml/hr/kg) ^c	3.9 ± 1.1	5.7 ± 1.6	2.6 ± 0.8	17.0 ± 2.1
T1/2 (hr) ^d	9.6 ± 4.3	4.5 ± 2.5	18.0 ± 16.0	4.3 ± 1.2
AUC (mg · hr/g) ^e	40.5 ± 12.4	35.1 ± 13.1	83.3 ± 34.1	11.9 ± 2.8

Data are expressed as the mean ± SD of five rats per group.

^aMaximum tissue concentration.

^bTime to reach the Cmax.

^cOrgan Clearance.

^dElimination half life.

^eArea under the tissue concentration-time curve.

분포농도는 간이나 신장보다 낮았으나, 조직에서 느리게 배설되어 24시간 후 농도는 1.1 ± 0.5 ug/g로써 다른 조직과 비교 시 가장 높은 분포 농도를 나타내었다.

뇨중의 4-tert-octylphenol 배설

200 mg/kg OP 경구투여 후 각 채취 시간(3, 6, 9, 12, 24 hr)에 따라 뇨를 채취하여 신장을 통해 배설되는 OP 양을 조사하였다(Fig. 5). OP 투여 후 3~6시간 사이에 뇨 중 최대배설속도, 431.8 ± 333.8 ng/hr를 나타내었으며, 평균 6.5시간에 뇨중 OP 최고 농도 433 ± 347 ng/ml에 도달하였다. 뇨 배설 반감기 및 신장을 통한 청소율은 각각 2.8 ± 1.4 hr와 92.6 ± 49.1 ml/hr/kg으로 나타났다. 뇨에서 검출된 미변환체는 OP 투여용량의 0.0017% 미만이었다(Table 3).

단회 정맥 및 경구투여시 각 조직에서의 4-tert-octylphenol 분포

투여 경로 및 투여 용량에 따른 OP의 조직 분포를 알아보기 위하여, OP를 정맥내(1, 5, 10 mg/kg) 및 경구

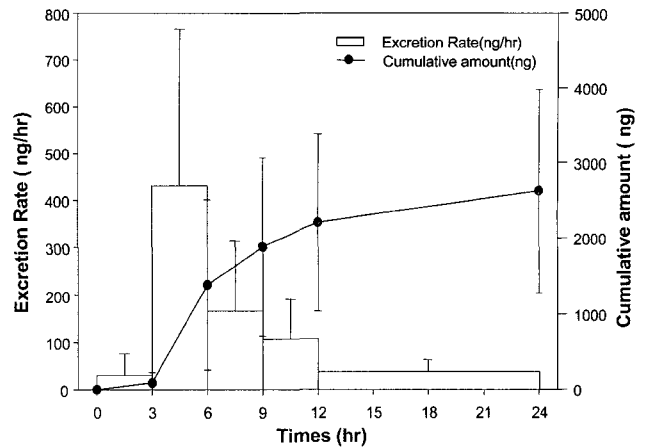


Fig. 5. The excretion rate and cumulative amount of 4-tert-octylphenol in the urine of male SD rats after single oral administration (200 mg/kg) for 24 hr.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of 4-tert-octylphenol obtained after single oral administration of 200 mg/kg in the urine SD rats

Parameter	200 (mg/kg)
Body weight (g)	234 ± 10
Cmax (ng/ml) ^a	433 ± 347
Tmax (hr) ^b	6.5 ± 3.5
T1/2 (hr) ^c	2.8 ± 1.4
Ae (ng) ^d	2,624 ± 1,352
CLR (ml/hr/kg) ^e	92.6 ± 49.1
Fe (%) ^f	0.0017 ± 0.0002

Data are expressed as the mean ± SD of five rats per group.

^aMaximum urine concentration.

^bTime to reach the Cmax.

^cElimination half-life.

^dTotal accumulative amount unchanged 4-tert-octylphenol in urine.

^eRenal clearance.

^fFraction extracted unchanged in urine.

(50, 100, 200 mg/kg) 투여하고 각각 6시간 및 24시간 후 간장, 신장, 고환 및 지방을 적출하여 각 조직에서의 OP 분포는 조사하였다(Fig. 6). 정맥투여시 각 조직별 OP 분포는 농도 의존적으로 지방 > 신장 > 간 > 고환 순으로 나타났으며, 경구투여군에서는 지방 > 간 > 신장 > 고환 순으로 나타나, OP의 투여경로 및 용량에 따라서 다른 분포 양상을 나타내었다.

조직별 OP 분포는 투여 경로에 상관없이 지방조직에서 가장 높은 반면 고환에서 가장 낮았다. 지방 조직에서의 OP 농도는 정맥투여시 1, 5, 10 mg/kg 투여 용량에 대하여 각각 470.4 ± 122.1, 1564.6 ± 546.4, 3577.7 ± 1348.7 ng/g, 경구투여시 50, 100, 200 mg/kg 투여 용량에 대하여 각각 123.8 ± 67.5, 218.8 ± 28.7, 1090.6 ± 209.7 ng/g으로 다른 조직에 비해 높은 분포 농도를 나타

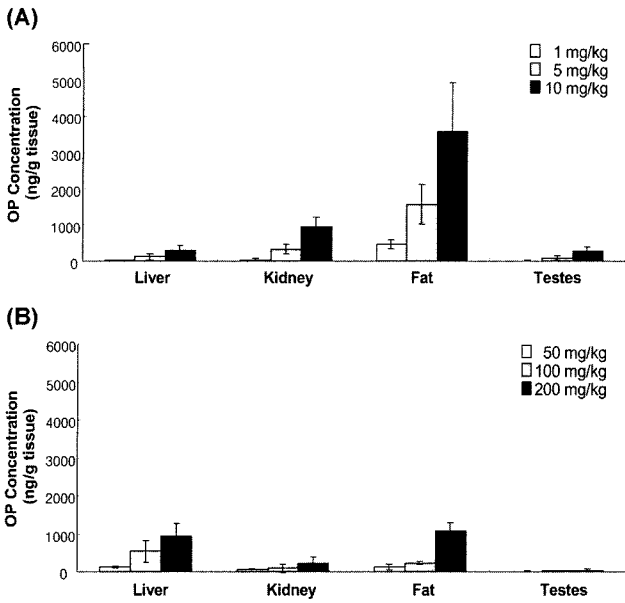


Fig. 6. The tissue distribution of 4-tert-octylphenol in male SD rats after single i.v. (A) and oral (B) administration.

내었다. 고환의 경우, 정맥투여시 1, 5, 10 mg/kg 투여 용량에 대하여 각각 8.7 ± 8.9 , 81.8 ± 53.7 , 277.3 ± 117.0 ng/g, 경구투여시 50, 100, 200 mg/kg 투여 용량에 대하여 각각 9.2 ± 14.5 , 12.0 ± 18.2 , 27.4 ± 33.0 ng/g이 검출되어 OP의 생식기로의 분포 가능성이 예측되었다.

장기 투여시 각 조직에서의 4-tert-octylphenol 분포

OP의 선택적 표적장기와 독성에 대한 정보를 얻고자 웅성 SD rats에서 경구로 유입되었을 때 가장 낮은 조직 분포를 나타내는 50 mg/kg의 OP를 단일농도로 선정하여 경구를 통한 반복투여 실험을 실시하였다. 50 mg/kg의 OP를 1일 1회씩 14일 동안 경구투여시 각 조직에서의 OP 체내 분포는 Fig. 7와 같다.

단회 투여시와 비교하였을 때 신장이나 고환에서는 큰 변화가 나타나지 않았으나, 간에서는 단회 투여시 117.1 ± 26.0 ng/g, 장기 투여시 272.6 ± 219.3 ng/g으로 2배 이상 높게 검출되었다. 반면에 지방조직에서는 단회 투여시 123.8 ± 67.5 ng/g이 검출되었으나, 장기 투여시 51.8 ± 23.2 ng/g으로 OP 축적이 일어나지 않았다(Fig. 7A). 한편, 장기 투여시 대조군은 113.7 ± 20.9 g의 체중 증가를 나타내었으나 OP 처리군은 79.4 ± 19.4 g이 증가되어 대조군에 비해 체중 증가율이 감소하였다(Fig. 7B). 또한 OP의 장기투여에 따른 장기별 무게에 있어서 간조직의 무게가 다소 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Data not shown).

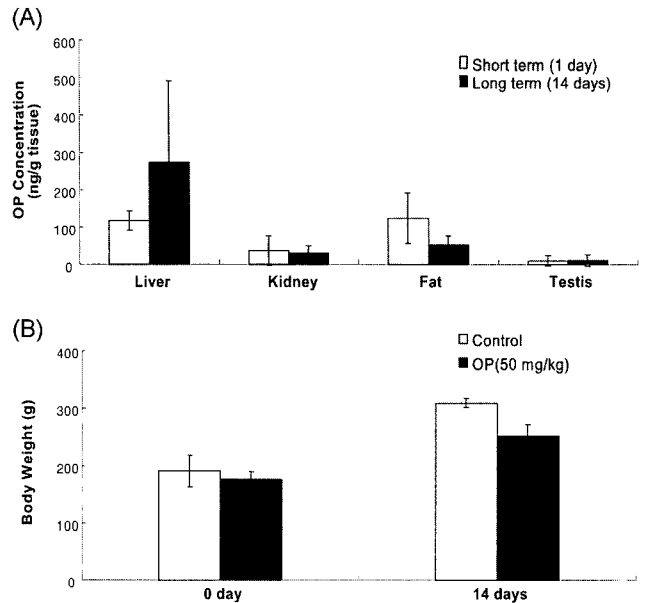


Fig. 7. The tissue distribution of 4-tert-octylphenol (A) and the body weight changes (B) in male SD rats after oral administration (200 mg/kg) for 14 days.

약물대사효소 발현에 미치는 영향 측정

약물 대사효소 발현에 미치는 OP의 영향을 알아보기 위하여 단회(50, 100 및 200 mg/kg) 및 장기(50 mg/kg, 14일) 투여한 수컷 SD 랫드 간조직에서 total RNA를 분리하여 약물대사효소의 mRNA 발현 양상을 조사하였다. 단회 경구투여시 OP는 투여 농도에 관계없이 CYP1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1, 3A1, 3A2, 4A1 등 각각의 약물대사

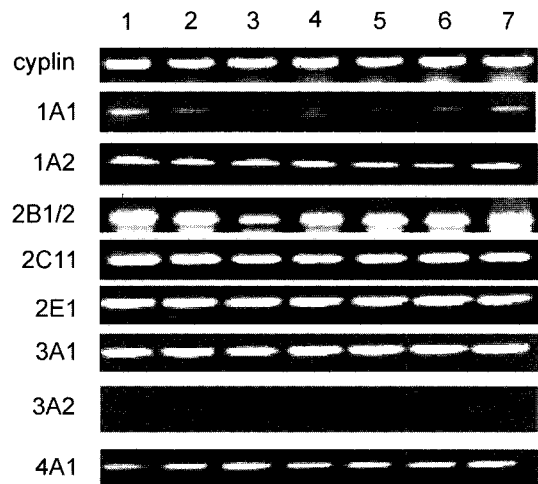


Fig. 8. Cytochrome P450 mRNA expressions in livers treated orally with 4-tert-octylphenol (OP). Lane 1, control; lane 2, OP 50 mg/kg; lane 3, OP 100 mg/kg; lane 4, OP 200 mg/kg; lane 5, OP 50 mg/kg for 14 days; lane 6, β -estradiol 50 mg/kg; lane 7, β -estradiol 200 mg/kg.

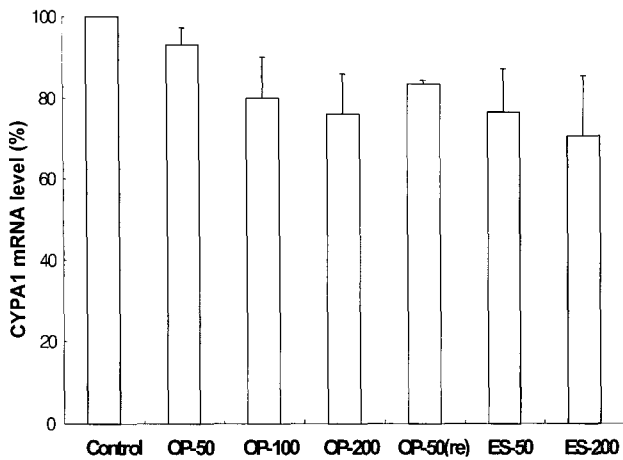


Fig. 9. Cytochrome P450 2C11 mRNA expressions in livers treated orally with 4-tert-octylphenol (OP). Control, control; OP-50, OP 50 mg/kg; OP-100, OP 100 mg/kg; OP-200, OP 200 mg/kg; OP-50 (re), OP 50 mg/kg for 14 days; ES-50, β -estradiol 50 mg/kg; ES-200, β -estradiol 200 mg/kg.

효소발현에 영향을 미치지 않았으나(Fig. 8), CYP2C11의 발현은 각각 93, 80, 76%로 용량 의존적인 억제를 보였다(Fig. 9). 이러한 억제효과는 에스트로겐 투여군에서도 나타나, 50 mg/kg 및 200 mg/kg 투여시 각각 77%, 71%로 억제되었다. 따라서 OP가 약물대사효소 발현에 있어서 에스트로겐 유사작용을 나타냄을 확인할 수 있었다. 한편 OP 50 mg/kg 장기 경구투여군의 CYP2C11의 발현은 83.5%로 단기 경구투여군보다 약 10% 정도 억제되어 나타났다(Fig. 9).

고 찰

현재 4-tert-octylphenol(OP)의 분석 방법은 다양한 검출기가 부착된 가스 크로마토그래피(Gas chromatography; GC) 또는 액체 크로마토그래피(Liquid chromatography; LC)를 사용하고 있으나(Tsuda *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2000; Petrovic and Barcelo, 2001), 검체의 휘발성 향상을 위한 유도체화 및 복잡한 전처리 과정, 낮은 정량 및 검출 한계 등으로 인하여 고감도의 효율적인 생체 내 미량 시료 분석법 개발이 요구되고 있다(Bolz *et al.*, 2000). 본 연구에서는 GC의 복잡한 전처리 과정 및 LC의 낮은 정량·검출 한계의 단점을 보완하기 위하여 column-switching valve system을 사용한 Nanospace SI-1을 사용하여, 생체 시료 중의 OP를 간편하고 신속하게 검출할 수 있었다. Column-switching HPLC를 사용한 OP 분석 시 분석감도가 5 ng/ml로서 생체시료 중에 미량으로 존재하는 OP의 정량 분석이 가능하였으며, 혈액, 조직

및 뇨에 대한 검량선의 상관계수가 0.998~0.999로 분석농도 범위에서 높은 직선성을 나타냈다.

200 mg/kg OP는 경구투여시 15분 이내에 혈중에서 검출되었으며 투여 후 75분에 최고 혈중 농도(Cmax) 213 ± 123 ng/ml에 도달하였다. 경구투여시 OP의 혈중 소실 반감기는 6.3 ± 3.4 hr로 나타나, 5 mg/kg OP 단기 정맥투여시의 5.2시간보다 길었으며(Shon *et al.*, 2001), 웅성 Whister 랫드(Certa *et al.*, 1996) 및 자성 DA/Han 랫드(Upmeier *et al.*, 1999)에서의 각각 310분과 36.1시간과는 많은 차이를 보였다. 이와 같은 결과는 OP의 독성 파라미터가 랫드의 개체 및 종에 따라 차이를 보이는 것으로 사료된다. 또한, OP의 혈중 소실 반감기는 Bisphenol A(Yoo *et al.*, 2001)보다 짧아, 경구투여시 위장관으로부터 신속하게 흡수되는 것으로 사료된다(Upmeier *et al.*, 1999).

한편, OP 경구투여시 뇨 배설 반감기 및 청소율은 각각 2.8 ± 1.4 hr, 92.6 ± 49.1 ml/hr/kg으로 혈중 소실 반감기 및 혈중내 청소율에 비해 매우 낮았다. 이와 같은 결과는 OP가 체내 유입시 효율적인 약물제거가 일어나지 않아 체내에 축적될 수 있음을 시사한다. 또한 뇨를 통해 배설되는 OP는 0.0017% 미만으로 나타났다. 이는 신장배설 경로를 통해서 제거되어지는 Polychlorinated biphenyls와는 달리(Saghir *et al.*, 1999), OP는 신장배설 경로가 아닌 다른 배설 경로에 의해서 제거되어 지며(Ferrerira-Leach and Hill, 2001), 다른 지용성 phenol계 물질과 마찬가지로 신장에서의 재흡수로 인한 체내 유입 시 축적될 수 있다는 것을 뒷받침해주고 있다(Pottenger *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 2000).

혈중 OP 농도는 반복적인 증가와 감소를 반복하면서 1.25시간에 최고 혈중농도에 도달하였다. 이러한 특이적인 변화는 간, 신장, 고환 및 지방 조직에서의 관찰되어졌는데, 모든 조직 중의 OP 농도는 시간 경과에 따라 증가와 감소를 반복하면서 경구투여 후 6시간째에 최고 분포농도에 도달하였다. 따라서 OP는 연속적인 장관 순환을 하는 것으로 사료되어진다(Upmeier *et al.*, 1999; Strandgarden *et al.*, 2000). 특히 간 조직에서는 경구투여 15분 이내에 고농도로 검출됨으로써 OP가 간을 통한 초회 대사를 거침으로써 간에 많이 분포하는 것으로 사료되어지며(Upmeier *et al.*, 1999; Pederson and Hill, 2000b), OP가 간/담즙 경로를 경유함으로써 간 및 담즙에서 높게 검출되고 sulfate나 glucuronide 포함체 형태로 존재한다는 보고와 일치하였다(Ferreira-Leach and Hill, 2001; Muller *et al.*, 1998). 본 연구에서 간 조직의 청소율이 혈장 및 뇨 청소율보다 높게 나타나, 경구로 투여된 OP의 대사가 간을 통과하는 동안 충분히 일어나는

것으로 사료된다(Pederson and Hill, 2000a).

반면, 경구투여시 간 조직에서의 OP 반감기는 혈장 내 소실 반감기 및 뇨 배설 반감기보다 길에 나타났으며, 정맥 및 경구투여시 투여 농도에 비례하여 주로 간 조직 다량의 OP가 분포되었다. 이와 같은 결과는 Certá *et al.* (1996)의 보고와 일치하는 것으로, OP의 빠른 대사에도 불구하고 고농도의 OP 투여에 의한 해독과정에서의 포화로 사료되어진다. 또한 OP를 장기 경구 투여 시 간 조직에서의 OP 분포량은 단회 경구투여보다 약 2배 정도 증가되어, 저농도의 OP에 장기간 노출 시 간 조직 축적됨으로써 독성 유발농도에 도달할 것으로 사료된다.

OP는 경구투여 후 각 조직에서 OP는 1시간 이내에 모든 조직에서 검출 가능하였으며, 지방 조직을 제외한 나머지 조직에서는 빠르게 감소되는 경향을 보였다. 특히 경구투여시보다 정맥투여시 OP의 높은 지용성으로 인하여 지방 조직으로의 분포가 많이 일어나는 것을 관찰 할 수 있었다(Certá *et al.*, 1996; Ferrerira-Leac and Hill, 2001). 또한 다른 조직과는 달리 긴 반감기와 느린 청소율이 관찰되었으며, 시간 경과에 따라 분포량이 증가하여 24시간 후에는 가장 높은 분포 농도를 나타냈다. 이러한 결과는 지방 조직이 지용성 약물의 주요 저장 부위로서, 공급되는 혈액량이 매우 적어 약물의 이행이나 소실이 서서히 일어나므로 나타난 결과로 사료되어지며, OP가 주요 에너지원인 지방조직에 다량으로 축적되어 이동, starvation 및 생식선 발달 시 지방과 함께 대사 된다는 보고와 일치하였다(Ferrerira-Leac and Hill, 2001). 그러나 장기 투여시 지방 조직에서의 OP 축적은 일어나지 않아 단기 투여 시와는 다른 양상을 보였는데, 이와 같은 결과는 장기 투여에 따른 스트레스와 먹이 섭취 장애에 의한 체중 증가 감소 및 체내 지방의 감소와 관련이 있을 것으로 사료된다.

고환 조직에서의 OP 반감기는 짧았으며 청소율은 높게 나타나, 경구투여 24시간 후의 고환 조직 내 OP 농도는 간, 신장 및 지방 조직보다 매우 낮은 농도로 검출되었다. 그러나 정맥 및 경구투여시 투여 용량에 비례적으로 OP 검출 농도가 증가되어 생식기로의 분포 가능성을 예측할 수 있었다.

일반적으로 OP는 에스트로젠 대사에 관여하는 Cytochrome P450(CYP) monooxygenase enzymes에 의해서 대사 되며(Pedersen and Hill, 2000a), 일부 OP 활성 대사체는 에스트로젠의 약물대사효소에 영향을 미친다(Hanioka *et al.*, 1999). 본 연구에서 OP는 CYP1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1, 3A1, 3A2, 4A1 등의 약물대사효소 발현에는 영향을 미치지 않았으나, 수컷 특이적인 약물 대사 효소 중 하나인 CYP2C11의 발현은 용량 의존적

로 억제하였다. 이와 같은 결과는 Hanioka *et al.*(2000a)의 OP 복강투여에 의해서 CYP2C11의 발현이 감소된 연구결과와 일치하였다. 그러나 CYP2C11외에 CYP3A2도 용량 의존적인 억제를 나타낸다고 보고되어 본 연구와 차이가 있었으나, 이것은 CYP3A2의 발현정도가 CYP2C11에 비하여 비교적 낮고 본 연구에서 투여한 OP의 총량이 이들보다 적었기 때문이라 사료된다. OP에 의한 CYP2C11/3A2 등의 수컷 랫트 특이적 약물대사효소의 발현 억제는 체내 내분비계 영향을 나타내며(Hanioka *et al.*, 2000b), 이러한 CYP2C11의 억제효과는 에스트로젠 투여군에서도 나타냄으로써 OP가 약물대사효소 발현에 있어서 에스트로젠 유사작용을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 OP에 의한 CYP2C11 발현 억제 효과는 단회 경구 투여군보다 장기 경구투여군에서 더 증가되어 나타났다.

따라서 본 연구에서 고환조직의 OP 분포 및 축적은 다른 조직에 비하여 매우 낮게 검출되었으나 소량으로도 유사 에스트로젠 작용을 나타내는 OP에 장기적으로 노출될 때 내분비계에 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다. 그러나 이것이 OP의 생체내 축적에 의한 것인지, 활성화된 대사체에 의한 것인지에 대한 여부는 잘 알려져 있지 않다. 또한 OP의 주요대사에 관련된 CYP isomer가 어떤 것인지는 알려져 있지 않으며, 단지 어떤 CYP isomer에 영향을 주는지에 관한 연구에 초점을 맞추고 있는 실정이다(Hanioka *et al.*, 2000a, b; Buhler *et al.*, 2000; Badawi *et al.*, 2000). 따라서 estrogen-sensitive tissue에서 OP 대사에 관여하는 CYP isomer 및 약물대사 효소에 영향을 미치는 OP의 활성 대사체가 존재하는지에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 연구가 더욱 필요하다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 2001년도 내분비 장애 물질 연구사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Badaiwi, A.F., Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G. (2000): Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 β -estradiol on female Sprague-Dawley rats. *Carcinogen.*, **21**, 1593-1599.
- Bolz, U., Kormer, W. and Hagermaier H. (2000): Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Cheoms.*, **40**, 929-935.
- Buhler, D.R., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Yang, Y.H.,

- Lee, S.J. and Wang-Buhler, J.L. (2000): Effects of 17 β -estradiol and testosterone on hepatic mRNA/protein levels and catalytic activities of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **168**, 91-101.
- Certa, H., Fedtke, N., Wiegand, H.J., Muller, A.M.F. and Bolt, H.M. (1996): Toxicokinetics of p-*tert*-octylphenol in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, **71**, 112-122.
- Clark, L.B., Rosen, R.T., Hartman, T.G., Louis, J.B., Suffet, I.H., Lippincott, R.L. and Rosen, J.D. (1992): Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic-acid derivatives in drinking-water by particle beam liquid-chromatography mass-spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **47**, 167-180.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. (2000): Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **72**, 4322-4330.
- Ferreira-Leach, A.M.R. and Hill, M.E. (2001): Bioconcentration and distribution of 4-*tert*-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout. *Mar. Environ. Res.*, **51**, 75-89.
- Hanioka, N., Jinno, H., Chung, Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T. and Ando, M. (1999): Inhibition of rat hepatic cyochrom P450 activates by biodegradation products of 4-*tert*-octylphenol ethoxylate. *Xenobiotica*, **29**, 873-883.
- Hanioka, N., Jinno, H., Chung, Y., Nishimura, T., Tanaka-Kagawa, T. and Ando, M. (2000a): Effect of 4-*tert*-octylphenol on cytochrome P450 enzymes in rat liver. *Arch. Toxicol.*, **73**, 625-631.
- Hanioka, N., Tanaka-Kagawa, T., Chung, Y., Nishimura, T., Jinno, H. and Ando, M. (2000b): Changes in hepatic cytochrome P450 enzymes by biodegradation products of 4-*tert*-octylphenol polyethoxylate in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **64**, 804-810.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P. (1996): Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposure to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 194-202.
- Muller, S., Schmid, P. and Schlatter, C. (1998): Distribution and pharmacokinetics of alkylphenolic compounds in primary mouse hepatocyte cultures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **6**, 45-48.
- Pedersen, R.T. and Hill, E.M. (2000a): Identification of novel metabolites of the xenoestrogen 4-*tert*-octylphenol in primary rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **128**, 189-209.
- Pedersen, R.T. and Hill, E.M. (2000b): Bioconcentration of the xenoestrogen 4-*tert*-octylphenol in hepatocytes of rainbow trout. *Xenobiotica*, **30**, 867-879.
- Petrovic, M. and Barcelo, D. (2001): Analysis of ethoxylated nonionic surfactants and their metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectro.*, **36**, 1173-1185.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A. and Hansen, S.C. (1997): Bioavailability of ¹⁴C-bisphenol A in fischer rats following oral, subcutaneous or intraperitoneal administration. Report K-001302-012A, Society of Plastics Industry Bisphenol A Task Group, 8 January.
- Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (2000): Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3280-3288.
- Saghir, S.A., Koritz, G.D. and Hansen L.G. (1999): Short-term Distribution, metabolism, and excretion of 2,2',5-tri-, 2,2',4,4'-tetra-, and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyls in prepubertal rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **36**, 213-320.
- Sohn, S.J., Kang, H.G., Yi, S.W., Suh, S.K., Park, I.S., Ahn, M.R., Choi, H.S., Cho, J.M., Shon, D.H., Yoo, T.M. and Yang, J.S. (2001): Toxicokinetics of 4-*tert*-octylphenol in rats. *Environ. Mutagens Carcinogens*, **21**, 122-127.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W. and Sonnenschein, C. (1991): p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" poly-styrene. *Environ. Health Persp.*, **92**, 167-173.
- Talmage, S.S. (1994): Environmental and human safety of major surfactants-alcohol ethoxylates and alkylohenol ethoxylates. The Soap and Detergent Association, Lewis, Boca Raton, FL.
- Tsuda, T., Takino, A., Kojima, M., Harada, H. and Muraki, K. (1999): Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-nonylphenols and 4-*tert*-octylphenol in biological samples. *J. Chromatogr.*, **723**, 273-279.
- Upmeier, A., Degen, G.H., Schuhmacher, U.S., Certa, H. and Bolt, H.M. (1999): Toxicokinetics of p-*tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. *Arch. Toxicol.*, **73**, 217-22.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. and Parker, M.G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol.*, **135**, 175-182.
- Yacobi, A., Skelly, J.P. and Batra, V.K. (1989): Toxicokinetics and new drug development, In Pergamon Press, Inc., pp.1-20.
- Yoo, S.D., Shin, B.S., Kwack, S.J., Lee, B.M., Park, K.L., Han, S.Y. and Kim, H.S. (2000): Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. *J. Toxicol. Environ. Health*, **60**, 131-139.
- Yoo, S.D., Shin, B.S., Lee, B.M., Lee, K.C., Han, S.Y. Kim, H.S., Kwack, S.J. and Park, K.L. (2001): Bioavailability and mammary excretion of Bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **64**, 417-426.