

서울 거주 산모의 초유 중 노닐페놀 분석을 통한 인체노출평가

이빛나, 김창성¹, 박미정², 한유석³, 이소정, 양미희*

숙명여자대학교 약학대학, ¹한국화학시험연구원, ²인제대백병원, ³성세병원

Exposure Monitoring of Nonylphenol in Preterm Breast milk in Soulers

Bitna Yi, Changsung Kim¹, Mijung Park², Yusok Han³,
Sojung Lee and Mihi Yan*

Sookmyung Women's University College of Pharmacy, Seoul 140-742, Korea

¹Korea Testing & Research Institute, Gyeongido 415-871, Korea

²Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul 139-707, Korea

³Sungse Children's Hospital, Gyeongido 450-832, Korea

ABSTRACT

Biomonitoring of nonylphenol (NP), an endocrine disrupting chemical, is required in Korea to perform its proper regulation. Thus, we analyzed exposure levels of nonylphenol (NP) in breast milk from the mothers who delivered babies within 10 days (N=325). We analyzed free and total forms of NP in breast milk with LC/MS/MS (LOD, 0.5 ppb). In addition, we obtained questionnaires concerning lifestyle from the subject. As results, ranges of total NP were <LOD-23.4 µg/L (median, <LOD) and the estimated exposure level of the NP was lower than TDI (tolerable daily intake)s. However, we found that the levels of total NP in the mothers, who had some diseases such as thyroid disorders, were higher than those in healthy mothers (sick mothers, N=34, 3.51 ± 4.98 µg/L vs. normal, N=281, 2.07 ± 3.76 µg/L; p < 0.05). In conclusion, we suggest that exposure monitoring of NP should be continuously performed, even though the risks of NP are not clear, yet.

Key words : Nonylphenol, milk, endocrine disrupting chemicals, Korean, biomonitoring

서 론

내분비 장애물질은 생식이상, 기형, 발달장애, 신경계장애 등 인체에서 여러 건강 위해와 관련되어

있는 것으로 알려져 있다(Colborn *et al.*, 1993; Bromwich *et al.*, 1994; Safe, 2000; Sharpe, 2001). 또한, 이들 물질이 극소량으로도 내분비계를 교란시키고, 잔류성, 미세독성, 생체축적 등의 특성을 보임에 따라 1990년대 후반부터 미국 및 유럽을 선두로 내분비장애물질과 그 대사체에 대한 인체노출모니터링 사업 및 이들 물질에 대한 규제사업이 시작되었으며 (Welshons *et al.*, 2003; Calafat *et al.*, 2005;

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-2077-7179, Fax: +82-2-710-9871

E-mail: myang@sm.ac.kr

Daidoji *et al.*, 2006), 현재 우리 나라에서도 알킬페놀 및 비스페놀을 포함한 내분비장애 추정물질 27종에 대해 취급제한 등의 조치로 이들 물질의 사용을 규제하고 있다(환경부, 2002). 특히, 이들 물질 중 유효유 첨가제, 항산화제의 원료, 비이온성 세제 성분, 식품용기, 의약품 등 다양한 소비재에 널리 사용되는 노닐페놀(NP)은 에스트로겐의 100~1,000,000분의 1의 활성을 가진다고 알려져 있으며, DNA adduct 형성, 돌연변이 또는 유전자 재배열을 유도하고, 성장장애, 생태계의 내분비계 이상현상 등과 관련된 것으로 보고되고 있다(Kahl, 1997; Sonnenschein and Soto, 1998; Sumpster, 1998; 이창주 등, 2001; Atiezar *et al.*, 2002; Vivacqua *et al.*, 2003; Recchia *et al.*, 2004).

한편, 모유는 아기의 발달에 영향을 미치는 영양소를 공급하고 면역, 성장에 많은 도움을 주지만, 이와 동시에 내분비계 장애물질에 대한 고감수성군인 영·유아에게 환경물질의 주된 노출경로로 작용할 수 있어 최근에 모유를 통한 위험 노출에 대한 관심이 증대되었으며, 이미, polychlorinated biphenyls (PCBs), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)와 그 대사체, dioxin류, dibenzofurans류, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), 중금속과 BPA 및 알킬페놀류 등이 모유를 통해 영아들에게 노출될 수 있음이 보고된 바 있다(Sonawane *et al.*, 1995; Hooper *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2002; Calafat *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2006).

따라서, 본 연구에서는 모유를 유일한 식이로 섭취하는, 내분비장애물질에 고감수성 인공인 영아 및 산모에서 NP 노출 실태를 파악하고자 모유 중 NP 생물학적 모니터링을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상자 및 시료채집

인제대 백병원 IRB를 통과한 프로토콜에 따라 백병원 및 소아과 전문의가 관리하는 서울소재 산후조리원에 입원한 수유부 중 의사의 실험참가 동의서에 동의한 자원자(N=325)로부터 10일째 모유(10 mL)를 수집하였다. 모유시료는 차광한 초자에 채집되어 냉동상태로 center (숙명여자대학교 약학

대학 독성학교실)로 운반되어 분석 전까지 -80°C 에 보관하였다. 또한, 연구대상자들의 나이, 병력, 화장품 사용, 낙농품 섭취 등 NP류의 노출원으로 의심되는 생활습관에 관한 설문조사를 실시하였다.

2. 모유 중 NP 분석법 확립 및 NP 분석

분석대상물질인 NP(4-n-nonylphenol, CAS# 104-40-5: Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany)를 내부표준물질인 bisphenol B(BPB, Tokyo Chemical Industry Company, Tokyo, Japan)를 이용, 정량하여 BPB 면적에 대한 상대적으로 LC/MS/MS를 이용하여 분석하였다.

1) 모유 시료의 전처리

모유 시료 1 mL을 취하여 유리초자에 넣고, 1.25 ppm 농도의 내부표준물질 BPB 0.1 mL, 2.0 M sodium acetate 60 μL 를 가한 후, 총(포함형+유리형) NP를 분석하기 위하여 가수분해효소 β -glucuronidase 1392U (Type H-1, Sigma, St. Louis, MO, USA), 진탕 항온 수조에서 37°C , 5시간 반응시켰다. 반응 후, acetonitrile 1 mL과 NaCl 50 mg 첨가하고, 1분 동안 교반 후, 10분 동안 sonication 하고, 원심분리(3,500 g, 30 min) 하여 상등액 1 mL을 취하는 과정을 3회 반복하였다. 이렇게 모아진 상등액 3 mL에 HCl 0.2 mL와 dichloromethane 2 mL을 첨가하여 1분 동안 교반하고, 14,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후, 하층을 취하는 과정을 3회 반복하였다. 취한 액을 무수황산나트륨으로 탈수시켜 0.2 mL로 농축하고, 60% acetonitrile 1 mL에 녹인 후 LC/MS/MS에 5 μL 을 주입하였다. 유리형의 NP 분석을 위하여 가수분해효소를 제외한 반응액을 조제하여 같은 전처리 과정을 거쳐 LC/MS/MS에 적용하였다.

2) LC/MS/MS조건

LC/MS/MS-ESI 분석법으로 NP를 정량하였고 그 시스템은 Waters alliance 2695 Quattro Premier XELC/MS/MS (Waters, Watford, UK), Zobax SB-C18 (5 μm , 4.6 \times 250 mm, Agilent, USA) 으로 구성되었다. Gradient 법(개시, 물: acetonitrile, 70% : 30%; 3분, 70% : 30%; 4분, 95% : 5%; 10분, 95% : 5%; 15분, 70% : 30%; 25분, 70% : 30%)으로 0.3 mL/min 유속으로 분석하였다.

3. 모유 중 NP 수준으로부터 영아의 노출량 산출

모유를 통한 영아의 NP 노출량은 모유 중 NP 농도 중간값에 일일 모유소비량, 500 mL (Neville *et al.*, 1988)를 곱하고 본 실험 대상 영아의 평균체중 3.24 kg으로 나눈 뒤, μg 으로 단위 환산하여 산출하였다. 불검출 시료에 대해서는 통계 및 환산을 위하여 검출된 최소값의 1/2값을 적용하였다.

4. 통계분석

NP level과 설문에서 조사된 노출추정요인(식습관, 화장빈도, 세제사용, 랩 사용 등), 피험자의 건강상태의 관련을 조사하기 위하여 Spearman's Rho test, nonparametric Wilcoxon test를 각각 수행하였다. 본 연구에서의 모든 통계분석은 JMP Version 4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하였으며, 통계적 유의는 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 피험자 특성

피험자는 Table 1과 같이 서울에 거주하는 30대 초반의 산모 (N=325)로 구성되었다. 월수입 정도(평균 수입, 2,000,000~4,000,000원/월)를 고려할 때 피험자는 우리나라 중산층인구를 반영한 것으로 예상되었다.

2. 모유 중 NP 분석을 위한 이상적 조건 확립

표준품 NP를 농도별 (0.2~140 $\mu\text{g/L}$)로 spike한 모유시료에서 위 전처리법을 통하여 모두 수득률 80% 이상, recovery 90% 이상을 획득하여 (N=5), 본 전처리법을 시험법으로 채택하였다. LC/MS/MS 법에 의한 대상 NP의 LOD (limit of detection) 및 LOQ (limit of quantification)는 각각 0.5 $\mu\text{g/L}$ 및 1.6 $\mu\text{g/L}$ 이었다.

3. 모유 중 페놀의 분포

모유 중 페놀의 분포는 total form과 free form 모두 Shapiro-Wilk W Test에서 $p < 0.01$ 이하로 정규 분포를 따르지 않았다 (Fig. 1). 따라서, 이하 통계분

Table 1. Characteristics of mother subjects

Items	Characteristics
Age (yrs)	30.67 \pm 3.45
Body weight (kg)	before pregnancy, 53.67 \pm 6.87 after pregnancy, 61.73 \pm 7.49
Health status (%)	normal, 89.21 sick, 10.79
Monthly income (won, %)	<2,000,000, 17% 2,000,000~4,000,000, 56% >4,000,000, 27%
Tobacco smoking (%)	never smoker, 88.07 ex-smoker, 11.58 smoker, 0.35

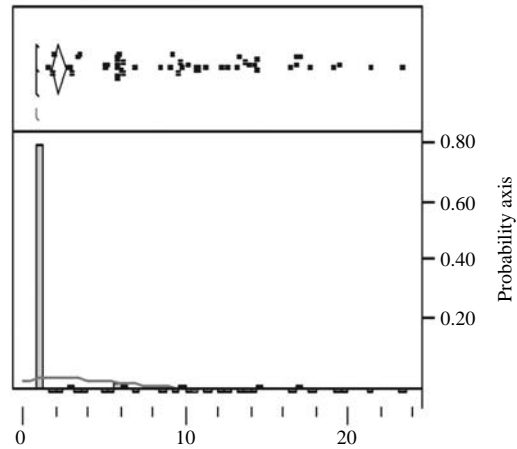


Fig. 1. Histogram of total NP: x axis, NP levels (ng/mL).

석에서는 non parametric analysis를 수행하였다. 모유의 NP 농도의 범위는 <LOD-23.4 $\mu\text{g/L}$, 중간값은 LOD (0.5 $\mu\text{g/L}$) 미만이었다: Free NP는 전 인구에서 검출되지 않았고, total NP 만이 약 15% 인구에서 검출되었다. 국내외적으로 참고할 만한 모유 중 NP에 대한 biomonitoring 연구가 부족한 실정인데, 일본인 인구 (N=3)에서 분석한 결과에서는 NP level이 0.65~1.4 ng/g으로 분석되어 (Otaka *et al.*, 2003), 본 대상인구에서 NP 노출수준은 다소 낮은 것으로 추정된다.

4. 모유 중 NP 수준으로부터 영아의 노출평가

모유로 인해 노출되는 영아에서의 산출된 일일 NP 노출량은 0.08 $\mu\text{g/kg/day}$ 이며, 이는 현 규제수준

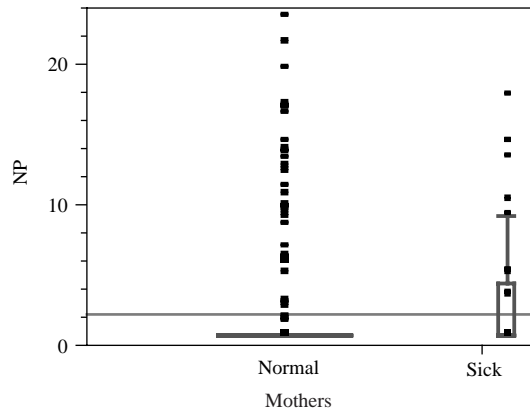


Fig. 2. Differences in NP levels between normal and sick mothers: y axis, NP levels (ng/mL).

tolerable daily intake (TDI) 인 $5 \sim 15 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Yang *et al.*, 2006)를 밑도는 매우 안전한 수준으로 판정되었다.

5. 모유 중 NP 농도와 예상 노출요인과의 상관성

페놀 노출 농도와 페놀류의 노출원으로 추정되는 환경요인(식이습관, 세제사용, 화장품사용, 흡연 등)과의 통계적 유의한 관련은 관찰되지 않았다.

6. 모유 중 페놀 수준과 질병과의 상관성

산모의 질병 유무와 태아의 질병 유무 사이에는 유의적인 상관관계는 찾을 수 없었다. 모유 중 total NP level과 산모의 질병유무를 Wilcoxon test를 통해 비교한 결과는 산모 중 갑상선이상, 임신성 당뇨 등을 모두 합친 유병군은 정상군보다 total NP level 이 유의적으로 높았다(Fig. 2). 그러나, 피험자의 질병의 종류가 갑상선이상, 임신성 당뇨, 임신중독 등 다양하고, 아직 관련 보고가 없으므로 향후 내분비장애물질의 건강 위해 중점으로써의 이들 질병에 관한 보다 집중적 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

본 연구진은 우리 국민에서 내분비장애물질인

NP의 노출 실태를 파악하기 위하여 내분비장애물질 고감수성 인구인 수유부와 영유아를 대상으로 NP의 노출 모니터링을 실시하였다. 그 결과, 모유 중 NP 농도 분포는 LOD에 가까운 좌측으로 치우친 양상을 띠었고, 중간값은 LOD 미만 이었다. 또한, 모유 중 NP 농도로 산출한 영유아의 노출 수준은 TDI를 밑도는 안전한 노출로 판정되었다. 한편, 페놀류 노출원을 세제, 화장품 사용 등 설문을 중심으로 조사한 결과, 유의적인 노출원은 찾을 수 없었다. 산모 및 영아의 건강상태와 NP 노출량 비교에서는 갑상선 이상 등 질환을 갖는 산모(N=34)에서 total NP의 수준이 건강한 산모(N=281)보다 유의적으로 높았다. 본 연구 결과로부터 도출된 현재 NP 노출수준은 낮은 것으로 생각되지만, 현재 NP 등의 인체 위해성이 아직 확실하지 않은 우리 인구에서 내분비장애물질 중 하나인 NP의 인체노출 모니터링 등 감시 작업은 지속적으로 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 식약청/국립독성연구원의 연구비 지원을 받아 수행된 것으로, 연구에 도움을 주신 국립독성연구원 인체노출평가팀 윤혜성과장님 등 관련자 분들께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 이창주, 윤용달. 내분비계장애물질이 생식과 발생에 미치는 영향, 한국발생생물학회지 2002; 4(2): 3-11.
 환경부, 환경백서 2007; 627.
 Atiezar FA, Billingham Z and Depledge MH. 4-n-nonylphenol and 17- β estradiol may induced common DNA effects in developing barnacle larvae, Environmental Pollution 2002; 120: 735-738.
 Bromwich P, Cohen J, Stewart I and Walker A. Decline in sperm counts : an artifact of changed reference range of "normal"?, British Med Journal 1994; 309: 19-22.
 Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, and Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population, Environ. Health Perspect 2005; 113(4): 391-395.
 Calafate AM, Ye X, Silva MJ, Kuklenyik Z and Needham

- LL. Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring, *International Journal of Andrology* 2006; 29: 166-171.
- Colborn T, Vom Saal FS and Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect* 1993; 101: 378-384.
- Daidoji T, Ozawa M, Sakamoto H, Sako T, Inoue H and Kurihara R. Slow elimination of nonylphenol from rat intestine, *Drug Metabol Dispos* 2006; 34(1): 184-190.
- Hooper K and MacDonald TA. The PBPEs : an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs, *Environ. Health Perspect* 2000; 108: 387-392.
- Kahl MD, Makynen EA, Kosian PA and Ankley GT. Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*, *Ecotoxicol Environ Safe* 1997; 38: 155-160.
- Neville MC, Keller R, Seacat J, Lutes V, Neifert M, Casey C, Alleln J and Archer P. Studies in human lactation : milk volumes in lactating women during the onset of lactation and full lactation, *Am J Clin Nutr* 1988; 48: 1375-1386.
- Otaka H, Yasuhara A and Morita M. Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. *Anal Sci* 2003; 19: 1663-1666.
- Recchia AG, Vivacqua A, Garpino A, Fasanella G, Rago V, Bonofoglio D and Maggiolini M. Xenoestrogens and the induction of proliferative effects in breast cancers via direct activation of oestrogen receptor alpha, *Food addict contamination* 2004; 21: 133-144.
- Safe SH. Endocrine disruptors and human health-is there a problem? An update, *Environ. Health Perspect* 2000; 108: 487-493.
- Sharpe RM. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals, *Toxicol Lett* 2001; 120: 221-232.
- Solomon GM and Weiss PM. Chemical contaminants in breast milk : time trends and regional variability, *Environ Health Perspect* 2002; 110: A339-348.
- Sonnenschein C and Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65: 143-150.
- Sonowane BR. Chemical contaminants in human milk : An overview, *Environ Health Perspect* 1995; 103: 197-205.
- Sumpter JP. Xenoendocrine disruptores-environmental impacts, *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 337-342.
- Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Garpino A, Rago V, Di Gioia ML, Leggio A, Bonofoglio D, Maggiolini M and Liguori A. The food contaminations bisphenol A and nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF breast cancer cells, *Endocrine* 2003; 22: 275-284.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM and vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity, *Environ. Health Perspect* 2003; 111: 994-1006.
- Yang M, Park MS and Lee HS. Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks, *J Environ Sci Health C Environ Carcinogen Ecotoxicol Rev* 2006; 24: 188-224.
- Ye X, Kuklenvik Z, Needham LL and Calafat AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2006; 831: 110-115.