

유기용제의 피부 흡수속도 연구

1. 연구목적

화학물질의 피부 흡수 연구는化粧품을 포함하여 물질 자체의 피부 흡수 효과와 피부에의 유해성 유무 및 피부의 밀착성 등 안전성에 관한 정성적 연구를 중심으로 많은 연구가 되어 왔으나 화학물질의 피부 흡수속도 및 흡수량에 관한 정량적 평가 연구는 매우 소홀이 되어왔다. 그러나 산업장에서는 화학물질을 대량으로 장시간 취급하는 경우가 많으며, 취급방법과 작업환경에 따라 근로자의 과도한 유해물질 흡수로 인해 건강장해를 초래할 수가 있다. 따라서 이의 체내 흡수 가능량의 평가를 위해서는 호흡에 의한 흡수량 뿐만 아니라 경우에 따라서는 작업환경에 피부의 노출 및 화학물질의 접촉에 따른 흡수량에 대해서도 정량적 평가의 필요성이 제기되고 있다. 최근 피부 흡수량의 연구에 있어 유기용제의 경우 일반 작업환경에서 피부로 부터의 흡수가 전체 체내 흡수량의 0.1-5%수준(Wieczorek, 1985)에 이르며 작업환경 평가에서도 이의 고려가 필요하다고 지적하였으며, ACGIH의 TLV에서도 Acetonitrile을 포함하여 70여종의 화학물질에 대해 경피 흡수를 예방하기 위한 적절한 대책을 강구하여야 함을 지적하고 있다.

본 연구에서는 2-Bromopropane과 Styrene을 시험물질로 하여 실험동물인 Nude mouse를 이용, 확산셀법과 체내 잔존량 측정법에 의해 유기용제의 피부 투과속도와 흡수속도등을 연구하여 유기용제를 취급하는 작업환경에서 피부접촉에 의한 체내 흡수 가능량을 평가하기 위한 자료로 활용 하고자 한다.

2. 실험동물

시험물질의 피부 투과 실험을 위한 피부의 전처리 및 본 실험에서 사용한 피부투과 시험장치인 In vitro 시험기에 장착이 용이하고, 피부흡수 시험인 In vivo 시험에서 실험동물의 체내에 흡수된 시험물질의 흡수량을 측정하기 위해 동물의 전신을 냉동 분쇄하여 사용하

로 무게가 적고 취급이 간편한 mouse로 선택하였으며, 유기용제의 피부 흡수시험을 위해 많이 사용되는 10-11주령이며 무게는 33 ± 3 g의 수컷 Nude mouse(Cr1:SKH-hrBR)를 사용하였다.

3. 실험방법

1) 피부 투과속도(In vitro법) 측정

동물의 복부로 부터 적출한 각질층 피부를 확산 cell에 장착한 후 시험물질의 피부 투과량을 측정할수 있는 확산셀법으로 하였으며 시험장치로는 Tsuruta가 개발한 확산 cell형 피부 투과량 시험장치를 이용하였다.

실험에 사용된 피부는 10주령된 Nude mouse(Cr1:SKH-hrBR)의 복부 각질층 피부를 취한 후 피부에 부착된 지방질 및 혈관들을 분리 제거 시키고, 알루미늄 호일에 피부를 평편히 펴서 고정시킨후 사용하였다.

피부 투과시험시 피부의 크기는 내경 18 mm인 테프론 O-ring을 이용 순간접착제(α -cyanoacrylate)로 앞서 취한 각질층 피부에 접착 시키고 무거운 Pb봉(지름 30, 높이 7 mm)으로 눌러 적출된 피부를 O-ring에 충분히 접착 고정시킨 후 In vitro시험 용기인 cell에 장착시킨다.

그리고 시험물질의 피부 투과 흡수액은 생리식염수(NaCl 0.9 %, 대한약품공업주식회사)를 사용하며 cell의 용량인 14.5 cc를 정확히 cell에 넣어 장착된 피부에 밀착되게 하고 항온 진탕시험기(Bio-shaker, BR-30LF)를 이용 시험기 내의 온도가 36.5°C 로 항온이 될 때까지 숙성 시킨다.

그후 cell 및 흡수액의 온도 변화에 따라 피부와 흡수액의 밀착 정도와 기포가 없는지를 확인하고 시험기內 온도가 사람의 체온 수준인 36.5°C 로 항온이 되면 시험용 시료(유기용제) 0.5 cc를 cell 상부에 주입하고 즉시 마개로 충분히 밀봉한후, 유기용제가 피부를 투과하여 흡수액인 식염수에 잘 분산 되도록 chamber형 항온진탕기를 이용(90 rpm 수준) 시간 경과별 유기용제의 피부 투과량을 측정한다.

투과된 시험물질의 양은 2시간 경과후 시간별로(2, 3, 4, 5, 6시간) 측정하며 흡수된 용액을 0.2 μl 씩 sampling하여 G.C를 이용 투과된 시험물질의 농도를 정량한다.

단, 유기용제의 피부 투과시험 시작전 시험물질에 대해 G.C를 Calibration 하여 시료의 분석 조건을 설정토록 한다.

또한, 시료의 sampling은 일정한 시간 간격으로(예, 5분간격) sampling 할수 있도록 G.C의 retention time을 조정하여 시료별 동일 시간에 분석이 가능토록 분석조건을 설정한다.

2) 피부 흡수속도(In vivo법) 측정

11-12주령된 Nude mouse(Crl:SKH-hrBR)를 폭로 시간 군별로 하여 pentobarbital (sigma사)로 마취(200 mg/10 ml증류수 용액을 0.05 - 0.1 ml투여) 하고 고정판에 테이프로 시험군별(5 min, 10 min군) 고정시킨다.

시험물질의 피부 접촉을 위해 0-ring형 유리관(내경: 20 mm, 높이: 15 mm)의 한쪽면에 순간접착제(α -cyanoacrylate)를 바르고 반대편에는 접착 테이프를 붙인후 동물 복부에 Fig. 3과 같이 시험용 유리관을 장착 시킨다.

각 실험동물별 시험 시간별로 유리관속에 시험용 시료를 0.5 ml 정도 넣고 테이프로 휘발되지 않게 즉시 밀봉한다. 정확히 흡수시험 시간 경과후(시험물질 폭로시는 동물이 마취되어 있는 상태일것) 즉시 접촉시킨 시험물질과 유리관을 주의하여 깨끗이 제거하고 동물의 무게를 측정한 후 신속히 액체질소에 넣어 고정시킨다.

단, 시험물질 흡수시간 종료전(약30초전) N_2 가스나 CO 가스 등으로 동물을 질식시키고, 유리관 속의 시험물질 제거시는 휘발되지 않게 진공펌프와 접착테이프 등을 이용하여 피부에 묻은 시험물질을 깨끗이 제거한다.

비폭로 대조군 3마리의 동물은 시험물질을 투과 시키지 않고 CO 가스로 질식 희생시킨 후 시료 1 μl 를 복부에 깊숙히 투여하고 즉시 액체 질소에 넣어 고정시킨후 회수율 보정용으로 사용 한다.

각 군별 액체 질소(스텐레스 Jar)에 고정된 동물의 사체를 분쇄하기 위하여 압축기와 스텐레스 봉으로 압착하여 잘개 부순후 그림2의 homogenizer(PT45-80, KINEMATICA AG, SWISS)장

치를 이용 동물의 사체를 분쇄(10,000 rpm에서 10분정도)하여 미세 분말로 만든다.

분쇄된 동물사체를 마개달린 50 ml 갈색 삼각플라스크에 5g정도 취한후 시료의 무게를 정확히 측정하고 저온 상태의 시료에 즉시 20 ml의 CS₂를 추가하고 진탕기에서 30분 정도 충분히 진탕하여 분쇄된 동물사체 속의 흡수된 시험물질을 추출한후 CS₂에 추출된 용액을 sampling하여 G.C를 이용 피부에 흡수된 시험물질의 양을 구하고 회수율을 피부 흡수량 계산식에 의해 보정하여 시험물질의 흡수된 양을 산출한다.

* 대사량 보정

In vivo 시험에서 피부 흡수 시험시간(5-10분) 동안 시험물질의 생체 대사작용에 의해 흡수된 시험물질의 일부가 소실될수 있으므로 시험에서 측정된 시험물질의 흡수량에 대사량을 보정할 필요가 있다.

이를 위해 동물 각 3마리를 한군으로 하여 pentobarbital 용액으로 마취 시켜 시험 군별(1시간군, 2시간군) 동물을 고정판에 고정시킨후 시료 1 μ l를 복부 깊숙히 주사한다.

마취 상태에서 일정시간 경과후(1, 2시간) N₂ 가스로 질식희생시킨후 체중을 측정하고 즉시 액체질소에 넣어 고정시킨후 앞에서와 같이 그림2의 homogenizer장치등을 이용 동물의 사체를 분쇄하고 CS₂에 추출한 후 G.C를 이용 시험물질의 남은양을 측정하여 투여량(1 μ l)으로부터 대사 및 호흡 배출에 대한 양을 역산출하고 이를 대사량 보정 값으로 한다.

4. 실험결과

1) 피부 투과속도(In vitro)

Alcohol류인 Ethanol과 '96년도 생식독성 물질로 확인된 2-bromopropane등 각각의 단일 물질을 시험물질로 하여 확산셀법에 의한 피부 투과 시간별 투과량을 시험하여 Table 1와 같은 결과를 얻었으며, 이를 시간과 투과량에 대해 Fig. 1와 같이 각 물질별 경피투과 곡선을 작성 시험물질의 피부투과속도를 구하였다.

Table 1. 확산셀법에 의한 유기용제의 피부 투과속도

단위 : mg/cm^2

시험물질	시료수	투과 시간 (hour)				
		2	3	4	5	6
Ethanol	1	0.767	0.884	1.718	2.729	3.656
	2	2.812	4.575	7.597	10.382	12.171
	3	1.428	2.956	4.126	6.725	8.242
	4	1.282	2.725	5.841	7.296	9.175
	mean $\pm$ SD	1.57 $\pm$ 0.87	2.79 $\pm$ 1.51	4.82 $\pm$ 2.51	6.78 $\pm$ 3.14	8.31 $\pm$ 3.53
2-Bromo- propane	1	2.104	7.935	13.348	23.438	over
	2	3.370	6.720	9.812	10.890	over
	3	5.125	8.265	15.726	26.178	over
	4	3.178	6.306	8.196	15.495	25.27
	mean $\pm$ SD	3.44 $\pm$ 1.21	7.31 $\pm$ 0.94	11.8 $\pm$ 3.40	19.0 $\pm$ 7.05	over

Fig. 1는 시험 시간별 투과량을 나타낸 것으로 Ethanol의 경우 피부 투과속도는 $1.747 \text{ mg}/\text{cm}^2/\text{h}$, 2-bromopropane은 $4.165 \text{ mg}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 측정 되었다. 특히 2-bromopropane은 시간의 경과에 따라 피부 투과속도가 급속히 증가 하였으며 본 연구 결과에서는 Ethanol의 2.384배로 피부 투과속도가 매우 빠른 물질로 나타났다.

Fig. 1. Percutaneous absorption curve of organic solvents through mouse skin

2) 피부 흡수속도(In vivo)

2-bromopropane과 Styrene을 시험물질로 하여 Nude mouse를 이용 피부에 흡수시킨 후 homogenizer를 이용 체내 잔존량 측정법(In vivo)에 의해 유기용제의 피부흡수 시험을 하였다.

시험물질의 피부 흡수 시간은 시험군별 5분과 10분으로 하고 시험물질의 대사량과 회수율 보정을 위해 별도의 동물시험군을 이용 이를 보정하였다.

시험결과 Table 2과 같이 2-bromopropane과 Styrene의 경우 5분간 Nude mouse의 피부접촉시 체내에 흡수된 시험물질의 흡수량은 $0.59 \pm 0.05 \text{ mg/cm}^2$ 과 $0.23 \pm 0.02 \text{ mg/cm}^2$, 10분간 접촉시 $0.85 \pm 0.08 \text{ mg/cm}^2$ 과 $0.35 \pm 0.03 \text{ mg/cm}^2$ 이었으며 회수율 보정시험에서 시험물질의 회수율은 $67.3 \pm 3.5 \%$ 와 $64.0 \pm 8.2 \%$ 이었다.

Table 2. 체내 잔존량 측정법에 의한 유기용제의 피부 흡수속도

시험물질	흡수시간 (min)	회수율 (%)	대사량보정 계수	체내 흡수량 (mg/cm ²)
2-bromopropane	5	-	1.0052	0.59±0.05
	10	-	1.0105	0.85±0.08
	0	67.3±3.5	-	-
Styrene	5	-	1.0100	0.23±0.02
	10	-	1.0201	0.35±0.03
	0	64.0±8.2	-	-

Fig. 2는 2-bromopropane과 Styrene의 피부 흡수시험 결과로 부터 시험물질 접촉시간에 따른 체내 흡수량의 상관 관계를 나타낸 것이며 시험물질의 단위면적 당 흡수량과 흡수시간으로 부터 경피 흡수속도를 구하였다.

2-bromopropane의 경피 흡수속도는 0.052 mg/cm²/min(3.12 mg/cm²/h 상당) 이었으며, Styrene의 경우 0.024 mg/cm²/min(1.44 mg/cm²/h 상당) 이었다.

2-bromopropane의 경피 흡수속도를 앞서 확산셀법에 의한 경피 투과속도 시험결과(4.165 mg/cm²/h)를 기준으로 비교할 때 경피 흡수속도는 74.9 %를 나타내고 있다.

Fig. 9. Percutaneous absorption curve of 2-bromopropane and styrene through mouse skin

5. 결 론

Nude mouse(Cr1:SKH-hrBR)를 이용 확산셀법과 체내 잔존량 측정법에 의한 유기용제류의 피부 투과속도 및 피부 흡수속도를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ethanol의 피부 투과속도는 $1.747 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$, 2-bromopropane은 $4.165 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$ 이었다.
2. In vivo법에 의한 2-bromopropane 및 Styrene의 피부 흡수속도는 $3.12 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$, $1.44 \text{ cm}^2/\text{h}$ 이었으며 2-bromopropane의 경우 In vitro법에 의한 경피투과 시험결과 ($4.165 \text{ m/cm}^2/\text{h}$)를 기준으로 할 때 74.9 %의 수준을 나타내었다.