Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(4):293-298. Korean
Published online 2017 December 22. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.4.41

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

Deltamethrin에 노출된 흰쥐의 뇨 중 3-PBA 검출 및 노출상관성

김아름누리, 전경미, 박경훈, 문병철, 노진호, 백민경*

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과

The Correlation Between Deltamethrin Exposure and Urinary 3-PBA Concentrations in Rats

Areumnuri Kim, Kyongmi Chon, Kyung-Hun Park, Byeong-Chul Moon, Jin-Ho Ro and Min Kyoung Paik*
(Chemical Safety Division, Department of Agro-food Safety & Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea)

Received: 7 November 2017/ Revised: 25 November 2017/ Accepted: 29 November 2017

ORCID
Min Kyoung Paik
http://orcid.org/0000-0001-6002-6358

Abstract

BACKGROUND: Pyrethroids (PYRs) are a widely used insecticide in agriculture and household area. In mammals, PYRs such as deltamethrin is metabolized to 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) in liver that is mainly excreted in urine. This study is designed to single exposure of deltamethrin to rats in a dose-dependent manner and identify the correlation between deltamethrin exposure and its metabolite (3-PBA) in urine.

METHODS AND RESULTS: Exposure levels of deltamethrin were control (0 mg/kg bw), low (0.0705 mg/kg bw), medium (0.705 mg/kg bw) and high (7.05 mg/kg bw) dose. Low concentration was derived by ussing Korea predictive operator exposure model (KoPOEM). Dermal exposure persisted for 6 h, and urine specimens were collected for 24 h. The urine matrix was removed after a series of procedures and 3-PBA was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry.

CONCLUSION: There was a strong correlation (R^2=0.83) between the amount of oral exposure to delta me thrin and urinary levelof3-PBAexcreted. In dermal exposure groups of deltamethrin except high-dose, also there was a good correlation between urinary 3-PBA and deltamethrin exposure, but not stronger than in oral deltamethrin exposure groups. Based on these results, therefore, the amount of 3-PBA in urine can be used as a good monitoring indicator that reflexing the exposure level of deltamethrin to human body.

Key words: Correlation, Deltamethrin, Rats, Urinary 3-PBA

*Corresponding author: Min Kyoung Paik
Phone: +82-63-238-3253; Fax: +82-63-238-3238;
E-mail: mink1114@korea.kr

서 론

Deltamethrin [(S)-*alpha*-cyano-3-phenoxybenzyl(1*R*,3*R*)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate] 은 pyrethroids (PYRs)계 살충제 중 하나로 농업과 산업전반에 널리 쓰이고 있다. PYRs는 곤충의 나트륨 채널에 민감하게 영향을 주며 곤충계에 신경독성을 일으켜 살충제로서 사용된다. Deltamethrin은 일반적으로 인체에 독성이 낮다고 평가되나 잠재적인 신경독성을 유발할 가능성이 있다고 보고된다(Barlow *et al.*, 2001). Deltamethrin은 Fig. 1과 같이 Esterase 효소에 의한 ester결합의 가수분해를 통해서 3-Phenoxybenzoic acid(3-PBA)와 cis-3-(2,2-Dibromovinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylic acid (cis-DBCA)로 대사되며(Angerer and Ritter, 1997; Arrebola *et al.*, 1999), 대사체들은 glucuronic acid와 결합하여 24시간안에 뇨로 배설된다(Leng *et al.*, 1997). 3-PBA는 PYs계 농약 중 cyhalothrin, cypermethrin, esfenvalerate, etofenprox, permethrin, phenothrin에서 공통적으로 배출되는 대사체이기 때문에 뇨중 3-PBA는 PYPs 농약의 노출에 대한 모니터링

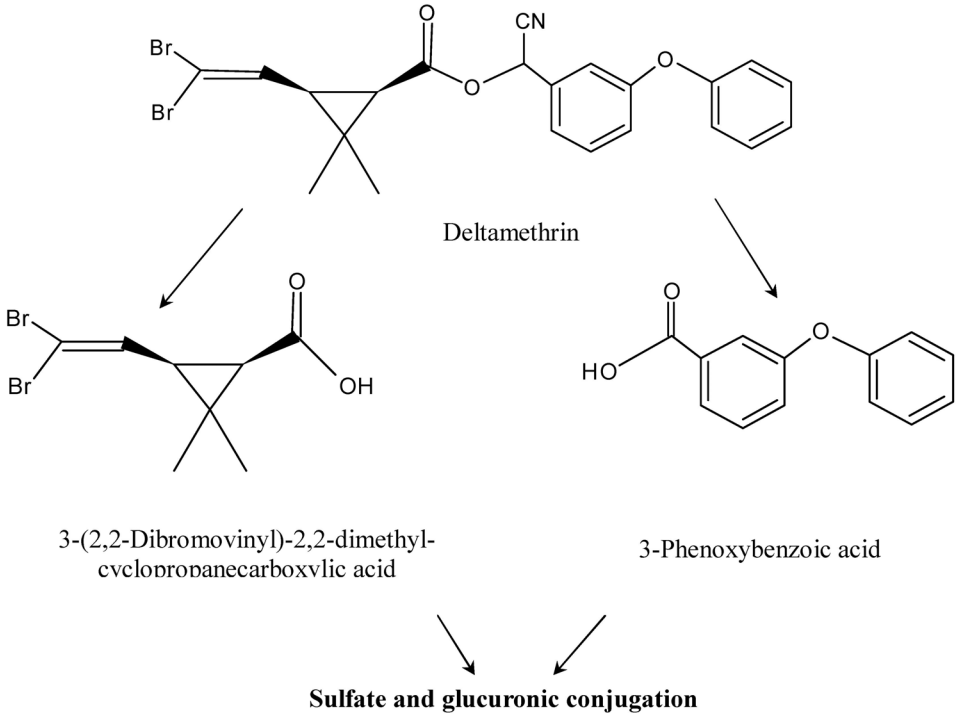

Fig. 1. Main metabolic pathways of deltamethrin in mammals.

지표로 사용되고 있다(Wielgomas *et al.*, 2013; Watkins *et al.*, 2016; Rousis *et al.*, 2017). 이전 연구들에서는 deltamethrin에 대한 독성연구가 주로 수행되었으며(Rickard *et al.*, 1985; Anadon *et al.*, 1996), 인체 내 미량의 3-PBA농도를 검출할 수 있었으나 정량적인 노출량을 예측하기가 어렵고 고용량 투여에 대한 임상시험에 한계점을 가진다. 농약은 일반인의 경우 농산물의 잔류농약을 섭취하는 경로로 일반적으로 노출되며, 농작업자의 경우 농약 조제나 살포시 피부와 호흡기가 주된 노출경로이다(Kim *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2013). 본 실험에서는 대사생리적 측면에서 다른 종류의 동물보다 사람과의 유사성이 높은 장점이 있는 Spraque-Dawley 흰쥐를 이용하여 동물실험을 실시하였으며, 농약의 주된 노출경로인 경구와 경피 투여를 통해 흰쥐의 뇨에서 deltamethrin 대사체인 3-PBA를 검출하여 상관관계를 얻기 위한 목적으로 연구되었다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

시험물질은 Technical deltamethrin (99.8%)으로 Bayer Cropsicence (Monheim am Rhein, Germany)에서 제공받아 사용하였다. 표준용액 제조에 사용된 3-PBA (98%), 내부표준물질로 사용된 2-PBA(98%), 유도체화 시약인 MTBSTFA (97%), 추출 용매인 n-hexane (95%), Toluene (99%) 모두 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 뇨중 creatinine 분석에 사용된 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 1% picric acid는 Ricca chemical (Arlington, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다.

시험동물 및 사육조건

시험동물은 Sprague-Dawley 계 7주령 수컷 흰쥐를 ㈜ Koatech (Gyeonggi-Do, Korea)로 부터 구매하여 시험 전 1주정도 시험조건에서 순화 후 사용하였다. 사육조건은 온도 23±3℃, 상대습도 50±5%, 환기횟수 10~15회/시간, 조도 150~300 Lux, 조명시간 12시간으로 전 시험기간 동안 폴리카보네이트 사육상자에 3마리씩 넣어 시험하였으며, 물과 사료는 자유롭게 공급하였다.

시험군의 구성 및 투여용량 설정

시험군간 체중차이는 평균체중의 ±20%를 넘지 않도록 선별하였다. 시험군의 용량은 Korea predictive operator exposure model (KoPOEM)에 의해 근거하여 산정한 농도를 저농도로 기준을 삼고 10배, 100배 높은 농도를 각각 중농도, 고농도로 투여하였다. Deltamethrin을 corn oil에 녹여 고농도(7.05 mg/kg bw), 중농도(0.75 mg/kg bw) 및 저농도(0.075 mg/kg bw)로 설정하였으며 군당 8-12마리로 구성하였고 대조군은 corn oil만을 투여하였다.

투여방법

경구투여는 시험 전일 금식을 시키고 존데(Zonde)를 사용하여 시험물질을 위내강으로 직접 경구투여 시켰다. 경피투여는 시험 전일 쥐의 등 부위를 체표면적의 10% 정도 제모한 후 4×4 cm 크기의 거즈에 시험물질을 균일하게 도포한

Table 1. The operating condition of GC/MS for analytes

Description	Condition
Apparatus	Agilent 6890 GC with 5973 MSD
Column	DB-5 30 m×0.32 mm×0.5 um
Injection Temp	280℃
Injection volume	2 ul
Injection type	Splitless
Oven Temp	Initial 90℃ for 1 min, 25℃/min to 120℃, 2.1℃/min to 240℃ for 1.5 min, 25℃/min to 300 for 7 min

Table 2. Retention times and detected masses of the analytes

Compound	Retention time (min)	*m/z*
2-PBA (IS)	39.85	271, 227, 197
3-PBA	43.86	271, 227, 197

후 비자극성 테이프로 6시간 동안 고정시켜준 뒤 멸균증류수로 씻어 냈다.

뇨 시료채취 방법

뇨 시료는 Deltamethrin 투여 후 대사 케이지를 이용하여 24시간 채취하였다. 수거한 뇨 시료는 2,000 rpm 10분간 원심분리(Hanil, Supra 22K, Incheon, Korea) 한 뒤 상층액을 0.45 μm 주사기 필터를 사용하여 불순물을 제거 하고 부피를 측정하였으며 분석 전까지 -70℃ 이하에서 보관되었다.

분석기기 및 분석조건

뇨 시료에서 3-PBA를 정량 분석하기 위해 Agilent 사(Santa Clara, CA, USA)의 GC (6890N)/MSD (5975)를 사용하였고 GC-MS의 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. Column은 DB-5(30 m×0.32 mm×0.5 um)를 사용하였고. 컬럼 온도는 초기온도 90℃에서 1 분간 유지시킨 후, 120℃까지 25℃/min 속도로 올리고, 그 후 240℃까지는 2.1℃/min 속도로 15 분간 유지하고, 300℃까지 25℃/min 속도로 7분 동안 유지시켰다. 시료주입은 splitless mode로 분석시료를 2 μL로 주입하였다. 정량분석을 위해 selected ion monitoring (SIM) 모드에서 사용한 모니터링 분자량은 Table 2에 나타냈고 3-PBA의 머무름 시간(Retention time)은 Table 1의 조건하에서 38분에서 40분 사이였다.

전처리 방법

본 연구에 사용된 전처리 방법은 Schettgen 등(2002)의 방법을 따랐다. 뇨 시료는 사용하기 전 37℃ Water bath (EYELA, SB-15, Tokyo, Japan)에서 해동한 후 사용하였다. 뇨 시료 1 mL에 내부표준물질(2-PBA) 10 μL (10 μg/mL), HCl (12 N) 100 μL를 첨가 한 뒤 oven (Vision, VS-4150ND, Daejeon-Si, Korea)에서 90℃, 1시간 동안 가수분해 시킨 후 상온에서 식혔다. n-hexane 500 μL를 첨가 한 뒤 10분간 진탕하였다. 1500 g에서 10분간 원심분리를 한 뒤 상층의 유기층을 새로운 tube에 취하였다. 이와 같은 과정을 반복하여 2회 추출하였으며 추출된 유기층을 질소가스를 사용하여 완전히 건조시켰다. Toluene 50 μL과 유도체시약인 MTBSTFA 10 μL를 첨가하여 진탕한 뒤 분석 용기에 취하여 oven에서 70℃, 45분 동안 반응시킨 후 2 μL를 GC-MS에 주입하여 분석하였다.

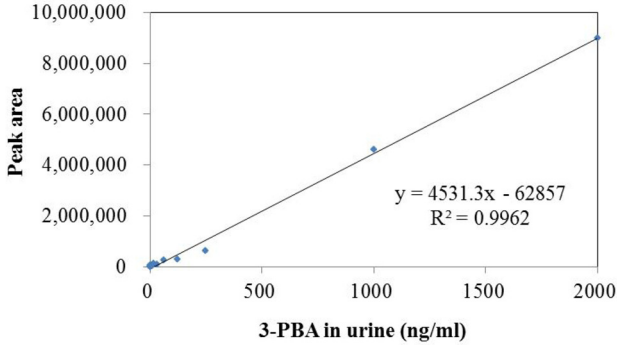

Fig. 2. Standard calibration curve of urinary 3-PBA.

표준검정곡선 시험

뇨 중 3-PBA를 정량분석 하기 위해서 3-PBA stock 용액(40 ug/mL)을 제조하여 0.98 ug/mL- 2.00 ng/mL까지 무처리군 뇨로 희석하여 Fig. 2와 같은 표준검정곡선을 작성하였다.

뇨 중 creatinine분석

본 시료의 뇨 중 creatinine 분석에는 Jaffe reaction을 기본원리로 Ahn 등(2011)의 방법에 따라 측정하였다. 20 mg/dL creatinine 표준용액을 공비 2로 희석하여 7단계의 농도로 표준검정곡선을 작성하여 정량에 사용하였다. 96 well plate (SPL life science, Gyeonggi-do, Korea)에 20배 희석한 뇨 시료, creatinine 표준용액 및 blank시료를 각각 50 μLwell^{-1} 첨가하였으며 creatinine reagent (1:1=0.3 N NaOH:1% picric acid)을 100 μLwell^{-1} 첨가 한 뒤 15분 동안 상온에서 반응시켰다. 색 변화를 일으킨 반응액은 Multiskan microplate reader (Thermo Scientific, Vantaa, Finland)을 이용하여 480 nm 파장에서 측정하였다. 실험은 3반복으로 수행하였다.

결과 및 고찰

뇨 중 creatinine 분석 결과

creatinine은 근육내에서 생성되는 물질로 정상상태에서 뇨 중 배출량이 일정하기 때문에 신장기능의 지표와 함께 뇨 중 대사체 분석의 지표로도 사용된다(O'Rourke *et al.*, 2000). 뇨 중 creatinine을 분석한 결과 경구투여 고농도군 2마리를

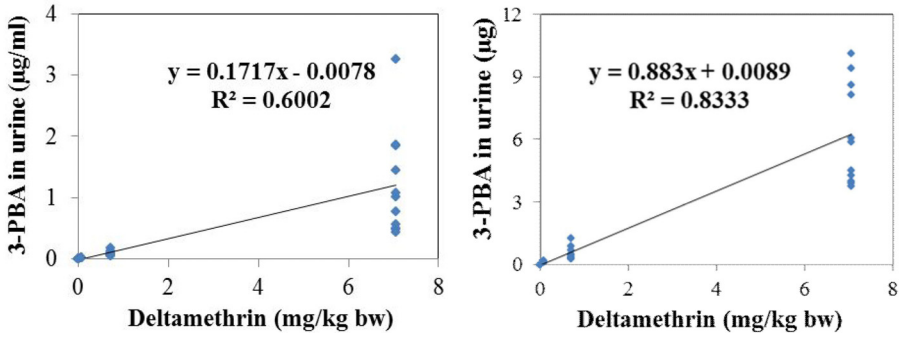

Fig. 3. The concentration (μg/ml) and amount (μg) of urinary 3-PBA in rats after single oral administration of deltamethrin.

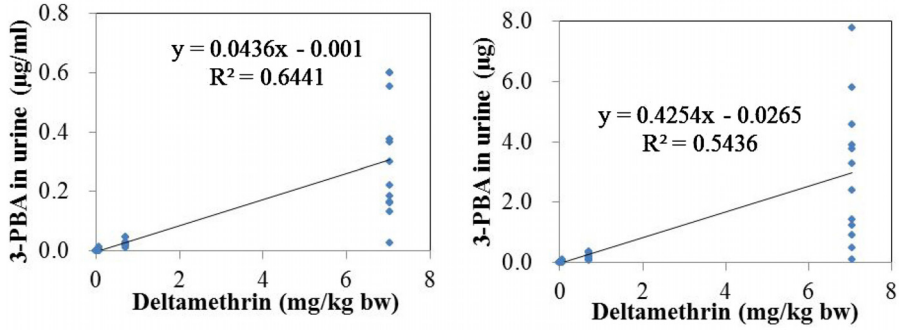

Fig. 4. The concentration (μg/ml) and amount (μg) of urinary 3-PBA in rats after single dermal administration of deltamethrin.

Table 3. Descriptive analytical data for urinary 3-PBA detected in rats

Route of administration	Groups	No. of rats	Dose (mg/kgbw)	3-PBA			
				Mean (μg/ml)	SD (μg/ml)	Mean (μg)	SD (μg)
Oral	Control	13	0	ND*	ND	ND	ND-
	Low	8	0.070	0.019	0.004	0.153	0.034
	Medium	9	0.705	0.086	0.042	0.566	0.331
	High	11	7.050	1.205	0.859	6.239	2.406
Dermal	Control	8	0	ND	ND	ND	ND
	Low	10	0.070	0.004	0.005	0.026	0.029
	Medium	11	0.705	0.027	0.013	0.222	0.105
	High	12	7.050	0.307	0.193	2.977	2.328

*ND; Not Detected

제외한 모든 시험군에서 Shevock 등(1993)의 문헌상의 정상 범위내의 값을 보여 신장기능에 이상이 없음을 나타내었고, 뇨 중 Creatinine 보정 값으로 환산한 결과 경구투여 시험군(R^2=0.817), 경피투여 시험군(R^2=0.586)으로 deltamethrin 투여 농도에 따른 상관성을 보였으며 뇨 중 3-PBA 양 그래프와 유사한 결과를 나타냈다(Fig. 3,4).

경구투여 후 뇨 중 3-PBA 검출

Deltamethrin을 경구투여한 쥐에서 각각 24시간 동안 뇨를 채취하여 분석한 결과는 Fig. 3, Table 3과 같다. 대조군에서는 뇨 중 3-PBA가 검출되지 않았고 저, 중, 고농도에서는 각각 0.019±0.004, 0.086±0.042, 1.205±0.859 μg/mL의 농도로 3-PBA가 검출되었다. Deltamethrin 투여 농도에 따른 뇨 중 3-PBA 상관성은 R^2=0.600로 나타나지만, 채취된 뇨 부피로 환산하면 저, 중, 고농도에서 각각 0.153±0.034, 0.566±0.331, 6.239±2.406 μg의 결과를 나타내며 deltamethrin 투여 농도에 따른 유의적 상관성(R^2=0.833)을 나타냈다.

경피투여 후 뇨 중 3-PBA 검출

Deltamethrin을 고농도, 중농도, 저농도, 무처리군으로 경피투여한 쥐에서 각각 24시간 동안 뇨를 채취하여 분석한 결과는 Fig. 4과 Table 3에 나타내었다. 경피 투여 역시 대조군 에서는 뇨 중 3-PBA가 검출되지 않았고 저, 중, 고농도에서는 각각 0.004±0.005, 0.027±0.013, 0.307±0.193 μg/mL의 농도로 3-PBA가 검출되었다. Deltamethrin 투여 농도에 따른 뇨 중 3-PBA 상관성은 R^2=0.644로 나타난다. 채취한 뇨 부피로 환산하면 저, 중, 고농도에서 각각 0.026±0.029, 0.222±0.105, 2.977±2.328 μg의 결과를 나타내며 낮은 상관성(R^2=0.5436)을 나타냈지만, 고농도를 제외한 결과값에서는 뇨 중 3-PBA 농도와 검출량에서 R^2=0.7 이상의 값을 보였다.

Fig. 3과 4의 결과에서 deltamethrin의 경구 및 경피 투여에 의한 뇨 중 3-PBA의 검출량과 검출농도 모두 용량 의존적인 경향을 나타내었으며 뇨 중 3-PBA 검출농도는 경구, 경피투여시 R^2=0.6이상의 값을 나타냈지만, 뇨 부피를 환산하여 구한 뇨 중 3-PBA 검출량에서는 경피투여에서 R^2= 0.543으로 경구투여보다 더 낮은 상관성을 나타내었다.

쥐를 이용한 detlamethrin의 독성 연구와 Pharmacokinetic modeling에 따르면 경구투여의 경우 위장관에서 고농도에서 흡수율이 증가하며(Godin *et al.*, 2010), 생체흡수율은 0.4-10.0 mg/kg 투여군에서 18% 수준으로 나타났다(Kim *et al.*, 2007). 경피투여의 경우, Rat 피부를 이용한 *in vitro* 연구에서 24시간 도포 후 투여 용량의 70% 정도가 세척과정에서 제거되고 27%는 그대로 피부에 남았으며, 2-4%만이 receptor fluid에서 검출된 것을 보면 피부를 통한 흡수율은 매우 낮은 것으로 나타났다. *invivo* 실험결과 또한 50% 이상이 세척과정에서 제거되었으며 피부에 9-24% 남아 있는 것으로 나타났다(Hughes and Edwards, 2010; 2016). 이는 detamethrin은 피부 투과가 용이한 친유성 화학구조상의 특성과는 달리 농작업자의 작업수준에 따른 실험조건상 미량 노출된다는 것을 의미한다. 본 실험에서는 농작업자의 표준 작업시간인 6시간 동안 처리로 선행연구보다 노출시간이 짧았기 때문에 미량 흡수된 것으로 보이며, 고농도에서 검출값의 범위가 넓어 편차가 크기 때문에 농도 의존적 상관성이 낮은 경향을 보였다. 하지만 경피투여군 내에서 고농도를 제외한 결과에서는 더 유의적인 결과를 얻었다.

국내 농작업자의 요 중 3-PBA을 검출에 관한 연구들이 다수 진행되었지만(Seo *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015), 직접적으로 농약의 노출과 뇨 중 대사체 배출량의 상관관계에 대한 연구는 없었다. 본 연구에서는 deltamethrin 노출량과 3-PBA의 검출량과의 유의적인 상관관계와 경구 및 경피투여 실험을 통해서 식이 노출량과 피부를 통한 노출량간의 상관관계를 알 수 있었으며, 이는 농작업자만이 아닌 인체내의 3-PBA의 검출량으로부터 노출량을 환산 할 수 있는 지표로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 다만 본 동물실험은 다른 식이섭취나 환경적 노출에 대한 변수의 영향을 배제한 결과로 직업적인 노출이나 일반인에 대한 평가를 위해서는 특성에 맞는 노출수준 및 경로에 대한 추가 연구가 선행될 필요가 있다.

Notes

The author declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ01283502)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Ahn, K. C., Gee, S. J., Kim. H. J., Aronov, P. A., Vega, H., Krieger, R. I., & Hammock, B. D. (2011). Immunochemical analysis of 3-phenoxybenzoic acid, a biomarker of forestry worker exposure to pyrethroid insecticides. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401(4), 1285-1293.

Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R., Fernandez-Cruz, M. L., Diaz, M. J., Fernandez, M. C., & Martinez, M. A. (1996). Toxicokinetics of deltamethrin and its 4′-HO-metabolite in the rat. Toxicology and Applied Pharmacology, 141(1), 8-16.

Angerer, J., & Ritter, A. (1997). Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 695, 217–226.

Arrebola, F. J., Martinez-Vidal, J. L., Fernández-Gutiérrez, A., & Akhtar, M. H. (1999). Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 401, 45–54.

Barlow, S. M., Sullivan, F. M., & Lines, J. (2001). Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. Food and Chemical Toxicology, 39(5), 407-422.

Godin, S. J., DeVito, M. J., Hughes, M. F., Ross, D. G., Scollon, E. J., Starr, J. M., & Tornero-Velez, R. (2010). Physiologically based pharmacokinetic modeling of deltamethrin: development of a rat and human diffusion-limited model. Toxicological Sciences, 115(2), 330-343.

Hong, S., You, A. S., Jeong, M., Park, K. H., Park, J. Y., & Lee, Y. J. (2013). Risk assessment of pesticide operator using modified UK-POEM in Korean orchard. The Korean Journal of Pesticide Science, 17(1), 50-59.

Hughes, M. F., & Edwards, B. C. (2016). In vivo dermal absorption of pyrethroid pesticides in the rat. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 79(2), 83-91.

Hughes, M. F., & Edwards, B. C. (2010). In vitro dermal absorption of pyrethroid pesticides in human and rat skin. Toxicology and Applied Pharmacology, 246, 29-37.

Kim, E. H., Lee, H. R., Choi, H., Moon, J. K., Hong, S. S., Jeong, M. H., & Kim, J. H. (2011). Methodology for quantitative monitoring of agricultural worker exposure to pesticides. The Korean Journal of Pesticide Science, 15(4), 507-528.

Kim, H. K., Song, J. S., Choi, S. H., & Yu, H. Y. (2015). Evaluation of Exposure to Pyrethroid Pesticides in Highland Cabbage Farmers by Using Biological Monitoring. The Korean Society of Pesticide Science, 19(1), 41-46.

Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., White, C. A., & Bruckner, J. V. (2008). Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague Dawley rats. Toxicological Sciences, 101(2), 197-205.

Leng, G., Kuhn, K. H., & Idel, H. (1997). Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. Sciences Total Environment, 199, 173–181.

O'Rourke, M. K., Lizardi, P. S., Rogan, S. P., Freeman, N. C., Aguirre, A., & Saint, C. G. (2000). Pesticide exposure and creatinine variation among young children. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, 10, 672–681.

Rickard, J., & Brodie, M. E. (1985). Correlation of blood and brain levels of the neurotoxic pyrethroid deltamethrin with the onset of symptoms in rats. Pesticide Biochemistry and Physiology, 23(2), 143-156.

Rousis, N. I., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2017). Wastewater-based epidemiology to assess human exposure to pyrethroid pesticides. Environment International, 99, 213-220.

Schettgen, T., Koch, H. M., Drexler, H., & Angerer, J. (2002). New gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. Institute Journal of Chromatography B, 778, 121–130.

Seo, J. C., Choi, H. S., & Song, J. S. (2007). Determination of 3-phenoxybenzoic Acid in Urine and Exposure Assessment of Pyrethroid Insecticides to Human. The Korean Society of Pesticide Science, 11(2), 87-94.

Shevock, P. N., Khan, S. R., & Hackett, R. L. (1993). Urinary chemistry of the normal Sprague-Dawley rat. Urological Research, 21, 309-312.

Watkins, D. J., Fortenberry, G. Z., Sánchez, B. N., Barr, D. B., Panuwet, P., Schnaas, L., & Hu, H. (2016). Urinary 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) levels among pregnant women in Mexico City: Distribution and relationships with child neurodevelopment. Environmental Research, 147, 307-313.

Wielgomas, B., Nahorski, W., & Czarnowski, W. (2013). Urinary concentrations of pyrethroid metabolites in the convenience sample of an urban population of Northern Poland. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 216, 295–300.