

# 급성중독 가토의 치아 및 악골조직에서의 Endosulfan 검출에 관한 실험적 연구

연세대학교 대학원 치의학과  
조 호 현 · 김 중 열

## — 목 차 —

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 연구방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

## I. 서 론

최근 사회의 발전과 더불어 인간의 생활이 다변화되고 기계화됨에 따라 각종 중독, 과실, 자살, 모함사건이 증가되고 있는 추세이다. 이중 독극물로 인한 중독사건은 국내통계<sup>1)·2)</sup>에 따르면 거의 30% 이상을 점유하고 있다.

따라서 법의학적 및 법치학적으로 볼 때 사인규명을 위한 독극물의 검출은 대단히 중요하며 과학 수사 및 감정실무에 그 가치는 매우 크다 할 수 있는 것이다. 그러나 시체의 상태에 따라서는 독극물의 검출은 커다란 난점이 있으며 고도의 부패가 되어 있는 경우에는 검출상 문제점이 많다고 할 수 있다.

독극물의 분류상 신경독에 속하는 malix는 유기 염소산 제제로서 1957년에 독일 Hoechst에서 Messers에 의해 최초로 합성된 비교적 최근의 살충제이며 일반명을 Endosulfan이라 명명하였고<sup>3)</sup> 본품은 화학적으로 안정하여 주변환경에 오래 잔류하며 지용성이어서 자연 생태계의 변화 및 오염을 시키고 있고 식물 연쇄과정을 통해 조류등의 동물체내에 축적 및 농축되는 성질이 있는 것으로<sup>4)</sup> 우리나라에서

는 마릭스, 지오렉스, 지오단 등의 상품명으로 시판되고 있어 구입이 용이하고 전 유기염소 살충제 중독사건 중에서 본품으로 인한 사고건수는 전체의 약 30% 이상을 차지하고 있는 실정이다. <sup>1), 2), 22)</sup>

Bernard, C(1857) 등은 농약을 실험동물에 투여하여 세포내 Chromosome이나 다른 구조물을 변화시킨 것을 보고한 바 있고 Baumler, J, Rippsteins (1961), Walker, K, Beroza, M<sup>11)</sup> (1963), 丹羽<sup>12)</sup> (1962) 등은 수종의 농약을 대상으로 Thin Layer Chromatography에 의한 분석법을 보고하였고, Fishbein<sup>5)</sup> (1974)은 유기 염소제의 신체내 중독기전을 밝힌 바 중추신경계의 자극 작용이 특징이라고 하였으며, Luckens<sup>6)</sup>, M. M. (1974)은 농약이 각 장기에 분포되어 Cholinesterase의 작용을 저해하여 체내에 acetylcholine 이 축적되어 Choline행동성 신경의 자극이 증가되는 것이 중독의 핵심이라고 보고하였다.

유기염소 및 인계제의 분석은 일반화학 분석을 비롯하여<sup>1-3), 15, 16)</sup> Gas Chromatography<sup>1-3), 13, 14)</sup> polarography<sup>13, 14, 22)</sup> 및 paper chromatography<sup>13, 22)</sup> 등이 있으나 국내의 연구로는 김이<sup>17)</sup> Gas Chromatography에 대한 연구와 오<sup>20)</sup> 등이 사체 장기 중에서 Malix 검출에 관한 연구가 있고 치아 등을 중심으로한 악골 조직에서의 독극물 검출에 관한 연구로는 임<sup>24)</sup>의 청산 및 비소 검출에 관한 연구가 있을 뿐이다. 이에 본 연구에서는 Endosulfan을 가토에 투여하고 간, 혈액등의 장기와 함께 물리적 및 화학적 변화에 대하여 내구성 강한 치아 및 주위 조직, 악골 등을 중심으로 한 장기 조직에서 Endosulfan 검출 양상 및 병리조직 변화 등을 관찰함으로써 법치학적 감정실무에 응용될 것으로 사료되어 본 연구를 시도하였다.

## II. 연구재료 및 연구방법

### 가) 장치 및 기구

- Gas Chromatograph(G.C.) Model : Varian 3700 Series with Recorder 9176
- Rotary Vacuum evaporator : Büchi
- Glass Column(15mmφ×500mm) : Pyrex U. S. A.
- Funnel : Buchner type
- TLC용 Silicagel(20×20cm)
- TLC용 Glass Chamber
- Homogenizer : Du Pont
- U-V Light Source : (Short Wave Length)

### 나) 시 약

- Acetonitrile : 잔류농약 분석용
- Petroleum ether : 잔류농약 분석용
- Sodium chloride : 1 급시약
- Ethyl Ether : 잔류농약 분석용
- Carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>)
- Cyclohexane
- Acetone
- Florisil
- Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>
- 0.5% ortho-toluidine, ethanol soln.
- D. D. E.

### 다) 연구 재료

본 연구의 재료로는 Endosulfan을 경구 투여하여 희생시킨 가토의 악골, 치아, 치수, 혈액 및 간을 절제하여 사용하였으며 각 시료의 채취량은 다음과 같다. (Table 1 참조)

Table 1.; Amounts of samples used this study.

Samples	Amounts(g)
Jaw Bone	6.00
Tooth	3.50
Dental Pulp	0.40
Blood	10.00
Liver	10.00

### 라) 연구 방법

Endosulfan을 함유한 생체조직을 유기용매로 추출한 후 Column Chromatography로 정제하여 Gas Chromatography 및 Thin Layer Chromatography에 의한 정성방법을 시도하였다.

### 1) 시료의 채취

가토를 고정 실험대에 사지를 고정시키고 Endosulfan 150mg/kg을 경구 투여하여 희생시키고 즉시 부검하여 간, 혈액 및 악골을 채취하여 악골을 제외한 장기는 Homogenizer를 이용하여 균일화시키고 악골은 치아 및 치수로 각각 분리한 다음, 악골, 치아를 여과지에 싸서 쇠질구로 분쇄하고 다시 사기막자로 세밀하게 분쇄하였다.

### 2) 시료의 추출 및 정제

각 시료를 Acetonitrile 40ml와 혼합하여 1ℓ 분액여두(Separate funnel)에 취하고 다시 Acetonitrile 40ml를 넣고 15~20분간 혼합, 진탕하여 상등액만 여과시키고 잔사에 다시 Acetonitrile 40ml를 넣고 혼합 진탕후 상등액을 여과시키는데 이 과정을 3회 반복 시행하였다.

여액을 분액 여두에 옮기고 포화 NaCl용액 50ml와 증류수 300ml를 넣고 Petroleum ether 100ml를 가하여 15~20분간 활발히 혼합 진탕한 후 용매층(Petroleum ether층)만 취하는데 이 과정을 3회 반복 시행하였다. 이 용매층에 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 15g정도 넣어 탈수시킨 다음 50℃ 이하에서 감압 농축시켰다.

Glass column에 적당량의 Glass wool과 Florisil 10g을 넣고 감압 농축한 시료에 Petroleum ether 10ml를 넣어 잘 용해시킨 후 Column에 붓고 Petroleum ether 50ml, 6% Ether 함유 Petroleum ether 100ml, 15% Ether 함유 Petroleum ether 100ml를 차례로 부어 천천히 유향(液下)시킨 후 (5 ml/min정도), 유출액을 취하여 50℃ 이하에서 감압 농축시켰다. 여기에 0.2p.p.m. D. D. E. (0.01mg/50ml Benzene) 5ml씩 넣어 잘 흔들어서 용해시켜 이것을 검액으로 하였다.

### 3) Gas Chromatography

위의 검액을 0.5μl씩 microsyringe에 취해 G. C.에 주입하였다.

\* Gas Chromatography의 조건

명 칭 : Varian Model 3700

Detector : E. C. D.

Column : 2% OV-17(Chromosorb W 80/100 mesh) 2mm Stainless Steel

Column temperature : 190℃

Injector temperature : 240℃

Detector temperature : 240℃

Carrier gas : N<sub>2</sub>

Flow rate : 40ml/min

Attenuator : 10<sup>-11</sup> × 512

Chart Speed : 0.5 cm/min

#### 4) Thin Layer Chromatography

\* 전개용매

① CCl<sub>4</sub> : Petroleum ether → 1 : 1

② Cyclohexane : Acetone → 7 : 3

③ Benzene : Petroleum ether → 1 : 1

Thin Layer Chromatography용 glass Chamber를 3개 준비하여 위의 전개용매를 각 100ml씩 채우고 이리저리 흔들어 채워진 후 물방울을 넣었다. Thin Layer Chromatography용 Silicagel판 3개에 위의 혼합액을 Chamber내에 채워놓고 물방울을 넣었다. 전개용매가 Spot 지점으로 부터 10cm기량 올라오면 꺼내어 잘 건조시킨 후 검출 시약인 0.5% ortho-toluidine ethanol Soln을 용기로 뿌려 워진지 건조시킨 다음 U-V light를 쬐어 관찰하였다.

#### 5) 조직표본제작

가토를 희생시킨 후 혈점막 및 구개점막을 10% Formalin 용액에 고정하여 농법에 따라 조직표본을 제작하였고 상, 하 악골은 10% Formalin에 24시간 고정시키고 5% 질산으로 탈회시킨 후 농법에 따라 5~7μ의 조직절편을 제작하여 Hematoxylin Eosin으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

### Ⅲ. 연구성적

#### 가) Gas Chromatography

Chromatography상에서 Endosulfan의 Retention Time인 대략 9분, 18분 경과시에 Endosulfan이 함유되어 있음을 나타내는 Peak (Curve)가 각 조직에서 모두 나타났으므로 악골, 치아경조직, 치수, 혈액 및 간에서 Endosulfan이 검출되었다.

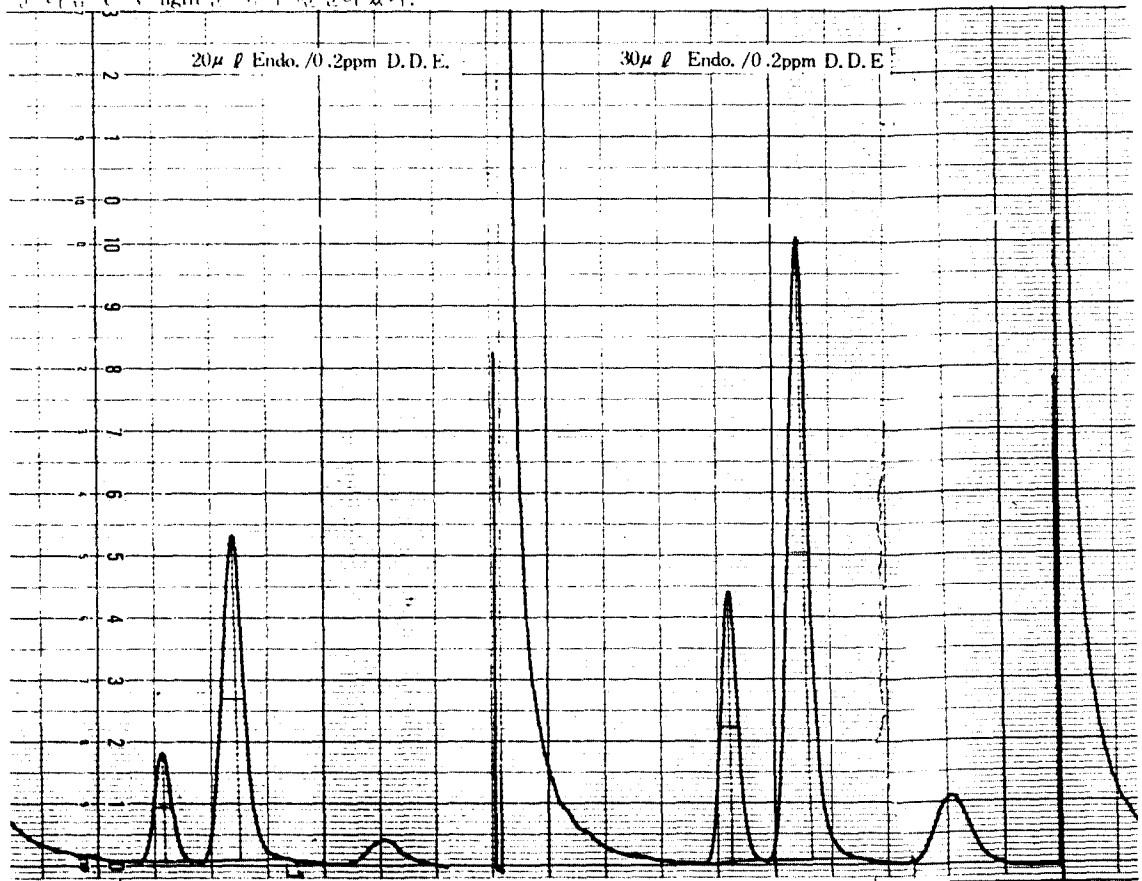


Fig. 1. Gas Chromatogram of Endosulfan

나) Thin Layer Chromatography

검출 시약인 ortho-toluidine을 뿌려 건조시킨 후 U-V light Source에 넣어 관찰해 본 결과 검액이 전개용매를 따라 올라간 곳에 Endosulfan임을 나타내는 녹색 ring이 2 개씩 나타났으므로 Endosulfan이

함유되어 있다는 것을 확인할 수 있었으며 검액의 Spotting 위치로부터 전개용매를 따라 올라간 거리를 측정하여 Retardation Value를 구하였다.

$$R_f \text{ Value} = \frac{\text{검액의 전개거리}}{\text{전개용매의 전개거리 (10cm)}}$$

Table 2. Rf Values of Endosulfan A. B. by Thin Layer Chromatography.

i) Developing Solvent (CCl<sub>4</sub> : Petroleum ether → 1 : 1)

	Jaw Bone	Tooth	Dental Pulp	Blood	Liver
Endo A.	0.67	0.62	0.70	0.69	0.72
Endo B.	0.85	0.79	0.87	0.90	0.92

ii) Developing Solvent (Cyclohexane : Acetone → 7 : 3)

	Jaw Bone	Tooth	Dental Pulp	Blood	Liver
Endo A.	0.58	0.55	0.62	0.65	0.69
Endo B.	0.79	0.68	0.85	0.88	0.89

iii) Developing Solvent (Benzene : Petroleum ether → 1 : 1)

	Jaw Bone	Tooth	Dental Pulp	Blood	Liver
Endo A.	0.59	0.53	0.68	0.69	0.67
Endo B.	0.70	0.68	0.81	0.83	0.80

Table 3. The Result of Detection of Endosulfan A. B.

	Jaw Bone	Tooth	Dental Pulp	Blood	Liver
Endo A.	+	+	+	+	+
Endo B.	+	+	+	+	+

#### 다) 병리조직학적 소견

협점막 고유층에 현저한 울혈상을 나타냈으며 구개점막의 점막하 조직에서도 다소의 울혈상을 보였다.

치수에서는 뚜렷한 혈관의 확장이 관찰되었으며 충혈 내지 출혈이 현저한 상을 나타내었다.

### IV. 총괄 및 고찰

유기염소 살충제 중 Endosulfan은 우리나라에서 널리 보급되고 있으며 살충효과가 큰 반면, 인체에 대한 독성도 매우 크기 때문에<sup>11)</sup> 이 제재에 대한 중독사고가 매년 증가하고 있다. 이 살충제는 최초에는 집파리를 비롯한 가정용 살충제로 사용되었다가 그 후 농약용 살충제로 발전된 것이다. 유기염소제는 대개 지방조직에 축적되어 만성중독을 일으키며 간 및 신의 장애를 초래하고 소화기 및 호흡기로도 흡수되지만 피부로도 흡수가 가능한 독극물이다.<sup>12, 13)</sup>

Kacew, S. R, Singhal, P. P., Hrdina, G. M? 은 D. D. T를 흡수한 쥐의 간, 신에서 gluconeogenic enzymes의 활동성을 강화시켜 hyperglycaemia가 야기되어 결국은 insulin유리불 방해하는  $\beta$ -cell membrane에서 calcium 투과성을 감소시킨다고 하였으며 Anil, K. 19) Singh N. N. 등은 인디안 벵기에 aldrin을 준 치사농도인 0.14p. p. m. 을 투여하여 탄수화물 대사에 미치는 영향을 조사하였던 바 muscle glycogenolysis와 glycogenesis가 일어남을 보고하였다.

유기염소제의 정성 분석방법으로는 Thin Layer Chromatography,<sup>14, 15, 16)</sup> Gas Chromatography,<sup>17, 18)</sup> Beilstein반응, 정색반응,<sup>19)</sup> 적외선 스펙트럼<sup>20)</sup> 이 있으며, 저자는 山村<sup>21)</sup> 및 Walker, 11) K. C. 등의 Thin Layer Chromatography에 의한 분리 검출법을 이용하여 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 이 방법에 의해 얻어진 Rf. value를 비교하여 검액중의 독극물의 정성시험을 행한 결과 혈액, 간은 물론 치아 및 악골 조직에서도 검출이 가능하였던 것이다.

Gas Chromatography에 의한 정성방법<sup>17, 18, 19)</sup> 은 Gas Chromatography의 측정조건을 어떻게 하던간에 시험결과는 표준품으로 시험했을 때와 일치하지 않으면 안되는데 즉 표준품과 Retention time (보지시간)이 일치해야만 하는 것이다. Endosulfan의 경우 두가지 이성체<sup>22)</sup>를 가지고 있으므로 Gas

Chromatography상에서도 Retention time이 두 종류로 일정하게 나와야 검출을 확인할 수 있는 것이다.

본 연구에서는 Gas Chromatography상에 9분과 18분에서 Peak가 나타나 Endosulfan A. B.의 Retention time과 일치한 것으로 보아 정성분석을 시행할 수 있었다.

Gas Chromatography에 의하여 정량분석은 10 $\mu$ g 정도의 유기염소가 함유되었을 때만 가능한 데<sup>23)</sup> 본 연구에서는 정량 분석이 불가능한 것으로 보아 각 장기에서는 그 이하의 미량이 분포되었을 것으로 사료된다.

병리 조직학적 소견에 있어서 협점막, 구개점막 치수에서 울혈 내지 출혈이 관찰된 것 이외에는 별다른 변화가 관찰되지 않았는데 일반적으로 유기염소제 중독시 별 특이한 소견은 보이지 않으며 뇌간, 신등의 퇴행성 변화등 중독시의 일반적 소견만이 나타날 뿐이다.<sup>14)</sup>

Endosulfan은 온도적, 화학적으로 안정하여 시체가 고도로 부패된 후에도 각 장기에서의 검출이 가능하고 특히 악골 및 치아 조직에서도 검출이 가능한 것으로 보아 인체에서 물리 화학적으로 저항성이 가장 큰 치아 및 악골 조직에서의 Endosulfan의 검출은 법치학적 감정 실무에 응용할 수 있는 것으로 사료된다.

### V. 결 론

실험가토에 Endosulfan을 경구 투여하여 희생시킨 후 치아경조직, 치수 및 악골 등 구강 조직에서의 검출 양상을 연구하기 위하여 이들 조직의 법 화학적 검사 및 병리 조직학적 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Thin Layer Chromatography에 의하여 악골, 치아경조직, 치수, 혈액 및 간에서 Endosulfan을 분리 검출할 수 있었다.
2. Gas Chromatography에 의해서도 악골, 치아경조직, 치수, 혈액 및 간에서 공히 Endosulfan을 분리 검출할 수 있었다.
3. 협점막 고유층, 구개 점막하 조직에서 울혈을 볼 수 있었으며 치수에서 혈관확장, 충혈이 현저한 상을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. AOAC; Methods of Analysis of AOAC., 475-490, 11th edi., 1970.
2. APHA-AWWA-WPCF; Standard Methods for the examination of water and waste water., 15th edi., 493-509, 1981.
3. Clarke, E.G.C.; Isolation and Identification of Drugs., London, Pharmaceutical Press 1968.
4. Fatteh, A.; Hand book of Forensic Pathology., J.B. Lippincott company, 310-313.
5. Fishbein, C.; Chromatographic & biological aspects of DDT and its metabolites., J. Chromatogr., 98, 177, 1974.
6. Fleisher, J.H., Wood, G.S. and Simet, L.; A visual method for estimating blood cholinesterase activity., A.M.A. Arch, Ind. Health, 14:510, 1956.
7. Kacew, S., Singhal, R.L.; Adaptive responses of hepatic carbohydrate metabolism to oral administration of DDT in rats., Biochem. Pharmacol., 22:45-47, 1973.
8. Kacew, S., Singhal, R.L., Hrdina, P.D. and Ling. G.M.; Changs in kidney cortex gluconecogenic enzymes induced by DDT., J. Pharmacol. Exp. Therap., 181:234-243, 1972.
9. Luckens, M.M.; Screening tissues and urine for pesticide, J. Forensic Sci., 11:64, 1966.
10. Srivastava, A.K., Singh, N.N.; Effect of aldrin on carbohrdrate metabolism in Indian catfish., Acta. Pharmacol., et toxicol., 49: 266-269, 1981.
11. Walker, K.C., Berosa, G.; J. Assoc. offic. Agr. Chemists., 46:250, 1963.
12. 丹羽; 科警研報告 13卷4 450 pp. - 451, 1968.
13. 三橋靖, 中村勇藏; 裁判化学および実験書, 廣川書店, 1962.
14. 日本薬学会編; 薬毒物化学 試験注解 南山堂, 1974
15. 고 인석; 법화학, 동명사, 1956.
16. 고 인석; 법화학 및 실험서, 동명사 1974.
17. 김 동욱; Gas Chromatography에 의한 Eosulfan의 생체대상기별 분존에 관한 연구.
18. 문 국진; 최신 법의학 일조각, 1982.
19. 오 수창; 독극약물 중독 사고에 관한 통계적 관찰, 국과수 연보 제10. 1971.
20. 오 수창, 이 병수; 사체 장기 중에서 Max 검출법에 관한 연구, 국과수 연보 제11호. 1972.
21. 이 성환, 홍 중옥; 개정 농약학, 향문사, 140-141 제 5판 . 1982.
22. 이 병수, 이 완수; 사체 장기 중에서의 유기인소 살충제 검출에 관하여 국과수 연보 제 7호. 1968.
23. 이 완수, 박 성우, 성 회선; TLC에 의한 유기 카바에이트계 농약의 스크린 테스트에 관한 연구 (1) 국과수 연보 제12호. 1977.
24. 임동원, 김종열; 급성 중독 가토의 치아 및 악골에서의 청산 및 비소검출에 관한 실험적연구, 대한 구강내과 학회지., vol. 8., No. 1, 83-96 1983.
25. 최규한, 이명연, 법화학, 동명사, 1970.

— ABSTRACT —

## DETECTION OF ENDOSULFAN FROM ORAL TISSUES OF ACUTE POISONED RABBITS.

Ho-Hyun Cho, D.D.S.

*Dept. of Dental Science, Graduate School, Yonsei University.*

*(Director: Prof. Chong-Youl Kim, D.D.S., M.S.D., Ph. D.)*

In spite of the radical increase of chemical poisoning cases caused by prevalent use of organic chlorine like endosulfan, the study of detection of chemical poisoning has seldom been attempted; the study of poisoning in teeth, which is more secure physiochemically, and in all the oral tissues has been even less attempted.

The author has administered endosulfan into the mouth of a rabbit, causing its death, and tried to detect endosulfan in the teeth, jaws, and oral tissues through forensic chemical and histopathological tests. The result obtained is as follows:

1. By thin layer chromatography, endosulfan was detected in the jaws, dental hard tissues, dental pulp, blood, and the liver.
2. By gas chromatography, it was also detected in the jaws, dental hard tissues, dental pulp, blood, and the liver.
3. The congestion and hemorrhage in buccal mucosa, palatal mucosa, and dental pulp was detected.

〈조호현 논문 사진부도①〉



Fig. 1. Photomicrograph shows the congestion in buccal mucosa. (x 400)

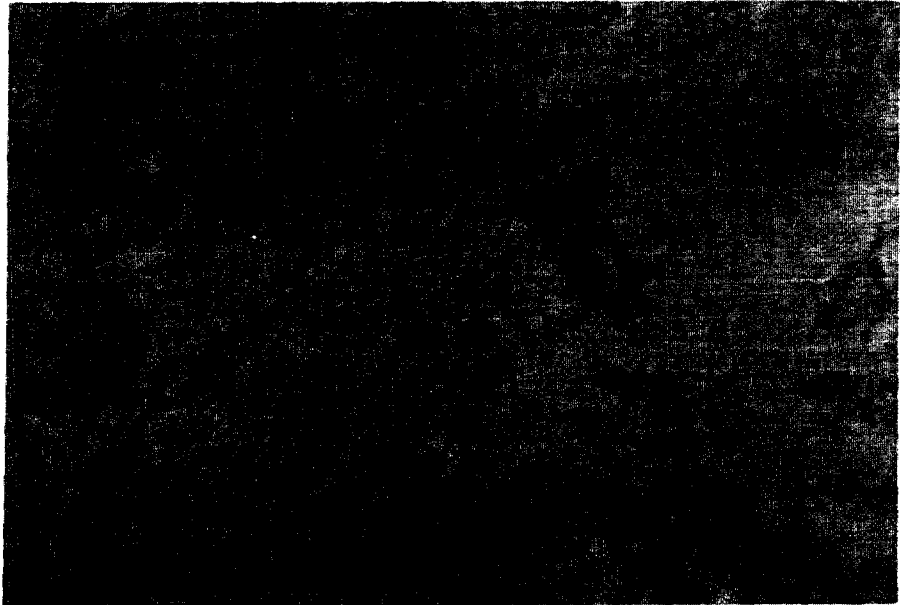


Fig. 2. Photomicrograph shows the congestion in palatal mucosa. (x 100)



3-A

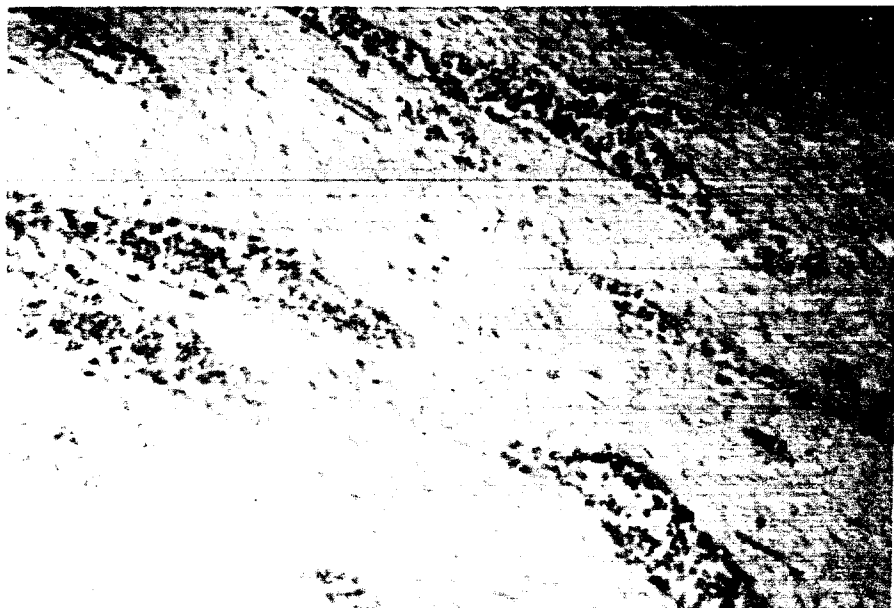


Fig. 3. Photomicrographs show markedly the congestion and vasodilatation in dental pulp.  
(3-A; x 100; 3-B; x 400)