응용 자료

임상 진단

Agilent
Trusted Answers

애질런트 헤드스페이스–GC/MS를 이용한 소변 중 o-Cresol 등의 특수건강진단 5항목 동시분석법 개발

저자

김병호, 강성훈
한국애질런트테크놀로지스㈜

개요

특수건강진단을 위해 톨루엔의 생물학적 노출지표로써 그동안 소변 중 마뇨산을 평가하여 왔으나, 노출지표로써 효용성이 낮은 것으로 보고되어 왔습니다. 이에 산업안전보건법이 개정됨에 따라 2021년 7월부터 톨루엔의 생물학적 노출평가 항목으로 소변 중 o-Cresol이 특수건강진단 항목에 포함되었습니다.

소변 중 o-Cresol 분석법은 우선 소변시료의 산가수분해 처리를 필요로 하며, 기존에 시험방법으로 염산가수분해 후 유기용매로 추출하여 GC로 분석하는 방법이 사용되어 왔으나, 전처리에 많은 인력 및 시간이 소모되고 전처리과정 중 손실이 발생될 수 있는 어려움이 있었습니다. 이에 헤드스페이스 장비 등을 이용한 자동화된 전처리방법의 필요성이 논의되었습니다. 또한 특수건강진단 항목 중 소변시료의 산가수분해 처리를 필요로 하는 항목들을 동시에 분석하는 방법으로 개발되면 특수건강검진 기관에 효용성이 높은 분석법이 될 수 있기 때문에 본 연구를 수행하게 되었습니다.

산가수분해 시약으로 $NaHSO_4$를 사용하였고, 소변 중 TCA, TCE, 2,5-Hexanedione, Phenol, o-Cresol의 5 항목 동시분석법으로 Agilent 7697 헤드스페이스–8890 GC–5977 MSD를 이용하여 자동화된 분석방법을 개발하였습니다.

검량범위는 각 항목의 기준치를 감안하여 설정되었으며, 직선성은 모두 R^2 값 0.998 이상을 나타냈습니다. 감도는 검량범위의 최저농도를 검출하기에 충분한 S/N비를 나타냈으며, 인증표준물질 및 Spike 시료를 통한 정확도 및 회수율은 모두 80~120% 범위 이내로 나타났습니다.

서론

유해 화학물질을 취급하는 근로자의 건강을 보호하고 근로자가 직업성 질환에 걸리는 것을 사전에 예방하기 위하여 특수건강진단 검사항목으로 해당 유해인자의 생물학적 노출 평가를 실시 합니다. 이를 위해 근로자의 소변이나 혈액을 채취하여 생체시료 중 노출지표를 평가 하는데, 톨루엔의 생물학적 노출지표로써 그동안 소변 중 마뇨산을 평가하여 왔습니다. 그러나 소변 중 마뇨산은 톨루엔의 생물학적 노출지표로써 효용성이 낮은 것으로 국제적으로 보고되어 왔습니다. 국내에서도 이 문제가 제기되어 톨루엔 노출지표로써 소변 중 o-Cresol로 대체 되어야 한다고 논의 되었습니다. 이에 산업안전보건법이 개정됨에 따라 2021년 7월부터 톨루엔의 생물학적 노출평가 항목으로 소변 중 o-Cresol을 특수건강진단 항목에 포함하게 되었습니다.

소변 중 o-Cresol 분석을 위해 우선 소변시료의 산가수분해 처리를 필요로 하며, 기존에 시험방법으로 염산가수분해 후 유기용매로 추출하여 GC로 분석하는 방법이 사용되어 왔으나, 전처리에 많은 인력 및 시간이 소모되고 전처리과정 중 손실이 발생될 수 있는 어려움이 있었습니다. 이에 헤드스페이스 장비 등을 이용한 자동화된 전처리방법의 필요성이 논의되었습니다. 또한 특수건강진단 항목 중 소변시료의 산가수분해 처리를 필요로 하는 항목들을 동시에 분석하는 방법으로 개발되면 특수건강검진 기관에 매우 효용성이 높은 분석법이 될 수 있기 때문에 소변 중 TCA, TCE, 2,5-Hexanedione, Phenol, o-Cresol의 5 항목에 대해 Agilent 7697 헤드스페이스–8890 GC–5977 MSD를 이용하여 자동화된 분석방법을 개발하게 되었습니다.

실험

표준액 조제방법

1) TCA, TCE, 2,5-Hexandione, Phenol, o-Cresol을 각각 20mg 취하여 10mL 용량 플라스크에 옮기고, 탈이온수로 표선을 채워 각 2,000mg/L의 표준용액을 조제합니다.

2) 10mL 용량 플라스크에 1)에서 만든 각 (2,000mg/L) 표준용액을 TCA 500µL, TCE 1,000µL, 2, 5-Hexandione 100µL, Phenol 1,000µL 넣고, o-Cresol은 따로 10배 희석하여 200mg/L로 만든 표준용액을 200µL를 넣은 후, 탈이온수로 표선을 채워 각 100, 200, 20, 200, 4mg/L 혼합표준용액을 조제합니다. 이를 표준용액 원액으로 하였습니다.

3) 2)에서 만든 표준용액 원액을 단계적으로 희석하여, 아래의 표 1과 같이 검량선용 표준용액을 조제합니다.

4) 탈이온수를 공시료로 사용합니다.

표 1. 검량 Level별 농도(단위: mg/L).

검량 Level	TCA	TCE	2,5-HD	Phenol	o-Cresol
STD 1	1.25	2.5	0.25	2.5	0.05
STD 2	2.5	5	0.5	5	0.1
STD 3	12.5	25	2.5	25	0.5
STD 4	25	50	5	50	1
STD 5	50	100	10	100	2
STD 6	100	200	20	200	4

시료 전처리 방법

1) 가수분해 시약($NaHSO_4$) 0.5g을 20mL 헤드스페이스 바이알에 넣어 놓습니다.

2) 내부표준물질(o-Cresol-D8, 1mg/L)용액 200µL를 1)에서 준비한 헤드스페이스 바이알에 넣습니다(Phenol, o-Cresol의 정량을 위해 사용됩니다).

3) MeOH 10µL를 2)에서 준비한 헤드스페이스 바이알에 넣습니다(TCA 분석을 위해 사용됩니다).

4) 검량용 표준용액 및 소변 시료는 잘 흔들어 준 후, 위에서 준비한 각 헤드스페이스 바이알에 각각 200µL를 취하여 넣고, 바로 뚜껑을 닫아 밀봉하여 기기분석 합니다.

참고:

* 분석항목에서 TCA를 제외한다면 MeOH는 넣지 않는 것이 좋습니다.

* 2)의 내부표준물질(o-Cresol-D8, 1mg/L) 용액에 MeOH를 5 v/v%가 되도록 조제하여, 혼합용액으로 200µL를 넣어 사용이 가능합니다(이 경우 혼합용액은 사용 시 조제하고, 냉장보관 하여야 합니다).

* 분석항목에서 Phenol과 o-Cresol을 제외한다면 내부표준물질은 사용하지 않습니다.
그리고 o-Cresol 분석을 위해 FID를 사용하는 경우 또는 MSD를 사용하는 경우에도 내부표준물질이 사용되지 않을 수 있지만, 이 경우 특이성이 있는 소변시료에 대해 결과의 신뢰성이 낮아집니다.
내부표준물질을 사용하지 않는 경우에는 NaCl 2w/v% 수용액 200µL를 2)와 같이 넣어 시료와 함께 액량의 합계가 400µL가 되도록 해야 합니다.

분석 기기 및 조건

Agilent 7697 헤드스페이스와 8890 GC–5977 MS 장비를 사용하였으며, GC 분석용 컬럼으로 Agilent DB-1701(30m x 0.25mm x 0.25µm)을 사용하였습니다. DB-624(30m x 0.25mm x 1.4µm)컬럼도 사용 가능하며, 분석시간을 보다 짧게 설정할 수 있지만 Phenol 및 o-Cresol 피크의 꼬리끌림 현상이 다소 발생될 수 있습니다. 설정한 분석조건은 아래의 표 2, 3, 4, 5와 같습니다.

표 2. Agilent 7697 헤드스페이스 분석조건.

파라미터	값
기기	Agilent 7697 헤드스페이스
오븐온도	100°C
평형유지시간	60분
Loop 온도	195°C
Transfer line 온도	200°C
Shaking Level	7
주입시간	0.5분
Cycle 시간	15분

표 3. Agilent 8890 GC 분석조건.

파라미터	값
기기	Agilent 8890 가스 크로마토그래피
주입구	230°C, Split 50:1
컬럼	DB-1701(30m X 0.25mm X 0.25µm)
컬럼 유량	1.5mL/분(일정한 유량, He)
오븐	60°C (1분간 유지) 20°C/분으로 180°C까지, Post run: 260°C에서 3분간 유지
Transfer line 온도	260 °C

표 4. Agilent MSD 분석조건.

파라미터	값
기기	Agilent 5977 MSD
이온 소스	Electron Impact (EI)
전자 에너지	70eV
소스 온도	230°C
사중극자 온도	150°C
검출기 설정	Gain (factor: 1)
모드	SIM

표 5. SIM 조건.

번호	화합물	RT(분)	TS	(분)	Dwell	정량이온	정성이온	
1	TCA_ME	3.879	1	3.00	100	117	119	141
2	TCE	4.424	2	4.15	100	77	113	49
3	2,5-HD	4.621	3	4.55	100	43	99	114
4	Phenol	5.500	4	5.00	100	66	94	65
5	o-Cresol-d8	5.849	5	5.70	60	113	111	
6	o-Cresol	5.869			60	108	107	79

결과

크로마토그램

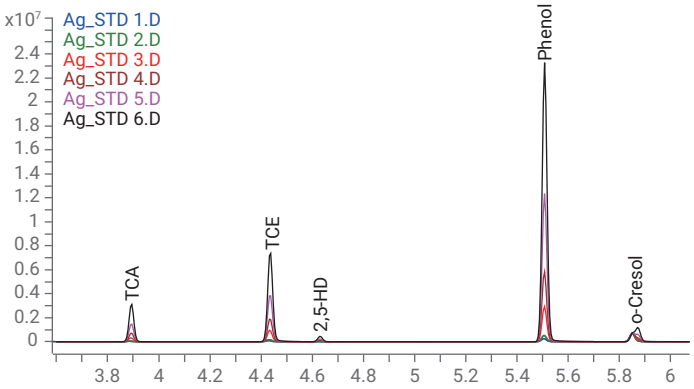


그림 1. 특수건강진단 5항목 동시분석의 SIM(TIC) 크로마토그램.

5성분의 동시분석 SIM 모드 TIC 크로마토그램은 그림 1과 같습니다. 참고로 o-Cresol의 앞부분은 내부표준물질(o-Cresol-d8) 피크로 o-Cresol과 EIC 크로마토그램에서는 피크 모양에 이상 없이 분리되어 검출됩니다.

검량범위 및 직선성

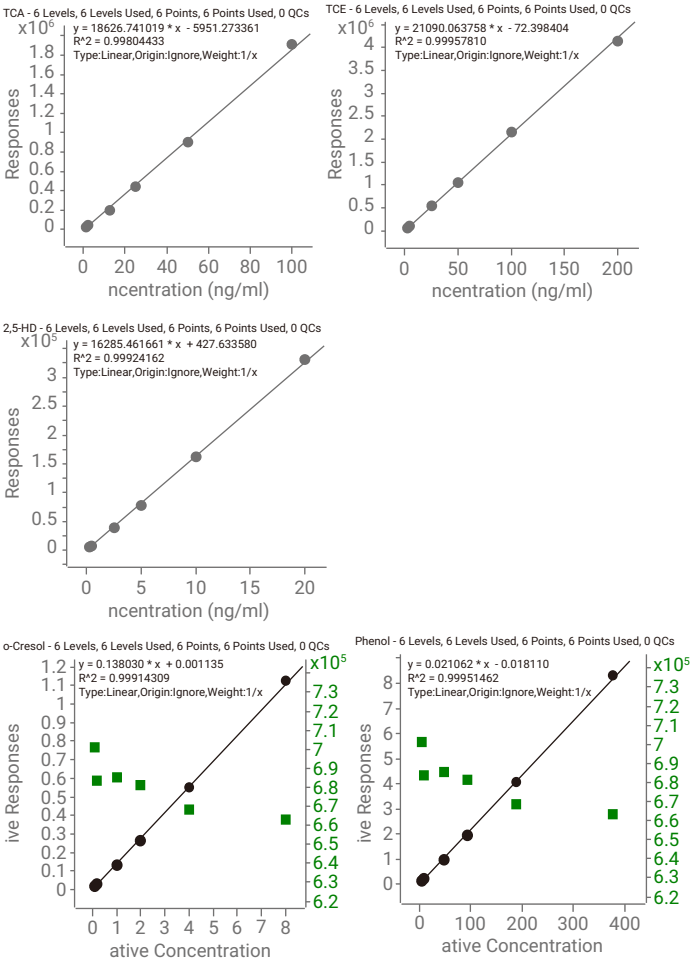


그림 2. 검량선.

위의 그림 2와 같이 5항목은 동시분석을 진행하여 TCA, TCE, 2,5-HD는 ESTD법으로 정량하고, Phenol, o-Cresol은 ISTD법으로 정량합니다.

각 항목의 기준치가 검량선 Level 4 농도 부분에 해당 하도록 검량범위를 설정 하였으며, 표 6과 같이 5항목 모두 R^2 값 0.998 이상으로 좋은 직선성을 나타냈습니다.

표 6. 검량선 범위 및 직선성.

화합물	검량범위(mg/L)	값
TCA	1.25 ~100	0.99804433
TCE	2.5 ~ 200	0.99957810
2,5-HD	0.25 ~20	0.99924162
Phenol	2.5 ~ 200	0.99951462
o-Cresol	0.05 ~ 4	0.99914309

감도

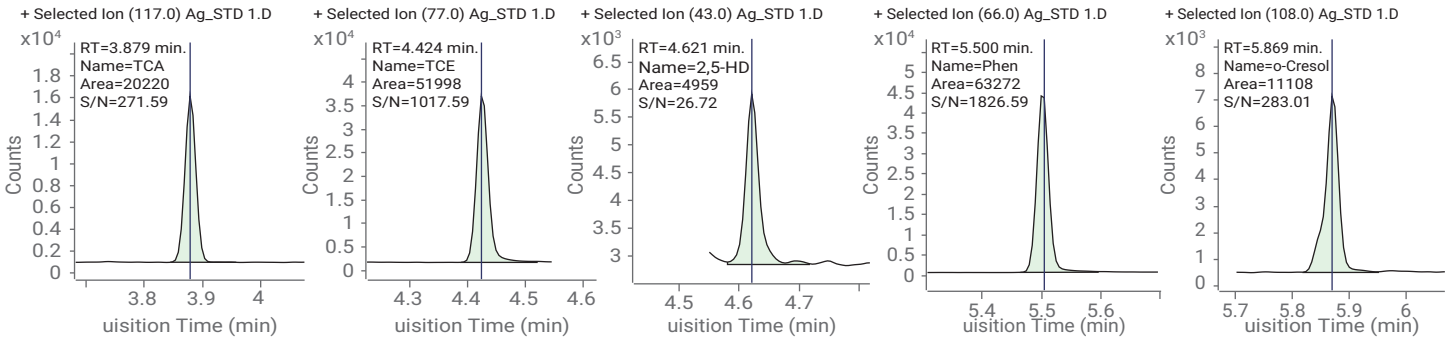


그림 3. 검량범위 최저농도의 정량이온 피크.

표 7. 검량범위 최저농도 정량이온 피크의 S/N비.

화합물	TCA	TCE	2,5-HD	Phenol	o-Cresol
STD Level 1 농도(mg/L)	1.25	2.5	0.25	2.5	0.05
STD Level 1 S/N비	271	1017	26	1826	283

위의 그림 3 및 표 7과 같이 감도는 검량범위의 최저농도를 검출하기에 충분한 S/N비를 나타냈으며, 따라서 기준치를 검사하기에 충분합니다. 또한 주입시간 및 분할비 등의 분석조건에 따라 더 좋은 감도로 더 낮은 농도범위의 분석도 충분히 가능합니다.

정확도 및 회수율

인증표준물질로 ClinCheck(Urine control, lyophilized, for phenolic compounds)를 사용하였으며, Matrix spike 테스트는 Blank Urine에 조제한 표준용액을 9:1 v/v 비율로 해당 농도가 되도록 첨가하여 분석 하였습니다.

표 8. 특수건강진단 5항목 동시분석법에 따른 정확도 및 회수율 측정결과.

시료	결과 농도(mg/L)					참값(mg/L)	범위(mg/L)		화합물	정확도 및 회수율(%)
	TCA	TCE	2,5-HD	Phenol	o-Cresol					
ClinCheck_Level 1				5.85		**5.77**	4.04	7.50	Phenol	101
					0.19	0.23	0.16	0.30	o-Cresol	81
ClinCheck_Level 2				41.68		43.70	32.80	54.60	Phenol	95
					2.30	2.50	1.87	3.12	o-Cresol	92
Matrix Spike	28.24					25.00	Spike sample (Blank urine)		TCA	113
		48.95				50.00			TCE	98
			4.33			5.00			2,5-HD	87
				53.74		50.00			Phenol	107
					0.95	1.00			o-Cresol	95

위의 표 8과 같이 특수건강진단 5 항목 동시분석법으로 인증표준물질 및 Matrix spike 테스트를 수행한 결과 정확도 및 회수율은 모두 80~120% 범위 이내로 확인되었습니다.

이번 테스트 결과 외에도 많은 RRT 및 정도관리 시료 등으로 5항목 동시분석법에 대한 정확성 및 재현성 테스트가 수행되었으며, 모두 양호한 결과 값을 얻었습니다.

결론 및 고찰

산업안전보건법이 개정됨에 따라 2021년 7월부터 톨루엔의 생물학적 노출평가 항목으로 소변 중 o-Cresol을 특수건강진단 항목에 포함하게 되었습니다. 이에 특수건강진단 항목 중 o-Cresol을 포함하여 소변시료의 산가수분해 처리를 필요로 하는 TCA, TCE, 2,5-HD, Phenol 5항목에 대해 Agilent 7697 헤드스페이스–8890 GC–5977 MSD로 자동화된 전처리 및 동시분석방법을 개발하였습니다.

검량범위는 각 항목의 기준치를 감안하여 설정되었으며, 직선성은 모두 R^2값 0.998 이상을 나타냈습니다. 감도는 검량범위의 최저농도를 검출하기에 충분한 SN비를 나타냈으며, 인증표준물질 및 Matrix spike 테스트를 통한 정확도 및 회수율은 모두 80~120% 범위 이내로 나타났습니다.

참고 문헌

1. 이희상, 표재성, 박유진, 조지영, 인상환, 최화경, 최상길. Head-space GC/FID에 의한 톨루엔 흡입자 소변에서의 가수분해 시간에 따른 톨루엔 및 o-크레졸 분석. 한국법과학회. 2013년 12월 발행.
2. Ane K. S. Frohlich, Viviane C. Sebben, Alexandre B. F. Ferraz. New Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Method for Ortho-Cresol Detection in Urine. Journal of Biosensors. June 27 2017.
3. 황정호, 김주자, 이경재, 노재훈, 이종원, 김치년, 이혜진. 톨루엔 노출 근로자의 생물학적 노출지표로서의 요중 마뇨산, 톨루엔 및 오르토-크레졸 비교. 한국산업위생학회. 2002년 8월 발행.
4. 임성국, 강재호, 임득순, 김창현, 최호춘. 톨루엔에 노출된 근로자의 생물학적 노출평가. 대한산업보건협회 산업보건환경연구원.
5. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 -크실렌 등 유기용제 26종, 한국산업안전보건연구원, 2010년 10월 31일 발행.
6. 이미영, 최윤정. 생물학적 노출 평가를 위한 소변 시료의 보정 지표 개선. 한국산업안전보건연구원, 2014년 11월 30일 발행.
7. 산업안전보건법 (법률 제 17187호), http://www.law.go.kr/lsInfoP.do?lsiSeq=216365&efYd=20200331#0000.
8. 한국산업안전보건공단 안전보건기술지침(GUIDE) 중 건강진단 및 관리지침(H), http://www.kosha.or.kr/kosha/data/guidanceH.do.

www.agilent.com/chem

RA44631.3630208333

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2022

2022년 3월 1일, 한국에서 발행
5994-4603KOKR

한국애질런트테크놀로지스㈜
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

Agilent
Trusted Answers