

기체크로마토그래프 질량분석기-헤드스페이스시스템을 이용한 혈액 중 톨루엔 분석방법



대한산업보건협회 / 강재호·최호춘

서론

톨루엔(toluene : methylbenzene : CAS No. : 108-88-3)은 무색의 가연성 액체이며 벤젠과 유사한 방향(芳香)이 있다. 분자량은 92.13 g/mol, 끓는점은 110.6 °C로 연소성이 있고 그 증기는 폭발성이 있다(Budavari 등, 1996).

주로 페인트, 오일, 고무, 합성수지 등의 용제로 이용되어 염료 및 약품, 페놀, TDI, TNT, 사카린 같은 화합물 제조에 사용되고 있으며, 페인트 도색이나 제거작업, 그라비아 인쇄, 접착제 사용, 금속부품의 세정 등에 사용되고 있다(이학성 등, 2004).

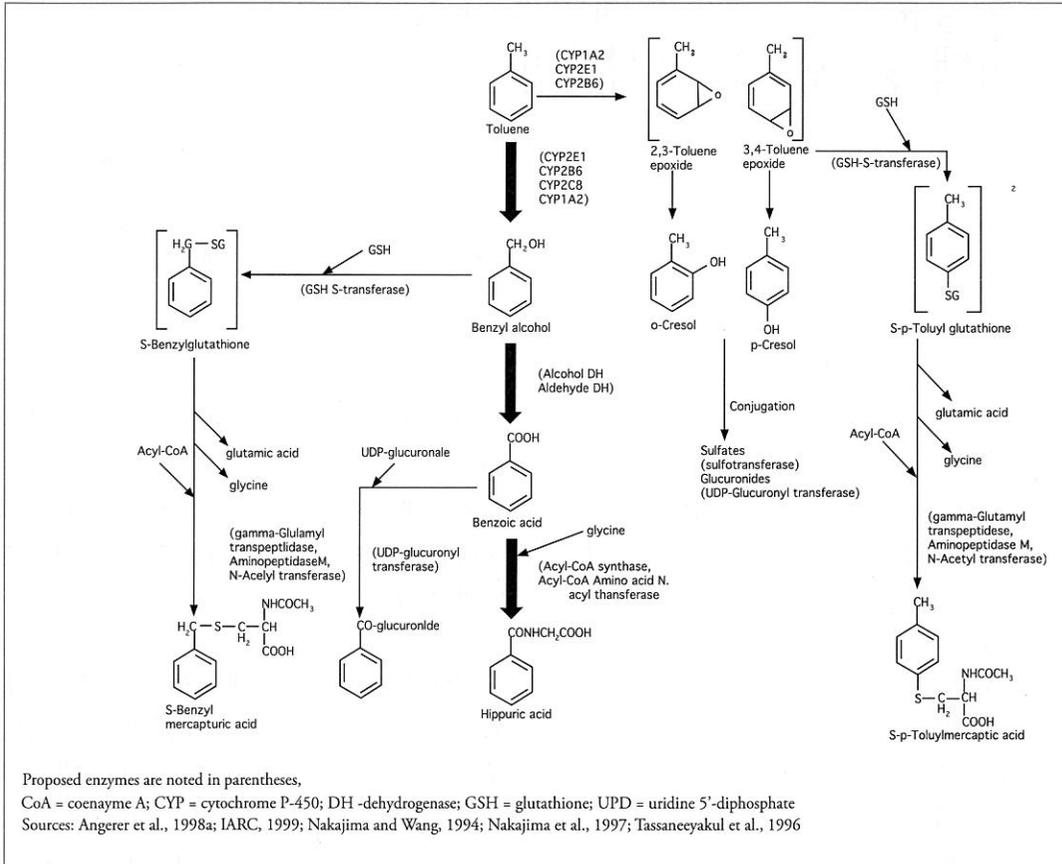
톨루엔은 벤젠에 비해 독성이 적어 대체 물질로 널리 사용되고 있으나 사용량이 증가함에 따라 작업장에서 이를 취급하고 있는 근로자들의 직업적 노출기회가 매우 많다(양정선 등, 1993).

톨루엔의 흡수경로는 주로 호흡기를 통해 이루어지며, 피부로도 흡수가 되는데 증기

상태의 톨루엔이 피부를 통하여 흡수되는 양은 미미하며(Cohr 등, 1979), 그로인한 건강장해는 눈, 호흡기, 피부 등의 자극과 중추신경계(CNS) 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다.

체내에 흡수된 톨루엔의 약 15~20%는 대사 과정을 거치지 않고 호기를 통해 체외로 배출되며 80%는 <그림 1>과 같이 간장에 흡수되어 산화작용에 의해 benzyl alcohol로 되고 alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase system에 의해 산화 대사를 거쳐 안식향산(benzoic acid)이 된 후 80%는 마뇨산(hippuric acid)으로, 나머지 20%는 benzoyl glucuronide 포합체, o-cresol, m-cresol, p-cresol sulfate의 형태로 요중에 배설된다(Cohr 등, 1987).

또한 호흡기를 통해 흡수된 톨루엔은 기관 말단의 가스교환부위인 폐포(alveoli)에



〈그림 1〉 톨루엔의 대사 경로(ATSDR, 2000)

서 모세혈관으로 흡수되어 혈관을 통해 온몸으로 퍼지며(Carlsson, 1982), 신장의 사구체(glomerulus)에서 혈액과 소변의 삼투압차에 의한 확산을 통해 대사되지 않고(unchanged toluene) 일정부분 소변으로 배출된다(Imbiani 등, 1983).

따라서 국내·외에서 톨루엔의 생물학적 모니터링의 지표로서 소변중 마뇨산, 소변

중 o-크레졸, 혈중 톨루엔, 소변중 톨루엔을 사용하고 있다.

우리나라의 현재 요중 마뇨산의 생물학적 노출기준은 2.5 g/g creatinine으로, 2008년 톨루엔의 작업환경 노출기준이 100 ppm에서 50 ppm으로 개정되었음에도 불구하고 현재까지 기존 고농도 노출에 해당하는

수준을 유지하고 있으며 권장항목으로 소변 중 o-크레졸(0.8mg/l)과 혈액중 톨루엔(1mg/dL)을 정하고 있다.

ACGIH에서는 2009년도에 음식물 섭취나 환경적 요인 등 다양한 변수에 의해 일반인에게도 요중으로 마노산이 배출되는 이유로 요중 마노산을 톨루엔의 생물학적 노출지표물질에서 삭제하였고 혈액중 톨루엔 0.02 mg/l (작업 전 측정; Prior to last shift of work-week), 요중 톨루엔 0.03 mg/l (작업 후), o-크레졸 0.3mg/g · creatinine(작업 후)을 정하고 있다.

혈액중 톨루엔은 혈액을 채취하는데 어려움이 있으나 작업장 내에서 발생하는 공기중 톨루엔과 상관성이 가장 높아 폭로량을 정확히 예측할 수 있는 방법으로 알려져 있다(Foo, 1988).

이에 본 연구의 목적은 근로자의 노출기준 강화로 인해 생물학적 모니터링 기준이 낮아지는 상황에서 저농도에서 특이성을 보이는 혈중 톨루엔을 가스크로마토 질량분석기-헤드스페이스(GC/MS-HS)를 이용해 분석하고 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀도를 평가하고자 하였다.

분석방법

1. 시료의 관리

채취된 혈액 시료는 응고방지를 위하여

헤파린, EDTA와 같은 항응고제(anticoagulant) 처리가 된 진공 튜브에 담아 냉장 보관된 상태로 실험실로 운반하여 냉장 보관한 후 가급적 3일 이내에 분석을 실시한다.

채취 후 4 °C에서 냉장 보관할 경우 2~3주간 시료의 손실이 없으며, 반면에 실온에서 보관 할 경우, 일주일 후 25% 이상 손실된다고 알려져 있다(Saker 등, 1991).

2. 분석 원리(헤드스페이스)

헤드스페이스는 액체 혹은 고체 시료 중에 함유되어 있는 휘발성유기화합물을 가스크로마토그래피로 분석할 수 있도록 하는 전처리 시스템이다.

휘발성 혹은 중간 휘발성유기화합물이 함유된 시료를 밀폐된 바이알에 넣고 가열하면 시료 중의 휘발성 물질은 기체상으로 휘발되고 다시 용해 되는 성질을 가지며 이 두 성질이 평형을 이루는 시점을 이용한다.

바이알 내의 기체상을 헤드스페이스라고 하며 이 기체상을 가스크로마토그래피에 주입하여 분석하는 자동화된 시스템이고 시료의 농축 및 희석이 가능하며 쉽게 자동화가 가능하다.

산업보건 분야에서는 혈액이나 뇨 등 매질이 복잡한 생체시료 중의 휘발성유기화합물을 기화시켜 저농도의 시료를 분석할 때 많이 사용하고 있다.

〈표 1〉 혈중 톨루엔 GC/MS-HS 분석 조건

헤드스페이스(HS)	
Sample Temp.	65 °C
Transfer Line Temp.	110 °C
Valve Oven Temp.	100 °C
Sample equil Time	20 min
Inject Volume	1 mL
기체크로마토그래프(GC)	
Column	J&W DB-1MS (60 mm×0.25 mm×250 um)
Oven Temperature	60 °C → 220 °C
Flow Rate	1 mL/min
Split ratio	20:1
질량분석기(MS)	
Interface Temp.	280 °C
Ion source Temp.	230 °C
Quadropole Temp.	150 °C
Acquisition mode	SIM(Selective Ion Monitoring)

3. 분석 조건

본 실험은 Head-space(TEKMAR HT3, Teledyne)가 부착된 가스크로마토그래피 질량분석기(Gas Chromatography Mass Spectrometer, GC/MS, 5975C, Agilent)로 분석하였고, 분석조건은 〈표 1〉에 나타내었다.

4. 시약 제조

1) Acidium citricum dextrose solution(ACD)
citric acid 4.8 g, sodium citrate 13.2 g, dextrose 14.7g을 정확히 칭량하여 1 l 용량플라스크에 넣고 증류수로 표선을 맞춘다.

2) 표준용액

일정량의 톨루엔을 증류수에 단계적으로 희석하는 방식으로 0.0087, 0.0173, 0.0433, 0.0866 mg/l 수준의 표준용액을 제조하였다. 또한 본 실험에서는 내부표준물질로서 fluorobenzene(0.1 mg/l)을 사용하였다.

5. 시료의 전처리

22 ml 헤드스페이스 바이알에 ACD 용액 0.5 ml를 넣고 혈액 1 ml, 내부표준물질 100 µl를 넣은 후 밀봉하여 3분간 잘 섞어 주었다.

6. 저농도(비노출군) 시료의 분석

혈액중 미량의 톨루엔 검출을 평가하기 위하여 톨루엔에 노출되지 않았을 것이라 예상되는 사무직 근로자 7명을 대상으로 혈액을 채취하여 동일한 방법으로 전처리 한 후 분석하였다.

7. 검출한계(Limit of Detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)

농도와 면적간의 회귀방정식을 표준오차 값과 기울기 값을 이용하여 검출한계 $LOD = \frac{3 \times SE}{b}$ (SE: standard error, b: 검량곡선식에서 기울기 값)을 이용하여 산출하였으며, 정량한계 $LOQ = 3.3 \times LOD$ 를 이용하여 산출하였다(AIHA, 1988).

8. 정확도(Accuracy) 및 정밀도(Precision) 평가

정확도 및 정밀도 평가를 위하여 바탕값을 측정된 혈액시료에 표준물질을 일정농도로 첨가하여 0.0433, 0.8866, 1.4433 mg/l 수준으로 제조한 후 전처리하고 분석하여 회수율을 평가하였다.

또한 각 시료의 동일한 농도 5개를 분석하여 변이계수를 통해 정밀도를 검증하였다.

결과 및 고찰

본 실험은 혈액중의 톨루엔을 헤드스페이스 기체크로마토그래피 질량분석기(HS-GC/MS)를 이용하여 분석하는 방법으로 미국 국립안전보건연구원(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)의 8002 method를 참고하여 분석하였다.

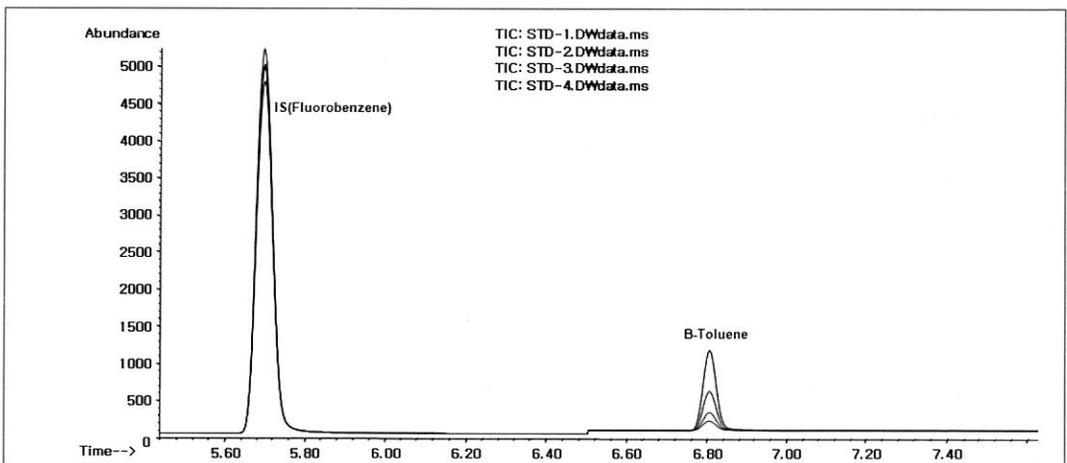
검출기로 질량분석기를 사용하였으며 분석물질의 감도를 높이고 다른 유기화합물의 간섭을 배제하기 위하여 SIM(Selective Ion Monitoring) mode로 분석하였다.

1. 톨루엔의 크로마토그램 및 표준 검량곡선 톨루엔 및 내부표준물질의 크로마토그램은 <그림 2>와 같다.

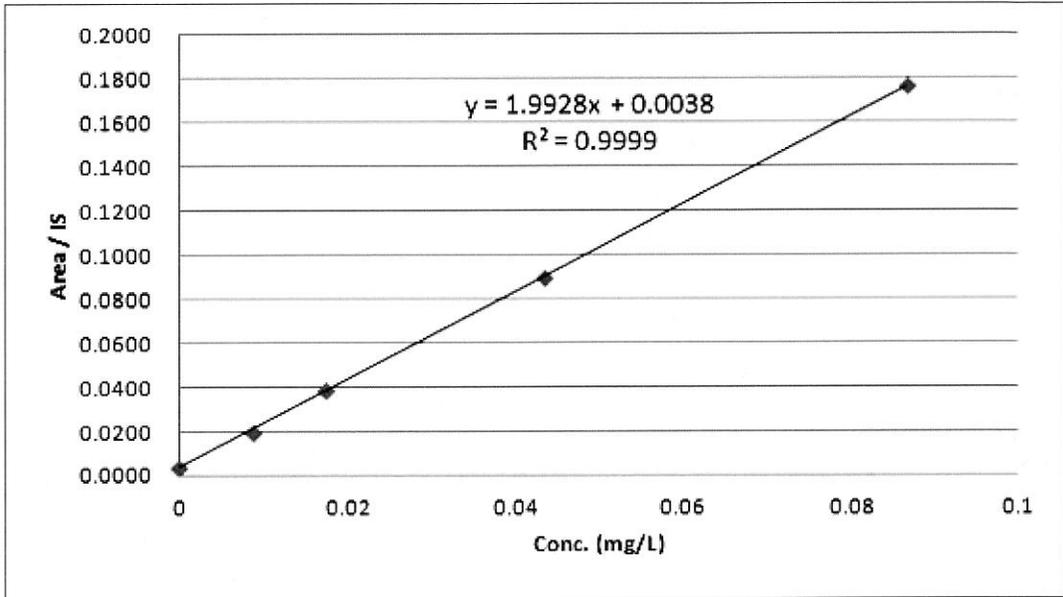
표준검량곡선은 톨루엔의 Target ion인 92 m/z값을 내부표준물질로 나누어 작성하였으며 <그림 3>과 같이 농도범위 0.0087 ~1.732 mg/l 범위에서 상관계수 0.9999로 양호한 상관성을 나타내었다.

2. 저농도 시료 분석

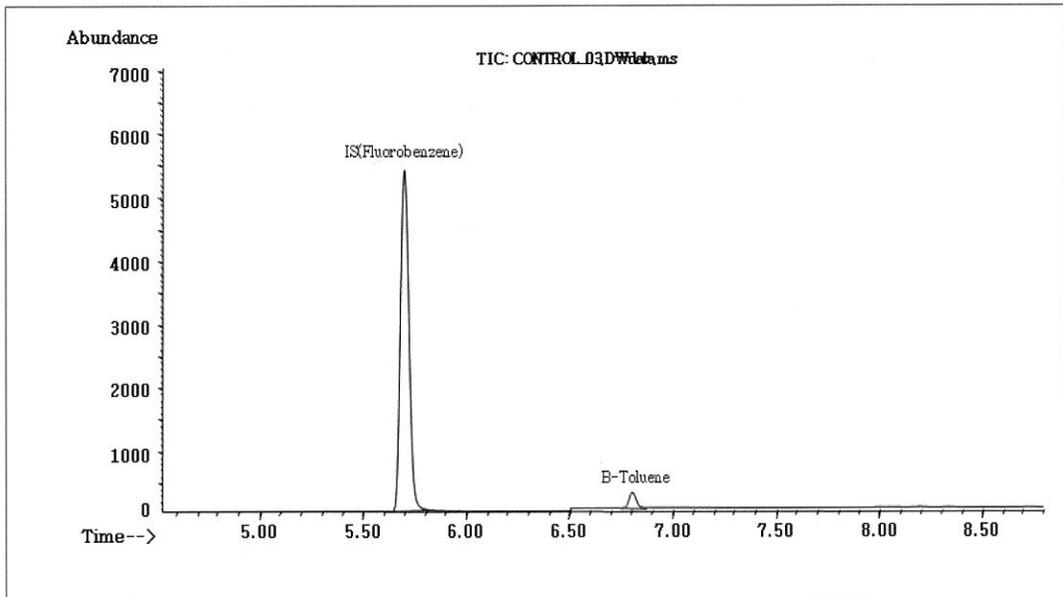
톨루엔은 내부에서 생성되는 대사체(endogenous metabolism) 또는 식이요소로



<그림 2> 톨루엔 표준물질의 크로마토그램



〈그림3〉 톨루엔의 검량곡선 및 회귀방정식



〈그림 4〉 비노출군 시료의 크로마토그램

서 발생되지 않으나 실내공간의 가구나 내장재에서 미량의 톨루엔이 발생하므로 흡입을 통해 비노출군의 혈액에서도 저농도의 톨루엔이 검출될 수 있다.

시료의 크로마토그램은 <그림 4>와 같으며, 사무직 근로자(비노출군) 혈액에 대한 분석 결과는 <표 2>와 같이 7개 시료에서 0.0030 ~ 0.0068 mg/l로 나타났다.

이는 톨루엔에 노출되지 않은 집단의 흡연자 그룹 0.002 mg/l, 비흡연자 그룹 0.001 mg/l로 보고한 Hajimiragha 등(1989)의 연구보다 다소 높은 값을 보였으나 ACGIH의 기준 농도인 0.02 mg/l 의 1/5 수준, 우리나라 기준 농도인 1.0 mg/dl의 1/2500수준에서도 정밀한 분석이 가능하다고 생각된다.

톨루엔 분석에 있어 다른 화학 물질이 농도에 영향을 줄 수 있다. 에탄올은 혈액중 톨루엔 농도를 높이는 반면에 소변중 톨루엔의

농도는 감소시킨다(Waldron 등, 1983).

이는 혈액중 톨루엔 분석에 있어 과대평가할 수 있는 가능성을 의미하며 노출 평가 시 톨루엔과 에탄올을 함께 사용하거나 음주 여부에 따라 농도가 달라질 수 있으므로 주의해야 한다.

3. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계 및 정량한계는 검량선 자료인 회귀방정식 $y = 1.9928 + 0.0038x$ 에서 산출하였으며, 검출한계는 0.001 mg/l 이고, 정량한계는 0.003 mg/l로 나타났다.

4. 정확도 및 정밀도 평가

정확도 및 정밀도 실험에 대한 결과는 <표 3>과 같으며 저농도 부터 고농도 까지의 범위에서 평가하기 위하여 시료 범위를 포괄할 수 있는 표준용액을 추가로 분석하여 검량곡선을 작성하였다.

각각 0.043, 0.887, 1.443 mg/l 의 회수율 실험을 통한 정확도 평가는 92.8 ~ 102.6 %

<표 2> 비노출군의 혈중 톨루엔 농도

시료명	IS	Area	농도(mg/l)
1	120939	1490	0.0043
2	133900	1293	0.0030
3	113383	1290	0.0038
4	131005	1457	0.0037
5	190788	3303	0.0068
6	124577	1360	0.0036
7	121999	1493	0.0043
평균			0.0042

〈표 3〉 혈중 톨루엔의 정확도 및 정밀도

구분 n.	시료 1(0.043 mg/l)	시료 2(0.887 mg/l)	시료 3(1.443 mg/l)
1	0.041	0.836	1.527
2	0.040	0.866	1.530
3	0.039	0.851	1.536
4	0.040	0.834	1.481
5	0.040	0.851	1.328
평균	0.040 (92.8%)	0.848 (95.6%)	1.480 (102.6%)
표준편차	0.0007	0.0130	0.0880
변이계수(%)	1.8	1.5	5.9

로 양호한 정확도를 보였다. 또한 동일 시료 5회 분석에 대한 정밀도 평가는 1.8 ~ 5.9 %의 변이계수를 나타내었다.

결론

기체크로마토그래프 질량분석기-헤드스페이스시스템을 이용한 혈액중 톨루엔 분석의 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도 및 저농도 시료의 분석 결과는 아래와 같다.

1. 헤드스페이스시스템을 이용하여 혈액 중 톨루엔 분석을 실시한 결과 검출한계는 0.001 mg/l, 정량한계는 0.003 mg/l 이었다.

2. 회수율을 통한 정확도 실험에서는

0.043, 0.887, 1.443 mg/l의 농도 범위에서 92.8 ~ 102.6%로 양호한 정확도를 보였고, 변이계수를 통한 정밀도 실험은 동일 시료 5회 분석에 대해 변이계수가 1.8 ~ 5.9%로 정밀한 결과를 나타내었다.

3. 저농도 분석 평가를 위한 비노출군의 혈액 중 톨루엔 분석결과는 7개 시료에서 평균 0.0042(0.0030 ~ 0.0068) mg/l로 나타났으며 7개 모두 정량한계 이상의 값이었다.

국내·외 기준과 비교해 봤을 때 ACGIH의 기준 농도인 0.02 mg/l의 1/5 수준, 우리나라 기준 농도인 1.0 mg/dl의 1/2500수준에서도 정밀한 분석이 가능하였다. ☺

 참고문헌

1. 양정선, 강성규, 김기웅, 이종성, 조영숙, 정호근, 톨루엔 폭로 근로자의 혈중 톨루엔 및 요중 마노산 농도, 한국산업위생학회지, 1993;3(2):188-193.
2. 이학성, 문광용, 안갑환, 서정호, 톨루엔 폭로 근로자의 요중 마노산 농도 및 건강장해, 한국환경과학회지, 2004;13(10):939-946.
3. ACGIH 2010 ACGIH : Toluene. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices 7th Edition, ACGIH, Cincinnati, OH(2011).
4. Ashley DL, Bonin MA, Cardinali FL, Determining volatile organic compounds in human blood from a large sample population by using purge and trap gas chromatography/mass spectrometry, Anal Chem 1992;64:1021-1029.
5. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Hekelman PE, Kimneary JF. The Merck index. 12th ed, whitehouse station NJ, 1996.
6. Carlsson A, Exposure to toluene. Uptake, distribution and elimination in man. Scand J Work Environ & Health. 1982;8:43-55.
7. Cohr KJ, Stockolm J, Toxicological review. Scand J Work Environ & Health. 1979;5:71-90.
8. Foo C.S, Toluene in blood after exposure to toluene, Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1988;49:255.
9. Hajimiragha H, Ewers U, Brockhaus A, Level of benzene and other volatile aromatic compounds in thre blood of non-smoker and smoker. Int Arch Occup Environ Hlth. 1989;61:513-518.
10. Imbriani M, Ghittori S, Pezzagno G, Capodaglio E, Toluene and styrene in urine as biological indices, Appl Ind Hyg. 1986;1:172-176.
11. NIOSH [1996]. MEK, Toluene and Ethanol in blood: Method 8002. In: William P. Tolos, NIOSH/DBBS. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), issue 2.
12. Saker EG, Eskew AE, Panter JW, Stability of toluene in blood:its forensic relevance, J Anal Toxicol. 1991;15:246-249.
13. Waldron HA, Cherry N, Johnston JD, The effect of ethanol on blood toluene concentrations. Int Arch Occup Environ Hlth. 1983;51:365-369.