

KOSHA GUIDE

H - 168 - 2021

크실렌의 생물학적 노출지표 물질 분석에 관한 기술지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 제정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 이미영
- 제정 경과
 - 2015년 9월 산업의학분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2021년 8월 산업의학분야 표준제정위원회 심의(법령 및 규격 최신화)
- 관련규격 및 자료
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침: 제1권 특수건강진단 개요. 2020-산업안전보건연구원-349
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 I : 크실렌 등 유기용제 16종. 보건분야-연구자료 연구원 2010-64-880. 2010
- 관련법규·규칙·고시 등
 - 산업안전보건법 시행규칙 [별표 24] 특수건강진단·배치전건강진단·수시건강진단의 검사항목(제206조 관련)
 - 고용노동부고시 제2020-61호(특수건강진단기관의 정도관리에 관한 고시)
 - 고용노동부고시 제2020-60호(근로자 건강진단 실시기준)
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 「근로자건강진단 실무지침」 제1권 특수건강진단 개요. 2020-산업안전보건연구원-349
- 기술지침의 적용 및 문의
 - 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지(www.kosha.or.kr)의 안전보건기술지침 소관분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
 - 동 지침 내에서 인용된 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2021년 10월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

크실렌의 생물학적 노출지표 물질 분석에 관한 기술지침

1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법(이하 “법”이라고 한다) 제130조(특수건강진단) 및 같은 법 시행규칙(이하 “시행규칙”이라고 한다) 제206조(특수건강진단 등의 검사항목 및 실시방법 등) 별표 24, 고용노동부고시 제2020-61호(특수건강진단기관의 정도관리에 관한 고시) 및 고용노동부고시 제2020-60호(근로자 건강진단 실시기준)에 따라 크실렌에 노출된 근로자의 생물학적 노출평가와 관련된 생물학적 노출지표 물질의 분석 방법을 제시함을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 법, 시행규칙 및 고용노동부고시에 따라 실시하는 근로자 건강진단 중 크실렌에 노출되는 근로자의 생물학적 노출평가에 적용한다.

3. 정 의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

- (가) “생물학적 노출평가”란 혈액, 소변 등 생체시료로부터 유해물질 자체 또는 유해물질의 대사산물이나 생화학적 변화산물 등을 분석하여 유해물질 노출에 의한 체내 흡수정도나 건강영향 가능성 등을 평가하는 것을 말한다.
- (나) “생물학적 노출지표 물질”이란 생물학적 노출평가를 실시함에 있어 체내 흡수정도를 반영하는 물질로서 유해물질 자체나 그 대사산물, 생화학적 변화물 등을 말한다.
- (다) “정밀도(Precision)”란 일정한 물질에 대하여 반복측정·분석을 했을 때 나타나는 자료분석치의 변동크기가 얼마나 되는가를 나타낸다. 이 경우 같은 조건에서 측정했을 때 일어나는 우연오차(Random error)에 의한 분산

(Dispersion)의 정도를 측정값의 변이계수(Coefficient of variation)로 표시한다.

(라) “정확도(Accuracy)”란 분석치가 참값에 얼마나 접근하였는지를 수치로 표현한 것이다. 다만, 인증표준물질이 있는 경우는 상대오차로 표시하고, 인증표준물질이 없는 경우는 시료에 첨가한 값으로부터 구한 평균회수율로 표시한다.

(마) “검출한계(Limit of detection: LOD)”란 공시료 신호값(Blank signal, background signal)과 통계적으로 유의하게 다른 신호값(Signal)을 나타낼 수 있는 최소의 농도를 말한다. 이 경우 가장 널리 사용하는 공시료 신호값과의 차이가 공시료 신호값 표준편차의 3배인 경우로 한다.

(2) 그밖에 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 「산업안전보건기준에 관한 규칙」에서 정하는 바에 따른다.

4. 분석장비

분석장비는 가스크로마토그래프-불꽃이온화검출기(Gas chromatograph-flame ionization detector, GC-FID) 또는 고성능 액체크로마토그래프-자외선검출기(High performance liquid chromatograph-ultraviolet detector, HPLC-UVD)를 사용한다.

5. 분석방법

5.1 분석 원리 및 시료채취

(1) 분석 원리

크실렌은 호흡기와 피부 경로로 흡수되며 작업장에서는 주로 호흡기를 통해 흡수된다. 크실렌은 o(오쏘)-, m(메타)-, p(파라)-크실렌의 세 가지 이성질체가 혼합되어 있으며, 흡수된 크실렌 양의 95% 정도가 o-, m-, p-메틸마노산으로 대사되어 소변으로 배설된다. 소변 중 o-, m-, p-메틸마노산을 유기용제로 추출한 뒤 휘발성 유

도체를 만들어 가스크로마토그래프 불꽃이온화검출기로 분석하거나 소변을 이동상으로 희석한 후 고성능 액체크로마토그래프 자외선검출기로 분석한다.

(2) 시료의 채취

(가) 시료 채취 시기

소변 시료는 당일 작업종료 2시간 전부터 작업종료 사이에 채취한다.

(나) 시료 채취 요령

- ① 채취 용기는 밀봉이 가능한 용기를 사용하고, 시료는 10 mL 이상 채취한다.
- ② 채취한 시료는 시료 채취 용기에 밀봉하여 채취 후 5일 이전에 분석하며 4 °C(2~8 °C)에서 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리는 경우에는 시료를 냉동보관용 저온바이알에 옮겨 -20 °C 이하에서 보관한다.

5.2 가스크로마토그래피 불꽃이온화검출법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 용량플라스크 100 mL
- ② 용량플라스크 10 mL
- ③ 마이크로피펫 200-1,000 µL
- ④ 테플론막 마개 유리시험관 10 mL
- ⑤ 가스크로마토그래피(GC)용 바이알 2 mL
- ⑥ 항온수조(Water bath)

(나) 시약

- ① o-메틸마노산
- ② m-메틸마노산
- ③ p-메틸마노산
- ④ 헵타데카노인산(Heptadecanoic acid)
- ⑤ 에틸아세테이트

- ⑥ 클로로포름
- ⑦ 염산
- ⑧ 탈이온수(18 MΩ/cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 유도체화 시약 조제

진한 염산 5 mL를 100 mL의 메탄올에 녹여 GC용 유도체화 시약을 만든다.

(나) 표준용액

- ① 메틸마노산 이성질체 각 0.05 g을 100 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 0.5 g/L의 표준용액을 만든다. 이것을 표준용액 원액으로 한다.
- ② 표준용액 원액을 각각 2, 4, 6, 8 mL 취하여 10 mL 용량플라스크에서 희석하여 각각 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 g/L가 되도록 제조하여 0.5 g/L의 표준용액을 포함하여 5 농도의 용액을 검량선용 표준용액으로 한다. 증류수를 공시료로 한다.

(다) 내부표준용액

헵타데카노인산 10 mg을 10 mL 메탄올에 녹여 1 g/L의 내부표준용액을 만든다.

(3) 시료 전처리

(가) 소변시료 또는 표준용액 0.5 mL에 탈이온수 0.5 mL를 가하고 내부표준물질 100 μL를 첨가한다.

(나) 여기에 0.5 N 염산용액 200 μL와 2 mL의 에틸아세테이트를 첨가한 다음 20 분 흔들어 주고 3,000 rpm으로 4분간 원심분리하여 유기층을 추출한다.

(다) 잔사에 유도체화 시약 1 mL를 넣고 마개를 한 후 60 °C에서 40분 반응시킨다. 반응액을 상온으로 냉각시킨 후 탈이온수 2 mL와 클로로포름 1 mL를 첨가하고 20분간 잘 흔들어 준 후 3,000 rpm에서 4분간 원심분리한다.

(라) 클로로포름 층을 피펫으로 취하여 GC용 바이알에 옮겨 검액으로 한다.

(4) 가스크로마토그래프 분석 조건

- (가) 컬럼: Rtx-5 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm 막 두께의 컬럼,
또는 이와 동등한 수준으로 분리가 가능한 컬럼.
- (나) 온도조건: 오븐 100 °C(1min) → 20 °C/min → 240 °C(2min)
주입구 240 °C
검출기(FID) 250 °C
- (다) 컬럼 유속: 1 mL/min
- (라) 분할주입비율: 1/10
- (마) 검출기: 불꽃이온화검출기

(5) 분석 결과 크로마토그램

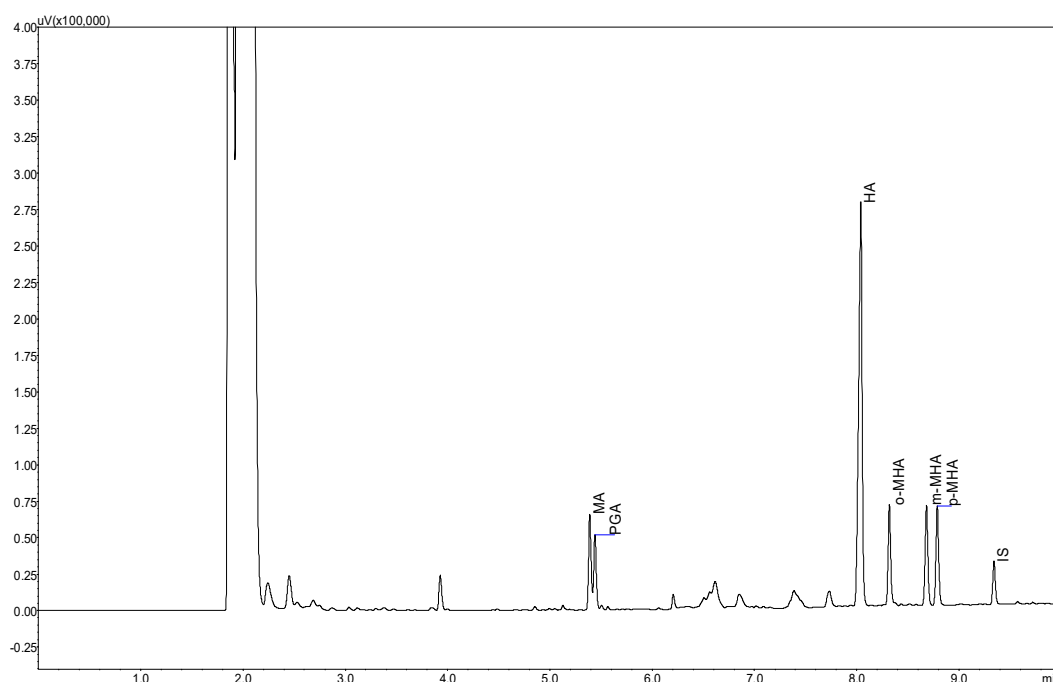


그림 1. 소변 중 메틸마노산(o-, m-, p-메틸마노산)의 GC 크로마토그램
(MA: 만텔산, PGA: 페닐글리옥살산, HA: 마노산, MHA: 메틸마노산)

(6) 농도 계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고 시료의 피크 면적을 내부표준물질의 피크 면적으로 보정한 값을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, y=

$ax+b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 메틸마노산 이성질체의 농도(g/L)를 각각 구한다. 3 종의 이성질체의 농도를 합한 값을 크레아티닌으로 보정하여(g/g크레아티닌) 크실렌의 생물학적 노출평가 결과값을 계산한다.

(7) 생물학적 노출평가 기준

(가) 기준값: 메틸마노산 1.5 g/g크레아티닌

(나) 소변 중 크레아티닌 농도

소변 중 생물학적 노출평가지표물질 보정에 사용하는 크레아티닌 농도는 0.3~3.4 g/L 범위이며, 크레아티닌 농도가 이 범위를 벗어난 소변은 비정상으로 간주하여 다시 채취한다.

(8) 정밀도(예)

	농도(mg/L)	변이계수(%) [*]
o-메틸마노산	25	1.6
	250	1.7
m-메틸마노산	25	4.3
	250	2.3
p-메틸마노산	25	3.4
	250	2.2

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함

(9) 정확도(예)

	농도(mg/L)	회수율(%)*
o-메틸마노산	25	120
	250	98
m-메틸마노산	25	99
	250	96
p-메틸마노산	25	109
	250	97

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함

(10) 검출한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 o-메틸마노산 0.4 mg/L
소변 중 m-메틸마노산 1.0 mg/L
소변 중 p-메틸마노산 0.9 mg/L

(나) 산출방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준 오차와 기울기를 이용하여 검출한계를 산출한다.

$$LOD = 3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum(Y_{ei} - Y_i)^2}{N-2}}}{b}$$

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값
 Y_i : 각 시료량에 대한 반응값
 N : 표준용액 시료 수
 b : 회귀방정식의 x계수

5.3 고성능 액체크로마토그래피 자외선검출법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 용량플라스크 100 mL
- ② 용량플라스크 10 mL
- ③ 피펫 1, 3, 5 mL
- ④ 테플론막 마개 유리시험관 5 mL
- ⑤ 주사기 2 mL
- ⑥ 멤브레인필터 0.45 μm

(나) 시약

- ① o-메틸마노산
- ② m-메틸마노산
- ③ p-메틸마노산
- ④ 이수소화칼륨(KH_2PO_4)
- ⑤ 인산
- ⑥ 초산
- ⑦ 테트라하이드로퓨란(HPLC급)
- ⑧ 아세토니트릴(HPLC급)
- ⑨ 탈이온수(18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$ 이상)

(2) 시약 조제

(가) 표준용액

- ① 만텔산, 페닐글리옥실산 각각 0.05 g을 100 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 500 mg/L의 표준용액을 만든다. 이것을 표준용액 원액으로 한다.
- ② 표준용액 원액을 각각 1, 3, 5, 7, 9 mL 취하여 10 mL 용량플라스크에서 희석하여 각각 50, 150, 250, 350, 450 mg/L가 되도록 제조하여 검량선용 표준용액으로 한다. 증류수를 공시료로 한다.

(나) 이동상

- ① 0.3% 초산을 포함한 0.01 M 이수소화칼륨 용액에 인산을 가하여 pH 2.5로 조정하여 용액 A를 조제한다.
- ② 용액 A, 테트라하이드로퓨란, 아세토니트릴을 87:5:8의 부피비로 혼합한 용액을 이동상으로 한다.

(3) 시료 전처리

(가) 소변시료를 교반기로 3분 정도 잘 섞어준다.

(나) 표준용액 및 시료 200 μ L를 취한 후, 탈이온수로 10배 희석한다.

(다) 희석액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시료를 준비한다.

(4) 액체 크로마토그래프 분석 조건

(가) 컬럼 : C₁₈, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m 입경의 컬럼,
또는 이와 동등한 수준으로 분리가 가능한 컬럼.

(나) 이동상 : 용액A, 테트라하이드로퓨란, 아세토니트릴 87:5:8(v/v/v)

(다) 유속 : 1.2 mL/min

(라) 검출기 : 자외선검출기(225 nm)

(5) 분석 결과 크로마토그램

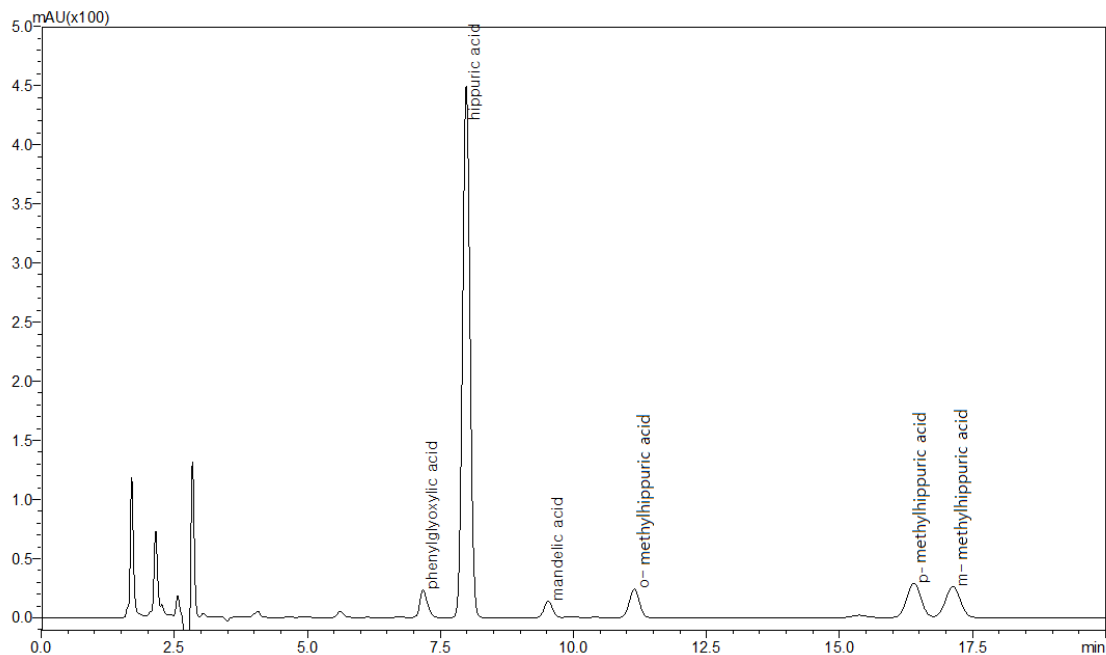


그림 2. 소변 중 메틸마노산(o-, m-, p-메틸마노산)의 HPLC 크로마토그램

(6) 농도 계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고, 최대피크 면적 값을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y = ax + b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 메틸마노산 이성질체의 농도(g/L)를 각각 구한다. 3종의 이성질체의 농도를 합한 값을 크레아티닌으로 보정하여(g/g크레아티닌) 크실렌의 생물학적 노출평가 결과값을 계산한다.

(7) 생물학적 노출평가 기준

(가) 기준값 : 소변 중 메틸마노산 1.5 g/g크레아티닌

(나) 소변 중 크레아티닌 농도

소변 중 생물학적 노출평가 지표물질 보정에 사용하는 크레아티닌 농도는 0.3

~3.4 g/L 범위이며, 크레아티닌 농도가 이 범위를 벗어난 소변은 비정상적으로 간주하여 다시 채취한다.

(8) 정밀도(예)

	농도(mg/L)	변이계수(%) [*]
o-메틸마뇨산	25	3.2
	250	0.8
m-메틸마뇨산	25	3.0
	250	0.9
p-메틸마뇨산	25	1.2
	250	1.5

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함

(9) 정확도(예)

	농도(mg/L)	회수율(%) [*]
o-메틸마뇨산	25	102
	250	100
m-메틸마뇨산	25	101
	250	101
p-메틸마뇨산	25	101
	250	100

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함

(10) 검출한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 o-메틸마뇨산 0.8 mg/L
소변 중 m-메틸마뇨산 0.7 mg/L
소변 중 p-메틸마뇨산 0.3 mg/L

(나) 산출방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준 오차와 기울기를 이용하여 검출한계를 산출한다.

$$LOD = 3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum(Y_{ei} - Y_i)^2}{N-2}}}{b}$$

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값

Y_i : 각 시료량에 대한 반응값

N : 표준용액 시료 수

b : 회귀방정식의 x계수