

KOSHA GUIDE

H - 145 - 2021

비소의 생물학적 노출지표 물질 분석에 관한
기술지침

2021. 10.

한 국 산 업 안 전 보 건 공 단

안전보건기술지침의 개요

- 제정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 최윤정
- 제정 경과
 - 2013년 11월 산업위생분야 제정위원회 심의
 - 2021년 8월 산업의학분야 표준제정위원회 심의(법령 및 규격 최신화)
- 관련규격 및 자료
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침: 제1권 특수건강진단의 개요. 2020-산업안전보건연구원-349
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 III: 납 등 중금속 10종. 보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882. 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(<http://kosha.or.kr>) 안전보건기술지침 소관 분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2021년 10월

제정자 : 한국산업안전보건공단 이사장

비소의 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 삼산화비소, 삼수산화비소, 비소 및 그 무기화합물에 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 삼산화비소, 삼수산화비소, 비소 및 그 무기화합물에 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, 시행규칙 및 「산업안전보건기준에 관한 규칙」에서 정하는 바에 따른다.

4. 분석장비

분석장비는 비불꽃 원자흡광광도기(Graphite furnace atomic absorption spectrometer, GF-AAS) 또는 고성능액체크로마토그래프-유도결합플라즈마 질량분석기(High performance liquid chromatograph-inductively coupled plasma mass spectrometer, HPLC-ICP-MS)를 사용한다.

5. 분석방법

5.1 분석 원리 및 시료채취

(1) 분석 원리

삼산화비소, 삼수소화비소, 비소 및 그 무기화합물은 호흡기 또는 경구 섭취를 통하여 흡수되고 체내에서 무기 비소나 유기 비소로 대사되어 이 중 60%가 소변으로 배설되므로 소변 중 총 비소를 비불꽃 원자흡광광도기로 분석한다. 소변 중 무기

비소와 유기 비소를 중 별로 분석하기 위해서는 고성능액체크로마토그래프-유도결합플라즈마 질량분석기를 사용한다.

(2) 시료의 채취

(가) 시료채취 시기

소변 시료를 목요일이나 금요일 또는 4~5일간 연속 작업 종료 2시간 전부터 직후에 채취한다.

(나) 시료채취 요령

- ① 채취 용기는 밀봉이 가능한 플라스틱 용기를 사용하고, 시료는 10 mL 이상 채취한다.
- ② 채취 전 48시간 이내에 해산물 섭취를 금하고 중금속제거를 위한 산 세척을 실시한 specimen cup에 받아 검체로 사용한다.
- ③ 채취한 시료는 시료 채취 용기에 밀봉하여 채취 후 5일 이전에 분석하며 4 ℃ (2 - 8 ℃)에서 냉장 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리는 경우에는 -20 ℃이하에서 냉동 보관한다.

5.2 비불꽃 원자흡광광도법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 용량플라스크 500, 100, 50, 10 mL
- ② 마이크로피펫 10-100, 200-1000 μ L
- ③ 마개달린 폴리에틸렌 시험관 5 mL
- ④ 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌 시료컵
- ⑤ 롤러 믹서
- ⑥ 화학 저울

(나) 시약

- ① 비소 1000 ppm(1000 μ g/mL) 표준용액

- ② 질산(검사 관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ③ 트리톤 X-100(Triton X-100)
- ④ 질산니켈 육수화물(Nickel(II) nitrate hexahydrate)
- ⑤ 기포방지제(Antifoam)
- ⑥ 탈이온수(18 MΩ/cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 표준용액

- ① 100 mL 용량플라스크에 1% 질산을 반쯤 넣고 비소 표준용액(982 µg/mL)을 1 mL주입한 후 1% 질산으로 표선을 맞추어 표준용액 원액을 조제한다.
- ② 표준용액 원액을 각각 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mL를 취하고 이를 10 mL 용량 플라스크에서 1% 질산으로 희석하여 24.6, 49.1, 98.2, 196.4, 392.8 µg/L의 검량선용 표준용액을 조제한다. 이 5가지 농도의 표준용액을 검량선용 표준용액으로 사용한다. 1% 질산을 공시료(blank)로 사용한다.

(나) 희석액

- ① 100 mL 용량플라스크에 트리톤 X-100 10 mL를 넣고 탈이온수로 표선을 맞추어 10% 트리톤 X-100 용액을 조제한다.
- ② 100 mL 용량플라스크에 10% 트리톤 X-100 5 mL와 질산니켈 육수화물 5.0 g, 기포방지제 10 µL를 넣고 탈이온수로 표선을 맞추어 희석액을 조제한다.

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 모든 시료는 거품이 발생하지 않도록 40분간 롤러 믹서로 균질화시킨다.

(나) 산처리가 끝난 시험관에 <표 1>과 같이 시료를 순서대로 주입 후 마개로 막은 후 롤러 믹서로 30초간 혼합한다.

<표 1>표준물 첨가법에 의한 시료 및 표준용액 전처리 (단위 : mL)

순서	물 질	공시료	첨가1	첨가2	첨가3	첨가4	첨가0	시료
1	희석액	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
2	소변 시료	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
4	탈이온수	0.2	0	0	0	0	0	0
5	표준용액	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0
6	1% 질산	0.2	0	0	0	0	0.2	0.2

(4) 원자흡광광도기 분석 조건 예시

<표 2> 분석 조건

AA condition	
Type	Furnace / Zeeman
Instrument mode	Absorbance
Calibration mode	Standard Additions
Measurement mode	Peak Area
Wavelength	193.7 nm
ETH	481 V
Slit Width	0.2 nm
Lamp Current	10.0 mA
Background Correction	BC Off

<표 3> 온도 프로그램

Step	Temp (°C)	Time (s)	Flow (L/min)
1	85	5.0	3.0
2	95	40.0	3.0
3	300	10.0	3.0
4	1500	10.4	3.0
5	1500	1.0	3.0
6	1500	2.0	0.0
7	2600	1.4	0.0
8	2700	0.2	0.0
9	2700	2.0	3.0

※ 분석 조건은 장비제조회사의 권고 방법을 사용한다

(5) 농도 계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고, 비소 피크 면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식을 통해 비소의 농도($\mu\text{g/L}$)를

KOSHA GUIDE
H - 145 - 2021

구한 후 이를 요 비중으로 보정한다.

(6) 생물학적 노출 평가 기준

총비소 150 µg/L(초과시 종분류:무기 비소+메틸화 대사물질 35µg/L)

(7) 정밀도(보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882 자료 예시)

50, 100, 400 µg/L 농도 수준에서 변이계수 3.4 %

(8) 정확도(보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882 자료 예시)

31.1, 124.8 µg/L 농도 수준에서 상대오차 각각 21.2 %, -6.2 %

(9) 검출 한계(보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882 자료 예시)

(가) 검출한계

1.39 µg/L

(나) 산출방법

$$LOD = 3 \times SD$$

(LOD : 검출한계, SD : 표준편차)

미첨가 소변을 6회 반복 측정하여 검출된 반응값의 표준편차의 3배를 검출한계로 한다.

5.3 고성능액체크로마토그래피-유도결합플라즈마 질량분석법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 용량플라스크 500, 100, 50, 10 mL
- ② 메스실린더 100 mL
- ③ 마이크로피펫 10-100, 200-1000 μ L
- ④ 마개달린 폴리에틸렌 시험관 5 mL
- ⑤ 롤러 믹서
- ⑥ 원심분리기
- ⑦ HPLC 용매 여과 기구
- ⑧ 진공펌프
- ⑨ 화학저울
- ⑩ 시린지 필터(0.45 μ m pore size)

(나) 시약

- ① Arsenate(As V) 표준용액 1000 ppm(1000 μ g/mL) 표준용액
- ② Arsenite(As III) 표준용액 1000 ppm(1000 μ g/mL) 표준용액
- ③ Arsenobetaine(As-B) 용액 1000 ppm(1000 μ g/mL) 표준용액
- ④ Dimethylarsinic acid(DMA) 용액 1000 ppm(1000 μ g/mL) 표준용액
- ⑤ Monosodium acid methane arsonate(MMA) 용액 1000 ppm(1000 μ g/mL) 표준용액
- ⑥ Yttrium(내부표준시약) 용액 1000 ppm(1000 μ g/mL)
- ⑦ Arsenic fraction control 특급시약
- ⑧ 탄산암모늄 특급 시약
- ⑨ 질산 특급 시약(검사 관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑩ 탈이온수(18 M Ω /cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 표준용액

- ① 100 mL 용량플라스크에 1% 질산을 반쯤 넣고 각각 1000 ppm(1000 µg/mL)의 arsenate(As V) 3 µL, arsenite(As III) 3 µL, arsenobetaine(As-B) 20 µL, dimethylarsinic acid(DMA) 10 µL, monosodium acid methane arsonate(MMA) 3 µL를 주입한 후 표선을 맞추어 표준용액 원액을 조제한다.
- ② 표준용액 원액을 2배씩 단계별 희석하여 <표 4>과 같이 검량선용 표준용액을 조제한다. 이 5가지 농도의 표준용액을 검량선용 표준용액으로 사용한다. 1% 질산을 공시료(blank)로 사용한다.

<표 4> 검량선용 표준용액 조제

구 분		As(V)	As(III)	As-B	DMA	MMA	용 매
검량선용	Blank	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1% 질산
표준용액	STD 1	1.875	1.875	12.500	6.250	1.875	
	STD 2	3.750	3.750	25.000	12.500	3.750	
	STD 3	7.500	7.500	50.000	25.000	7.500	
	STD 4	15.000	15.000	100.000	50.000	15.000	
	STD 5	30.000	30.000	200.000	100.000	30.000	

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 모든 시료는 거품이 발생하지 않도록 30분간 롤러 믹서로 균질화시킨다.

(나) 산처리가 끝난 시험관에 <표 5>와 같이 시료를 순서대로 주입 후 마개를 닫고 롤러 믹서로 3분간 혼합한다.

<표 5>표준물 첨가법에 의한 시료 및 표준용액 전처리 (단위 : mL)

순서	물 질	공시료	첨가1	첨가2	첨가3	첨가4	첨가0	시료	내부표준 시약
1	탈이온수	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.1
2	미첨가 소변	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	0.1
3	소변 시료	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1
5	표준용액	-	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	0.1
6	1% 질산	0.1	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1

(다) 4℃로 온도를 조절한 원심분리기를 이용하여 13000 rpm에서 10분간 원심분리한다.

(라) 상층액을 0.45 μm 시린지 필터를 이용하여 여과하고, 여액을 HPLC vial에 모은다.

(마) HPLC 자동시료주입기를 이용하여 50 μL 를 HPLC ICP-MS로 주입한다.

(4) 고성능액체크로마토그래프-유도결합플라즈마 질량분석기 분석 조건

<표 6> 고성능액체크로마토그래프 분석 조건 예시

Items	Condition
Mobile phase	30 mM Ammonium carbonate, pH 9.0
Flow rate	1 mL/min
Column	Anion Exchane column(Hamilton PRP-X100) 4.1 X 250 mm, 10 μm
Column temperature	25 $^{\circ}\text{C}$
Injection volume	50 μL
Run time	30 min

<표 7> 유도결합플라즈마 질량분석기 분석 조건 예시

Items	Condition
Nebulizer gas flow	1.00 L/min
Plasma gas flow	18.00 L/min
Sheath gas flow	0.16 L/min
Auxiliary gas flow	1.65 L/min
Torch RF generator power	1.40 Kw
Spray chamber cooling temperature	3.01 $^{\circ}\text{C}$

※분석 조건은 장비제조회사의 권고 방법을 사용한다.

(5) 농도 계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고, 내부표준물질의 면적에 대한 비소 피크 면적의 상대적 비를 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식을 통해 비소의 농도($\mu\text{g/L}$)를 구한 후 이를 요 비중으로 보정한다.

(6) 생물학적 노출 평가 기준

총 비소 150 $\mu\text{g/L}$ (초과시 중분류:무기 비소+메틸화 대사물질 35 $\mu\text{g/L}$)

(7) 정밀도(보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882 자료 예시)

AsV, As III, MMA는 1.88, 3.75, 15.0 µg/L 농도 수준에서, DMA는 6.25, 12.5, 50.0 µg/L 농도 수준에서 통합변이계수 5.1 %

(8) 정확도(보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882 자료 예시)

- ① As V : 4.2, 30.2 µg/L 농도 수준에서 상대오차 각각 34.1 %, -10.0 %
- ② As III : 1.6, 17.3 µg/L 농도 수준에서 상대오차 각각 40.1 %, 15.2 %
- ③ MMA : 3.4, 10.6 µg/L 농도 수준에서 상대오차 각각 17.8 %, 7.2 %
- ④ DMA : 15.0, 73.0 µg/L 농도 수준에서 상대오차 각각 14.0 %, 5.0 %

(9) 검출 한계(보건분야-연구자료 연구원 2010-66-882 자료 예시)

(가) 검출한계

- ① As V : 0.027 µg/L
- ② As III : 0.025 µg/L
- ③ As-B : 0.033 µg/L
- ④ DMA : 0.026 µg/L
- ⑤ MMA : 0.034 µg/L

(나) 산출방법

$$LOD = 3 \times SD$$

(LOD : 검출한계, SD : 표준편차)

미첨가 소변을 6회 반복 측정하여 검출된 반응값의 표준편차의 3배를 검출한계로 한다.