

KOSHA GUIDE

H - 12 - 2021

콜타르의 생물학적 노출지표물질
분석에 관한 지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

○ 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김현영

○ 제 · 개정 경과

- 2011년 6월 산업의학분야 제정위원회 심의(제정)
- 2021년 8월 산업의학분야 표준제정위원회 심의(법령 및 규격 최신화)

○ 관련규격 및 자료

- 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침 제1권 특수건강진단의 개요. 2020-산업안전보건연구원-349. 2020
- 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 II: 디메틸포르름아미드 등 유기용제 13종. 연구원 2010-65-881. 2010
- Shahtaheri SJ, Ibrahimi L, Golbabaei F, et al. Optimization of sample preparation for 1-hydroxypyrene as a major biomarker of exposure to PAHs prior to HPLC. Anal Bioanal Chem 2006;35(1):33-41
- Han IK, Duan X, Zhang L, et al. 1-Hydroxypyrene concentration in first morning voids and 24-h composite urine: intra- and inter-individual comparisons. Journal of exposure science and environmental epidemiology 2008;18:477-485
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists(ACGIH): Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 7th Ed

○ 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)

○ 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

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

콜타르의 생물학적 노출지표물질 분석에 관한 지침

1. 목 적

이 지침은 산업안전보건법(이하 “법”이라고 한다) 제130조 및 같은 법 시행규칙(이하 “시행규칙”이라고 한다) 제206조 별표 24, 고용노동부고시 제2020-61호(특수건강진단기관의 정도관리에 관한 고시) 및 고용노동부고시 제2020-60호(근로자 건강진단 실시기준)에 따라 콜타르에 노출된 근로자의 생물학적 노출평가와 관련된 노출지표물질의 분석방법을 제시하는 데 그 목적이 있다.

2. 적용범위

이 지침은 법, 시행규칙 및 고용노동부고시에 따라 실시하는 근로자 건강진단 중 콜타르에 노출되는 근로자의 생물학적 노출 평가에 적용한다.

3. 정 의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

(가) “생물학적 노출평가”란 혈액, 소변 등 생체시료로부터 유해물질 자체 또는 유해물질의 대사산물, 또는 생화학적 변화산물 등을 분석하여 유해물질 노출에 의한 체내 흡수정도 또는 건강영향 가능성 등을 평가하는 것을 말한다.

(나) “생물학적 노출지표물질”이란 생물학적 노출평가를 실시함에 있어 생체 흡수정도를 반영하는 물질로서 유해물질 자체나 그 대사산물, 생화학적 변화산물 등을 말한다.

(다) “정밀도(Precision)”란 일정한 물질에 대하여 반복측정·분석을 했을 때 나타나는 자료 분석치의 변동크기가 얼마나 되는가를 말한다. 이 경우 같은 조건에서 측정했을 때 일어나는 우연오차(Random error)에 의한 분산(Dispersion)의 정

도를 측정값의 변이계수(Coefficient of variation)로 표시한다.

(라) “정확도(Accuracy)”란 분석치가 참값에 얼마나 접근하였는가 하는 수치상의 표현을 말한다. 다만, 인증표준물질이 있는 경우는 상대오차로 표시되고, 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 쓰이는 대로 공시료 신호값과의 차이가 공시료 신호값 표준편차의 3배인 경우로 한다.

(2) 그 밖의 용어의 뜻은 이 지침에서 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 「산업보건기준에 관한 규칙」에서 정하는 바에 따른다.

4. 분석장비

분석 장비는 고성능액체크로마토그래프-형광검출기(High performance liquid chromatograph-fluorescence detector, HPLC-FD)를 사용한다.

5. 분석방법

5.1 소변 중 1-하이드록시파이렌

(1) 분석 원리

콜타르는 다환방향족 탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocabons, PAHs)를 함유한 혼합물로, 이들은 체내로 흡수된 후 대부분 1-하이드록시파이렌으로 대사된다.

소변 중으로 배출되는 1-하이드록시파이렌은 75-90%가 글루쿠론산과 포함된 결합체로 존재하며 일부는 포함되지 않은 형태로 배출된다. 소변 중 존재하는 결합형 1-하이드록시파이렌을 효소반응을 이용하여 모두 유리형으로 만든 후, C₁₈ 고상 카트리지로 1-하이드록시파이렌을 분리하고 농축하여 HPLC-FD로 분석한다.

(2) 시료 채취

(가) 시료 채취 시기

시료 채취는 4-5일간 연속작업의 작업종료 2시간 전부터 작업종료 직후까지 한다.

(나) 시료채취 요령

- ① 채취용기는 오염되지 않고 밀봉이 가능한 용기를 사용하고, 시료는 10 mL 이상 채취한다.
- ② 시료 중의 다환방향족 탄화수소는 태양광에 의해 분해되므로 일주일 이상 보관할 경우에는 시료 500 mL를 염산으로 pH를 2.0 정도로 조절한 후, 갈색병에 넣거나 차광하여 밀봉하고 영하 20 ℃ 이하에 보관한다.

(3) 기구 및 시약

(가) 자동피펫 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L

(나) 용량 플라스크 10 mL 6 개, 100 mL 2 개, 1000 mL 2 개

(다) 50 mL 마개달린 시험관

(라) 고상추출(Solid phase extraction, SPE) 카트리지(C₁₈, 500 mg)

(마) HPLC용 바이알

(바) 원심분리기

(사) 인큐베이터

(아) pH 미터

(자) 1-하이드록시파이렌(표준시약)

(차) β -글루쿠로니다제(설파타제와의 혼합효소)

(타) 설파타제(2150 unit 또는 동등한 것)

(파) 빙초산

(하) 염산

- (자) 수산화나트륨(NaOH)
- (차) 메탄올(HPLC용)
- (카) 탈이온수(18 MΩ/cm 이상)

(4) 시약 조제

(가) 표준용액 조제를 위한 희석용 소변

콜타르에 노출되지 않은 정상인 소변을 채취하여 냉동 보관한다. 냉동한 소변을 상온에서 녹이고, 여과지를 사용하여 여과한 후, 여액을 표준용액 조제를 위한 희석용 소변으로 사용한다. 단, 사용 이전에 미리 소변을 분석하여 소변 중 1-하이드록시파이렌이 없는 것을 확인한 소변을 표준용액 조제에 사용한다.

(나) 표준용액

- ① 1-하이드록시파이렌 표준시약 10 mg을 100 mL 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선을 채워 100 mg/L 표준용액 원액을 조제한다. 조제한 표준용액 원액은 플라스틱 용기에 옮겨 영하 18 °C에 보관하며 2주에 한번씩 조제한다.
- ② 표준용액 원액을 10 µL 취하여 10 mL 용량플라스크에 옮기고 희석용 소변으로 표선을 채워 100 µg/L 표준용액을 조제하고 이를 희석용 소변으로 희석하여 2, 4, 6, 8, 10 µg/L의 검량선용 표준용액을 조제한다.

(다) 2 M 수산화나트륨

8 g의 수산화나트륨을 비이커에 달아 약 50 mL의 탈이온수를 가하여 잘 녹인 후, 100 mL 용량플라스크에 옮기고 표선까지 탈이온수를 채운다.

(라) 0.1 M 아세트이트 완충액

약 400 mL의 탈이온수를 1000 mL 용량플라스크에 넣고 5.7 mL의 빙초산을 가하고 2 M 수산화나트륨 용액으로 pH를 5.0으로 맞춘 후, 탈이온수로 표선을 채운다.

(마) 1 N 염산

1000 mL 용량플라스크에 탈이온수를 500 mL 넣은 후, 여기에 진한 염산 88.5 mL를 가하고 다시 탈이온수로 표선을 채운다.

(바) 이동상

메탄올과 탈이온수를 8 : 2 부피비로 혼합한 후 0.45 μm 여과막을 통과시켜 여과한다.

(5) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 소변시료 10 mL를 50 mL의 시험관에 옮기고, 1 N 염산으로 pH 5.0으로 맞춘다. 여기에 0.1 M 아세트이트 완충액을 가하여 최종량을 30 mL로 하고 이 용액을 흔들어 섞는다.

(나) β -글루쿠론산 분해효소 용액과 설파타제를 각각 20 μL 를 가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 고정한 자동회전 항온조에서 16시간 이상 가수분해시킨다.

(다) 카트리지에 메탄올 5 mL를 1 mL/min 유속으로 통과시킨 후, 다시 같은 유속으로 10 mL 탈이온수를 이용하여 카트리지를 세척한다.

(라) 활성화된 카트리지에 가수분해된 소변시료 또는 표준용액을 통과시킨 다음, 시료가 카트리지에 모두 흡수될 때까지 방치한다. 그리고 3 mL 증류수, 50%의 메탄올 3 mL를 통과시켜 카트리지를 세척한다.

(마) 메탄올 3 mL로 1-하이드록시파이렌을 추출하고 추출액을 HPLC 바이알에 옮겨 분석한다. 남은 시료는 알루미늄 호일로 싸서 -7 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다.

(6) 기기 조건

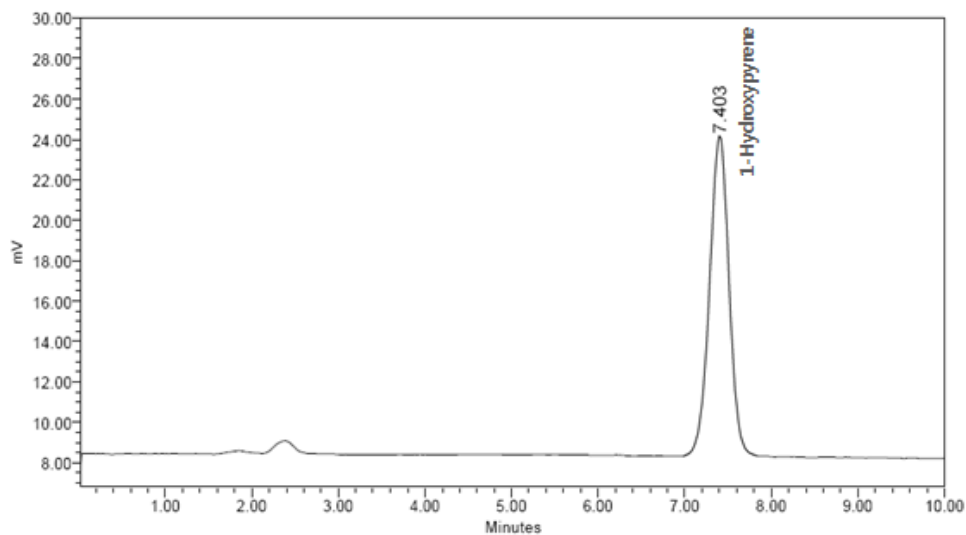
(가) 컬럼 : C_{18} 컬럼 (150 mm \times 4.6 mm, 입경 5 μm) 또는 그 이상의 분리능을 가진 컬럼

(나) 파장 : 여기/방출(Excitation/emission)파장은 242 nm/388 nm

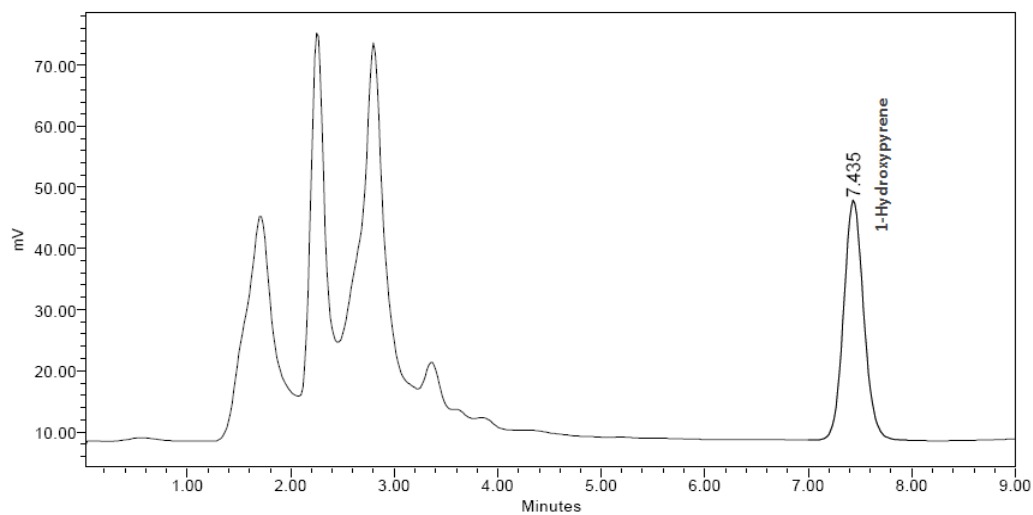
(다) 유속 : 0.8 mL/min

(라) 주입량 : 20 μL

(7) 분석 결과 크로마토그램



<그림 1> HPLC-FD 크로마토그램
(10 µg/L의 1-하이드록시파이렌 표준용액)



<그림 2> HPLC-FD 크로마토그램
(10 µg/L의 1-하이드록시파이렌을 첨가한 소변시료)

KOSHA GUIDE
H - 12 - 2021

(8) 농도계산

1-하이드록시파이렌 검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로, 피크면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식을 통해 1-하이드록시파이렌 농도($\mu\text{g/L}$)를 구한다.

(9) 생물학적 노출 평가 기준

4.6 $\mu\text{g/L}$

(10) 정밀도

2.0 - 10.0 $\mu\text{g/L}$ 농도 범위에서 변이계수 4.0 - 8.2%

(11) 정확도

2.0 - 10.0 $\mu\text{g/L}$ 농도 범위에서 회수율 89 - 116%

(12) 검출 한계

(가) 검출 한계

0.05 $\mu\text{g/L}$ (S/N 비 3)

(나) 산출 방법

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/b$$

(LOD : 검출한계, SD : 표준편차, b : 검량선의 회귀방정식 기울기)

표준용액 농도 범위 중 중간값을 대상으로 실시하며, 선정된 농도를 5회 이상 반복 측정하여 구한다.