

KOSHA GUIDE

H - 13 - 2020

클로로벤젠의 생물학적 노출지표물질
분석에 관한 지침

2020. 12.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

○ 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김현영

○ 개정자 : 사회정보연구원 김기웅

○ 제정 경과

- 2011년 6월 산업의학분야 제정위원회 심의(제정)
- 2020년 11월 산업의학분야 제정위원회 심의(개정)

○ 관련규격 및 자료

- 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침 제2권 유해인자별 특수건강진단 방법. 2020-산업안전보건연구원-350. 2020.
- 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 II: 디메틸포름아미드 등 유기용제 13종. 연구원 2010-65-881. 2010
- Knecht U, Weitowitz HJ, Human toxicokinetics of inhaled monochlorobenzene: latest experimental findings regarding re-evaluation of the biological tolerance value. Int Arch Occup Environ Health 2000;73:543-54
- Ogata M, Taguchi T, Hirota N, et al. Quantitation of urinary chlorobenzene metabolites by HPLC: concentrations of 4-chlorocatechol and chlorophenols in urine and of chlorobenzene in biological specimens of subjects exposed to chlorobenzene. Int Arch Occup Environ Health 1991;63:121-8
- Occupational Safety and Health Administration. Evaluation guidelines for air sampling methods utilizing chromatographic analysis
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Chlorobenzene. IN: Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. 2010

○ 관련법규·규칙·고시 등

- 산업안전보건법 제130조(특수건강진단),
- 고용노동부고시(제2010-37호) 「특수건강진단 정도관리 규정」
- 고용노동부고시(제2020-60호) 「근로자 건강진단 실시기준」
- 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침 제2권 유해인자별 특수건강진단 방법. 2020-산업안전보건연구원-350. 2020.

○ 기술지침의 적용 및 문의

- 이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지(www.kosha.or.kr)의 안전보건 기술지침 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 : 2020년 12월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

클로로벤젠의 생물학적 노출지표물질 분석에 관한 지침

1. 목 적

이 지침은 클로로벤젠에 노출된 근로자의 생물학적 노출평가와 관련된 생물학적 노출지표물질 분석 방법의 제시를 목적으로 한다.

2. 적용범위

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

3. 정 의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

- (가) “생물학적 노출평가”란 혈액, 소변 등 생체시료 중 유해물질 자체 또는 유해물질의 대사산물이나 생화학적 변화산물 분석값을 이용한, 유해물질 노출에 의한 체내 흡수정도나 건강영향 가능성 등의 평가를 의미한다.
- (나) “생물학적 노출지표물질”이란 생물학적 노출평가를 실시함에 있어 생체 흡수정도를 반영하는 물질로 유해물질 자체나 그 대사산물, 생화학적 변화물 등을 말한다.
- (다) “생물학적 노출기준값”이란 일주일에 40시간 작업하는 근로자가 고용노동부고시에서 제시하는 작업환경 노출기준 정도의 수준에 노출될 때 혈액 및 소변 중에서 검출되는 생물학적 노출지표물질의 값이다.
- (라) “정밀도(precision)”란 일정한 물질에 대하여 반복측정·분석을 했을 때 나타나는 자료분석치의 변동의 크기를 나타낸다. 이 경우 같은 조건에서 측정했을 때 일어나는 우연오차(random error)에 의한 분산(dispersion)의 정도를 측정값의 변이계수(coefficient of variation)로 표시한다.

(마) “정확도(accuracy)”란 분석치가 참값에 접근한 정도를 의미한다. 다만, 인증표준 물질이 있는 경우는 상대오차로 표시하고, 인증표준물질이 없는 경우는 시료에 첨가한 값으로부터 구한 평균회수율로 표시한다.

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

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

4. 분석개요

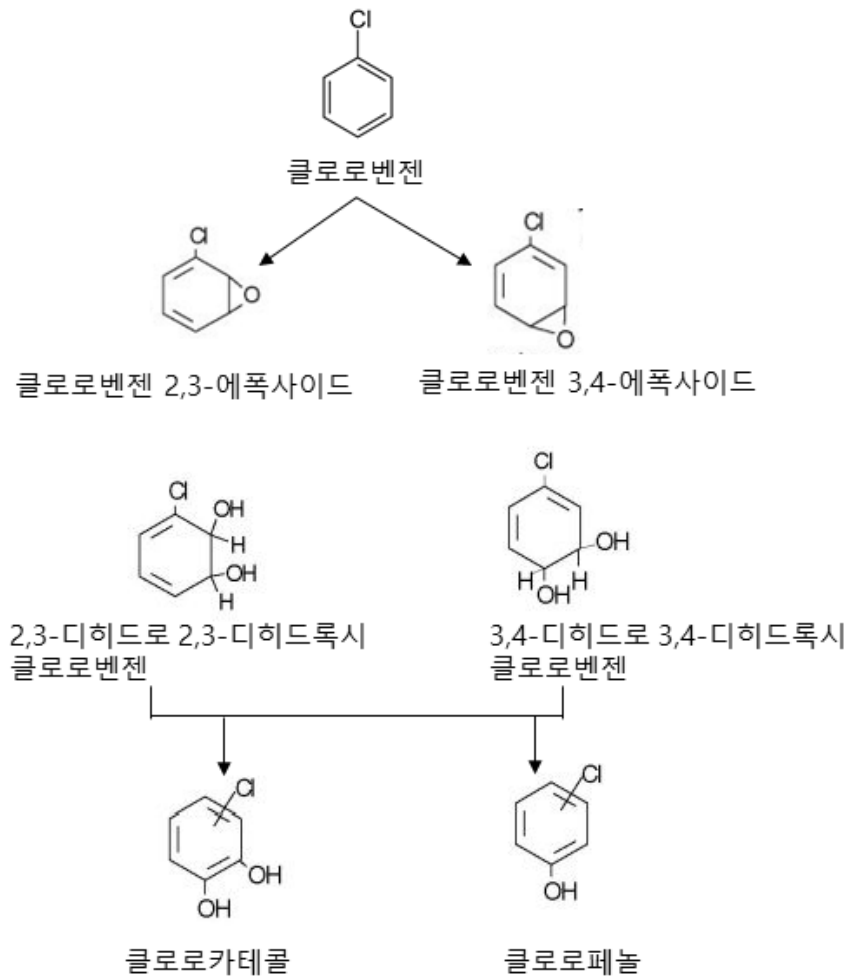
소변 중 총클로로카테콜을 분석하며, 분석장비는 고성능액체크로마토그래프-자외선검출기(high performance liquid chromatograph- ultraviolet detector, HPLC-UVD)를 사용한다.

5. 분석방법

5.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

클로로벤젠은 체내로 흡수된 후 소변 중으로 47%가 4-클로로카테콜로 배출되며, 대부분 황산이나 글루쿠론산과 포함된 결합체로 배설된다. 효소반응을 이용하여 소변 중 4-클로로카테콜 결합체를 유리형 4-클로로카테콜로 만들고 이를 HPLC-UVD로 분석한 소변 중 총클로로카테콜 값을 클로로벤젠 생물학적 노출평가에 이용한다.



<그림 1> 클로로벤젠 대사과정

(2) 시료 채취

(가) 시료채취 시기

소변 시료는 당일 작업종료 2시간 전부터 작업종료 사이에 채취한다.

(나) 시료채취 요령

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

5.2 고성능 액체크로마토그래피 자외선검출법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동피펫 10, 100 μ L, 1000 μ L
- ② 용량 플라스크 10 mL 5 개, 100 mL 2 개, 1000 mL 1 개
- ③ HPLC용 바이알
- ④ 원심분리기
- ⑤ 인큐베이터
- ⑥ pH 미터

(나) 시약

- ① 4-클로로카테콜(표준시약)
- ② β -글루쿠로니다제(설파타제와의 혼합효소)
- ③ 설파타제(2150 unit 또는 이와 동등한 것)
- ④ 초산나트륨
- ⑤ 인산제1칼륨(KH_2PO_4)
- ⑥ 초산
- ⑦ 인산
- ⑧ 메탄올(HPLC용)
- ⑨ 탈이온수(18 M Ω /cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 표준용액 조제를 위한 희석용 소변

클로로벤젠에 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 4-클로로카테콜이 없는 것을 확인한 소변을 표준용액 조제에 사용한다.

(나) 표준용액

- ① 4-클로로카테콜 표준시약 100 mg을 10 mL 용량 플라스크에 넣고 메탄올로 표선을 채워 10,000 mg/L 표준용액을 조제한다.
- ② 10,000 mg/L 표준용액을 각각 50, 100, 200, 300 μ L 취하여 10 mL 용량 플라스크에 넣고 희석용 소변으로 표선을 채워 50, 100, 200, 300 mg/L의 검량선용 표준 용액을 조제한다.

(다) 초산 완충용액

① 0.2 M 초산 수용액

1.2 g의 초산을 탈이온수에 넣어 100 mL로 만든다.

② 0.2 M 초산나트륨 수용액

1.64 g의 초산나트륨을 탈이온수에 녹여 100 mL로 만든다.

③ pH 5 완충용액

0.2 M 초산 수용액 32%와 0.2 M 초산나트륨 수용액 68%를 섞는다.

(라) 이동상

20 mM 인산제1칼륨 수용액과 아세트니트릴을 3:1 부피비로 혼합하고 인산을 가하여 pH를 3.6으로 맞춘 후, 0.45 μ m 여과막을 통과시켜 여과한다.

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 소변시료 100 μ L에 0.2 M 초산 완충용액(pH 5.0) 300 μ L를 넣은 다음, β -글루크로니다제와 설파타제를 각각 50 μ L 넣어 섞는다.

(나) 위의 혼합 용액을 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 2시간 배양한다.

(다) 배양한 용액에 메탄올을 1.5 mL 넣고 혼합한 후 원심분리한다(3000 rpm, 5분).

(라) 원심분리 후 상층액을 취해 HPLC 바이알에 옮기고 20 μ L를 HPLC에 주입하여 분석한다.

(4) 액체 크로마토그래프 분석 조건

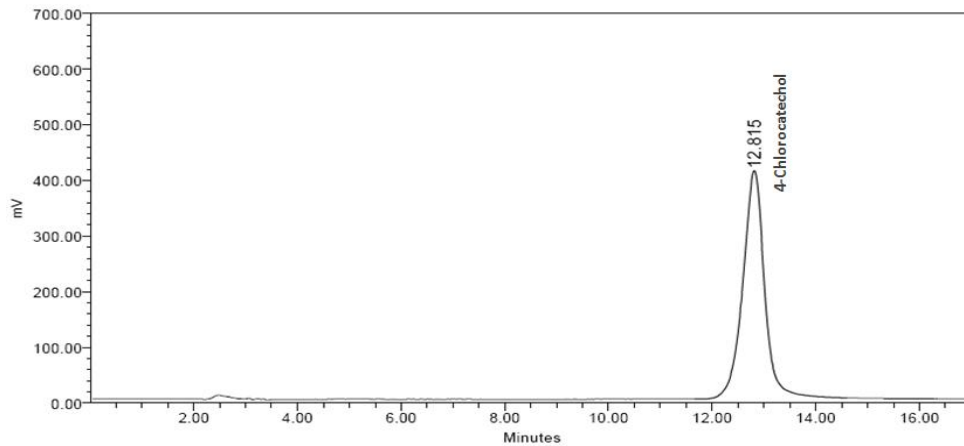
(가) 컬럼 : C₁₈ 컬럼 (150 mm \times 4.6 mm, 입경 5 μ m) 또는 그 이상의 분리능을 가진 컬럼

(나) 유속 : 0.7 mL/분

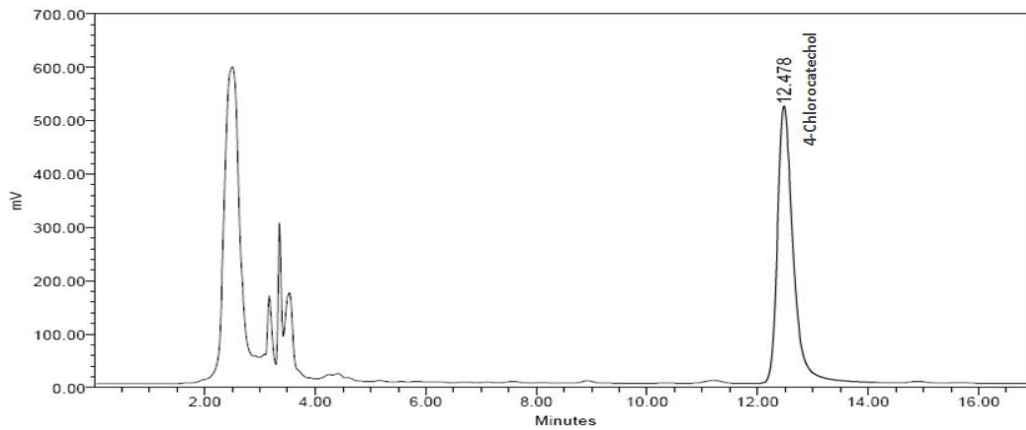
(다) 시료 주입량 : 20 μ L

(라) 검출기 : 자외선검출기(280 nm)

(5) 분석 결과 크로마토그램 예시



<그림 1> HPLC-UVD 크로마토그램(300 mg/L의 4-클로로카테콜 표준용액)



<그림 2> HPLC-UVD 크로마토그램(300 mg/L의 4-클로로카테콜을 첨가한 소변시료)

(6) 농도 계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고 시료의 피크 면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 그리고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 4-클로로카테콜 농도(mg/L)를 구한다. 4-클로로카테콜의 농도값을 크레아티닌으로 보정하여(mg/g크레아티닌) 클로로벤젠의 생물학적 노출평가 결과값을 계산한다.

(7) 생물학적 노출기준

(가) 기준값 : 150 mg/g 크레아티닌

(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 다시 채취한다.

(8) 정밀도(예)

50.0 - 300.0 mg/L 농도 범위에서 변이계수 1.3 - 6.1%

(9) 정확도(예)

50.0 - 300.0 mg/L 농도 범위에서 회수율 86 - 103%

(10) 검출 한계

(가) 검출 한계

예) 소변 중 4-클로로카테콜 17.1 mg/L(S/N 비 3)¹⁾

(나) 산출 방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준오차와 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

1) 배경 반응값(noise, N)의 3배인 시료 반응값(signal, S)을 나타내는 농도를 검출한계로 함.