

KOSHA GUIDE

H - 151 - 2021

스티렌의 생물학적 노출지표 물질 분석에 관한 기술지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 직업건강연구실 이미영
- 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 직업건강연구실 이미영
- 제·개정 경과
 - 2014년 11월 KOSHA Guide 산업의학분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2016년 6월 KOSHA Guide 산업의학분야 제정위원회 심의(개정)
 - 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 I : 크실렌 등 유기용제 16종. 보건분야-연구자료 연구원 2010-64-880. 2010
 - <http://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-53.pdf>
- 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

스티렌의 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 실시 방법 등) 별표 24, 고용노동부고시 제2020-61호(특수건강진단기관의 정도관리에 관한 고시) 및 고용노동부고시 제2020-60호(근로자 건강진단 실시기준)에 따라 스티렌에 노출된 근로자의 생물학적 노출평가와 관련된 생물학적 노출지표 물질의 분석 방법을 제안함을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 법, 시행규칙 및 고용노동부고시에 따라 실시하는 근로자 건강진단 중 스티렌에 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 생체 흡수정도를 반영하는 물질로서 유해물질 자체나 그 대사산물, 생화학적 변화물 등을 말한다.
- (다) “정밀도(Precision)”란 일정한 물질에 대하여 반복측정·분석을 했을 때 나타나는 자료분석치의 변동크기를 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, 인증표준물질

이 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.

(2) 그밖에 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 법, 같은 법 시행령과 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

스티렌은 호흡기와 피부 경로로 흡수되며 작업장에서는 주로 호흡기를 통한다. 8시간 노출 중 흡수된 스티렌 양의 85% 정도가 만델산으로 소변에 배설되며 10% 정도는 페닐글리옥실산으로 소변을 통해 배설된다. 만델산과 페닐글리옥실산을 합한 값이 각각의 값보다 스티렌 노출을 더 잘 반영하므로 이들 두 성분을 합한 값을 스티렌의 생물학적 노출 지표로 사용한다. 소변 중 만델산과 페닐글리옥실산을 유기용제로 추출한 뒤 휘발성 유도체를 만들어 가스크로마토그래프-불꽃이온화검출기로 분석하거나, 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 이내에 분석하며 4 ℃(2~8 ℃)에서 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리는 경우에는 시료를 냉동보관용 저온바이알에 옮겨 -20 ℃이하에서 보관한다.

5.2 가스크로마토그래피 불꽃이온화검출법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 용량플라스크 100 mL
- ② 용량플라스크 10 mL
- ③ 마이크로피펫 50~200 μ L
- ④ 마이크로피펫 200~1,000 μ L
- ⑤ 테플론막 마개 유리시험관 10 mL
- ⑥ 가스크로마토그래피(GC)용 바이알 2 mL
- ⑦ 항온수조(Water bath)

(나) 시약

- ① 만델산
- ② 페닐글리옥실산
- ③ 헵타데카노인산(Heptadecanoic acid)
- ④ 에틸아세테이트
- ⑤ 클로로포름
- ⑥ 염산
- ⑦ 탈이온수(18 M Ω ·cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 유도체화 시약 조제

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

(나) 표준용액

- ① 만델산, 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.

(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 μ L를 첨가한다.

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

(다) 추출한 유기층을 새 시험관에 옮기고 시험관 안으로 질소나 공기를 분사하여 에틸아세테이트를 제거한 나머지 시료에 유도체화 시약 1 mL를 넣고 마개를 한 후 60 $^{\circ}$ 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) 클로로포름층을 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(1분) → 20 °C/분 → 240 °C(2분)

주입구 240 °C

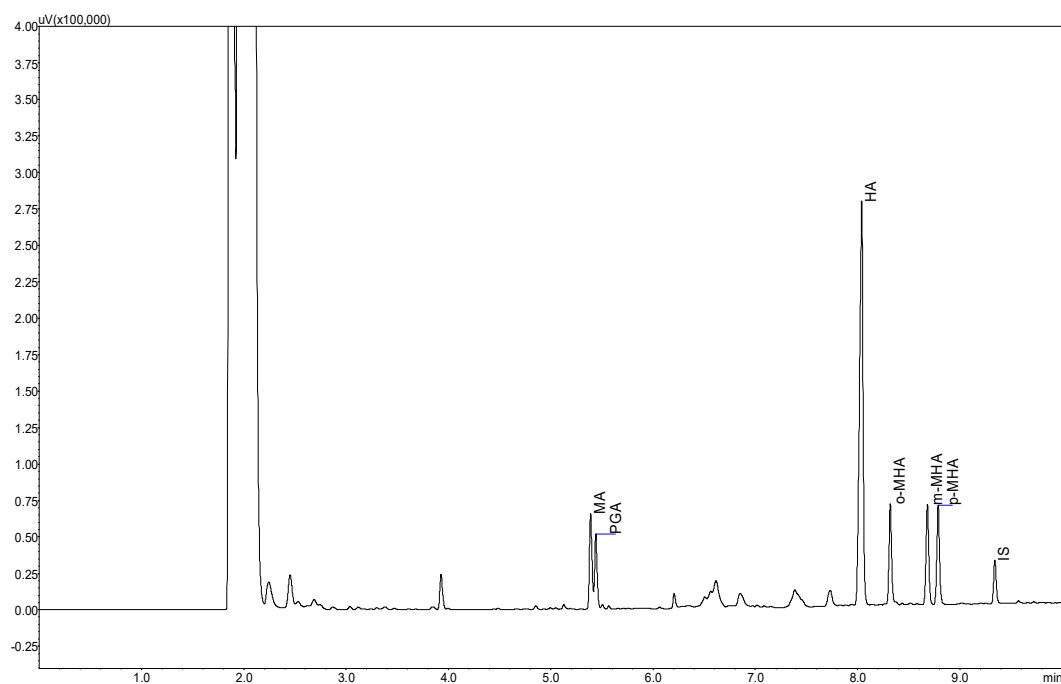
검출기 250 °C

(다) 컬럼 유속 : 1 mL/분

(라) 분할주입비율 : 1/10

(마) 검출기 : 불꽃이온화검출기

(5) 분석 결과 크로마토그램



[그림 1] 소변 시료 중 대상물질의 GC-FID 크로마토그램

(MA: 만델산, PGA: 페닐글리옥실산, 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 만델산과 페닐글리옥실산의 농도(mg/L)를 각각 구한다. 만델산과 페닐글리옥실산의 농도를 합한 값을 크레아티닌으로 보정하여(mg/g크레아티닌) 스티렌의 생물학적 노출평가가 결과값을 계산한다.

(7) 생물학적 노출 평가 기준

(가) 기준값 : 소변 중 만델산과 페닐글리옥실산의 합 600 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 비정상적으로 간주하여 다시 채취한다.

(8) 정밀도(예)

	농도(mg/L)	변이계수(%)*
만델산	25	3.8
	250	2.1
페닐글리옥실산	25	1.4
	250	2.1

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함.

(9) 정확도(예)

	농도(mg/L)	회수율(%)*
만델산	25	104.6
	250	91.1
페닐글리옥실산	25	115.5
	250	116.0

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함.

(10) 검출한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 만델산 0.09 mg/L,

소변 중 페닐글리옥실산 0.4 mg/L(S/N 비 3)¹⁾

(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

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

5.3 고성능 액체크로마토그래피 자외선검출법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 용량플라스크 100 mL
- ② 용량플라스크 10 mL
- ③ 피펫 10 mL
- ④ 마이크로피펫 200~1,000 μ L
- ⑤ 테플론막 마개 유리시험관 5 mL
- ⑥ 주사기 2 mL
- ⑦ 멤브레인필터 0.45 μ m

(나) 시약

- ① 만델산
- ② 페닐글리옥실산
- ③ 이수소화칼륨(KH_2PO_4)
- ④ 인산
- ⑤ 초산
- ⑥ 테트라하이드로퓨란(HPLC급)
- ⑦ 아세토니트릴(HPLC급)
- ⑧ 탈이온수(18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 이상)

(2) 시약 조제

(가) 표준용액

- ① 만델산, 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 인산완충용액을 조제한다.
- ② 인산완충용액, 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 멤브레인필터로 여과하여 시료를 준비한다.

(4) 액체 크로마토그래프 분석 조건

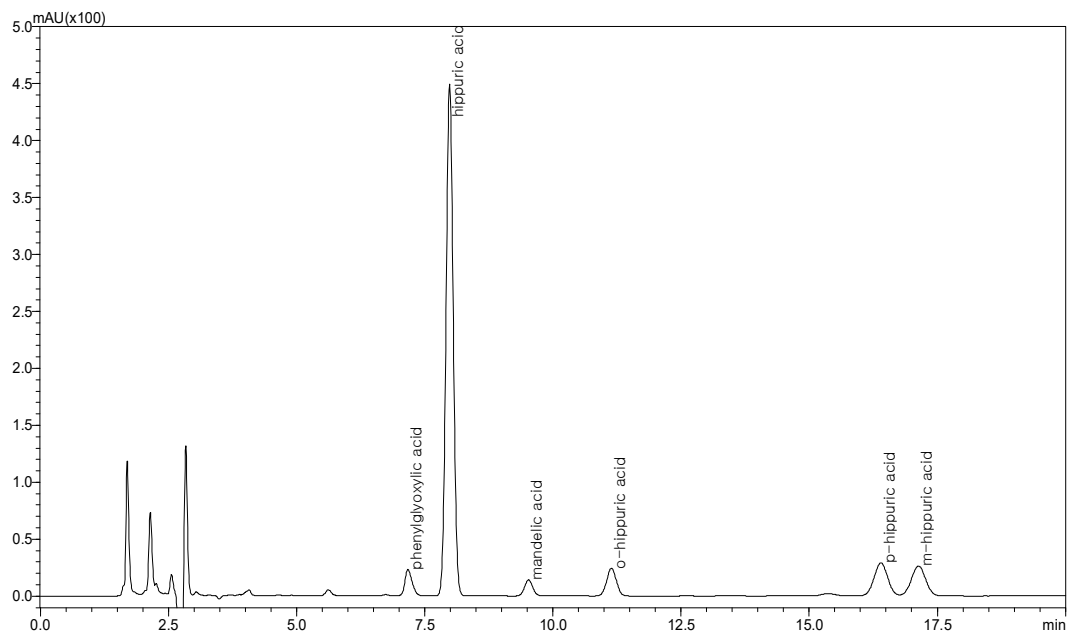
(가) 컬럼 : C₁₈, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m 입경의 컬럼,
또는 이와 동등한 수준으로 분리가 가능한 컬럼.

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

(다) 유속 : 1.2 mL/분

(라) 검출기 : 자외선검출기(225nm)

(5) 분석 결과 크로마토그램



[그림 2] 소변 시료 중 만델산, 페닐글리옥실산의 HPLC 크로마토그램

(6) 농도 계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고 시료의 피크 면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 만델산과 페닐글리옥실산의 농도(mg/L)를 각각 구한다. 만델산과 페닐글리옥실산의 농도를 합한 값을 크레아티닌으로 보정하여(mg/g크레아티닌) 스티렌의 생물학적 노출평가 결과값을 계산한다.

(7) 생물학적 노출 평가 기준

(가) 기준값 : 소변 중 만델산과 페닐글리옥실산의 합 600 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 비정상으로 간

주하여 다시 채취한다.

(8) 정밀도(예)

	농도(mg/L)	변이계수(%)*
만델산	25	2.7
	250	0.9
페닐글리옥실산	25	3.8
	250	0.8

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함.

(9) 정확도(예)

	농도(mg/L)	회수율(%)*
만델산	25	102.1
	250	99.9
페닐글리옥실산	25	101.2
	250	99.8

* 같은 농도의 시료를 7개 분석한 결과로부터 구함.

(10) 검출한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 만델산 0.7 mg/L,

소변 중 페닐글리옥실산 0.9 mg/L(S/N 비 3)²⁾

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

(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