

KOSHA GUIDE

H - 15 - 2021

수은의 생물학적 노출지표물질 분석에
관한 기술지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 장승희
- 1차 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 박종수
- 제 · 개정 경과
 - 2011년 6월 산업의학분야 제정위원회 심의(제정)
 - 2017년 6월 KOSHA Guide 산업의학분야 제정위원회 심의(1차 개정)
 - 2021년 8월 산업의학분야 표준제정위원회 심의(법령 및 규격 최신화)
- 관련규격 및 자료
 - National Institute of Occupational Safety and Health(NIOSH). Method 6009. In NIOSH Pocket guide to chemical hazards and other databases (DHHS [NIOSH] Pub. No 2000-130). Cincinnati, Ohio, NIOSH, 2018.
 - American Conference of Governmental Industrial Hygienists(ACGIH): Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 7th Ed
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 III: 납 등 중금속 10종. 연구원 2010-66-882. 2010
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침: 제1권 특수건강진단의 개요. 2020-산업안전보건연구원-349. 2020
- 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. 2020
- 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

수은의 생물학적 노출지표물질 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 수은에 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 수은에 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 일어

나는 우연오차(Random error)에 의한 분산(Dispersion)의 정도를 측정값의 변이 계수(Coefficient of variation)로 표시한다.

- (마) “정확도(Accuracy)”란 분석치가 참값에 접근한 정도를 의미한다. 다만, 인증표준물질이 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

소변과 전혈 중의 무기수은을 분석하며, 분석장비는 원자흡광분광광도계-환원기화 장치(Atomic absorption spectrometer-cold vapor generation system, AAS-CV)를 사용한다.

5. 분석방법

5.1 소변 중 수은

5.1.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

수은은 체내로 흡수된 후 2가 이온 수은으로 산화되어 체내의 여러 조직에 분포하며, 무기 수은은 소변으로 20%가 배출된다. 소변으로 무기 수은이 배출되는 반감기는 40일 정도로, 소변 중 무기수은 농도는 장기노출에 의해 축적된 정도를 반영한다. 수은은 상온에서 액체로 존재하는 금속으로, 휘발성이 매우 강하다. 따라서

AAS처럼 고온에서 회화(ashing), 원자화가 이루어지면 검출하고자 하는 수은이 모두 휘발하여(400 °C 이하) 검출되지 않는다. 수은과 산화환원반응을 하는 이염화주석을 시료에 넣은 후 발생한 수은 증기를 장비에 주입하여 분석하는 환원기화법을 사용한다.

(2) 시료채취

(가) 시료채취 시기

소변은 오염을 방지하기 위하여 하루 중 작업을 시작하기 전에 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 °C 이하에서 보관한다.

5.1.2 원자흡광광도계 환원기화법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동 피펫 10 - 1000 μ L
- ② 용량플라스크 500 mL 1 개, 100 mL 1 개, 10 mL 5 개
- ③ 마개달린 시험관
- ④ 뿔죽관(Conical tube) 50 mL
- ⑤ 뿔죽관(Conical tube) 15 mL
- ⑥ 혈액 혼합기
- ⑦ 와류혼합기
- ⑧ 초음파전처리장치
- ⑨ 초음파전처리 용기

(나) 시약

- ① 수은(표준시약, 1000 mg/L)
- ② 과염소산 마그네슘(Magnesium perchlorate) : 특급시약
- ③ 이염화주석(Tin(II) chloride dihydrate) : 특급시약
- ④ 염산 : 특급시약(검사관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑤ 질산 : 특급시약(검사관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑥ 탈이온수(18 MΩ/cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 검량선용 표준용액

- ① 100 mL 용량 플라스크에 10% 질산을 반 이상 넣고 1000 mg/L 수은 표준시약 200 µL를 가한 후 10% 질산으로 표선을 채워 2000 µg/L의 표준용액 원액을 조제한다.
- ② 표준용액 원액을 50, 100, 200, 300, 400 µL씩 10 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 10, 20, 40, 60, 80 µg/L의 검량선용 표준용액을 조제한다.

(나) 환원 시약

이염화주석 50 g, 진한 염산 37.5 mL를 500 mL 용량플라스크에 가한 후 탈이온수로 표선을 맞춘다.

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 시료는 3분간 상온에서 혈액혼합기로 잘 흔들어 사용한다.

(나) 초음파 전처리 용기를 미리 질산으로 처리하여 오염을 제거한다.

(다) 시료를 <표1>과 같이 전처리 용기에 옮긴다.

<표 1> 시료 전처리 방법

순서	물질	공시료(mL)	대조시료(mL)	시료(mL)
1	소변	-	1.0	1.0
2	탈이온수	1.0	-	-
3	진한 질산	5.0	5.0	5.0

- (라) 초음파 전처리용기의 뚜껑을 닫아 완전 밀봉한 후 초음파 전처리하여 유기물을 제거한다.
- (마) 초음파 전처리 장치에서 용기를 꺼낸 후 냉장고에서 약 1시간 식힌다.
- (바) 전처리를 마친 시료를 50 mL 뿔죽관에 담고 탈이온수로 표선을 맞춘다(장비 조건과 검체의 농도에 따라 희석 배수는 달라질 수 있다).
- (사) 장비 작동 지침에 따라 기기를 작동시키고 시료를 분석한다.

(4) 원자흡광광도계 분석 조건

- (가) 파장(Wavelength) : 253.7 nm
- (나) 슬릿 너비(Slit width) : 0.7
- (다) 신호 측정(Signal measurement) : 피크높이(Peak height)
- (라) 시료 루프(Sample loop) : 500 μ L
- (마) 주입 프로그램(Flow injection program, <표 2> 참조)

<표 2> 주입 프로그램 예

단계	시간 (sec)	펌프1 속도(mL/min)	펌프2 속도(mL/min)	밸브
안정화(Prefill)	15	100	120	채움(Fill)
1	17	100	120	채움(Fill)
2	15	0	120	주입(Inject)

(바) 시약 유속(Agent flow rate)

산(Acid channel) : 3% 염산, 유속 9-11 mL/min

환원제(Reductant channel) : 환원 시약, 유속 산 x 1/2

(5) 농도계산

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 수은의 농도(μ g/L)를 구한다. 수은의 농도값을 크레아티닌으로 보정하여(μ g/g크레아티닌) 수은의 생물학적 노출평가 결과값을 계산한다.

(6) 생물학적 노출기준

(가) 기준값 : 50 $\mu\text{g/g}$ 크레아티닌

※ 미국 ACGIH(2016) : 소변 중 무기수는 20 $\mu\text{g/g}$ 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.

(7) 정밀도 (예)

	농도(mg/L)	변이계수(%) [*]
수은	5.0	4.1
	10.0	3.9
	20.0	3.7

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(8) 정확도 (예)

	농도(mg/L)	회수율(%) [*]
수은	5.0	101.4
	10.0	99.5
	20.0	103.8

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(9) 검출 한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 수은 0.24 $\mu\text{g/L}$ (S/N 비 3)¹⁾

(나) 산출방법

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

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

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

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값

Y_i : 각 시료량에 대한 반응값

N : 표준용액 시료 수

b : 회귀방정식의 x계수

5.2 혈액 중 수은

5.2.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

수은은 체내로 흡수된 후 산화되어 2가 이온 수은이 되어 체내의 여러 조직에 분포하며, 금속 수은(Hg^0)이 짧은 시간 내에 혈액으로 이동하므로 혈중 수은은 최근의 노출을 반영한다. 수은은 상온에서 액체로 존재하는 금속으로, 휘발성이 매우 강하다. 따라서 AAS처럼 고온에서 회화(ashing), 원자화가 이루어지면 검출하고자 하는 수은이 모두 휘발하여(400 °C 이하) 검출되지 않는다. 수은과 산화환원반응을 하는 이염화주석을 시료에 넣은 후 발생한 수은 증기를 장비에 주입하여 분석하는 환원기화법을 사용한다.

(2) 시료채취

(가) 시료채취 시기

시료채취 시기는 특별히 제한하지 않는다.

(나) 시료채취 요령

- ① 근로자의 정맥혈을 수은이 포함되지 않은 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 또는 헤파린 처리된 튜브와 일회용 주사기 또는 진공채혈관을 이

용하여 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 °C 이하에서 보관한다.

5.2.2 원자흡광광도계 환원기화법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동 피펫 10 - 1000 μ L
- ② 용량플라스크 500 mL 1 개, 100 mL 1 개, 10 mL 5 개
- ③ 마개달린 시험관
- ④ 뿔죽관(Conical tube) 50 mL
- ⑤ 뿔죽관(Conical tube) 15 mL
- ⑥ 혈액 혼합기
- ⑦ 와류혼합기
- ⑧ 초음파전처리장치
- ⑨ 초음파전처리 용기

(나) 시약

- ① 수은(표준시약, 1000 mg/L)
- ② 과염소산 마그네슘(Magnesium perchlorate) : 특급시약
- ③ 이염화주석(Tin(II) chloride dihydrate) : 특급시약
- ④ 염산 : 특급시약(검사관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑤ 질산 : 특급시약(검사관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑥ 탈이온수(18 M Ω /cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 검량선용 표준용액

- ① 100 mL 용량 플라스크에 10% 질산을 반 이상 넣고 1000 mg/L 수은 표준시약 50 μ L를 가한 후 10% 질산으로 표선을 채워 500 μ g/L의 표준용액 원액을 조제한다.
- ② 표준용액 원액을 100, 200, 300, 400, 500 μ L씩 10 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 5, 10, 15, 20, 25 μ g/L의 검량선용 표준용액을 조제한다.

(나) 환원 시약

이염화주석 50 g, 진한 염산 37.5 mL를 500 mL 용량플라스크에 가한 후, 탈이온수로 표선을 맞춘다.

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 초음파 전처리 용기를 미리 질산으로 처리하여 오염을 제거한다.

(나) 시료를 <표 3>과 같이 전처리 용기에 옮긴다.

<표 3> 시료 전처리 방법

순서	물질	공시료(mL)	대조시료(mL)	시료(mL)
1	혈액	-	0.5	0.5
2	탈이온수	0.5	-	-
3	진한 질산	5.0	5.0	5.0

(다) 초음파 전처리용기의 뚜껑을 닫아 완전 밀봉한 후, 초음파 전처리하여 유기물을 제거한다.

(라) 초음파 전처리 장치에서 용기를 꺼낸 후 냉장고에서 약 1시간 식힌다.

(마) 전처리를 마친 시료를 50 mL 뿔측관에 담고 탈이온수로 표선을 50 mL로 맞춘다(장비 조건과 검체의 농도에 따라 희석 배수는 바꿀 수 있다).

(바) 장비 작동 지침에 따라 기기를 작동시키고 시료를 분석한다.

(4) 원자흡광광도계 분석 조건

(가) 파장(Wavelength) : 253.7 nm

(나) 슬릿 너비(Slit width) : 0.7

(다) 신호 측정(Signal measurement) : 피크높이(Peak height)

(라) 시료 루프(Sample loop) : 500 μ L

(마) 주입 프로그램(Flow injection program, <표 4> 참조)

<표 4> 주입 프로그램 예

단계	시간 (sec)	펌프1 속도(mL/min)	펌프2 속도(mL/min)	밸브
안정화(Prefill)	15	100	120	채움(Fill)
1	17	100	120	채움(Fill)
2	15	0	120	주입(Inject)

(바) 시약 유속(Agent flow rate)

산(Acid channel) : 3% 염산, 유속은 9-11 mL/min

환원 시약(Reductant channel) : 환원 시약, 유속은 산 유속의 1/2

(5) 농도계산

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 수은의 농도(μ g/L)를 구한다.

(6) 생물학적 노출기준

- 기준값 : 15 μ g/L

(7) 정밀도 (예)

	농도(mg/L)	변이계수(%)*
수은	5.0	5.0
	10.0	4.7
	20.0	3.3

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(8) 정확도 (예)

	농도(mg/L)	회수율(%)*
수은	5.0	102.6
	10.0	104.1
	20.0	100.7

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(9) 검출 한계

(가) 검출한계

예) 혈액 중 수은 0.18 µg/L(S/N 비 3)²⁾

(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

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