

## 염화비닐의 요중 대사물질인 thiodiglycolic acid의 분석을 위한 전처리 조건

연세대학교 의과대학 산업보건연구소, 연세대학교 보건대학원 산업보건학과\*

홍주연\* · 김치년 · 정재훈 · 장정환 · 노재훈†

### - Abstract -

#### Pretreatment method of urinary thiodiglycolic acid as metabolite of vinyl chloride

Joo Youn Hong\*, Chi Nyon Kim, Jae Hoon Jung, Jung Hwan Chang, Jaehoon Roh†

*Institute for Occupational Health, Yonsei University College of Medicine*

*Department of Occupational Health, Graduate School of Health Science and Management, Yonsei University\**

The analysis of thiodiglycolic acid in urine has been used as an index of biological exposure to vinyl chloride. Unfortunately thiodiglycolic acid has a strong hydrophilic character, because it has two carboxylic groups, so that it can only be extracted with organic solvent with a great difficulty. Underivatized thiodiglycolic acid tends to tail because of non-specific interaction with the inert support. Therefore, esterification is the obvious first choice for derivatization of thiodiglycolic acid, particularly for gas chromatography.

---

\* 본 연구의 일부는 1998년 연세대학교 산업보건연구소 연구비의 지원으로 이루어 졌음.

† 교신저자

In this study, the focus of interest is to compare two method of esterifications (methylation and silylation). Methylation is to make the methyl ester of thiodiglycolic acid by reaction with diazomethane. Silylation is to make the trimethylsilyl ester of thiodiglycolic acid by reaction with N-trimethylsilyldiethylamine.

The results and conclusions are as the following:

1. The detection limit (sensitivity) of methylated thiodiglycolic acid was  $5.00 \mu\text{g}/\text{ml}$  and silylated thiodiglycolic acid was  $3.07 \mu\text{g}/\text{ml}$  by gas chromatography with flame ionization detector.
2. The optimal liquid-liquid extraction of thiodiglycolic acid was as following:  
To each of the tubes, 15 ml of urine, concentrated sulfuric acid (pH 1 - 2) and 5 gsodium sulfate were added. The samples was extracted three times with 5 ml ethylacetate each time.
3. The methylated thiodiglycolic acid was more stable than silylated thiodiglycolic acid in extractional solvent which contained humidity.
4. The precision (pooled coefficient of variation for 4 days) of the analysis was 0.07324 in methylated thiodiglycolic acid with external standard calibration, and 0.07033 in methylated thiodiglycolic acid with internal standard calibration.
5. The precision (pooled coefficient of variation for 4 days) of the analysis was 0.10914 in silylated thiodiglycolic acid with external standard calibration, and 0.13602 in silylated thiodiglycolic acid with internal standard calibration.

From the above results, the analysis of methylated thiodiglycolic acid was more sensitive (limit of detection) than silylated thiodiglycolic acid by gas chromatography. However, the methylated thiodiglycolic acid was stable in the humidity and was separated sharply on chromatogram. Also, analysis of methylated thiodiglycolic acid was more precise (pooled coefficient of variation for 4 days) than silylated thiodiglycolic acid.

In conclusion, it is established that the analysis of methylated thiodiglycolic acid is appropriate for biological monitoring of exposure to vinyl chloride.

**Key words** : thiodiglycolic acid, vinyl chloride, gas chromatography, diazomethane, N-trimethylsilyldiethylamine.

## I. 서 론

미국 산업위생전문가협회의 (American Conference of Governmental Industrial Hygienist, ACGIH, 1998)에서는 염화비닐을 발암성물질 (A1)로 선정하고 노출기준을 8 시간 가중평균값 (TLV-TWA)  $5 \text{ ppm}$

으로 권고하고 있으며 미국산업안전보건청 (Occupational Safety and Health Administration, OSHA, 1990)에서는  $1 \text{ ppm}$  (A1)으로 정하고 있다. 또한 영국의 건강유해물질관리위원회 (Control of Substances Hazardous to Health Regulation: COSHH, 1996)에서는  $7 \text{ ppm}$ 으로 규정하고 있다. 우리 나라

노동부의 경우는 염화비닐을 발암성물질(A1)로 정하여 노출기준을 8 시간 가중평균값 1 ppm으로 규정 (노동부, 1998)하고 있어 미국 산업안전보건청과 같이 매우 엄격하게 다루고 있다. 염화비닐 수지 성형 가공공장들을 제외한 염화비닐 및 염화비닐 중합체를 제조하는 공장들은 대부분이 옥외에 설치되어 있고 장치산업으로 이루어져 있어 생산 현장 근로자들은 생산 설비관리가 주요 업무이다. 따라서 근로자들의 염화비닐에 대한 노출양상이 옥내 작업환경과 다르게 옥외 작업장의 경우는 기류에 의한 영향을 많이 받으므로 공기중 염화비닐 측정에 의한 개인 노출평가가 정확하게 이루어지기 어렵다 (노재훈 등, 1997). 또한 우리 나라와 같이 사계절이 뚜렷한 지역에서는 기온의 변화가 심하여 계절에 따라 염화비닐에 대한 시료포집량의 정밀성이 떨어질 가능성이 높기 때문에 작업환경 평가와 함께 반드시 생물학적 모니터링의 실시가 필요하다 (박윤정 등, 1998).

Baretta 등 (1969)은 호기중의 염화비닐을 포함하여 시료를 직접 가스크로마토그래피/불꽃이온화검출기 (gas chromatography/ flame ionization detector, GC/FID)로 평가하였다. 이 분석법은 감도가 불량하여 50 ppm 이상 노출되는 경우에만 가능하였다. Conkle 등 (1975)은 호기중의 염화비닐을 다단계 극저온 트랩 (multistage cryogenic trapping)을 이용하여 시료포집한 후 열탈착하여 시료를 직접 GC/FID와 가스크로마토그래피/질량분석기 (gas chromatography/mass selective detector, GC/MSD)로 분석을 하였다. 감도는 좋았으나 시료포집과 분석의 정밀성에 문제점이 제시되었다. 혈액을 이용한 생물학적 모니터링은 흰쥐를 대상으로 혈액과 조직을 메탄올-물 혼합용액으로 추출하고 항온시킨 후 headspace법으로 시료를 직접 GC/FID로 분석하였으며 혈액의 정량 한계는 5 µg/ml이었다 (Zuccato 등, 1979).

염화비닐에 대한 인체내의 대사과정은 아직까지 확실하게 평가하지 못하고 있다. 흰쥐를 대상으로 한 연구에서는 유입된 양의 69 % 정도가 24 시간 이내

에 소변으로 배출되며 추가적으로 1.7 %가 24 - 48 시간에 걸쳐 배출되는 것으로 알려져 있다 (Bolt 등, 1976). 다른 연구에서는 흰쥐에 유입된 염화비닐의 1/2이 4 시간 이내에 대사체의 형태로 배출된다고 하였으며 (Baselt, 1997; Watanabe 등, 1976) 염화비닐의 요중 대사물질로 N-acetyl-S-(2-hydroxyethyl)cysteine, TdGA 그리고 확인되지 않은 물질을 발견하였다 (Watanabe 등, 1976).

요중 TdGA의 농도는 염화비닐에 1 - 7 ppm으로 노출된 근로자들의 소변에서는 4 mg/l 까지 검출되었고 대조군의 평균 농도는 0.5 - 0.7 mg/l이었다 (Muller 등, 1978). 선진국에서는 폴리염화비닐 제조 공장 근로자들의 노출수준과 요중 TdGA의 상관성을 비교한 연구가 이미 1978년부터 실시되었으며, 그 결과 어느 정도는 양적 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다 (Muller 등, 1978; 1979a, 1979b). 그 후 이를 입증하려는 동물실험이 시작되었으며 1981년에는 고농도의 염화비닐 노출농도와 요중 TdGA 배설량 간에 양적 상관관계가 있음을 확인하였다 (Draminski와 Trojanowska, 1981).

염화비닐 2.9 - 23.5 ppm의 농도에 6 시간 노출되면 0.21 - 1.11 ppm이 호기로 배출되며 이 양은 총 흡입량의 3.60 - 4.73%로 매우 적은 양이다 (Krajewski 등, 1980). Watanabe 등 (1976)의 동물실험 연구에 따르면 10 ppm으로 6 시간 동안 노출이 되면 호기로 배출되는 양이 2 % 이하이고 주로 소변으로 70 % 이상이 배설된다. 그러나 1,000 ppm에 노출되면 대사가 포화되어 호기로 12.3 % 이상이 배출되고 소변으로 56.3 % 이하가 배설된다. 또한 5,000 ppm의 고농도로 노출되면 호기로 50 % 이상이 배출되고 소변으로 27 % 그리고 대변과 호기중의 CO<sub>2</sub>에서 소량이 발견되었다. 이러한 이유로 호기를 이용한 생물학적 모니터링의 연구 (Baretta 등, 1969; Conkle 등, 1975)는 고농도의 노출에서만 사용이 가능하여 큰 실효를 거두지 못했다. 근로자들이 염화비닐에 노출되는 농도가 점점 감소되어 1979년 이후부터는 소변을 이용한 생물학적 모니터링에 많은 관심을 가지

게 되었다.

소변을 이용한 생물학적 모니터링은 염화비닐의 요중 대사물질인 thiodiglycolic acid (TdGA)를 분석하여 평가를 하였다. 요중 TdGA를 직접 분석하는 것은 시료의 안정성이나 감도에 문제가 발생하여 대부분이 TdGA를 유도체화하여 GC/FID나 GC/MSD로 분석하였다. 기존에 발표된 대부분의 TdGA 유도체화는 디아조메탄 (diazomethane)을 이용하여 메틸화 (methylation)하는 방법 (Brakenhoff 등, 1993; Chen 등, 1983; Lingg 등, 1979; Muller 등, 1978, 1979a, 1979b; Wormhoudt 등, 1997a, 1997b)과 N-trimethylsilyl diethylamine (TMSDEA)을 이용하여 TdGA를 사일리화 (silylation)하는 방법이었다 (Draminski와 Trojanowska, 1981; Payan 등, 1993; Pettit 등, 1984; Tarkowski 등, 1980). 앞에서 언급한 요중 TdGA 분석은 유기용매 추출시의 회수율 평가, 시료의 안정성 그리고 분석의 정밀성과 시료의 저장성 등에 대한 전처리 및 분석법의 기본적인 자료들이 부족한 상태에서 사용되어 왔다. 현재까지 TdGA 분석에 관한 종합적인 내용은 Table 1과 같다

본 연구의 목적은 요중 TdGA를 GC/FID로 분석하기 위한 대표적인 유도체화 반응인 메틸화 반응과 사일리화 반응을 대상으로 염화비닐에 노출된 근로자들의 요중 TdGA 분석을 간편하고 정확하게 실시할 수 있도록 최적의 방법을 제시하는데 있다. 이를 위하여 첫째, GC/FID의 분석조건을 선정하고 GC/MSD를 이용하여 유도체화 반응을 확인한다. 둘째, 추출용매에 따른 pH와 염석효과를 평가하고 셋째, 수분이 유도체화 반응에 미치는 영향을 평가한다. 넷째, 유도체화된 분석시료의 정밀성 및 안정성을 디아조메탄과 TMSDEA를 이용하여 종합적으로 평가한다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

사일리화 유도체시약인 N-trimethylsilyldiethylamine

(TMSDEA, Lot 115H3500, Sigma, St. Louis, MO, USA)과 피리딘 (Lot 04260MZ, Sigma, St. Louis, MO, USA) 그리고 추출용매 등은 분석용 특급시약을 사용하였으며 메틸화 유도체 시약인 디아조메탄은 합성하였다 (Bore와 Backer, 1950). 디아조메탄 합성시약인 N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide (Lot 116H3721, Sigma, St. Louis, MO, USA)와 표준물질인 TdGA (Lot 86H0471, Sigma, St. Louis, MO, USA)는 분석용 특급으로 하였고 양이온 교환수지는 Dowex 50WX8-100 ion-exchange resin (Aldrich, Milwaukee, WI, USA)을 사용하였다. 유도체화된 분석시료의 분리 정량은 GC/FID (HP 6890 series plus, USA)로 분석하였으며 유도체화 반응의 확인은 GC/MSD (HP 5890/MSD 5972, USA)를 이용하였다. 디아조메탄의 합성은 단순 증류장치를 사용하였으며 실험에 사용된 시료는 소변에 TdGA를 첨가하여 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) Diazomethane을 이용한 유도체화 반응

기존에 발표된 TdGA를 디아조메탄을 이용한 메틸화 반응들 (Brakenhoff 등, 1993; Chen 등, 1983; Lingg 등, 1979; Muller 등, 1978, 1979a, 1979b; Wormhoudt 등, 1997a, 1997b)을 참조하여 유도체화 방법을 선정하였다. 유기용매에 추출된 TdGA 시료를 30 °C의 음압 건조기에서 완전히 건조시킨 후 잔여물에 메탄올 1 ml를 첨가하였다. 15 분후 1 ml의 디아조메탄과 500mg의 양이온 교환수지를 가하여 유도체화를 시킨다. 15분후 시료가 안정된 후에 GC/FID로 분리 정량하고 GC/MSD로 메틸화 반응을 확인하였다.

#### 2) TMSDEA를 이용한 유도체화 반응

기존에 발표된 TMSDEA를 이용하여 TdGA를 사일리화하는 방법들 (Draminski와 Trojanowska, 1981; Payan 등, 1993; Pettit 등, 1984; Tarkowski

Table 1, Analytical methods for determining thiodiglycolic acid in urine

Exposure material	Extraction method	Derivatizing agent	Analytical method	Detection limit	Percent recovery	Reference
Acrylonitrile	HPLC freeze dried	Boron trichloride	GC/MSD	NR	NR	Kedderis 등, 1993
Bis(2-chloroethyl) ether	Ion exchange resin column	Diazomethane	GC/MSD	NR	NR	Lingg 등, 1979
2,2'-bis-(chloroethyl)-ether	Ion exchange resin column	Diazomethane	GC/FID	NR	NR	Muller 등, 1979b
1,2-dibromoethane	Ethylacetate	Diazomethane	GC/FPD	5µg/ml	NR	Wormhoudt 등, 1997a
1,2- [ <sup>14</sup> C] dibromomethane	HPLC ethylacetate	Diazomethane	GC/MSD	NR	NR	Wormhoudt 등, 1997b
S-carboxymethyl-L-cysteine	Ethylacetate	1-pentafluorophenyl diazoethane	GC/MSD	NR	NR	Hofmann 등, 1991
1,2-dichloroethane	Ether	3-methyl-1(4-tolyl) triazene	GC/FID	NR	NR	Payan 등, 1993
Fotemustine anti-cancer agent	Ethylacetate	Diazomethane	GC/FPD	10µg/ml	NR	Brakenhoff 등, 1993
Premature babies normal urine	Freeze dried	Butanolic hydrogen chloride	GC/MSD	NR	NR	Pettit, 1986
Vinyl Chloride	Direct dried	Diazomethane	GC/FID GC/MSD	NR	NR	Muller 등, 1978, 1979 a
Vinyl Chloride	Direct dried	Diazomethane	GC/FPD	0.5µg/ml	88-95%	Chen 등, 1983
Vinyl Chloride	Ethylacetate	TMSDEA	GC/FID GC/MSD	NR	NR	Tarkowski 등, 1980
Vinyl Chloride	Ethylacetate	TMSDEA	GC/FID GC/MSD	10µg/ml	NR	Draminski와 Trojanowska, 1981

GC, gas chromatography; FID, flame ionization detector; MSD, mass selective detector; FPD, flame photometric detector; TMSDEA, N-trimethylsilyldiethylamine; NR, Not reported.

등, 1980)을 참조하여 유도체화 방법을 선정하였다. 유기용매로 추출한 TdGA 시료를 30 °C의 음압 건조기에서 완전히 건조시킨 후 잔여물에 피리딘과 TMSDEA를 1:1로 혼합한 유도체화 시약 0.2 ml를 첨가하여 반응을 시키고 GC/FID로 분리정량하고 GC/MSD로 반응을 확인하였다.

3) 추출용매에 따른 pH와 염석효과 평가

TdGA 표준용액 4 µg/ml를 조제하여 추출시의 pH와 염석효과를 평가하였다. TdGA 표준용액 15 ml를 취하여 추출용매인 에틸아세테이트와 에테르 그리고 헥산을 이용하여 5 ml씩 3 회에 걸쳐 추출하였다. TdGA 표준용액은 진한 황산으로 pH 1 - 2로 산성화하거나 수산화칼륨으로 pH 12의 알칼리상태를 맞추었으며 중성상태는 산과 염기를 가하지 않은 상태에서 실험을 하였다. 염석효과를 평가하기 위하여 액

체-액체 추출시에 일반적으로 많이 사용하는 염화나트륨 (NaCl) 또는 황산나트륨 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 수용액층에 각각 5 g을 가했을 때와 아무 물질도 첨가하지 않은 상태의 추출율을 비교 평가하였다.

#### 4) 수분이 유도체화 반응에 미치는 영향

요중 TdGA의 전처리 과정인 유기용매의 추출과정에서 적은 양의 수분이 유기용매 층으로 이동할 가능성이 있다. 이러한 유기용매 층의 수분 함유가 유도체화 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 디아조메탄과 TMSDEA를 이용하여 유도체화 반응을 진행하는 과정에서 수분함유에 대한 영향을 평가하였다. 디아조메탄과 TMSDEA 각각의 반응액 400  $\mu$ l에 수분을 0, 5, 10, 15 그리고 20  $\mu$ l를 첨가하여 수분함량이 0, 1.25, 2.5, 3.75 그리고 5 %가 되도록 하여 GC/FID로 분석을 하였다.

#### 5) 유도체화된 분석시료의 정밀성 및 안정성

반응시료의 농도를 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml 그리고 30  $\mu$ g/ml를 조제하여 프탈산을 이용한 내부 표준방법으로 메틸 에스테르화와 사일리화 반응을 각각 완료한 후에 GC/FID로 1 일에 4 회씩 4 일 동안 분석을 실시하였다. 분석결과를 외부 표준방법 (external calibration method)과 내부 표준방법 (internal calibration method)으로 계산하여 반응이 완료된 후 분석 시간 경과에 따른 분석의 정밀성 (precision)과 시료의 안정성을 비교 평가하였다.

분석의 정밀성 평가는 4 일동안의 분석결과를 이용하여 3 가지 농도 (5, 10, 30  $\mu$ g/ml)를 대상으로 각각의 변이계수 (coefficient of variation)를 계산하였다. 이 변이계수들을 이용하여 통합 변이계수(pooled-coefficient of variation)를 계산하였다. 통합 변이계수의 계산식은 다음과 같다 (OSHA, 1990).

$$pooled\ CV = \left[ \frac{\sum_{i=1}^3 f_i (CV)^2}{\sum_{i=1}^3 f_i} \right]^{1/2}$$

*pooled CV* = 통합 변이계수 (pooled coefficient of variation)

*i* = 3 가지에 대한 농도지표

*CV<sub>i</sub>* = *i* 농도에 대한 변이계수

*f<sub>i</sub>* = 자유도 (분석수 - 1)

검출한계(limit of detection, LOD)는 NIOSH (1995)에서 제시한 방법에 따라 산출하였다. 시료량과 반응 면적간의 선형회귀식( $Y = mX + b$ )을 작성하여 각 시료량에 따른 반응 기대값 (*y*)과 표준오차 (standard error of regression, *sy*)를 구하여 아래와 같은 식으로 검출한계를 구하였다.

$$LOD = 3\ sy / m$$

$$sy = \left[ \frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{(N - 2)} \right]^{1/2},$$

*N* = 표준용액 시료수, *m* = 기울기

이와 같이 구한 검출한계와 가장 낮은 표준용액의 시료량 또는 *X* 절편 (*Y*절편이 음수인 경우)을 서로 비교하여 가장 높은 값을 최종적인 검출한계로 구하였다.

## IV. 실험 결과

### 1. TdGA의 GC/FID 분석

염화비닐의 요중 대사물질인 TdGA는 에틸아세테이트를 이용하여 추출한 후에 디아조메탄과 TMSDEA를 각각 이용하여 유도체화하고 GC/FID로 분석을 하였다. 분석의 정밀성을 높이기 위하여 내부 표준물질로 *o*-phthalic acid를 사용하였으며 GC/FID 분석은 예비실험을 통하여 최적의 분석조건을 설정하였다<Table 2>.

Table 2. Gas chromatography/flame ionization detector operating conditions for derived thiodiglycolic acid

Descriptions	Conditions
Instrument	HP 6890 series plus
Detector	Flame ionization detector
Column	HP-1 capillary column(50m×0.2mm×0.33μl)
Temperature	Injection port 250 ℃ Detector 280 ℃ Column oven : 120 ℃ for 10 min 10℃/min →200 ℃ for 1 min 40℃/min →280℃ for 5 min
Carrier gas	N <sub>2</sub> 1.0 ml/min
Injection volume	1 μl
Split ratio	5 : 1

요중 TdGA를 에틸아세테이트로 추출한 후 디아조메탄을 이용하여 유도체화시켜 Table 2와 같은 GC/FID 조건으로 분석한 결과 메틸화된 TdGA의 머무름 시간 (retention time)은 12.486분이었으며 내부 표준물질인 메틸화된 프탈산의 머무름 시간은 16.812분이었다 (Figure 1). 검량방법은 통합을 5 μg/ml에서 30 μg/ml로 선정한 TdGA와 내부 표준물질로 사용한 프탈산 간의 피크 면적의 비로 내부 표준 검량식을 구하였다.

TMSDEA를 이용하여 유도체화한 후 분석한 결과의 크로마토그램은 Figure 2와 같았다. 사일리화된 TdGA의 머무름 시간은 18.512 분이었으며 내부 표준물질인 프탈산의 머무름 시간은 20.644 분이였다 (Figure 2). 통합을 3 μg/ml에서 30 μg/ml로 선정한 TdGA와 사일리화된 TdGA와 내부 표준 물질로 사용한 프탈산 간의 피크 면적의 비로 내부 표준 검량식을 구하였다 .

디아조메탄을 이용한 메틸화 반응의 검출한계는 가장 낮은 표준용액의 시료량 5.00 μg/ml 이었으며 TMSDEA를 이용한 사일리화 반응의 검출한계는 선형회귀식의 표준오차로 계산한 검출한계 3.07 μg/ml 이었다.

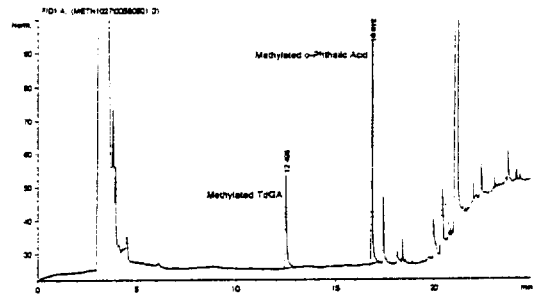


Fig. 1. Chromatogram of methylated thiodiglycolic acid and o-phthalic acid by gas chromatography /flame ionization detector

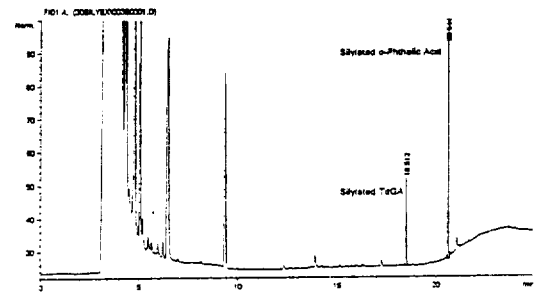


Fig. 2. Chromatogram of silylated thiodiglycolic acid and o-phthalic acid by gas chromatography /flame ionization detector

## 2. GC/MSD를 이용한 유도체화 반응 확인

디아조메탄을 이용한 메틸화 그리고 TMSDEA를 이용한 사일리화 반응을 확인하기 위하여 유도체화의 반응시료를 GC/MSD로 분석하였다<Table 3>. GC/MSD의 분리 조건은 GC/FID 분석의 컬럼온도와 동일하게 설정하여 GC/FID 분석의 머무름 시간과 GC/MSD 분석의 머무름 시간을 비교 평가하였다. 메틸화된 TdGA의 total ion chromatogram (TIC) 상에서 머무름 시간은 12.10 분으로 GC/FID의 머무름 시간 (12.498 분)과 비슷하였고<Fig. 3> mass spectra에서도 메틸화된 TdGA의 base peak 146과 M+ 178을 검출하여 메틸화 반응을 확인하였다<Fig. 4>. 사일리화의 경우는 total ion chromatogram (TIC)에서 사일리화된 TdGA의 머무름

시간이 18.08 분으로 GC/FID의 머무름 시간 (18.512 분)과 비슷하고<Fig. 5> mass spectra에서도 사일 리화된 TdGA의 base peak 73과 M<sup>+</sup> 294를 검출하여 사일리화 반응을 확인하였다<Fig. 6>.

Table 3. Gas chromatography/mass selective detector operating conditions for derived thiodihglycolic acid

Descriptions	Conditions
Instrument	HP 5890 series II-HP 5972
Detector	HP 5972 mass selective detector
Column	HP-1 capillary column(50m×0.2mm×0.33μl)
Temperature	Injection port 250 ℃ Detector 280 ℃ Column oven : 120 ℃ for 10 min 10℃/min →200 ℃ for 1 min 40℃/min →280℃ for 5 min
Carrier gas	He 1.0 ml/min
Injection	Electron impact ionization
Mass range	methylated TdGA(50 m/z - 200 m/z) silylated TdGA(50 m/z - 300 m/z)
Injection volume	2 μl
Split ration	6.9 : 1

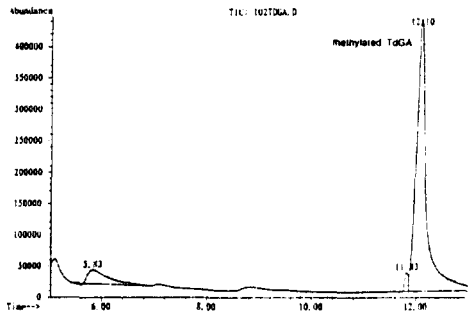


Fig. 3. Total ion chromatogram of methylated thiodiglycolic acid

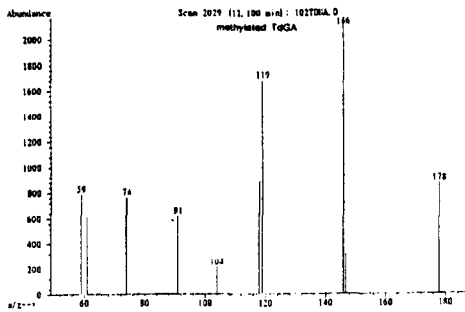


Fig. 4. Mass spectra of methylated thiodiglycolic acid

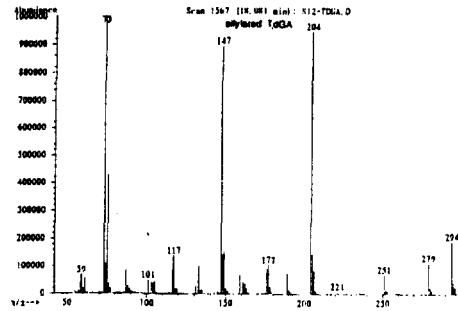


Fig. 5. Total ion chromatogram of silylated thiodiglycolic acid

### 3. 추출용매에 따른 pH와 염석효과 평가

pH (pH 1 - 2, pH 7, pH 12)와 염석효과 (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)가 추출효율에 어떠한 영향이 있는지 알아보기 위하여 TdGA 표준용액 4 μg/ml를 조제하여 에틸아세테이트와 에테르 그리고 헥산을 이용하여 추출하였다.

추출된 유기용매 층을 건조한 후 디아조메탄을 이용하여 유도체화한 후 GC/FID로 분석하고 추출율을 평가하였다. 수용액층을 중성과 알칼리성 (pH 12)으로 하였을 때는 추출용매와 염석효과에 상관없이 메틸화된 TdGA가 모두 검출되지 않아서 TdGA 수용액층을 산성 (pH 1 - 2)으로 한 결과만을 표현하였다<Table 4>.

Table 4. Extractational recovery of thiodiglycolic acid by salting-out agents and solvents in acid state(pH 1-2)

Salting out agent	Solvent	Extraction rate(%)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ethylacetate	62.85 ± 4.63*
	Ether	33.24 ± 0.88
	n-Hexane	ND
NaCl	Ethylacetate	51.29 ± 2.71
	Ether	27.27 ± 1.05
	n-Hexane	ND
not added	Ethylacetate	33.22 ± 8.44
	Ether	ND
	n-Hexane	ND

ND: Not detected

\*: Extraction rates are means of 4 determinations, Mean ± SD



수용액층을 산성으로 한 후 hexan을 이용하여 추출하였을 때는 염석제에 상관없이 모두 검출되지 않았다. 에틸아세테이트 추출에서는 황산나트륨을 첨가한 경우가 62.85%로 가장 높았으며 다음은 염화나트륨 첨가시이며 가장 낮은 추출율은 염석제를 첨가하지 않은 경우였다 ( $P < 0.05$ , by Kruskal Wallis test). 염석제를 첨가하지 않고 에테르로 추출한 경우는 검출되지 않았으며 염화나트륨 첨가보다 황산나트륨을 첨가할 때 추출율이 높았다 ( $P < 0.05$ , by Wilcoxon rank sum test).

따라서 hexan추출을 제외한 에틸아세테이트나 에테르로 추출할 경우 황산나트륨 첨가의 추출율이 가장 높았으며 추출시에 수용액층은 반드시 산성으로 하여야 하며 에틸아세테이트로 추출하는 것이 추출율을 높이는 방법이다.

#### 4. 수분이 유도체화 반응에 미치는 영향

요중 TdGA의 전처리 과정인 유기용매의 추출과정에서 적은 양의 수분이 유기용매 층으로 이동할 가능성이 있다. 이러한 수분이 유도체화 과정인 메틸화 반응과 사일리화 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 디아조메탄과 TMSDEA 각각의 반응액 400  $\mu\text{l}$ 에 수분함량이 0, 1.25, 2.5, 3.75 그리고 5 %가 되도록 하여 TdGA의 최종농도가 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 조정하여 평가하였다<Table 5>.

디아조메탄을 이용한 메틸화의 유도체반응에서는 수분 함량에 따른 영향이 없는 것으로 평가되었다 ( $P > 0.05$ , by Kruskal Wallis test).

그러나 TMSDEA를 이용한 사일리화 유도체반응은 수분에 대한 영향이 있었으며 ( $P < 0.01$ , by Kruskal Wallis test) 수분함량이 증가할수록 사일리화된 TdGA의 검출량이 줄어들었다 ( $P < 0.05$ , by Tukey test). 특히 수분 함량이 3.75 % 이상인 경우는 사일리화된 TdGA가 검출되지 않았다.

Table 5. Effect of humidity on methylation and silylation

Humidity(%)	Amount of TdGA found ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	Methylation	Silylation
0	10.0 $\pm$ 0.3* (9.683-10.405)	10.0 $\pm$ 0.55* (9.384-10.677)
1.25	10.4 $\pm$ 0.3 (9.996-10.747)	8.0 $\pm$ 0.5 (7.302-8.567)
2.5	9.1 $\pm$ 0.7 (8.371-9.996)	4.5 $\pm$ 1.1 (3.098-5.602)
3.75	9.7 $\pm$ 0.9 (9.266-10.853)	2.2 $\pm$ 1.46 (ND-3.003)
5	10.3 $\pm$ 0.8 (9.481-11.203)	ND

ND: Not detected. 검출한계 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하

\* : Amounts found are means of 4 determinations (methylated TdGA). Mean  $\pm$  SD

\*\* : Amounts found are means of 4 determinations (silylated TdGA). Mean  $\pm$  SD

#### 5. 유도체화된 분석시료의 정밀성 및 안정성

유도체화된 시료의 안정성을 평가하기 위하여 반응시료의 TdGA 농도를 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  그리고 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조제하여 디아조메탄을 이용한 메틸화의 유도체반응과 TMSDEA를 이용한 사일리화 유도체반응을 실시하였다. 반응이 완료한 후에 GC/FID 분석을 하루 간격으로 4 일 동안을 실시하여 분석결과의 정밀성과 안정성 그리고 내부 표준물질 사용의 필요성을 평가하였다.

##### 1) 유도체화된 분석시료의 정밀성

외부 표준검량에 의한 결과를 이용하여 메틸화된 시료와 사일리화된 시료의 분석 정밀성(precision)을 평가한 결과<Table 6> 메틸화된 시료는 둘째 날 (0.03463)을 제외하고 첫째 날 (0.00889), 셋째 날 (0.01706) 그리고 넷째 날 (0.00711)의 분석 정밀성이 사일리화된 시료보다 양호하게 나타났다. 또한 4 일간의 전체 통합 변이계수 값에서도 메틸화된 시료는 0.07324로 사일리화된 시료의 0.10914보다 낮아 정밀성이 좋은 것으로 평가되었다.

Table 6. Comparison between the coefficients of variations of methylation and silylation by external standard calibration

Added amounts [ $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ]	Days									
	1		2		3		4		1 - 4	
	M <sup>1)</sup>	S <sup>2)</sup>	M	S	M	S	M	S	M	S
5	0.00540*	0.09000**	0.05591	0.03747	0.02481	0.02319	0.00775	0.14674	0.11389	0.14727
10	0.00800	0.03700	0.02021	0.02013	0.01496	0.03075	0.00643	0.02850	0.03256	0.08681
30	0.01200	0.03792	0.00796	0.03729	0.00584	0.04163	0.00708	0.00525	0.04542	0.08068
Pooled CV <sup>3)</sup>	0.00889	0.06030	0.03463	0.03266	0.01706	0.03281	0.00711	0.09020	0.07324	0.10914

\* : Coefficients of variation within 4 determinations (methylated thiodiglycolic acid);

\*\* : Coefficients of variation within 4 determinations (silylated thiodiglycolic acid);

1) : Methylation                      2) : Silylation

3) : Pooled Coefficient of variation, Precision of the analytical procedure

Table 7. Comparison between the coefficients of variations of methylation and silylation by internal standard calibration

Added amounts [ $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ]	Days									
	1		2		3		4		1 - 4	
	M <sup>1)</sup>	S <sup>2)</sup>	M	S	M	S	M	S	M	S
5	0.05600*	0.09703**	0.05819	0.04556	0.03440	0.02895	0.03562	0.15625	0.11111	0.16707
10	0.05495	0.04200	0.01987	0.02067	0.01464	0.02699	0.01049	0.02362	0.02482	0.11723
30	0.01297	0.03445	0.01501	0.04512	0.00876	0.04489	0.00920	0.00444	0.04334	0.11769
Pooled CV <sup>3)</sup>	0.04591	0.06420	0.03654	0.03890	0.02217	0.03455	0.02209	0.09127	0.07033	0.13602

\* : Coefficients of variation within 4 determinations (methylated TdGA)

\*\* : Coefficients of variation within 4 determinations (silylated TdGA)

1) : Methylation                      2) : Silylation

3) : Pooled Coefficient of variation, Precision of the analytical procedure

내부 표준검량에 의한 결과를 이용하여 메틸화된 시료와 사일리화된 시료의 분석 정밀성을 평가한 결과<Table 7> 메틸화된 시료는 첫째 날 (0.04591), 둘째 날 (0.03654), 셋째 날 (0.02217) 그리고 넷째 날 (0.02209)의 분석 결과 정밀성이 사일리화된 시료보다 양호하게 나타났으며, 4 일간의 전체 통합 변이계수 값도 메틸화된 시료는 0.07033로 사일리화된 시료

의 0.13602보다 낮아 정밀성이 훨씬 좋은 것으로 평가 되었다.

메틸화된 시료의 분석결과 정밀성을 내부 표준검량법과 외부 표준검량법으로 평가하면 내부 표준검량법의 4 일간 통합 변이계수가 0.07033으로 외부 표준검량법의 4 일간 통합 변이계수 0.07324보다 낮아 정밀성이 좋았다. 그러나 사일리화된 시료는 반대로

Table 8. Comparison between the analytical recovery(%) of methylated thiodiglycolic acid and silylated thiodiglycolic acid by external standard calibration on different days

Days	Amount added (TdGA, $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	5		10		30	
	M <sup>1)</sup>	S <sup>2)</sup>	M	S	M	S
1	100.00 ± 5.40	100.0 ± 9.05	100.0 ± 0.78	100.0 ± 3.74	100.0 ± 1.19	99.34 ± 3.78
	92.04-103.66	91.94-112.96	98.97-100.82	96.93-105.29	99.02-101.52	94.83-103.86
2	93.01 ± 5.22	85.42 ± 3.23	93.99 ± 1.91	89.37 ± 1.75	92.09 ± 0.73	88.51 ± 3.30
	87.42-98.68	80.78-87.62	92.21-96.31	87.21-91.09	91.26-92.90	84.49-92.36
3	80.66 ± 2.04	77.56 ± 1.82	93.60 ± 1.40	81.29 ± 2.51	91.25 ± 0.52	84.87 ± 3.52
	78.74-83.54	75.14-79.54	92.65-95.65	79.11-84.68	90.62-91.90	83.03-90.16
4	77.39 ± 0.53	73.63 ± 10.89	93.32 ± 0.62	84.24 ± 2.45	89.45 ± 0.62	82.61 ± 0.43
	76.92-78.06	58.28-82.76	92.58-94.09	80.75-86.33	88.67-90.06	82.31-83.24

\* : Analytical recoveries are means of 4 determinations (methylated TdGA)

\*\* : Analytical recoveries are means of 4 determinations (silylated TdGA)

1) : Methylation 2) : Silylation

Table 9. Comparison between the analytical recovery (%) of methylated thiodiglycolic acid and silylated thiodiglycolic acid by internal standard calibration on different days

Days	Amount added (TdGA, $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	5		10		30	
	M <sup>1)</sup>	S <sup>2)</sup>	M	S	M	S
1	100.02 ± 5.73	100.93 ± 9.74	100.13 ± 0.55	99.98 ± 4.21	100.24 ± 1.31	99.66 ± 3.45
	91.42-102.92	92.60-114.82	99.65-100.67	96.00-105.75	99.13-101.67	95.86-104.14
2	92.85 ± 5.47	83.33 ± 3.70	95.59 ± 1.86	87.10 ± 1.78	93.25 ± 1.41	85.69 ± 3.88
	85.72-97.14	77.78-85.18	93.55-97.62	84.91-89.27	91.50-94.68	80.69-89.66
3	81.43 ± 2.86	75.93 ± 2.14	95.59 ± 1.44	77.84 ± 2.09	91.35 ± 0.80	79.48 ± 3.58
	80.00-85.72	74.08-77.78	94.57-97.62	76.20-80.56	90.23-92.11	77.24-84.83
4	78.57 ± 2.86	70.38 ± 10.90	95.33 ± 0.97	76.20 ± 1.78	90.55 ± 0.82	75.0 ± 0.35
	74.28-80.00	55.56-81.48	94.57-96.60	74.03-78.38	89.60-91.50	74.48-75.17

\* : Analytical recoveries are means of 4 determinations (methylated TdGA)

\*\* : Analytical recoveries are means of 4 determinations (silylated TdGA)

1) : Methylation 2) : Silylation

외부 표준검량법의 4 일간 통합 변이계수가 0.10914로 내부 표준검량법의 0.13602보다 낮아 정밀성이 좋은 것으로 평가되었다.

종합적으로 평가할 때 메틸화된 시료가 사일리화

된 시료보다 정밀성이 높게 나타났으며 메틸화된 시료는 내부 표준방법을 활용하는 것이 정밀성을 높이는 방법이었다.

Table 10. Comparison between external and internal standard calibration of methylated thiodiglycolic acid on different days

Days	Amount added (TdGA, $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )					
	5		10		30	
	EXT <sup>1)</sup>	INT <sup>2)</sup>	EXT	INT	EXT	INT
1	5.00 ± 0.27	5.00 ± 0.29	9.99 ± 0.08	10.01 ± 0.06	30.00 ± 0.36	30.07 ± 0.39
	4.60-5.18	4.57-5.15	9.90-10.08	9.97-10.07	29.71-30.46	29.74-30.50
2	4.65 ± 0.26	4.64 ± 0.27	9.40 ± 0.19	9.56 ± 0.19	27.63 ± 0.22	27.98 ± 0.42
	4.37-4.93	4.29-4.86	9.22-9.63	9.36-9.76	27.38-27.87	27.45-28.40
3	4.03 ± 0.10	4.07 ± 0.14	9.36 ± 0.14	9.56 ± 0.14	27.38 ± 0.16	27.40 ± 0.24
	3.94-4.18	4.00-4.29	9.27-9.57	9.46-9.76	27.19-27.57	27.07-27.64
4	3.87 ± 0.03	3.93 ± 0.14	9.33 ± 0.06	9.53 ± 0.10	26.84 ± 0.19	27.17 ± 0.25
	3.85-3.90	3.71-4.00	9.26-9.41	9.46-9.66	26.60-27.02	26.88-27.45

1) : External standard calibration

2) : Internal standard calibration

Table 11. Comparison between external and internal standard calibration of silyated thiodiglycolic acid on different days

Days	Amount added (TdGA, $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )					
	5		10		30	
	EXT <sup>1)</sup>	INT <sup>2)</sup>	EXT	INT	EXT	INT
1	5.00 ± 0.45	5.05 ± 0.49	10.00 ± 0.37	10.00 ± 0.42	29.80 ± 1.13	29.90 ± 1.03
	4.60-5.65	4.63-5.74	9.69-10.53	9.60-10.58	28.45-31.16	28.76-31.24
2	4.27 ± 0.16	4.17 ± 0.19	8.94 ± 0.18	8.71 ± 0.18	26.55 ± 0.99	25.71 ± 1.16
	4.04-4.38	3.89-4.26	8.72-9.11	8.49-8.93	25.35-27.71	24.21-26.90
3	3.88 ± 0.09	3.80 ± 0.11	8.13 ± 0.25	7.78 ± 0.21	25.46 ± 1.06	23.84 ± 1.07
	3.76-3.98	3.70-3.89	7.91-8.47	7.62-8.06	24.91-27.05	23.17-25.45
4	3.68 ± 0.54	3.52 ± 0.55	8.42 ± 0.24	7.62 ± 0.18	24.78 ± 0.13	22.50 ± 0.10
	2.91-4.14	2.78-4.07	8.08-8.63	7.40-7.84	24.69-24.97	22.35-22.55

1) External standard calibration    2) Internal standard calibration

## 2) 유도체화된 분석시료의 안정성

유도체화된 분석시료의 안정성 평가는 농도에 따른 4 일간 경과후의 메틸화된 시료와 사일리화된 시료의 회수율을 비교하였다.

외부 표준검량을 이용한 분석결과의 회수율 평가는 <Table 8> 10  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 과 30  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  농도에서는 메

틸화된 시료의 회수율이 95.22 %와 93.02 %로 사일리화 시료의 회수율 88.72 %와 88.38 %보다 높게 나타났다(P < 0.05, by Wilcoxon rank sum test). 5  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 경우는 메틸화된 시료 회수율이 87.76%로 사일리화된 시료의 회수율 84.15%보다 높았으나 통계학적으로는 유의한 차이가 없었다(P = 0.39, by Wilc-

oxon rank sum test)

내부 표준검량을 이용한 분석결과와 회수율 평가 <Table 9>는 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 메틸화된 시료의 회수율이 96.66 %, 93.85 %로 사일리화된 시료 85.28 %, 84.96 %보다 높게 나타났다( $P < 0.01$ , by Wilcoxon rank sum test). 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 경우 메틸화된 시료 회수율이 88.22 %로 사일리화된 시료의 회수율 82.64 %보다 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $P = 0.08$ , by Wilcoxon rank sum test).

### 3) 내부 표준물질 사용에 대한 효율 평가

메틸화된 TdGA를 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  그리고 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 대상으로 4 일간의 GC/FID 분석결과를 외부 표준검량과 내부 표준검량으로 평가하였다 <Table 10>. 내부 표준검량을 이용한 분석결과는 4.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 9.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 28.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 외부 표준검량을 이용한 분석결과 4.39  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 9.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 27.96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 첫째 날의 표준농도 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 근접한 값을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $P > 0.05$ , by Wilcoxon rank sum test). 이러한 결과는 메틸화된 TdGA를 정량분석할 때는 외부 표준검량을 이용하거나 내부 표준검량을 이용하여도 분석값에는 큰 차이가 없음을 설명한다.

사일리화된 TdGA를 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  그리고 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 대상으로 4 일간의 GC/FID 분석결과를 외부 표준검량과 내부 표준검량으로 평가하였다 (Table 11). 외부 표준검량을 이용한 분석결과는 4.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 26.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 내부 표준검량을 이용한 분석결과 4.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 비슷한 결과를 보여 사일리화된 TdGA를 분석할 때도 외부 표준검량을 이용하거나 내부 표준검량을 이용하여도 비슷한 결과를 얻을 수 있다.

## V. 고 찰

디아조메탄을 이용한 메틸화된 TdGA의 정량분석은 GC/FID를 이용하는 경우 (Muller 등, 1978;

Payan 등, 1993)와 GC/MSD 이용 (Lingg 등, 1979; Muller 등, 1979a, Tarkowski 등, 1980; Pettit 등, 1986; Hofmann 등, 1991; Kedderis 등, 1993; Wormhoudt 등, 1997b) 그리고 GC/FPD (Brakenhoff 등, 1993; Chen 등, 1983; Wormhoudt 등, 1997a)를 사용하였다. GC/FPD의 분석은 황에 대한 선택성이 높아 최근에 많이 사용하고 있으며 메틸화된 TdGA의 검출한계는 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Chen 등, 1993)와 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Brakenhoff 등, 1993) 그리고 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Wormhoudt 등, 1997a)로 나타났다. 본 연구에서는 일반적으로 유기물질 분석에 많이 사용하는 GC/FID를 이용하였으며 검출한계는 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 나타났다. GC/FPD로 분석한 경우는 선택성이 높아 과량의 유도체화 시약 디아조메탄의 영향은 적으나 GC/FID로 분석하는 경우는 영향이 많아 반응 완료후에 과량의 디아조메탄을 제거하는 과정을 거쳐야 한다. 본 연구에서는 Muller 등 (1978)이 사용한 양이온 교환수지를 이용하여 과량의 디아조메탄을 제거한 후 GC/FID로 분석하였다.

TMSDEA를 이용하여 사일리화된 TdGA를 정량 분석하는 것은 GC/FID를 사용하거나 (Draminski와 Trojanowska, 1981; Tarkowski 등, 1980) GC/MSD를 사용하였다 (Pettit 등, 1984). 본 연구에서는 GC/FID를 사용하였으며 검출한계는 3.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 디아조메탄을 이용한 GC/FID 분석의 검출한계 5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 양호하게 나타났다. 그러나 과량의 TMSDEA를 제거하지 않아 검출기의 오염이 자주 발견되었다. 유도체화 시약 TMSDEA를 이용하여 요중 TdGA를 GC/FID로 분석하기 위해서는 과량의 TMSDEA를 반응완료후에 용액을 완전히 건조시켜 미반응을 제거하고 재용해하여 분석을 하는 등의 분야에 대한 연구가 이루어져야 한다.

유도체화 반응을 확인하기 위하여 본 연구에서 GC/MSD로 평가한 결과 메틸화된 TdGA의 경우 mass spectra에서 M<sup>+</sup> 178과 base peak 146이 나타나 Muller 등 (1979b)의 결과와 동일하게 나타났으며 사일리화 TdGA의 경우는 M<sup>+</sup> 234와 base peak 73으

로 Draminski와 Trojanowska (1981)의 결과와 동일하였다.

요중 TdGA를 직접 분석하는 것은 시료의 안정성이나 감도에 문제가 발생한다. 따라서 TdGA를 분자량이 크고 휘발성이 있는 물질로 유도체화 시켜 GC/FID 또는 GC/FPD, GC/MSD로 분석을 하여야 한다. 기존에 발표된 TdGA의 유도체화 방법은 디아조메탄을 이용한 메틸화 반응 (Brakenhoff 등, 1993; Chen 등, 1983; Hofmann 등, 1991; Kedderis 등, 1993; Lingg 등, 1979; Muller 등, 1978, 1979a, 1979b; Payan 등, 1993; Pettit 등, 1986; Tarkowski 등, 1980; Wormhoudt 등, 1997a; Wormhoudt 등, 1997b)과 TMSDEA를 이용한 사일리화 반응 (Draminski와 Trojanowska, 1981; Pettit 등, 1984; Tarkowski 등, 1980)이 대부분을 차지하고 있다. 그러나 이 분야의 연구들에서는 추출용매에 따른 추출율과 수분이 유도체화 반응에 미치는 영향 그리고 유도체화한 후 시료분석의 정밀성 및 안정성에 대한 연구가 충분하지 않았다.

기존에 발표된 메틸화의 유도체화 방법중 소변을 산성화하고 유기용매 추출없이 음압 건조시킨 후 건조물질을 유도체화하여 분석하는 과정이 있었다 (Chen 등, 1983; Muller 등, 1979a, 1979b). 그러나 본 연구의 예비실험에서 소변 중에 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 함유된 TdGA를 조제하여 Chen 등 (1983)과 Muller 등 (1979a, 1979b)의 방법으로 전처리한 결과 메틸화된 TdGA는 검출되지 않아 소변을 직접 농축시켜 유도체화하는 것은 비휘발성의 소변을 건조하는데 많은 시간이 필요하며 특히 저농도의 요중 TdGA를 전처리하는 데는 검출에 문제가 생긴다. 본 연구에서는 액체-액체 추출법을 이용하여 추출용매에 따른 수용액층의 pH와 염석효과를 평가하였다. 요중 TdGA 추출에 사용된 유기용매는 에틸아세테이트 (Brakenhoff 등, 1993; Draminski와 Trojanowska, 1981; Hofmann 등, 1991; Tarkowski 등 1980; Wormhoudt 등 1997a; Wormhoudt 등, 1997b)가 가장 많았으며 에테르 (Payan 등, 1993)를 사용한 경우도 있었다.

본 연구에서는 염석제로 황산나트륨을 첨가한 경우 에틸아세테이트의 추출율은  $62.85 \pm 4.63 \%$  이었고 에테르는  $33.24 \pm 0.88 \%$  로 나타나 기존에 요중 TdGA 추출용매로 많이 사용한 에틸아세테이트의 추출율이 높았다. 수용액층의 pH는 산성(pH 1 - 2)을 제외한 중성 (pH 7)과 염기성 (pH 12)에서는 추출용매나 염석제에 상관없이 메틸화된 TdGA가 모두 검출되지 않았다. 요중 TdGA의 추출율을 높이기 위하여 염화나트륨을 첨가한 경우 (Draminski와 Trojanowska, 1981; Hofmann 등, 1991)가 있었다. 본 연구에서는 수용액층을 산성으로 하고 황산나트륨을 첨가하여 추출한 경우의 염석효과가 에틸아세테이트와 에테르의 추출용매에서 모두 염화나트륨보다 높았으며 아무런 염석제를 첨가하지 않고 에틸아세테이트로 추출한 경우의 추출율은  $33.22 \pm 8.44 \%$  로 황산나트륨을 첨가한 경우의 추출율 ( $62.85 \pm 4.63 \%$ )의 약 1/2에 해당되었다. 이러한 결과는 요중 TdGA를 에틸아세테이트로 추출할 때 염석제의 첨가가 매우 필요하며 기존에 사용해온 염화나트륨보다 황산나트륨을 사용하는 것이 좋다는 것을 의미한다. 디아조메탄을 이용한 메틸화의 유도체반응에서는 수분 함량 5 %에서도 영향이 거의 없었다. 그러나 TMSDEA를 이용한 사일리화 유도체반응은 수분 함량이 증가할수록 많은 영향이 있었으며 특히 수분 함량이 5%인 경우는 사일리화된 TdGA가 4개의 시료에서 모두 검출되지 않았다. 이러한 결과는 요중 TdGA를 사일리화 유도체 방법을 이용하여 분석하는 경우 유기용매 추출시에 수분이 함유되지 않도록 주의하여야 한다는 것을 제시한다. 그러나 실제로 액체-액체 추출시에는 유기용매 층에 극미량의 수분을 함유할 가능성이 높아 디아조메탄을 이용한 유도체화 방법이 요중 TdGA를 분석하는데 실용성이 높다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 유도체화 반응후 4 일 동안 분석의 정밀성과 안정성을 평가하였다. 정밀성의 평가는 통합 변이계수를 사용하였으며 내부 표준물질을 사용한 경우 메틸화 반응은 0.07324이고 사일리화 반응은

0.10914로 메틸화 반응의 정밀성이 높았으며 외부표준 검량에 의한 계산에서도 메틸화 반응은 0.07033이고 사일리화 반응은 0.13602로 역시 메틸화 반응의 정밀성이 높았다. 이러한 결과는 요중 TdGA를 디아조메탄을 이용하여 메틸화한 후 GC/FID로 분석하는 경우가 사일리화보다 정밀성이 높은 결과를 기대할 수 있으며 유도체화후 분석시간이 어느 정도 경과되어도 메틸화된 TdGA 분석은 정밀성이 유지되는 것을 알 수 있다. 유도체화된 시료의 안정성을 평가하기 위하여 4 일 동안의 분석시료의 회수율을 평가하였다. TdGA 농도 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 외부표준검량이나 내부 표준검량의 결과 모두에서 사일리화 시료보다 메틸화된 시료의 회수율이 높았으며 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 차이가 없었다. 이러한 결과는 메틸화된 TdGA가 사일리화된 TdGA보다 시간 경과에 따른 안정성이 높다는 것을 의미한다. 메틸화 반응에서는 내부 표준물질을 2-benzoxazolinone을 사용하였고 Wormhou dt 등, 1997a) 사일리화 반응에서는 프탈산 (Tarkowski 등, 1980)과 dicarboxy[ $^3\text{H}$ ]methyl sulfide -(Hofmann 등, 1991)을 사용하였다. 본 연구에서는 사일리화 반응에서 사용한 프탈산을 내부 표준물질로 사용하여 TdGA와 함께 유도체화한 후 4 일 동안 분석을 실시한 결과 메틸화 반응이나 사일리화 반응에서 내부 표준물질을 사용하지 않은 경우와 큰 차이가 없었다.

본 연구의 결과를 종합하면 염화비닐에 노출된 근로자의 요중 TdGA를 GC/FID로 분석하기 위해서는 다음과 같은 방법들을 제안한다. 시료의 추출과정은 소변의 pH를 산성으로 하고 황산나트륨을 포화되게 첨가하여 에틸아세테이트로 여러 회 추출하는 것이 추출율을 높일 수 있는 방법이다. 유도체화는 TM-SDEA를 이용한 사일리화 반응보다는 수분의 영향이 적고 시료의 정밀성과 안정성이 좋은 디아조메탄을 이용한 메틸화 반응을 사용하는 것이 실용적인 방법으로 평가되었다.

그러나 TdGA 배설은 정상인에게서도 볼 수 있는데 TdGA의 농도는 염화비닐에 노출되지 않은 사람

들에게서 평균 0.5 - 0.7  $\text{mg}/\text{l}$ 의 범위로 나타난다고 하였으며 (Muller 등, 1978), Pettit 등 (1984)과 Pettit (1986)의 연구에서는 조산아 소변중에서도 TdGA의 배설을 확인하였다. 또한 TdGA는 클로로아세트알데하이드의 소변으로 배설되는 대사물질임이 확인되었고 (Norpoth 등, 1988), 이외에 비스 2-클로로아크릴로니트릴, 1,2-디클로로에탄, 클로로아세트알데하이드 등의 대사물질로도 확인되었다 (Fennell 등, 1991; Loqueviel 등, 1997; Payan 등, 1993). 최근에는 Visarius 등 (1998)은 암치료 환자를 대상으로 한 연구에서 항암제로 사용하는 ifosfamide의 주요 대사물질로 TdGA를 확인하였다. 위의 내용을 고찰하여 보면 염화비닐의 노출평가로서 요중 TdGA 분석을 이용할 때는 노출물질이 염화비닐이외에 다른 물질들이 있는지를 확인하고 노출전후의 요중 TdGA를 평가하여 그 차이를 이용한 노출평가를 하는 방법의 타당성을 고려하여야 한다. 아울러 앞으로의 연구에서는 염화비닐에 노출후 TdGA보다 더 특이적인 대사물질이 요중으로 배설되는지를 평가하는 연구가 필요하다.

## VI. 결 론

본 연구의 목적은 요중 TdGA를 GC/FID로 분석하기 위한 대표적인 유도체화 반응인 메틸화 반응과 사일리화 반응을 대상으로 염화비닐에 노출된 근로자들의 요중 TdGA 분석을 간편하고 정확하게 실시할 수 있도록 최적의 방법을 제시하는데 있다.

1. GC/FID 분석의 검출한계는 메틸화 유도체 방법이 5.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 사일리화 유도체는 3.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 분석 감도는 사일리화를 이용하는 것이 양호하였다.

2. 액체-액체 추출시에는 수용액층의 pH를 산성 (pH 1 - 2)으로 하고 황산나트륨을 첨가하여 추출용매를 에틸아세테이트로 사용하는 것이 추출효율을 높일 수 있는 방법이다.

3. 디아조메탄을 이용한 메틸화의 유도체반응에서는 수분의 영향이 거의 없었으나 TMSDEA를 이용한 사일리화 유도체반응은 수분 함량이 증가할수록 많은 영향이 있어 사일리화 유도체반응은 전처리 방법의 다양성을 추구하기 어렵다.

4. 유도체반응이 완료된 후 4 일간의 분석의 정밀성은 메틸화된 TdGA가 사일리화한 TdGA 보다 양호하였다.

5. 4 일간의 분석 회수율을 평가한 결과 메틸화된 TdGA가 사일리화보다 양호하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

본 연구의 결과를 종합하여 GC/FID를 이용한 효율적인 요증 TdGA 분석방법을 다음과 같이 제시한다. 소변의 pH를 산성으로 하고 황산나트륨을 과량 첨가한 후 에틸아세테이트로 3 회 추출함으로써 추출율을 높인다. 유도체화 반응은 수분의 영향이 적고 시료분석의 정밀성과 안정성이 좋은 디아조메탄을 이용한 메틸화 반응이 TMSDEA를 이용한 사일리화 반응보다는 적합한 방법이며 내부 표준물질을 이용하면 더 좋은 분석 결과를 얻을 수 있다.

## REFERENCES

노동부. 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준. 노동부고시 제97-65호, 1998

노재훈, 원종욱, 김치년, 송재석, 전미령, 박윤정, 황철, 왕승준, 이상희, 김용래. 공단지역의 작업환경 평가에 관한 연구. 한국산업안전공단, 1997

박윤정, 이상희, 김치년, 원종욱, 노재훈. 공기중 염화비닐 포집시 온도가 파괴현상에 미치는 영향. 한국산업위생학회지 1998; 8(1): 115-123

American Conference of Governmental Industrial Hygienists(ACGIH). Threshold limit values and

biological exposure indices. ACGIH, Cincinnati, Ohio, 1998

Baretta ED, Stewart RD, Mutchler JE. Monitoring exposures to vinyl chloride vapor: Breath analysis and continuous air sampling. Am Ind Hyg Assoc J 1969; 30: 537

Baselt RC. Biological monitoring method for industrial chemicals. 3rd ed., Chemical Toxicology Institute, Foster City, California, 1997: 373-375

Bolt HM, Kappus H, Buchter A, Bolt W. Disposition of (1,2-<sup>14</sup>C)vinyl chloride in the rat. Arch Toxicol 1976; 35: 153-162

Bolt HM, Filser JG, Laib RJ, Ottenwalder H. Binding kinetics of vinyl chloride and vinyl bromide at very low doses. In: Quantitative aspects of risk assessment in chemical carcinogenesis. Arch Toxicol Suppl 1980; 3: 129-142

Bore THJ, Backer HJ. Diazomethane. Org Synth 1950; 30: 16

Brakenhoff JP, Commandeur JN, Lamoree MH, Dubelaar AC, Van Barr BL, Lucas C, Vermeulen NPE. Identification and quantitative determination of glutathione-related urinary metabolites of fote-mustine, a new anti-cancer agents. Xenobiotica 1993; 23: 935-947

Chen ZY, Gu XR, Cui MZ, Zhu XX. Sensitive flame-photometric-detector analysis of TdGA in urine as a biological monitoring of vinyl chloride. Int Arch Occup Environ Health 1983; 52(3): 281-284

Conkle JP, Camp BJ, Welch BE. Trace composition of human respiratory gas. Arch Environ Health 1975; 30: 290-295

Control of Substances Hazardous to Health Regulations(COSHH). Health and Safety. HSE Books. United Kingdom. 1996: 7

Doll R. Effect of exposure to vinyl chloride: An



assessment of the evidence. *Scand J Work Environ Health* 1988; 14: 61-78

Draminski W, Trojanowska B. Chromatographic determination of TdGA: A metabolite of vinyl chloride. *Arch Toxicol* 1981; 48: 289-292

Falk H, Creech JL, Health CW. Hepatic disease among workers at a vinyl chloride polymerization plant. *JAMA* 1974; 230: 59-63

Fennell TR, Kedderis GL, Sumner SC. Urinary metabolites of [1,2,3-<sup>13</sup>C] acrylonitrile in rats and mice detected by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 1991; 4(6):678-687

Hefner RE, Watanabe PG, Gehring PJ. Percutaneous absorption of vinyl chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 34: 529-532

Hofmann U, Eichelbaum M, Seefried S, Meese C. Identification TdGA, TdGA sulfoxide, and (3-carboxymethylthio)lactic acid as major human biotransformation products of S-carboxymethyl-L-cysteine. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 222-226

Hultmark D, Sundh K, Johansson L, Arrhenius E. Ethanol inhibition of vinyl chloride metabolism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1979; 25: 1-6

Kedderis GL, Sumner SC, Held SD, Batra R, Turner MJ, Roberts AE, Fennell TR. Dose-dependent urinary excretion of acrylonitrile metabolites by rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 120: 288-297

Kenneth LC, James MC, Monaem EH, Kovatch RM, Weisburger EK. Ethylene dichloride: The influence of disulfiram or ethanol on oncogenicity, metabolism, and DNA covalent binding in rats. *Fundamental Appl Toxicol* 1990; 14: 243-261

Krajewski J, Dobecki M, Gromiec J. Retention of vinyl chloride in the human lung. *Br J Ind Med* 1980; 37: 373-374

Lingg RD, Kaylor WH, Pyle SM, Tardiff G.

Thiodiglycolic acid: A major metabolite of bis-(2-chloroethyl)ether. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 47: 23-34

Loqueviel C, Malet-Martino M, Martino R. A <sup>13</sup>C NMR study of 2-(<sup>13</sup>C)-chloroacetaldehyde, a metabolite of Ifosfamide and cyclo phosphamide, in the isolated perfused rabbit heart model. Initial observations on its cardiotoxicity and cardiac metabolism. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1997; 43(5): 773-782

Muller G, Norpoth K, Kusters E, Herweg K, Versin E. Determination of TdGA in urine specimens of vinyl chloride exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1978; 41: 199-205

Muller G, Norpoth K, Wickramasinghe RH. An analytical method using GC-MS for the quantitative determination of urinary TdGA. *Int Arch Occup Environ Health* 1979a; 44: 185-191

Muller G, Norpoth K, Eckard R. Identification of S-(carboxymethyl)-L-cystein and TdGA, urinary metabolites of 2,2'-bis-(chloroethyl)-ether in the rat. *Cancer letter* 1979b; 7: 299-305

National Institute of Safety and Health(NIOSH): A NIOSH Technical report: Guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation, DHHS(NIOSH) pub. Cincinnati, Ohio, 1995; 65-66

Norpoth K, Heger M, Muller G, Mohtashanipur E, Kemena A, Witting C. Investigations on metabolism and carcinogenicity of 1,1,2-trichloroethane. *J Cancer Res Clin Oncol* 1988; 114(2): 158-162

Occupational safety and Health Administration(OSHA). Analytical methods manual 2nd ed., part 1, 1990; Vol.1: 3-4

Occupational safety and Health Administration(OSHA). Code of federal regulations. part 1910.1017, 1990

Payan JP, Beydon D, Fabry JP, Brondeau MT, Ban M, Ceaurriz J. Urinary TdGA and thioether excretion in male rats dosed with 1,2-dichloroethane. *J Appl Toxicol* 1993; 13(6): 417-422

Pettit BR, King GS, Oberholzer VG, Wilson HK. Thiodiglycolic acid in neonatal urine: An indication of novel metabolism, not toxic exposure to vinyl chloride. *Lancet* 1984; 2(8398): 359

Pettit BR. The analysis of TdGA by selected ion monitoring. *Clin Chim Acta* 1986; 156(1): 85-90

Plugge H, Safe S. Vinyl chloride metabolism. A review. *Chemosphere* 1977; 6: 309-325

Sabadie N, Malaveille C, Camus AM, Bartsh H. Comparison of the hydroxylation of benzo(a)pyrene with the metabolism of vinyl chloride, n-nitrosomorpholine, and n-nitroso-n'-methylpiperazine to mutagens by human and rat liver microsomal fractions. *Cancer Res* 1980; 40(9): 119-126

Tarkowski S, Wisniewska-Knypl JM, Klimczak J, Draminski W, Wroblewska K. Urinary excretion of TdGA and hepatic content of free thiols in rats at different levels of exposure to vinyl chloride. *J Hyg Epid Microb Immunol* 1980; 24: 253-261

Veltman G, Lange CE, Juhe S, Stein G, Bachner U. Clinical manifestation and course of vinyl chloride disease. *Ann NY Acad Sci* 1975; 246: 6-17

Visarius TM, Bahler H, Kupfer A, Cerny T, Lauterburg BH. TdGA is excreted by humans receiving Ifosfamide and inhibits mitochondrial function in rats. *Drug Metab Dispos* 1998; 26(3): 193-196

Watanabe PG, McGowan GR, Madrid EO, Gehring PJ. Fate of (14C)vinyl chloride following inhalation exposure in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976; 37: 49-59

Wormhoudt LW, Commandeur JN, Polemen JH, Abdoelgafoer RS, Maknsi A, Van Bladeren PJ, Vermeulen NP. Urinary thiodiacetic acid. A selective biomarker for the cytochrome P-450-catalyzed oxidation of 1,2-dibromoethane in the rat. *Drug Metab Dispos* 1997a; 25: 508-515

Wormhoudt LW, Hissink AM, Commandeur JN, Van Bladeren PJ, Vermeulen NP. Disposition of 1,2-[14C]dibromoethane in male wistar rats. *Drug Metab Dispos* 1997b; 26: 437-447

Zuccato E, Mancucci F, Fanelli R, Mussini E. Head-space gas-chromatographic analysis of vinyl chloride monomer in rat and tissues. *Xenobiotica* 1979; 9: 27-31