

분석 방법에 따른 요중 마노산의 분석값 비교

이미영† · 양정선

한국산업안전공단 산업안전보건연구원 직업병연구센터

(1999. 9. 15 접수)

Comparison of analytical methods of hippuric acid in urine

Mi-Young Lee† and Jeong-Sun Yang

Korea Occupational Safety and Health Agency, Industrial Safety and

Health Research Institute, Bupyeong-Ku, Incheon 403-711, Korea

(Received September 15, 1999)

요 약: 이 연구의 목적은, 톨루엔에 노출된 근로자의 생물학적모니터링에 있어 혼재하는 유기산의 종류와 분석방법에 따른 요중 마노산 분석값을 비교하여, 다른 유기산이 혼재할 경우 UV법으로 분석했을 때 일어날 수 있는 방해효과를 측정하는데 있다. 마노산만 포함된 소변 표준시료와 마노산, 메틸마노산, 페닐글리옥실산, 만델산 등 각각 다른 유기용제의 대사물이 포함된 소변 표준시료를 UV법, HPLC법으로 분석하고 유기산의 방해효과(IE; Interference Effect)를 계산하였다. 또한 이들 소변 표준시료에 대해 전국 100개 검진기관을 대상으로 한 외부정도관리 결과, 참가기관들이 사용한 분석방법에 따른 요중 마노산 분석값을 비교하였다. 톨루엔과 크실렌에 노출된 근로자의 소변을 UV법으로 분석할 경우 크실렌 대사물인 메틸마노산은 마노산 분석값에 영향을 주어, 마노산 농도 0.33 g/L에서 0.5-2.0 g/L의 농도로 공존시 60-82%의 방해 영향을 가진 것으로 나타났다. 그러나 스티렌 대사물인 만델산, 페닐글리옥실산은 마노산 분석값에 거의 영향이 없었다. 따라서 톨루엔과 크실렌이 함께 노출되는 경우 소변 모니터링시 UV법을 사용하는 것보다 GC법이나 HPLC법을 사용하는 것이 바람직하다. 특히 특수검진기관의 의무 보유장비인 GC법은 경제적이고 신속하며 정확도가 높은 방법으로 UV법에 대체하여 사용할 수 있는 것으로 나타났다.

Abstract: The aim of this study is to assess the interference effect of other organic acids to the values of hippuric acid analysed by UV method. We calculated the interference effect of several metabolites of styrene and xylene, i.e., methylhippuric acid, phenylglyoxylic acid, and mandelic acid to hippuric acid, respectively. The result of interlaboratory quality control program of urinary hippuric acid showed that there was no significant difference between the results by UV and HPLC if there were no other organic acids in urine. However, 0.5-2.0 g/L methylhippuric acid showed positive interference of 64-82% to 0.33 g/L urinary hippuric acid while mandelic acid or phenylglyoxylic acid did not show this positive effect. We suggest that HPLC or GC method is more acceptable than UV method to analyse urinary hippuric acid for biological monitoring when the worker was exposed to mixture of toluene and xylene.

Key word: Hippuric acid, methylhippuric acid, phenylglyoxylic acid, mandelic acid, GC, UV, HPLC

1. 서 론

사업장에서 사용되고 있는 유기용제 중 톨루엔은 국내 제조량이 50만톤, 사용량은 2만톤¹⁾으로, 스티렌이나

크실렌과 함께 국내 생산량, 사용량 면에서 상위를 차지하고 있다. 톨루엔의 생물학적 모니터링의 지표^{2,3)}로는 소변중 마노산이나 o-크레졸이 있는데, 국내에서는 대부분 소변중 마노산을 지표로 이용하고 있다. 유해물질 취급 근로자를 대상으로 한 특수건강진단은 노동부로부터 지정받은 약 100개의 특수건강진단기관에 의해 수행되고 있다. 이들 검진기관의 50%인 50개 기관은 소변중

†Corresponding author

Phone: 032-510-0925 Fax: 032-518-0862

E-mail: cookmom@kosha.net

마노산 분석을 자외/가시부 흡광광도계(UV)법을 이용하여 수행하고 있다. 그러나 이 방법은 톨루엔 단독 노출 시의 마노산 분석의 경우에만 적용할 수 있다. 실제 사업장에서 신나, 솔벤트 등의 이름으로 불리우는 용제의 주성분은 톨루엔이지만 크실렌 등 다른 유기용제가 혼재되어 있는 경우가 많다. 이와 같이 복합 유기용제 형태로 노출되게 되면 소변중에 톨루엔 대사물인 마노산 뿐만 아니라 크실렌 대사물인 *o*-, *m*-, *p*-methylhippuric acid 등 다른 유기산이 혼재하게 된다. 톨루엔 단독이 아닌 복합 유기용제 형태로 폭로가 이루어지는 경우 UV법으로 마노산을 분석하면 소변중에 공존하는 다른 유기산에 의하여 30-40% 과대평가될 우려가 있다. 본 연구에서는 지정된 시점에 채취된 시료에 대하여 정확한 시료분석방법을 제시하여 특수건강진단기관의 실험자들이 신뢰할 만한 분석결과를 낼 수 있도록 돕고자 한다. 이를 위하여 자외/가시부 흡광광도계(UV)법과 액체크로마토그래피(HPLC)법을 이용한 소변중 복합유기산의 분석값을 비교하여 UV법으로 복합유기산을 분석하였을 때 어느 정도까지 공존 유기산들의 영향을 받는지를 조사하였다. 또한 HPLC를 보유하고 있지 않은 검진기관의 경우 검진기관 의무보유장비인 가스크로마토그래피(GC)를 이용한 복합유기산 분석법^{4,5}을 권장하기 위하여 HPLC법과 GC법을 이용한 소변중 마노산 분석값을 비교하였다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료 및 기기

실험에 사용된 표준소변은 소정의 방법으로 조제하였고,⁶ 유기산 표준물질은 Aldrich사에서 특급 시약을 구매하여 사용하였다. UV는 Du650 spectrophotometer (Beckman, U.S.A.), HPLC는 600E pump와 484 UV detector, 717 autosampler 시스템(Waters, U.S.A.)을 사용하였으며 GC는 HP5890(Hewlett-Packard, U.S.A.)을 사용하였다. 시료의 분리를 위해 사용한 HPLC 컬럼은 Supelcosil LC-18(15cm×2.1 mm, 5 μm, Supelco, USA), GC컬럼은 HP-5(30 m×0.32 mm×0.3 μm film thickness, Hewlett-Packard, U.S.A.)이었다.

2.2. 분석법에 따른 분석값 비교

마노산 농도 0-1.45 g/L 사이가 되도록 조제한 소변 표준시료에 메틸마노산 각 이성질체, 만델산, 페닐글리옥실산 각각 0.45-2.5 g/L 사이의 서로 다른 농도를 첨

가하여 시험에 필요한 표준시료를 조제하였다. 서로 다른 농도의 마노산 표준용액을, 각각 서로 다른 농도의 유기산 존재 하에, 아래에 기술한대로 UV법, HPLC법, GC법으로 분석하여 마노산의 분석값이 어떻게 차이나는지를 비교하였다.

2.3. UV법에 의한 소변중 마노산 분석²

0.5 mL의 시료(소변이나 표준용액)에 0.5 mL의 피리딘을 가하고 0.2 mL의 benzenesulfonyl chloride를 가한 후 진탕기에서 5초 동안 섞었다. 30°C에서 30분 방치한 반응액에 3.8 mL의 에탄올을 가해 반응을 종결시키고 진탕기에서 섞은 후, 시료 대신 증류수를 사용하여 같은 조건에서 추출한 에탄올 용액을 공시료로 하여 410 nm에서 흡광도를 측정했다.

2.4. HPLC법에 의한 소변중 마노산 분석

0.2 mL의 시료에 1.8 mL의 증류수를 가하고 0.45 μm membrane filter에 여과하여 HPLC용 검액으로 하였다. 검액 1 μL를 HPLC에 주입하여 분석했다. HPLC 이동상은 37.5% 메탄올 수용액(5.5 g tetrabutylammonium bromide+1.5 g KH₂PO₄/탈이온수 1 L), 유속은 0.3 mL/min였으며 검출기의 파장은 225 nm였다.

2.5. GC법에 의한 소변중 마노산 분석

1 mL의 소변에 1 g/L hexanadecanoic acid 메탄올 용액 200 μL를 내부표준물질로 가하고 0.5 N 염산용액 200 μL와 2 mL의 에틸아세테이트를 첨가하여 20분 추출한 후 유기층을 취하여 증발 건조시켰다. 잔사에 진한 염산 5 mL와 황산나트륨 10 mg을 100 mL 메탄올에 녹여 제조한 메틸유도체화시약 1 mL를 넣고 60°C에서 40분 반응시켰다. 상온으로 냉각시킨 후 증류수 2 mL를 가해 과량의 메틸유도체화 시약을 수층으로 이행시키고 클로로포름 1 mL를 첨가하여 20분간 추출하여 클로로포름층을 GC용 검액으로 하였다. 온도 조건은 주입부 250°C, 검출기 250°C, 오븐 100°C(1분) -20°C(분) -240°C(6분)이었고, 불꽃이온화 검출기(FID)를 이용하여 시료를 검출하였다.

3. 실험결과 및 토론

3.1. UV법에 의한 마노산 분석시 공존하는 유기산의 영향 크실렌 대사물인 *o*-, *m*-, *p*-methylhippuric acid, 스

터렌 대사물인 phenylglyoxylic acid, mandelic acid 등의 다른 유기산이 마노산 검출시 interference로 작용하는 정도를 비교하기 위하여 각각 o-, m-, p-methyl hippuric acid, phenylglyoxylic acid, mandelic acid에 대하여 interference effect를 비교하였다(Table 1-5).

공존하는 유기산이 마노산 분석에 아무 영향을 주지 않는다면 HPLC법으로 분석한 결과와 UV법으로 분석한 결과는 같은 값을 갖게 된다. 즉, HA(UV) = HA

(HPLC). 그러나 interference effect가 있으면 다음과 같은 식이 성립한다.

$$\text{즉, } \text{XA(HPLC)} \times \text{IE\%} + \text{HA(HPLC)} = \text{HA(UV)}$$

XA(HPLC); Amount of organic acid determined by HPLC method

IE%; Interference effect %

HA(HPLC); Amount of hippuric acid determined by HPLC method

Table 1. Interference effect of mandelic acid (MA) on UV measurement of hippuric acid(HA) in urine

Exp.set	Measurement value(n=3)			
	MA(HPLC) (g/L)	HA(HPLC) (g/L)	HA(UV) (g/L)	IE(%)
1	0.42	0.03	0.03	1.6
	0.75	0.04	0.11	7.8
	1.44	0.01	0.05	2.0
2	0.39	0.33	0.34	3.5
	0.79	0.33	0.37	5.1
	1.25	0.33	0.30	-2.3
3	0.47	0.69	0.58	-21.2
	0.79	0.68	0.59	-9.6
	1.43	0.68	0.57	-6.5
4	0.47	1.33	1.27	-10.1
	0.81	1.35	1.30	-5.1
	1.44	1.37	1.24	-7.5

Table 2. Interference effect of phenylglyoxylic acid (PGA) on UV measurement of hippuric acid(HA) in urine

Exp.set	Measurement value(n=3)			
	PGA(HPLC) (g/L)	HA(HPLC) (g/L)	HA(UV) (g/L)	IE (%)
1	0.43	0.00	0.03	6.1
	0.79	0.05	0.11	7.2
	1.33	0.01	0.05	2.8
2	0.46	0.33	0.34	3.0
	0.76	0.33	0.31	-2.6
	1.44	0.33	0.35	1.4
3	0.44	0.71	0.65	-10.5
	0.81	0.74	0.70	-3.6
	1.36	0.69	0.68	-0.7
4	0.43	1.41	1.35	-11.6
	0.81	1.45	1.32	-13.1
	1.42	1.48	1.40	-4.9

Table 3. Interference effect of o-methylhippuric acid (o-mHA) on UV measurement of hippuric acid(HA) in urine

Exp.set	Measurement value(n=3)			
	o-mHA(HPLC) (g/L)	HA(HPLC) (g/L)	HA(UV) (g/L)	IE (%)
1	0.37	0.01	0.35	99.5
	0.73	0.05	0.50	66.2
	1.22	0.01	0.68	59.0
2	0.50	0.33	0.65	63.7
	0.97	0.33	1.05	74.0
	1.52	0.33	1.41	71.0
3	0.39	0.69	0.82	38.2
	0.71	0.71	1.03	49.1
	1.22	0.69	1.27	50.9
4	0.39	1.42	1.39	-8.0
	0.78	1.48	1.69	30.5
	1.22	1.39	1.84	40.3

Table 4. Interference effect of p-methylhippuric acid (p-mHA) on UV measurement of hippuric acid(HA) in urine

Exp.set	Measurement value(n=3)			
	p-mHA(HPLC) (g/L)	HA(HPLC) (g/L)	HA(UV) (g/L)	IE (%)
1	0.41	0.01	0.30	77.3
	0.90	0.05	0.57	62.2
	1.13	0.01	0.61	56.9
2	0.51	0.33	0.63	59.4
	1.98	0.33	1.11	79.9
	2.00	0.33	1.59	63.2
3	0.41	0.66	0.65	-2.3
	0.82	0.74	0.88	18.4
	1.27	0.70	1.13	36.0
4	0.47	1.42	1.38	-9.3
	0.89	1.45	1.84	47.5
	1.39	1.41	1.83	32.6

Table 5. Interference effect of m-methylhippuric acid (m-mHA) on UV measurement of hippuric acid(HA) in urine

Exp.set	Measurement value(n=3)			
	m-mHA(HPLC) (g/L)	HA(HPLC) (g/L)	HA(UV) (g/L)	IE (%)
1	0.77	0.02	0.53	72.1
	1.46	0.06	1.00	69.6
	2.34	0.04	1.53	68.7
2	0.60	0.33	0.78	75.6
	1.17	0.33	1.29	81.8
	1.84	0.33	1.69	74.0
3	0.70	0.67	0.89	34.2
	1.37	0.74	1.24	39.5
	2.27	0.73	1.81	51.3
4	0.81	1.43	1.35	-10.8
	1.45	1.45	1.79	25.2
	2.46	1.44	2.43	42.9

HA(UV); Amount of hippuric acid determined by UV method

그러므로,

$$IE\% = \frac{HA(UV) - HA(HPLC)}{HA(HPLC)} \times f, f = \frac{fw \text{ of } XA}{fw \text{ of } HA}$$

여기서 XA는 MA(mandelic acid), PGA(phenylglyoxylic acid), o-, m-, p-methylhippuric acid의 5종이며 f는 각 유기산의 hippuric acid에 대한 분자량비이다.

Table 1-5에서 스티렌 대사물질인 페닐글리옥실산과 만델산은 UV법에 의한 마노산 분석에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났으나 크실렌 대사산물인 o-, m-, p-

메틸마노산은 마노산과 공존할 때 60-82%의 positive interference를 나타내었다(마노산 0.33 g/L). 따라서 톨루엔과 크실렌에 함께 폭로되는 경우 대사산물 분석은 UV법 보다 HPLC법으로 분리 정량하는 것이 더 적절할 것이다.

3.2. 복합유기용제 대사산물 분석의 실험실간 정도관리 결과

산업안전보건연구원에서는 1995년부터 특수건강진단 기관을 대상으로 생체지표물질 분석정도관리를 실시해 왔다. 현재 유기용제 대사산물의 경우 가장 기본적인 항목인 소변중 마노산 분석을 필수 항목으로 채택하고 있다. 1995년초 조사된 자료에 의하면 총 86개 기관중 60%의 기관이 UV법으로 마노산을 분석하였고,^{7,8} 1999년 9월 현재 49%의 기관에서 UV법을 이용한 소변중 마노산 분석을 하고 있다. 소변중 마노산은 산업안전보건연구원에서 제조하는 표준시료와 같이 마노산만을 주로 포함하는 소변에서는 분석 결과가 HPLC법과 UV법이 크게 다르지 않았다(Table 6).

그러나 사업장에서는 톨루엔 단독으로 노출되는 경우보다 다른 유기용제와 함께 노출되는 경우가 많으며 이때 공존하는 유기산은 UV법에 의한 마노산 분석시 positive interference로 작용하게 되어 마노산 농도가 과대평가된다. 복합유기용제에 노출된 근로자의 소변과 가장 유사한 조성으로 조제된 표준시료를 가지고 실시한 외부정도관리 프로그램의 결과는 이와 같은 사실을 뒷받침해 준다. 공존하는 다른 유기산은 UV법으로 분리 분석이 안되므로 단지 2개 기관만이 UV법으로 혼합유기용제 대사산물 중 마노산 분석에 참가하였다. Table 7에 그 결과를 실었으며 공존하는 유기산의 존재는 마노산 분석에 큰 영향을 준 것으로 나타났다.

Table 6. Interlaboratory comparison of analytical values of HA in standard reference samples which contain only HA(1999 Fall, the 10th round robin)

Consensus value(g/L)	HPLC method			UV method			Ratio (HPLC/UV)
	Mean(±SD)	No. of data	No. of outlier(%)	Mean(±SD)	No. of data	No. of outlier(%)	
0.54	0.51±0.03	17	2(11.8)	0.56±0.06	18	4(22.2)	0.91
0.75	0.74±0.03	20	0(0.0)	0.76±0.04	17	0(0.0)	0.97
1.06	1.05±0.04	27	0(0.0)	1.08±0.03	11	0(0.0)	0.97
1.27	1.28±0.07	15	0(0.0)	1.26±0.10	21	3(14.3)	1.02
1.59	1.57±0.05	17	0(0.0)	1.59±0.15	20	4(20.0)	0.99
2.31	2.31±0.10	21	0(0.0)	2.32±0.09	14	0(0.0)	1.00

Table 7. Interlaboratory comparison of analytical values of HA in standard reference samples which contain HA and other organic acids(1996 Fall, the third round robin)

Consensus value(g/L)	HPLC method			UV method		
	Mean(±SD)	No. of data	No. of outlier	Mean(±SD)	No. of data	No. of outlier
0.653	0.653±0.253	17	0	1.062±0.04	2	1(50%)
1.318	1.318±0.332	17	0	2.253±0.12	2	1(50%)

과대평가되는 정도는 공존하는 유기산의 종류와 농도에 따라 달라지며 복합유기용제에 노출된 근로자의 생물학적 모니터링 결과를 해석할 때 이러한 공존 유기산의 영향을 반드시 고려해야 한다. 특히 UV법으로 분석한 경우 공존 유기산의 영향이 어느 정도인지 전혀 알 수가 없으므로 HPLC에 관한 자료가 없다면 작업환경측의 자료를 참고하여 유기산을 대사산물로 가지는 다른 유기용제에 어느 정도 노출되었는가를 살펴야 한다.

따라서 현재 특수검진 항목의 하나로 시행되고 있는 소변중 마노산 분석이 UV법으로 이루어졌다면, 이 수치는 툴루엔이 아닌 다른 유기용제와 함께 노출되고 있는 사업장의 경우, 총 복합유기용제에 노출되는 개략적 양을 어느 정도 반영하는 참고 수치에 불과하며, HPLC로 이루어진 마노산 분석값과는 전혀 다른 의미를 지니게 된다.

한편, 특수건강진단기관은 시설장비기준에 의하여 GC를 갖추도록 되어 있고, GC법에 의해서도 공존하는 유기산의 분리분석이 가능하므로, GC를 이용한 소변중 마노산 분석을 권장하고자 HPLC와 GC법에 의한 소변중 마노산 분석 결과를 비교하였다(Table 8). 0.54-2.31 g/L의 마노산 농도 범위에서 HPLC법의 분석값 오차범위가 0.3-4.6%, GC법의 경우는 1.7-3.9%로, 두 방법에 의한 오차 범위가 유사하여, HPLC를 보유하고 있지 않은 기관에서는 기존의 GC를 이용하여 혼합유기용제 중의 마노산 분석을 방해물질의 영향 없이 정확히 분석할 수 있다.

Table 8. Comparison of analytical values of urinary HA in standard reference sample by GC and HPLC

Samle No.	Reference value(g/L)	Measured value(±SD)	
		GC(Error,%)	HPLC(Error,%)
1	0.54	0.52(-2.8)	0.54(0.3)
2	0.73	0.74(1.9)	0.74(0.8)
3	1.01	1.03(2.2)	1.03(1.9)
4	1.27	1.22(3.8)	1.32(3.5)
5	1.56	1.62(3.9)	1.60(2.5)
6	1.59	1.55(2.7)	1.63(2.4)
7	1.85	1.91(3.0)	1.91(3.5)
8	2.31	2.27(1.7)	2.42(4.6)

나타났으나 크실렌 대사산물인 o-, m-, p-메틸마노산은 마노산 농도 0.33 g/L에서 0.5-2.0 g/L의 농도로 공존시 60-82%의 방해 영향을 가진 것으로 나타났다. 따라서 툴루엔과 크실렌에 함께 폭로되는 경우 대사산물 분석은 UV법보다 HPLC법으로 분리 정량하는 것이 더 적절할 것이다. 또한 복합유기용제에 노출된 작업자의 소변을 GC법과 HPLC법으로 분석한 분석값을 비교한 결과 마노산 0.52-2/42 g/L 농도범위에서 두 분석값 간의 변이는 평균 3.2%였다. GC법은 정확도가 높고 유도체화 반응에 사용되는 시약도 흔히 구할 수 있으며, 반응과정도 비교적 간단하므로 HPLC를 가지고 있지 않은 기관에서는 복합유기산 분석에 UV법으로 대체하여 적용할 수 있는 방법으로 생각된다.

4. 결 론

참고문헌

UV법에 의한 마노산 분석시, 복합유기용제의 대사물로 소변중에 공존하는 다른 유기산들이 마노산 분석값에 미치는 영향을 조사한 결과, 스티렌 대사물인 페닐 글리옥살산과 만델산은 거의 영향을 주지 않는 것으로

1. '93 제조업체 작업환경 실태조사, 한국산업안전공단 기술자료 위생 94-4-73 (1994).
2. NIOSH analytical method, 3rd edition, No. 8300 (1984).
3. WHO/HPR/OCH, Biological monitoring of chemical

- exposure in the workplace; Toluene (1993).
4. D. Carvalho, *et al.*, *Int. Arch. Occp. Environ. Health*, **63**, 33-37 (1991).
 5. 조수현 외 5인, *대한산업의학회지*, **7**(1), 58-62 (1995).
 6. 양정선 외 3인, *노중 유기용제 대사산물의 분석을 위한 표준시료의 제조방법*, 특허 제165621호 (1998).
 7. 양정선, 근로자 특수건강진단 방법 및 평가; 한국산업안전공단 세미나자료 95-1-1 (1995).
 8. 양정선, 생물학적 모니터링에 관한 분석정도관리 프로그램, 산업안전보건연구원 연구자료 센터 95-4-21 (1995).