

Monolithic 칼럼을 이용한 뇨 중 유기용매 대사체의 신속한 HPLC 동시 분석

한상범¹ · 이상주¹ · 이철우¹ · 윤서현^{1,2} · 정선경^{1,3} · 염정록^{1*}

¹중앙대학교 약학대학, ²수도약품(주), ³바이오코어(주) 신약개발지원사업부
(2006. 8. 23. 접수; 2006. 9. 18. 승인)

Rapid and simultaneous determination of metabolites of organic solvents in human urine by high-performance liquid chromatography using a monolithic column

Sang Beom Han¹, Sang-Ju Lee¹, Cheol-Woo Lee¹, Seo Hyun Yoon^{1,2},
Sun Kyung Joung^{1,3} and Jeong-Rok Youm^{1*}

¹College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

²Dept. of Drug Development, SudoPharm. Ind. Co., Ltd., Seoul 135-090, Korea

³Dept. of Drug Development Supporting Service, BioCore Co., Ltd., Seoul 137-130, Korea

(Received August 23, 2006; Accepted September 18, 2006)

요 약: 본 연구에서는 톨루엔, 크실렌, 스티렌 등의 폭로에 대한 측정지표로서 체내에서 대사되어 뇨로 배설되는 마노산, 메틸마노산, 만델산과 페닐글리옥실산에 대한 신속한 동시분석법을 개발하였다. 일반 충전형 ODS 칼럼과 달리 빠른 유속에서도 고분리능을 구현할 수 있는 monolithic 칼럼을 사용하였고, 이동상으로는 ion-pairing reagent인 tetrabutylammonium bromide 5.5 g과 potassium phosphate monobasic 1.5 g을 증류수 1 L에 녹인 후, 메탄올 0.6 L와 혼합하여 조제한 것을 사용하였으며, 유속 2.4 mL/min에서 분석한 결과, 6종의 유기용매 대사체들을 2.5분 이내에 검출하였다. 일정 농도 범위 내에서 6종 화합물 모두 검량선의 상관계수(r^2)가 0.9993 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 각 화합물별로 5가지 농도에 대하여 하루에 5번 반복 실험하여 구한 일내 정밀성 %C.V.와 정확성은 0.01~7.32%, 83.9~116.3%이고 5일간 반복 실험하여 구한 일간 정밀성 %C.V.는 0.01~7.16%이다. 본 분석법은 뇨 중 유기용매 대사체의 분석에 필요한 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 가지며, 한국산업안전공단 산하 산업안전보건연구원 직업병연구센터의 정도관리 소변시료를 분석 비교하여 그 신뢰성을 확보하였다.

Abstract: A HPLC/UV method was developed and validated for the rapid and simultaneous determination of urinary metabolites of organic solvents, mandelic acid, hippuric acid, phenylglyoxylic acid, ortho-, meta- and para-methylhippuric acid, using a monolithic column. The mobile phase was composed of tetrabutylammonium bromide as ion-pairing reagent with a flow rate of 2.4 mL/min. The total run time was less than 2.5 min for all six analytes. Good linearities were obtained for all the metabolites with correlation coefficients above 0.9993. Intra-day precision, accuracy and inter-day precision was 0.01~7.32%, 83.9~116.3% and 0.01~7.16%,

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-820-5601 Fax : +82-(0)2-3280-5596

E-mail: youmjr@cau.ac.kr

respectively. The method was validated and confirmed by quantification of the quality assurance samples of Industrial Safety and Health Research Institute, Korea Occupational Safety and Health Agency.

Key words: monolithic column, urinary metabolites, organic solvents, HPLC

1. 서 론

톨루엔, 크실렌, 스티렌 등의 유기용매는 도장업, 인쇄업, 세탁시설, 유기합성공업 및 석유정제공업 등에 많이 사용되고 있으며, 차량배기 가스로도 많이 발생되고 있다.¹ 유기용매는 주로 호흡기를 통하여 폐에서 혈액과 체내로 흡수되며, 혈액에 용해된 유기용매는 장기로 옮겨가 조직으로 분산된다. 휘발성인 유기용매는 호흡에 의해 일부 배설되고, 흡수된 유기용매의 대부분은 주로 간에서 대사되어 노 중으로 배설된다.²

벤젠보다는 독성이 덜하여 벤젠의 대체물질로 많이 사용되고 있는 톨루엔은, 체내에 흡수되면 간에서 대사되어 주로 메틸기가 산화되고 그 다음에 글리신과 포함되어 노 중으로 마노산(60%)과 ortho-, meta-, para-크레졸(1%)의 형태로 대사된다.³ 크실렌은 그 자체가 ortho-, meta-, para-크실렌의 이성질체를 가지고 있으며, 체내에 흡수되어 대사되면 두 개의 메틸기 중 한 개가 산화되고 그 다음에 글리신과 포함되어 노 중으로 각각 ortho-, meta-, para-메틸마노산(95%)으로 대사된다.⁴ 스티렌은 플라스틱, 수지, 합성 고무의 원료가 되는 유기용매로, 인체에 흡수될 경우 비닐기가 산화되어서 대부분이 만델산(85%), 페닐글리옥실산(10%)으로 대사된다. 또한 스티렌은 벤조산으로 대사

되어 글리신과 포함하고, 노중 마노산으로 배설되기도 한다.⁵ 만델산과 페닐글리옥실산은 에틸벤젠, 스티렌 글라이콜, 스티렌옥사이드, 아세토페논, 페닐글라이신, 알파-페닐-아미노아세트산 등과 같이 화학적 구조가 비슷한 물질들이 대사하여도 노 중에 존재하므로 주의가 필요하다(Fig. 1).

톨루엔, 크실렌, 스티렌 등의 유기용매 대사체의 기기분석법으로는 현재까지 UV spectrophotometry⁶, CZE(capillary zone electrophoresis)^{7,8}, HPLC(high performance-liquid chromatography)⁹⁻¹², GC-FID(gas chromatography-flame ionization detector)¹³⁻¹⁵, GC-MS(gas chromatography-mass spectrometry)¹⁶, LC-MS(HPLC-mass spectrometry), LC-MS/MS(HPLC-tandem mass spectrometry)^{17,18} 등과 같이 다양한 분석법이 연구되어 왔다.

톨루엔, 크실렌, 스티렌 등의 유기용매 대사체는 벤젠환을 이루고 있기 때문에 자외부 흡광을 잘하여, UV spectrophotometry로 정량이 용이하나, 선택성이 없다는 치명적인 단점을 가지고 있다. 따라서, HPLC를 이용하여 원하는 대사체를 칼럼으로 분리한 후 UV 검출기를 이용하여 분석하는 방법이 시험의 안정성, 감도, 간편성 등을 만족시켜 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 방법이다. 하지만 ortho-, meta-,

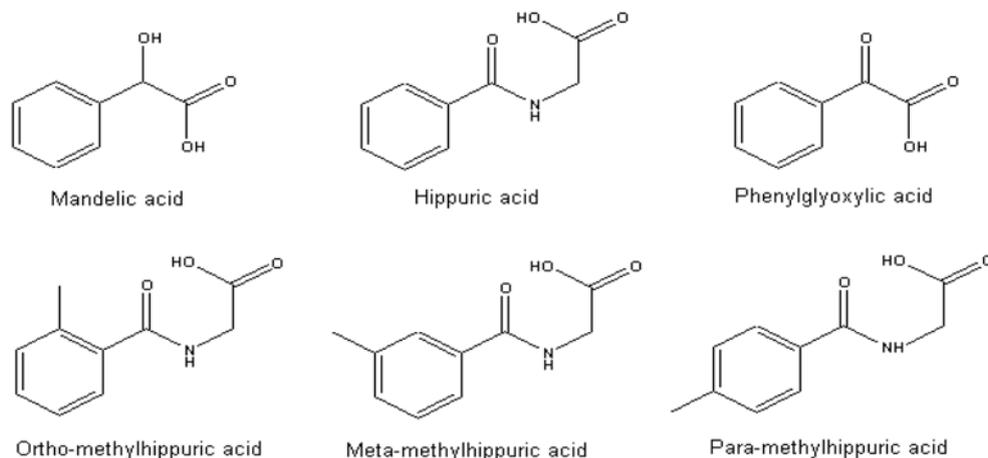


Fig. 1. Chemical structures of urinary metabolites of toluene, xylene and styrene.

para- 이성질체에 대한 분리능이 좋지 않고, 매우 미량으로 존재하는 대사체를 동시에 고감도로 분석할 수 없다는 단점을 가지고 있다. GC 분석법은 HPLC 분석법에 비하여 분리능과 감도가 좋아, 다양한 유기용매 대사체를 동시에 분석할 경우 또는 ortho-, meta-, para-메틸마노산의 이성질체를 정확하게 정량할 경우에 사용되고 있으나, 대상 성분들이 휘발성이 없으므로 분석하기 전에 시료를 유도체화 반응시켜야 한다는 단점이 있다. LC-MS/(MS) 분석법은 각 성분에 대한 높은 선택성과 고감도 및 빠른 분석시간, 전처리 용이성 등으로 HPLC 분석법과 GC 분석법의 장점을 모두 가지고 있는 방법이다. 하지만 분석 장비가 매우 고가이어서 아직까지는 범용으로 사용하기가 어렵다는 단점이 있다.

본 연구에서는 뇨 중 유기용매 대사체의 분석으로 GC 분석법의 복잡한 유도체화 과정을 피할 수 있고, 고가의 분석 장비를 갖춰야 하는 LC-MS/(MS) 분석법보다 쉽게 사용할 수 있는 HPLC 분석법의 개선을 통해 신속한 분석법을 확립하고자 하였다. 최근에 그 활용성이 증가하고 있는 monolithic 실리카 칼럼^{19,26,29}을 사용하면 보통의 역상 칼럼과 비교하여 매우 짧은 시간 안에 분석이 가능하다. 이는 다공성 막대 형태의 고정상이 충분한 표면적을 가져 좋은 분리능을 나타내면서, 충전형의 칼럼과 달리 압력이 낮게 걸려 고속의 유량이 사용 가능하기 때문이다. 따라서, 시료가 많고 신속한 분석이 요구되는 임상시험시료 중의 약물농도 분석, 품질관리를 위한 약물제제 중의 분석, 천연물 제제 중의 유해성분 및 활성 성분 분석, 기타 환경시료, 식품 중의 유해성분 분석 등에 그 활용도가 급격히 증가하고 있다. 본 연구에서는 monolithic 칼럼을 뇨 중 유기용매 대사체의 HPLC 분석법에 적용하여, 그 분석조건을 확립하였고 분석법에 대한 검증(validation)도 실시하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

마노산(Hippuric acid, 98%), 만델산(Mandelic acid, 99%), 페닐글리옥실산(Phenylglyoxylic acid, 97%), ortho-, meta-, para-메틸마노산(2-, 3-, 4-Methylhippuric acid, 각 98%)의 표준품과 이동상에 ion-pairing reagent로 사용한 tetrabutylammonium bromide(TBABr, 99%)는 각각 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 시판품을 사용하였다. 이동상의 buffer 용액을 만들기

위해 사용한 potassium phosphate monobasic은 Merck Co.(Darmstadt, Germany)의 시판품을 사용하였으며, HPLC용 메탄올은 Fisher Scientific Co.(Fair Lawn, NJ, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 특급 및 1급 시약을 사용하였다. 증류수는 PURE-UP (Chem-Science, USA)에서 18 MΩ/cm로 여과한 것을 사용하였다. 특수건강진단 정도관리규정(노동부고시 제2004-17호)에 따른 유기분석분야의 정도 관리 소변 시료는 한국산업안전공단(KOSHA) 산하 산업안전보건연구원 직업병연구센터로부터 제공받았다.^{27,28}

HPLC용 펌프로 Hitachi L-2130 low-pressure gradient pump(Hitachi, Tokyo, Japan)를, 주입기는 Hitachi L-2200 자동주입기를, 칼럼 오븐으로는 Hitachi L-2300을, UV 검출기로는 Hitachi L-2400 등을 사용하였다. HPLC 칼럼은 Chromolith Performance RP-18e (100×4.6 mm, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 데이터 처리장치로는 EZChrome Elite(Ver. 3.1.3)을 사용하였다.

2.2. 표준검량선 작성

마노산, 만델산, 페닐글리옥실산, ortho-, meta-, para-메틸마노산 표준품을 정밀하게 취하고 증류수에 녹여, 농도가 각각 125 ppm, 45 ppm, 25 ppm, 25 ppm, 25 ppm, 25 ppm이 되도록 표준용액을 조제하였다. 이 표준용액을 증류수로 희석하여 마노산의 농도가 1~125 ppm, 만델산은 0.72~45 ppm, 페닐글리옥실산은 1~25 ppm, ortho-, meta-, para-메틸마노산 이성질체는 각 1~25 ppm, 0.2~25 ppm, 0.4~25 ppm의 농도범위가 되도록 검량선용 표준용액을 조제하고 필터한 후, 20 μL를 HPLC/UV에 주입하였다. 여기에서 얻은 각 표준용액의 농도 대 피크 면적으로 검량선을 작성하였다.

2.3. HPLC 조건 최적화 및 분석법 검증

뇨 중 유기용매 대사체인 마노산, 만델산, 페닐글리옥실산, ortho-, meta-, para-메틸마노산의 분석은 이미 보고된 HPLC 분석법²⁹을 참고하여 이동상 조성, 유속과 칼럼 온도 등을 변화시키며 최적화하였다. 그 결과 전처리된 뇨 시료는 다음의 조건에서 정량하였다. 이동상으로는 tetrabutylammonium bromide 5.5 g과 potassium phosphate monobasic 1.5 g을 증류수 1 L에 녹인 후, 메탄올 0.6 L와 혼합하여 조제한 것을 사용하였다. 칼럼은 Chromolith Performance RP-18e(100×4.6 mm)를 사용하였으며, 유속은 2.4 mL/min, 칼럼

온도로 30°C(±1°C 이내)를 유지하였고, UV 검출과장은 225 nm에서 등용매용리(isocratic elution)하였다. 하루에 실험을 5번 반복 시행하여 일내 재현성과 정확성을 구하였고, 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

2.4. 정도관리 시료의 처리 및 농도 계산

한국산업안전공단 산하 산업안전보건연구원 직업병 연구센터로부터 제공받은 정도관리 시료는 -80°C 이

하의 냉동고에 보관하였고, 분석시 실온에 방치하여 녹인 후 약 0.5분간 탁상용 혼합기에서 잘 섞은 다음, 0.5 mL를 취하여 glass tube에 옮기고 증류수로 20 배 희석한 후, 4000 rpm에서 5 분간 원심분리하고 상징액 20 μ L를 취하여 HPLC/UV에 주입하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 마노산, 만델산, 페닐글리옥실산, ortho-, meta-, para-메틸마노산의 각 피크를 확인하고 피크 면적을 구하였으며, 희석비를 계산하여 검량선으로부터 뇨 중 유기용매 대사체의 농도를 구하였다.

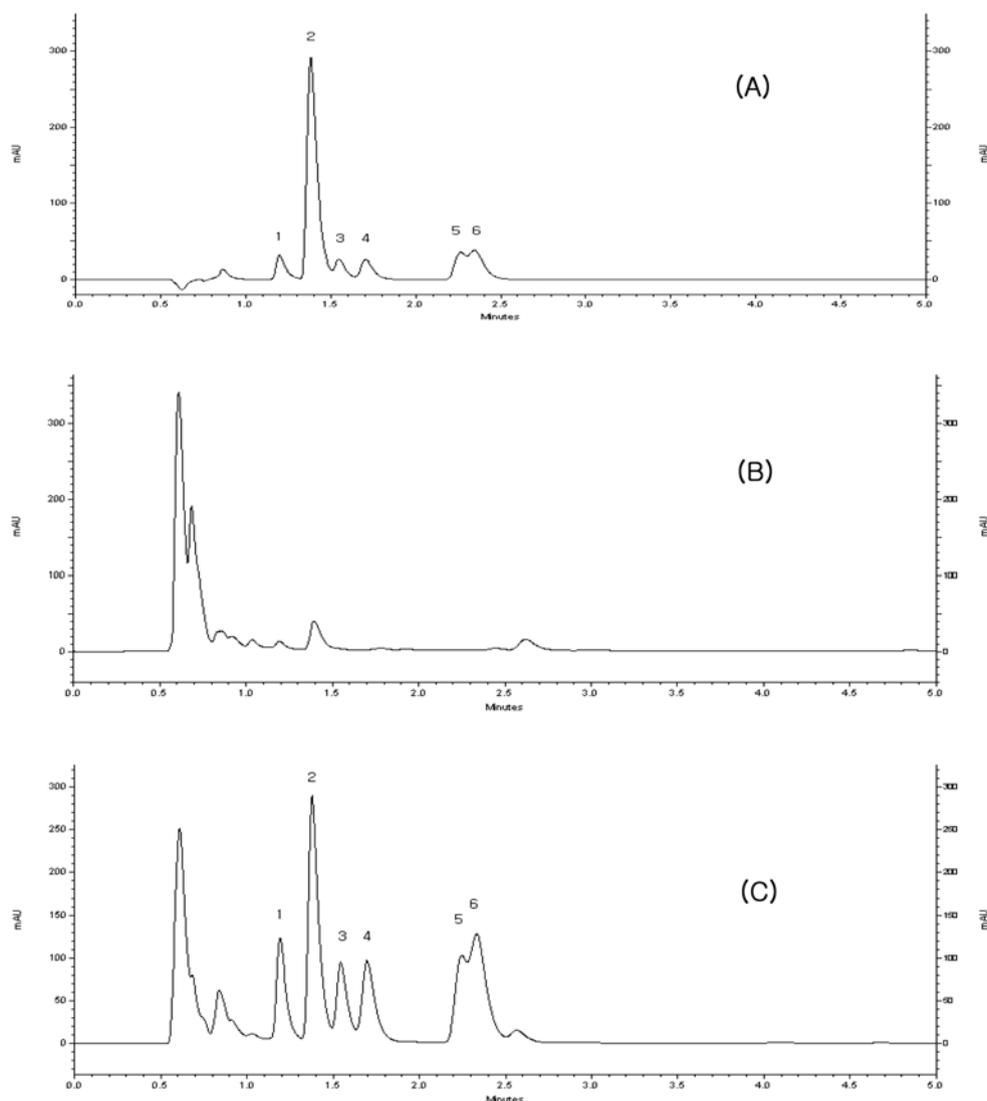


Fig. 2. Representative HPLC chromatograms of urinary metabolites standards of toluene, xylene and styrene (A), a normal urine sample (B), and a quality assurance sample of Industrial Safety and Health Research Institute, Korea Occupational Safety and Health Agency (C). (1 : mandelic acid, 2 : hippuric acid, 3 : phenylglyoxylic acid, 4 : o-methylhippuric acid, 5 : p-methylhippuric acid, 6 : m-methylhippuric acid)

3. 결과 및 고찰

건강한 성인의 뇨 시료와 마노산, 만델산, 페닐글리옥실산, ortho-, meta-, para-메틸마노산 표준품을 희석한 시료, 한국산업안전공단 산하 산업안전보건연구원 직업병연구센터로부터 제공받은 정도관리 고농도시료를 본 시험법에 따라 분석하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 6종 혼합물은 크로마토그램에서 만델산, 마노산, 페닐글리옥실산, ortho-메틸마노산, para-메틸마노산, meta-메틸마노산의 순으로 용리되어 검출되었으며 para-, meta-메틸마노산은 분리가 충분히 이루어지지 않았다. 만델산 피크의 머무름시간은

Table 1. Regression line and correlation coefficient (r^2) for urinary metabolites of toluene, xylene and styrene

Compounds	Regression line		r^2
	m*	b**	
Mandelic acid	1247.1	1955.2	1
Hippuric acid	4675.3	2866.5	1
Phenylglyoxylic acid	2105	2208.7	0.9998
ortho-methylhippuric acid	2268	7108.2	0.9993
meta-methylhippuric acid	5498.4	6235	0.9999
para-methylhippuric acid	3494.3	6703.9	0.9999

*slope

**intercept

Table 2. Accuracy and precision of HPLC analysis for urinary metabolites of toluene, xylene and styrene

Compounds	Nominal Conc. (mg/L)	Calculated Conc. (mg/L, mean)	Coefficient of Variation (%)		Accuracy (%)
			Intra-Day (n=5)	Inter-Day (n=5)	
Mandelic acid	0.72	0.64	2.08	5.74	88.3
	1.8	1.76	1.49	4.27	97.7
	3.6	3.63	0.50	3.59	100.7
	9	9.13	0.35	0.36	101.4
	45	44.98	0.01	0.01	99.9
Hippuric acid	1	0.94	7.32	3.26	93.8
	2	1.92	2.35	5.05	95.8
	10	10.05	0.32	2.47	100.4
	25	25.13	0.32	0.57	100.5
	125	124.97	0.01	0.01	100.0
Phenylglyoxylic acid	1	1.13	2.26	3.06	112.7
	2	2.09	1.87	4.54	104.5
	5	4.92	0.95	1.80	98.4
	10	9.77	0.28	1.66	97.7
	25	25.10	0.06	0.18	100.4
ortho-methylhippuric acid	1	1.09	1.08	2.76	109.0
	2	2.05	0.86	6.18	102.6
	5	4.88	1.24	3.15	97.7
	10	9.71	1.14	1.22	97.1
	25	25.28	0.34	3.62	101.1
meta-methylhippuric acid	0.2	0.23	2.34	3.14	116.3
	0.4	0.42	4.01	6.23	105.3
	2	1.96	1.84	5.88	98.2
	10	9.48	3.57	7.16	94.8
	25	23.83	3.14	4.97	95.3
para-methylhippuric acid	0.4	0.34	0.77	1.22	83.9
	1	0.96	1.76	5.41	96.3
	2	2.01	0.52	4.58	100.7
	5	5.08	1.03	3.97	101.5
	25	24.57	1.01	3.63	98.3

1.19분, 마노산 1.38분, 페닐글리옥실산 1.55분, ortho-메틸마노산 1.70분, para-메틸마노산 2.26분, meta-메틸마노산 2.34분으로 총 2.5분 이내에 6종의 유기용매 대사체를 분석하였다. 이는 기존의 HPLC 분석법 및 GC 분석법에 비하여 매우 짧은 분석시간 내에 좋은 분리능으로 검출된 것이다. 또한 6종의 화합물은 노로부터 유래되는 간섭물질의 영향을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

Monolithic 칼럼은 일반 충전형 역상 칼럼보다 고가인 단점이 있으나, 고정상 구조의 특성으로 인하여 칼럼 압력이 매우 적으며, 따라서 이동상의 유량을 고속으로 흘려줄 수 있어 획기적인 분석시간의 단축이 가능하였다. 이와 같은 장점을 이용하여 이미 Sperlingova 등²⁹이 monolithic 칼럼을 사용하여 노 중에서 카르복실산의 신속 분석법을 보고하였으나, 본 연구에서는 이동상에 ion-pairing reagent를 사용하여 각 성분별 분리능을 더 향상시켰고, 분석시간을 Sperlingova 등이 보고한 10분대에서 2.5분 이내로 단축시켰다.

마노산의 경우, 농도 1~125 ppm에서 HPLC로 분석하였을 때, 검량선의 회귀방정식은 $Y=4675.3X+$

2866.5이였으며, 다른 화합물에 대한 검량선의 계산식을 Table 1에 나타내었다. 일정 농도 범위 내에서 6종 화합물 모두가 상관계수(r^2) 0.9993 이상으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다. 일내 정밀성, 정확성을 평가하기 위하여 각 화합물별로 5가지 농도에 대하여 하루에 5번 반복 실험하였으며, 일간 정밀성을 확인하기 위하여 5일간 반복 실험하였다. 정밀성은 각 화합물의 피크 면적의 표준편차를 평균 피크 면적값으로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였고, 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였다. Table 2에 본 분석법의 정확성과 정밀성에 대한 결과를 나타내었다. 각 농도에서의 일내 정밀성 %C.V.는 0.01~7.32%, 일간 정밀성 %C.V.는 0.01~7.16%, 정확성은 83.9~116.3%이었다. 감도는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였으며, 이 때 얻어진 정량한계는 만델산 0.72 mg/L, 마노산 1 mg/L, 페닐글리옥실산 1 mg/L, ortho-메틸마노산 1 mg/L, para-메틸마노산 0.4 mg/L, meta-메틸마노

Table 3. Quantification of the quality assurance sample of Industrial Safety and Health Research Institute, Korea Occupational Safety and Health Agency

Compound	Sample No.	Calculated Conc. (g/L)	Standard Value (g/L)	Acceptable Range (g/L, standard value \pm 3SD)
Mandelic acid	1	0.709	0.63	0.54 - 0.72
	2	1.370	1.29	1.11 - 1.47
	3	1.760	1.58	1.34 - 1.82
	4	0.564	0.47	0.32 - 0.62
	5	0.962	0.87	0.72 - 1.02
Hippuric acid	1	1.444	1.37	1.19 - 1.55
	2	1.747	1.67	1.49 - 1.85
	3	1.318	1.22	1.01 - 1.43
	4	1.121	1.03	0.88 - 1.18
	5	2.182	2.06	1.85 - 2.27
Phenylglyoxylic acid	1	0.339	0.34	0.31 - 0.37
	2	0.213	0.22	0.21 - 0.22
	3	0.746	0.75	0.63 - 0.87
	4	0.557	0.55	0.46 - 0.64
	5	0.443	0.44	0.41 - 0.47
Total Methylhippuric acid	1	0.661	0.69	0.51 - 0.87
	2	0.930	0.95	0.83 - 1.07
	3	0.489	0.49	0.46 - 0.52
	4	1.227	1.19	1.07 - 1.31
	5	1.435	1.44	1.17 - 1.71

*S.D.: standard deviation

산 0.2 mg/L 이었다.

한국산업안전공단 산하 산업안전보건연구원 직업병 연구센터로부터 제공받은 5 개의 정도관리 소변시료를 분석하고 그 결과를 제공된 기준값과 비교하여 본 분석법을 평가하였다. 정도관리 프로그램에서는 만델산, 마노산, 페닐글리옥실산, 총 메틸마노산으로 정량값을 평가하므로 ortho-, meta-, para-메틸마노산을 각각 정량한 후에 합산하여 비교하였다. 그 결과 Table 3에 나타낸 바와 같이 기준값 ± 3 S.D.의 적합범위에 모두 만족하는 결과를 보였다.

5. 결 론

공업적으로 사용되는 유기용매의 폭로에 대한 인체 모니터링은 새집증후군에 대한 관심 증가와 더불어 관련 산업 현장의 근로자뿐만 아니라, 더 많은 집단을 대상으로 이루어질 필요성이 커지고 있다. 따라서 본 연구에서는 산업현장에서 많이 사용되는 톨루엔, 크실렌, 스티렌 등의 폭로에 대한 측정지표로써 체내에서 대사를 거쳐 뇨로 배설되는 마노산, 메틸마노산, 만델산과 페닐글리옥실산에 대한 신속한 분석법을 개발하고자 하였다.

본 연구에서 사용된 monolithic 칼럼은 일반 충전형 ODS 칼럼보다 빠른 유속에 고분리능을 구현할 수 있어서 최근 그 사용 빈도가 증가하고 있으며 특히 high throughput bioanalysis에 그 사용이 많이 보고되고 있다. 뇨 중 유기용매 대사체의 동시분석에 monolithic 칼럼을 사용하고 유속을 일반 충전형 ODS 칼럼의 경우보다 빠른 2.4 mL/min으로 용리한 결과 2.5분 이내에 6종의 유기용매 대사체를 분석할 수 있었으며 para, meta-메틸마노산의 분리도를 무시한다면 4.0 mL/min의 유속으로도 분석이 가능하였다.

본 분석법에 대하여 분석법 검증(analytical method validation)을 실시한 결과 뇨 중 유기용매 대사체의 분석에 필요한 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있었으며, 한국산업안전공단 산하 산업안전보건연구원 직업병연구센터의 정도관리 소변시료를 분석 비교하여 그 신뢰성을 확보하였다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 중앙대학교 학술연구비 지원으로 중앙대학교 약학대학 약품분석화학고실에서 수행

되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. L. Seendorf and E. Olsen, *Ann. Occup. Hyg.*, **34**, 371-378 (1990).
2. A. Astier, *J. Chromatogr.*, **643**, 389-398 (1993).
3. M. Ikeda, Toluene : Biological monitoring of chemical exposure in the workplace, *World Health Organization*, Geneva, 205-217 (1996).
4. M. Ikeda, Xylene : Biological monitoring of chemical exposure in the workplace, *World Health Organization*, Geneva, 229-236 (1996).
5. M. Ikeda, Styrene : Biological monitoring of chemical exposure in the workplace, *World Health Organization*, Geneva, 195-204 (1996).
6. K. Tomokuni and M. Ogata, *Clin. Chem.*, **18**, 349 (1972).
7. M. Shirao, R. Furuta, S. Suzuki, H. Nakazawa, S. Fujita and T. Maruyama, *J. Chromatogr. A*, **680**, 247-254 (1994).
8. T. Fujii, S. Kawabe, T. Horike, T. Taguchi and M. Ogata, *J. Chromatogr. B*, **730**, 41-47 (1999).
9. O. Inoue, K. Seiji, T. Suzuki, T. Watanabe, H. Nakatsuka, H. Satoh and M. Ikeda, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 204-210 (1991).
10. S. C. Chua, B. L. Lee, L. S. Liao and C. N. Ong, *J. Anal. Toxicol.*, **17**, 129-132 (1993).
11. O. Inoue, K. Seiji, T. Kawai, T. Watanabe, C. Jin, S. X. Cai, Z. Chen, Q. S. Qu, T. Zhang and M. Ikeda, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **64**, 533-539 (1993).
12. A. J. Murer, J. M. Christensen and T. Midtgaard, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**, 313-318 (1994).
13. P. Kongtip, J. Vararussami and V. Pruktharathikul, *J. Chromatogr. B*, **751**, 199-203 (2001).
14. H. Kivisto, K. Pekari and A. Aitio, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **64**, 399-403 (1993).
15. V. L. Lanchote, A. C. Santos, R. H. Queiroz, E. Queiroz and D. Carvalho, *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 143-146 (1994).
16. S. Szucs, L. Toth, J. Legoza, A. Sarvary and R. Adany, *Arch. Toxicol.*, **76**, 560-569 (2002).
17. S. Marchese, R. Curini, A. Gentili, D. Perret and L. M. Rocca, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 265-272

- (2004).
18. P. Manini, R. Andreoli, D. Poli, G. D. Palma, A. Mutti and W. M. A. Niessen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16(24)**, 2239-2248 (2002).
19. K. Cabrera, *J. Sep. Sci.*, **27**, 843-852 (2004).
20. W. Li, D. P. Fries and A. Malik, *J. Chromatogr., A*, **1044**, 23-52 (2004).
21. T. Ikegami and N. Tanaka, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8(5)**, 527-533 (2004).
22. A. Zarghi, A. Shafaati, S. M. Foroutan and A. Khodam, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 677-680 (2005).
23. H. Y. Aboul-Enein and I. Ali, *Talanta*, **65**, 276-280 (2005).
24. A. Korner and S. Kohn, *J. Chromatogr. A*, **1089**, 148-157 (2005).
25. M. Cledera-Castro, A. Santos-Montes and R. Izquierdo-Hornillos, *J. Chromatogr. A*, **1087**, 57-63 (2005).
26. V. F. Samanidou, A. S. Ioannou and I. N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B*, **809**, 175-182 (2004).
27. S. K. Kang, J. S. Yang, M. Y. Lee, I. J. Park and H. K. Chung, *Korean J. Occup. Environ. Med.*, **12(1)**, 139-147 (2000).
28. M. Y. Lee and J. S. Yang, *Analytical science & technology*, **13(1)**, 121-126 (2000).
29. I. Sperlingova, L. Dabrowska, V. Stransky and M. Tichy, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 536-543 (2004).