

가스크로마토그래프-질량분석기에 의한 타액 및 뇨 중 포름알데하이드 분석법 연구

신호상* · 안혜실¹

공주대학교, 환경교육과, 약물남용연구소, ¹공주대학교, 환경과학과 대학원
(2005. 12. 8. 접수, 2006. 2. 20. 승인)

The study on the measurement of formaldehyde in saliva and urine by GC-MS

Ho-Sang Shin* and Hye-Sil Ahn¹

Department of Environmental Education, Drug Abuse Research Center, Kongju National University, Kongju, 314-701 Korea

*Department of Environmental Science, Kongju National University, Kongju, 314-701 Korea.

(Received December 8, 2005, Accepted February 20, 2006)

요 약 : 가스크로마토그래프-질량분석기를 사용한 타액과 뇨 시료 중 포름알데하이드의 분석법이 확립되었다. 타액 또는 뇨 시료 0.2 ml를 20 mL 유리시험관에 넣고 0.1 M HCl 1.8 ml와 내부표준물질인 20 mg/L acetone-d₆을 20 µl 그리고 2,000 mg/L 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 0.1 mL첨가하여 진탕기로 실온에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 toluene 4 mL를 넣어 추출하여 원심분리 후 toluene 층을 분리하고 완전 농축시킨 후 acetonitrile 100 µl로 재 용해시켜 가스크로마토그래프-질량분석기로 측정하였다. 이때 검출한계는 타액 중에서는 2.0 ng/mL 이었고 뇨 중에서는 0.5 ng/mL이었다. 검량선은 타액과 뇨 중에서 각각 0.997과 0.998로 좋은 직선성을 보였다. 이 방법은 포름알데하이드를 구강 노출시킨 쥐의 뇨 중에서 포름알데하이드를 검출하는데 사용하였으며 사람의 뇨나 타액에서 포름알데하이드를 검출하는 데에도 가치 있는 방법으로 사료된다.

Abstract : A gas chromatography-mass spectrometric method was developed for the determination of formaldehyde in urine and saliva. In a 20 mL glass tube, 0.2 mL of urine or saliva was taken. Further, 1.8 mL of 0.1 M HCl, 0.1 mL of 2,000 mg/L 2,4-dinitrophenyl hydrazine and 20 µl of 500 mg/L acetone-d₆ as internal standard were added in the tube and sealed tightly with cap. The solution was shaken for 20 min at room temperature and extracted using 4 mL of toluene. The extract was concentrated and redissolved with 100 µl of acetonitrile, and then measured by gas chromatography-mass spectrometer (selected ion monitoring). The detection limit was 2.0 ng/mL and 0.5 ng/mL in saliva and urine, respectively. The calibration curves showed good linearity with $r = 0.997$ and 0.998 for saliva and urine, respectively. The method was used to analyze formaldehyde in rat urine after oral exposure. The developed method may be use ful to the monitoring for formaldehyde exposure in human.

Key words : Gas chromatography-mass spectrometric method, formaldehyde, saliva, urine

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)41-850-8811 Fax : +82-(02)41-850-8810

E-mail: hshin@kongju.ac.kr

1. 서 론

포름알데하이드는 화학적으로 반응성이 매우 높은 가연성 무색기체로 합판, 우레아폼 단열재(urea formaldehyde foam insulation), 접착제 등의 용도로 다양하게 사용되어 실내에서 서서히 발생되어 실내공기를 오염시키며 특히 새로 지어진 건물에서 많이 발생되는 것으로 알려져 있다. 이 화합물은 사람들에게 지속적으로 노출되어 천식, 알레르기성 비염과 같은 질환을 유발하는 것으로 보고 되어있고 사람의 혈액, 뇨 및 타액 중에 자주 검출이 되는 화학물질이다.

지금까지 포름알데하이드의 분석법은 공기 중에 존재하는 포름알데하이드에 집중되어 왔다. 공기 중에 이러한 유해물질의 농도를 측정하는 것은 노출의 양을 직접적으로 아는 것이 아니므로 보다 노출정도를 정확히 알 수 있는 방법의 개발이 요구되어진다. 노출평가를 위한 생체시료로는 혈액, 뇨 및 타액을 사용할 수 있으나 그 중 혈액은 시료 채취가 어려워 모니터링을 위한 시료로는 적합하지 않다.

생체 시료 중에 포름알데하이드의 측정법에 관한 논문은 많지 않다. 혈액 중에 포름알데하이드의 액체 크로마토그래프법,¹ 혈액 중에 포름알데하이드의 가스 크로마토그래프-질량분석법,² 뇨 중에 포름알데하이드의 액체 크로마토그래프법,³ 타액 중에 포름알데하이드의 얇은막크로마토그래프법⁴이 알려져 있을 뿐이다.

본 연구에서는 포름알데하이드에 의한 노출정도를 쉽게 판단하기 위해 고통 없이 간단히 시료채취가 가

능한 타액과 뇨 시료 중 포름알데하이드의 고감도 가스 크로마토그래프-질량분석법을 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 표준물질 및 시약

본 연구에 사용된 모든 용매는 분석용 순수 시약을 사용하였으며 클로로포름 표준물질과 내부표준물질(ISTD)인 acetone-d₆ 그리고 2,4-dinitrophenyl hydrazine 은 Aldrich(미국)사로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 분석 장비 및 조건

본 연구에 사용한 가스 크로마토그래프-질량분석기는 Agilent 6890 gas chromatography(GC)와 Agilent 5973N MSD이었다. Data system으로는 HP GGI701AA MSD Chemstation을 이용하였다. Electron multiplier는 auto-tune 값보다 300 V 증가시켜 사용하였으며 dwell time은 100 msec로 조절하였으며 정량을 위해 특성이 온(characteristic ion)만을 선택하여 분석하는 selected ion-monitoring (SIM) 방법을 이용하였다.

자세한 분석 조건들은 Table 1과 같다.

2.3. 시료채취

Blank로 사용한 타액과 뇨 시료는 특별한 약을 투여한 경력이 없는 건강한 사람의 뇨와 타액을 받아 사용하였고, 쥐의 뇨는 먹는 물에 포름알데하이드로 일정 농도가 되게 조제 하고 투여한 후 채취하여 사용하였다.

Table 1. Operating conditions of GC-MS for analysis of formaldehyde in saliva or urine

Instrument	Conditions			
GC	• column	HP-5MS(Cross-linked 5%phenylmethylsilicon), 30 m×0.25 mm I.D.×0.25 μm F.T		
	• carrier gas	He at 1.0 ml/min		
	• injection port temp.	260°C		
	• injection mode	split ratio 10:1		
	• oven temp	10°C/min 140°C(3 min) → 280°C	Post run 300°C(3 min)	
MS	• interface temp.	280°C		
	• ionization mode	EI mode		
	• electron energy	70 eV		
	• ion source temp.	230°C		
	• analyzer	Mass Spectrometer		
	• detection mode	Selected Ion Monitoring (SIM)		
	Group	Start time(min)	Compound	Selected Ions, m/z
• SIM	1	10.0	FA-DNPH	63, 79, 210
	2	12.0	Acetone-d ₆ -DNPH	63, 79, 244

2.4. 동물실험 설계

Female Sprague-Dawley rat 4마리를 다물과학(주)에서 공급받아 일주일 동안 온도와 습도를 각각 18°C, 30~70%를 유지하면서 물과 사료를 자유롭게 주며 적응시켰다.

대조군은 포름알데하이드를 투여하기 전에 각각 rat의 뇨를 얻어 사용하였으며, 투여군은 4마리의 rat를 2마리씩 나눠 포름알데하이드를 생수에 각각 200 ng/mL (R-01, R-02) 및 500 ng/mL (R-03, R-04)로 오염시킨 음용수를 15일간 투여하였다. 실험 쥐는 1마리씩 metabolite-cage에서 사육하여 각각의 뇨를 매일 일정한 시각에 받아서 사용 하였다.

2.5. 시험방법

2.5.1. 타액 중 포름알데하이드 분석

타액 중 포름알데하이드의 분석은 시료 0.2 ml에 0.1 N HCl 1.8 ml를 넣어 pH를 1로 조정 한 후 내부 표준물질인 acetone-d₆를 0.4 µg 첨가하여 골고루 섞

이도록 흔들어 준 후 정치시켰다. 유도체 시약인 2,4-dinitrophenyl hydrazine 2000 mg/L 100 µl를 첨가하여 진탕기로 실온에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 toluene 4 mL를 넣어 추출하여 3000 rpm의 원심분리기로 toluene 층을 분리하고 질소가스를 불어주어 완전 농축시킨 후 acetonitrile 100 µl로 재 용해시켜 GC auto-sampler 용 V-sharp vial 에 옮긴 후 검액으로 하였다.

2.5.2. 뇨 중 포름알데하이드 분석

뇨 중 포름알데하이드의 분석은 뇨 0.2 ml에 0.1 N HCl 1.8 ml를 넣어 pH를 1로 조정 한 후 내부표준물질인 acetone-d₆를 0.4 µg 첨가하여 골고루 섞이도록 흔들어 준 후 정치시켰다. 유도체 시약인 2,4-dinitrophenyl hydrazine 2000 mg/L 250 µl를 첨가하여 진탕기로 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 toluene 4 mL를 넣어 추출하여 3000 rpm의 원심분리기로 toluene 층을 분리하고 질소가스를 불어주어 완전 농축

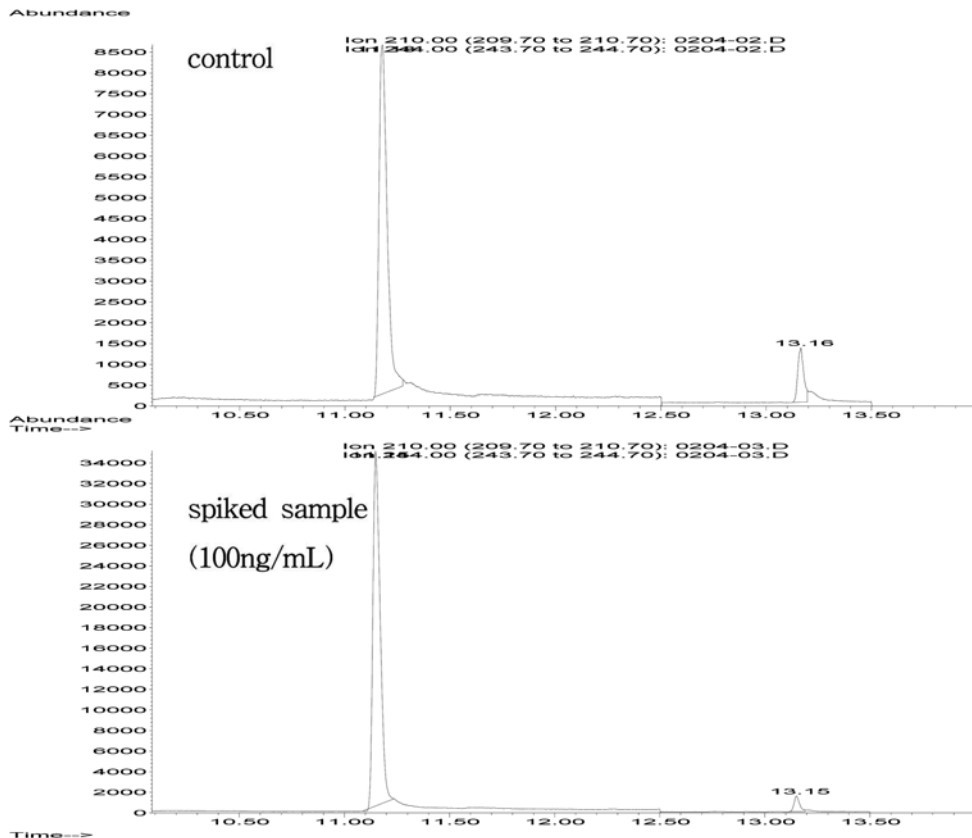


Fig. 1. GC-MS chromatogram after extraction and derivatization of formaldehyde in urine. 11.15: formaldehyde-DNPH, 13.15: acetone-d₆.

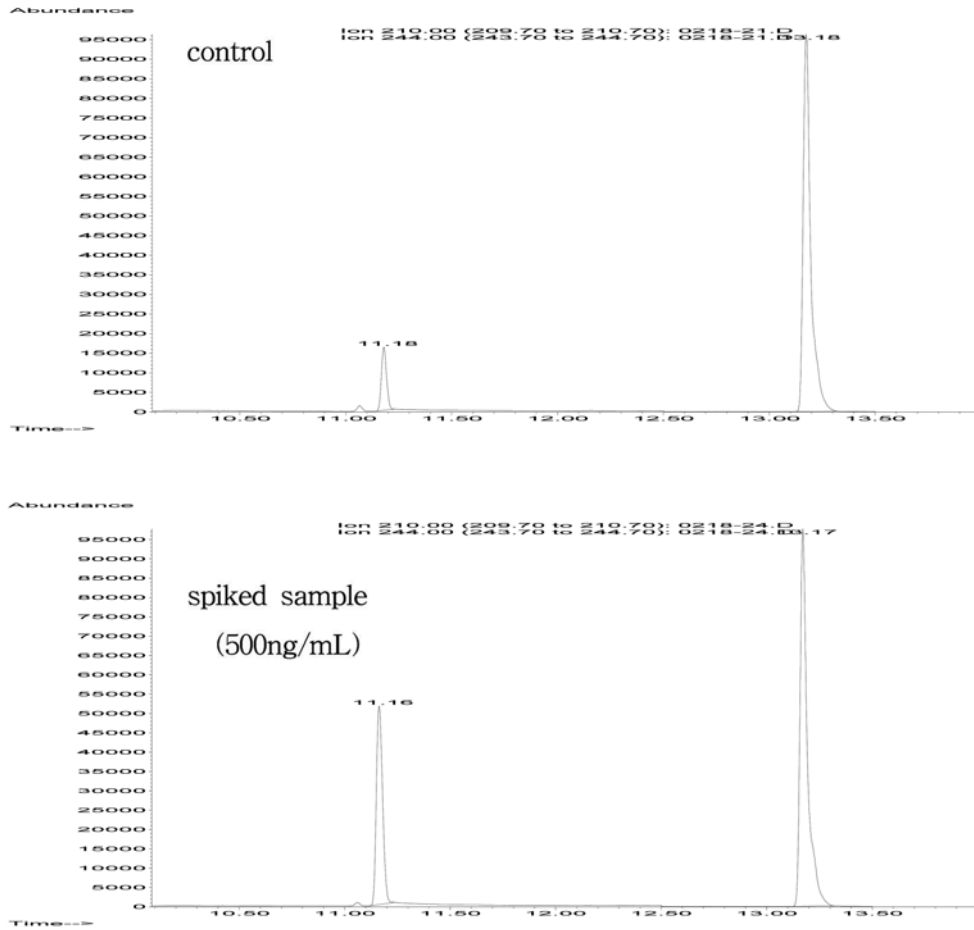


Fig. 2. GC-MS chromatogram after extraction and derivatization of formaldehyde in saliva. 11.15: formaldehyde-DNPH 13.15: acetone-d₆.

시킨 후 acetonitrile 100 μ l로 재 용해시켜 GC auto-sampler용 V-sharp vial 에 옮긴 후 검액으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 크로마토그램

타액 및 뇨 시료와 포름알데하이드를 첨가한 시료를 개발된 방법에 의해 시료 처리한 후 얻은 GC-MS 크로마토그램을 Fig. 1과 2에 도시하였다. Formaldehyde-DNPH 피크는 주변에 특별한 방해 피크 없이 대칭적인 모양을 보였다.

3.2. 검량선

포름알데하이드를 시료에 작업농도로 첨가하여 이를 시료처리하는 방법과 동일하게 추출 및 측정 한 후

피크면적을 포름알데하이드의 농도 간 상관성으로 작성하였다.

포름알데하이드를 시료 중에 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/L의 농도와 내부표준물질 acetone-d₆을 2.0 mg/L이 되도록 첨가한 다음 검량선을 작성한 결과 타액과 뇨에서 각각 0.9968 및 0.9980의 correlation coefficient 값을 나타내었다.

3.3. 검출한계

Method detection limit (MDL)는 시료 속에서 검출될 수 있는 최소농도로 포름알데하이드를 5개 시료에 첨가한 후 이들 간의 standard deviation의 5배로 하여 구하였을 때 타액에서는 2.0 ng/mL이었고 뇨에서는 0.5 ng/mL이었다.

일반적으로 위의 검출한계의 값들은 뇨와 타액에서

Table 2. Precision & accuracy by the extraction and the derivatization of formaldehyde in saliva and urine

Matrix	Spiked conc.(ng/mL)		Measured conc. (µg/L)				Mean±SD (RSD%)
Saliva	500	562	599	835	725	719	688 ± 109 (15.9)
Urine	800	956	996	1219	1106	860	1027 ± 139 (13.5)

정량하는 농도 값들보다 약 1/1000의 낮은 값으로 매우 감도가 좋은 분석법으로 판단된다.

3.4. 회수율

회수율은 시료 5개에 포름알데하이드를 1.0 mg/L가 되도록 첨가한 후 측정값을 사용하여 %회수율 = 100(Xs-Xu)/K을 구하였다. 여기에서 Xs=첨가된 시료의 측정값, Xu=첨가되지 않은 시료의 측정값, K=시료 중 첨가량이다. 회수율을 측정 한 결과 타액에서는 91.9±9.0%이었고 뇨에서는 102±11%이었다.

타액과 뇨 중에는 포름알데하이드와 반응이 가능한 여러 화합물이 존재할 것이라고 추측하였는데 회수율이 높은 값을 보이므로 포름알데하이드와 반응하는 화합물은 거의 없는 것으로 판단된다.

3.5. 정밀 · 정확도

타액 및 뇨 5개의 시료에 0.5 와 0.8 mg/L의 농도로 각각 첨가한 후 시료 전처리를 거쳐 측정 값의 상대표준편차 (RSD)를 정밀도로, 측정값과 참값 사이의 차이를 정확도 (accuracy)로 나타내었을 때 그 결과 Table 2와 같았다. 측정값들은 각각의 매질에서 첨가한 양에 비해 타액에서는 37.6%, 뇨에서는 28.4% 증가하였으며 이는 본래 뇨와 타액에 있었던 포름알데하이드의 농도 때문으로 판단된다.

3.6. 동물실험 분석결과

동물실험 설계에 따라 포름알데하이드를 투여 전 (Fig. 3에서 0 day에 해당)에 비해 먹는물 중에 200과 500 µg/L의 농도로 투여 후 15일까지의 뇨 중 포름알데하이드를 분석하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 200 µg/L로 투여할 실험군 (R-01, R-02)에서는 6일째까지 2배로 증가하다가 감소 및 증가하는 등 불규칙적인 변화를 보였다. 500 µg/L로 투여한 실험군(R-03, R-04)에서도 포름알데하이드를 투여하기 전과 큰 차이가 없거나 오히려 감소하는 경향을 보였다.

위의 결과로부터 쥐의 경우 포름알데하이드 노출 후 체내 포름알데하이드의 농도변화가 크게 없으며 따라서 뇨 중 포름알데하이드의 농도로 포름알데하이드

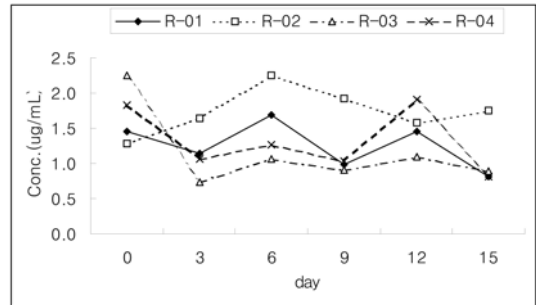


Fig. 3. The concentration of formaldehyde in rat urine before and after oral exposure. (R-01 and R-02 were dosed as the concentration of 200 µg/L, and R-03 and R-04 as the concentration of 500 µg/L formaldehyde in drinking water)

노출 지표물질로 활용하기는 어려운 것으로 판단된다.

4. 결 론

가스 크로마토그래프-질량분석기를 사용한 타액과 뇨 시료 중 포름알데하이드의 분석법이 확립되었다. 이 방법은 시료 중에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 사용하여 유도체화하여 용매로 추출 후 가스 크로마토그래프-질량분석기로 측정하는 방법이다. 이때 검출한계는 타액 중에서 2.0 ng/mL, 뇨 중에서 0.5 ng/mL이었으며 검량선의 직선성이 좋았다. 이 방법은 체액 시료 중에 포름알데하이드를 분석하는데 좋은 방법으로 사료된다.

개발된 방법을 사용하여 쥐에 포름알데하이드를 일정농도로 노출시킨 후 쥐의 뇨를 분석한 결과 체내 포름알데하이드의 농도변화가 크게 없었다. 이는 포름알데하이드가 체내에서 신속하게 대사가 되기 때문이므로 따라서 체액 중 포름알데하이드의 농도를 포름알데하이드 노출 지표물질로 활용하기는 어려운 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 환경기술진흥원에서 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. W. Luo, H. Li, Y. Zhang and C. Y. W. Ang, *J. Chromatogr. B*, **753**, 253-257 (2001)
2. M. Casanova, H. d'A. Heck, J. I. Everitt, W. W. Harrington and J. A. Popp, *Food & Chem. Toxicol.*, **26**, 715-716 (1988).
3. J. B. De Andrade, M. V. De Andrade, H. L. C. Pinheiro, R. A. Martins and E. L. Borges, *Am. Lab.*, **31**, 22 (1999)
4. T. K. Rozylo, A. Zabinska, I. Rozylo-Kalinowska and E. Tvihak, *Chem. & Environ. Research*, **10**, 315-319 (2001).
5. M. Casanova-Schmitz, T. B. Starr and H. d'A Heck, *Toxic. Appl. Pharmac.*, **76**, 26-44 (1984).