

흡연자와 비흡연자의 소변 중 다환방향족탄화수소(PAHs) 대사체 농도 비교

고영림 · 이은희*†

을지대학교 보건환경안전학과, 극동대학교 보건과학대학원*

Comparison of Concentration of Urinary Metabolites of PAHs from Smokers and Nonsmokers

Young Lim Kho and Eun Hee Lee*†

Department of Health, Environment & Safety, Eulji University, Sungnam, Korea
Graduate School of Health Science, Far East University, Eumsung, Korea

ABSTRACTS

This study investigated urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urine of smokers and non-smokers by liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectroscopy (LC/MS/MS). Compounds analyzed for urinary biomarkers of PAHs were five mono-hydroxylated PAHs metabolites; 1-naphthol, 2-naphthol, 1-hydroxypyrene(1-OHP), 3-phenanthrol, 2-fluorenl. Urine samples were pretreated by enzymatic hydrolysis and solid phase extraction method. Smokers were composed of 17 men and five women; non-smokers 17 men and 16 women. Smoking increased urinary concentrations of five PAHs metabolites significantly higher than those of nonsmokers. Statistically significant correlations among the five PAHs metabolites were shown. The results suggest that LC/MS/MS technology should be useful in the environmental health discipline.

Key words: Biomarkers, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), LC/MS/MS, Monohydroxylated PAHs, Smoke

I. 서 론

다환방향족탄화수소(PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons)란 2개 이상의 벤젠고리로 형성된 방향족 탄화수소를 일컫는 말이다. Percival Pott가 굴뚝 청소부에게 발생하는 음낭암을 발표¹⁾한 이후 콜타르의 발암성에 관한 많은 연구가 이루어졌으며, Yamagiwa와 Ichikawa에 의하여 처음으로 실험동물에게서 피부암을 발생시켰다. 이후 콜타르에 포함된 benzo[a]pyrene(B(a)P), dibenz[a,h]anthracene 등의 PAHs가 발암의 원인으로 밝혀졌으며, 이에 관한 많은 연구가 이루어졌다. PAHs는 원유나 석탄 등 자

연적인 상태에서도 발견되지만 주로 유기화합물의 연소에서 비롯하며, 직업적 노출(coke-oven, 철의 주조 등)이나 환경에 의한 노출(대기오염, 수질오염, 폐기물 등), 개인적 습관에 의한 노출(흡연 등)과 식이를 통한 노출 등을 통하여 인체에 흡수된다.

요즘 PAHs 대사체를 분석하기 위해서는 2가지의 기기분석법이 주로 이용된다. 하나는 HPLC/FD (high performance liquid chromatography/fluorescence detector)와 같이 형광검출기를 이용하는 방법이고 다른 하나는 GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry) 또는 LC/MS(liquid chromatography/mass spectrometry)와 같이 질량분석기를 이용하는 방법이

*Corresponding author: Graduate School of Health Science, Far East University, Eumsung 369-700, Korea
Tel: +82-43-879-3701, Fax: +82-43-879-3730, E-mail:leh0917@hanmail.net

Received: 31 August 2011, Revised: 22 December 2011, Accepted: 26 December 2011

다. 소변에서 배출되는 1-OHP는 Glucuronide나 Sulfate와의 결합된 형태로 배출되는데, 이러한 결합을 깨기 위해서는 효소(glucuronidase/ arlsulfatase)를 이용한 가수분해법이 일반적으로 이용되어왔다. 가수분해 이후에는 주로 고체상추출법(solid phase extraction)을 이용하여 방해물질의 제거와 농축을 위한 전처리가 진행된다.

Elovaara 등²⁾은 실험동물의 소변에서 naphthols과 phenanthrols 및 1-OHP를 HPLC 형광검출기를 이용하여 동시에 검출하는 방법을 제시하였는데 HPLC를 이용하여 다양한 PAHs 대사산물을 동시에 분석하기 위해서는 분석시간이 상당히 길어진다. 질량분석기를 이용할 경우에는 다양한 PAHs 대사산물을 짧은 시간 내에 동시에 분석할 수 있다는 장점이 있다. 최근 들어 PAHs 대사산물 분석을 위하여 LC/MSD 또는 LC/MS/MS를 이용한 기기분석법이 적용되고 있다. LC/MSD를 이용한 분석은 검출한계면에서 형광검출기를 이용한 방법에 비해 떨어지는 단점이 있었지만,³⁾ LC/MS/MS를 이용한 분석은 HPLC 형광검출기를 이용한 분석법보다 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity) 및 정확도(validity) 면에서 우수하다.⁴⁾ 이는 질량분석기를 이용한 분석에서 항상 관여하는 내부 표준물질의 사용과 연관되어 있다. 내부 표준물질로는 중수소(²H)나 ¹³C로 라벨링된 물질을 이용하므로 전처리과정이나 분석과정에서의 오차를 보정할 수 있다.

현재까지 PAHs의 대사산물의 분석을 이용한 국내 역학연구는 주로 1-OHP 및 1-OHPG에 한정되어 있다. Lee 등은 병원소각시설에 근무하는 남성 근로자의 소변 중 1-OHPG의 농도를 보고하였고,⁵⁾ 조선소 근로자 25명의 소변 중 1-OHP 및 1-OHPG를 분석한 결과 대조군보다 노출군에서 유의하게 높은 농도를 검출하였다.⁶⁾ 또한 폐기물 소각시설 근로자 50명을 대상으로 요중 1-OHPG를 분석한 연구,⁷⁾ 환경중 PAHs 농도 및 일반주민 27명(대조군)과 도로포장 근로자 9명(노출군)을 대상으로 개인 노출량 측정,⁸⁾ 서울을 비롯한 전국의 6개 지역 660명을 대상으로 하는 비직업성 PAHs 노출에 대한 연구,⁹⁾ 고교 1년생을 대상으로 한 연구,¹⁰⁾ PAHs에 대한 직업적 노출이 없는 병원 근로자를 대상으로 한 연구¹¹⁾ 등 다양한 대상자의 소변 중 PAHs 대사체를 HPLC 형광검출기를 이용하여 분석하는 연구들이 진행되었다.

오염이 심한 대도시 지역 주민의 소변 중 1-OHP 농도가 다른 지역에서보다 높게 나타났으며, 배의 섭취는 1-OHP의 농도를 떨어뜨리는 것으로 조사되었으며, 일반인 남성을 대상으로 한 연구¹²⁾에서는 흡연군에서 비흡연군보다 유의하게 높은 PAHs 대사체가 발견되었다. 직업적 노출이 아닌 대기오염에 의한 PAHs 노출을 평가하기 위한 연구에서 고흡연군을 제외하면, 노출군으로 선정된 교통경찰관의 요중 1-OHP 농도가 실내에서 근무하는 대조군보다 유의하게 높게 나타났다.¹³⁾

하지만 현재까지 국내에서는 소변 중 PAHs 대사체 농도와 건강 영향의 연관성을 밝히는 역학연구에서 LC/MS/MS가 적극적으로 활용되고 있지 못하다. 본 연구의 목적은 LC/MS/MS방법을 이용하여 흡연자와 비흡연자의 소변 중 다양한 PAHs 대사체 농도를 비교·분석함으로써, 소변 중 PAHs 대사체의 농도에 미치는 흡연의 영향을 규명하고 대규모 역학연구에서의 활용가능성을 파악하는 것이다.

II. 연구 방법

1. 분석대상 물질 및 재료

소변 중 PAHs 대사체 노출량 측정에 동의한 서울 거주 20~69세 성인 55명(남 34, 여 21)을 섭외하여 소변시료를 채취하였다. 이 중 흡연자는 22명(남 17, 여 5)이었으며, 비흡연자는 33명(남 17, 여 16)이었다. 연구 대상자인 흡연군과 비흡연군 모두는 직업적으로 PAHs에 노출되지 않음을 확인한 후 시료를 수집하였다.

연구대상물질은 PAHs 노출의 생체지표로 널리 사용되는 monohydroxy 형태의 PAHs 대사산물 5종이다. 1-naphthol(1-Na)은 Fluka(Buchs, Switzerland)에서 구입하였고, 2-naphthol(2-Na), 3-phenanthrol(3-Phe), 1-hydroxypyrene(1-OHP), 2-hydroxyfluorene(2-Flu)은 Aldrich (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였으며, 하나의 벤젠고리에 포함된 탄소가 질량수 13인 탄소의 동위원소(¹³C)로 치환된 내부표준물질(internal standard, IS)인 ¹³C₆-1-hydroxypyrene (¹³C₆-1-OHP)은 미국 국립암연구소(NCI)에서 구입하여 이용하였다. 분석대상물질 5종의 분자구조는 Fig. 1과 같다. 고체상추출 및 HPLC 분석을 위해 이용된 증류수와 용매는 모두 Burdick & Jackson (Morristown,

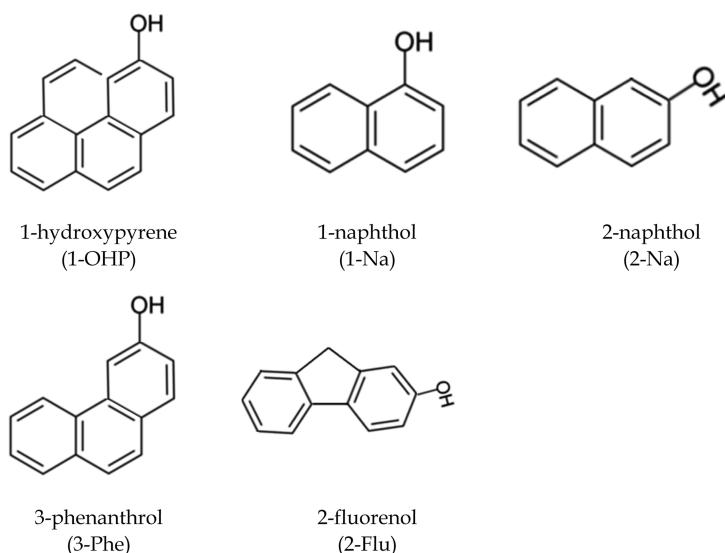


Fig. 1. Chemical structure of 5 monohydroxy-PAHs.

NJ, USA) 사에서 구입하였으며, 완충용액 제조를 위해 ammonium formate, ammonium acetate 및 formic acid를 Fluka (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다.

2. 소변시료의 전처리

수거된 소변은 전처리가 진행되기 전까지 냉동보관하였다. 소변에 포함된 PAHs 대사체는 대부분 Glucuronide 및 Sulfate와 결합하고 있으므로 이 결합을 끊어주기 위하여 효소(β -glucuronidase/sulfatase)를 이용한 가수분해반응을 진행하였다. 소변 1 ml를 15 ml 원심분리관에 넣고 효소반응을 위해 pH 5로 조정된 완충용액(1 M ammonium acetate, 1 N HCl) 1 ml와 효소 10 μ l 및 내부표준물질(IS) 혼합액(1 μ g/ml) 10 μ l를 넣고 잘 혼합한 후 14시간 동안 37°C로 맞춰진 배양기에서 반응시켰다.

효소에 의한 가수분해가 완료된 시료는 세척과 농축을 위해 Sep-pak C₁₈ 카트리지(1 cc/100 mg, Waters)를 이용한 고체상추출(solid phase extraction)을 실시하였다. 우선, 2 ml 메탄올과 2 ml 초순수로 카트리지를 활성화하고, 2 ml 초순수와 2 ml 30% 메탄올로 세척한 후 4 ml 100% 메탄올로 용출시켰다. 각 시료간의 분석 오차를 줄이기 위하여 동시에 24 port의 SPE를 동시에 진행할 수 있는 매니폴더(Supelco)를 이용하였다. 추출된 메탄올 용액은 Speed-Vac을 이용하여 진공상태에서 40°C로 가열하며 완전히 건

조시키고 여기에 메탄올 100 μ l를 이용하여 다시 녹인 후 200 μ l 폴리프로필렌 인서트(polypropylene insert)가 삽입된 2 ml vial에 넣고 다음의 LC/MS/MS 시스템에서 정량분석하였다.

검량선 작성을 위하여 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng/ml 농도의 표준용액을 제조하고 시료를 처리하는 방법과 같이 고체상추출을 거친 후 LC/MS/MS 시스템에서 분석하였다.

3. LC/MS/MS 분석

1-OHP를 비롯한 PAHs 대사산물분석에 이용된 액체크로마토그래피 시스템은 autosampler, dual pump, column oven, vacuum degaser 등이 포함된 Agilent 1100 시리즈를 이용하였다. 분석에 이용된 컬럼은 Hypersil C18(3.5 μ m, 2.1 \times 50 nm, Thermo, USA)이었다.

고체상추출과정으로 전처리된 용액 10 μ l를 HPLC system에 주입하였다. 분리를 위한 이동상은 물(A)과 메탄올(B)이었다. 유량은 250 μ l이었으며, 이동상은 초기 조건 50% B에서 25분 만에 100% B로 직선상 증가시켰으며 5분 동안 100% B 상태를 유지하다가 초기 조건으로 되돌아오는 경사용매조성법(gradient mode)을 이용하였다.

분석대상물질의 검출을 위해 API 4000 (Applied biosystems, USA) triple quadrupole mass spectro-

Table 1. Mass spectrometer operational parameters

Compound	Precursor ion Q1 Mass (m/z)	Daughter ion Q3 Mass (m/z)	DP	CE	CXP
1-Na	143.00	114.9	- 55	- 34	- 5
		143.0	- 65	- 30	- 11
2-Na	143.00	115.2	- 60	- 30	- 9
		143.0	- 65	- 30	- 11
2-Flu	181.07	152.9	- 80	- 30	- 9
		181.0	- 75	- 35	- 7
3-Phe	193.08	165.1	- 90	- 40	- 9
		164.9	- 55	- 40	- 11
1-OHP	217.00	189.0	- 50	- 44	- 7
		217.0	- 30	- 30	- 5

DP: Declustering Potential (V). CE: Collision Energy (V). CXP: Collision Cell Exit Potential (V).

meter가 이용되었다. PAHs 대사체 분석은 ESI (electron spray ionization) negative mode에서 이루어졌으며 Harvard apparatus를 이용한 유량 10 μ l/min로 주입하는 방식에 의한 정량적 최적화(quantitative optimization)를 실시하여 정량분석을 위한 질량분석기 조건을 확립하였다. 분석은 MRM (multiple reaction monitoring) 방식에서 진행되었으며, 확립된 질량분석조건은 다음 Table 1과 같다.

질량분석기의 parameter는 분석의 감도를 최상으로 유지하기 위하여 curtain gas 15 Mpsi, GS1 40 Mpsi, GS2 60 Mpsi, detector temperature 400°C를 이용하였으며 모든 분석대상물질의 EP (entrance potential)는 -10.0 V로 유지하였다. Ion source는 electrospray ionization (ESI) negative 방식을 이용하였으며 ion source energy는 -4500 V를 유지하였다. ion source의 충돌 에너지(collision energy)를 표현하는 CAD (collisionally activated dissociation)는 5 eV로 고정하였다.

4. 분석방법의 타당성 평가

소변 중 PAHs 대사체를 분석하기 위한 본 연구에서는 Xu 등(2004)⁴⁾이 제시한 방법을 수정하여 이용하였다. 검출한계의 결정은 미국 식품의약품 안전청 (FDA)이 정의한 분석절차의 검증에서 규정하고 있는 개념을 사용하였으며, 그 구하는 방법은 다음과 같다.¹⁴⁾

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \text{SE/S}$$

SE: 공시료를 포함한 가능한 낮은 농도들로 작성한 검량선 회귀직선의 y 절편 표준편차

S: 회귀직선의 기울기

분석대상 소변시료를 일정량씩 취하여 통합 소변시료(pooled urine sample)를 제조하고 여기에 일정량의 표준물질을 첨가한 후 시료를 분석한 방법과 같은 방법으로 전처리와 분석을 수행하고 반복분석의 일정성을 평가하기 위하여 변이계수(CV, coefficient of variables)를 이용한 정밀도(precision)와 회수율(recovery)을 이용한 정확도(accuracy)를 계산하였다.

III. 연구 결과

1. 소변 중 PAHs 대사산물의 분석

분석대상물질의 검출한계는 Table 2에서와 같이 0.025~ 0.4 μ g/l로 나타났다. 동일한 기기분석방법을 적용한 Onyemauwa 등¹⁵⁾의 결과에서보다 다소 높은 검출한계값을 나타내었다. 이것은 Onyemauwa 등은 3 ml의 시료를 사용한 것에 비해 본 연구에서는 1 ml의 시료를 사용하였으며, 검출한계를 산출할 때 검출한계값이 높아지는 경향이 있는 FDA방법¹⁴⁾을 사용하였기 때문으로 판단된다.

통합 소변시료에 일정량의 표준물질을 첨가하여 반복 측정의 일정성을 표현하는 정밀도를 평가한 결과 Table 2와 같이 나타났다. 분석대상물질 중 가장 소수성이 적은 2-Naphthol의 경우 방해물질의 영향으로 CV값이 증가되는 것이 관찰되어 정밀도가 떨어지는 것이 확인되었다. 회수율(recovery)을 이용하여 평가한 정확도의 경우, 1-OHP를 제외하면 50% 부근의 값으로 나타났다. 이것은 고체상추출과정에서 사용한 카트리지의 추출효율이 높지 않았으며, 카

Table 2. method validation results for analysis of PAHs metabolites

Compounds	LOD (mg/l)	Linearity (r ²)	Precision (%) ^a	Accuracy (%)
1-Naphthol	0.200	0.9987	9.05	55.1
2-Naphthol	0.400	0.9968	14.24	42.8
2-Fluorenlol	0.150	0.9993	12.63	50.7
3-Phenanthrol	0.025	0.9996	6.68	48.3
1-OHP	0.140	0.9991	3.14	95.9

^aCV = (standard deviation)/mean.

Table 3. Concentration of PAHs metabolites in human urine

Compounds	Smokers			Nonsmokers			p-value ²⁾
	Male (N = 17)	Female (N = 5)	Subtotal (N = 22)	Male (N = 17)	Female (N = 16)	Subtotal (N = 33)	
1-naphthol	13.60 ± 2.92 ¹⁾	9.03 ± 4.57	12.43 ± 3.19	2.36 ± 3.42	1.42 ± 2.92	1.84 ± 3.19	< 0.001
2-naphthol	7.39 ± 2.39	10.49 ± 2.83	7.85 ± 2.44	0.77 ± 7.17	0.81 ± 3.49	0.79 ± 5.05	< 0.001
2-fluorenlol	0.53 ± 2.08	0.50 ± 3.13	0.53 ± 2.25	0.07 ± 1.97	0.12 ± 2.34	0.09 ± 2.20	< 0.001
3-phenanthrol	0.17 ± 1.75	0.16 ± 2.94	0.17 ± 1.97	0.05 ± 2.01	0.07 ± 2.23	0.06 ± 2.16	< 0.001
1-hydroxypyrene	0.49 ± 1.58	0.51 ± 1.52	0.50 ± 1.55	0.21 ± 1.84	0.30 ± 1.70	0.25 ± 1.80	< 0.001

¹⁾mean ± SD, µg/g creatinine. ²⁾Difference between smokers and nonsmokers by t-test.

트리지의 세척과 분석대상물질의 용출에 이용한 용매에 의한 것으로 판단된다.

2. 소변시료 분석결과

흡연자와 비흡연자의 소변시료 중 분석대상물질의 농도는 다음 표와 같다. 분석대상 5종의 PAHs 대사체 농도는 모두 비흡연자보다 흡연자의 소변에서 더 높게 검출되었으며, 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었다. 남성과 여성 모두 흡연자의 소변 중 PAHs 대사체의 농도가 높게 나타났으며, t-test 결과 여성의 경우 대상자의 수가 적었기 때문에 흡연자와 비흡연자 소변 중 농도의 차이가 통계적으로 유의하지 않았으나, 남성과 전체 대상자를 분석한 결과 모든 물질의 차이가 통계적 유의성을 보였다(Table 3, Fig. 2).

이러한 결과는 소변으로 배출되는 PAHs 대사체의 상당부분이 흡연과 관련이 있다는 것을 보여준다. 본 연구의 연구대상자 소변 중 농도 평균값을 Wilhelm 등¹⁶⁾이 제시한 독일의 일반인구에 대한 여성흡연자 평균 농도와 비교하면 1-naphthol은 유사하였으나 (13.97 vs. 13 µg/l), 2-naphthol 농도가 낮은 값을 보였다(5.55 vs. 17 µg/l). 3-phenanthrol (0.14 µg/l)의 농도는 Schulz 등¹⁷⁾이 제시한 0.16 µg/l 및 Aquilina¹⁸⁾ 등이 제시한 0.22 µg/l, NHANES 1999-2000 자료의¹⁹⁾

기하평균값인 0.13 µg/l와 유사한 농도를 나타내었다. 2-fluorenlol (0.36 µg/l)의 경우 Aquilina 등¹⁸⁾이 제시한 0.28 µg/l 및 NHANES 1999-2000 자료¹⁹⁾의 기하평균값인 0.46 µg/l와 비슷한 농도로 나타났다.

비흡연자 소변 중 1-OHP 농도는 독일 GerES 연구(0.10~0.14 µg/l), 영국(0.13 µg/l) 및 미국 NHANES 1999-2000 연구(0.07~0.11 µg/l)에서보다 높은 값인 0.37 µg/l을 나타내었다.

각 분석대상물질의 농도들 사이의 피어슨 상관계수를 구하여 상관성을 평가하였다. 소변 중 PAHs 대사체 농도 사이의 상관계수를 계산한 결과 0.44 < r < 0.86으로 통계적으로 유의한 상관성을 나타내었다(Table 4). 모든 분석대상물질들 간의 상관성이 높고 통계적으로 유의하게 나타난 것은 PAHs에 대한 공통적인 노출원이 존재한다는 것을 의미한다. 1-OHP의 경우 다른 4종의 PAHs 대사체와의 상관계수 평균값이 0.53으로 나타나 2-fluorenlol 0.69, 3-Phenanthrol 0.64, 2-naphthol 0.59에 비하여 낮은 값을 나타내었다.

PAHs 노출에 대한 생체지표로 가장 흔히 이용되고 있는 것이 1-OHP이다. 공기중 농도에서나 소변 등 생체시료 등에 존재하는 PAHs 및 그 대사산물과의 상관성이 높고 대표성을 가질 수 있기 때문이

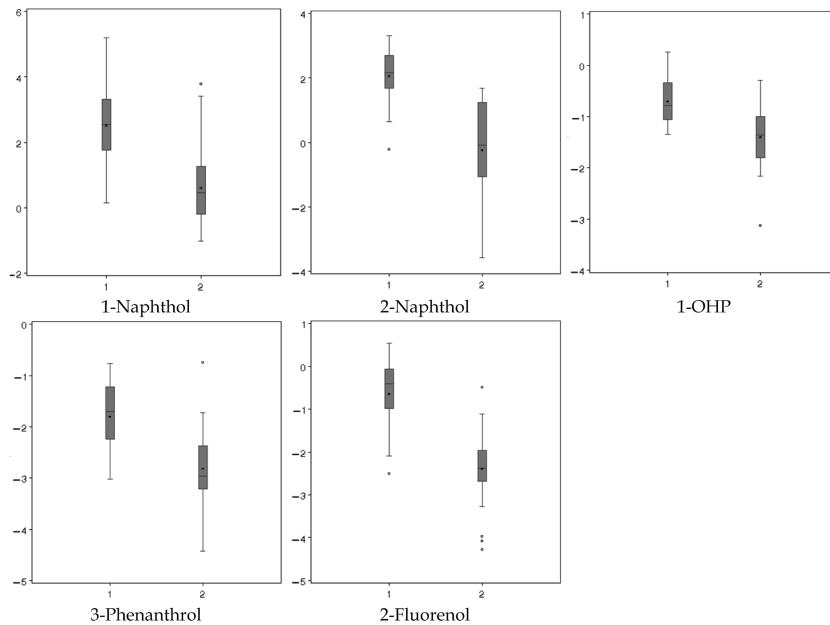


Fig. 2. Box plots for 5-monohydroxy-PAHs urinary concentrations for smokers (1) and nonsmokers (2). The concentration unit of y axis is log[µg/g creatinine]. The points outside the box represent the outliers which exceed the probability 0.95. The horizontal lines represent from top to bottom the maxima, 75th, 50th, 25th percentiles and the minima. The asterisks in the boxes represent the arithmetic means.

Table 4. Pearson corr

Compounds	1-Na	2-Na	2-Flu	3-Phe	1-OHP
1-Na	1	0.5683* (<0.001)	0.5514 (<0.001)	0.4817 (<0.001)	0.4576 (<0.001)
2-Na		1	0.7068 (<0.001)	0.6632 (<0.001)	0.4392 (0.0046)
2-Flu			1	0.8553 (<0.001)	0.6588 (<0.001)
3-Phe				1	0.5470 (<0.001)
1-OHP					1

Elation coefficients among age and 5 PAHs metabolites. * Correlation coefficient (p-value).

며,¹³⁾ 실제 건강영향과 직접적인 관련을 나타내는 benzo[a]pyrene-tetraol과 같은 물질보다 생체 내에 존재하는 농도가 훨씬 높기 때문에 측정의 용이함이 있기 때문이다. 하지만, 각 물질들 간의 변이가 존재하고 노출원이 달라질 경우 1-OHP만으로는 발암성 PAHs를 비롯한 건강에 직접적인 영향을 미치는 다양한 PAHs의 노출을 정확하게 평가할 수 없을 가능성이 있다. 따라서, 많은 PAHs 대사체를 동시에 분석할 수 있는 질량분석 기법을 환경역학 연구분야에 적극적으로 도입하여야 할 것이다.

1-OHP가 PAHs 대사산물의 대표적인 지표로 주로 이용되어온 반면에 두 개의 벤젠고리로 이루어진 1-

naphthol 및 2-naphthol의 경우 일부 연구자에 의해서만 연구가 되어졌다. 분석과 관련하여 1 or 2-naphthol의 가장 큰 단점은 컬럼을 통과하여 용출되는 시간이 짧기 때문에 소변에 포함된 방해물질과 같이 나온다는 점이다. 이것은 검출한계를 높이는 결과를 가져오며 질량분석기를 이용할 때에는 오염의 문제를 일으킬 수 있다. 1- 또는 2-naphthol의 장점은 1-OHP에 비해 상대적으로 생체 내에 존재하는 농도가 높고, 휘발성이 큰 나프탈렌의 특징²⁰⁾ 때문에 작업환경 측정을 통한 공기중 농도를 측정할 때 발생하는 오차를 줄일 수 있다는 점이다.

정확성 문제에 있어서는 여러가지 관점을 가질 수

있겠지만, 질량분석기법을 이용하는 것보다 정확성을 높이는 방법은 없을 것이다. 다만, 질량분석기의 특성상 소변이나 혈액과 같이 불순물이 많이 포함된 시료를 직접 주입하여 분석할 수 없다는 단점 때문에 전처리과정이 다양하게 진행되어야 한다. 따라서 질량분석기를 이용하여 분석시간을 상당히 단축시키더라도 이 부분은 전처리를 진행하는데 소요되는 시간과 노력 그리고 비용과 상쇄될 것이다. 그리고 GC/MS를 이용할 경우에는 휘발성을 증가시키기 위한 추가적인 유도체화 반응이 필요한 불편함이 있으며, LC/MS를 이용할 경우에는 구조적으로 안정된 PAHs의 특징 때문에 daughter ion의 생성이 어려워 민감도(sensitivity)가 떨어진다는 단점이 있다.

최근에 소변시료를 효소를 이용하여 전처리하는 과정을 거치지 않고 1-OHP-glucuronide를 LC/MS/MS를 이용하여 직접 분석하는 방법이 개발되었다.²¹⁾ 이 방법은 switching column 방법과 결합되면 소변 중 PAHs 대사체 분석을 위한 전처리 시간을 대폭 줄일 수 있으며, 1-OHP와 glucuronide의 결합이 쉽게 끊어지므로 민감도가 증가될 것이다.

IV. 결 론

2개 이상의 벤젠고리로 이루어진 방향족 탄화수소인 PAHs는 15종의 발암물질이 포함되어 있으며, 직업적 환경적 유해물질 노출의 대표적인 예로 많은 연구가 이루어졌다. 본 연구에서는 비직업적인 PAHs 노출원인 흡연이 소변으로 배출되는 PAHs 대사체 농도에 미치는 영향과 분석방법으로써 LC/MS/MS의 활용가능성을 타진하기 위해 진행되었다.

흡연 및 비흡연 성인 55명을 대상으로 PAHs의 생물학적 노출지표로 국내외에서 많은 연구가 이루어진 1-OHP를 비롯한 5종의 PAHs 대사체를 질량분석기법을 응용하여 분석하였다. 본 연구에 이용한 전처리 및 질량분석기법에 의하여 소변 중 분석대상 5종의 PAHs 대사체 농도를 평가하기에 적절한 검출 한계와 정밀도를 보였으나 민감도와 회수율이 떨어지는 단점이 발견되었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 LC/MS/MS를 이용하여 PAHs 대사체를 분석할 때에는 전처리방법의 간소화와 민감도의 증가를 위해 스윙칭 컬럼을 활용하여 효소처리 전의 1-OHP-glucuronide를 직접 분석하는 것을 고려할 필요가 있

을 것이다.

분석대상 PAHs 대사체 5종 모두 비흡연자보다 흡연자의 소변에서 통계적으로 유의하게 높게 나타나 흡연이 일반인구에서 PAHs의 주요한 노출원인을 확인할 수 있었다. 또한, PAHs 대사체들 간의 상관성이 모두 높으므로 주로 이용하고 있는 1-OHP 등 일부 물질을 지표물질로 이용할 수 있으나, 노출과 건강영향의 관계를 명확하게 밝히기 위해서는 질량분석기법을 활용하여 다양한 물질을 동시에 측정하는 방법을 도입할 필요성을 발견하였다.

참고문헌

1. Pott P. Cancer Scorti. In: Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the modification of the toes and feet. Hawes, Clarke and Collins, London, England. 1775. p.63-68.
2. Elovaara E, Vaananen V, Mikkola J. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with β -naphthoflavone induction in the rat. *Archives of Toxicology*. 2003; 77(4): 183-193.
3. Ferrari St, Mandel F, Berset JD, Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection, *Chemosphere*. 2002; 47: 173-182.
4. Xu X, Zhang J, Zhang L, Liu W, Weisel CP. Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2004; 18: 2299-2308.
5. Lee KH, Cho SH, Hong YC, Lee KH, Kwan HJ, Choi I, Kang D. Urinary PAH metabolites influenced by genetic polymorphism of GSTM1 in male hospital incinerator workers. *J Occupational Health*. 2003; 45: 168-171.
6. Lee KH, Ichiba M, Zhang J, Tomokuni K, Hong YC, Ha M, Kwon HJ, Koh SB, Choi HR, Lee KH, Park CG, Cho SH, Hirvonen A, Strickland PT, Vermeulen R, Hayes RB, Kang D. Multiple biomarkers study in painters in a shipyard in Korea, *Muta-*

- tion Research*. 2003; 540: 89-98.
7. Lee J, Kang D, Lee KH, Ichiba M, Zhang J, Tomokuni K, Hwang E, Park CG, Ha M, Kim S, Han SG, Choi JW, Lee E, Jang J, Strichland PT, Hirvonen A, Cho SH. Influence of GSTMa genotype on association between aromatic DNA adducts and urinary PAH metabolites in incineration workers, *Mutation Research*. 2002; 514: 213-221.
 8. NIER. Research on the Analysis Technology of Exposure and Effect markers for Hazardous Organic compounds(II). 2003. p.43-45.
 9. Yang M, Kim S, Lee E, Cheong HK, Chang SS, Kang D, Choi Y, Lee SM, Jang JY, Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure in Non-Occupationally Exposed Koreans, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2003; 42: 250-257.
 10. Lee CK, Cho SH, Kang JW, Lee SJ, Ju YS, Sung J, Strickland PT, Kang D. Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicology Letters*. 1999; 108: 209-215.
 11. Hong YC, Leem JH, Park HS, Lee KH, Lee SJ, Lee CK, Kang D. Variations in urinary 1-hydroxypyrene glucuronide in relation to smoking and the modification effects of GSTM1 and GSTT1, *Toxicology Letters*. 1999; 108: 217-223.
 12. Kim YD, Lee CH, Nan HM, Kang JW, Kim H. Effects of genetic polymorphisms in metabolic enzymes on the relationships between 8-hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocytes and urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations, *J Occup Health*. 2003; 45: 160-167.
 13. Merlo F, Andreassen A, Weston A, Pan Df, Haugen A, Valerio F, Reggiardo G, Fontana V, Garte S, Puntoni R, Abbondandolo A. Urinary Excretion of 1-Hydroxypyrene as a Marker for Exposure to Urban Air Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention*. 1998; 7: 147-155.
 14. FDA. Validation of analytical procedures: Methodology, recommended for implementation at step 7 of the VICH process on 22 October 1998 by the VICH steering committee (64. guidance for industry), FDA, DHHS. 1998
 15. Onyemauwa F, Rappaport SM, Sobus JR, Gajdošová D, Wu R, Waidyanatha S. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify mono-hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine, *J Chromatography B*. 2009; 877(11-12): 1117-1125.
 16. Wilhelm M, Hardt J, Schulz C, Angerer J. New reference value and the background exposure for the PAH metabolites 1-hydroxypyrene and 1- and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: Basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine, *Int J Hyg Environ Health*. 2008; 211(3-4): 447-453.
 17. Schulz C, Angerer J, Ewers U, Heudorf U, Wilhelm M. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German Environmental Survey on Children 2003-2006 (GerES IV). *Int J Hyg Environ Health*. 2009; 212(6): 637-647.
 18. Aquilina NJ, Delgado-Saborit JM, Meddings C, Baker S, Harrison RM, Jacob III P, Wilson M, Yu L, Duan M, Benowitz NL. Environmental and biological monitoring of exposures to PAHs and ETS in the general population, *Environ Int*. 2010; 36(7): 763-771.
 19. Grainger J, Huang W, Patterson Jr. DG, Turner WE, Pirkle J, Caudill SP, Wang RY, Needham LL, Sampson EJ. Reference range levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in the US population by measurement of urinary monohydroxy metabolites, *Environ Res*. 2006; 100(3): 394-423.
 20. Preuss R, Angerer J. Simultaneous determination of 1- and 2-naphthol in human urine using on-line clean-up column-switching liquid chromatography-fluorescence detection, *J Chromatography B*. 2004; 801(2): 307-316.
 21. Kakimoto K, Toriba A, Ohno T, Ueno M, Kameda T, Tang N, Hayakawa K. Direct measurement of the glucuronide conjugate of 1-hydroxypyrene in human urine by using liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J Chromatography B*. 2008; 867(2): 259-263.