

소변 중 다환방향족탄화수소 대사체의 분석법 확립 및 교차분석

박나연* · 전중대* · 구혜령** · 김정환*** · 이은희**** · 이경무***** · 문철진** · 고영림*†

*을지대학교 보건환경안전학과
**녹십자의료재단 대사의학연구소
***을지대학교 식품산업외식학과
****극동대학교 보건과학대학원
*****한국방송통신대학교 환경보건학과

Method Development and Cross Validation of Analysis of Hydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (OH-PAHs) in Human Urine

Na-Youn Park*, Jung-Dae Jeon*, Hyeryeong Koo**, Jung Hoan Kim***, Eun-Hee Lee****, Kyungmu Lee*****, Cheoljin Mun**, and Younglim Kho*†

*Department of Health, Environment & Safety, Eulji University

**Institute of Metabolism, Green Cross Laboratories

***Food Technology & Service, Eulji University

****Graduate School of Health Science, Far-East University

*****Department of Environmental Health, Korea National Open University, Korea

ABSTRACTS

Objectives: This study was performed to evaluate the analytical method for PAH metabolites in human urine using enzyme hydrolysis and solid-phase extraction coupled with LC-(ESI)-MS/MS technique.

Methods: We employed HPLC tandem mass spectrometry techniques with appropriate pre-treatment for analysis of 16 OH-PAHs in human urine. Samples were hydrolysis by β -flucuronidase/Aryl sulfatase, and target compounds were extracted by solid-phase extraction with a strata-x cartridge. Cross-validation was performed between Eulji University and Green Cross laboratories with 200 human urine samples.

Results: The accuracies were between 90.3% and 118.8%, and precisions (relative standard deviations) were lower than 10%. The linearity obtained was satisfying for the 16 OH-PAH compounds, with a coefficient of determination (r^2) higher than 0.99. The results of cross-validation at the two organizations were compared by ICC (interclass correlation coefficient) values. The cross-validation results were excellent or good for all compounds.

Conclusion: An analytical method was validated for low nanogram levels of 16 OH-PAHs in human urine. Also, satisfying results were obtained for method validation such as accuracy, precision and ICC of cross-validation.

Keywords: Cross validation, LC-MS/MS, OH-PAHs, urine

I. 서 론

다환방향족탄화수소(PAHs, polycyclic aromatic

hydrocarbons)란 2개 이상의 벤젠고리로 형성된 방향족탄화수소를 말한다.¹⁾ PAHs는 고기를 굽거나 석탄, 가스 등의 유기물질의 불완전연소에 의해 인위

†Corresponding author: Department of Health, Environment and Safety, Eulji University, Seongnam, 461-713, Korea, Tel: +82-31-740-7142, Fax: +82-31-740-7327, E-mail: ylkho@eulji.ac.kr

Received: 9 July 2015, Revised: 14 October 2015, Accepted: 15 October 2015

적으로 생성되거나, 산불, 화산 폭발 등 자연적인 현상에 의해 발생하여 대기 중으로 방출된다.²⁾

PAHs에 노출되면 생식, 발달, 혈액, 심장 혈관, 신경 및 면역계통에 문제가 생길 뿐만 아니라 암이 발생할 가능성이 있고, 또한 최근 연구에 따르면 태아에서 높은 PAHs 수준은 태아의 불안, 우울 및 주의력 문제와 연관 될 수 있다.³⁾ PAHs의 생체 내 변화는 cytochrome P450 효소에 의해 가수분해 반응이 복잡하고 빠르게 일어나고(Phase I), glucuronide 또는 황산염 접합체로 변환된다(phase II).⁴⁾ 이렇게 대사된 몇몇의 PAHs 대사산물은 난분해성 탄화수소 성분으로, 암 또는 돌연변이를 유발하는 등 독성이 강한 물질로 알려져 있다. 세계보건기구(WHO, World Health Organization) 산하 국제암연구센터(IARC, International Agency for Research on Cancer)는 벤조피렌 (benzo[a]pyrene)을 포함하여 PAHs 15종을 Group I(인간 발암물질)로 지정하였다.⁵⁾ 대표적인 발암성 PAHs인 벤조피렌은 인체 내 잔류성과 독성이 강하며, 내분비계장에 추정물질인 동시에 발암가능 물질로서 거의 모든 실험동물에서 암이 유발되는 것으로 확인되었다.⁶⁾

코울타르와 같이 PAHs 발생 작업장에서는 고농도의 직업적인 노출이 가능하며 비직업적으로는 식이(diet), 흡연, 대기오염 등이 PAHs의 노출원으로 알려져 있다.⁷⁾ 미국, 유럽 등 선진국에서는 매년 국민들의 PAHs 노출 수준을 소변 중 대사체 분석으로 파악하고 있으나 우리나라에서는 특정 직업적 노출 외에 일반인들의 다양한 PAHs 노출수준은 보고된 바가 없다.

소변 중 OH-PAHs를 분석하기 위해서는 주로 HPLC/FD⁸⁻¹¹⁾, LC-MS¹²⁻¹⁸⁾, GC/FID¹⁹⁾ 또는 GC-MS²⁰⁾를 이용하는데, HPLC 형광검출기를 이용하여 다양한 PAHs 대사체를 측정하기 위해서는 분석시간이 상당히 길어질 수 있으며, GC/FID나 GC-MS를 이용할 경우에는 휘발성 증가를 위한 유도체화 과정이 필요하다. LC-MS, LC-MS/MS를 이용한 분석법의 경우, naphthalene, phenanthrene, pyrene 등 벤젠고리가 2~4개인 PAHs의 대사체를 측정하는데 적용되고 있는데, 이보다 벤젠고리가 많은 발암성 PAHs 대사체를 함께 분석할 수 있도록 개발된다면 적은 양의 시료를 이용하여 PAHs에 대한 노출 수준을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 좋은 방법이 될 것

이다.

소변에서 배출되는 OH-PAHs는 glucuronide나 sulfate와의 결합된 형태로 배출되는데, 이러한 결합을 깨기 위해서 효소(glucuronidase/arylsulfatase)를 이용한 가수분해법이 일반적으로 이용되어왔다. 가수분해 이후에 소변시료 중의 OH-PAHs의 추출을 위하여 메탄올이나 아세토니트릴을 혼합하여 고형물질을 제거하는 방법과,¹⁴⁾ 액체-액체 추출(liquid liquid extraction) 또는 고체상추출(solid phase extraction)을 이용하는데, 액체-액체 추출은 주로 펜탄,¹⁹⁾ 펜탄:톨루엔(80:20) 혼합액¹³⁾ 등을 사용한다. 고체상추출법은 방해물질의 제거와 농축을 위한 전처리로서, HPLC 형광검출기 분석과는 달리 질량분석기의 검출기에 소변과 같이 다양한 오염물질이 혼재된 시료를 직접 주입할 수는 없기 때문에 질량분석기를 이용할 경우에 자주 사용된다.^{12,16-18)}

이에 본 연구는 한국인의 성인 및 어린이 4,000명을 대상으로 소변 중 OH-PAHs 분석법 마련을 위해 고체상추출법 통해 전처리하고, LC-MS/MS를 이용하여 OH-PAHs 16종을 동시에 분석하는 방법을 개발하였다. 또한 새로운 분석법의 반복성, 재현성, 견고성을 평가하기 위해 2개 기관(을지대, 녹십자의료재단)에서 교차분석을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 분석 대상 물질

소변 중 OH-PAHs 분석에 사용된 16종의 표준물질 중 1-Naphthol (1-Na)와 2-Naphthol (2-Na)은 Fluka (Buchs, Switzerland)에서, 1-Hydroxyphenanthrene (1-OH-Phe), 4-Hydroxyphenanthrene (4-OH-Phe), 3-Hydroxyfluorene (3-OH-Flu)은 Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)에서 구입하였고, 2-Hydroxyphenanthrene (2-OH-Phe), 3-Hydroxyphenanthrene (3-OH-Phe), 3-Hydroxyfluoranthene (3-OH-Fluoran), 1-Hydroxypyrene (1-OHP), 6-Hydroxychrysene (6-OH-Chr), 3-Hydroxybenzo[a]anthracene (3-OH-BaA), 3-Hydroxybenzo[a]pyrene (3-OH-BaP), 3-Hydroxybenzo[j]fluoranthene (3-OH-BjF), 3-hydroxydibenzo[a,h]anthracene (3-OH-DBA)은 Midwest Research Institute (Kansas City, MO, USA), 9-Hydroxyphenanthrene (9-OH-Phe), 2-

Hydroxyfluorene (2-OH-Flu)는 Aldrich (Milwaukee, WI, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 내부표준물질 (IS, Internal Standard)로 사용된 6종은 1-Naphthol-2,3,4,5,6,7,8-d₇ (1-Na-d₇)은 ISOTEC (Miamisburg, OH, USA)에서 구입하였으며, 1-Hydroxy[¹³C₆]Pyrene (¹³C₆-1-OHP), 1-Hydroxy[¹³C₆]benzo[a]anthracene (¹³C₆-1-OH-BaA), 3-Hydroxy[¹³C₆]chrysene (¹³C₆-3-OH-Chr)은 Midwest Research Institute에서, 2-Hydroxy[¹³C₆]fluorene (¹³C₆-2-OH-Flu), 3-Hydroxy[¹³C₆]phenanthrene (¹³C₆-3-OH-Phe)은 Cambridge Isotope Laboratories에서 각각 구입하여 사용하였다.

소변의 글루쿠로나이드 결합을 가수분해하기 위한 효소 β-glucuronidase/aryl sulfatase는 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), 고체상 추출에서 사용되는 Starata-X 카트리지는 phenomenex (Torrance, CA, USA)에서 구입하였다. 전처리와 HPLC 이동상에 사용되는 메탄올과 에틸아세테이트는 JT Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, USA), 증류수는 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

2. 전처리 방법

본 연구에서 확립한 PAHs 대사체 분석법은 Onyemauwa 등¹⁶⁾이 개발한 방법을 일부 변형하여 수행되었다. 분석 대상 물질을 2~4개 벤젠고리보다 큰 물질(3-OH-BjF 등)을 추가하고 전처리에 이용된 소변시료의 양도 1ml로 축소한 후, 전처리 방법과 기기분석조건을 확립하였으며 구체적인 내용은 다음과 같다.

우선, 소변에 포함된 OH-PAHs 대부분 Glucuronide 및 Sulfate와 결합하고 있으므로 이 결합을 끊어주기 위하여 효소 (β-glucuronidase/Ary sulfatase)를 이용한 가수분해반응을 진행하였다. 소변 1 ml를 1.5 ml 원심분리관에 넣고 효소 10 μl, IS 혼합용액 20 μl, 1M HCl 30 μl를 넣고 2분간 혼합한 후 14시간동안 37°C로 맞춰진 incubator에서 반응시켰다.

효소에 의한 가수분해가 완료된 시료는 세척과 농축을 위해 Strata-X 카트리지 (1 cc/30 mg, Phenomenex)를 이용한 고체상추출 (solid phase extraction)을 실시하였다. 우선 2 ml 메탄올과 2 ml 초순수로 카트리지를 활성화하고, 2 ml 초순수와 2 ml 50% 메탄올로 세척한 후 3 ml 에틸아세테이트로 용출시켰다.

추출된 에틸아세테이트 용액은 원심농축기 (Speed-Vac)를 이용하여 진공상태에서 40°C로 가열하며 완전히 건조시키고 여기에 0.3% 암모니아 용액이 첨가된 아세토니트릴 100 μl를 첨가하여 용매 제조정하여 200 μl vial에 넣고 LC-MS/MS 시스템에서 정량분석하였다.

검량선 작성을 위하여 소변을 고체상추출 카트리지에 통과시킨 공시료 (blank urine)에 표준용액을 첨가하여 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 30 ng/ml 농도의 검정곡선 용액을 제조하고 시료를 처리하는 방법과 같이 전처리하여 분석하였다. 1-Na와 2-Na의 검량선 범위는 0.01~30 ng/ml 였으며, 다른 OH-PAHs 14종의 검량선의 범위는 0.01~10 ng/ml로 설정하였다.

3. 기기분석

소변 중 OH-PAHs 분리는 SI-2 (Shiseido, Japan) 액체크로마토그래피 시스템과 Capcellpak C₁₈ (2.0×150 mm, 3.0 μm, Shiseido, Japan) 컬럼을 이용하여 수행하였다. 고체상추출로 전처리된 용액 5 μl를 HPLC system에 주입하여 경사용매법 (gradient mode)을 이용하여 분석대상물질의 피크를 분리하였다. 분리를 위한 이동상은 물(A)과 메탄올(B)이었으며, 유량은 200 μl/min이었다. 이동상의 조건은 초기에 B 60%로 시작하여 19분까지 82%로 상승시키고 24분까지 유지시켰다. 이후 24.1분에 100%로 상승시켜서 3분간 유지하고 다시 초기 상태로 되돌아오도록 하였으며, 총 분석시간은 35분이었다.

OH-PAHs 정량분석은 API 4000 질량분석기 (Appliedbiosystems, USA)를 MRM (multiple reaction mode) 방법으로 수행하였다. PAHs 대사체의 물질별 확인은 Harvard apparatus를 이용한 최적화 (quantitative optimization)를 실시한 후 정량분석을 위하여 확립된 조건으로 ESI(electron spray ionization) 음이온 모드에서 이루어졌으며, 확립된 질량분석 조건은 Table 1과 같다. PAHs 대사체의 경우 전자와의 충돌에 의해 Q3 이온의 생성이 어려우므로 일부 물질의 경우에는 Q1과 Q3를 동일하게 하는 pseudo-MRM 방법을 이용하여 정량하였다.

질량분석기의 parameter는 분석의 감도를 최상으로 유지하기 위하여 curtain gas 15 Mpsi, GS1 40 Mpsi, GS2 60 Mpsi, detector temperature 400를 유

Table 1. The mass spectrometer parameter of PAHs metabolites

compound	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP	CE	CXP
1-Na	142.9	114.9	-55	-34	-5
2-Na	143.1	143.0	-65	-30	-11
2-OH-Flu	181.0	181.0	-75	-35	-7
3-OH-Flu	181.1	181.0	-85	-26	-9
OH-Phe(1,2,4,9)	192.8	165.1	-90	-40	-9
	193.0	193.0	-110	-48	-11
3-OH-Phe	193.1	164.9	-55	-40	-11
1-OHP	216.9	189.0	-50	-44	-7
3-OH-Fluoran	217.0	217.0	-50	-30	-5
6-OH-Chr	243.0	243.0	-100	-44	-13
3-OH-BaA	243.0	214.9	-110	-44	-15
3-OH-BaP	267.0	238.9	-115	-46	-13
3-OH-BjF	267.0	267.0	-95	-50	-5
3-OH-DBA	293.0	293.0	-90	-45	-6
1-Na-d ₇	150.0	150.0	-65	-30	-11
¹³ C ₆ -2-OH-Flu	187.0	187.0	-80	-22	-3
¹³ C ₆ -3-OH-Phe	199.0	170.1	-80	-44	-17
¹³ C ₆ -1-OHP	223.0	194.8	-115	-48	-13
¹³ C ₆ -3-OH-Chr	249.0	249.0	-105	-46	-11
¹³ C ₆ -1-OH-BaA	249.1	221.1	-105	-44	-13

DP: declustering potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential

지하고, 모든 분석대상물질의 EP(entrance potential)는 -10.0 V로 하였다. Ion source는 electrospray ionization (ESI) negative 방식을 이용하였으며 ion source energy는 -4500 V, ion source의 충돌 에너지 (collision energy)를 표현하는 CAD(collisionally activated dissociation)는 5 eV로 고정하였다

3. 분석법의 정확도 검증 방법

본 연구에서 확립한 소변 중 16종 OH-PAHs의 동시 분석법의 정확도 검증을 위하여 검출한계 평가와 정확도 및 정밀도 확인을 위한 실험을 실시하였다. 이 때 사용한 시료는 소변시료를 고체상추출 카트리지를 통과시켜 분석대상물질이 없는 상태의 공시료에 표준물질을 첨가하여 이용하였고, 실제 소변 시료와 같은 방법으로 전처리하여 LC-MS/MS를 통해 정량분석을 하였다.

검출한계(LOD)는 저농도 시료를 반복분석하여 계

산하는 EPA method(40 CFR Part 136. APPENDEX B, revision 1.11)를 이용하였다. 정확도와 정밀도 확인 실험을 위해 공시료에 농도가 각각 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ng/ml 인 표준물질을 첨가하여 각 농도별로 7개의 검정시료를 소변과 같은 방법으로 전처리하여 정량분석하였다. 정확도의 경우 회수율 (recovery)을 이용하여 측정하였으며, 정밀도는 반복 측정의 일정성을 확인하기 위하여 상대표준편차 (RSD)를 이용하였다.

4. 교차분석 및 검증방법

분석에 이용한 시료는 2009년 식품의약품안전평가원 과제로 수행된 유해물질의 인체모니터링 기반연구(과제번호: 09182유해물607)에서 2009~2010년 동안 전국민을 대상으로 표본추출하여 수집한 성인 및 어린이 소변시료 2000건 중 각 100건씩 총 200건을 무작위로 선정하여 이용하였으며, 시료 수집 전에 결정된 윤리위원회(IRB) 결정과는 별도로 본 분석법 개발과 시료분석을 위한 심의를 을지대 윤리위원회에서 획득 후 분석을 수행하였으며, 소변 시료는 전처리 전까지 -80°C로 냉동보관 하였다.

소변 시료 중 OH-PAHs 분석법을 검증하기 위하여 2개 기관(을지대, 녹십자)에서 교차분석을 수행하였다. 을지대에서 개발된 전처리 및 기기분석 방법을 동일하게 이용하여 녹십자에서 분석한 결과와 비교하였다.

분석법의 재현성은 두 기관 분석결과의 ICC (interclass correlation coefficient) 값을 구하여 검증하였다. ICC는 전체 분산 중에서 그룹 내의 분산이 차지하는 비율을 의미하며, 다음의 식으로 표현된다 (식 1).²¹⁾ ICC 값의 경우 0.75 이상일 때 우수, 0.4~0.75일 때 양호, 0.4 미만일 때 적합하지 않은 것으로 판정한다.²²⁾

$$ICC \text{ or } \rho = \frac{S_b^2}{(S_b^2 + S_w^2)} \tag{1}$$

여기서 S_b는 비교군 간의 변이를 나타내며, S_w는 동일군 내의 변이를 나타낸다. 시료별로 두 기관 간 분석결과를 엑셀에서 정리한 자료(wide form)를 SAS ver. 9.2에서 로그 변환 후 icc_sas macro를 이용하여 분석하였다.

Table 2. Validation results; intra-day and inter-day accuracy

compound	<i>Intra-day (n=5), ng/ml</i>					<i>Inter-day (3days), ng/ml</i>				
	0.05	0.1	0.5	1	5	0.05	0.1	0.5	1	5
1-Na			108.7	105.2	100.8			96.9	98.7	101.3
2-Na			95.1	98.0	98.0			91.3	99.2	103.1
2-OH-Flu	92.5	96.1	99.1	104.2	96.8	94.9	97.0	100.0	103.4	98.1
3-OH-Flu			104.1	105.6	102.9			118.8	107.0	103.2
(1+9)-OH-Phe	100.2	102.5	108.3	116.6	106.7	103.1	108.8	111.8	118.9	107.3
(2+3)-OH-Phe	98.0	99.4	98.8	104.4	100.5	92.9	97.5	99.2	104.3	99.5
4-OH-Phe	100.8	103.7	105.7	109.8	99.8	107.1	106.8	106.2	109.0	100.4
1-OHP	103.5	100.2	97.7	101.8	98.4	100.6	100.0	97.7	102.6	98.5
3-OH-Fluoran	99.3	99.7	89.2	95.7	90.2	100.3	100.9	92.0	96.9	90.6
6-OH-Chr	104.8	106.9	109.9	113.4	110.8	103.2	104.8	100.1	104.9	101.9
3-OH-BaA	100.8	102.3	92.2	98.1	93.1	102.1	103.6	95.5	100.8	95.7
3-OH-BaP	98.7	99.4	103.0	108.2	107.2	98.7	90.3	103.3	106.3	105.9
3-OH-BjF	98.9	104.4	102.9	109.9	102.4	98.5	106.6	102.9	110.1	101.7
3-OH-DBA	102.0	104.6	95.3	95.6	89.2	112.6	103.4	94.4	97.7	93.1

Table 3. Validation results; intra-day and inter-day precision and limit of detection

compound	<i>Intra-day (n=5), ng/ml</i>					<i>Inter-day (3days), ng/ml</i>					LOD ng/ml
	0.05	0.1	0.5	1	5	0.05	0.1	0.5	1	5	
1-Na			0.5	0.9	1.6			1.7	2.0	2.2	0.051
2-Na			1.4	1.3	2.2			2.0	2.7	3.8	0.125
2-OH-Flu	0.7	1.6	2.5	2.9	2.4	1.8	1.9	2.1	2.9	3.3	0.056
3-OH-Flu			3.0	4.7	3.4			3.7	4.1	2.9	0.050
(1+9)-OH-Phe	1.9	1.3	2.7	3.2	4.2	2.4	1.7	3.0	3.8	3.8	0.050
(2+3)-OH-Phe	2.6	3.2	1.2	1.6	2.7	3.3	3.1	1.2	2.6	2.4	0.020
4-OH-Phe	5.5	2.0	2.2	2.7	2.4	4.4	2.4	2.6	3.0	2.1	0.037
1-OHP	1.9	1.4	2.1	1.6	2.0	2.8	2.4	1.8	1.7	1.6	0.037
3-OH-Fluoran	3.9	6.2	1.6	3.2	1.7	3.3	5.5	2.0	2.6	2.0	0.022
6-OH-Chr	3.1	3.3	3.8	2.3	2.7	3.5	5.6	4.3	3.7	3.9	0.066
3-OH-BaA	6.3	5.4	2.0	2.6	4.9	5.5	4.2	3.0	3.2	5.5	0.029
3-OH-BaP	2.8	4.8	2.6	5.6	5.0	2.8	4.0	3.4	5.4	5.4	0.042
3-OH-BjF	5.5	3.5	3.8	4.3	3.6	4.1	4.1	4.2	3.5	4.3	0.061
3-OH-DBA	7.3	4.6	5.4	4.1	3.9	7.7	3.0	5.9	3.5	4.4	0.081

III. 연구결과

1. 소변 시료 중 OH-PAHs 16종의 동시 분석법

소변 시료 중 OH-PAHs 분석을 위한 검정곡선에 서 회귀직선의 결정계수(r^2) 값은 0.9988~1.000으로 안정적인 직선성을 보여주었다. 각 분석대상 물질별 일내 및 일간 정확도는 Table 2에 제시하였으며 일

내 및 일간 정밀도와 검출한계는 Table 3에 제시하였다. OH-PAHs 분석을 위해 표준물질을 첨가하여 분석한 LC-MS/MS 크로마토그램은 Fig. 1과 같이 나타났다.

검출한계(LOD)는 0.02 ng/ml ((2+3)-OH-Phe) ~ 0.125 ng/ml (2-Na)의 범위로 나타났다. 16종의 OH-PAHs의 정확도는 89.2~118.8%, 정밀도는 10%미만

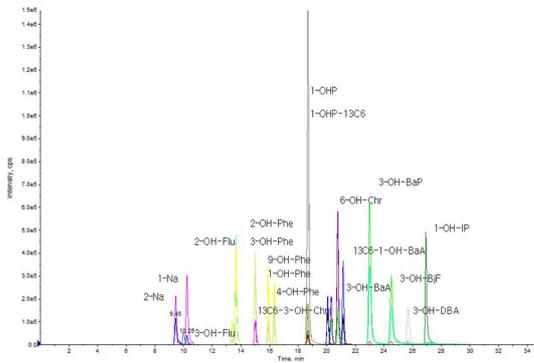


Fig 1. LC-MS/MS Chromatograms of PAHs metabolites.

검출한계 이상의 값을 나타낸 비율은 2-Na (96%), 1-Na (93%), 2-OH-Flu (84%), (2+3)-OH-Phe (84%), 1-OHP (76%), (1+9)-OH-Phe (61%), 3-OH-Flu (47%), 3-OH-Fluoran (31%), 4-OH-Phe (26%), 3-OH-BaA (3%) 순으로 검출되었으며, 나머지 물질들은 모두 검출되지 않았다. 가장 높은 농도를 보인 물질은 2-Na이었으며, 그 다음으로 1-Na, 2-OH-Flu, (1+9)-OH-Phe 순이었다 (Table 4).

본 연구에서는 새로운 OH-PAHs의 분석법을 확립한 후 재현성을 평가하기 위해 을지대학교와 녹십자 의료재단에서 교차분석을 수행하였다. 두 기관에서 분석에 이용한 기본적인 방법은 동일하지만 사용한 시약, 분석장비, 실험자, 분석시간 등 세부적인 조건이 바뀐 상황에서 정확도와 정밀도가 유지되는지를 관찰하는 분석방법의 신뢰도의 일종인 견고성을 평가한 것이다. 두 기관의 교차분석 결과를 검증하기 위하여 75% 이상 검출된 8종의 물질에 대하여 ICC 값을 구하여 비교하였다. 비교결과 4종의 물질(1-Na,

으로 안정적인 값을 얻었다.

2. PAHs 대사체 교차분석 결과

성인 및 어린이 200명의 소변시료를 분석한 결과

Table 4. Cross-Validation results between Eulji University and Green Cross Laboratory (unit: ng/ml)

compound	Eulji University			Green Cross-labs				Log transformation		
	N ^a	Mean ^b	SD ^c	N	Mean	SD	LOD	N	r	ICC(95% CI)
1-Na	185	4.95	9.47	173	5.77	11.08	0.152	169	0.86	0.86 (0.82-0.89)
2-Na	192	5.07	7.38	197	6.21	8.95	0.125	190	0.87	0.86 (0.82-0.89)
2-OH-Flu	168	0.459	0.70	166	0.666	0.98	0.141	158	0.90	0.78 (0.71-0.83)
3-OH-Flu	94	0.152	0.43	72	0.164	0.37	0.168	74	0.83	0.49 (0.25-0.67)
(1+9)-OH-Phe ^d	122	0.096	0.10	133	0.118	0.20	0.068	115	0.84	0.77 (0.68-0.83)
(2+3)-OH-Phe ^d	167	0.087	0.08	72	0.079	0.11	0.12	72	0.72	0.70 (0.56-0.80)
4-OH-Phe	51	0.029	0.03	15	0.011	0.11	0.069	14	0.75	0.65 (0.24-0.86)
1-OHP	152	0.124	0.11	172	0.209	0.19	0.053	147	0.78	0.56 (0.44-0.66)
3-OH-Fluoran	62	0.022	0.03	1	0.002		0.339	1	NC ^e	NC

^aN : number of detected.

^bMean was calculated assuming that levels <LOD are equal to 1/2 LOD.

^cSD : standard deviation of detected sample concentration.

^d: two OH-phenanthrenes were simultaneously eluted.

^eNC: not calculated.

*Four compounds were not presented in the table; 6-OH-Chr, 3-OH-BaP and 3-OH-BjF were not detected in all samples. 3-OH-BaA and 3-OH-DBA was detected in only 5 and 6 samples, respectively.

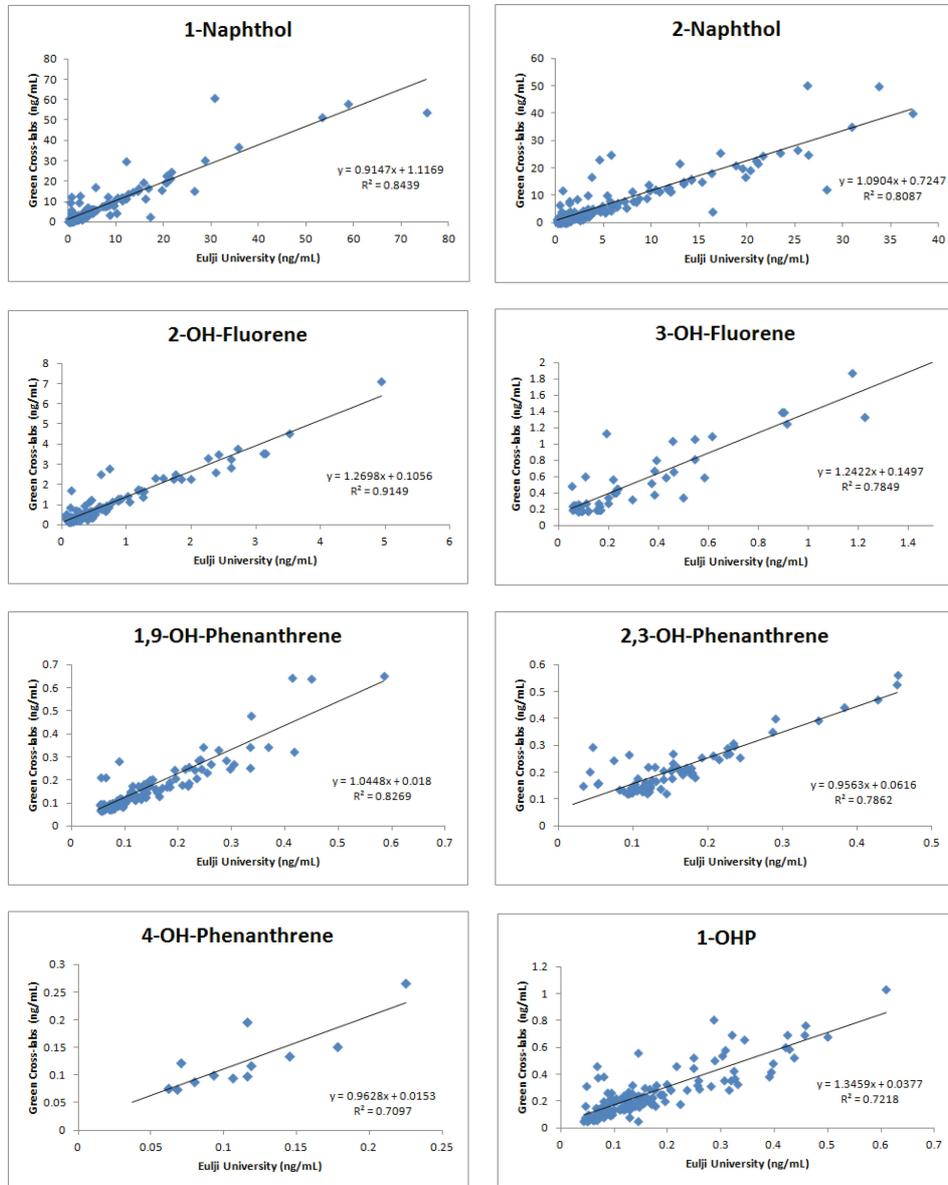


Fig 2. Cross validation results of urinary OH-PAHs between Eulji University and Green Cross Laboratory.

2-Na, 2-OH-Flu, (1+9)-OH-Phe)은 우수한 결과를 보였으며, 4종(3-OH-Flu, (2+3)-OH-Phe, 4-OH-Phe, 1-OHP)의 경우 양호한 결과를 나타내었다 (Table 4). Fig. 2는 2개 기관에서 교차분석을 실시한 시료 200개의 결과를 비교한 그래프이다. 대부분의 시료에서 검출한계 이하로 나타난 물질들을 제외한, 8종의 경우 두 기관의 분석결과가 유의한 상관성을 보여주었

다. 또한 분석 값이 일치성을 보여주는 회귀직선의 기울기는 fluorene 및 pyrene의 대사체를 제외하면 0.9~1.1 이내의 값을 나타내었다(Fig. 2).

IV. 고 찰

1. 소변 시료 중 PAHs 대사체 분석법

Table 5. The concentration of urinary PAHs metabolites (unit: ng/ml)

Ref.	Amorim (2009) ¹⁴		Fan (2012) ¹⁵	Zhao (2013) ¹⁶		Onyemauwa (2009) ¹⁸		This study (n=200)
	Smoker (n=5)	Non smoker (n=5)	(n=92)	Smoker (n=8)	Non smoker (n=4)	Steel workers (n=57)	Controls (n=27)	
1-Na	4.34	1.76	1.954 ± 4.917 ^a	9	2.3	7.39 ± 2.51	2.18 ± 43.8	4.945 ± 9.468
2-Na	3.48	1.93	5.992 ± 8.334	20.8	3.5	7.12 ± 2.73	3.08 ± 4.27	5.067 ± 7.375
2-OH-Flu	2.43	0.89	0.325 ± 0.572	7.3	2.8	4.11 ± 2.85	0.600 ± 3.94	0.459 ± 0.698
3-OH-Flu			0.263 ± 0.641	5.9	0.57			0.152 ± 0.433
1-OH-Phe						0.397 ± 2.84	0.068 ± 5.25	
2-OH-Phe			0.064 ± 0.069	1.3	0.87			
3-OH-Phe			0.063 ± 0.0104	2.6	1.2			
4-OH-Phe			0.077 ± 0.091			0.138 ± 3.17	0.029 ± 4.09	0.029 ± 0.031
9-OH-Phe	2.26	0.83		0.7	0.06	0.437 ± 2.87	0.095 ± 4.26	
(1+4)-OH-Phe ^c				4.2	1.8			
(1+9)-OH-Phe ^c			0.031 ± 0.034					0.096 ± 0.098
(2+3)-OH-Phe ^c						0.980 ± 2.36	0.246 ± 2.79	0.087 ± 0.083
1-OHP			0.038 ± 0.056	3.4	2.2	0.586 ± 3.04	0.104 ± 4.81	0.124 ± 0.114
3-OH-Fluoran								0.022 ± 0.027
6-OH-Chr								ND ^b
3-OH-BaA								0.016 ± 0.007
3-OH-BaP								ND ^b
3-OH-BjF								ND ^b
3-OH-DBA								0.043 ± 0.009

a: mean ± standard deviation, where the concentration of not detected samples were replaced by 1/2LOD.

b: the concentrations of all samples were below the LOD.

c: two OH-phenanthrenes were simultaneously eluted.

2000년대 이전에는 PAHs 노출에 대한 평가를 위해 PAHs 대사체 전체를 분석하기 보다는 PAHs 노출에 관한 대표적 지표로 사용할 수 있는 1-OHP만을 분석한 연구들이 많았다.^{9,12} 최근의 PAHs 대사체 분석에 관한 문헌들에서는 1-OHP뿐만 아니라 발암성 PAHs로 알려진 benzo[a]pyrene, chrysene 등의 대사체를 포함하여 13종,¹² 12종,²⁰ 10종^{10,14} 등의 동시분석법이 개발되었다. 본 연구에서 새롭게 적용한 분석법은 효소에 의한 가수분해와 고체상추출을 이용하는 기존의 전처리 방법과 LC-MS/MS를 활용¹⁶ 하여 소량의 시료(1 ml)로 신속하게 발암성 PAHs를 포함한 16종의 PAHs 대사체의 동시분석이 가능함을 보였다. 본 연구에서 적용한 분석법의 모태가 된 Onyemauwa 등¹⁶이 개발한 방법에 비하여 더 적은 용량의 시료를 이용하여 다양한 PAHs 대사체 분석을 위한 방법을 확립하였다.

본 연구에서 얻어진 검출한계를 기존 연구와 비교할 때, 동일한 장비를 이용하거나¹³ HPLC 형광 검출기를 이용한 경우¹¹에는 유사한 수준의 값을 보이고 있으며, 성능이 우수한 질량분석기를 이용하거나^{14,18} 전처리에 이용한 시료의 양을 늘린 경우¹²에는 본 연구 결과보다 낮은 검출한계 값을 보여 주었다.

교차분석 자료는 을지대학교에서 개발한 소변 중 OH-PAHs 분석법을 그대로 적용하여 녹십자에서 전처리와 정량분석을 수행한 결과를 비교한 것이다. 분석에 이용한 질량분석기도 같았으며 동일한 절차를 통해 수행한 결과이었음에도 불구하고 물질별 검출한계의 경우, 녹십자에서 분석한 결과가 상당히 높게 나타났다. 검출한계의 영향으로 3-OH-Fluoranthene의 경우 검출비율이 녹십자 분석결과에서는 상당히 낮은 것으로 나타났다. 이것은 미량

물질 분석의 경우 실험 절차가 주어지더라도 상당 시간의 숙련 기간이 필요하다는 것을 보여준다.

2. 소변 시료 중 PAHs 대사체 농도 비교

소변 시료 중 OH-PAHs 분석결과 비발암성 물질 (naphthalene, fluorene, phenanthrene, pyrene)의 대사체들은 대부분의 시료에서 검출되었으며, 검출된 농도의 평균값(LOD 미만 값은 1/2LOD 적용)은 2-Na (5.07 ng/ml), 1-Na (4.95 ng/ml), 2-OH-Flu (0.46 ng/ml), 1-OHP (0.12 ng/ml), (1+9)-OH-Phe (0.096 ng/ml), (2+3)-OH-Phe (0.087 ng/ml), 4-OH-Phe (0.029 ng/ml), 3-OH-Fluoran (0.022 ng/ml) 순이었다. 본 연구의 결과를 다른 연구자의 분석결과와 비교하면 가장 높은 농도를 보인 naphthol의 경우 흡연자,¹⁴⁾ 철강근로자¹⁶⁾ 보다는 낮은 농도를 보였지만 일반인구(대조군)¹⁶⁾나 비흡연자¹⁴⁾ 보다는 높은 농도를 나타내었다. Naphthol을 제외한 다른 PAHs 대사체의 경우 시료수가 충분한 연구들^{13,16)}과 유사한 농도분포를 보였다 (Table 5).

V. 결 론

본 연구에서는 효소를 이용한 가수분해와 고체상 추출법으로 전처리한 후 LC-MS/MS를 이용하여 소변 중 16종 OH-PAHs를 동시에 분석하는 방법을 개발하였다. 분석법 검증 결과 우수한 직선성과 인체 시료 분석에 적합한 검출한계, 정확도 및 정밀도를 보여 향후 대단위 환경역학 연구에 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 분석법의 재현성을 확인하기 위하여 2개 기관에서 교차분석을 수행하고 ICC 값을 이용하여 검증한 결과, 두 기관 분석결과와의 일치도가 높은 것으로 나타났다. 교차분석에 이용된 200건의 소변 시료 중 PAHs 대사체 농도는 1-naphthol 5.07 ng/ml, 2-naphthol 4.95 ng/ml, 2-fluorene 0.46 ng/ml, 3-fluorene 0.15 ng/ml, 1-OHP 0.12 ng/ml 등으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2014~2015년 식품의약품안전평가원의 연구개발비(과제번호 14162위해기652)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Lokeshkumar B, Rajendran P, Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015; 5(3): 182-18.
2. Motorykin O, Schrlau J, Jia Y, Harper B, Harris S, Harding A, et al. Determination of parent and hydroxy PAHs in personal PM2.5 and urine samples collected during Native American fish smoking activities. *Science of the Total Environment*. 2015; 505: 694-703.
3. Levine H, Berman T, Goldsmith R, Göen T, Spungen J, Novack L, et al. Urinary concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in Israeli adults: Demographic and life-style predictors. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2015; 218: 123-131.
4. Serrano M, Bartolomé M, Gallego-Picó A, Garcinuño RM, Bravo JC, Fernández P. Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the isolation of 1-hydroxypyrene in human urine. *Talanta*. 2015; 143: 71-76.
5. IARC. Polynuclear aromatic compounds: Part 1. Chemical, environmental and experimental data. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 32, 1983. p. 1-453.
6. Sung T, Lee JS, Lee HG. Benzo(a)pyrene Contents in commercial vegetable oils and changes during processing of vegetable oils. *Korean J Food Sci Technol*. 2012; 44(3): 269-273.
7. Bartolomé M, Ramos JJ, Cutanda F, Huetos O, Esteban M, Ruiz-Moraga M, et al. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENTES project. *Chemosphere*. 2015; 135: 436-446.
8. Hara K, Hanaka T, Yamana Y, Itani T. Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Science of the Total Environment*. 1997; 199: 159-164.
9. Merlo F, Andreassen A, Weston A, Pan CF, Haugen A, Valerio F, et al. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998; 7(2): 147-155.
10. Chetiyakornkul T, Toriba A, Kameda T, Tang N,

- Hayakawa K. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Bioanal Chem.* 2006; 386: 712-718.
11. Hagedorn HW, Scherer G, Engl J, Riedel K, Cheung F, Errington G, et al. Urinary excretion of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in nonsmokers and in smokers of cigarettes with different ISO tar yields. *Journal of Analytical Toxicology.* 2009; 33(6): 301-309.
 12. 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 Commun Mass Spectrom.* 2004; 18(19): 2299-2308.
 13. Fan R, Ramage R, Wang D, Zhou J, She J. Determination of ten monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid-liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2012; 93: 383-391.
 14. Zhao G, Chen Y, Wang S, Yu J, Wang X, Xie F. Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2013; 116: 822-826.
 15. Yu J, Wang S, Zhao G, Wang B, Ding L, Zhang X, et al. Determination of urinary aromatic amines in smokers and nonsmokers using a MIPs-SPE coupled with LC-MS/MS method. *Journal of Chromatography B.* 2014; 958: 130-135.
 16. Onyemauwa F, Rappaport SM, Sobus JR, Gajdosova D, Wu R, Waidyanatha S. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *Journal of Chromatography B.* 2009; 877(11-12): 1117-1125.
 17. Luo K, Gao Q, Hu J. Derivatization method for sensitive determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene in human urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2015; 1379: 51-55.
 18. Zhang X, Hou H, Xiong W, Hu Q. Development of a method to detect three monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by liquid chromatographic tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry.* 2015; 2015: 1-9.
 19. Amorim LCA, Dimandja JM, Cardeal ZL. Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. *Journal of Chromatography A.* 2009; 1216: 2900-2904.
 20. Lia Z, Sandau CD, Romanoff LC, Caudill SP, Sjodin A, Needham LL, et al. Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. *Environmental Research.* 2008; 107: 320-331.
 21. Killip S, Mabfoud Z, Pearce K. What is an intraclass correlation coefficient? crucial concepts for primary care researchers. *Annals of Family Medicine.* 2004; 2(3): 204-208.
 22. Pinedo M, Villacorta E, Tapia C, Arnold R, López J, Revilla A, et al. Inter- and intra-observer variability in the echocardiographic evaluation of right ventricular function. *Rev Esp Cardiol.* 2010; 63: 802-809.