

보건분야 - 연구자료
연구원 2002-74-498

유해물질 노출근로자의 조기 이상 발견을
위한 새로운 생체 시료 분석방법 개발
- 액체크로마토그래피/질량분석/질량분석시스템을 이용한
생물학적지표물질의 분석 -

**Analysis of metabolites of
organic solvent by HPLC-tandem MS**

2002

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

요 약 문

1. 과제명: 유해물질 노출근로자의 조기 이상 발견을 위한 새로운 생체 시료 분석방법 개발 - 액체크로마토그래피/질량분석/질량분석시스템을 이용한 생물학적지표물질의 분석 -

2. 연구기간: 1년 (2002년 1월 - 2002년 12월)

3. 연구자: 총괄연구책임자 : 이 미 영 (선임연구원)

공 동 연 구 자 : 박 인 정 (선임연구원)

4. 연구목적

유해물질에 노출된 근로자의 생물학적 모니터링을 위해 LC/MS/MS 분석 방법을 이용하여 신속하고 선택적인 생물학적지표물질의 미량 분석법을 확립하고자 함.

5. 연구내용

- LC/MS/MS법에 의한 유기용제 대사산물 분석
- 유기용제 대사산물의 최적 분석 조건 설정
- 분석 방법의 선택성 조사

- 회수율, 분석방법의 정확도, 정밀도, 검출 감도 등 자료 분석

6. 활용계획

톨루엔, 자일렌, 스티렌 등 유기용제 대사산물의 생물학적 모니터링에 응용하여 신속하고 정확한 분석 결과 도출에 활용함.

7. 연구개요

연구목적: 유해물질에 노출된 근로자의 생물학적 모니터링을 위해 LC/MS/MS 분석 방법을 이용하여 신속하고 선택적인 생물학적지표물질의 미량 분석법을 확립하고자 하였다.

연구방법: 액체크로마토그래피 - 고상추출 시스템 - 질량분석/질량분석 시스템을 연결하여 분석 시스템을 구축하고 유기용제 대사산물 표준시료를 이용하여 유기용제 대사산물 분석을 위한 최적 조건을 설정하였다. 분석 대상 물질에 선택적으로 반응하는 조건에서 각 성분의 회수율, 분석방법의 정확도, 정밀도, 검출 감도 등을 조사하였다. 산업안전보건연구원에서 수행하는 정도관리 시료 72 건, 독일 정도관리 표준시료 4 건을 본 시스템에 주입하여 유기산 성분을 분석하고, 그 결과를 기존 가스 크로마토그래피에 의한 결과와 대조하여 기존 방법과의 분석 결과 정확도를 비교하였다.

연구결과: 고상추출을 이용하여 유기용제 대사산물을 정제하기 위해 C18 HD 카트리지를 고상 추출 고정상으로 사용했을 때 효과적인 소변 중 유기산의 정제가 가능하였으며 이동상으로 메탄올:10% 메탄올/0.02% 초산 수용액 1:1을 사용한 분석 조건에서 별도의 분석용 칼럼을 사용하지 않고도 마뇨산, 메틸마뇨산, 페닐글리옥실산의 고속 분석이 가능하였다. 만델산과 다른 유기산을 동시에 분석하기 위해 이동상으로 30 % 메탄올/0.02% 초산 수용액을 사용한 분석 조건에서 microbore 칼럼을 사용했을 때 만델산을 비롯한 다른 유기산들의 선택적인 분석이 가능하였다. 각 성분의 회수율 시험 결과는 97 - 110 % 범위로 양호한 회수율을 나타내었으며, 검출한계는 마뇨산의 경우 0.3 pg이었다(S/N 비 3). 유기산 분석을 위한 검량선은 만델산 0.07 - 0.35 g/L, 마뇨산 0.43 - 2.14 g/L, 페닐글리옥실산 0.08 - 0.38 g/L, 메틸마뇨산 0.07 - 0.67 g/L 범위에서 작성하였으며 이때 검량선의 상관계수는 0.997 - 0.999로 양호한 직선성을 나타내었다.

본 분석 방법을 사용하여 국내 정도관리 시료 및 독일 정도관리 시료를 분석하고 이를 기존의 분석 방법에 의한 분석 결과와 비교한 결과, 액체크로마토그래피/질량분석/질량분석 방법에 의한 결과가 더 정확하였다.

결론: 선택적 미량 분석이 가능한 액체크로마토그래피/이중질량분석 방법을 고상추출과 결합시킨 분석 시스템을 이용한 결과, 기존 방법에 비해 신속하고 정확한 유기용제 대사산물의 생물학적 모니터링이 가능하

였다.

중심어: LC/MS/MS, 고상 추출, 만델린산, 마노산, 페닐글리옥실산, 메틸마노산

차 례

제 1장 서 론	1
1. 연구배경 및 목적	1
제 2장 연구 방법	4
1. 실험	4
가. 시약 및 장비	4
나. 표준용액 제조	5
다. 시료 전처리	6
라. 분석조건	6
제 3장 결 과	10
제 4장 고 찰	21
참고문헌	23

1제 장 서 론

1. 연구배경 및 목적

질량 분석의 응용 분야 질량 분석 방법은 성분 분석을 분자 수준에서 수행하는 가장 고감도의 분석 방법이다. 이 방법을 사용하면 각 성분의 분자량에 대한 정보를 알아내어 미지 성분이 어떤 물질인지 규명할 수 있으며, 역으로 분자량을 알고 있는 성분에 대해 그 질량을 선택하여 분석함으로써 원하는 물질에 대한 선택적인 분석도 가능하다. 질량 분석의 응용 범위는 복잡한 유기 화합물 혼합물 확인과 정량, 습관성 약물 등 법의학 분석, 환경 오염 물질 분석, 무기화합물 다원소의 초감도 분석, 생체 분자의 구조 확인, 단백질, 다당류 등 생체 분자의 서열 분석 등으로, 매우 다양한 분야에 걸쳐서 활발하게 이용되고 있다.

질량 분석의 기본 원리는, 물질 분자를 이온으로 만들고, 이 이온을 질량/하전 비(m/z ratio)에 따라 분리 혹은 선택하여 검출하는 것이다. 질량 분석 결과는 이 질량/하전 비로 나타나며, 단일 하전을 가지는 이온은 질량 분석 스펙트럼에 나타나는 숫자가 해당 이온의 질량이 된다. 시료 중의 목적 성분을 이온으로 만들어야 질량 분석기에서 분석이 가능하며, 이전에는 질량 분석 시스템이 모두 진공을 유지해야 해, 액체가 시스템에 들어갈 때 급격한 기화로 인한 진공 상태의 약화로 액체 크로마토그래피와 질량 분석기와의 연결이 어렵고, 시료의 이온화가 어려웠으나, 최근에는 터보스프레이 방식 등의 방법을 이용하여 상압에서 이온화가 가능해짐으로써 액체 크로마토그래피와 질량 분석기와의 연결을 용이하게 하여, 고분자와 같은 비휘발성인 물질의 질량 분석이 가능해지는 등 그 응용이 급증하고 있다. 이온을 분리 분석하는 부분은 사극자관으로, 이온은 사극자관의 전자기적 변화에 의해 특정 질량의 이온만이 분리된 후, 검출기까지 도달한 해당 질량의 이온이 검출된다(그림 1).

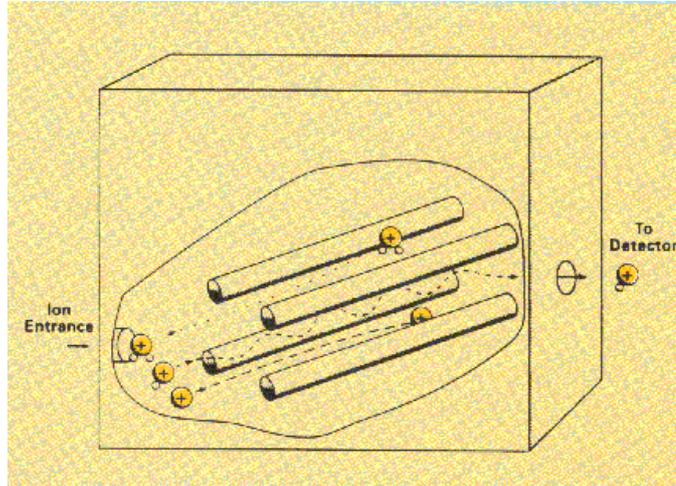


그림 1. 사중극관을 통한 질량 이온 분석

한편, 분자를 질량 분석기 내부에 들어간 분자는 이온화 과정 중이나 이중 질량 분석기(tandem MS 혹은 MS/MS)의 중간에 장치된 반응부에서 가스와 충돌로 다시 한번 분해가 되어, 해당 분자에서만 발견되는 분자 조각 이온을 생성할 수 있다(그림 2). 이중 질량 분석기는 원래의 분자 이온과 이온 조각 쌍을 조합, 분석함으로써 유사한 구조를 가지면서 세부 구조가 다른 물질들을 구분하여 분리 분석할 수 있고, 이를 MRM(Multiple reaction monitoring)이라 하며, 이 방법을 사용하면 매우 선택적인 미량 분석이 가능하다.

유기 용제의 생물학적 모니터링을 위한 지표 물질로서, 톨루엔은 마노산(분자량 179.2), 스티렌은 만델린산(분자량 152), 페닐글리옥실산(분자량 150), 자일렌은 메틸 마노산(분자량 193)을 분석 대상으로 한다. 현재 마노산의 분석 방법으로 UV법, 다른 유기산들과의 동시 분석을 위한 분석 방법으로는 HPLC-UV(고성능 액체크로마토그래피-자외부, high performance liquid

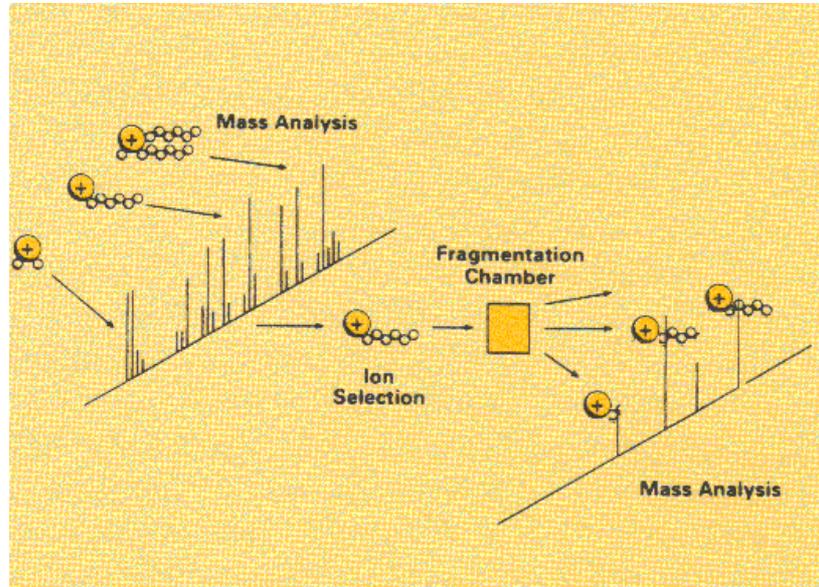


그림 2. LC/MS/MS의 MRM(Multiple reaction monitoring) 이온 쌍 생성

chromatography-ultraviolet) 검출법, GC-FID (기체크로마토그래피-불꽃 이온화 검출기, gas chromatography-flame ionization detector)법을 이용해 생물학적 모니터링을 수행하고 있다. 본 연구에서는 이들 유기 용제 대사산물을 대상으로 하여, 액체크로마토그래피와 상온, 상압하에서 운영되는 시료 이온화 장치, 고온, 고진공상태의 질량검출기, 그리고 빠르고 효율적으로 시료 성분 추출이 가능한 고상 추출기를 조합시켜, 유해물질에 노출된 근로자의 생물학적 모니터링을 위한 신속하고 효과적인 생물학적지표물질의 분석법을 확립하고자 하였다.

2 제 장 연구 방법

1. 실험

가. 시약 및 장비

1) 시약

마노산, 만델린산, 페닐글리옥실산, o-, m-, p-메틸마노산, 신나민산 등은 Sigma사(미국)의 특급 시약을, 초산은 Junsei사(일본)의 특급 시약을 사용하였으며 메탄올은 J.T.Baker사(미국)의 HPLC용을 사용하였다. 탈이온수는 Millipore사(미국)의 Milli-RO와 Milli-Q water system으로 실험실에서 제조하여 사용하였다.

2) 장비

LC/MS/MS 분석에 사용한 장비는 Agilent사(미국)의 HP1100 system 및 PE SCIEX사(미국)의 API3000이며, 시료의 전처리를 위해 Spark사(네덜란드)의 PROSPEKT 2 고상추출기를 사용하였다. 각 대상 물질의 최적 조건을 검토하기 위하여 Hamilton사(미국)의 syringe pump를 사용하였고, 여기에 Hamilton사(미국)의 25, 1000, 2500 μ L gas-tight syringe를 장착하여 질량 분석기에 시료를 주입하면서 최적 조건을 검토하였다. 또한 infusion analysis를 통한 빠른 조건 검토를 위해 Valco사(미국)의 injection valve를 syringe pump와 질량 분석기 사이에 연결하고 최적 조건 설정에 사용하였다. 질량 분석기 조건 설정 후 시료 전처리를 위해 Spark사(네덜란드)의 HYSHERE RP method development kit 중 C18 HD 카트리지를(7 μ m, 10 x 2 mm)를 사용하였고, 성분 분리를 위해 Waters사(미국)의 Xterra MS C18 칼럼(2.5 μ m, 2.1 x 30 mm)을 사용하였다.

장비 구동용 소프트웨어로 HPLC에는 Hpchem (v.A.06.03)을, 질량분석기에는 Analyst (v.1.1)를, 고상추출기에는 SparkLink(v.2.10)를 사용하였다. 그

림 3에 분석 시스템을 나타내었다.

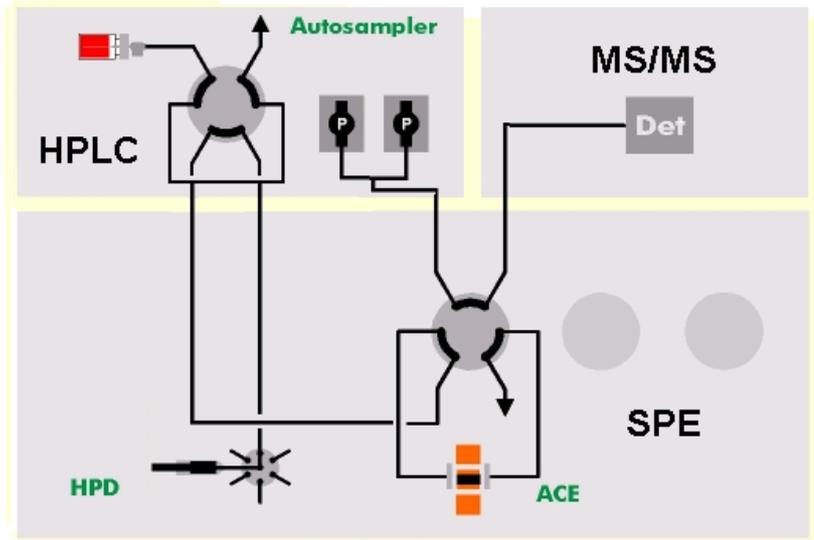


그림 3. 분석 시스템

가. 고상추출 시스템(Solid phase extraction)

- HPD(High pressure dispenser)
- ACE(Automated cartridge exchange)

나. 액체크로마토그래피(HPLC)

다. 질량분석/질량분석 시스템(Tandem Mass Spectrometer)

나. 표준용액 제조

- 1) 만델린산 0.035 g, 마노산 0.214 g, 페닐글리옥실산 0.038 g, o-메틸마노산 0.034 g, m-메틸마노산 0.036 g, p-메틸마노산 0.031 g, 신나민산 0.10 g을 하나의 100 mL용량플라스크에 차례로 옮기고 이동상을 용매로 하여 표선을 채워 만델린산 0.35 g/L, 마노산 2.14 g/L, 페닐글리옥실산 0.38 g/L, o-메틸마노산 0.34 g/L, m-메틸마노산 0.36 g/L, p-메틸마노산 0.31 g/L 용액을 만들어 검량선 작성용 표준용액

원액으로 하였다.

- 2) 만델린산 0.044 g, 마노산 0.034 g, 페닐글리옥실산 0.076 g, o-메틸마노산 0.068 g, m-메틸마노산 0.050 g, p-메틸마노산 0.034 g, 신나민산 0.10 g을 각각 100 mL 용량플라스크에 옮기고 이동상을 용매로 하여 표선을 채워 만델린산 0.44 g/L, 마노산 0.34 g/L, 페닐글리옥실산 0.76 g/L, o-메틸마노산 0.68 g/L, m-메틸마노산 0.50 g/L, p-메틸마노산 0.34 g/L, 신나민산 1.0 g/L 용액을 만들어 LC/MS/MS 분석조건 설정용 원액으로 사용하였다.
- 3) 검량선 작성용 표준용액 원액을 2, 4, 6, 8 mL 취하여 각각 10 mL 용량플라스크에 옮기고 이동상으로 표선을 채워 희석하여 검량선 작성에 사용하였다.

다. 시료 전처리

- 1) 표준용액이나 소변 시료 10 μ L 혹은 50 μ L를 취하여 HPLC용 바이알에 옮긴 후 0.02% 초산 수용액 1,000 μ L와 혼합하여 이를 검액으로 하였다.
- 2) 자동 시료 주입기에서 고상추출기에 1 μ L의 검액을 주입하여 전처리 후 LC/MS/MS로 분석하였다.

라. 분석조건

1) 고상추출

고상추출용 조건 검토를 위해 8종의 Hysphere 역상 카트리지(CN, C2, C8, C8(EC), C18(EC), C18 HD, resin GP, resin SH)를 이용한 분석을 시도하였고, 이 중 시료 분석에는 C18 HD를 사용하였다. 카트리지를 메탄올 1000 μ L로

초기화하고 0.02% 초산 수용액 1000 μ L로 안정화한 후 다시 0.02% 초산 수용액 500 μ L를 용리시켜 시료를 주입하였다. 카트리지를 다시 0.02% 초산 수용액 500 μ L로 세척한 후 크로마토그래피 이동상으로 용리시켜 분석하였다 (그림 4). 분리 결과를 검토하기 위해 분리되어 나온 유기산을 UV 검출기 254, 225 nm에서 관찰하고, 시료의 고상 추출 시 방해 물질의 제거 정도를 관찰하기 위해 질량 분석기 검출 시 UV 검출기를 동시에 이용하였다.

Show Program Steps	
01 new cartridge	Exchange completed Syringe ready HP AS request: On Position left clamp valve: [1-2]Left 1-2 Cartridge exchange left Diagram HP AS request: Off
02 solvation	Exchange completed Syringe ready HPD1, Pump 1: Aspirate Solvent: MeOH Dispense Solvent: OUT Volume: 1000 μ l Aspirate Flowrate: 10000 μ l/min Dispense Flowrate: 5000 μ l/min Diagram
03 equilibration	Syringe ready HPD1, Pump 1: Aspirate Solvent: 0.2% HAc Dispense Solvent: OUT Volume: 1000 μ l Aspirate Flowrate: 10000 μ l/min Dispense Flowrate: 5000 μ l/min Diagram
04 inject sample	Syringe ready HP AS request: On HPD1, Pump 1: Aspirate Solvent: 0.2% HAc Dispense Solvent: OUT Volume: 500 μ l Aspirate Flowrate: 10000 μ l/min Dispense Flowrate: 2500 μ l/min Diagram HP AS request: Off
05 washing	Syringe ready HPD1, Pump 1: Aspirate Solvent: 0.2% HAc Dispense Solvent: OUT Volume: 500 μ l Aspirate Flowrate: 10000 μ l/min Dispense Flowrate: 2500 μ l/min Diagram
06 elution	Input 1 ACE: High Syringe ready HP Pump start: On Position left clamp valve: [6-1]Left 6-1 Diagram HP AS request: Off Position left clamp valve: [1-2]Left 1-2

그림 4. 유기산 6종의 고상 추출 조건
(탄탈산, 마노산, 페닐글리옥실산, o-, m-, p-메틸마노산)

2) 액체크로마토그래피

액체크로마토그래피 이동상으로 10% 메탄올/0.02% 초산 수용액(pH 3.3) 수용액을 제조하여 0.45 μm 의 여과막으로 여과하고 탈기하여 다시 메탄올과 1:1, 7:3, 3:1 혹은 17:3으로 용리시켰으며 유속은 칼럼 미사용 시는 0.3 mL/min, 칼럼 사용 시는 0.2 mL/min로 하여 크로마토그래피를 수행하였다. 고상추출기에 시료를 주입하기 위하여 시료 주입용 프로그램을 그림 5와 같이 설정하여 시료를 주입하였다.

Program Table:

#	Command
1	VALVE mainpass
2	WAIT FOR Startrequest, timeout 10.00 min.
3	VALVE bypass
4	DRAW 1.0 μL from sample, 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ speed
5	WAIT FOR Startrequest, timeout 10.00 min.
6	VALVE mainpass
7	WAIT FOR Start, timeout 10.00 min.
8	INJECT

그림 5. 자동시료 주입 프로그램

3) 질량분석

이온 발생원으로 turbo ionspray를 사용하여 질량분석을 수행하였다. 양이온 분석 방식과 음이온 분석 방식으로 나누어 분자이온 피크를 선택하고 각각의 precursor ion과 product ion을 측정하여 특이적인 분석 조건을 검토하였다.

각 성분에 특이적인 반응을 보이는 이온의 질량을 선택한 후, 이들 이온이 공통으로 최적 반응을 보이는 질량 분석용 인자를 조사하였다(그림 6).

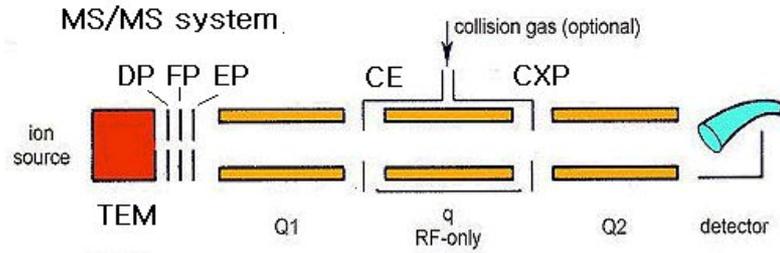


그림 6. 질량 분석을 위한 최적 조건 검토 인자

(DP : Declustering potential
 FP: Focusing potential
 EP : Entrance potential
 TEM : Turbospray temperature
 CE : Collision energy
 CXP : Collision cell exit potential)

4) 회수율

정상인 소변 100 μ L, 만델린산 0.35 g/L, 마노산 2.14 g/L, 페닐글리 옥실산 0.38 g/L, o-메틸마노산 0.34 g/L, m-메틸마노산 0.36 g/L, p-메틸마노산 0.31 g/L 농도로 구성된 유기산 혼합 표준용액 100 μ L, 0.02 % 초산 수용액 800 μ L를 가하여 회수율 시험용 검액으로 하고, 그 결과를 표준용액 대신 탈이온수를 넣은 대조 용액과 비교하여 회수율을 측정하였다. 분리용 칼럼을 사용한 경우와 사용하지 않은 경우에 대해 각각 회수율을 구하였다.

5) 검출 한계

표준용액을 1/10 씩 단계별로 희석하여 주입하고 크로마토그램을 관찰하고 피크를 관찰할 수 있는 최소 농도를 구하여 S/N 비 3에서 검출한계를 구하였다.

3제 장 결 과

각 유기산 성분 분석을 위한 조건 검토 결과, 양이온 분석 방식을 사용하여 product ion scan(그림 7)을 수행하여 얻은 마노산 180-105, 메틸마노산 194-119의 이온쌍을 이용한 MRM(Multiple reaction monitoring)에서 마노산과 메틸마노산에 대해서는 검출 한계가 fg에 해당하는 미량 검출이 가능하였으나(그림 8), 만델산, 페닐글리옥실산은 양이온 분석 방식을 사용했을 때 각 성분에 해당하는 분자 이온 피크가 선택적으로 검출되지 않아 이 방법으로는 대상 유기산들의 동시 분석이 어려웠다.

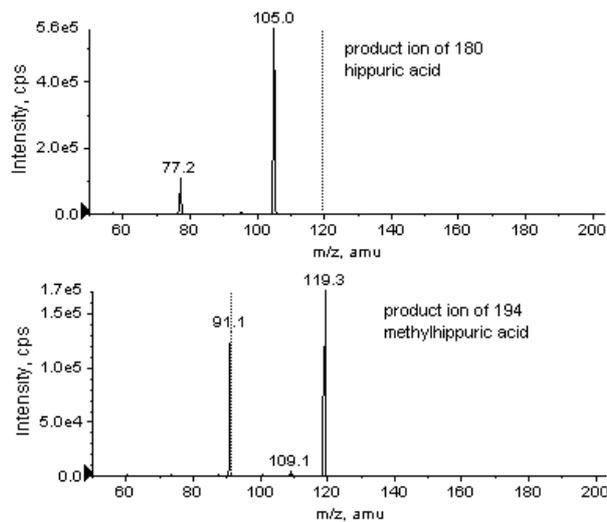


그림 7. 마노산과 메틸 마노산의 product ion monitoring

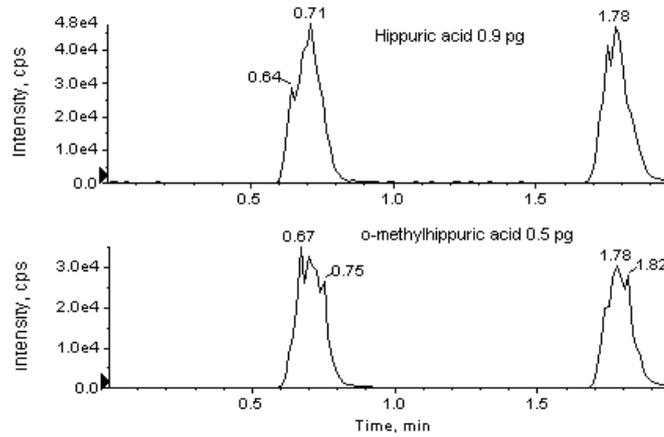


그림 8. 양이온 분석 방식을 이용한 마노산과 메틸마노산의 동시 분석 크로마토그램(마노산 m/z 180-105, 메틸마노산 m/z 194-119 쌍을 이용한 MRM(Multiple reaction monitoring))

선택적인 고감도의 동시 분석을 위해 음이온 분석 방식으로 분자이온 피크를 선택하였을 때 각 성분이 특이적으로 고감도로 검출되었으므로 이를 분석 조건으로 정하였다. 설정한 분자이온은 분자에서 수소 이온이 탈락한 [M-1]-에 해당하였고, 각각 만델린산 151.0, 마노산 178.0, 페닐글리옥실산 149.0, 메틸마노산 192.0이었다. 각 유기산의 음이온 질량분석 스펙트럼을 그림 9에 나타내었다. Multiple reaction monitoring을 통해 음이온에 대해 더욱 선택적인 분석을 시도하였으나, 마노산, 메틸 마노산에 비해 만델산, 페닐글리옥실산의 반응이 너무 작아 비교적 모든 유기산이 유사한 반응 범위에서 검출되는 Q1 multiple ion scan 방식을 분석 방법으로 채택하였다. 유기산 분석을 위해 그림 10과 같이 질량 분석기 허용 범위 내에서 인자별로 값을 변화시키며 검토한 최적 조건은 표 1과 같았다. 표 2에 Q1 multiple ion scan 방식의 조건을

나타내었다. 이 조건에 제시한 multiple ion scan 모드로 유기산들을 동시 분석하였다.

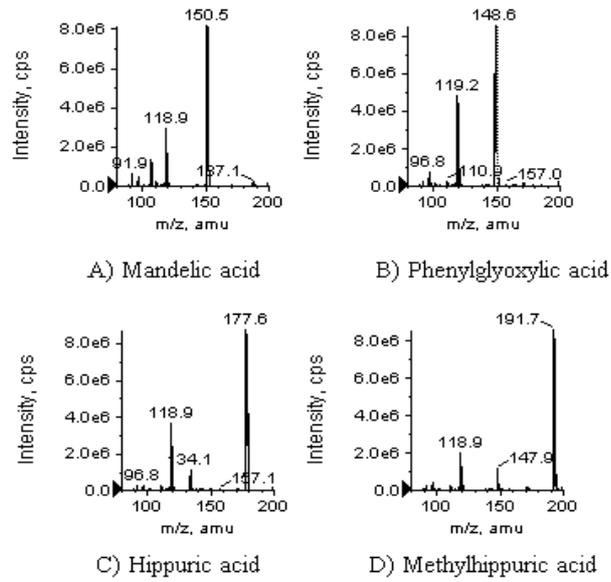


그림 9. 4 종의 유기용제 대사산물의 음이온 질량 스펙트럼

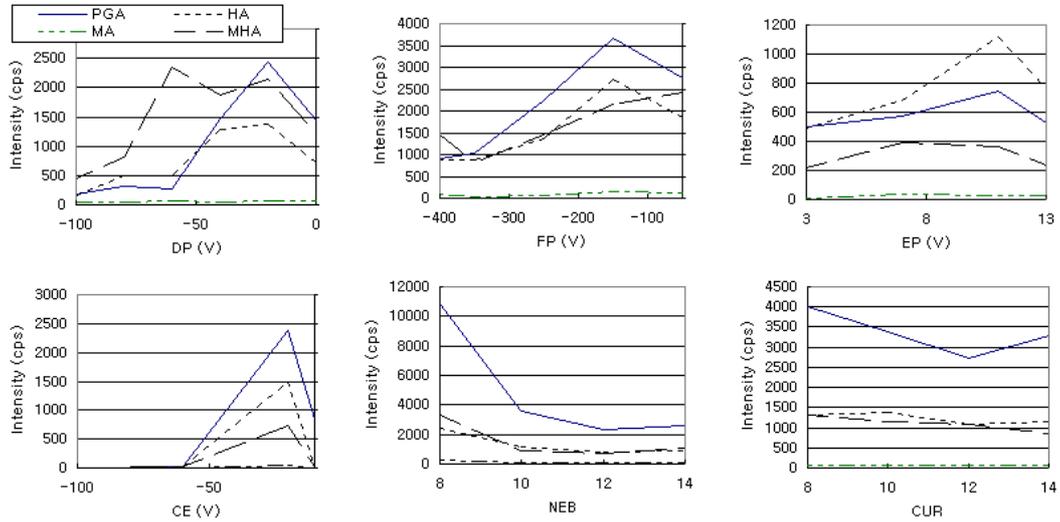


그림 10. 질량 분석기 최적 조건 설정을 위한 인자별 검토

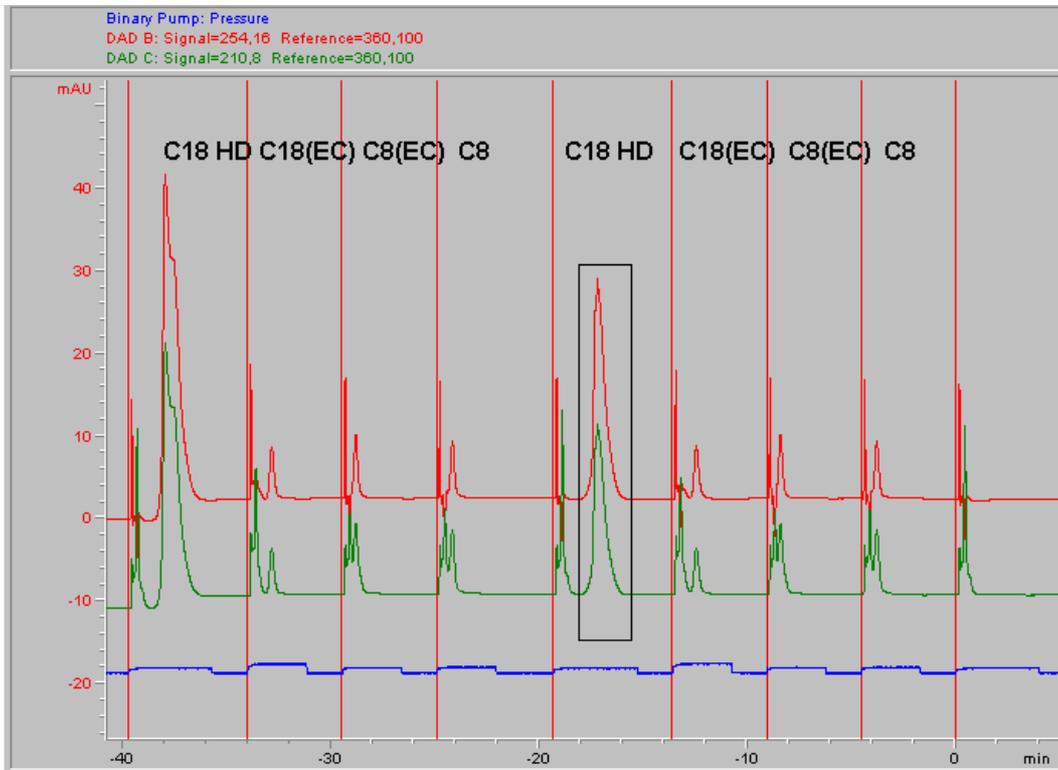
인자	최적값
DP(Declustering potential)	-20
FP(Focusing potential)	-150
EP(Entrance potential)	10
NEB(Nebulizer gas)	8
CUR(Curtain gas)	8
IS(Ionspray voltage)	-4200
TEM(Turbospray temperature)	500
DF(Deflector)	200
CEM(Chemical emission multiplier)	2000

표 1. 유기산 음이온 분석을 위한 MS/MS 조건

물질	분자이온	유지시간(msec)
만델린산	151	1600
페닐글리옥실산	149	400
마노산	178	100
메틸마노산	192	100

표 2. 유기산 음이온 분석을 위한 Q1 multiple ion scan 조건

고상추출을 이용하여 비극성 유기물 분석에 효과적인 C18 HD를 고상추출 고정상으로 사용했을 때 효과적인 소변 중 유기산의 정제가 가능하였으며(그림 11) 이동상으로 메탄올:10% 메탄올/0.02% 초산 수용액 1:1을 사용한 분석 조건에서 별도의 분석용 칼럼을 사용하지 않고도 마노산, 메틸마노산, 페닐글리옥실산의 고속 분석이 가능하였다(그림 12). 만델산은 이 조건에서 분리도가 낮아, 만델산과 다른 유기산을 동시에 분석하기 위해 이동상으로 30% 메탄올/0.02% 초산 수용액을 사용한 분석 조건에서 microbore 칼럼을 사용했을 때 만델산을 비롯한 다른 유기산들의 선택적인 분석이 가능하였다. 그림 13에 유기산 표준용액 및 시료의 크로마토그램을 나타내었다. 유기산 분석을 위한 검량선은 만델산 0.07 - 0.35 g/L, 마노산 0.43 - 2.14 g/L, 페닐글리옥실산 0.08 - 0.38 g/L, 메틸마노산 0.07 - 0.67 g/L 범위에서 작성하였으며(그림 14) 이때 검량선의 상관계수는 0.997 - 0.999로 양호한 직선성을 나타내었다.

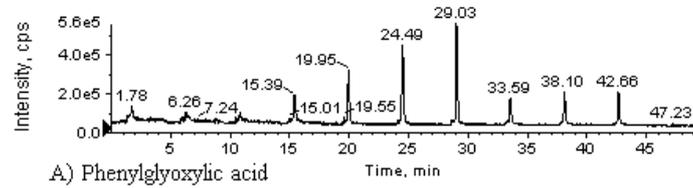


A) MeOH:10% MeOH in 0.02% HAc 50:50

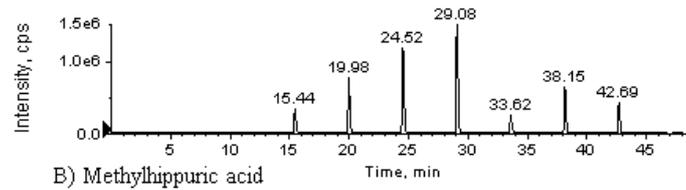
B) MeOH:10% MeOH in 0.02% HAc 15:85

그림 11. 고상 추출 후 마노산의 UV 스펙트럼
 (위 : UV 225 nm, 아래 UV 254 nm)

XIC of -Q1 SIM (4 ions): 149.0 amu from Sample 1 (run1)... Max. 5.6e5 cps.



XIC of -Q1 SIM (4 ions): 192.0 amu from Sample 1 (run1)... Max. 1.5e6 cps.



XIC of -Q1 SIM (4 ions): 178.0 amu from Sample 1 (run1)... Max. 3.0e6 cps.

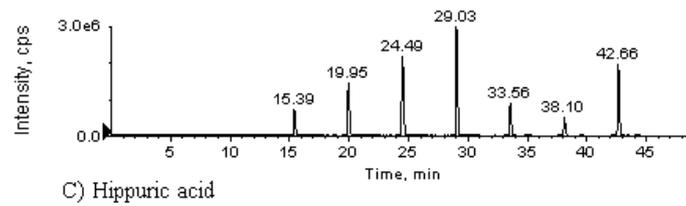
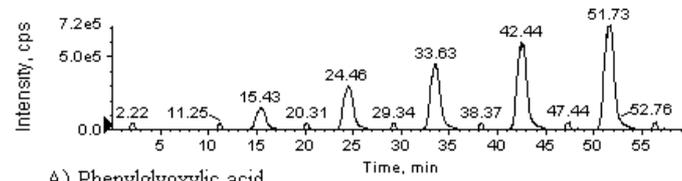


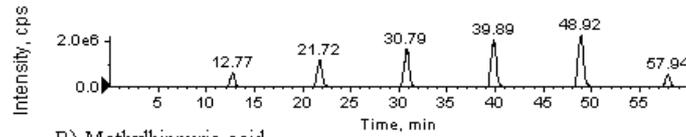
그림 12. 페닐글리옥살산, 메틸마노산, 마노산의 질량분석 크로마토그램 (공시료 3회, 표준용액 1-4, 독일 정도관리 시료 3종 주입)

XIC of -Q1 SIM (4 ions): 149.0 amu from Sample 8 (xterr... Max. 7.2e5 cps.



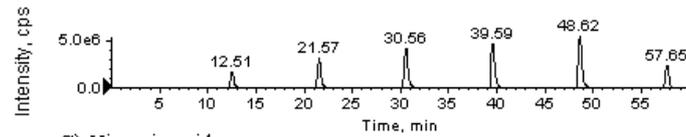
A) Phenylglyoxylic acid

XIC of -Q1 SIM (4 ions): 192.0 amu from Sample 8 (xterr... Max. 2.3e6 cps.



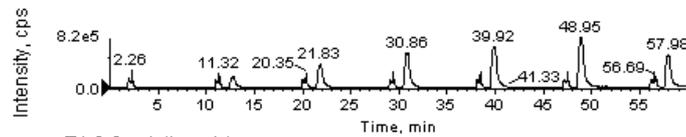
B) Methylhippuric acid

XIC of -Q1 SIM (4 ions): 178.0 amu from Sample 8 (xterr... Max. 5.6e6 cps.



C) Hippuric acid

XIC of -Q1 SIM (4 ions): 151.0 amu from Sample 8 (xterr... Max. 8.2e5 cps.



D) Mandelic acid

그림 13. 페닐글리옥실산, 메틸마노산, 마노산, 만델산의 질량분석 크로마토그램 (공시료 1회, 표준용액 1-5, 독일정도관리 시료 1종 주입)

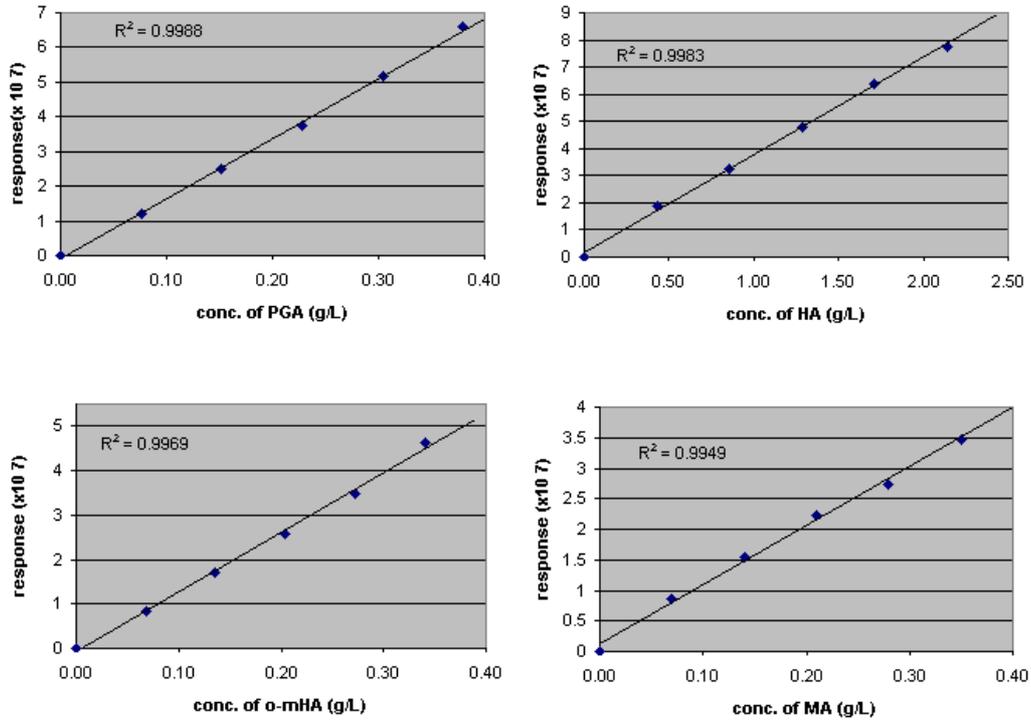


그림 14. LC/MS/MS를 이용한 유기용제 대사산물의 검량선

각 성분의 회수율 시험 결과는 94 - 110 % 범위로 양호한 회수율을 나타내었다(표 3).

Compound	Recovery (%)	
	Cartridge only	Cartridge and column
MA	101	102
HA	100	97
PGA	98	94
o-mHA	97	100
m-,p-mHA	110	110

표 3. 유기용제 대사산물의 회수율

표준용액 희석액을 단계별로 희석하여 주입하고 관찰한 LC/MS/MS 방법에 의한 유기용제 대사산물의 검출한계는 S/N비를 3으로 하였을 때 만델산 4.3 mg/L, 마노산 0.03mg/L, 페닐글리옥실산 0.2 mg/L, 메틸마노산 0.3 mg/L이었다(그림 15). 시료 주입 전 1/100로 희석하고, 주입량이 1 μ L였으므로 각 유기산의 검출 한계는 만델산 43 pg, 마노산 0.3 pg, 페닐글리옥실산 2.4 pg, 메틸마노산 2.5 pg이었다. 본 분석 방법을 사용하여 국내 정도관리 시료를 분석하고 이를 기존의 분석 방법에 의한 분석 결과와 비교하였다(표 4). 분석 결과의 정확도를 조사하기 위해 독일정도관리 시료를 분석한 결과, 각각 만델산 94 %, 마노산 108 %, 페닐글리옥실산 98%, 메틸마노산 104 %의 정확도를 나타내었다. 동일 농도의 시료를 3개씩 분석하여 변이 계수를 구하여 정밀도를 구한 결과는 페닐글리옥실산이 0.2 - 2.3 %, 메틸마노산 2.5 - 3.8 %로 HPLC법의 변이 계수 4.0 %이하였으나, 마노산은 시료 농도 별로 4.6 - 6.8 %, 만델산 3.7 - 8.4 %로 HPLC법의 변이 계수를 초과하는 결과를 보였다.

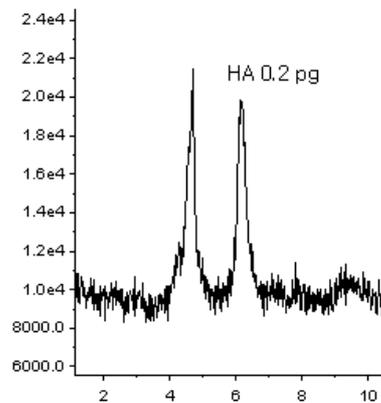


그림 15. 음이온 분석 방식을 사용한 마노산의 검출한계 조사용 크로마토그램

Compound	Level	conc.(g/L)	CV(%)	Ratio(GC)
HA	1	0.647 ±0.030	4.6	1.12
	2	0.799 ±0.042	5.3	1.12
	3	1.253 ±0.081	6.5	1.19
	4	1.414 ±0.096	6.8	1.03
	5	1.610 ±0.078	4.8	1.04
	6	2.084 ±0.125	6.0	1.03
MHA	1	0.578 ±0.015	2.6	1.18
	2	0.829 ±0.031	3.8	1.24
	3	1.007 ±0.033	3.3	1.13
	4	1.242 ±0.031	2.5	1.14
	5	1.431 ±0.038	2.7	1.19
	6	1.674 ±0.043	2.5	1.13
PGA	1	0.187 ±0.003	1.8	1.07
	2	0.296 ±0.005	1.5	1.19
	3	0.431 ±0.004	0.9	1.17
	4	0.510 ±0.012	2.3	1.27
	5	0.589 ±0.007	1.2	1.18
	6	0.692 ±0.001	0.2	1.23
MA	1	0.177 ±0.015	8.4	1.08
	2	0.281 ±0.011	4.0	1.04
	3	0.420 ±0.022	5.2	1.13
	4	0.542 ±0.043	7.9	.98
	5	0.709 ±0.030	4.3	1.09
	6	0.870 ±0.032	3.7	1.06

표 4. LC/MS/MS 법에 의한 소변 중 유기용제 대사산물 분석 결과

4제 장 고 찰

질량 분석 방법은 성분 분석을 분자 수준에서 수행하는 가장 고감도의 분석 방법이다. 이 방법을 사용하면 각 성분의 분자량에 대한 정보를 알아내어 미지 성분이 어떤 물질인지 규명할 수 있으며, 역으로 분자량을 알고 있는 성분에 대해 그 질량을 선택하여 분석함으로써 원하는 물질에 대한 선택적인 분석도 가능하다.

유기 용제 중, 톨루엔, 스티렌, 자일렌의 생물학적 모니터링 지표물질인 마노산, 만델린산, 페닐글리옥실산, 메틸 마노산 등은 분석 방법이 잘 정립되어 있고, 정도관리 체계도 잘 갖추어져 있다. 톨루엔의 생물학적 지표 물질인 마노산만을 분석 대상으로 하는 경우 UV법을 이용해 많은 시료를 단시간에 분석할 수 있으나, 이 방법은 마노산에 대한 선택성이 없어 메틸마노산이 시료에 포함되어 있는 경우 함께 분석값으로 산출되므로 복합 유기용제의 생물학적 모니터링으로는 적합하지 않으나 실제 검진 기관에서는 마노산 분석 방법으로 아직도 UV법을 사용하고 있는 실정이다. 이를 해결한 방법인 HPLC법을 이용한 분석의 경우는, 분석 결과 크로마토그램에서 소변 중 미지 성분이 만델산과 유사한 시간대에 용리되어 만델산과 중첩되는 피크를 나타내어 분리 분석이 어렵고, 만델산 분석 값에 이 물질의 양이 포함되어 과대평가되는 경우가 생긴다. 한편, 검진 기관에서 대부분 보유하고 있는 가스 크로마토그래피를 이용하여 복합 유기용제 대사산물을 분석하는 방법이 개발되어 있고, 이 방법을 사용하여 다른 물질들과 중첩되지 않고 좋은 감도로 유기용제 대사산물을 분석하는 것이 가능하다. 그러나 이 방법은 유기용제 대사산물인 유기산을 소변으로부터 추출하고, 추출된 유기산에 휘발성을 부여하기 위해 유도체화 반응을 거친 후, 다시 분석을 위해 추출 과정을 거쳐야 분석이 가능하여 우수한 분석 결과를 얻을 수는 있으나 시간과 노력이 많이 소요되는 단점이 있다.

LC/MS/MS에 의한 분석 방법은 각 성분 고유의 분자량을 선택하여

분석하므로 분자량이 다른 성분에 대해 매우 선택적인 분석 방법이 된다. 그림 10, 11에서 기존의 분석 방법으로는 이 용매 조건에서 분리가 되지 않았을 성분들이 각 분자량에 해당하는 크로마토그램에서 다른 성분들에 전혀 영향을 받지 않고 검출됨을 알 수 있다. 전처리 방법은 기존의 HPLC법과 마찬가지로 시료를 희석하는 과정만을 필요로 하며, 칼럼을 사용하지 않았을 경우 시료 1건 분석에 소요되는 시간은 약 2분 가량으로, 다수의 시료에 대한 신속한 분석이 또한 가능하였다.

본 분석 방법을 사용하여 국내 정도관리 시료 및 독일 정도관리 시료를 분석하고 이를 기존의 분석 방법에 의한 분석 결과와 비교한 결과, 액체크로마토그래피/이중질량분석 방법에 의한 독일정도관리 시료 분석 결과는 기준값의 94 - 108 %에 해당하여 분석 결과의 정확성이 매우 우수하였으며, 가스 크로마토그래피에 의한 결과보다 더 정확하였다.

결론적으로, 선택적 미량 분석이 가능한 액체 크로마토그래피/이중질량분석 방법을 고상추출과 결합시킨 분석 시스템을 이용한 결과, 기존 방법에 비해 신속하고 정확한 유기용제 대사산물의 생물학적 모니터링이 가능하였다.

본 연구에 의하여 확립한 분석 방법 개발 기법을 앞으로 다른 미량의 대사산물 분석에 적용하여 각 물질의 분석 조건을 개발하여 신속하고 정확한 분석을 수행함으로써 유기 용제의 효율적인 생물학적 모니터링에 응용할 수 있을 것이다.

참고문헌

5

Boismenu, D., Robitaille, L., Hamadeh, M.J., Hongsprabhas, P., Hoffer, L.J., & Mamer, O.A. (1998). Measurement of Sulfate Concentrations and Tracer/Tracee Ratios in Biological Fluids by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Analytical biochemistry*, 261, 93-99

Cioffi, N., Losito, I., Terzano, R., & Zambonin, C.G. (2000). An electrospray ionization ion trap mass spectrometric (ESI-MS-MSⁿ) study of dehydroascorbic acid hydrolysis at neutral pH. *Analyst*, 125, 2244-2248

De Baere, S., Cherlet, M., Baert, K., & De Backer, P. (2002). Quantitative Analysis of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Animal Tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 74(6), 1393-1401

Geromanos, S., Freckleton, G., Tempst, P. (2000). Tuning of an Electrospray Ionization Source for Maximum Peptide-Ion Transmission into a Mass Spectrometer. *Analytical chemistry*, 72, (4), 777-790

Gibson, C. R., Staubus, A.E., Barth, R.F., Yang, W., Kleinholz, N.M., Jones, R.B., Green-Church, K.B., Tjarks, W., & Soloway, A. H. (2002). Electrospray Ionization Mass Spectrometry Coupled To Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography for Quantitation of Sodium Borocaptate and Application To Pharmacokinetic Analysis. *Analytical chemistry*, 74(10), 2394-2399

Ishihama, Y., Katayama, H., & Asakawa, N. (2000). Surfactants Usable for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical biochemistry*, 287, 45-54

J. C. Miller and J. N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*(1988). 115-117,

Jacob, P., III, Wilson, M., Yu, L., Mendelson, J., & Jones, R.T. (2002). Determination of 4-Hydroxy-3-methoxyphenylethylene Glycol 4-Sulfate in Human Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 74(20), 5290-5296

Kuklennyik, Z., Ashley, D.L., & Calafat, A. M. (2002). Quantitative Detection of Trichloroacetic Acid in Human Urine Using Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 74(9), 2058-2063

Le Bouil, A., Cailleux, A., Turcant, A., & Allain, P. (1999). Determination of Monomethylarsonic Acid and Dimethylarsinic Acid in Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of analytical toxicology*, 23(4), 257-261

Manini, P., Andreoli, R., Bergamaschi, E., De Palma, G., Mutti, A., & Niessen, W.M.A. (2000). A new method for the analysis of styrene mercapturic acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid communication in mass spectrometry*, 14(21), 2055-2060

Melikian, A.A., Meng, M., O'Connor, R., Hu, P., & Thompson, S.M. (1999). Development of liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry methods for determination of urinary metabolites of benzene in humans. Research Report/ Health Effects Institute (Cambridge, MA), 87, 1–36

Moriwaki, H., Tsujimoto, Y., Noda, T., Shimizu, M., & Tanaka, M. (2000). Determination of mercapturic acids in urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 125, 715–718

Qu, Q., Melikian, A.A., Li, G., Shore, R., Chen, L., Cohen, B., Yin, S., Kagan M.R., Li, H., Meng, M., Jin, X., Winnik, W., Li, Y., Mu, R., & Li, K. (2000). Validation of Biomarkers in Humans Exposed to Benzene: Urine Metabolites. *American journal of industrial medicine*, 37(5), 522–531

Stanek, W., Krenmayr, P., Scherer, G., & Schmid, E.R. (1993). Quantitative determination of N-acetyl(-L)cysteine derivatives in human urine by tandem mass spectrometry. *Biological mass spectrometry*, 22, (2), 133–142

Takino, M., Daishima, S., & Yamaguchi, K. (2000). Determination of haloacetic acids in water by liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry using volatile ion–pairing reagents. *Analyst*, 125, 1097–1102

Tracqui, A., Raul, J.S., Geraut, A., Berthelon, L., & Ludes, B. (2002). Determination of Blood Cyanide by HPLC-MS. *Journal of analytical toxicology*, 26(3), 144-148

W. M. A. Niessen(1999). *Liquid chromatography-mass spectrometry*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc.

Xia, Y., Wang, P.P., Bartlett, M., Solomon, H.M., & Busch, K.L. (2000). An LC-MS-MS Method for the Comprehensive Analysis of Cocaine and Cocaine Metabolites in Meconium. *Analytical chemistry*, 72, (4), 764-771

Zhang, N., Fountain, S.T., Bi, H., & Rossi, D.T. (2000). Quantification and Rapid Metabolite Identification in Drug Discovery Using API Time-of-Flight LC/MS. *Analytical chemistry*, 72(4), 800-806

유해물질 노출근로자의 조기 이상 발견을 위한 새로운 생체 시료 분석
방법 개발 - 액체크로마토그래피/질량분석/질량분석시스템을 이용한 생
물학적지표물질의 분석 -

(연구원 2002-74-498)

발 행 일 : 2002년 12월 31일
발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 정호근
연구책임자 : 직업병연구센터 선임연구원 이미영
발 행 처 : 한국산업안전공단 산업안전보건연구원
주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4
전 화 : (032) 5100 - 925
F A X : (032) 5180 - 862
