LC/MS/MS를 이용한 어린이 소변 중 프탈레이트 대사산물 분석

고영림 · 정지연* · 최경호** · 김판기*†

을지대학교 보건환경과학부, *용인대학교 산업환경보건학과, **서울대학교 보건대학원
(2008. 6. 13. 접수/2008. 7. 8. 수정/2008. 7. 28. 채택)

Determination of Phthalate Metabolites in Korean Children's Urine by High Performance Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry

Young Lim Kho · Jee Yeon Jeong* · Kyung Ho Choi** · Pan Gyi Kim*†

School of Human & Environment, Eulji University, Sunnam City, Kyeonggi-do, Korea

**Department of Occupational & Environmental Health, Yonin University, Kyeonggi-do, Korea*

***School of Public Health, Seoul National University, Jongro-gu, Seoul, Korea*

(Received June 13, 2008/Revised July 8, 2008/Accepted July 28, 2008)

ABSTRACTS

Dialkylated phthalates have been commonly used as plasticizers and a variety of applications. Phthalate diesters have been shown to be developmental and reproductive toxicants. It is very difficult to exactly estimate the dose of dialkylated phthalates taken up by the general population because of environmental contamination. Urinary metabolites of phthalates enabled to estimate internal exposure. The objective of this study was quantitative determination of phthalate metabolites by LC/MS/MS with on-line cleanup method to analyze phthalate metabolites in Korean children's urine. We employed LC/MS/MS with on-line enrichment and column-switching techniques for this biological monitoring. Metabolites determined were 4 primary metabolites; MEHP, MnBP, MiBP, MEP and 2 secondary metabolites of DEHP; 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP. We analyzed children's urine from 30 boys and 30 girls. The method detection limit of phthalate metabolites were 0.03 ng/mL for MEP, 1.05 ng/mL for MBP, 0.22 ng/mL for MEHP, 0.15 ng/mL for 5-OH-MEHP and 0.16 ng/mL for 5-oxo-MEHP, respectively. Switching Column LC/MS/MS was proven to be a useful tool to determine metabolites of phthalate diesters in human urine. The correlation among phthalate metabolites was very high and statistically significant, except MEP. The children's age (months) was negatively correlated to the concentration of phthalate metabolites. The geometric mean concentration of phthalate metabolites (mg/g creatinine) in children's urine were 25.5 for MEP, 130.3 for MnBP, 56.8 for MiBP, 19.5 for MEHP, 85.6 for 5-OH-MEHP and 83.1 for 5-oxo-MEHP, respectively. Levels of estimated daily intake of parent phthalate compounds ($\mu\text{g/kg bw/day}$) were 0.8 for DEP, 5.0 for DnBP, 1.9 for DiBP and 8.9~14.2 for DEHP, respectively. Estimated daily intake for DEP and DiBP were lower than those of other studies but the value for DEHP was higher than that of other study.

Keywords: phthalate metabolites, children's urine, LC/MS/MS, on-line cleanup, estimated daily intake

I. 서 론

플라스틱이 없는 오늘날의 생활은 상상도 할 수 없을 것이다.¹⁾ 프탈레이트는 플라스틱 가소제로 40년 이상이나 사용되어 왔다. 사용량이 많은 프탈레이트인 DEHP (di-(2-ethylhexyl) phthalate), DBP(dibutyl phthalate),

DEP(diethyl phthalate) 등은 의약품, 광택제, 향수, 헤어스프레이, 화장품, 건설자재, 목재 마감재, 접착제, 바닥재, 페인트, 혈액용기와 같은 의료기구 등의 다양한 사용처를 가지고 있다.²⁾ 사용량이 가장 많은 DEHP의 경우 전세계적으로 약 2백만톤이 매년 생산되고 있으며,³⁾ 업계에 따르면 2004년도의 국내 생산량은 45만톤이었다.

프탈레이트는 플라스틱 물질과 공유결합을 하지 않아 결합력이 약해 쉽게 떨어져 나오므로,⁴⁾ 생산이나 이동 과정, 사용할 때 쉽게 인간에게 노출이 가능하다. 음식

†Corresponding author: Department of Occupational & Environmental Health, Yonin University
Tel: 82-31-8020-2752, Fax: 82-31-8020-2886
Email: pgkim@yongin.ac.kr

이나 물, 고기 및 프탈레이트를 함유하는 상품들을 통해서도 인간에게 노출될 수 있다.⁵⁾ PVC 산업에 종사하는 노동자, 혈액투석이나 수혈 및 이식수술을 받는 환자의 경우에는 고농도로 노출이 일어날 수 있다.⁶⁾

프탈레이트의 급성독성은 낮은 편이지만 동물실험에서 발암성인 것으로 밝혀졌으며,⁷⁾ 내분비교란물질로 작용하여 태아 사망, 기형, 고환과 간 상해, 과산화물질의 증대를 일으킬 수 있다.⁸⁾ 일부는 모노에스테르 형태의 대사산물이 생식독성과 발달독성을 야기할 수 있는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 실험동물에서의 생식 이상은 태어날 때의 체중 감소와 생존률 감소, 생식기 기형, 정류고환, 저류유두, 수컷의 성기 길이의 감소 등이 포함된다.¹⁰⁾

혈중에서의 디에스테르 형태의 프탈레이트 모분자 분석은 도처에서 오염될 가능성이 있기 때문에,²⁾ 공시료에서 항상 검출되며, 공시료에서 검출되는 양의 변동은 혈중 프탈레이트 농도의 정량적 평가를 힘들게 하고 있다. 프탈레이트는 생체 내에서 빠르게 변환되어 모노에스테르 형태로 바뀐다.⁸⁾ 따라서 프탈레이트의 인체노출을 평가하기 위해서는 모노에스테르 형태의 대사산물 분석이 주로 이용된다.¹¹⁾ DEHP는 생체내에서 다양한 대사산물로 전환되며,¹²⁾ 소변에서 주로 검출하는 것은 1차 대사산물인 MEHP(mono(2-ethylhexyl) phthalate)와 2차 대사산물인 5-OH-MEHP (mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate), 5-oxo-MEHP (mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate)등이 주로 이용된다. MEHP의 경우에는 비생물학적 과정에서 생성이 가능하기 때문에 소변을 통한 정확한 노출평가를 힘들게 하는 반면,⁷⁾ 5-OH-MEHP와 5-oxo-MEHP는 생체 내에서만 생성되므로 노출을 민감하게 반영하는 지표로 알려졌다(그림 1).²⁾ 이들 대사산물의 반감기는 수시간 내외이다.

소변시료를 이용한 프탈레이트 대사산물 분석에서 가장 많이 쓰이는 방법은 LC/MS/MS(liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectro-

metry)를 이용하는 것이다.^{8,13)} 수산화기(-OH)가 존재하기 때문에 ESI(electron spray ionization) negative 모드에서 주로 분석하며, 일반적인 전처리 기법은 고체상 추출(SPE)을 활용하는 것이다. 최근에는 전처리에 소요되는 시간과 노력을 줄이기 위한 방법으로 자동화된 SPE나,⁹⁾ 스윗칭컬럼을 활용하는 방법이 많이 쓰이고 있다.⁶⁾

어린이들의 경우에는 프탈레이트에 노출될 수 있는 경로가 어른들보다 많으며, 실제 소변을 통한 DEHP의 대사산물의 내적 노출량 평가에서 2차 대사산물의 농도가 어른들보다 어린이의 소변에서 상당히 높은 것이 발견되었다.¹⁴⁾ 또한 미국 환경보호청의 권고용량(RfD)과 유럽 식품안전국의 1일 섭취허용량(TDI)을 초과하는 어린이도 발견되었다.¹⁵⁾

지금과 같이 플라스틱 제품의 사용이 필수적이고 도처에서 프탈레이트에 노출될 수 있는 상황에서 노출원이나 경로를 더 많이 가지는 어린이의 프탈레이트 노출실태에 관한 면밀한 조사가 필요하다. 본 연구는 스윗칭컬럼을 이용하여 전처리를 간편하게 한 분석방법을 적용하여 초등학생을 대상으로 소변 중 6종의 프탈레이트 대사산물의 농도를 분석하고 내적 노출량을 조사하였다.

II. 연구방법

1. 대상자의 선정 및 시료의 수집

시료채취 및 설문조사 대상자는 경기도 용인시에 거주하고 있는 남녀 초등학생 각 30명씩이었다. 소변시료는 프탈레이트의 오염이 일어날 수 있는 플라스틱 제품을 배제하기 위하여 뚜껑이 있는 10ml 유리관을 이용하였다. 연령, 가족관계와 같은 일반적인 특성 및 프탈레이트에 노출될 수 있는 생활환경과 식품 등에 관한 정보를 얻고자 설문조사도 병행하여 실시하였다.

Fig. 1. Formation of primary and secondary metabolites of DEP, DnBP and DEHP.

2. 소변 중 프탈레이트 대사산물 분석

(1) 물질 및 재료

분석대상물질로 선정된 것은 사용량이 가장 많은 DEHP와 DBP, DEP의 대사산물, 즉 MEP(mono ethyl phthalate), MiBP (mono(iso-butyl)phthalate), MnBP (mono(n-butyl)phthalate), MEHP 등 4종의 프탈레이트 1차 대사산물과 DEHP의 2차 대사산물인 5-oxo-MEHP와 5-OH-MEHP이었다.

정확도 검증과 추출효율 보정을 위해 ^{13}C 로 라벨링된 내부표준물질 5종($^{13}\text{C}_4$ -MEP, $^{13}\text{C}_4$ -MBP, $^{13}\text{C}_4$ -MEHP, $^{13}\text{C}_4$ -5-oxo-MEHP, $^{13}\text{C}_4$ -5-OH-MEHP)을 CIL(Cambridge Isotope Laboratory, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC에 사용된 용매인 물과 아세트니트릴은 B&J (Burdick & Jackson, NJ, USA)에서, 완충용액 제조를 위한 시약인 암모늄아세테이트와 포름산은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

(2) 소변시료의 전처리

채취한 소변은 냉장보관 하여 운반하였고 실험실로 운반된 시료는 전처리할 때까지 냉동보관(-20°C) 하였다. 전처리를 위해 냉동보관 된 시료를 실온에서 해동하고 완전히 혼합시킨 후, 1.5 ml glass vial에 시료 0.5 ml, 1 µg/ml 농도의 내부표준물질 10 µl 및 β-glucuronidase(E. coli 12, Bachem) 10 µl와 1 M 암모늄아세테이트 용액 100 µl를 첨가하여 37°C로 맞춰진 항온배양기에서 2시간 동안 반응시켜 프탈레이트 대사산물의 결합체를 가수분해하였다. 가수분해된 시료 중의 프탈레이트 대사체가 쉽게 분리될 수 있도록 10 분간 초음파로 처리한 후, 시료 : 아세트니트릴=1 : 2의 비율로 담아 잘 혼합한 후 단백질과의 분리를 위해 원심분리(5000 g, 10 min)하였다. 원심분리된 시료의 상등액을 아세트니트릴로 세척한 주사기와 실린지필터

(nylon, 0.2 µm, Whatman)를 이용하여 여과한 후 분석용 시료로 사용하였다.

(3) LC/MS/MS를 이용한 분석

프탈레이트 대사체 분석을 위하여 기포제거기, 시료 주입기를 초음파로 세척할 수 있는 자동시료주입기와 2쌍의 binary 펌프, 가열기 및 스위칭 밸브가 장착된 HPLC(Nanospace SI-2, Shiseido)를 이용하였다. 스위칭 컬럼은 동시전처리(on-line cleanup) 목적의 크기배제(size exclusion) 방식의 전처리컬럼(MF C₈, 4.6×50 mm, 5 µm, Shiseido)과 농축을 위한 컬럼(Cadenza C₁₈, 2.0×30 mm, 5 µm, Imtakt), 그리고 피크의 분리를 위한 분석컬럼(Cadenza C₁₈, 2.0×75 mm, 3 µm, Imtakt)을 스위칭 밸브를 이용하여 교차하여 통과할 수 있도록 하여 진행하였다(그림 2).

분석 대상물질인 프탈레이트 대사체의 경우 극성의 차이가 커서 스위칭 시간을 구분하여 진행하였다. 가장 먼저 용출되는 MEP를 따로 분리하고, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP, MiBP, MnBP는 다음으로 스위칭하였으며, 마지막으로 배출되는 MEHP를 분리하여 스위칭하는 방법을 선택하였다(표 1).

Table 1. Switching valve program

Time (min)	Valve position	Status	
		Pretreatment column	Analysis column
Initial	Position A	Waste	Mass Injection
4.2	Position B	Concentration	Waste
5.1	Position A	Waste	Mass Injection
8.1	Position B	Concentration	Waste
10.0	Position A	Waste	Mass Injection
14.8	Position B	Concentration	Waste
15.3	Position A	Waste	Mass Injection

Fig. 2. Schemes of switching column procedure; 1) A mode - online clean-up, 2) B mode - concentration to trap-column, 3) A mode - separation by analytical column and injection to MS/MS detector.

프탈레이트 대사체의 컬럼을 이용한 분리는 질량분석기를 이용하였기 때문에 분석감도를 최적화하는 것에 주안점을 두었다. 하지만, MiBP와 MnBP의 경우 분자량이 같고 구조가 비슷하기 때문에 질량분석기에서의 겹침현상이 나타나 최대한으로 분리할 수 있도록 크기배제 방식의 전처리컬럼과 실리카 바탕의 분석컬럼을 적절히 활용하였다.

프탈레이트 대사체의 분리를 위한 이동상 용매는 섞임성의 문제를 최소화하기 위하여 전처리컬럼과 분석컬럼으로 주입되는 각각의 A 및 B 펌프에서 같은 용액을 사용하였다. 이동상 A의 경우 0.1% 포름산 용액을 이용하였으며, 이동상 B는 0.1% 포름산이 첨가된 아세토니트릴을 이용하였다. 각각의 용매는 0.2 µm 여과지를 이용하여 여과하고 초음파 처리하여 사용하였으며, 시료 주입량은 10 µl로 하였다.

프탈레이트 대사체 및 ¹³C로 라벨링된 내부표준물질의 질량분석기 조건을 확립하기 위하여 주입기(10 µl/min, Harvard Apparatus)로 최적화 과정을 수행하였다. 확립된 질량분석 조건은 표 2와 같다. 질량분석기의 parameter는 분석의 감도를 최상으로 유지하기 위하여 curtain gas 15 Mpsi, GS1 40 Mpsi, GS2 60 Mpsi, detector temperature 400°C를 이용하였으며 모든 분석 대상물질의 EP는 -10.0 V로 유지하였다. Ion source는 electrospray ionization(ESI) negative 방식을 이용하였으며 Ion source energy는 -4500 V를 유지하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분석방법의 타당성 평가

(1) 검출한계

표 3은 소변에서 평가한 프탈레이트 대사체의 검출한계 결과이다. MBP 1.05 ng/ml, MEP 0.03 ng/ml,

Table 3. Method detection limits for phthalate metabolites in urine

Phthalate metabolites	LOD ^{a)} (ng/ml)	LOQ ^{b)} (ng/ml)	Linearity (r)
MBP	1.05	3.15	0.9943
MEP	0.03	0.10	0.9996
MEHP	0.22	0.67	0.9994
5-OH-MEHP	0.15	0.46	0.9998
5-oxo-MEHP	0.16	0.49	0.9964

a) limit of detection, b) limit of quantification.

MEHP 0.22 ng/ml, 5-OH-MEHP 0.15 ng/ml, 그리고 5-oxo-MEHP 0.16 ng/ml로 평가되었다. MBP의 검출한계가 1.05 ng/ml가 약간 높기는 하지만 전반적으로 혈액에서 프탈레이트 대사체 검출한계와 비슷한 값을 나타냈으며, 농도증가와 기기반응 간의 상관성에 있어서도 매우 우수한 결과를 나타냈다.

본 연구에서 사용한 스위칭 칼럼 LC/MS/MS 분석방법의 프탈레이트 대사체에 대한 검출한계는 Kato 등¹⁶⁾이 소변에서의 프탈레이트에 대한 대사체를 LC/MS로 분석하면서 평가한 검출한계 결과(5-oxo-MEHP; 1.2 ng/ml, 5-OH-MEHP; 1.6 ng/ml, MEHP; 1.3 ng/ml)보다 우수한 검출한계를 보였다. Kee 등¹⁷⁾이 본 연구와 매트릭스 및 대상물질이 동일한 소변에서의 프탈레이트 대사체인 MEHP의 검출한계 12 ng/ml는 본 연구에서의 검출한계 0.22 ng/ml 보다 5배 정도 높은 수준이다. 그러나 이러한 검출한계를 직접 비교하기 위해서는 각 연구자들이 검출한계를 어떤 방식으로 산출했는지 고려되어야 한다. Takatori 등¹⁸⁾과 Kee 등¹⁷⁾가 적용한 검출한계 산출방식은 Taylor¹⁹⁾가 제안한 방법으로 보이는데, 이는 가능한 낮은 농도로 만들어진 표준용액의 반복분석으로 얻어진 표준편차 값으로 검출한계를

Table 2. Mass spectrometer condition for determining phthalate metabolites

Compound	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	DP ^{a)} (V)	CE ^{b)} (V)	CXP ^{c)} (V)
MEP	192.98	121.2	- 40	- 16	- 7
¹³ C ₄ -MEP	197.04	123.2	- 40	- 16	- 9
MnBP	221.03	149.3	- 45	- 18	- 1
¹³ C ₄ -MnBP	225.07	150.9	- 45	- 16	- 9
MiBP	221.11	133.9	- 55	- 18	- 7
MEHP	277.17	134.1	- 55	- 22	- 11
¹³ C ₄ -MEHP	281.23	136.8	- 85	- 24	- 11
5-OH-MEHP	293.17	121.1	- 60	- 28	- 11
¹³ C ₄ -5-OH-MEHP	297.17	145.1	- 75	- 20	- 1
5-oxo-MEHP	291.21	120.9	- 55	- 24	- 5
¹³ C ₄ -5oxo-MEHP	295.1	124.0	- 55	- 24	- 9

a) declustering potential, b) collision energy, c) collision cell exit potential.

구한 것으로 보이며, 본 연구에 적용한 검출한계를 구하는 방식에 비해 검출한계가 낮게 평가되는 방법이다. 따라서 이러한 점을 고려한다면 Takatori의 검출한계와 본 연구에서 산출한 검출한계 값 간에는 별 차이가 없는 것으로 보이며, 이병무가 연구한 소변에서의 MEHP가 본 연구보다 높게 평가된 이유는 두 연구에서 적용한 분석 장비의 기본적인 차이, 즉, 본 연구에서는 LC/MS/MS를 적용하였기 때문에 HPLC-UV 방법에 비해 상대적으로 매우 낮은 검출한계를 보인 것으로 판단된다.

(2) 분석방법의 정확도 및 정밀도

정확도는 회수율(recovery)로 평가하였으며, 정밀도는 동일한 농도의 시료를 6회 반복측정함으로써 반복측정의 일정성을 확인하였다. 3 농도수준(저농도, 중농도, 고농도)에서 정확도와 정밀도를 평가하였으며, 구체적인 방법은 미국 산업안전보건연구원(NIOSH)²⁰과 산업안전보건청(US OSHA)²¹에서 권고하고 있는 방법을 사용하였다.

소변에서 평가한 MBP의 회수율 평가결과 3농도수준에서 평균 회수율은 100.0%, 그리고 통합변이계수 값은 4.3%였으며 모든 농도수준에서 변이계수 값이 4.1~4.5%를 나타내었다. MEP는 평균 회수율이 99.1%, 그리고 통합변이계수 값은 9.0%였으나 저농도 수준에서 변이계수 값이 13.9%인 반면 중농도와 고 농도에서는 각각 5.1%, 4.7%로 회수율간의 차이가 다소 크게 나타났다. MEHP는 회수율 평균은 97.6%, 통합변이계수는 4.2%였으며, 5-OH-MEHP의 평균 회수율은 102.1%, 통합변이계수는 4.4%였고, 5-oxo-MEHP는 회수율 평균은 99.5%, 통합변이계수 값은 5.9%였다. 정밀도 평가에서의 통합변이계수는 MEP, MBP, MEHP, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP가 각각 6.5%, 3.6%, 2.8%, 5.1%, 4.6%로 나타나 반복측정의 일정성이 안정적으로 나타남을 보여주었다.

Fig. 3. Concentrations of phthalate metabolites in urine; 1 : MEP, 2 : MEHP, 3 : 5-OH-MEHP, 4 : 5-oxo-MEHP, 5 : MnBP, 6 : MiBP.

2. 어린이 소변 중 프탈레이트 대사체의 농도 분포

초등학교에 재학중인 남녀 각각 30명씩의 어린이의 소변에서 검출된 프탈레이트 대사산물의 농도분포는 그림 3 및 표 4와 같이 나타났다. 모든 시료에서 6종의 프탈레이트 대사산물이 검출가능한 농도 이상으로 발견되었으며, 어린이와 물질의 종류에 따라 농도의 편차가 크게 나타났다²⁾. DEHP 3가지 대사산물의 경우 남자 어린이의 소변 중 농도가 여자 어린이의 소변 중 농도보다 유의하게 높게 나타났다(표 4). 이는 사용량이 적은 DEP나 DBP의 경우에는 특정 노출원에 의해 좌우되는 반면, DEHP의 경우에는 사용량이 많아 노출원이 도처에 산재해 있기 때문에 활동범위가 넓은 남자 어린이가 더 많이 노출된 것으로 보인다.

본 연구에서 분석된 6종의 프탈레이트 대사산물의 농도는 어린이의 연령(개월)이 증가할 수록 낮아지는 경향을 보였다. 이 중에서 MiBP, MEHP, 5-OH-MEHP 및 5-oxo-MEHP의 농도는 연령과 유의한 음의 상관성

Table 4. Metabolites of phthalates in urine ($\mu\text{g/g}$ Creatinine)

Compound	Boys (n=30)		Girls (n=30)		Total (n=60)	
	GM $\pm$ GSD	Min~Max	GM $\pm$ GSD	Min~Max	GM $\pm$ GSD	Min~Max
MEP	25.5 $\pm$ 2.2	6.2~158.0	26.6 $\pm$ 2.1	10.1~177.7	26.0 $\pm$ 2.1	6.2~177.7
MnBP	130.3 $\pm$ 1.5	57.2~308.9	149.9 $\pm$ 2.5	30.7~523.3	139.8 $\pm$ 2.0	30.7~523.3
MiBP	56.8 $\pm$ 2.0	13.3~308.9	56.8 $\pm$ 2.1	16.4~289.3	56.8 $\pm$ 2.0	13.3~308.9
MEHP	19.5 $\pm$ 2.3	4.8~173.0	15.3 $\pm$ 2.7	1.3~124.6	17.3 $\pm$ 2.5	1.3~173.0
5-OH-MEHP	85.6 $\pm$ 1.8	44.5~792.6	75.2 $\pm$ 2.5	13.5~788.2	79.8 $\pm$ 2.1	13.5~792.6
5-oxo-MEHP	83.1 $\pm$ 1.8	29.0~620.5	79.0 $\pm$ 2.4	12.2~758.8	80.6 $\pm$ 2.1	12.2~758.8

Fig. 4. Correlation among concentrations of phthalate metabolites.

을 나타내었다.

프탈레이트 대사산물 간의 상관성은 MnBP와 MiBP, DEHP 대사산물 간에는 유의하게 나타났다(그림 4). 특히 5-OH-MEHP와 5-oxo-MEHP의 상관성은 상관계수 값이 0.955로 상당히 높아서 DEHP의 1차 대사산물인 MEHP에서 동일한 대사과정에 의해 생성된 물질임을 쉽게 알 수 있었다. DEHP의 1차 대사산물이 MEHP와 2차 대사산물과의 상관성은 통계적으로 유의하지만 상관계수가 2차 대사산물 간의 상관계수보다는 낮았다(그림 3). 이는 2차 대사산물로의 생체전환이 사람에 따라 다르게 나타날 수 있으며, MEHP가 생체 내에서의 대사과정 이외의 원인으로 생성되기 때문인 것으로 판단된다.

3. 어린이들의 1일 프탈레이트 노출량 추정

어린이들의 소변에서의 프탈레이트 대사산물 농도를

이용하여 1일 노출량을 추정하였다. 여기에서 이용된 식은 다음과 같다.

$$\text{Intake } (\mu\text{g/kg bw/day}) = \frac{ME \times CE}{1000 \times f} \times \frac{MW_d}{MW_m} \quad (1)$$

위의 식 (1)에서 ME 는 크레아티닌 값으로 보정한 소변 중 프탈레이트 대사산물의 농도($\mu\text{g/g Cr}$)이며, CE 는 1일 크레아티닌 배출량으로 남자의 경우 23 mg/kg/day , 여자의 경우 18 mg/kg/day 를 이용하였다.²²⁾ f 는 해당 프탈레이트 대사산물이 소변으로 배출되는 몰분율이며, MW_d 는 프탈레이트 디에스테르 형태의 모분자의 분자량, MW_m 은 대사산물의 분자량을 나타낸다. f 값의 경우 DnBP의 경우 0.69, DEHP를 추정하기 위한 MEHP 0.059, 5-OH-MEHP 0.233, 5-oxo-MEHP 0.150을 이용하였으며,²³⁾ DEP와 DiBP는 DnBP와 같은 값을 사용하였다.²²⁾ DEHP의 대사산물 3가지를 합하여

Table 5. Levels of estimated daily intake of parent phthalate compounds(n=60)

	DEP	DnBP	DiBP	DEHP			
	MEP	MnBP	MiBP	MEHP	5OH-MEHP	5oxo-MEHP	ME _{total}
Median	0.8	5.0	1.9	8.9	9.3	14.2	10.9
Min	0.2	1.0	0.5	0.5	1.4	2.0	1.5
Max	6.1	172.2	13.0	95.1	104.3	127.7	111.0

* unit : $\mu\text{g/kg bw/day}$.

계산된 1일 노출량 추정값은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{DEHP Intake } (\mu\text{g/kg bw/day}) = \frac{ME_{\text{total}} \times CE}{1000 \times f} \times MW_{\text{DEHP}} \quad (2)$$

위 식(2)에서 ME_{total} 은 MEHP, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP 농도의 크레아티닌으로 보정된 몰농도($\mu\text{mol/g Cr}$)의 총합을 나타내며 MW_{DEHP} 는 DEHP의 분자량, f 는 0.442를 이용하였다.¹⁵⁾ 식 (1)과 식 (2)를 이용하여 계산된 1일 섭취량 추정치를 표 5에 나타내었다.

어린이들의 1일 프탈레이트 섭취량 추정식에 의해 계산된 값은 표 5와 같다. DEP 및 DiBP의 경우에는 낮은 값을 보였으나 DnBP의 경우 1명이 유럽연합의 TDI인 $100 \mu\text{g/kg bw/day}$ 를 초과하였다. DEHP의 경우에는 Wittassek 등¹⁵⁾이 독일의 어린이를 대상으로 조사한 값(median range 2.6~8.0) 보다 다소 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 어린이의 경우 어른들 보다 프탈레이트 노출량이 많은 것으로 알려져 있지만,¹⁴⁾ Itoh 등²³⁾이 일본인을 대상으로 한 DEHP 노출량을 추정한 $1.8 \mu\text{g/kg bw/day}$ 과는 5배 이상의 차이를 보였다. 또한, DEHP의 노출이 국내 식품의약품안전청의 잠정기준(TDI, $50 \mu\text{g/kg bw/day}$)과 유럽연합 식품안전 기준($48 \mu\text{g/kg bw/day}$) 보다 높은 섭취량을 보인 어린이는 2명에 불과하였으며, 이보다 낮은 미국 환경보호청의 RfD($20 \mu\text{g/kg bw/day}$)를 초과하는 어린이는 11명(18.3%)이었다.

IV. 결 론

본 연구에서는 스윗칭컬럼 방법을 활용하여 소변 중 6종의 프탈레이트 대사산물을 LC/MS/MS를 이용하여 분석하였다. 적용된 분석방법은 조사 대상 시료 모두에서 모든 프탈레이트 대사산물을 추정할 수 있는 0.03~1.05 ng/ml 범위의 낮은 검출한계를 보여주었으며, 정확도 97.6~102.1%, 정밀도 2.8~6.5% 범위로 우수하였다. 조사대상인 초등학생의 소변 중 프탈레이트 대사산물의 농도는 MEP를 제외하면 상관계수 0.375~0.975 범

위의 상관성을 나타내었고, 연령에 따라 감소하는 경향을 보여주었다. 측정된 소변 중 대사산물의 농도는 17.3~139.8 $\mu\text{g/g Creatinine}$ 의 농도 범위를 보였으며 MnBP의 농도가 가장 높았다. 소변 중 대사산물의 농도를 이용하여 1일 섭취량($\mu\text{g/kg bw/day}$)을 추정하였을 때, 중앙값을 기준으로 DEP 0.8, DnBP 5.0, DiBP 1.7, DEHP 8.9~14.2로 나타났다. 본 연구에 참가한 어린이들은 DEP와 DiBP는 독일 등 외국에 비하여 낮았으며, DEHP는 다른 연구결과에서 나타난 성인 및 어린이의 1일 섭취량 추정치에 비해 다소 높은 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 연구비 지원(07142 독관리558)으로 진행된 연구의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Preuss, R., Koch, H.M. and Angerer, J. : Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **816**(1-2), 269-280, 2005.
2. Fromme, H., Bolte, G., Koch H.M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R. and Liebl, B. : Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **210**, 21-33, 2007.
3. Koch, H.M., Rossbach, B., Drexler, H. and Angerer, J. : Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates-determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environmental Research*, **93**(2), 177-185, 2003.
4. Becker, K., Seiwert, M., Angerer, J., Heger, W., Koch, H.M., Nagorka, R., Roßkamp, E., Schlüter, C., Seifert, B. and Ullrich, D. : DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*,

- 207(5), 409-417, 2004.
5. Silva, M.J., Samandar, E., Preau, J.L. Jr., Reidy, J.A., Needham, L.L. and Calafat, A.M. : Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, **860**, 106-112, 2007.
 6. Koch, H.M., Gonzalez-Reche, L.M. and Angerer, J. : On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, **784**(1), 169-182, 2003.
 7. Becker, K., Seiwert, M., Angerer, J., Heger, W., Koch, H.M., Nagorka, R., Roßkamp, E., Schlüter, C., Seifert, B. and Ullrich, D. : DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **207**(5), 409-417, 2004.
 8. Latini, G. : Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*, **361**(1-2), 20-29, 2005.
 9. Silva, M.J., Slakman, A.R., Reidy, J.A., Preau, J.L. Jr., Herbert, A.R., Samandar, E., Needham, L.L. and Calafat, A.M. : Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, **805**(1), 161-167, 2004.
 10. Wittassek, M., Wiesmüller, G.A., Koch, H.M., Eckard, R., Dobler, L., Müller, J., Angerer, J. and Schlüter C. : Internal phthalate exposure over the last two decades - A retrospective human biomonitoring study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **210**(3-4), 319-333, 2007.
 11. Kato, K., Shoda, S., Takahashi, M., Doi, N., Yoshimura, Y. and Nakazawa, H. : Determination of three phthalate metabolites in human urine using on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **788**(2), 407-411, 2003.
 12. Silva, M.J., Samandar, E., Preau J.L. Jr., Needham, L.L. and Calafat, A.M. : Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*, **219**(1-3), 22-32, 2006.
 13. Kato, K., Silva, M.J., Needham, L.L. and Calafat, A.M. : Determination of total phthalates in urine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **814**(2), 355-360, 2005.
 14. Koch, H.M., Drexler, H. and Angerer, J. : Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **207**(1), 15-22, 2004.
 15. Wittassek, M., Heger, W., Koch, H.M., Becker, K., Angerer, J. and Kolossa-Gehring, M. : Daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children-A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **210**(1), 35-42, 2007.
 16. Kato, K., Silva, M.S., Reidy, J.A., Hurtz, D. III, Malek, N.A., Needham, L.L., Nakazawa, H.N., Barr, D.B. and Calafat, A.M. : Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate and mono (2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Environment Health Perspectives*, **112**(3), 327-330, 2004.
 17. Koo, H.J. and Lee, B.M. : Human monitoring of phthalates and risk assessment. *Journal of Toxicological Environmental Health, Part A*, **68**, 1392, 2005.
 18. Takatori, S., Kitakawa, Y., Kitagawa, M., Nakazawa, H. and Hori, S. : Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **804**, 397-401, 2004.
 19. Taylor, J.K. : Quality assurance of chemical measurements, Chelsea, MI: Lewis publishers, 1987.
 20. NIOSH : Guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation (DHHS[NIOSH]) Pub. No. 95-117, Cincinnati, OH: NIOSH, 1995.
 21. OSHA : Evaluation scheme for methods that use filters as collection medium. In OSHA analytical manual, 2nd ed. Salt Lake City: OSHA, 1990.
 22. Fromme, H., Gruber, L., Schlummer, M., Wolz, G., Böhmer, S., Angerer, J., Mayer, R., Liebl, B. and Bolteln, G. : Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: Results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environment International*, **33**(8), 1012-1020, 2007.
 23. Itoh, H., Yoshida, K. and Masunaga, S. : Evaluation of the effect of governmental control of human exposure to two phthalates in Japan using a urinary biomarker approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **208**(4), 237-245, 2005.