LC-MS/MS를 이용한 인체시료 중 프탈레이트 대사체 동시분석법 확립

홍순근 · 남혜선 · 정기경 · 강일현 · 김태성 · 조상은 · 정수희 · 이장우 · 김준철 · 고영림* · 강태석†

식품의약품안전평가원, *울지대학교 보건환경과학부
(2010. 10. 13. 접수/2010. 11. 25. 수정/2010. 12. 24. 채택)

Development and Validation of On-line Column Switching HPLC-MS/MS Method for 10 Phthalate Metabolites in Human Urine

Soon Keun Hong · Hye Seon Nam · Ki Kyung Jung · Il Hyun Kang · Tae Sung Kim · Sang Eun Cho ·
Su Hee Jung · Jang Woo Lee · Jun Cheol Kim · Young Lim Kho* · Tae Seok Kang†

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea

*School of Human & Environmental Service, Eulji University, Seongnam 461-713, Korea

(Received October 13, 2010/Revised November 25, 2010/Accepted December 24, 2010)

ABSTRACT

Phthalates, such as di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP) have been proved to be teratogenics and endocrine disruptors, metabolized rapidly and excreted in the urine. In this study, a simultaneous analytical method for 10 phthalate metabolites, MnBP, MiBP, MBzP, MCHP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MnOP, MiNP and MiDP, in human urines, based on switching system with on-line pretreatment column using HPLC-MS/MS has been developed. This method was validated according to the guideline of bioanalytical method validation of National Institute of Toxicological Research. Limits of detection range between 0.2 and 0.9 ng/ml for 10 phthalate metabolites. The calibration curves showed linearity in the range 0.997~0.999, and the results of the intra- and inter-day validations were in the range from 0.4 to 14.7% RSD and from 0.3 to 9.4% RSD, respectively. Recoveries of phthalate metabolites varied from 87.0 to 116.1%. This analytical method showed high accuracy and stable precision for all metabolites, and seems to be suitable for biomonitoring of phthalates in human urine.

Keywords: phthalate metabolites, on-line column switching, LC-MS/MS, biomonitoring

I. 서 론

플라스틱 재료는 상온에서 단단하고 깨지기 쉬운 유리상 물질이지만 여기에 여러 첨가제를 혼용하여 부서짐을 제거하고 가공이 용이해진다. 이러한 과정을 가소화(plasticization)라고 하며, 가소제의 종류에는 분자 구조식에 의해 프탈레이트류, 트리멜리트산류, 에폭시류 등이 있다. DBP (di-butyl-phthalate), DEHP (di-2-ethylhexyl phthalate), DINP (di-isononyl phthalate),

DIDP(di-isodecyl phthalate), BBP(butyl benzyl phthalate) 등과 같은 프탈레이트류는 전체 가소제의 약 75%를 차지하며, 의료용구(혈액백, 튜브), 포장재, 고무호스, 비닐랩, 장난감, 건축자재, 자동차 내장재 등의 플라스틱 제품 뿐 아니라, 각종 화학제품 및 화장품 용매, 잉크, 도료, 의류, 카펫 등 생활용품에 이르기까지 광범위하게 사용되었다.^{1,2)} 현재는 DEHP, BBP, DBP 등 프탈레이트류의 실험동물 및 인체에 대한 독성이 알려지면서³⁻⁵⁾ 우리나라를 비롯하여 많은 국가에서 사용을 규제하고 있다.⁶⁾ 프탈레이트류의 인체에 대한 노출은 작업장, 자동차 내장재, 건축자재를 통한 공기흡입과 화장품류를 통한 경피흡입,⁷⁾ PVC 튜브 등의 의료기기 사용으로 인한 노출,⁸⁾ 장난감, 어린이용품을 통한 노출,⁹⁾ 물

†Corresponding author : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
Tel: 82-2-380-1816, Fax: 82-2-388-6452
E-mail : taska@korea.kr

또는 식품의 섭취¹⁰⁾ 등의 다양한 경로를 통하여 이루어지며, 다양한 대사 경로를 통해서 체외로 배출된다.¹¹⁾ 방사성동위원소로 표지된 DEHP를 인체에 투여하고 24시간 후, DEHP의 67%가 뇨를 통해 배설되는 것을 확인하였으며, mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate (5OH-MEHP) (23.3%), mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate(5cx-MEPP) (18.5%), mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate (5oxo-MEHP) (15.0%), mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) (5.9%), mono[2-(carboxymethyl)hexyl]phthalate (2cx-MMHP) (4.2%) 등이 뇨 중에서 검출되었다.¹²⁾ DBP의 인체 내 반감기는 12시간 이내로 알려져 있으며, 체내에 흡수된 후 mono-n-butyl phthalate (MnBP)로 분해되어 glucuronide가 결합된 형태로 배설되고, 일부는 unconjugated monobenzyl phthalate (MBzP)와 free phthalic acid 형태로 뇨를 통해 배출되었다.¹³⁾ BBP의 인체에 대한 연구에 따르면, 임상 지원자의 경구투여를 통한 BBP의 약 75%가 뇨로 배출되며, 대부분은 MBzP의 형태로, mono-n-butyl phthalate (MnBP)는 소량 검출되는 것으로 확인되었다.¹⁴⁾ ¹⁴C-DINP를 단회 경구 투여한 랫드의 뇨에서는 대부분 phthalic acid (PA)와 mono-isononyl phthalate (MINP)가 검출되었다.¹⁵⁾ DIDP는 rat에 경구 투여했을 때 뇨에서 주요 대사물로서 phthalic acid와 단일에스테르 산화 유도체가 검출되었으나, DIDP, monoisodecyl phthalate (MIDP)는 거의 검출되지 않는 것으로 나타났다.¹⁶⁾ 이와 같이 프탈레이트류는 체내에서 빠르게 대사되어 뇨를 통해 배설되므로, 뇨 중에 존재하는 프탈레이트 대사체의 농도를 측정하는 것은 인체가 프탈레이트에 얼마나 노출되었는지, 프탈레이트에 대한 인체노출평가를 수행하는 데 있어서 유용하게 이용되고 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 우리나라에서도 뇨 중 프탈레이트 대사체 분석을 통하여 프탈레이트에 대한 인체노출평가를 수행하고 있으나, 분석 대상물질이 주로 DEHP 및 DBP, BBP에 한정되어 있었으며,²⁰⁾ 다양한 프탈레이트류에 대한 복합노출량을 평가하기 위해서는 각각의 프탈레이트류 대사체에 대한 동시분석법이 필요하다. 본 연구에서는 DEHP를 비롯한 6종의 프탈레이트류에 대하여 10종의 프탈레이트 대사체 동시분석법을 개발하고 분석법에 대하여 타당성을 평가하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 표준물질 및 시약

프탈레이트 대사체 mono-n-butyl phthalate (MnBP), mono-iso-butyl phthalate (MiBP), mono-benzyl phthalate

(MBzP), mono-cyclo-hexyl phthalate (MCHP), mono-(2-ethyl-5-hydroxy-hexyl) phthalate (MEHHP), mono-(2-ethyl-5-oxo-hexyl) phthalate (MEOHP), mono-n-octyl-phthalate (MnOP), mono-iso-nonyl-phthalate (MiNP), mono-iso-decyl-phthalate (MiDP)와 내부표준물질로 사용한 ¹³C₄-MnBP, ¹³C₄-MBzP, ¹³C₄-MCHP, ¹³C₄-MEHP, ¹³C₄-MEOHP, ¹³C₄-MnOP, ¹³C₄-MiNP는 CIL (Cambridge Isotope Laboratory, MA, USA)에서 구입하였으며, mono-(2-ethyl-hexyl) phthalate (MEHP)는 Wako (Wako pure chemical Inc., Osaka, Japan)에서 구입하였다. 아세토니트릴(Merck, Darmstadt, Germany)과 물(J.T Baker, Phillipsburg, NJ)은 HPLC grade를 사용하였다. 암모늄 아세테이트와 β-Glucuronidase (from *Escherichia. coli*-K12)는 각각 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)와 Roche (Biomedical, Mannheim, Germany)에서 구입하였다.

10종의 표준품과 7종의 내부표준물질은 아세토니트릴로 희석하여 각각 5 ug/ml과 10 ug/ml 농도로 stock solution을 제조하여 냉장보관하였으며, 전처리 시 각각 2.5 ug/ml과 1 ug/ml으로 희석하여 사용하였다.

2. 시료전처리방법

프탈레이트류는 일상 환경 중에 광범위하게 노출되어 있으므로, 오염을 최소화하기 위하여 실험에 사용되는 가능한 모든 용기를 유리소재로 사용하였으며, 다음과 같은 세척과정을 거친 후 사용하였다. 먼저 세제로 충분히 닦은 후 증류수로 헹구내고, 에탄올에 담근 채 10분간 초음파 세척을 해주었다. 이후 다시 HPLC급 증류수에서 10분간 초음파 세척 후 methanol로 다시 한번 세척 후 180°C 이상의 고온의 오븐에서 2시간 이상 건조시켜 사용하였다.

시료전처리방법은 Koch,¹²⁾ Kho²⁰⁾ 등에서 뇨 중 프탈레이트 대사체 분석을 위하여 최적화된 방법을 이용하였다. 간단히 설명하면, 1.5 ml 갈색 유리 바이알에 공시료(물) 490 uL, 1 ppm 농도의 내부표준물질 10 uL를 가한 후 β-glucuronidase 10 uL를 첨가하고, 1 M 암모늄아세테이트 완충 용액(pH 6.5) 130 uL를 가한 후 37°C에서 90분 동안 항온배양기에서 반응을 시켰다. 가수분해된 시료 중의 프탈레이트 대사체가 쉽게 분리되도록, 10분간 초음파 처리를 하고 1% acetic acid가 포함되어 있는 아세토니트릴과 1:6(v/v %)이 되도록 희석하였다. 이 용액을 10분간 3000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 조심히 취하여 분석용 시료로 사용하였다.

3. 시료분석

프탈레이트 대사체 분석을 위한 LC-MS/MS로는

Nanospace SI-2 (Shiseido, Tokyo, Japan)와 API 4000 (Applied Biosystems, Foster, CA)을 사용하였다.

1) HPLC 조건

10종의 프탈레이트 대사체의 분리를 위하여 동시전처

Table 1. HPLC analytical condition for on-line switching mode

Pre-column	Oasis, HLB, 5 μ m, 2.1 $\times$ 20 mm
Analytical column	Cadenza, CD-C18, 3 μ m, 2.0 $\times$ 150 mm
Oven temperature	30°C
Injection volume	10 μ l
Mobile phase	A: 0.1% acetic acid in water B: 0.1% acetic acid in ACN

Fig. 1. Flow Diagram for on-line switching mode (A) a stage of concentration in pre-column (B) a stage of analysis of phthalate metabolites.

Table 2. HPLC gradient program used to separate 10 phthalate metabolites

Time (min)	Flow rate (μ l/min)	Elution A (%)	Elution B (%)
0	200	90	10
2.5	200	90	10
3	200	80	20
7	200	63	37
9	200	63	37
14	200	50	50
18	200	0	100
22	200	0	100
22.1	400	90	10
25	400	90	10

리(on-line cleanup) 및 농축을 위한 전처리 컬럼(HLB, 5 μ m, 2.1 $\times$ 20 mm, Oasis)과 피크의 분리를 위한 분석 컬럼(Cadenza, CD-C18, 3 μ m, 2.0 $\times$ 150 mm, Imtakt)으로 구성된 스위칭 모드 방식을 이용하였다(Table 1, Fig. 1). 또한, 두 종류의 이동상을 시간대별로 조성을 달리하는 구배용매조성법(gradient mode)을 이용하여(Table 2) MiBP/MnBP와 MEHP/MnOP와 같은 이성질체의 분리하고자 하였다.

2) 질량분석기 조건

프탈레이트 대사체 및 ^{13}C 로 라벨링된 내부표준물질의 질량분석기 조건을 확립하기 위하여 주입기(10 μ l/min, Harvard Apparatus)로 최적화 과정을 수행하였다. Curtain gas 15 Mpsi, GS1 40 Mpsi, GS2 60 Mpsi, detector temperature 400°C를 이용하였으며, ion source는 electrospray ionization (ESI) negative, ion source energy는 -4500 V에서 최상의 조건을 확인하였다(Table 3). 이에 따른 각 프탈레이트 대사체의 정성 및 정량을 위한 이온값에 대한 기기 조건은 Table 4와 같다.

4. 검증(Method validation)

프탈레이트 대사체 동시분석법의 검증은 식품의약품안전청 국립독성연구원의 “생체시료분석법 validation”에 따라 시행하였다.²¹⁾ 직선성, 정확성, 정밀성, 특이성 등을 일내(Intra-day, n = 6)와 일간(inter-day, n = 3)으로 나누어 실시하였다. 분석 시료와 동일한 생체 공시료인 노 공시료에서 분석법 검증이 이루어져야 하나, 프탈레이트의 분포 특성상 노 공시료 자체에서도 높은 농도의 검출이 예상되기 때문에 모든 시험법의 검증은 노 공시료 대신 HPLC급 물을 사용하였다.²²⁾ 검량선 및 데이터처리 시 가중치를 고려한 역산농도를 사용하였으며, 검출한계는 FDA 가이드라인에 제시되어 있는 방법에 의거하여 공시료를 포함한 가능한 낮은 농도들로 작성한 검량선의 회귀직선의 기울기 및 y 절편의 표준편차의 수학적 통계처리를 통하여 얻었다.²³⁾ 정량한계는 FDA 가이드라인의 계산식에 따라 검출한계의 3배수에 해당하는 값으로 결정하였다. 분석법의 정확도는 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 참값의 농도

Table 3. MS conditions for detection of phthalate metabolites

Mode	ESI / negative
Ion source energy	-4500 V
Curtain gas	15 Mpsi
GS2	60 Mpsi
Detector temperature	400°C

Table 4. Parent/daughter ions, declustering potential, entrance potential, collision energy and collision cell exit potential

	Phthalate metabolites	Parent/Daughter ion (m/z)	Declustering potential	Entrance potential	Collision energy	Collision cell exit potential
1	MnBP	221/149	-50	-10	-18	-7
2	MiBP	221/149	-50	-10	-18	-7
3	MBzP	255/183	-45	-10	-16	-11
4	MCHP	247/97	-50	-10	-22	-7
5	MEHP	277/127	-60	-10	-24	-7
6	MEHHP	293/145	-55	-10	-20	-7
7	MEOHP	291/121	-55	-10	-26	-5
8	MnOP	277/125	-60	-10	-20	-7
9	MiNP	291/141	-70	-10	-26	-1
10	MiDP	305/155	-55	-10	-24	-11
11	¹³ C ₄ -MnBP	225/151	-40	-10	-16	-7
12	¹³ C ₄ -MBzP	259/107	-40	-10	-20	-5
13	¹³ C ₄ -MCHP	251/97	-40	-10	-22	-5
14	¹³ C ₄ -MEHP	281/137	-60	-10	-22	-7
15	¹³ C ₄ -MEOHP	295/143	-65	-10	-20	-7
16	¹³ C ₄ -MnOP	281/127	-55	-10	-24	-7
17	¹³ C ₄ -MiNP	295/141	-70	-10	-26	-7

로 나눈 비의 백분율(%)로 구하여 산출하였으며, 정밀도는 동일 시료의 반복측정을 통하여 얻은 표준편차를 농도로 나눈 상대표준편차(RSD %)로 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분석법의 타당성 평가(method validation)

1) 특이성

MiBP, MnBP, MBzP, MCHP, MEHP, MEHHP,

Fig. 2. HPLC-MS/MS chromatogram for a standard mixture of 10 phthalate metabolites.

MEOHP, MnOP, MiNP, MiDP 각각의 피크를 확인하고 분리정도를 확인하였으며, 각 물질에 대한 retention time 및 크로마토그램의 결과는 Fig. 2와 같다. 특히 MnBP와 MiBP 및 MEHP와 MnOP는 분자량이 같은 구조 이성질체로서 같은 머무름 시간에 용출되어 분리가 용이하지 않으나, 이동상의 gradient 조건을 조절하여 두 쌍의 이성질체를 분리할 수 있었다(Fig. 3). 공시료에 대한 간섭시험을 수행한 결과, 다른 프탈레이트 대사체 물질은 검출되지 않았으나, MnBP 및 MEHP가 검출되었다(Fig. 4). 공시료를 반복하여 측정한 결과, MnBP와 MEHP의 평균 농도는 0.2와 0.6 ng/ml였

Fig. 3. LC-MS/MS chromatogram of two couples of isocratic phthalates, MiBP and MnBP, MEHP and MnOP.

Fig. 4. Chromatograms of MnBP and MEHP in blank sample.

으며, 시료의 조제법과 동일한 방법으로 조제한 표준용액의 검량선을 이용하여 보정되도록 하였다.

2) 직선성, 검출한계 및 정량한계

프탈레이트 대사산물의 정량을 위한 검정곡선은 공시료(물), 제로시료(내부표준물질만 포함된 물) 및 각 물질의 정량한계를 최저범위로 하여 250 ppb까지 범위 내 여덟 가지 농도로부터 얻었으며, 각 물질의 검정곡선으로부터 직선성을 검토한 결과, 물질별 정량한계 및 검정곡선의 범위는 Table 5와 같다. 각 프탈레이트 대사산물의 회귀계수(r^2)는 0.9977 이상으로 나타났으며, 농도증가와 기기반응 간의 상관성에 있어서도 매우 우수한 결과를 나타냈다.

각 프탈레이트 대사체의 검출한계와 정량한계의 결과는 Table 6에 제시하였다. MnBP 등 10종의 대사체에 대한 정량한계는 0.2~0.9 ng/ml의 범위에 속하는 것으로 나타났으며, 미국 CDC^[8]의 프탈레이트 대사체 분석법에 의한 검출한계와 비교하였을 때 우수한 검출한계

를 보였으나, Kho 등^[20]의 검출한계(MBP; 1.05 ng/ml, MEHP 0.22 ng/ml, 5-OH-MEHP; 0.15 ng/ml)보다는

Table 6. LOD, LOQ and retention time for phthalate metabolites

Analyte	Limit of detection (ng/ml)	Limit of quantitation (ng/ml)	Retention time (min)
MnBP	0.4	1.1	15.25
MiBP	0.5	1.4	15.0
MBzP	0.4	1.3	15.8
MCHP	0.2	0.7	16.7
MEHP	0.8	2.5	19.4
MEHHP	0.7	2.3	14.4
MEOHP	0.5	1.5	14.9
MnOP	0.6	2.0	19.7
MiNP	0.3	1.0	19.8
MiDP	0.4	1.2	20.8

Table 5. Calibration curves for phthalate metabolites from eight different spiked samples

Analyte	Regression line			Calibration range (ng/ml)
	Slope (a)	Intercept (b)	r^2	
MnBP	0.03309	0.03469	0.9994	1.5~250
MiBP	0.0804	-0.03918	0.9997	1.5~250
MBzP	0.24339	-0.24933	0.9991	1.5~250
MCHP	0.05062	-0.02397	0.9998	1.0~250
MEHP	0.02164	0.02783	0.9988	3.0~250
MEHHP	0.04109	-0.07340	0.9993	3.0~250
MEOHP	0.06171	-0.04614	0.9982	1.5~250
MnOP	0.04211	-0.02399	0.9980	3.0~250
MiNP	0.09244	-0.02708	0.9977	1.0~250
MiDP	0.10367	-0.04879	0.9994	1.5~250

Table 7. Intra- and inter accuracy for 10 phthalate metabolites at low, midium and high concentration

Analyte		Low conc.	Midium conc.	High conc.	Average	%C.V.
MnBP	Intra-day	100.7	100.4	101.0	101.0	1.7
	Inter-day	100.6	98.1	100.7		
MiBP	Intra-day	102.5	103.2	102.1	102.0	2.3
	Inter-day	102.9	101.1	101.1		
MEHP	Intra-day	89.0	101.7	101.6	96.9	5.7
	Inter-day	94.6	102.0	101.3		
MEOHP	Intra-day	100.6	101.9	100.8	101.2	1.3
	Inter-day	100.7	102.5	103.6		
MEHHP	Intra-day	96.0	97.1	102.5	101.0	4.5
	Inter-day	96.9	98.2	103.5		
MiNP	Intra-day	92.6	105.0	102.7	99.0	6.8
	Inter-day	89.0	101.9	101.6		
MBzP	Intra-day	101.6	93.9	98.0	102.3	6.9
	Inter-day	102.0	97.4	101.3		
MCHP	Intra-day	92.6	97.5	97.2	98.2	8.4
	Inter-day	87.0	99.4	100.9		
MnOP	Intra-day	100.7	97.1	98.9	99.2	1.9
	Inter-day	101.2	100.6	100.8		
MiDP	Intra-day	99.9	103.5	98.5	100.3	2.1
	Inter-day	102.8	100.2	99.6		

약간 높은 검출한계를 나타냈다. 그러나, Kho 등이 프탈레이트 대사체 3종에 관하여 검출한계를 산출한 데 비하여 본 연구에서는 동시에 10종의 대사체를 분석하는 데에서 기인하는 것으로 판단된다. 한편, 10종의 프탈레이트 대사체에 관한 정량한계는 0.7~2.5 ng/mL로 나타났으며, 실제 시료 분석시 매우 낮은 수준까지 정량이 가능하므로 프탈레이트에 관한 정확한 노출 평가가 이루어질 것으로 생각된다.

3) 정확도

10종의 프탈레이트 대사체 동시분석법의 검증을 위하여 일내 및 일간에 대하여 정확성을 평가한 결과, 정량한계 수준에서 88.8~106.1%였으며, 그 외의 농도에서는 87.0~103.6% 범위 안에 속했으며, 각 물질에 대한 평균 변이계수는 1.3~8.4%였다(Table 7). 대부분의 프탈레이트 대사체에서 비교적 안정적인 정확성 및 회수율을 보이는 것으로 평가되었다. 국립독성연구원 “생체시료의 validation”에 따르면, 최저정량한계를 제외한 농도에서 정확도는 $\pm 15\%$ 이내이어야 하며, 최저정량한계에서는 $\pm 20\%$ 를 넘지 않아야 한다. 본 연구에 적용한 시료전처리 및 분석방법은 노 중 프탈레이트 대사체를 분석하는데 있어서 적합한 방법이라고 판단된다.

4) 정밀도

정확도와 같이 검출한계 및 저농도, 중농도, 고농도에서 일내(n = 6)와 일간(n = 3)에 따른 변동계수(% CV)를 비교하여 평가하였다. 국립독성연구원 “생체시료의 validation”에 따라 정밀도는 정량한계에서는 20%를, 저농도, 중농도, 고농도에서는 15%의 변동계수를 초과하지 않아야 한다. 본 연구의 결과, 정량한계 및 저농도, 중농도, 고농도 세 농도에서 모두 기준치 범위를 넘지 않았으며, 모든 대사체의 변동계수의 평균이 2.8~4.2% 이내에 드는 수치로 우수한 재현성을 확인하였다(Table 8).

IV. 결 론

화장품, 장난감, 건축기자재 및 의료용품 등 매우 다양한 방면에서 가소제로서 사용되고 있는 프탈레이트류는 동물실험 결과 발암성 및 생식 독성이 밝혀지면서, 인체에 대한 노출 정도 및 위해성 평가에 대한 연구가 요구되었고, 이에 우리나라를 비롯하여 외국에서는 노, 혈액, 모유 등 인체시료로부터 프탈레이트류의 분석을 통해서 노출평가 및 위해평가를 수행하고 있다. 기존 국내에서는 규제 대상 물질인 DEHP, DBP,

Table 8. Intra- and inter precision for 10 phthalate metabolites at low, medium and high concentration

Analyte		Low conc.	Medium conc.	High conc.	Average
MnBP	Intra-day	0.4	4.4	2.8	3.9
	Inter-day	3.1	2.0	1.1	
MiBP	Intra-day	0.4	3.9	4.4	4.1
	Inter-day	2.8	3.4	2.8	
MEHP	Intra-day	0.4	3.6	2.4	3.6
	Inter-day	3.7	1.4	0.7	
MEOHP	Intra-day	0.4	4.0	2.8	4.2
	Inter-day	0.6	1.8	1.9	
MEHHP	Intra-day	0.4	2.1	2.9	2.9
	Inter-day	2.4	3.5	0.6	
MiNP	Intra-day	0.4	1.4	3.0	4.0
	Inter-day	1.1	5.7	4.2	
MBzP	Intra-day	0.4	4.0	6.9	4.8
	Inter-day	1.2	4.3	3.7	
MCHP	Intra-day	0.4	4.4	7.7	4.1
	Inter-day	1.9	0.6	1.9	
MnOP	Intra-day	0.4	4.0	5.2	2.8
	Inter-day	0.9	1.8	0.7	
MiDP	Intra-day	0.4	2.6	3.6	2.8
	Inter-day	2.1	4.3	0.3	

BBP 중심으로 프탈레이트류의 분석이 이루어졌으나, 본 연구에서는 프탈레이트 복합노출에 대한 평가를 위해 DEHP, DBP, BBP를 비롯한 DINP, DnOP, DIDP 등 6종의 프탈레이트류에 대하여 각각의 대사체 10종을 분석하기 위한 분석법을 개발하고, 시험법 검증 과정을 통하여 10종의 동시분석법을 확립하였다. 프탈레이트류는 대기 및 분석기구, 분석장비에 사용된 플라스틱에도 상당히 포함되어 있으므로, 전처리 및 분석시 최소한의 오염을 위해서 추출 및 농축 등의 과정을 없애고, 전처리 과정을 단순화하였다. 특히, 스윙킹 컬럼을 이용함으로써, 전처리 및 분석 중에 기인하는 프탈레이트의 오염을 최소화하였으며, 고감도 장비인 LC-MS/MS tandem mass 방법으로 재현성과 감도가 뛰어난 분석법을 적용함으로써 10종의 프탈레이트 대사체 및 이성질체를 분석할 수 있었다. 분석법의 신뢰성 있는 검증을 위하여 국립독성연구원의 『생체시료분석법 validation』에 따라서 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정확성, 정밀성 등의 시험법 검증을 수행하여 허용 오차범위내의 결과를 확인함으로써 프탈레이트 대사체 동시분석법에 대한 신뢰성을 확보하였다.

그러나, 본 연구에서는 공시료로서 물을 이용하여 프탈레이트 대사체의 동시분석법을 검증하였다. 분석시료

인 뇨 시료와 물은 매질의 성질이 다르기 때문에 실제로 뇨 시료를 분석시 매질 효과(matrix effect)를 고려하지 않을 수 없다. 그러나, 실제로 신생아의 뇨에서조차 프탈레이트가 검출되는 등 프탈레이트가 검출되지 않는 뇨 공시료를 구하는 것은 어렵기 때문에 뇨 공시료 대신에 물 등의 다른 매질을 이용하여 분석법 개발 및 검증, 모니터링 연구에 이용하고 있다.²²⁾

이렇게 확립된 분석법은 대단위 인체 모니터링 사업 등을 통해 우리나라 일반 인구를 대상으로 한 프탈레이트류의 노출량을 평가하는데 활용될 것이며, 설문조사 등을 통해 프탈레이트류에 관한 노출평가 및 위해 평가가 이루어질 것으로 기대한다.

감사의 글

이 연구는 정부(식품의약품안전평가원)의 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구(09181유해물610, 09182유해물607)이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Wensing, M., Uhde, E. and Satthammer, T. : Plastics

- additives in the indoor environment-frame retardants and plasticizers. *Science of the Total Environment*, **339**, 19-40, 2005.
2. US Environmental Protection Agency : An exposure and risk assessment for phthalate ester : Di(2-ethylhexyl)phthalate, di-n-butyl phthalate, dimethyl phthalate, diethyl phthalate, di-n-octyl phthalate, butyl benzyl phthalate. U.S. Environmental Protection Agency, 1981.
 3. Doull, J., Cattley, R., Elcombe, C., Lake, B. G., Swenberg, J., Wilkinson, C., Williams, G. and van Gemert, M. : A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new US EPA Risk Assessment Guidelines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **29**, 327-357, 1999.
 4. Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Fail, P. A., Seely, J. C., Brine, D. R., Barter, R. A. and Butala, J. H. : Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reproductive Toxicology*, **18**, 241-264, 2004.
 5. Agency for Toxic Substances and Disease Registry : Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008.
 6. Kamrin, M. A. : Phthalate risks, phthalate regulation, and public health : A review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **12**, 157-174, 2009.
 7. Gray, T. J. and Gangolli, S. D. : Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environmental Health Perspectives*, **65**, 229-235, 1986.
 8. Hashizume, K., Nanya, J., Toda, C., Yasui, T., Nagano, H. and Kojima, N. : Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. *BioPharm Bulletin*, **2**, 209-214, 2002.
 9. Kluwe, W. M. : Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environmental Health Perspectives*, **45**, 3-9, 1982.
 10. David, R. M. : Exposure to phthalate esters. *Environmental Health Perspectives*, **108**, A440, 2000.
 11. Wittassek, M. and Angerer, J. : Phthalates : metabolism and exposure. *International Journal of Andrology*, **31**, 131-138, 2008.
 12. Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J. : New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuteriumlabelled DEHP. *Archives of Toxicology*, **79**, 367-376, 2005.
 13. Albro, P. W. and Moore, B. : Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. *Journal of Chromatography A*, **94**, 209-218, 1974.
 14. Leeder, J. S. and Kearns, G. L. : Pharmacogenetics in pediatrics : Implications for practice. *Pediatric Clinics of North America*, **44**, 55-77, 1997.
 15. Anderson, W., Castle, L. and Scotter, M. : A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Additives and Contaminants*, **18**, 1068-1074, 2001.
 16. Midwest Research Institute : Single and repeated oral dose pharmacokinetics of 14 C-labelled diisononyl phthalate with cover letter. Midwest Research Institute, 1983.
 17. Kato, K., Silva, M. J., Wolf, C., Gray, L. E., Needham, L. L. and Calafat, A. M. : Urinary metabolites of diisodecyl phthalate in rats. *Toxicology*, **236**, 114-122, 2007.
 18. Center for Disease Control and Prevention : Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2005.
 19. Wittassek, M., Wiesmiller, G., Koch, H., M., Eckard, R., Dobler, L., Mllera, J., Angerer, J. and Schlterb, C. : Internal phthalate exposure over the last two decades - A retrospective human biomonitoring study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **210**, 319-333, 2007.
 20. Kho, Y. L., Jeoung, J. Y., Choi, K. H. and Kim P. G. : Determination of Phthalate Metabolites in Korean Children's Urine by High Performance Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Environmental Health Sciences*, **34**, 207-278, 2008.
 21. National Institute of Technological Research : Bioanalytical Method Validation. National Institute of Technological Research, 2002.
 22. Silva, M. J., Malek, N. A., Hodge, C. C., Reidy, J. A., Kato, K., Barr, D. B., Needham, L. L. and Brock, J. W. : Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **789**, 393-404, 2003.
 23. US Food and Drug Administration : Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration, 2001.