

생체시료에서 GC/MS에 의한 에틸렌글리콜 및 대사체인 글리콜산 동시분석

이준배^{1,4}, ★ · 박미정¹ · 성태명³ · 최병하² · 유재훈¹ · 손성건¹ · 팽기정⁴

¹국립과학수사연구원 동부본원, ²국립과학수사연구원 법의학과,
³국방부 조사본부 이화학과, ⁴연세대학교 화학과
(2010. 12. 1. 접수, 2010. 12. 7. 승인)

Simultaneous analysis of ethylene glycol and glycolic acid in bio-specimens by GC/MS

Joon-Bae Lee^{1,4}, ★, Mee-Jung Park¹, Tae-Myung Sung³, Byung-Ha Choi², Jae-Hoon You¹,
Shungkun Shon¹ and Ki-Jung Paeng⁴

¹Eastern District Office, National Forensic Service, Wonju 220-805, Korea

²Department of Medicine, National Forensic Service, Seoul 158-707, Korea

³Department of Chemistry, Criminal Investigation Command, Seoul 140-701, Korea

⁴Department of Chemistry, Yonsei University, Wonju, 220-710, Korea

(Received December 1, 2010; Accepted December 7, 2010)

요 약: 담홍색 열매체유를 포도주로 오인하고 음용하여 사망한 변사사건에서 열매체유 중 39%의 에틸렌글리콜을 확인하였다. 열매체유는 물을 열전달 매체로 사용하였을 경우 고온에서 발생하는 고압 수증기에 의한 문제를 피하기 위하여 사용되는 열전달 매체로 주로 광유계 또는 에틸렌글리콜을 사용하는 것으로 알려져 있다. 부검을 통한 혈액 및 기타 조직 등의 변사자 생체시료에서 증수소로 치환된 에틸렌글리콜을 내부표준물질로 하여 아세토니트릴로 추출, 정제 및 질소 기류하에서 농축한 다음 1% TMCS가 함유된 BSTFA로 유도체화하여 에틸렌글리콜과 그 대사체인 글리콜산을 GC/MS에 의하여 동시 분석하였다. 약 0.2 g의 생체시료에 대하여 0.5 M의 HCl 용액 50 µL를 이용한 산성조건에서 추출하였으며 무수 황산나트륨을 단계적으로 처리하여 수분제거를 하였고 혈액에서 2,755 µg/mL의 에틸렌글리콜과 174 µg/mL의 글리콜산 및 기타 시료에서 860 µg/g~1,290 µg/g의 에틸렌글리콜과 93 µg/g~134 µg/g의 글리콜산을 검출하였다. 특히 신장 조직에서 이와 관련된 대사체인 옥살산염으로 추정되는 결정이 관찰되었다.

Abstract: Mistaking pink colored thermal oil for grape wine, a victim drank the oil to death which was analyzed to contain 39% of ethylene glycol. Thermal oil could be used for heat transfer to prevent the malfunction due to the high pressure in the boiler operated at high temperature when using water. Main component of thermal oil is known to be mineral oil or ethylene glycol. From the blood and other tissue of the victim from autopsy, ethylene glycol and its metabolite were simultaneously analyzed by GC/MS after extraction under acidic condition with acetonitrile followed by derivatization with BSTFA. About 0.2 g of the specimens were pretreated

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)33-740-8761 Fax : +82-(0)33-731-7636

E-mail : pajlee@korea.kr

with 50 uL of 0.5 M HCl solution to keep acidic condition, then dehydrated with anhydrous sodium sulfate followed by concentration under nitrogen stream. Ethylene glycol and glycolic acid concentration in blood was measured to be 2,755 µg/mL and 174 µg/mL respectively. In other specimen, the concentration of ethylene glycol and glycolic acid was 860 µg/g~1,290 µg/g and 93 µg/g~134 µg/g. Especially, crystal appeared in kidney which was supposed xalate from the metabolite of ethylene glycol.

Key words: ethylene glycol, glycolic acid, ethylene glycol-d₄, derivatization, GC/MS

1. 서 론

에틸렌글리콜(ethylene glycol, HOCH₂CH₂OH)은 밀도 1.12 g/mL, 끓는점 약 198 °C인 무색 투명하고 점성이 있는 2가 알콜로, 어는점은 -12.6 °C 이나 수용액 상태에서 농도에 따라 어는점이 약 -48 °C까지 강하되어 차광용 부동액으로 사용되며, 기타 합성수지 제조, 열매체유 등에 사용되는 물질이다.

에틸렌글리콜의 인체에 대한 치사량은 1.4 mL/kg 또는 약 100 mL 정도이며, 약 1 L의 음용시라도 대사과정에서 에틸렌글리콜과 에탄올과의 경쟁반응을 이용한 에탄올 투여 및 대사체인 글리콜산으로 생기는 산독증(acidosis)에 대하여 탄산염을 이용한 혈액 pH 조절, 혈액 투석 등을 통한 응급조치시 생존하였다는 임상보고도 있다.

생체내 에틸렌글리콜 대사과정은 음용 후 약 1~4 시간 후 혈중 최대 농도에 이르며, 글리콜 알데히드(glycolic aldehyde, HOCH₂CHO)와 글리콜산(glycolic acid, HOCH₂COOH) 및 글리옥실산(glyoxylic acid, HCOCOOH)을 거쳐 옥살산(oxalic acid, HOCCOOH)으로 대사된다(Fig. 1). 이 대사 과정 중 글리콜산에서 글리옥실산으로의 과정이 속도결정 단계로 체내에 글리콜산의 축적이 일어나 치명적이며, 옥살산은 옥살산

염의 형태로 조직에 축적되어 신장 등에서 관찰되기도 한다.^{2,4}

글리콜산은 α-hydroxy acid 중에서 가장 작은 크기의 산으로 분자 크기가 작아 피부흡수가 용이하여 피부 각질제거제 등으로 이용되고 기타 수술용 봉합사의 제조 등에 사용된다. 글리콜산의 물리적 특성과 독성은 pKa 3.83(25 °C), 녹는점 약 80 °C이고, 흰쥐(rat)에 대한 경구반수치사량(LD₅₀)은 약 1.9 g/kg으로 알려져 있다.

에틸렌글리콜의 분석은 주로 GC/FID나 GC/MS에 의하며 그 대사체인 글리콜산의 분석은 이온크로마토그래피 또는 HPLC에 의한 분석이 일반적이다^{5,6}. 이들에 대한 GC/FID 및 GC/MS를 이용한 동시분석은 Yao 및 Porter 등에 의해 아세트산과 에틸아세테이트 및 DMP (dimethoxy propane)와 DMF (dimethyl formamide)를 이용한 분석사례가 있다.^{7,8}

히드록시기(-OH) 및 카르복시기(-COOH) 등과 같은 큰 극성을 가진 화합물을 기체크로마토그래피로 분석할 경우 감도 및 분리능 등의 크로마토그래피 분석특성 향상을 위해 열안정성이 큰 휘발성유도체로 전환시킬 필요가 있다. 히드록시기의 경우 일반적으로 TMS (trimethylsilyl)화, TBDMS (tributyldimethylsilyl)화 또는 acetyl화 시키고, 카르복시기의 경우 TMS화, TBDMS화 또는 ester화 시키는 방법이 있으며, 특히

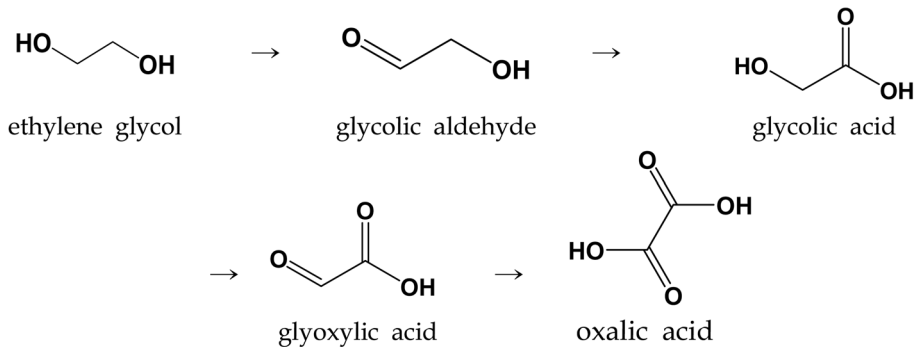


Fig. 1. Metabolic process of ethylene glycol in body.

글리콜산의 경우 pH가 적합하지 않고 수분이 충분히 제거되지 않은 상태에서는 염의 형태로 존재할 수 있어, 기체크로마토그래피에 의한 분석이 어려울 수 있다. 따라서 기체크로마토그래피를 이용한 글리콜산 분석의 경우, pH 조절과 추출물 중 수분의 제거가 중요한 단계로 생각된다.

본 연구에서는 생체시료 중 에틸렌글리콜과 그 대사체인 글리콜산의 분석을 위하여 증수소로 치환된 에틸렌글리콜을 내부표준물질로, 0.5 M HCl 수용액을 이용한 산성 조건에서 아세토니트릴로 추출한 다음 무수 황산나트륨으로 단계적으로 수분을 제거하고 농축하여 BSTFA (bistrimethylsilyltrifluoroacetamide)로 TMS 화시켜 에틸렌글리콜과 글리콜산을 GC/MS로 동시 분석하였다. 특히 에틸렌글리콜이 함유된 석유보일러용 담홍색 열매체유를 포도주로 오인, 음용하여 사망한 생체시료에서 에틸렌글리콜과 그 대사체인 글리콜산을 분석하였고, 신장조직에서 에틸렌글리콜 대사체인 옥살산염으로 추정되는 결정을 관찰하였다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 기기

내부표준물질(IS)인 에틸렌글리콜 증수소치환체 (ethylene glycol-d₄), 에틸렌글리콜과 글리콜산 및 유도체화 시약인 1% TMCS (trimethylchlorosilane)가 함유된 BSTFA (bistrimethylsilyltrifluoroacetamide)는 Aldrich, 아세토니트릴(acetonitrile, CH₃CN)은 HPLC급의 Burdick & Jackson, 무수 황산나트륨(Na₂SO₄)은 Shinyo Pure Chemicals사의 제품을 사용하였으며 분쇄는 OMNI-INC의 핸드분쇄기, 교반 및 유도체화 반응을 위한 오븐은 Vision Scientific의 vortex mixer 및 건조기, 농축은 Caliper Life Sciences의 Turbo Vap 질소농축기, 조직관찰을 위한 현미경은 Olympus제로 DP71 카메라가 장착된 BX51 현미경을 사용하였고, GC/MS 및 오토샘플러는 Agilent Technologies사의 6890N GC와 5973MSD의 GC/MS system 및 Gerstel MPS2 오토샘플러를 각각 사용하였으며 질량측정을 위한 저울은 Mettler-Toledo AL204 모델을 이용하였다.

2.2. 표준시료 제조 및 시료전처리

검량선 작성을 위하여 에틸렌글리콜이 검출되지 않음을 GC/MS로 확인한 공시료 혈액 각 0.2 mL에 증류수에 제조한 1,000 µg/mL의 내부표준물질 100 µL와 에틸렌글리콜과 글리콜산 혼합표준원액을 에틸렌

Table 1. GC/MS condition

| GC/MS | Condition |
|--------------------|---|
| Injector temp. | 250 °C |
| Split ratio | 40:1 |
| Transfer line temp | 270 °C |
| Carrier Gas | He 1.0 mL/min |
| Oven temp. | 40 °C (3 min) → (10 °C/min) → 280 °C (5 min) |
| Column | DB-5MS (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 µm film thickness) |
| Solvent delay | 5.8 min |
| Ion source temp. | 230 °C |

글리콜이 100 µg/mL~3,000 µg/mL, 글리콜산이 10 µg/mL~300 µg/mL 되도록 첨가한 다음, 증류수로 부피를 모두 일정하게 1.0 mL로 하여 vortex mixer로 20 초간 균질화 시켰다. 균질화된 혈액 시료에 대하여 0.5 M HCl용액 50 µL를 가하고 약산성을 확인한 다음, 0.5 mL의 아세토니트릴과 무수 황산나트륨 약 1 g을 첨가한 뒤 곧 2 mL의 아세토니트릴을 사용하여 추출하였으며, 추출액에 대하여 무수 황산나트륨 증진관을 통과시켜 정제한 다음 질소기류하의 47 °C에서 농축하였다. 용기 바닥에 미량의 액상물이 잔류할 때까지 농축하였고, 용기 바닥의 농축물을 1 mL의 아세토니트릴로 회수하여 1% TMCS가 함유된 BSTFA 100 µL를 가하고 80 °C를 유지한 오븐에서 30 분간 반응시킨 다음 0.5 µL 주입하여 GC/MS로 분석하였으며, 이때 분석조건은 Table 1과 같았다.

2.3. 열매체유 및 생체시료 분석

열매체유는 아세토니트릴에 1,000배 희석하여 내부표준물질을 첨가한 다음 TMS화시켜 GC/MS로 분석하였고, 열매체유를 포도주로 오인하고 음용한 번사자의 부검시 채취한 생체시료에 대해서는 혈액의 경우 0.2 mL을 사용하였으며 기타 심장, 신장, 뇌 조직은 분쇄기로 분쇄한 후 -25 °C에서 냉동보관하고 시료에 따라 약 0.2 g-0.5 g씩을 용기에 취하여 1,000 µg/mL의 내부표준물질 100 µL를 가하여 vortex mixer로 균질화 시킨 다음 2.2 절과 동일한 방법으로 추출, 정제, 농축 및 유도체화하여 GC/MS로 분석하였다.

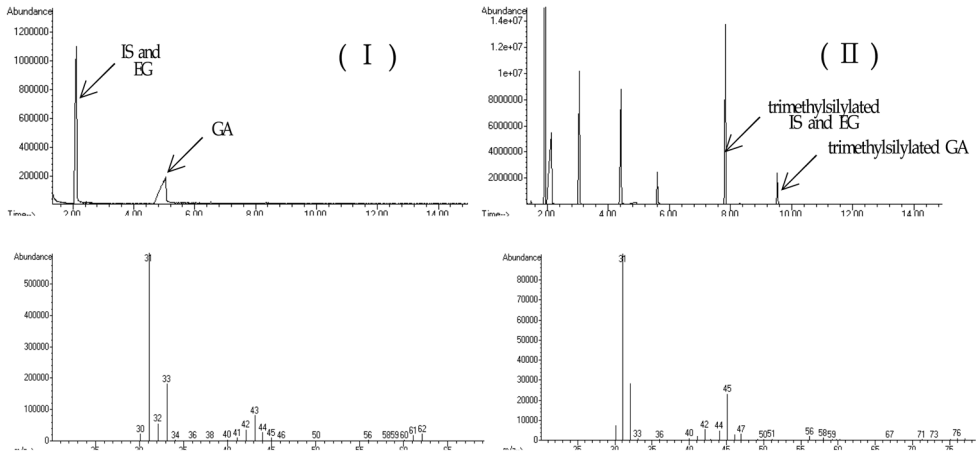
3. 결과 및 고찰

3.1. GC/MS를 이용한 동시분석을 위한 시료전처리

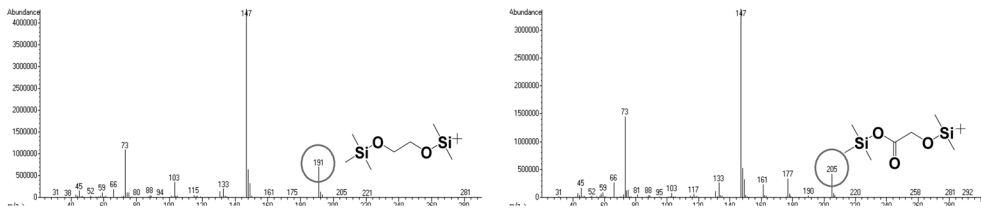
글리콜산은 pKa 값이 25 °C에서 3.83으로, 그 수

용액은 산성을 나타내어 유기용제를 이용한 추출시 pH 조건과 수분의 존재는 추출액의 유도체화 및 GC/MS를 이용한 분석 특성에 영향을 미칠 수 있다. 에틸렌글리콜 및 글리콜산이 각각 1,000 µg/mL의 농도로 첨가된 0.2 mL의 혈액에 대하여 최적 pH 조건 탐색결과 염기성 조건에서의 전처리시 글리콜산은 미량 검출되거나 검출되지 않았고 이는 염기성 조건에서 글리콜산염의 형성으로 인한 것으로 추정되었으며, 산성조건인 0.5 M HCl용액 50 µL의 첨가시 양호한 결과를 얻어 다른 생체시료의 추출에 대해서도 이를 적용하였다. 각 경우에 약산성을 확인하였고, 추출 용제인 아세토니트릴은 끓는점이

81.6 °C로 분석대상 물질과도 잘 섞이는 용제이나 물과도 잘 혼합되어 수분의 제거가 중요한 단계였으며, 수분의 제거를 위하여 추출과정 초기부터 pH 조절과 함께 무수 황산나트륨을 이용한 수분 제거를 시행하였고 최종 추출액에 대하여 무수 황산나트륨이 충전된 충전관을 통과시킨 다음 질소 농축시 미량의 액상물이 잔류할 때까지 농축하여 분석하였다. 에틸렌글리콜은 끓는점이 198 °C인 점점한 액상물이며 글리콜산은 가열하였을 경우 분해되는 것으로 알려져 있어, 본 실험에서 47 °C의 질소기류하의 온화한 농축과정에서 분석대상 물질은 미량의 액상에서 유지되는 것으로 생각되었다.

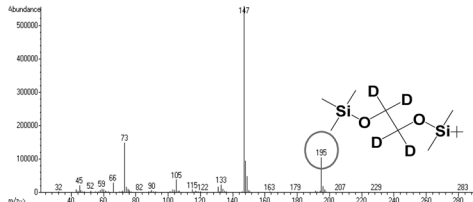


I-1. Mass spectrum for ethylene glycol(EG). I-2. Mass spectrum for glycolic acid(GA).



II-1. Mass spectrum for EG-di(TMS).

II-2. Mass spectrum for GA-di(TMS).



II-3. Mass spectrum for EG-d4-di(TMS).

Fig. 2. (I) GC/MS chromatogram for ethylene glycol (EG) and glycolic acid (GA), (II) GC/MS chromatogram for EG-di(TMS) and GA-di (TMS).

3.2. 분석조건외 확립

복잡한 기질의 생체시료에서 분석대상물질의 정량을 위하여, 내부표준물질로 에틸렌글리콜과 화학적 성질이 유사한 중수소로 치환된 에틸렌글리콜을 사용함으로써 내부표준물질과 분석대상물질이 동일한 환경에서 전처리할 수 있었으며, 분석대상물질인 에틸렌글리콜과 글리콜산의 경우 히드록시기 및 카르복시기에 의한 영향으로 GC/MS에 의한 분석시 크로마토그래피 분석특성이 동일농도에 대하여 대상물질을 화학적으로 전환한 경우보다 양호하지 못하였다(Fig. 2, (I)). 따라서 히드록시기를 BSTFA를 이용하여 TMS화시킨 다음(Fig. 3) 분석한 결과 크로마토그래피에서의 분석특성이 개선된 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 2, (II)) 특히 Table 1의 분석조건에서 얻은 GC/MS 크로마토그램에서 TMS화된 내부표준물질과 에틸렌글리콜은 이들의 증기압과 컬럼내부 충전물에 대한 용해도 등의 물리적 특성 차이로 머무름 시간이 7.80 분 및 7.83 분으로 약간의 차이가 확인되었다(Fig. 4).

TMS화된 내부표준물질의 질량스펙트럼에서 특성이온의 m/z인 195(Fig. 2. II-3)는 분석대상물질 중 하나인 TMS화된 에틸렌글리콜의 특성이온의 m/z인 191(Fig. 2. II-1)과 질량수 4의 차이가 있는 것으로 보아

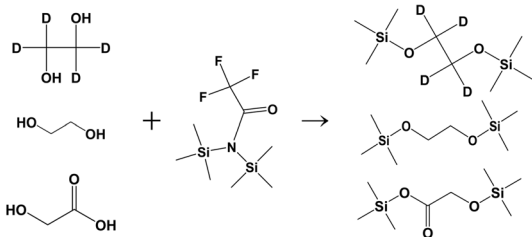


Fig. 3. Reaction of IS, EG and GA with BSTFA.

이는 4개의 중수소 때문인 것으로 사료되었다. 주어진 GC 분석 조건의 기체크로마토그램에서 유도체화 시약의 영향을 배제하기 위하여 solvent dealy를 5.8 분으로 설정하였으며 TMS화된 글리콜산은 9.53 분에서 확인되었고 이의 특성이온은 m/z인 205(Fig. 2. II-2)인 이온으로 이를 이용하여 정량에 사용하였다.

3.3. 검량선 작성

생체시료 중 에틸렌글리콜이 검출되지 않은 0.2 mL의 공시료 혈액에 대하여 에틸렌글리콜 100 µg/mL ~3,000 µg/mL 및 글리콜산 10 µg/mL~300 µg/mL 농

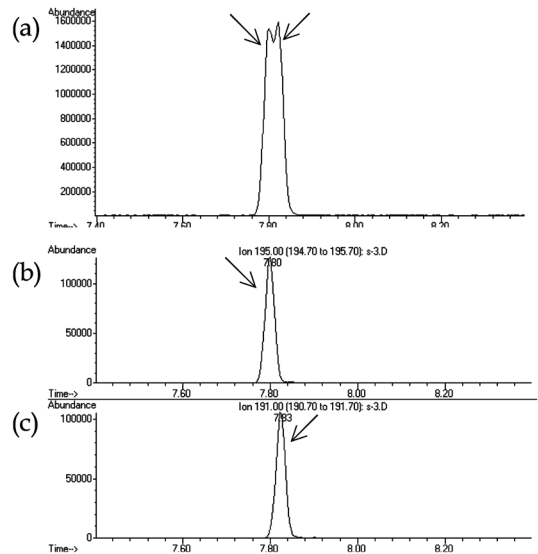


Fig. 4. (a) Retention time for EG-d₄-di(TMS) and EG-di(TMS). (b) Retention time for the ion of m/z=195 in EG-d₄-di(TMS). (c) Retention time for the ion of m/z=191 in EG-di(TMS).

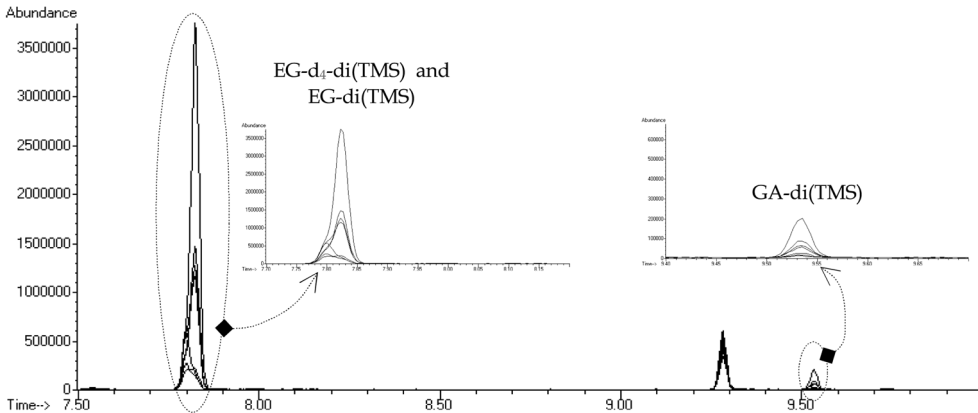


Fig. 5. GC/MS chromatogram for the spiked blood standard.

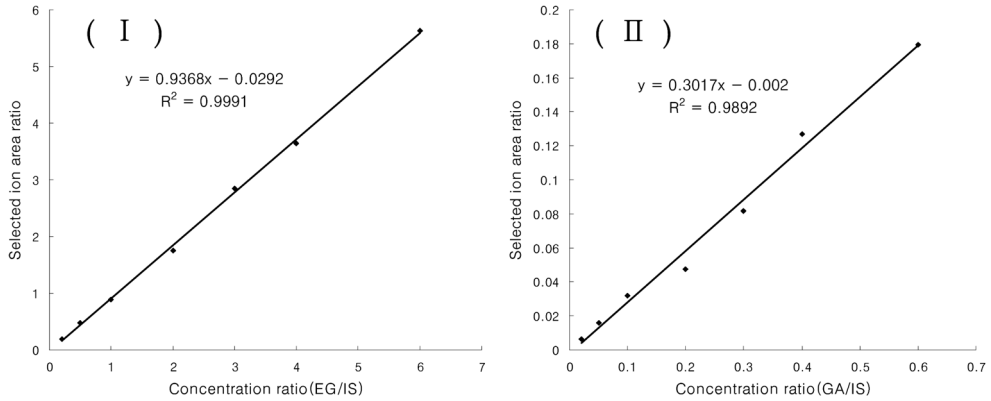


Fig. 6. Calibration curves for trimethylsilylated EG(I) and GA(II) against trimethylsilylated IS.

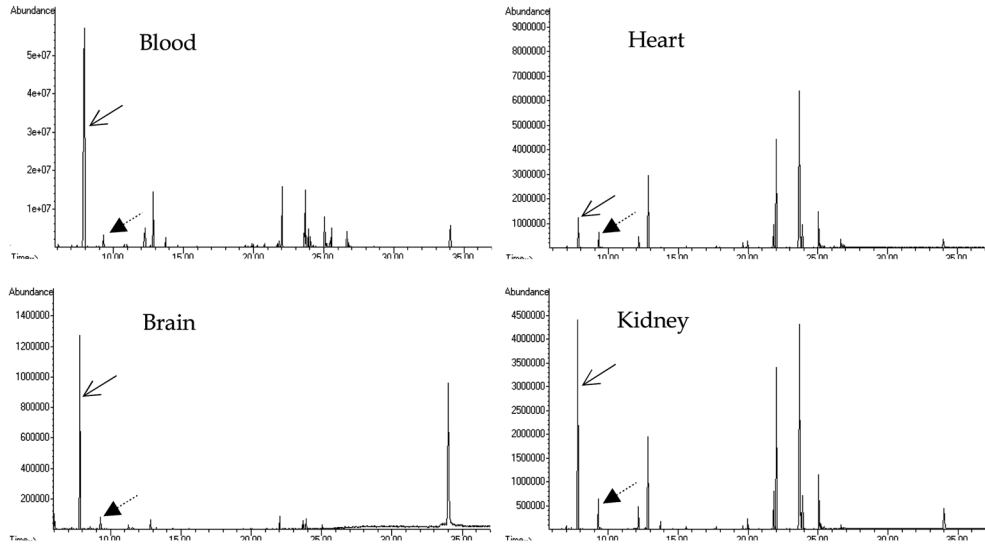


Fig. 7. GC/MS Chromatogram of the specimens. (↙ : EG-d₄-di(TMS), ▲ : GA-di(TMS)).

도범위에서 각 혈액 시료에 내부표준물질을 100 µg 첨가한 GC/MS 분석결과는 Fig. 5와 같으며 TMS화된 특성이온인 m/z 195에 대한 TMS화된 에틸렌글리콜과 글리콜산의 특성이온인 m/z 191과 205의 면적비로 검량선을 작성한 결과 각각에 대하여 r² 값은 각각 0.9991 및 0.9892의 직선성을 얻었다(Fig. 6).

3.4. 열매체유 및 생체시료 중 함량

열매체유에서 39%의 에틸렌글리콜이 확인되었고, 변사자의 혈액, 심장, 신장, 뇌 조직에서의 GC/MS 분석결과는 Fig. 7과 같으며 Table 2와 같이 에틸렌글리콜과 글리콜산이 확인되었으며 이 중 혈액에서 각각 2,755 µg/mL 및 174 µg/mL이 검출되었고 특히 신장 조직에서 글리콜산의 대사체인 옥살산염으로 추정되

Table 2. Contents of ethylene glycol and glycolic acid in specimens [µg/mL, µg/g]

| Specimens | Compound | |
|-----------|-----------------|---------------|
| | Ethylene glycol | Glycolic acid |
| Blood | 2,755 | 174 |
| Heart | 1,290 | 124 |
| Kidney | 1,190 | 93 |
| Brain | 860 | 134 |

는 결정의 영상이 확인되었다(Fig. 8).

4. 결 론

에틸렌글리콜이 함유(39%)된 열매체유를 응용하여

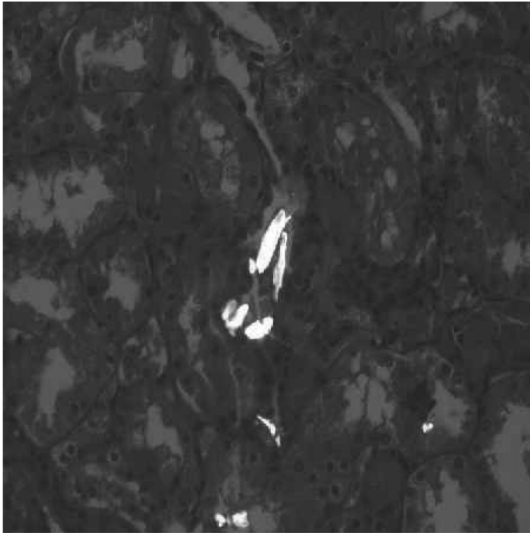


Fig. 8. Crystal found in kidney.

사망한 생체시료에서 에틸렌글리콜 및 그 주요 대사체인 글리콜산의 GC/MS에 의한 동시분석을 위하여, 중수소로 치환된 에틸렌글리콜(EG-d₄)을 내부표준물질로 산성조건에서 아세토니트릴로 추출하고 BSTFA로 유도체화한 다음, 표준시료 중 내부표준물질의 TMS화된 특성이온인 m/z 195에 대한 TMS화된 에틸렌글리콜과 글리콜산의 특성이온인 m/z 191과 205의 면적비로 검량선을 작성한 결과 각각에 대하여 r² 값은 각각 0.9991 및 0.9892의 양호한 직선성을 얻었다.

에틸렌글리콜은 혈액에서 약 2.75 mg/mL, 심장에서 1.29 mg/g, 신장과 뇌에서 각각 1.19 mg/g 및 0.86 mg/g 검출되었으며, 글리콜산은 혈액에서 약 0.174 mg/mL, 심장에서 0.124 mg/kg, 신장과 뇌에서 각각 0.093 mg/kg 및 0.134 mg/kg 확인되었다.

에틸렌글리콜 중독에 의하여 사망한 9 사례에서 음

용후 6~48 시간 경과후 에틸렌글리콜의 혈액에서의 함량이 0.3 mg/mL~4.3 mg/mL 분포하였고 평균 2.4 mg/mL 검출된 것으로 보고되어 있다.⁹ 본 사례에서 혈액 중 에틸렌글리콜의 함량이 2.75 mg/mL으로 문헌에 보고된 에틸렌글리콜 변사의 경우에서 확인되는 범위에 있고 그 대사체인 글리콜산이 확인되며 특히 신장 조직에서 옥살산염으로 추정되는 결정이 확인되는 것으로 보아 변사자는 에틸렌글리콜 음용에 의한 사망인 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. D. Jacobsen, S. Ovrebo, J. Ostborg and O. M. Sejersted, *Acta. Med. Scand.*, **216**, 409-416(1984).
2. P. M. Leth, and M. Gregersen, *Forensic Sci. Int.*, **155**, 179-184(2005).
3. M. Lovric, P. Granic, M. Cubrilo-Turek, Z. Lalic and J. Sertic, *Forensic Sci. Int.*, **170**, 213-215(2007).
4. P. A. Gabow, K. Clay, J. B. Sullivan and R. Lepoff, *Ann. Intern. Med.*, **105**, 16-20(1986).
5. T. R. Wandzilak, L. E. Hagen, H. Hughes, R. A. L. Sutton, L. H. Smith and H. E. Williams, *Kidney Int.*, **39**, 765-770(1991).
6. M. Petraulo, S. Pellegrino, O. Bianco, M. Marangella and F. Linari, *J. Chromatogr.*, **465**, 87-93(1989).
7. H. H. Yao and W. H. Porter, *Clin. Chem.*, **42**, 292-297(1996).
8. W. H. Porter, P. W. Rutter, and H. H. Yao, *J. Anal. Tox.*, **23**, 591-597(1999).
9. R. C. Baselt, 'Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man', 7th ed., 425-427(2004).