

HS-GC 에 의한 생체 시료내 톨루엔 분석에 대한 방법의 유효화와 불확도 추정

허상철* · 민지숙 · 박종서 · 임미애 · 박성우

국립과학수사연구소

(2004. 1. 15 접수, 2004. 10. 8 승인)

Method Validation and Uncertainty Estimation for Toluene Measurement in Biological Fluids by HS-GC

Sangcheol Heo*, Ji-sook Min, Jongseo Park, Mi-Ae Lim and Sungwoo Park

National Institute of Scientific Investigation

(Received Jan. 15, 2004, Accepted Oct. 8, 2004)

요 약 : 톨루엔은 환각성 유기용매로서 청소년에 의하여 남용되는 본드류에서 주성분으로 사용되고 있다. 본 연구에서는 Headspace 가스크로마토그래프 방법에 의한 톨루엔 남용자들의 혈액, 소변, 타액에서 톨루엔을 분석하는 방법을 확립하기 위하여 측정 방법의 유효화와 측정에 관련된 불확도를 추정하였다. 혈액, 소변, 타액 시료 중에서 검출한계는 타액에서 0.01 µg/mL로, 정량한계는 혈액에서 0.1 µg/mL로 가장 높았다 (N=5). 각 생체시료에 대한 유효화의 다른 주요 인자들인 직선성 분석농도범위, 정확도, 정밀도, 회수율 등도 측정하였다. 톨루엔 1 µg/mL의 농도에서 혈액, 소변, 타액 시료의 톨루엔 분석방법에 대한 불확도는 각각 0.13, 0.09, 0.17 µg/mL로 추정되었고, 추정된 불확도의 성분들 중에서 낮은 농도에서는 검량선에 대한 불확도가 가장 큰 비중을 차지하고 있었다.

Abstract : Toluene is currently used as a major organic solvent of glues which are abused by the youngster for its hallucinogenic effect. In this study, toluene determination method using headspace gas chromatography (HS-GC) in the biological fluids like blood, urine and saliva of glue sniffers was validated and related uncertainties were estimated. LOD of 0.01 µg/mL in saliva and LOQ of 0.1 µg/mL in blood were the highest among LODs and LOQs in urine, blood and saliva. Other performance characteristics such as linearity, working range, accuracy, precision and recovery were also measured. The uncertainty at toluene concentration of 1 µg/mL was estimated to be 0.13, 0.09 and 0.17 µg/mL for blood, urine and saliva, respectively, and the uncertainty contribution from the least linear regression was dominant at the lower concentration of toluene.

Key words : validation, uncertainty, toluene

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-2600-4942 Fax : +82+(0)2-2600-4939

E-mail : hukcle@nisi.go.kr

1. 서 론

톨루엔은 환각성 유기용매로서 환각을 목적으로 이를 흡입하는 경우에는 법에 의하여 규제를 받게 된다. 톨루엔이 함유되어 있는 제품으로는 본드, 니스, 락카, 신나 등 많은 공업용 제품이 있고, 우리나라에서는 주로 청소년들에 의해 불법적으로 사용되고 있으며, 96년 한 해에는 6천여명이 검거되었던 적도 있었고 현재에도 매년 천오백여명 정도가 이를 남용하여 적발되고 있는 실정이다.¹

톨루엔을 남용한 사람들에게서 톨루엔에 노출됐는지 여부를 확인하는 방법으로는 소변에서 톨루엔의 대사체인 마노신², o-크레졸³, SBAC⁴ 등을 검출하는 방법, 호흡 공기에서 톨루엔을 흡착하여 분석하는 방법⁵ 그리고 생체시료에서 톨루엔을 검출하는 방법 등으로 Purge and trap⁶ 또는 SPME⁷ 방법 등을 사용하여 ppb 수준으로 검출하는 방법들이 있으나, 감도는 그보다 낮지만 톨루엔 남용자들의 경우에는 높은 농도의 톨루엔에 노출된다는 점에서 Headspace Gas Chromatograph (HS-GC)⁸ 방법이 톨루엔 남용자들의 생체시료에 더 안정적이면서 반복적인 측정 작업에 적합하다고 할 수 있다.

톨루엔 분석을 위한 생체시료로 사용될 수 있는 것으로는 혈액, 소변, 타액 등이 있으며, 본 연구에서는 측정 방법의 성능을 명확히 하기 위하여 톨루엔을 검출하는 HS-GC 분석 방법을 유효화하였고, 측정에 대한 신뢰성을 확보하기 위하여 측정에 관련된 불확도를 추정하였다.

2. 실험

2.1. 분석절차

2.1.1. 분석 시료 제조

10 mL 유리 바이알에 완충용액 2 mL 및 시료 1 mL, 내부표준물질 50 μ L을 넣고 테프론으로 입혀진 뚜껑을 닫은 후 알루미늄 seal로 봉한다(완충용액 sodium citrate solution: 4.8 g citric acid(Sigma Chemical Co.), 13.2 g sodium citrate (Sigma Chemical Co.) 및 14.7 g dextrose/L (Junsei Chemical Co.), 내부표준물질 0.05% iso-butanol (Aldrich Chemical Co.)).

2.1.2. 시료의 가열

HP7694 Headspace autosampler 에서 60 $^{\circ}$ C로 20 분간 가열한 후 GC로 바이알의 상층부 기체 1 mL가 주입되게 한다.

2.1.3. GC 분석

주입된 기체를 HP5890 series II GC-FID에서 분석한다. 기기의 분석조건은 다음과 같다.

Capillary column: HP INNOWax (INNO phaseTM bondable PEG, 30 m \times 0.25 mm (ID) \times 0.25 μ m (film thickness)), Detector: FID, Oven temp.: 6 min at 60 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min, 3 min at 140 $^{\circ}$ C, Carrier gas: Helium 1 mL/min, Split ratio 30:1, Injector temp.: 240 $^{\circ}$ C, Detector temp.: 240 $^{\circ}$ C.

2.2. 표준용액의 제조

2.2.1. 표준원액 (Stock standard solution, 500 μ g/mL)의 제조

완충 용액이 2/3정도 채워진 10 mL 용량플라스크에 톨루엔 표준시약 (5000 μ g/mL in methanol, Supelco) 1 mL 전량을 옮긴 후 완충용액으로 표시선까지 채운다.

2.2.2. 표준용액 (Working standard solution, 10 μ g/mL)의 제조

완충 용액이 2/3정도 채워진 50 mL 용량플라스크에 톨루엔 표준원액 (500 μ g/mL) 1 mL를 1 mL용 피펫으로 채취한 후 완충용액으로 표시선까지 채운다.

2.2.3. 톨루엔 검량 표준용액의 제조

0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ g/mL의 농도로 톨루엔 검량 표준용액을 제조하기 위하여 10 mL 바이알에 완충용액 1 mL, 생체시료 1 mL을 넣은 다음 톨루엔 10 μ g/mL 표준용액을 마이크로피펫으로 10 μ L, 30 μ L, 100 μ L, 300 μ L, 1000 μ L를 각각 첨가한 후 완충 용액을 990 μ L, 970 μ L, 900 μ L, 700 μ L, 0 μ L로 용액의 함이 1 mL가 되도록 추가하고, 내부표준물질 50 μ L를 첨가한 후 바이알을 밀봉한 다음 분석을 수행하여 검량선을 작성한다.

2.3. 생체시료

본 연구에서 매트릭스로 사용된 생체시료는 혈액, 소변, 타액이며 혈액은 톨루엔 흡입과 관련이 없는 사망한 사람에게서 채취하였고, 소변은 건강한 성인 남자로부터

부터, 타액은 성인 남녀 약 40여명으로부터 약 2주간 모았다. 모아진 혈액, 소변 타액은 각각 약 200 mL 정도였으며 이들 시료들에서 톨루엔이 검출되지 않음을 확인하였다.

3. 결 과

3.1. 방법의 유효화

생체시료에서 톨루엔을 분석하기 위한 방법을 확립하기 위하여 EURACHEM 가이드⁹에서 권고한 유효화 인자들을 확인하였다. 톨루엔 분석법에 대한 분석적 성능을 살펴보기 위한 중요한 유효화 인자로는 분석하려는 화합물의 동일성, 선택성, 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ), 분석 가능한 농도범위, 직선성, 정확도, 정밀도, 회수율 등이 있으며, 이들 핵심적인 분석 인자들을 확인하여 실제 분석시 사용될 수 있는 비슷한 방법들을 또는 개선된 방법을 기존의 방법과 비교하여 성능을 평가 할 수 있게 된다.

3.1.1. 동일성 및 선택성의 확인

톨루엔 표준품을 분석하여 GC 크로마토그램 상에서 톨루엔 피크에 대한 동일성을 확인하였다. 일반적으로 본드류에는 유기용매로 톨루엔이 주성분으로 사용되며 이를 흡입한 사람들의 생체시료에서 검출되는 성분은 주로 톨루엔이다. 본드류 흡입자들의 혈액이나 소변 또는 타액에서의 크로마토그램은 서로 큰 차이가 없고 주로 톨루엔이 약 4분, 내부표준물질인 iso-butanol은 약 5분 정도에서 나타나며 종종 에틸알콜 약 2.7분, 부탄가스 약 1.7분과 함께 나타나기도 한다. Fig. 1은 소변 공시료와 톨루엔 1 µg/mL로 강화된 소변 시료를 분석한 크로마토그램으로 톨루엔, 내부표준물질 그리고 톨루엔 표준품에 들어있는 메탄올이 나타나고 있다. 그러나, 간혹 복잡한 휘발성 성분이 함유된 물질을 흡입한 경우에는 생체시료에서도 그 성분들이 함께 나타나며 GC/MS로 확인하는 절차를 수행하여야 한다.

3.1.2. LOD(Limit of Detection) 및 LOQ (Limit of Quantification)

톨루엔 표준용액 5000 µg/mL를 완충용액으로 희석한 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µg/mL의 톨루엔 표준용액과 공시료를 각각 5개씩 제조하여 분석하였다. LOD는 신뢰될 수 있으면서 검출될 수 있는 가장 낮은 농도로 정의되며 공시료 피크

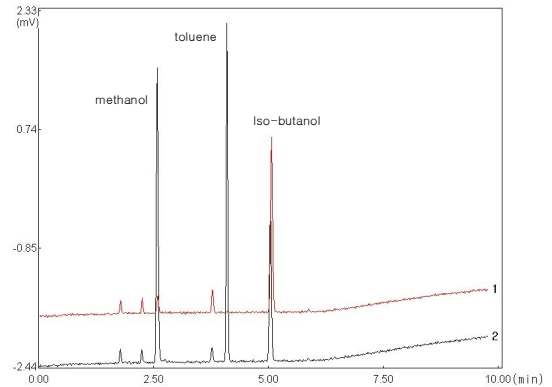


Fig. 1. Chromatograms for 1) blank and 2) fortified urine sample at 1 µg/mL of toluene.

면적의 평균과 표준편차의 3배를 합한 것보다 큰 최소 농도를 LOD로 정한다.⁹ LOQ는 반복적 정밀도와 정확도의 허용되는 정도를 결정할 수 있는 가장 낮은 농도로 정의되며 공시료 피크 면적의 평균과 표준편차의 10배를 합한 것보다 큰 최소 농도를 LOQ로 정한다.⁹

$$\text{LOD} = A_0 + 3\text{SD} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = A_0 + 10\text{SD} \quad (2)$$

여기서, A_0 는 공시료의 크로마토그램에서 피크면적의 평균이고, SD는 그 면적의 표준편차이다.

Fig. 2는 혈액, 소변 타액에서 각 농도에 대한 톨루엔을 분석하여 측정된 LOQ와 LOD를 나타내었다. LOD는 혈액, 타액, 소변 순으로 낮은 농도를 보여 주었고, LOQ는 혈액, 소변 타액 순으로 낮은 농도를 나타내었다. 생체시료에서 톨루엔 분석 방법에 대한 LOD, LOQ 값을 Table 1에 나타내었다.

3.1.3. 분석농도범위 및 직선성

각 생체시료에서 LOQ부터 100 µg/mL까지의 농도에 대한 톨루엔 피크 면적을 x의 누승 회귀식으로 나타내면 결정계수 (R^2)는 0.99 이상이고 지수는 대략 1이었다. 회귀식에서 지수가 1과 가까우면 직선식으로 나타내진다. 분석 가능한 농도 범위의 최소 농도는 정량한계 (LOQ)에서부터이고 최대 농도는 직선범위를 갖는 곳까지이다. 이 방법에서 실험한 톨루엔의 최대 농도는 100 µg/mL였고 그 농도까지는 직선성을 보여주고 있으므로 LOQ부터 100 µg/mL까지는 이 방법으로 정량 가능 하다.

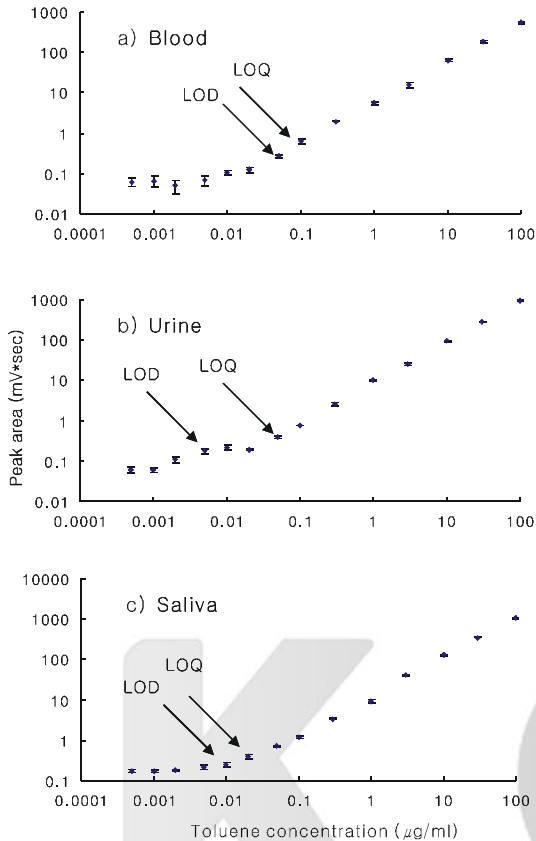


Fig. 2. LODs and LOQs for toluene determination in a) blood, b) urine and c) saliva samples by HS-GC method(n=5).

Table 1. LOD, LOQ, working range and linearity

	Blood	Urine	Saliva
LOD (µg/mL)	0.05	0.005	0.01
LOQ (µg/mL)	0.1	0.05	0.02
Working range (µg/mL)	0.1 ~ 100	0.05 ~ 100	0.02 ~ 100
Regression equation	$6.198x^{0.967}$	$8.794x^{1.024}$	$12.414x^{0.967}$
R ²	0.9984	0.9993	0.9952

톨루엔 분석에 대한 분석농도범위와 직선성은 Table 1에 나타내었다.

3.1.4. 정확도, 정밀도 및 회수율

정확도 (Accuracy)는 참값에 가까운 정도를 나타내며 기준물질과 측정값의 편차 (bias)로 표현된다.⁹ 정밀도

(Precision)는 측정값 사이의 근접도를 나타내며 측정값에 대한 RSD로 표현한다.⁹ 이 실험에서는 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL의 톨루엔 표준시료를 각각 10개씩 제조하여 5개는 제조한 그 날에 분석하였고 (intra-day precision) 5개는 4 °C로 보관하다가 2일이 지난 후에 분석하였다 (inter-day precision).

$$\text{정확도 (Bias\%)} = \frac{(\text{측정치}의\ \text{평균}\ \text{농도} - \text{표준용액의}\ \text{농도})}{\text{표준용액의}\ \text{농도}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{정밀도 (Precision, RSD\%)} = \frac{(\text{측정치}의\ \text{표준편차} / \text{측정치}의\ \text{평균농도}) \times 100}{\text{정치의}\ \text{평균농도}} \times 100 \quad (4)$$

회수율은 강화된 시료에서 분석물질의 비율을 퍼센트 회수율 (%R)로 나타냈다⁹

$$\%R = \frac{(\text{CF}-\text{CU})/\text{CA}}{\text{CA}} \times 100 \quad (5)$$

여기서, CF는 톨루엔이 첨가된 시료에서 측정된 농도, CU는 공 시료의 농도, CA는 시료가 제조된 농도이다. Table 2에 혈액, 소변, 타액에서 측정된 정밀도, 정확도 및 회수율을 표시하였다.

3.2. 측정 불확도의 추정

톨루엔 분석에 대한 측정 불확도는 전체적인 실험과정에 대한 측정 방법의 성능을 보장하기 위하여 측정 결과에 영향을 미칠 수 있는 모든 인식 가능한 요소들을 기초로 하여 측정값의 가능한 값의 범위를 추정한다. 본 연구에서는 EURACHEM 가이드¹⁰에서 권고한 절차대로 다음의 과정으로 불확도를 추정하였고, 추정된 불확도는 측정 결과의 품질을 나타내 주고 측정 과정의 신뢰도를 부여하게 된다.

3.2.1. 불확도 추정의 절차

1. 측정량을 분명하게 한다.
2. 불확도 요소를 파악한다.
3. 측정에 관련된 개별 불확도 성분을 측정하거나 추정한다.
4. 합성불확도를 계산한다.

3.2.2. 측정량에 대한 계산식

검량표준용액을 5회 분석하여 검량표준용액의 농도는 x축에, 크로마토그램의 피크면적 비율 (검량표준용액

Table 2. Precision, accuracy and recovery in fortified blood, urine and saliva samples (n=5)

	intra-day	measured±SD	RSD(%)	Bias(%)	Recovery(%)
Blood (µg/mL)	0.1	0.233 ± 0.019	8.3	132.5	85.8
	1	1.039 ± 0.061	5.9	3.9	89.3
	10	10.117 ± 0.436	4.3	1.2	99.7
	inter-day after 2 days				
	0.1	0.218 ± 0.004	2.0	117.7	71.0
	1	0.935 ± 0.070	7.4	-6.5	78.8
Urine (µg/mL)	0.1	0.087 ± 0.001	1.7	-12.8	82.5
	1	1.143 ± 0.051	4.5	14.3	113.8
	10	10.034 ± 0.369	3.7	0.3	100.3
	inter-day after 2 days				
	0.1	0.064 ± 0.005	7.5	-35.9	59.4
	1	0.601 ± 0.032	5.3	-35.9	59.6
Saliva (µg/mL)	0.1	0.129 ± 0.005	3.8	29.2	66.7
	1	0.736 ± 0.033	4.5	-26.4	67.4
	10	9.928 ± 0.402	4.0	-0.7	98.7
	inter-day after 2 days				
	0.1	0.132 ± 0.031	23.8	32.0	69.5
	1	0.775 ± 0.054	6.9	-22.5	71.2
	10	7.953 ± 0.289	3.6	-20.5	78.9

/내부표준물질)은 y축에 나타내어 검량선을 작성한 다음 식 (6)에 의하여 기용기의 평균 (B₁)과 y축 절편의 평균 (B₀)을 구한다

$$A_j = B_1 \times C_j + B_0 \tag{6}$$

여기서, C_j는 검량선을 작성하는데 사용한 표준용액의 농도 (µg/mL), 측정값 A_j는 톨루엔 성분에 대한 기기의 반응정도로서 내부표준물질에 대한 톨루엔 피크면적비율이다. 따라서 미지의 농도에 대한 시료를 분석하면 크로마토그램에서 시료 중 내부표준물질에 대한 톨루엔 피크면적비율 (A_{obs})이 얻어지며 톨루엔 함량 (C₀)은 식 (7)에 의하여 계산된다.

$$C_0 = (A_{obs} - B_0)/B_1 \tag{7}$$

3.2.3. 톨루엔 분석시 불확도 요소

미지의 생체시료에서 톨루엔을 분석할 때는 우선 톨

루엔 농도에 대한 검량선을 작성한 다음 측정값을 검량선에서 계산하여 농도를 결정하게 된다. 이때 측정에 관계되는 불확도 요소는 크게 검량선에 대한 불확도와 검량선을 작성하는 데 사용된 톨루엔 표준용액 (Working standard solution)의 불확도, 그리고 측정이 시간을 두고 반복적으로 측정될 때 측정기기의 상태변화에 의해 생기는 불확도 (QC 정밀도가 갖는 불확도)가 관계될 수 있어 크게 3가지로 나눌 수 있다 또한 톨루엔 표준용액을 제조할 때의 불확도는 표준원액 (Standard stock solution)의 불확도와 희석할 때 사용한 기구 (1 mL 피펫, 50 mL 용량플라스크)의 불확도에서 기인한다고 볼 수 있고, 표준원액의 불확도에는 표준원액 제조시 사용한 톨루엔 시약 (5000 µg/mL)의 불확도와 희석할 때 사용한 기구 (10 mL 용량플라스크)에서 기인하게 되며, 희석할 때 사용한 각각의 기구는 제조사의 허용공차, 온도의 변화, 측정의 반복도에서 불확도가 기인한다고 가정하였다. 이렇게 파악된 톨루엔 측정에 대한 불확도 요소들과 전체 불확도와의 관계를 Fig. 3과 같이 Fishbone Diagram으로 표현하였다.

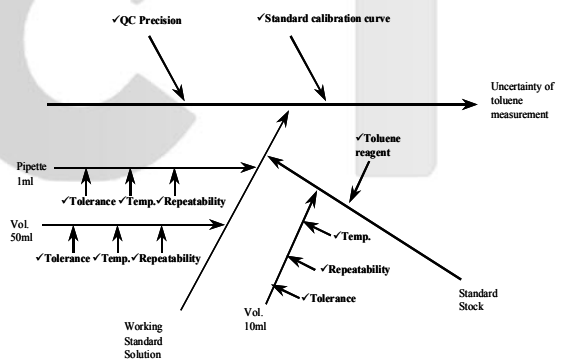


Fig. 3. Uncertainty analysis for toluene measurement by HS-GC.

3.2.4. 개별 요인의 불확도 추정과 불확도 요소들의 합산

측정에 대한 전체불확도를 추정하기 위해서는 불확도 요소들에 대한 개별 불확도들을 실험을 통하여 측정하거나 알려진 정보로부터 추정하여 각 성분의 불확도를 표준불확도 또는 표준편차의 표현으로 정량화하여야 한다.¹⁰ Fig. 3에서 체크표시가 되어 있는 12개의 불확도 요소들은 모두 GUM¹¹에서 표현하고 있는 B타입 불확도들이므로 그 평가방법으로 정량화하고 그 외 나머지

지 불확도 요소들은 개별 불확도 요소들로부터 합성하여 계산 할 수 있다. 개별 불확도 요소들을 합성하여 합성불확도를 계산하는 방법은 각 불확도의 요소가 전체 불확도에 독립적으로 기여한다고 가정하면 다음 2가지 규칙¹⁰을 사용할 수 있게 된다.

규칙 1. 양의 합 또는 차만 포함된 모델 (예, $y=(p+q+r+...)$)에서 합성표준불확도 $u_c(y)$ 는 다음과 같다.

$$u_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (8)$$

규칙 2. 곱하기 또는 나누기만 포함되어 있는 모델 (예, $y=p/(q \times r \dots)$)에서 합성표준불확도는 다음과 같다.

$$u_c(y(p, q, \dots)) = y \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (9)$$

3.2.5. 희석시 사용한 기구의 불확도

희석에 사용한 기구는 10 mL, 50 mL 용량플라스크와 1 mL 피펫이다. 이들 기구들의 불확도 측정은 부피에 영향을 미칠 수 있는 다음 3가지 인자 (허용공차 반복측정, 온도)를 고려하였다

3.2.5.1. 허용공차

제조회사로부터 제공된 10 mL 용량플라스크 (± 0.025 mL, 20 °C), 1mL 피펫 (± 0.006 mL, 20 °C), 50 mL 용량플라스크 (± 0.08 mL, 20 °C)의 허용공차를 가진 제품을 사용하였다. 신뢰구간에 대한 어떤 정보도 없었기 때문에 직사각형 분포¹²로 가정하고 불확도를 계산하였다.

$$u_{\text{Tolerance}} 10 \text{ mL} = 0.025 / \sqrt{3} = 0.014 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Tolerance}} 1 \text{ mL} = 0.006 / \sqrt{3} = 0.003 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Tolerance}} 50 \text{ mL} = 0.08 / \sqrt{3} = 0.05 \text{ mL}$$

3.2.5.2. 실험 온도와 교정 온도와의 차이

제조회사는 위 용량 플라스크를 20 °C의 조건에서 교정하였다. 그러나 실제 실험이 ± 5 °C의 온도범위에서 수행된다면 온도변화가 용액의 부피 팽창에 미치는 영향을 계산하여 주어야 한다. 본 실험에서 표준용액 제조에 사용한 용액은 증류수이므로, 증류수의 부피팽창 계수 ($1.806 \times 10^{-4} \text{ mL} / \text{°C}$)¹³를 다음의 계산식에 적용하였다.

$$\begin{aligned} \text{온도 변화에 대한 부피변화} &= V \times \pm \text{Temp.} \times \text{H}_2\text{O의 팽창계수} \\ &= V \times \pm 5 \text{ °C} \times 1.806 \times 10^{-4} / \text{°C} \end{aligned} \quad (10)$$

$$\text{온도 변화에 대한 부피변화 (10 mL)} = 10 \times \pm 5 \times 1.806 \times 10^{-4} = \pm 0.009030 \text{ mL}$$

$$\text{온도 변화에 대한 부피변화 (1 mL)} = 1 \times \pm 5 \times 1.806 \times 10^{-4} = \pm 0.0009030 \text{ mL}$$

$$\text{온도 변화에 대한 부피변화 (50 mL)} = 50 \times \pm 5 \times 1.806 \times 10^{-4} = \pm 0.04515 \text{ mL}$$

직사각형 분포를 가정하였을 때 온도 변화에 대한 부피측정의 불확도는 다음과 같다.

$$u_{\text{Temp}} 10 \text{ mL} = 0.009030 / \sqrt{3} = 0.005213 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Temp}} 1 \text{ mL} = 0.0009030 / \sqrt{3} = 0.0005213 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Temp}} 50 \text{ mL} = 0.04515 / \sqrt{3} = 0.02607 \text{ mL}$$

3.2.5.3. 반복측정

실험자의 반복측정성이 갖는 불확도를 실험으로 구한다. 용량 플라스크와 피펫의 눈금선까지 증류수를 채운 후 무게를 측정하였다. 본 조작은 10 회 반복하였으며, 이때 표준편차 (SD)는 10 mL 용량플라스크에서 0.0049 mL, 1 mL 피펫에서 0.0255 mL, 50 mL 용량플라스크에서 0.0104 mL 이었다. 그러므로, 각각에 대한 불확도 요소는 다음과 같다.

$$u_{\text{Repeat}} 10 \text{ mL} = 0.0049 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Repeat}} 1 \text{ mL} = 0.0255 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Repeat}} 50 \text{ mL} = 0.0104 \text{ mL}$$

3.2.5.4. 측정 기구들의 불확도의 합성

위 세 개의 불확도 요소에 대한 불확도 값을 각각 제공하여 합한 후 이를 다시 제공근을 취하여 불확도를 합성하면 세 가지 기구를 사용할 때의 합성불확도들을 구할 수 있다.

$$u_{\text{Volumetric, Pipette}} = \sqrt{u_{\text{tolerance}}^2 + u_{\text{temp}}^2 + u_{\text{repeat}}^2} \quad (11)$$

$$u_{\text{Volumetric}} 10 \text{ mL} = \sqrt{0.014^2 + 0.005213^2 + 0.0049^2} = 0.016 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Pipette}} 1 \text{ mL} = \sqrt{0.003^2 + 0.0005213^2 + 0.0255^2} = 0.026 \text{ mL}$$

$$u_{\text{Volumetric}} 50 \text{ mL} = \sqrt{0.05^2 + 0.02607^2 + 0.0104^2} = 0.05 \text{ mL}$$

부피 측정기구들에 대한 개별 불확도 요소들과 그 합성불확도를 요약하면 Table 3과 같다.

3.2.6. 표준시약이 갖는 불확도

Table 3. Uncertainties of glass-ware used

	Uncertainty of tolerance ($u_{Tolerance}$)	Uncertainty of temperature ($u_{Temp.}$)	Uncertainty of repeatability (u_{repeat})	Combined standard uncertainty
Pipette 1 mL	0.003 mL	0.0005213 mL	0.0255 mL	0.026 mL
Volumetric flask, 10 mL	0.014 mL	0.005213 mL	0.0049 mL	0.016 mL
Volumetric flask, 50 mL	0.05 mL	0.02607 mL	0.0104 mL	0.05 mL

검량선을 작성하는데 필요한 표준시약은 Supelco 회사의 톨루엔 5000 $\mu\text{g/mL}$ 제품을 사용하였으며 품질보증서에서 주어진 톨루엔 농도는 5018 $\mu\text{g/mL} \pm 5 \mu\text{g/mL}$ 이었다.

직사각형 분포로 가정할 수 있으므로 표준불확도는 다음과 같다.

$$u_{Reagent} = 5 / \sqrt{3} \approx 3 \mu\text{g/mL}$$

3.2.7. 표준원액 (Standard stock solution)이 갖는 불확도

표준원액이 갖는 불확도는 10 mL 용량플라스크가 갖는 불확도와 톨루엔 표준 시약이 갖는 불확도를 합성하여 구하였다.

3.2.7.1. 표준원액의 합성불확도

톨루엔의 표준원액은 5018 $\mu\text{g/mL}$ 의 표준 시약을 10 배 희석하여 제조되었으므로 표준원액의 농도는 다음의 계산식으로 얻어진다.

$$\text{표준원액의 농도 (Conc.1)} = 5018/10 = 501.8 \mu\text{g/mL}$$

따라서 표준원액의 합성불확도는 다음과 같다.

$$\begin{aligned} u_{Conc.1} &= \text{Conc.1} \sqrt{\left(\frac{u_{Reagent}}{\text{Conc.1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{Volumetric\ flask}}{\text{volume}}\right)^2} \\ (12) \quad &= 501.8 \sqrt{\left(\frac{3}{5018}\right)^2 + \left(\frac{0.016}{10}\right)^2} \\ &= 0.9 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

그러므로, 표준원액의 농도는 $501.8 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ 이 된다.

3.2.8. 표준용액 (Working standard solution)이 갖는 불확도

표준용액이 갖는 불확도는 표준원액이 갖는 불확도

와 1 mL 피펫이 갖는 불확도, 50 mL 용량플라스크가 갖는 불확도를 합성하여 구한다.

3.2.8.1. 표준용액의 합성불확도

톨루엔의 표준용액은 표준원액을 50배 희석하여 제조되었으므로 표준용액의 농도는 다음의 계산식으로 얻어진다.

$$\text{표준용액의 농도 (Conc.2)} = 501.8/50 = 10.04 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned} u_{Std} &= \text{Conc.2} \sqrt{\left(\frac{u_{Conc.1}}{\text{Conc.1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{pipette}}{\text{pipette}}\right)^2 + \left(\frac{u_{volumetric\ flask}}{\text{Volume}}\right)^2} \\ (13) \quad &= 10.04 \sqrt{\left(\frac{0.9}{501.8}\right)^2 + \left(\frac{0.026}{1}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{50}\right)^2} \\ &= 0.26 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

그러므로, 표준용액의 농도는 $10.04 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$ 이 된다.

3.2.9. 검량선이 갖는 불확도

시료중의 톨루엔의 함량 (C_0)은 미리 작성된 검량선에 의하여 계산된다. 검량선 작성에 사용된 톨루엔 표준용액의 농도는 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 검량선은 모두 5회 작성되었으며, Fig. 4에 혈액, 소변, 타액 시료에서의 검량선을 나타내었다.

생체시료중 톨루엔의 함량을 2회 측정하여 피크면적 비율을 구한 후 검량선에 의하여 농도를 구하게 되면 검량선이 갖는 불확도 ($u_{StdCurve}$)는 다음의 계산식으로 계산할 수 있다.¹⁰

$$\begin{aligned} u_{StdCurve} &= \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - c)^2}{S_{xx}}} \\ (14) \quad &= \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{25} + \frac{(C_0 - 2.88)^2}{343.14}} \end{aligned}$$

위의 S (the residual standard deviation) 및 S_{xx} 은 다음
의 식에서 구한다.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (B_0 + B_1 \times C_i)]^2}{n-2}} \quad (15)$$

K C I

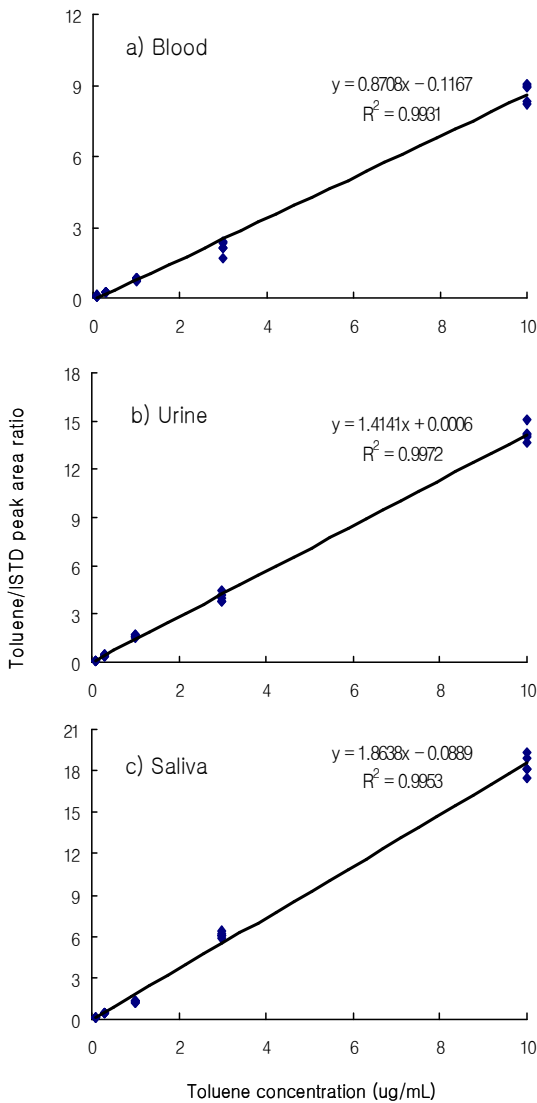


Fig. 4. Calibration curves of toluene concentration in a) blood, b) urine and c) saliva samples ranging from 0.1 to 10.0 µg/mL.

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - c)^2 = 343.14 \quad (16)$$

여기서, B_1 은 검량선 기울기들의 평균, B_0 는 검량선에서 Y절편의 평균값 P 는 C_0 를 측정할 횟수, n 은 검량선 작성할 때 측정할 횟수, C_0 는 생체시료에서 측정된 톨루엔 농도, c 는 검량 표준용액 농도들의 평균값 j 는 검량선을 얻기 위해 측정할 순서를 나타내는 숫자이다.

3.2.10. QC 정밀도가 갖는 불확도

혈액, 소변, 타액에 대하여 톨루엔 농도 10 µg/mL의 농도로 강화한 컨트롤 시료 10개를 제조하여 분석한 다음 평균과 표준편차를 구한다. Table 4에 톨루엔 농도가 10µg/mL인 생체시료에서 분석한 측정값의 평균(QC)과 표준편차(u_{QC})를 나타내었다.

3.2.11. 전체 확장불확도 (Overall expanded uncertainty)

톨루엔 분석에 대한 전체 합성불확도는 표준용액의 불확도, QC 시료에 대한 불확도 및 검량선에 대한 불확도를 합성하여 구할 수 있다. 전체 합성불확도를 합성한 후에 신뢰구간을 95%로 확장하기 위하여 포함인자(k, coverage factor)를 곱해주면 전체 확장불확도를 구할 수 있게 된다. 자유도가 비교적 큰 곳에서 95% 신뢰구간에 대한 k는 보통 2로 사용할 수 있다¹⁰ 앞에서 구한 각 불확도 인자들을 합성하면 아래와 같이 전체 확장 불확도로 나타낼 수 있다.

$$U_{expanded}(C_0) = k \times C_0 \sqrt{\left(\frac{u_{std}}{std}\right)^2 + \left(\frac{u_{QC}}{QC}\right)^2 + \left(\frac{u_{slope}}{C_0}\right)^2} \quad (17)$$

$$= 2 \times C_0 \sqrt{\left(\frac{0.26}{10.04}\right)^2 + \left(\frac{u_{QC}}{QC}\right)^2 + \left(\frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{25} + \frac{(C_0 - 2.88)^2}{343.14}}\right)^2} \quad (18)$$

측정 시료의 농도값 C_0 , QC 값과 그 불확도, 잔차의 표준편차 S , 검량선 기울기의 평균 값 B_1 을 알면 식 18에서 톨루엔 분석에 대한 전체 확장불확도를 구할 수 있게 된다. 각 생체시료에 대한 전체 확장불확도를 구하는데 필요한 인자들은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Required parameters for obtaining overall expanded uncertainty

	Blood	Urine	Saliva
QC (µg/mL)	10.15	9.96	10.67
u _{QC} (µg/mL)	0.51	0.28	0.84
B_1	0.871	1.414	1.864
S (µg/mL)	0.279	0.289	0.495

미지 시료를 2번 측정하여 농도의 평균이 C_0 이라면 시료중의 톨루엔 농도는 그 분석 방법에 대한 측정 불확도를 포함하여 다음과 같은 측정결과로 표시할 수 있다.¹⁰

$$C_0 \pm U_{\text{expanded}}(C_0) \text{ } \mu\text{g/mL (약 95\% 신뢰구간 } k=2) \text{ (19)}$$

Table 5에는 혈액, 소변, 타액 시료에서 몇 가지 톨루엔 농도를 결정할 때 추정된 불확도를 나타내었다.

Table 5. Estimated uncertainties for toluene determination

Blood	Urine	Saliva
0.1±0.48 $\mu\text{g/mL}$	0.1±0.31 $\mu\text{g/mL}$	0.1±0.40 $\mu\text{g/mL}$
0.5±0.48 $\mu\text{g/mL}$	0.5±0.31 $\mu\text{g/mL}$	0.5±0.40 $\mu\text{g/mL}$
1.0±0.49 $\mu\text{g/mL}$	1.0±0.31 $\mu\text{g/mL}$	1.0±0.43 $\mu\text{g/mL}$
5.0±0.74 $\mu\text{g/mL}$	5.0±0.49 $\mu\text{g/mL}$	5.0±0.92 $\mu\text{g/mL}$
10.0±1.25 $\mu\text{g/mL}$	10.0±0.84 $\mu\text{g/mL}$	10.0±1.71 $\mu\text{g/mL}$

Confidence level is approximately 95% and calibration range for overall expanded uncertainty is between 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$.

4. 토 의

이상으로 HS-GC 방법에 의한 톨루엔 분석법의 성능과 불확도를 확인하였으며 결정된 유효화 인자들로부터 혈액, 소변, 타액 시료들을 구성하는 매트릭스의 영향을 살펴볼 수 있다. 시료를 구성하는 성분들이 복잡할수록 시료 중의 톨루엔 성분이 평형상태에서 Headspace의 기체상과 교환과정에서 더 복잡한 상호작용을 나타낼 것이므로 재현성이 떨어질 것으로 예상되며 보다 단순한 구성성분을 갖는 시료에서 측정에 대한 재현성이 더 높을 것으로 생각된다. 소변, 타액, 혈액의 순서로 시료의 구성 성분이 복잡하며, LOD는 세 시료 중 소변의 경우가 가장 낮은 농도를 나타냈고, LOQ는 혈액에서 가장 높은 농도를 나타냈다. 또한, Table 2에서는 혈액, 타액, 소변 시료에서 정밀도 (RSD)가 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 8.3%, 3.8%, 1.7%, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 5.9%, 4.5%, 4.5%, 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 4.3%, 4.0%, 3.7%로 혈액, 타액, 소변 시료 순으로 정밀도가 더 좋은 것으로 나타났다. 이런 매트릭스의 영향은 각 농도에서 추정된 불확도에서도 나타나고 있었다. Table 5에서 추정된 불확도는 낮은 농도 (0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$) 구간에서 소변, 타액, 혈액 순서로 더 크게 나타났으며, 높은 농도 (1.0~10.0 $\mu\text{g/mL}$) 구간에서 소변, 혈액, 타액 순서로 불확도가 더 크게 나타났다. 전체적으로 소변 시료에서는 다른 두 시료에 비해서 보다 단순한 매트릭스의 경향이 뚜렷하였고 혈액과 타액 시료에서는 혈액

이 타액보다 매트릭스의 영향이 큰 것으로 보이지만 그 차이는 그리 크지 않은 것으로 생각된다.

정확도와 회수율에서는 높은 농도 (10 $\mu\text{g/mL}$)의 혈액, 소변, 타액 시료에서 각각 정확도 (Bias)가 1.2%, 0.3%, -0.7%로, 회수율이 99.7%, 100.3%, 98.7%로 낮은 농도의 시료들보다 정확도와 회수율이 모두 좋은 결과를 나타내었다. 높은 농도에서는 톨루엔이 휘발되는 성질이 중요하게 되므로 시료의 매트릭스 영향은 상대적으로 줄어들어 시료간 큰 차이가 없었다. 또한, 그 농도에서 추정된 불확도도 10% 정도로 매트릭스의 영향보다는 시료의 농도에 보다 크게 의존되는 것으로 확인된다. 반면에, 낮은 농도에서는 상대적으로 불확도가 차지하는 비중이 크므로 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 톨루엔 농도에서 결정된 정확도 및 회수율에서 시료들의 차이에 대한 경향을 살펴보기에는 어려움이 있다.

톨루엔 시료를 제조한지 2일 지난 후 분석했을 때 톨루엔 농도는 제조 당일 분석했을 때에 비해 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 톨루엔 농도에 대하여 혈액에서 각각 6.4%, 10.1%, 26.2%가, 소변에서 각각 26.5%, 47.4%, 35.8%가 감소하였으나, 타액에서는 톨루엔 농도 0.1, 1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 2.2%, 5.2%로 증가하였고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 19.9%가 감소하였다. 전체적으로 시간이 지나서 측정될 때 시료의 농도가 감소하는 것으로 나타났지만, 예외적으로 타액 0.1, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 측정된 농도가 증가하였다. 그러나, 당일 타액시료를 측정할 농도와 2일 후에 측정할 농도와의 차이가 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.003 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.039 $\mu\text{g/mL}$ 로 타액 시료의 농도에 비해서 적은 양이고, 해당 농도에서 추정된 불확도가 각각 0.40 $\mu\text{g/mL}$, 0.43 $\mu\text{g/mL}$ 인 것에 비추어 볼 때 측정 결과가 증가하였다고 말하기는 어렵다.

Table 6. The contribution of relative standard uncertainty to overall combined uncertainty

Concentration (C ₀)	Relative standard uncertainty	Blood	Urine	Saliva
0.1 µg/mL	u _{std} /std	0.0%	0.0%	0.0%
	u _{QC} /QC	0.0%	0.0%	0.2%
	u _{stdcurve} /C ₀	99.9%	99.9%	99.8%
1 µg/mL	u _{std} /std	1.1%	2.7%	1.4%
	u _{QC} /QC	4.3%	3.3%	13.6%
	u _{stdcurve} /C ₀	94.6%	94.0%	85.0%
10 µg/mL	u _{std} /std	16.8%	37.6%	9.0%
	u _{QC} /QC	65.2%	46.1%	84.4%
	u _{stdcurve} /C ₀	18.0%	16.3%	6.6%

K C I

전체 합성불확도에 대한 각각의 불확도 요소들의 상대적인 기여도를 계산해 보면 Table 6과 같다. 톨루엔 0.1 µg/mL의 농도에서 검량선에 대한 불확도 (u_{curve})의 기여도가 혈액, 소변, 타액에서 99.8% 이상이었고, 톨루엔 1 µg/mL의 농도에서는 각각 94.6%, 94.0%, 85.0%에 해당하여, 측정에 대한 불확도의 요소들 중에서 표준용액 (u_{std})이나 기기변동 (u_{QC})에 대한 불확도보다는 검량에 대한 불확도가 거의 대부분을 차지하고 있는 것으로 나타났다. 반면에, 톨루엔 10 µg/mL의 농도에서의 기여도는 검량선에 대한 불확도는 18.0% 이하로 많이 낮아지고, 기기변동에 대한 불확도는 46.1% 이상으로 상대적으로 높은 비중을 차지하였다.

일반적으로 넓은 구간의 검량구간에 대한 직선의 회귀식에 의해 농도를 계산하면 낮은 농도보다는 높은 농도에서 정확도가 더 높게 나타난다. 이는 회귀식에서 높은 농도의 잔차가 전체 잔차에서 큰 비중을 차지하고 있기 때문에 낮은 농도의 잔차보다는 높은 농도의 잔차를 보다 효율적으로 줄여서 전체 잔차를 최소화하기 때문이다. 그러므로, 회귀식에 의해 추정된 불확도는 낮은 농도에서 그 만큼 더 큰 비율로 불확도가 포함되게 된다.

0.1 µg/mL ~ 1 µg/mL에서 추정된 전체 불확도는 검량선에 대한 불확도가 거의 전부를 차지하고 있는 것으로 나타나므로 검량 구간을 축소하여 낮은 농도 구간에서 검량선에 대한 불확도를 보정해줄 필요가 있다. 측정값이 0.1 µg/mL ~ 1 µg/mL인 구간에서는 0.1, 0.3, 1 µg/mL의 세 가지 농도로 검량선을 다시 작성한 다음 식20을 이용하여 전체 확장불확도를 계산한다. 계산에 필요한 기울기 (B)와 잔차의 표준편차 (S)는 각각 혈액에서 0.7737, 0.032, 소변에서 1.6728, 0.054, 타액에서 1.2478, 0.038이었다.

$$U_{\text{expanded } C_0} = 2 \times C_0 \sqrt{\left(\frac{0.20}{10.91}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{QC}}}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{S}{B} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{13} + \frac{(C_0 - 0.467)^2}{2.23}}\right)^2} \quad (20)$$

낮은 농도구간에서는 다시 계산한 검량선에서 측정 농도를 구하고 앞의 인자들을 이용하여 식 20으로 그 측정에 대한 전체 확장불확도를 계산한다. 0.1 µg/mL ~ 1 µg/mL의 톨루엔 농도 범위에서 몇 개의 농도에 대한 전체 확장불확도를 계산하여 Table 7에 나타내었다.

낮은 농도구간에서 재계산한 혈액, 소변 및 타액의 전체 합성불확도는 검량선에 대한 불확도의 기여도가

0.1 µg/mL의 농도에서 88.4% 이상이었고, 1 µg/mL이

Table 7. Estimated uncertainties for low level toluene determination

Blood	Urine	Saliva
0.1±0.067 µg/mL	0.1±0.052 µg/mL	0.1±0.051 µg/mL
0.5±0.085 µg/mL	0.5±0.062 µg/mL	0.5±0.095 µg/mL
1.0±0.133 µg/mL	1.0±0.094 µg/mL	1.0±0.173 µg/mL

Confidence level is approximately 95% and calibration range for overall expanded uncertainty is between 0.1 µg/mL and 1.0 µg/mL.

농도에서는 33.4% 이하였다.

낮은 농도 범위에서는 전체 확장불확도에서 검량선의 불확도가 가장 중요한 불확도 요소로 파악되었고, 낮은 농도의 검량선 불확도를 감소시키기 위해서 잔차의 표준편차 S를 줄이는 실험 방법을 고안하여야 한다. 잔차의 표준편차 S의 크기에 영향을 미치는 요소들로는 검량 구간뿐만 아니라 검량 표준시료를 제조하는 과정에서 휘발되는 톨루엔의 손실, 내부표준물질의 적합성, 측정시료를 보관하는 용기, 측정시간 지연에 대한 시료의 안정성 등도 포함된다. 고농도의 경우에는 기기 변동에 의존하는 불확도가 커졌다. 여기에 영향을 주는 요소로는 기기 변동과 함께 시료의 휘발성과 Headspace 공간으로 톨루엔이 분배되는 과정에서 기인하는 것으로 보여진다.

5. 결론

생체시료에서 HS-GC 분석방법으로 톨루엔을 분석할 때 농도가 0.1 µg/mL 이상부터는 정량 가능하였으나 100 µg/mL 이상에서는 확인되지 않았다. 다만, 고농도 시료를 분석한 후에는 다음 시료를 분석하기 전에 톨루엔 성분이 기기에 잔류하고 있는지를 확인하여야 한다. 또한, 생체시료에서 HS-GC에 의해 톨루엔 성분을 측정할 때 검량 구간이 너무 커서 생기는 불확도를 보정해 주기 위해서 낮은 농도구간과 높은 농도구간에서 불확도를 각각 추정하여야만 한다. 이는 시료의 안정성 및 휘발성 등에 기인하는 것으로 휘발성이 강한 톨루엔의 경우 검량 구간을 좁게 하여야 하며 분석하고자 하는

고농도 시료는 검량 구간에 들어 올 수 있도록 희석하여 분석하여야 할 것이다.

K C I

참고 문헌

1. “경찰백서”, 경찰청, (2001).
2. E. De Rosa, G. B. Bartolucci, M. Sigon, R. Callegaro, L. Perbellini and F. Brugnone, *Am. J. Ind. Med.*, **11**, 529-537(1987).
3. L. C. A. Amorim and E. M. Alvarez-Leite, *J. Toxicol. Environ. Health.*, **50**, 401-407(1997).
4. S. Takahashi, T. Uezono, A. Akane, and K. Kimura, *J. Anal. Toxicol.*, **26**(4), May/June, 189-192(2002).
5. S.C. Foo, W.O. Phoon and N.Y. Khoo, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **49**(5), 255-258(1998).
6. D. L. Ashley, M. A. Bonin, B. Hamar and M. A. McGeehin, *Environ. Res.*, **71**(1), 39-45(1995).
7. N. Y. Kim and S. W. Park, *J. Forensic Sci.*, **45**(3), 702-707(2000).
8. S. W. Park, N. Y. Kim, Y. G. Yang, B. Seo, K. J. Paeng, *J. Forensic Sci.*, **43**(4), 888-890(1998).
9. “The Fitness for Purpose of Analytical Methods”, EURACHEM, (1998).
10. “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements”, EURACHEM, 2nd ed., (2000).
11. “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements”, ISO, (1993).
12. 우진춘, “측정 및 분석 결과의 불확도(I) - 국제 규범(GUM)에 맞는 불확도 산출 및 표현”, *Analytical Science & Technology*, **13**(2), 19-26 (2000).
13. “CRC handbook of Chemistry and Physics”, 76th ed., CRC Press (1995).

