발 간 등 록 번 호
11-1790387-000430-01

2015~2020년

흡연폐해실험실 운영 성과보고서

2021. 9.

질병관리청

목차

목차

Ⅰ 흡연폐해실험실 현황

2015~2020년 흡연폐해실험실 운영 성과보고서

질병관리청
건강위해대응과

Ⅰ. 흡연폐해실험실 현황

1 설립근거 및 추진경과

□ **(설립근거)** 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 담배규제기본협약(Framework Convention on Tobacco Control, FCTC) 제9조, 제10조

○ **FCTC 제9조(담배제품 성분에 관한 규제)** 당사국총회는 자격이 있는 국제기구와의 협의하에, 담배제품의 성분과 배출물을 검사 및 측정하며, 이를 규제하기 위한 가이드라인을 제안해야 한다. 각 당사국은 관할 국가 기구로부터 승인을 얻을 경우, 그 시험·측정·규제를 위한 효과적인 입법적·집행적·행정적 또는 기타 조치를 채택·시행한다.

○ **FCTC 제10조(담배제품 공개에 관한 규제)** 각 당사국은 국내법에 따라 담배제품의 제조업자 및 수입업자가 담배제품의 성분 및 배출물에 관한 정보를 정부당국에 공개하도록 명령하는 효과적인 입법적·집행적·행정적 및 기타 조치를 채택·시행해야 한다. 더 나아가, 각 당사국은 담배제품에 포함된 유독 성분과 이로 인해 발생되는 배출물에 관한 정보를 공시하도록 하는 효과적인 조치를 채택·시행해야 한다.

□ **(추진경과)**

○ 보건복지부(건강증진과)에서 담배규제기본협약 준수 위해 질병관리본부로 '국가흡연폐해실험실' 운영 요청('14.9.)

○ '흡연폐해예방TF' 구성·운영('15.1.~'16.12.) 및 '흡연폐해실험실' 개소('15.11.)

○ '흡연폐해예방추진단*' 구성('17.1.)

* 건강영양조사과(조사연구), **호흡기·알레르기질환과**(실험연구)

○ 질병관리청 승격에 따라 '건강위해대응관 건강위해대응과(신설)'로 통합('20.9~)

2 조직 및 임무

□ 조직

○ 질병관리본부 흡연폐해예방TF(~'16.12), 호흡기·알레르기질환과('17.1~'20.9)

○ 질병관리청 건강위해대응관 **건강위해대응과**('20.9~현재)

('21. 9월 현재)

□ 임무

○ **국제공인시험기관(ISO17025) 수준의 담배제품·배출물 성분분석, 임상분야 바이오마커 시험능력 확보**

- WHO 담배실험실네트워크(Tobacco Laboratory Network, TobLabNet) 분석회원 자격 확보 및 글로벌 공동연구 참여

- WHO TobLabNet 표준시험법에 따른 니코틴, 타르 등에 대한 시험절차서 정립, 내·외부 질관리 및 숙련도 시험 참가 등 기술력 향상·유지

< 흡연폐해실험실 ISO 17025시험인정 항목 >

구분	KOLAS* 중분류	규격명
담배성분	기타재료 및 제품 (02.008)	담배 필러 내 니코틴 분석을 위한 표준절차서
담배연기		담배- 자동흡연장치를 사용한 총 입자와 '니코틴을 제외한 건조입자' 분석
		담배- 연기 응축물 내 니코틴 분석- 가스크로마토그래피 방법
		담배- 주류연으로부터의 총 입자 내 물(water) 분석- part1.: 가스크로마토그래피 방법
		ISO와 격렬한 흡연조건에서의 주류연 내 TSNAs 분석을 위한 표준절차서
		담배 주류연 내 카르보닐류 분석
		담배- 담배연기의 증기상 내 일산화탄소 분석- 비분산적외선 방법
생체시료	임상 (02.029)	LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 및 trans-3'-hydroxycotinine 분석
		LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL**, NNN*** 분석

*한국인정기구(Korea Laboratory Accreditation Scheme, KOLAS)
**NNK(담배특이니트로스아민류) 대사체(4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, NNAL)
***담배특이니트로스아민류(3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine, NNN)

○ **국가수준에서의 직·간접흡연노출수준 모니터링 위한 바이오마커** 등 **담배의 인체 위해성 관련 근거**마련 연구

- (**인체 바이오마커**) 코티닌, NNAL 등 측정기술 및 호기 내 미량 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compounds, VOCs) 분석법 마련, 생체시료(혈액, 소변 등) 내 바이오마커 분석법 활용연구
- (**담배제품 및 배출물**) 니코틴, 타르, 물, 담배특이니트로스아민류(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs), 일산화탄소 등에 대한 표준시험법 개선·적용
- (**정책연구용역 협력연구**) 코티닌 분석을 통한 흡연여부 응답 정확성 및 흡연노출여부 검증, 인체 노출성분 분석

3 인력 · 시설 · 장비 및 예산

□ 인력 현황

○ 흡연폐해예방을 위한 조사연구담당(건강위해대응과 내 소속)

소속	직위		역할	
			주요임무	ISO17025
건강위해 대응과	보건연구관		*흡연폐해예방을 위한 조사연구 총괄	품질책임자(정)
	실험 연구 (흡연폐해실험실)	선임공무직 A	*흡연위해성 평가 *인체바이오마커 관련 연구 *(공통)흡연폐해 화학분석실험실 운영	품질책임자(부) 기술책임자(부) (02.008) 실무자(02.029)
		선임공무직 B	*흡연폐해바이오모니터링 *신종담배유래바이오마커 발굴 연구 *(공통)흡연폐해 화학분석실험실 운영	기술책임자(부) (02.029) 실무자(02.008)
		선임공무직 C	*담배제품별 배출물*사용행태 등에 따른 인체유해성 등 건강영향 연구 *흡연폐해세포독성실험실 운영 *(공통)흡연폐해 화학분석실험실 운영	기술책임자(정) (02.029) 실무자(02.008)
		선임공무직 D	*담배유해성분-인체영향관련 연구 *(공통)흡연폐해 화학분석실험실 운영	기술책임자(정) (02.008) 실무자(02.029)
	조사 연구	선임공무직 E	*흡연행태심층조사체계운영 *흡연기인 사회경제적부담 측정 등	-

□ 시설

○ 흡연폐해실험실

- 위치 : 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 187 질병관리청 2동 508호
- 규모 : 1실(7구획), 총 140 ㎡

· 담배연기발생실 : 약 15 ㎡
· 중금속 분석실 : 약 10 ㎡
· 기기분석실1 : 약 10 ㎡
· 기기분석실2 : 약 20 ㎡
· 생체시료 분석실 : 약 30 ㎡
· 시료전처리실 : 약 35 ㎡
· 물품보관실 : 약 20 ㎡

< 흡연폐해 화학분석실험실 배치도 >

□ 장비

○ 자동흡연장치(선형, 회전형, 부류연), GC, GC-MS, IC, LC, LC-MSMS, ICP-MS 등 총 66품목 보유 중*

< 주요장비 현황 >

구분	기기명	모델명 등	제조사	주요 용도
흡연 발생 장치	선형	SM250	Cerulean	담배 주류연(배출물) 포집
	회전형	RM20H	Borgwaldt	담배 주류연 포집
	부류연	LM5S	Borgwaldt	담배 부류연(배출물) 포집
정밀 분석 장비	가스크로마토그래프 (GC)	7890B, GC-FID/TCD	Agilent	Nicotine, Water (tar 포함), Humectants (Glycerol, Propylene glycol) 측정
		5977A, GC-MS	Agilent	Benzene, 1,3-Butadiene 등 VOCs 분석
	이온크로마토그래프(IC)	ICS-5000	Thermo	암모니아, 이온류 등 분석
	액체크로마토그래프(LC)	1260, LC-DAD	Agilent	Formaldehyde 등 aldehydes (카르보닐류 포함) 분석
		6460, LC-MSMS	Agilent	Cotinine, NNAL, TSNAs(NNN, NNK 등) 분석
		QTRAP 4500, LC-MSMS	AB Sciex	특이바이오마커 등 분석
	유도결합플라즈마(ICP)	7900, ICP-MS	Agilent	Cadmium, Nickel, Lead, Mercury 등 중금속류 분석

※ 세부 품목 '붙임 6' 참조

< *용어참고 >

약어	한글	영문
GC	가스크로마토그래프	Gas Chromatograph
GC-MS	크로마토그래프 질량분석기	Gas Chromatograph-Mass Spectrometer
IC	이온크로마토그래프	Ion Chromatograph
LC	액체크로마토그래프	Liquid Chromatograph
LC-MSMS	액체크로마토그래프 텐덤질량분석기	Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer
ICP-MS	유도결합플라즈마 질량분석기	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer

□ 예산

○ 연간 약 28억원 中 시험연구비 등 약 5억원 규모

- 회계명 : 국민건강증진기금
- 예산과목 : 흡연폐해예방을 위한 조사연구(3335-305)
- 세부내역

(단위 : 백만원)

내 역	'20	'21
인건비(실험연구 4명, 행태연구3명)	597	607
일반연구비(정책연구용역포함)	1,606 (실험연구 1,070)	1,736 (실험연구 1,170)
자산취득비	50	50
시험연구비(재료비 등 포함)	370	370
시설장비유지비	40	40
교육훈련 및 여비 등	58	59
총계	2,721	2,862

4 중점연구분야 및 과제현황

1 직·간접흡연노출에 따른 인체 바이오마커 관련 연구

○ 국제공인시험기관(ISO17025)기준 바이오마커 측정 기술* 확보

* 소변 내 ①코티닌, 하이드록시코티닌, ②NNAL, 3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine(NNN)

○ 국가수준의 흡연폐해바이오모니터링 관리

- 국민건강영양조사* 소변시료를 이용한 Cotinine 등 측정 및 질관리

* 국민건강영양조사 제7기('16-'18), 제8기('19-'21))

○ 생체시료*(혈액, 소변 등) 내 중금속류 분석법 확보

* (혈액) ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법('19)
(소변) ICP-MS를 이용한 소변 내 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Tin 및 Lead 시험검사법('20)

○ 호기(exhaled breath)* 내 유해성분 연구 등 VOCs 분석법 확보

* GC-MS를 이용한 호기 내 VOCs(Isoprene 외 12종) 시험검사법('19)

○ 신종담배 관련 바이오마커 연구

* 궐련과의 복합사용에 따른 소변 내 cotinine, NNAL 함량 비교 시범연구('20)

2 담배제품 및 담배 배출물 관련 연구

○ 국제공인시험기관(ISO17025)기준 표준시험법 확보

- 담배 주류연 내 ①Tar, Nicotine, ②일산화탄소, ③담배특이니트로스아민류(TSNAs)* ④알데히드류 3종**

* NNN, NNK, NAT, NAB 등 4종, **Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein

- 담배 필러 내 Nicotine 분석

○ 담배필러·캡슐 및 신종담배 주류연 등 배출물 성분 분석

* 담배연기추출물(CSE)에서의 니코틴 분석
* Tar함량별 주류연 내 성분 분석
* 주류연 휘발성유기화합물(VOCs)분석
* 필러 및 캡슐내 가향성분 스크리닝 정성분석

3 정책연구용역 협력연구

○ 여성 흡연조사 개선방안 연구 (신한대학교 김현숙, '16.10.~'17.7.)

- 설문조사 참여대상자의 소변 내 코티닌 분석을 통한 흡연여부 응답 정확도 검증

○ 흡연이 천식 혹은 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstruction Pulmonary Disease, COPD) 환자의 기도면역계와 마이크로바이옴에 미치는 영향연구 (중앙대학교 정재우, '16.10.~'17.9.)

- 천식 혹은 COPD 환자의 소변 내 코티닌 분석을 통한 흡연노출여부 검증

○ 액상형 전자담배 사용으로 인한 인체유해성 관련 분석('19.10.)

- 액상형 전자담배 사용으로 인한 급성 폐손상 의심사례 발생에 다른 인체노출성분 분석*

* 폐손상 의심사례 성분분석 목록

구분	시료 유형	분석항목	수행 내용
인체노출 성분	혈액	니켈, 카드륨, 수은, 납	혈액 내 중금속류 4종 분석
	소변	코티닌, NNAL, SPMA, MHBMA, 3-HPMA	소변 내 흡연바이오마커 5종 분석

Ⅱ 연구분야

2015~2020년 흡연폐해실험실 운영 성과보고서

질병관리청
건강위해대응과

Ⅱ. 연구분야

1 흡연노출 인체 바이오마커 관련 연구

□ **국제공인시험기관**(ISO17025) 기준의 **바이오마커 측정 기술* 확보**(붙임2 참고)

- (주요내용) 소변 내 흡연 바이오마커 분석방법에 대한 국제공인기관 기준의 내부 자체시험법(in-house method)* 확립

  * 소변 내 ①니코틴 대사체(코티닌, 하이드록시코티닌) 동시분석법 ②담배특이 니트로스아민류 대사체(NNAL, NNN) 동시분석법

- (성과 및 활용) 흡연폐해 바이오모니터링 등을 통한 국가수준 흡연노출수준 파악

□ **국가수준의 흡연폐해바이오모니터링 관리**

- (주요내용) 국민건강영양조사 기반의 흡연폐해 바이오모니터링 실시 및 흡연폐해실험실-정책연구용역기관 비교평가를 통한 질관리
- (성과 및 활용) 국민건강영양조사 결과 공표 등에 신뢰도 확보

□ **시험법 정립 등 관련 내부 연구**(붙임2 참고)

- (주요내용) 담배유형별 호기 내 CO, VOCs 및 혈액·소변 내 중금속류 등 분석
- (성과 및 활용) 흡연폐해실험실 역량강화프로그램으로 활용

□ **신종담배 관련 바이오마커 연구**

- (주요내용) 국제공인기관 기준으로 확립된 내부시험법을 활용하여 담배유형별 흡연자 소변 내 흡연 바이오마커에 대한 노출정도를 확인하는 내부 시범연구* 수행

  * 궐련과의 복합사용에 따른 소변 내 Cotinine, NNAL 함량 비교 시범연구('20)

- (성과 및 활용) 신종담배 흡연에 따른 생체 내 노출정도 평가에 대한 기초자료로 활용

구분	연도	주요내용	활용내용	관련연구
시험법 정립	2016	1) (KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 및 trans-3'-hydroxycotinine 분석 지침서	○ nicotine 노출여부를 확인하기 위한 바이오마커 및 nicotine 대사율(NMR) 을 산출하는데 활용	① (내부) 궐련과의 복합사용에 따른 소변 내 cotinine, NNAL 함량 비교 시범연구('20) ② (정책연구용역) 국가 흡연폐해 바이오모니터링 연구용역수행 및 질관리 참여 ③ (외부연구협력) 외부용역과제 및 의뢰 접수된 소변 내 코티닌 분석
	2017	2) (KDCA-M-06) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석 지침서	○ 체내 반감기가 약 2-3주로 길어 직·간접 흡연 노출 생체지표로 유용하게활용되며, NNAL과 동시분석법에 적용하여 2개 발암물질 노출여부 확인	① (내부) 궐련과의 복합사용에 따른 소변 내 cotinine, NNAL 함량 비교 시범연구('20) - 담배유형별 흡연자 소변 내 NNAL 함량 분석 ② (외부연구협력) 의뢰 접수된 소변 내 NNAL 분석
	2018	3) (KDCA-M-08) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, 3-HPMA, MHBMA 분석 지침서	○ 흡연 또는 환경적 영향에 의해 소변에서 검출되는 바이오마커로 활용되는 휘발성 유기화합물(VOCs)의 대사체 3종을 우선적으로 선정	① (외부연구협력) 의뢰 접수된 소변 내 VOCs 대사체 3종 분석
	2019	4) (KDCA-M-10) ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법	○ 흡연폐해실험실 내 중금속 분석실 마련('17) 및 흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보	① (외부연구협력) 의뢰 접수된 혈액 내 중금속류 4종 분석
	2019 -2020	5) (KDCA-M-11) GC-MS를 이용한 호기 내 VOCs 시험검사법	○ 간접흡연 연구의 일환으로, 흡연자의 흡연 후 호기 내 성분분석을 통한 과학적 근거자료 마련 ○ 신종담배 배출물 성분 스크리닝 기초연구('20) 시험법으로 활용	① (내부) 흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범연구 - 호기 내 유해성분 분석을 중심으로('19-'20)
		6) (KDCA-M-12) ICP-MS를 이용한 소변 내 Alu-minium 외 5종 시험검사법	○ 다양한 흡연유형별 흡연자의 소변 내 중금속 양 측정을 통한 노출정도 파악	① (내부) 흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범연구 - 소변 내 중금속 분석을 중심으로('19-'20)

2 담배제품 및 담배 배출물 관련 연구

□ **국제공인시험기관(ISO17025)** 기준의 **표준시험법 확보***(붙임4 참고)

- (주요내용) WHO TobLabNet Official Method에 따라 국제공인시험기관 기준의 표준시험법 정립
- (성과 및 활용) 흡연폐해실험실 내 니코틴, 타르 등 담배대표 유해물질에 대한 표준시험법 확보

  * ①nicotine, ②tar, ③carbon monoxide, ④담배특이니트로스아민류, ⑤카르보닐류

  ※ WHO TobLabNet Official Method 보유 SOP 10종 중 총 5종 확보('20.12기준)

□ **담배필러·캡슐 및 신종담배 주류연 등 배출물 성분 분석 연구**(붙임3 참고)

- (주요내용) 표준시험법 등을 적용하여, 담배제품 및 주류연·부류연에서의 성분분석 내부연구 실시
- (성과 및 활용) 흡연폐해실험실 내 역량강화 프로그램으로 활용

  * (주류연) Tar 함량에 따른 성분분석, VOCs분석

  * (담배연기추출물(CSE)) 니코틴 분석

  * (필러 및 캡슐) 가향성분 스크리닝 정성분석

구분	연도	주요내용	활용내용	관련연구
시험법 정립	2016	1) (KDCA-M-02) 담배 주류연 내 nicotine, water, tar 시험검사법	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보 및 국외숙련도 시험 참가('16, '20)	(내부) Tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구('17-'18)
	2016	2) (KDCA-M-05) 담배 주류연 내 formaldehyde, acetaldehyde, acrolein 시험검사법	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보 및 국외숙련도 시험 참가('17, '20)	(내부) Tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구('17-'18)
	2016	3) (KDCA-M-03) 담배 filler 내 nicotine 시험검사법	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보	-
	2017	4) (KDCA-M-04) 담배 주류연 내 담배특이니트로사민류 4종 시험검사법	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보 및 국외숙련도 시험 참가('17, '20)	(내부) Tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구('17-'18)
	2018	5) (KDCA-M-07) 담배 연기의 증기상 내 carbon monoxide 시험검사법	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보 및 국외숙련도 시험 참가('20)	-
	2019	6) (KDCA-M-09) 담배 주류연 내 aldehydes 18종 시험검사법	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보 및 신종담배 배출물 내 aldehydes 시험법 개선('20)에 활용	-
	2020	7) (KDCA-M-13) 담배 주류연 내 휘발성 유기화합물 5종 분석	흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보	-

3 정책연구용역 협력연구

□ **담배제품사용에 따른 급성폐손상 등 건강위해**관련 정책연구용역 등 협력연구 수행

연도	주요협력내용	세부과제명
2016 2017	(목적) 설문조사 참여대상자의 흡연여부 응답 정확도 검증(내용) 소변 내 코티닌 분석	(과제명) 여성흡연조사 개선방안 연구 (발주부서) 건강영양조사과 (수행기관) 신한대학교 김현숙 (연구기간) '16.10.~'17.7.
	(목적) 천식 혹은 COPD 환자의 흡연여부 검증 (내용) 소변 내 코티닌 분석	(과제명) 흡연이 천식 혹은 COPD 환자의 기도면역계와 마이크로바이옴에 미치는 영향연구 (발주부서) 호흡기·알레르기질환과 (수행기관) 중앙대학교 정재우 (연구기간) '16.10.~'17.9.
2019	(목적) 액상형전자담배사용으로 인한 급성 폐손상 의심사례 발생에 따른 인체유해성관련 분석 (내용) ①혈액 내 중금속류(니켈, 카드뮴, 수은, 납) 4종 분석 ②소변 내 코티닌, NNAL 등 5종 분석	(의뢰검체) 소변 40 mL, 전혈(whole blood) 3 mL (채취일·접수일) '19.10.3.(목), '19.10.4.(금) (수행부서) 호흡기·알레르기질환과 (수행기간) '19.10.

Ⅲ 주요연구성과

2015~2020년 흡연폐해실험실 운영 성과보고서

질병관리청
건강위해대응과

Ⅲ. 주요연구성과

1 흡연노출 바이오마커 관련 연구

① 생체시료를 이용한 니코틴 대사체 2종 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

흡연으로 인한 유해성분 노출 수준은 담배 유형별 특성, 흡연습성 등에 따라 달라지므로 이를 계량화하기 위해서는 바이오마커 측정이 필요하다. 이에 흡연폐해실험실은 흡연에 따른 생체 내 유해성분 노출수준을 파악하고, 흡연예방 및 금연지원을 위한 과학적 근거를 제공하기 위해 바이오마커 측정역량을 확보하고 우선순위 성분에 대한 시험방법을 확립하고자 하였으며, 담배 내 주성분인 nicotine의 대사물질을 우선순위 성분으로 선정하였다.

Nicotine은 WHO(세계보건기구) 담배실험실 네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시항목(1) 및 美FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있다(2). 체내 nicotine 노출수준에 따른 직·간접 흡연 노출정도를 파악하는데 활용하기 위해 nicotine의 주요 대사산물인 cotinine과 trans-3′-hydroxycotinine(OH-cotinine)을 시험방법 확립 항목으로 선정하였다. Nicotine의 70-80%가 cotinine으로 대사되며(3), 체내 반감기가 짧은 nicotine(약 2시간)에 비해 cotinine은 상대적으로 반감기가 18-20 시간으로 길어 nicotine 노출여부를 확인하기 위한 유용한 생체지표로 활용되고 있다(4). 또한, cotinine으로부터 대사되는 OH- cotinine을 측정함으로써, cotinine과 OH-cotinine의 함량비를 이용하여 nicotine 대사율(NMR)을 산출하는데 활용하기 위해 우선 선정 하였으며 소변 내 cotinine과 OH-cotinine 동시분석법을 ISO 17025 인정시험법으로 마련 후 결과의 유효성 보장을 위해 해당시험법으로 숙련도시험에 참가하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

소변 내 cotinine 및 OH-cotinine 분석에 대한 WHO의 표준시험절차서가 마련되어 있지 않아 美 질병통제예방센터(CDC)의 소변 내 nicotine 대사산물 시험방법 관련 문헌(5)을 참고하였다. 美CDC에서 사용한 분석장비는 AB Sciex API 4000 triple quadrupole mass spectrometer 였으며, 흡연폐해실험에서 보유한 장비는 Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer 임에 따라 성분분석을 위한 질량분석기의 이온화 에너지 및 전압, 액체크로마토그래피의 펌프 내 이동상 흐름조건 등 기기 분석조건을 변경하였다. 이와 같이 흡연폐해실험실 보유 장비・환경에 적합한 시험절차 및 분석방법을 자체적으로 개발하여 내부시험방법(In-house method) 절차서를 확립하였으며, 유효화시험을 통해 확립한 내부시험방법이 cotinine 및 OH-cotinine 정량분석에 타당함을 검증하였다.

2. 시료 전처리

200 μL의 시료(소변)와 내부표준물질 (480 ng/mL) 50 μL, 100 μL water, 0.85 mL의 acetone을 혼합한 후 충분히 섞어준다. 시료 내 존재하는 염, 단백질, 그 외 효소들을 침전시키기 위해 10분 이상 4 ℃에서 보관 후 13,000 r/min으로 30분간 4 ℃에서 원심분리한다. 1.5mL e-tube에 상층액 400 μL을 조심스럽게 옮긴다. 진공원심농축기를 40분 동안 가동하여 acetone을 제거한다.

3. 기기분석방법

LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량분석기, Agilent 6460 triple quadrupole)를 이용하여

cotinine 및 OH-cotinine을 정량 분석하였다. 이 때 사용된 기기 및 분석조건은 표1과 같다. 컬럼은 역상 C18 컬럼(150 mm × 4.6 mm× 5 ㎛)을 사용하였고, 흐름속도는 1 mL/min, 주입량은 5 ㎕, 컬럼오븐 온도는 40 ℃, 자동시료 주입기 온도는 10 ℃로 설정하였다.

이동상[1] 조건(mobile phase condition)에서 이동상 A와 B가 필요하였고, 이동상 A는 6 mM ammonium acetate (pH 10.5)을 사용하였으며, 이동상 B는 100% acetonitrile을 사용하였다. 조제된 이동상은 20분동안 가스제거(degassing) 후 사용하였다. 총 분석시간은 13.5분, 분석 후 안정화 시간은 3분으로 설정하였으며 이동상은 표1과 같은 조건으로 흘려주었다.

표 1. LC/MS/MS 기기조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
- ·컬럼유형 : 150 mm × 4.6 mm× 5 μm, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
- ·흐름속도: 1 mL/min
- ·주입량: 5 μL
- ·컬럼오븐 온도: 40 ℃
- ·자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.01	97	3	1
1.00	97	3	1
9.00	70	30	1
10.50	70	30	1
10.51	0	100	1
13.50	0	100	1

▶ MS 조건

-	cotinine	cotinine-d_3	OH-cotinine	OH-cotinine-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	24	28	24	28
단편화전압 (fragmentor voltage)	115	115	135	115
모이온 (precursor ion)	177.0	180.0	192.9	195.9
조각이온 (product ion)	80.1	80.0	80.1	80.0
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)			
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)			
온도(℃)	300			

1) 액체크로마토그래피에서 시료가 컬럼(column)을 통과하도록 이동시켜주는 물 또는 유기용매

4. 유효화 실험 및 시료분석

확립한 시험 방법이 적합하다는 것을 과학적 기법을 사용하여 이를 객관적으로 입증하기 위해 직선성, 정밀도, 정확도, 검출한계, 정량한계, 반복성, 캐리오버(carryover), 매질효과, 회수율 등을 산출하여 "시험방법 유효화확인(Method Validation)"을 수행하였다(6-7).

가. 직선성(Linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분하여 면적(area)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

나. 정밀도(Precision)

정밀도는 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 기기상의 조작을 반복・측정하여 평가하였다. 규정 범위를 포함하는 농도에 대하여 일내[2](intraday)에서 7회, 일간[3](interday)에서 4일에 걸쳐 3회 반복 측정에 대한 분석 값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합 여부는 15 % 이내 기준으로 판단하였다.

다. 정확도(Accuracy)

정확도는 설정된 조건하에서 실측된 값이 이론값, 즉 이미 알고 있는 참값에 근접한 정도를 말하며, 본 실험결과의 정확성은 시료 검출수준을 고려한 세 농도의 표준물질을 소변시료에 첨가하여 조제한 후 실측 값이 첨가한 이론값에 얼마나

2) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행
3) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

일치하는지 백분율(%)로 산출하였으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 80~120 % 이내 기준으로 판단하였다.

라. 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하며, 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법정량한계는 방법검출한계의 약 3배 정도이다. 공시료(Blank) 내 표준물질 0에 가까운 4개의 농도를 각각 첨가하여 조제한다. 각 농도별로 7번 반복실험 후 평균값과 표준편차 값을 산출한다. X축을 평균값, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성한다. 이때, 산출된 y절편 값의 3배를 방법검출한계값으로 정하며, 방법정량한계 값은 검출한계 값의 3배로 산출하였다.

마. 반복성(Repeatability)

동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 7개 검체를 짧은 시간차로 반복분석 실험하여 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15 % 이내 기준으로 판단하였다.

바. 캐리오버(Carryover)

시료의 연속 측정 시, 직전에 주입된 시료로부터 분석기기 내에 잔류된 분석물질 또는 내부표준물질이 다음 시료 주입 시에 나타내는 반응을 말한다. 캐리오버 시험에서는 고농도 표준시료 주입 직후에 공시료(Blank)를 주입하여 표준시료의 분석물질이 검출되는지 확인하였다.

사. 매질효과(Matrix effect) · 회수율(Recovery)

생체시료 성분이 분석물질 반응에 영향을 미침으로써 정량의 정확성, 정밀성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세 종류의 조제된 시료를 분석하여 매질효과와 회수율을 산출하였으며, 영향을 미치는 정도에 따라 결과 값 보정 필요 여부에 대해 판단하고자 하였다.

▶ **조제시료**

· A = 이동상에 표준물질을 첨가한 시료
· B = 추출된 소변시료에 표준물질을 첨가한 시료
· C = 추출되기 전 소변시료에 표준물질을 첨가한 시료

▶ **결과산출**

· 매질효과(matrix effect) = B/A x 100 %
· 회수율(recovery) = C/B x 100 %

5. 내부 시험방법 절차서 작성

흡연폐해실험실 시험업무 수행 시 소변 내 cotinine 및 OH-cotinine 정량시험 방법에 대한 규정을 목적으로 시약, 장비, 표준물질 조제, 시료전처리, 분석조건 등에 대한 내부 시험방법 절차서를 마련하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

해당시험법에서 그림 1과 같이 Cotinine과 OH-cotinine이 분리된 크로마토그램(chromatogram)을 얻을 수 있었다.

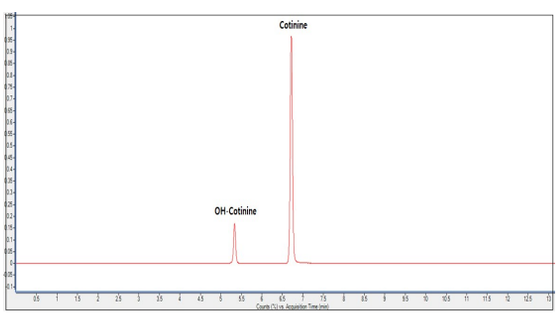
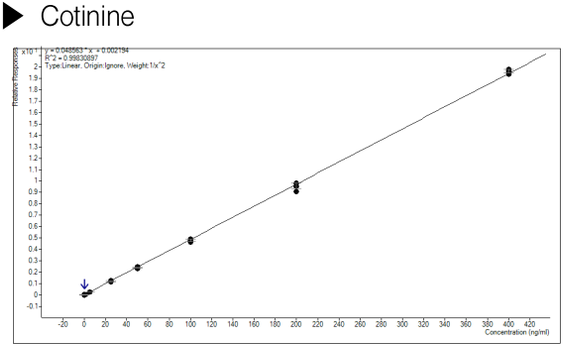


그림 1. Cotinine 및 OH-cotinine의 Chromatography

가. 직선성

Cotinine과 OH-cotinine R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 2).

▶ Cotinine



▶ OH-cotinine

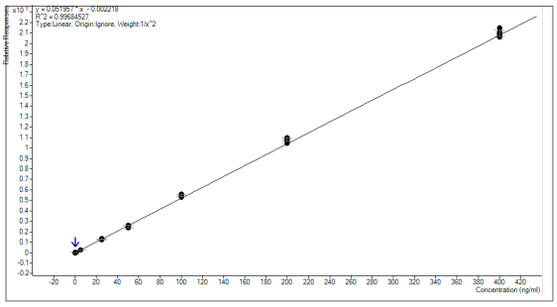


그림 2. Cotinine, OH-cotinine 검정곡선

나. 정밀도

한 개의 소변시료 내 Cotinine, OH-cotinine을 7회 반복 측정하여 일내 정밀성을 확인하였고 Cotinine과 OH-cotinine 상대표준편차(RSD)는 각 1.51 %, 0.36 % 이었다(표 2). 검정곡선 세 농도(0.5, 1, 5 ng/mL) 지점에 대하여 4일에 걸쳐 7회씩 반복 측정하여 일간 정밀성을 확인하였으며, Cotinine과 OH- cotinine 상대표준편차(RSD)는 각 0.43~2.76 %, 0.83~5.75 % 이었다(표3).

표 2. Cotinine, OH-Cotinine 정밀도(일내)

(단위: ng/mL)

Analyte (n=7)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	RSD (%)
Cotinine	142.18	2.15	1.51
OH-cotinine	289.84	1.04	0.36

표 3. Cotinine, OH-Cotinine 정밀도(일간)

(단위: ng/mL)

Cotinine (n=7)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
0.5	0.90	0.85	0.91	0.88	2.76
1	1.40	1.38	1.42	1.39	1.13
5	5.46	5.43	5.40	5.44	0.43

OH-cotinine (n=7)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
0.5	0.86	0.94	0.98	0.97	5.75
1	1.36	1.41	1.45	1.50	4.12
5	5.37	5.47	5.45	5.40	0.83

다. 정확도

소변시료 내 표준물질 세 농도(0.5, 1, 5 ng/mL)를 첨가하여 조제한 후 각 농도별로 7회 반복 측정하여 아래와 같이 정확도를 산출하였으며, Cotinine과 OH-cotinine 정확도는 각 농도에서 102.47~113.15 %, 101.67~114.34 % 으로 확인되었다(표4).

▶ 정확도(Accuracy)

· {(첨가시료 내 검출농도 - 첨가되지 않은 시료 내 검출농도) / 첨가한 표준물질 농도} x 100 %

표 4. Cotinine, OH-Cotinine 정확도

(단위: ng/mL)

Cotinine (n=7)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
0.5	0.00	0.566	113.15
1	0.00	1.071	107.13
5	0.00	5.124	102.47

OH-Cotinine (n=7)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
0.5	0.00	0.53	114.34
1	0.00	1.03	107.18
5	0.00	5.04	101.67

라. 검출 · 정량한계

공시료(Blank) 내 표준물질 4개의 농도(0.5, 1, 5, 25 ng/mL)를 첨가하여 조제한 후 각 농도별로 7번 반복 측정하여 평균 값을 X축, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성하였다. 이때, 산출된 y절편의 3배 값은 cotinine, OH-cotinine 각 0.051 ng/mL, 0.060 ng/mL이었으며, 이 값을 방법검출한계(LOD) 값으로 정하였다. Cotinine과 OH-cotinine 방법정량한계(LOQ) 값은 검출한계 값의 3배인 0.153 ng/mL, 0.180 ng/mL으로 확인되었다(표5, 표6).

표 5. Cotinine 검출·정량한계

(단위: ng/mL)

Cotinine (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
0.5	0.500 650 241	0.020 506 902
1	1.006 555 523	0.035 139 141
5	5.092 522 542	0.146 342 096
25	25.097 736 57	0.575 648 76

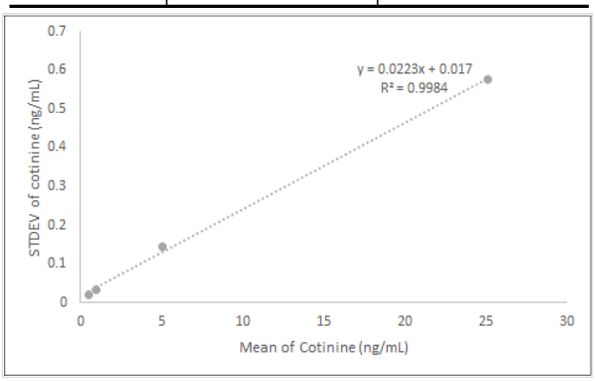


그림 3. Cotinine 검출·정량한계

표 6. OH-cotinine 검출·정량한계

(단위: ng/mL)

OH-cotinine (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
0.5	0.548 373 081	0.017 041 487
1	1.051 538 021	0.022 492 279
5	5.095 062 705	0.109 753 89
25	25.202 786 72	0.332 264 075

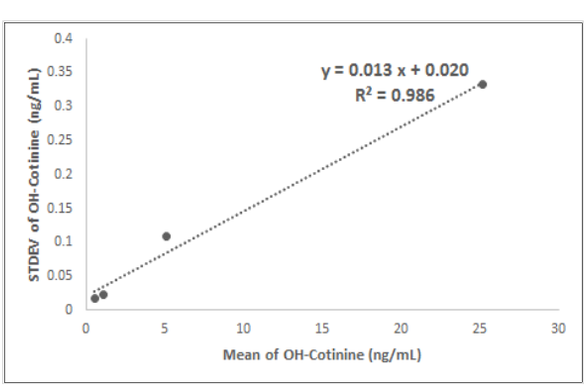


그림 4. OH-Cotinine 검출·정량한계

마. 반복성(Repeatability)

동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 7개 시료를 측정하여 반복성을 확인하였으며, cotinine과 OH-cotinine 상대표준편차(RSD)는 각 2.26 %, 1.38 % 이었다(표7).

표 7. Cotinine, OH-Cotinine 반복성

(단위: ng/mL)

Analyte (n=7)	Cotinine	OH-cotinine
Sample 1	149.71	227.50
Sample 2	143.69	229.71
Sample 3	143.632	225.43
Sample 4	142.85	220.38
Sample 5	141.29	226.99
Sample 6	144.88	223.70
Sample 7	139.31	223.38
평균	143.63	225.30
표준편차	3.25	3.10
상대표준편차 (RSD, %)	2.26	1.38

바. 캐리오버(Carryover)

고농도 표준시료 주입 직후에 공시료(Blank)를 주입하여 분석한 결과 표준시료의 분석물질이 미검출 되어 캐리오버가 발생하지 않음을 확인하였다(표8).

표 8. Cotinine, OH-Cotinine 캐리오버

(단위: ng/mL)

	Cotinine	OH-cotinine
고농도 표준시료	103.23	102.25
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
고농도 표준시료	102.50	101.19
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
고농도 표준시료	100.66	101.05
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00

사. 매질효과(Matrix effect)·회수율(Recovery)

Cotinine과 OH-cotinine 성분분석 시 생체시료 성분에 의한 영향은 각 94.02 %, 93.05 %로 확인되었으며, 회수율은 각 62.31 %, 69.25 % 으로 확인되었다(표9, 표10). 따라서 본 시험법에서는 표준물질 함량 분석 시 내부표준물질과의 함량비를 이용하여 정량하고자 하였다.

▶ 조제시료

· A = 이동상에 표준물질을 첨가한 시료
· B = 추출된 소변시료에 표준물질을 첨가한 시료
· C = 추출되기 전 소변시료에 표준물질을 첨가한 시료

▶ 결과산출

· 매질효과(matrix effect) = B/A x 100 %
· 회수율(recovery) = C/B x 100 %

표 9. Cotinine 매질효과 및 회수율

(단위: ng/mL)

Cotinine (n=6)	시료A	시료 B	시료C	매질효과	회수율
Sample 1	3457.29	3341.91	2043.35	96.66	61.14
Sample 2	3457.29	3255.49	2046.97	94.16	62.88
Sample 3	3457.29	3311.41	2021.34	95.78	61.04
Sample 4	3457.29	3157.63	1994.23	91.33	63.16
Sample 5	3457.29	3248.63	1998.97	93.96	61.53
Sample 6	3457.29	3188.70	2044.37	92.23	64.11
평균	3457.29	3250.63	2024.87	94.02	62.31

표 10. OH-cotinine 매질효과 및 회수율

(단위: ng/mL)

OH-cotinine (n=6)	시료A	시료 B	시료C	매질효과	회수율
Sample 1	2297.33	2287.68	1576.40	99.58	68.91
Sample 2	2297.33	2196.23	1580.27	95.60	71.95
Sample 3	2297.33	2169.42	1581.34	94.43	72.89
Sample 4	2297.33	2064.22	1377.27	89.85	66.72
Sample 5	2297.33	2048.08	1383.39	89.15	67.55
Sample 6	2297.33	2060.39	1390.24	89.69	67.47
평균	2297.33	2137.67	1481.48	93.05	69.25

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 및 trans-3’-hydroxycotinine 분석

나. 문서번호: KDCA-M-01

다. 제개정일: 2016.01.03.

라. 절차서 내용

1) 사용시약

시약명	주요특성
cotinine	표준물질
Cotinine-mythyl d_3	내부표준물질
trans-3’-hydroxycotinine	표준물질
trans-3’-hydroxycotinine-methyl-d_3	내부표준물질
Water	표준물질 및 이동상 조제
Acetonitrile	이동상 용매
Ammonium acetate	이동상 용매
Ammonium hydroxide	이동상 용매 pH 조정

2) 표준물질

Level	Cotinine, OH-Cotinine 표준 물질 (ng/mL)	내부표준물질 (ng/mL)	총 량 (mL)
1	0.1	20	1
2	0.5	20	1
3	1	20	1
4	5	20	1
5	25	20	1
6	50	20	1
7	100	20	1
8	200	20	1
9	400	20	1

3) 초자 및 소모품

초자 및 소모품	용량 및 기타
Cryovial	1.2 mL
BD Falcon™ Conical Tubes	15 mL, 50 mL
Media Bottle	500 mL, 1 L, 2L
Tip	10 μL, 20 μL, 200 μL, 1 000 μL
Volumetric flask	100 mL, 2 L
Vial insert	250 μL
LC injector vial	2 mL
e-tube	1.5 mL
PVDF syringe filter	0.45 μm

4) 보조장비

장비명	사용목적
분석용 전자저울	시약 및 이동상 용매조제
피펫	시료 분주
Vortexer	시료 혼합
pH Meter	버퍼 조제
초저온 냉동고	시료 보관
냉장고	시료 및 시약 보관
원심분리기	원심 분리
원심진공 농축기	시료 전처리
Sonicator	이동상 용매 조제

5) 분석장비

- 장비명: LC/MS/MS (액체크로마토그래피- 다중질량분석기)

제조사명 /모델명	장비사양
Agilent 6460 triple quadrupole	• Mass range : m/z 5 to 3,000 • Scanning speed : > 12,500 Da/s • Dynamic range : > 6.0 × 10^6 • Mass accuracy - 0.1 amu from (5-1000) m/z - 0.01% from (1,000-2,000) m/z - 0.02% from (2,000-3,000) m/z • Mass stability : < 0.1 Da in 24 h • Mass resolution - (autotune) : 0.7 Da - (manual tune) : 0.5 Da

6) 시험절차

200 μL의 시료(소변)와 내부표준물질 (480 ng/mL) 50 μL, 100 μL water, 0.85 mL의 acetone을 혼합

▼

10분 이상 4 ℃에서 보관

▼

13,000 r/min으로 30분간 4℃에서 원심분리

▼

상층액 400 μL을 진공원심농축기를 40분 동안 가동하여 acetone 제거

그림 5. Cotinine 및 OH-Cotinine 시험절차

마. 시험방법 유효화 보고서

직선성 (Linearity), 정밀도 (Precision), 정확도 (Accuracy), 검출·정량한계 (LOD·LOQ), 반복성 (Repeatability), 캐리오버 (Carryover), 매질효과 (Matrix effect)・회수율(Recovery) 등으로 구성되었다. 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였으며, Cotinine과 OH-cotinine 정확도는 각 농도에서 102.47~113.15 %, 101.67~114.34 % 이었다. 검출한계는 cotinine, OH-cotinine 각 0.051 ng/mL, 0.060 ng/mL이었으며, 정량한계는 Cotinine과 OH-cotinine 각 0.153 ng/mL, 0.180 ng/mL으로 확인되었다. 반복성은 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였으며, 본 시험법에서는 캐리오버가 발생하지 않는 것을 확인하였다. 생체시료 성분에 의한 영향(매질효과)은 cotinine, OH-cotinine 각 94.02 %, 93.05 %로 확인되었으며, 회수율은 각 62.31 %, 69.25 % 으로 확인되어 본 시험법에서는 표준물질 함량 분석 시 내부표준물질과의 함량비를 이용하여 정량하고자 하였다.

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
2. Food and Drug Administration. 2012. Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke: Established list.
3. Gabr, R. Q. et al. 2011. A liquid chromatography mass spectrometry method for nicotine and cotinine; utility in screening tobacco exposure in patients taking amiodarone. Biomedical chromatography, 25(10), 1124-1131.
4. Massadeh, A. M. et al. 2009. A single-step extraction method for the determination of nicotine and cotinine in Jordanian smokers' blood and urine samples by RP-HPLC and GC-MS. Journal of chromatographic science, 47(2), 170-177.
5. McGuffey, J. E. et al. 2014. Validation of a LC-MS/MS method for quantifying urinary nicotine, six nicotine metabolites and the minor tobacco alkaloids－anatabine and anabasine－in smokers' urine. PloS one, 9(7), e101816.
6. 한국인정기구. 2012. KOLAS-G-015 화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침.
7. Food and Drug Administration. 2013. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.

② 생체시료를 이용한 TSNAs 대사체 2종 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

흡연으로 인한 유해성분 노출 수준은 담배 유형별 특성, 흡연습성 등에 따라 달라지므로 이를 계량화하기 위해서는 바이오마커 측정이 필요하다. 이에 흡연폐해실험실은 흡연에 따른 생체 내 유해성분 노출수준을 파악하고, 흡연예방 및 금연지원을 위한 과학적 근거를 제공하기 위해 바이오마커 측정역량을 확보하고 우선순위 성분에 대한 시험방법을 확립하고자 하였으며, 담배에서 특이적으로 발생하는 발암물질인 담배특이니트로스아민류(TSNAs)의 NNK[4]와 NNN[5] 대사물질을 우선순위 성분으로 선정하였다.

NNK와 NNN은 WHO(세계보건기구) 담배실험실 네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시항목(1) 및 美FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있으며(2), 1급 발암물질로 알려져 있다(3). 체내 담배특이 발암물질 노출수준에 따른 직·간접 흡연 노출정도를 파악하는데 활용하기 위해 NNK의 주요 대사산물인 NNAL[6]과 체내 대사된 NNN을 시험방법 확립 항목으로 선정하였다. NNK로부터 대사되는 NNAL은 체내 반감기가 약 2-3주로 길어(4) 직·간접 흡연 노출 생체지표로 가장 유용하다고 알려져 있으며, 구조적으로 NNAL과 유사한 NNN을 동시 분석할 수 있는 분석법을 개발하여 담배특이 발암물질 2종에 대한 노출여부를 파악하는데 활용하기 위해 우선 선정 하였다. 소변 내 NNAL과 NNN 동시 분석법은 ISO 17025 인정시험법으로 마련 후 결과의 유효성 보장을 위해 해당시험법으로 숙련도시험에 참가하였다.

4) NNK, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone;
5) NNN, N'-Nitrosonornicotine;
6) NNAL, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol;

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

소변 내 NNAL 및 NNN 분석에 대한 WHO의 표준시험절차서가 마련되어 있지 않아 美 질병통제예방센터(CDC)의 소변 내 NNAL 시험방법 표준절차서(5)를 참고하였다. 美CDC에서 사용한 분석장비는 AB Sciex API 5000 triple quadrupole mass spectrometer 였으며, 흡연폐해실험에서 보유한 장비는 Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer 임에 따라 성분분석을 위한 질량분석기의 이온화 에너지 및 전압, 액체크로마토그래피의 펌프 내 이동상 흐름조건 등 기기 분석조건을 변경하였다. 이와 같이 흡연폐해실험실 보유 장비·환경에 적합한 시험절차 및 분석방법을 자체적으로 개발하여 내부시험방법(In-house method) 절차서를 확립하였으며, 유효화시험을 통해 확립한 내부시험방법이 NNAL 및 NNN 정량분석에 타당함을 검증하였다.

2. 시료 전처리

가. SPE(고체상추출) 컬럼 조화

시료 전처리 전 NNAL 및 NNN 성분을 추출하기 위한 SPE(고체상 추출) 전용 컬럼(Chem elut column)을 세척 및 적정온도에 조화시켜야 한다. 컬럼에 0.1 N KOH(수산화칼륨) 5mL을 넣어 3분간 정제한 후 10 mL methylene chloride로 용출한다. 해당 과정을 두 번 반복한 후 컬럼에 질소가스(10 psi, 20분)를 유입하고 60℃ 오븐에서 48시간 이상 건조시킨다.

나. SPE(고체상추출)

5 mL 시료에 10 ng/mL 내부표준물질 1mL을 첨가한다. 혼합된 시료에 0.5 mL β-glucuronidase (20 000 units/mL)을 첨가하여 37℃에서 24시간 보관한다(Free form 분석 시 해당과정 생략). 그 후 10 N NaOH(수산화나트륨) 100 μL를 첨가하고 충분히 혼합하여 조화된 SPE 컬럼에 주입한다. 3-4분 후 7 mL methylene chloride를 이용해 용출하는 과정을 두 번 반복한다.

다. LLE(액체상추출)

SPE 컬럼을 통해 용출된 시료에 0.1 N HCl(염산) 3 mL을 첨가한 후 10분동안 교반기에서 혼합한다. 혼합된 시료는 원심분리기를 통해 층분리한 후 HCl(염산) 용액층을 TEST Tube에 옮겨담는다. 옮겨담은 용액에 10 N NaOH(수산화나트륨) 30 μL를 넣어 중화시킨 후 3 mL의 phosphate buffer(완충용액)을 첨가한다.

라. MIP SPE(고체상추출)

SPE(고체상 추출) 전용 컬럼(MIP column) 은 1 mL methylene chloride, 1 mL methanol, 1 mL 증류수를 순차적으로 통과시켜 세척한다. 세척한 컬럼에 추출시료를 주입하고 0.5 mL/min 속도로 용출한다. 용출 후 컬럼을 질소가스(20 psi, 5분)를 유입하여 충분히 건조시킨다. 그 후 15 psi 압력을 걸고 1 mL 증류수, 1 mL toluene, 1 mL toluene/methylene chloride(9:1)을 순차적으로 주입하여 컬럼 내 불순물을 제거한다. 최종적으로 3 mL methylene chloride를 이용해 시료를 용출시킨다. 용출된 시료는 질소 농축기를 이용해 최종부피 20 μL로 농축시킨다.

① [SPE(고체상추출) 컬럼 조화]
- 0.1 N KOH(수산화칼륨) 5mL 주입 후 3분 정제
- 10 mL methylene chloride을 이용하여 용출 (해당과정 두 번 반복)
- 질소가스(10 psi, 20분)를 유입하고 60℃ 오븐에서 48시간 이상 건조

▼

② [SPE(고체상추출)]
- 5 mL 시료에 10 ng/mL 내부표준물질 1mL을 첨가
- 0.5 mL β-glucuronidase (20 000 units/mL)을 첨가하여 37℃에서 24시간 보관
  * Free form 분석 시 해당과정 생략
- 10 N NaOH(수산화나트륨) 100 μL 첨가
- SPE 컬럼에 주입 후 3-4분 후 7 mL methylene chloride를 이용하여 용출 (해당과정 두 번 반복)

▼

③ [LLE(액체상 추출)]
- 시료에 0.1 N HCl(염산) 3 mL을 첨가
- 10분동안 교반기에서 혼합
- 원심분리기를 통해 층분리된 HCl(염산) 용액층을 TEST Tube에 분리
- 10 N NaOH(수산화나트륨) 30 μL을 이용해 중화
- 3 mL phosphate buffer(완충용액) 첨가

▼

④ [MIP SPE(고체상 추출)]
- MIP 컬럼을 1 mL methylene chloride, 1 mL methanol, 1 mL 증류수를 이용해 세척
- 시료를 주입하고 0.5 mL/min 속도로 용출
- 질소가스(20 psi, 5분)를 유입하여 컬럼건조
- 15 psi 압력을 걸고 1 mL 증류수, 1 mL toluene, 1 mL toluene/methylene chloride(9:1)을 이용해 컬럼 내 불순물을 제거
- 3 mL methylene chloride를 이용해 시료용출
- 용출된 시료는 질소 농축기를 이용해 20 μL로 농축

그림 1. NNAL 및 NNN 전처리흐름도

3. 기기분석방법

본 시험법에서는 LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량분석기, Agilent 6460 triple quadrupole)를 이용하여 NNAL 및 NNN을 정량분석하였다. 이 때 사용된 기기 및 분석조건은 표1과 같다. 컬럼은 역상 C18 컬럼(150 mm × 3 mm × 5 μm)을 사용하였고, 흐름속도는 0.6 mL/min, 주입량은 10 μL, 컬럼오븐 온도는 40 ℃, 자동시료 주입기 온도는 10 ℃로 설정하였다.

이동상[7] 조건(mobile phase condition)에서 이동상 A와 B가 필요하였고, 이동상 A는 0.5 g Ammonium acetate (pH 5)을 사용하였으며, 이동상 B는 100% aceto nitrile을 사용하였다. 조제된 이동상은 20분동안 가스제거(degassing) 후 사용하였다. 총 분석시간은 8분으로 설정하였으며 이동상은 표1과 같은 조건으로 흘려주었다.

표 1. LC/MS/MS 기기조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
- ·컬럼유형 : 150 mm × 3 mm× 5 μm, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
- ·흐름속도: 0.6 mL/min
- ·주입량: 10 μL
- ·컬럼오븐 온도: 40 ℃
- ·자동시료주입기 온도: 10 ℃

7) 액체크로마토그래피에서 시료가 컬럼(column)을 통과하도록 이동시켜주는 물 또는 유기용매

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.00	95	5	0.6
0.50	85	15	0.6
4.50	15	85	0.6
5.00	85	15	0.6
6.00	95	5	0.6
8.00	95	5	0.6

▶ MS 조건

-	NNAL	NNAL-d_3	NNN	NNN-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	18	18	10	18
단편화전압 (fragmentor voltage)	65	65	85	95
모이온 (precursor ion)	210.2	213.2	178.2	182.2
조각이온 (product ion)	93.0	93.1	148.2	152.1
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)			
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)			
온도(℃)	300			

4. 유효화 실험 및 시료분석

확립한 시험 방법이 적합하다는 것을 과학적 기법을 사용하여 이를 객관적으로 입증하기 위해 직선성, 정밀도, 정확도, 검출한계, 정량한계, 반복성, 캐리오버(carryover), 매질효과 등을 산출하여 "시험방법 유효화확인(Method Validation)"을 수행하였다(6-7).

가. 직선성(Linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크를 적분하여 면적(area)으로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

나. 정밀도(Precision)

정밀도는 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 기기상의 조작을 반복・측정하여 평가하였다. 규정 범위를 포함하는 최소한 3가지 농도에 대하여 일내[8](intraday)에서 7회, 일간[9](interday)에서 4일에 걸쳐 5회 반복 측정에 대한 분석 값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15 % 이내 기준으로 판단하였다.

다. 정확도(Accuracy)

정확도는 설정된 조건하에서 실측된 값이 이론값, 즉 이미 알고 있는 참값에 근접한 정도를 말하며, 본 실험결과의 정확성은 시료 검출수준을 고려한 세 농도의 표준물질을 소변시료에 첨가하여 조제한 후 실측 값이 첨가한 이론값에 얼마나

8) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행
9) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

일치하는지 백분율(%)로 산출하였으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 80~120 % 이내 기준으로 판단하였다.

라. 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하며, 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법정량한계는 방법검출한계의 약 3배 정도이다. 공시료(Blank) 내 표준물질 0에 가까운 3개의 농도를 각각 첨가하여 조제한다. 각 농도별로 7번 반복실험 후 평균값과 표준편차 값을 산출한다. X축을 평균값, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성한다. 이때, 산출된 y절편 값의 3배를 방법검출한계값으로 정하며, 방법정량한계 값은 검출한계 값의 3배로 산출하였다.

마. 반복성(Repeatability)

동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 7개 검체를 짧은 시간차로 반복분석 실험하여 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15 % 이내 기준으로 판단하였다.

바. 캐리오버(Carryover)

시료의 연속 측정 시, 직전에 주입된 시료로부터 분석기기 내에 잔류된 분석물질 또는 내부표준물질이 다음 시료 주입 시에 나타내는 반응을 말한다. 캐리오버 시험에서는 고농도 표준시료 주입 직후에 공시료(Blank)를 주입하여 표준시료의 분석물질이 검출되는지 확인하였다.

사. 매질효과(Matrix effect)

생체시료 성분이 분석물질 반응에 영향을 미침으로써 정량의 정확성, 정밀성에 미치는 영향을 확인하기 위해 두 종류의 조제된 표준물질을 이용하여 검정곡선을 작성하여 각 기울기의 차이를 비교하였다. 분석값에 대한 보정필요 여부는 두 검정곡선 기울기의 차이 10 % 이내 기준으로 판단하였다.

▶ 조제시료
· A = 표준물질을 물(water)에 용해하여 조제
· B = 표준물질을 소변(urine)에 용해하여 조제

5. 내부 시험방법 절차서 작성

흡연폐해실험실 시험업무 수행 시 소변 내 NNAL및 NNN 정량시험 방법에 대한 규정을 목적으로 시약, 장비, 표준물질 조제, 시료전처리, 분석조건 등에 대한 내부 시험방법 절차서를 마련하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

해당시험법에서 그림 2와 같이 NNAL과 NNN이 분리된 크로마토그램(chromatogram)을 얻을 수 있었다.

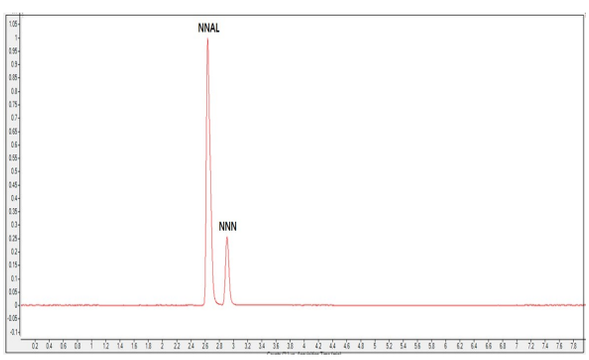
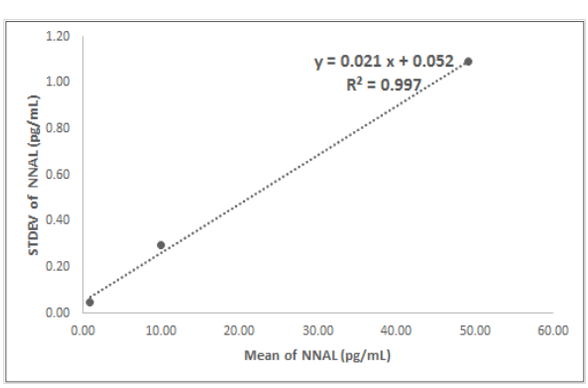


그림 2. NNAL 및 NNN의 Chromatography

가. 직선성

NNAL과 NNN R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 2).

▶ NNAL



▶ NNN

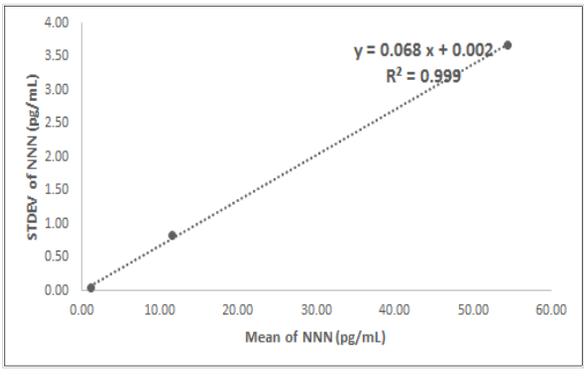


그림 3. NNAL, NNN 검정곡선

나. 정밀도

검정곡선 세 농도(1, 10, 50 pg/mL) 지점에 대하여 한 개의 소변시료 내 NNAL, NNN을 7회 반복 측정하여 일내 정밀성을 확인하였고 NNAL과 NNN 상대표준편차(RSD)는 각 1.26~3.25 %, 2.84~11.32 % 이었다(표 2). 검정곡선 세 농도(0.5, 1, 5 pg/mL) 지점에 대하여 4일에 걸쳐 5회씩 반복 측정하여 일간 정밀성을 확인하였으며, NNAL과 NNN 상대표준편차(RSD)는 각 0.48~7.90 %, 7.86~12.14 %으로 확인되었다(표3).

표 2. NNAL, NNN 정밀도(일내)

(단위: pg/mL)

NNAL (n=7)	Mean (pg/mL)	SD (pg/mL)	RSD (%)
1	0.96	0.03	3.25
10	10.02	0.27	2.65
50	49.82	0.63	1.26

NNN (n=7)	Mean (pg/mL)	SD (pg/mL)	RSD (%)
1	1.28	0.14	11.32
10	11.45	1.27	11.13
50	54.85	1.56	2.84

표 3. NNAL, NNN 정밀도(일간)

(단위: pg/mL)

NNAL (n=5)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
1	0.97	0.88	1.05	0.92	7.90
10	9.88	9.91	9.84	9.77	0.63
50	49.25	49.32	48.80	49.24	0.48

NNN (n=5)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
1	1.17	0.92	0.96	1.09	10.47
10	11.05	12.44	11.29	10.48	7.86
50	58.58	63.91	54.35	49.75	12.14

다. 정확도

소변시료 내 표준물질 세 농도(1, 10, 50 pg/mL)를 첨가하여 조제한 후 각 농도별로 5회 반복 측정하여 아래와 같이 정확도를 산출하였으며, NNAL과 NNN 정확도는 각 농도에서 97.34~103.27 %, 106.90~116.96 % 으로 확인되었다(표4).

▶ 정확도(Accuracy)

· {(첨가시료 내 검출농도 - 첨가되지 않은 시료 내 검출농도) / 첨가한 표준물질 농도} x 100 %

표 4. NNAL, NNN 정확도

(단위: pg/mL)

NNAL (n=5)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
1	0.00	0.97	97.34
10	0.00	9.96	99.58
50	0.00	51.64	103.27

NNN (n=5)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
1	0.00	1.17	106.90
10	0.00	11.05	109.52
50	0.00	58.58	116.96

라. 검출 · 정량한계

공시료(Blank) 내 표준물질 3개의 농도(1, 10, 50 pg/mL)를 첨가하여 조제한 후 각 농도별로 7번 반복 측정하여 평균 값을 X축, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성하였다. 이때, 산출된 y절편의 3배 값은 NNAL, NNN 각 0.156 pg/mL, 0.006pg/mL 이었으며, 이 값을 방법검출한계(LOD) 값으로 정하였다. NNAL과 NNN 방법정량한계(LOQ) 값은 검출한계 값의 3배인 0.468 pg/mL, 0.018 pg/mL 으로 확인되었다(표5, 표6).

표 5. NNAL 검출·정량한계

(단위: pg/mL)

NNAL (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
1	0.96	0.05
10	9.94	0.30
50	49.20	1.09

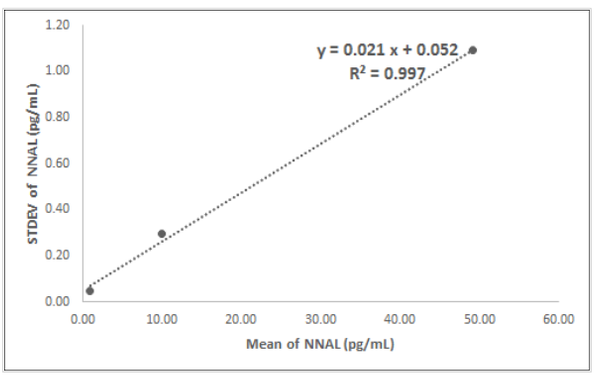
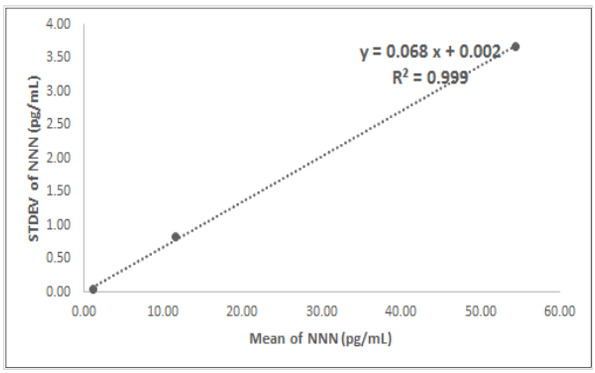


표 6. NNN 검출·정량한계

(단위: pg/mL)

NNN (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
1	1.18	0.04
10	11.51	0.84
50	54.38	3.68



마. 반복성(Repeatability)

동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 7개 시료를 측정하여 반복성을 확인하였으며, NNAL과 NNN 상대표준편차(RSD)는 각 2.22 %, 7.07 % 이었다(표7).

표 7. NNAL, NNN 반복성

(단위: pg/mL)

Analyte (n=7)	NNAL	NNN
Sample 1	49.76	53.56
Sample 2	50.46	47.38
Sample 3	50.03	57.78
Sample 4	48.87	58.10
Sample 5	47.11	57.87
Sample 6	48.96	54.50
Sample 7	49.18	52.84
평균	49.20	54.58
표준편차	1.09	3.86
상대표준편차 (RSD, %)	2.22	7.07

바. 캐리오버(Carryover)

고농도 표준시료 주입 직후에 공시료(Blank)를 주입하여 분석한 결과 표준시료의 분석물질이 미검출 되어 캐리오버가 발생하지 않음을 확인하였다(표8).

표 8. NNAL, NNN 캐리오버

(단위: pg/mL)

	NNAL	NNN
고농도 표준시료	1025	1017
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
고농도 표준시료	1012	1025
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
고농도 표준시료	1033	1001
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00
공시료(Blank)	0.00	0.00

사. 매질효과(Matrix effect)

두 종류의 조제된 표준물질을 이용하여 검정곡선을 작성하여 각 기울기의 차이를 비교하였을 때 NNAL과 NNN 각 13.0 %, 12.6 %로 확인되었다(표9). 따라서 본 시험법에서는 표준물질 함량 분석 시 매질(소변)에 조제된 표준물질을 사용하여 정량하고자 하였다.

▶ 조제시료
· A = 표준물질을 물(water)에 용해하여 조제
· B = 표준물질을 소변(urine)에 용해하여 조제

표 9. NNAL, NNN 매질효과

(단위: pg/mL)

Analyte	시료종류	검정곡선 기울기	기울기 차이 (%)
NNAL	A (Water)	9.90297	13.0
	B (Urine)	8.613251	
NNN	A (Water)	0.004468	12.6
	B (Urine)	0.005113	

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석

나. 문서번호: KDCA-M-06

다. 제정일: 2018.02.20.

라. 절차서 내용

1) 사용시약

시약명	주요특성
β-Glucuronidase	시료 효소반응
NNAL	표준물질 조제
NNAL-D_3	표준물질 조제
NNN	표준물질 조제
NNN-D_4	표준물질 조제
Ammonium acetate	이동상 용매
Acetonitrile	이동상 용매
hydrochloric acid(HCl)	SPE 전처리
Methanol	SPE 전처리
toluene	SPE 전처리
methylene chloride	SPE 전처리
10N NaOH	SPE 전처리

2) 표준물질

Level	NNAL, NNN 표준 물질 (pg/mL)	내부표준물질 (pg/mL)	총 량 (mL)
1	1	10,000	10
2	10	10,000	10
3	50	10,000	10
4	100	10,000	10
5	500	10,000	10
6	1,000	10,000	10

3) 초자 및 소모품

초자 및 소모품	용량 및 기타
Cryovial	1.2 mL
BD Falcon™ Conical Tubes	15 mL, 50 mL
Media Bottle	500 mL, 1 L, 2L
Tip	10 μL, 20 μL, 200 μL, 1 000 μL
Volumetric flask	100 mL, 2 L
Vial insert	250 μL
LC injector vial	2 mL
e-tube	1.5 mL

4) 보조장비

장비명	사용목적
분석용 전자저울	시약 및 이동상 용매조제
피펫	시료 분주
Vortexer	시료 혼합
pH Meter	버퍼 조제
초저온 냉동고	시료 보관
냉장고	시료 및 시약 보관
원심분리기	원심 분리
원심진공 농축기	시료 전처리
Sonicator	이동상 용매 조제

5) 분석장비

- 장비명: LC/MS/MS (액체크로마토그래피- 다중질량분석기)

제조사명 /모델명	장비사양
Agilent 6460 triple quadrupole	• Mass range : m/z 5 to 3,000 • Scanning speed : > 12,500 Da/s • Dynamic range : > 6.0 × 10^6 • Mass accuracy - 0.1 amu from (5-1000) m/z - 0.01% from (1,000-2,000) m/z - 0.02% from (2,000-3,000) m/z • Mass stability : < 0.1 Da in 24 h • Mass resolution - (autotune) : 0.7 Da - (manual tune) : 0.5 Da

6) 시험절차

① [SPE(고체상추출) 컬럼 조화]
- 0.1 N KOH(수산화칼륨) 5mL 주입 후 3분 정제
- 10 mL methylene chloride을 이용하여 용출 (해당과정 두 번 반복)
- 질소가스(10 psi, 20분)를 유입하고 60℃ 오븐에서 48시간 이상 건조

▼

② [SPE(고체상추출)]
- 5 mL 시료에 10 ng/mL 내부표준물질 1mL을 첨가
- 0.5 mL β-glucuronidase (20 000 units/mL)을 첨가하여 37℃에서 24시간 보관
* Free form 분석 시 해당과정 생략
- 10 N NaOH(수산화나트륨) 100 μL 첨가
- SPE 컬럼에 주입 후 3-4분 후 7 mL methylene chloride를 이용하여 용출 (해당과정 두 번 반복)

▼

③ [LLE(액체상 추출)]
- 시료에 0.1 N HCl(염산) 3 mL을 첨가
- 10분동안 교반기에서 혼합
- 원심분리기를 통해 층분리된 HCl(염산) 용액층을 TEST Tube에 분리
- 10 N NaOH(수산화나트륨) 30 μL을 이용해 중화
- 3 mL phosphate buffer(완충용액) 첨가

▼

④ [MIP SPE(고체상 추출)]
- MIP 컬럼을 1 mL methylene chloride, 1 mL methanol, 1 mL 증류수를 이용해 세척
- 시료를 주입하고 0.5 mL/min 속도로 용출
- 질소가스(20 psi, 5분)를 유입하여 컬럼건조
- 15 psi 압력을 걸고 1 mL 증류수, 1 mL toluene, 1 mL toluene/methylene chloride(9:1)을 이용해 컬럼 내 불순물을 제거
- 3 mL methylene chloride를 이용해 시료용출
- 용출된 시료는 질소 농축기를 이용해 20 μL로 농축

그림 4. NNAL 및 NNN 시험절차

마. 시험방법 유효화 보고서

직선성 (Linearity), 정밀도 (Precision), 정확도 (Accuracy), 검출·정량한계 (LOD·LOQ), 반복성 (Repeatability), 캐리오버 (Carryover), 매질효과 (Matrix effect) 등으로 구성되었다. 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R2 0.99 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였으며, NNAL과 NNN 정확도는 각 농도에서 97.34~103.27 %, 106.90~116.96 % 이었다. 검출한계는 NNAL, NNN 각 0.156 pg/mL, 0.006pg/mL이었으며, 정량한계는 NNAL과 NNN 각 0.468 pg/mL, 0.018 pg/mL으로 확인되었다. 반복성은 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였으며, 본 시험법에서는 캐리오버가 발생하지 않는 것을 확인하였다. 생체시료 성분에 의한 영향(매질효과)은 NNAL, NNN 각 13.0 %, 12.6 % 으로 확인되어 본 시험법에서는 표준물질 함량분석 시 매질(소변)에 조제된 표준물질을 사용하여 정량하고자 하였다.

참고문헌

1. WHO TobLabNet, Official Method SOP 03 「Standard Operating Procedure For Determination of Tobacco-Specific Nitrosamines in Mainstream Cigarette Smoke Under ISO and Intense Smoking Condition, 2014.
2. FDA, Harmful and potentially harmful constitue nts in tobacco products and tobacco smoke: Established list, 2012.
3. IARC, Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-116, 2016.
4. Elimination Kinetics of the Tobacco-Specific Biomarker and Lung Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (Maciej L. Goniewicz et al., 2009)
5. CDC Laboratory Procedure Manual. 4-(Methyl nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). 2009
6. FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2013.
7. KOLAS-G-015 화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침, 2012.

③ 생체시료를 이용한 VOCs 대사체 3종 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

흡연으로 인한 유해성분 노출 수준은 담배 유형별 특성, 흡연습성 등에 따라 달라지므로 이를 계량화하기 위해서는 바이오마커 측정이 필요하다. 이에 흡연폐해실험실은 흡연에 따른 생체 내 유해성분 노출수준을 파악하고, 흡연예방 및 금연지원을 위한 과학적 근거를 제공하기 위해 바이오마커 측정역량을 확보하고 우선순위 성분에 대한 시험방법을 확립하고자 하였으며, 흡연 및 환경적 영향에 의해 소변에서 검출되는 휘발성 유기화합물(VOCs)인 acrolein, benzene, 1,3-butadiene의 대사물질을 우선순위 성분으로 선정하였다.

Acrolein, benzene, 1,3-butadiene은 WHO(세계보건기구) 담배실험실 네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시항목(1) 및 美FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있으며(2), 1급 또는 3급 발암물질로 알려져 있다(3). 체내 휘발성 유기화합물(VOCs) 노출수준에 따른 직·간접 흡연 노출정도를 파악하는데 활용하기 위해 Benzene의 주요 대사산물인 SPMA[10], 1,3-Butadiene의 주요 대사산물인 MHBMA[11], acrolein의 주요 대사산물인 3-HPMA[12]을 시험방법 확립 항목으로 선정하였다. 흡연 또는 환경적 영향에 의해 소변에서 검출되는 바이오마커로 활용되는 휘발성 유기 화합물(VOCs) 대사체 3종에 대한 노출여부를 파악하는데 활용하기 위해 우선 선정 하였으며, 소변 내 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 동시 분석법은 내부시험법으로 마련 후 결과의 유효성 보장을 위해 숙련도시험에 참가하였다.

10) SPMA, N-Acetyl-S-(phenyl)-L-cysteine;
11) MHBMA, N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl-2-propenyl)-L-cysteine;
12) 3-HPMA, N-Acetyl-S- (3-hydroxypropyl)-L-cysteine;

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

소변 내 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 분석에 대한 WHO의 표준시험절차서가 마련되어 있지 않아 美 질병통제예방센터(CDC)의 소변 내 휘발성 유기화합물(VOCs) 시험방법 표준절차서(4) 및 선행문헌(5)을 참고하였다. 美CDC에서 사용한 분석장비는 AB Sciex API 55000 triple quadrupole mass spectrometer 였으며, 흡연폐해실험에서 보유한 장비는 Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer 임에 따라 성분분석을 위한 질량분석기의 이온화 에너지 및 전압, 액체크로마토그래피의 펌프 내 이동상 흐름조건 등 기기 분석조건을 변경하였다. 이와 같이 흡연폐해실험실 보유 장비·환경에 적합한 시험절차 및 분석방법을 자체적으로 개발하여 내부시험방법(In-house method) 절차서를 확립하였으며, 유효화시험을 통해 확립한 내부시험방법이 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 정량분석에 타당함을 검증하였다.

2. 시료 전처리

시료 50 μL, 내부표준물질 25 μL, 15 mM ammonium acetate 425 μL를 20초 이상 충분히 혼합한다.

3. 기기분석방법

본 시험법에서는 LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량분석기, Agilent 6460 triple quadrupole)를 이용하여 NNAL 및 NNN을 정량분석하였다. 이 때 사용된 기기 및 분석조건은 표1과 같다. 컬럼은 역상 C18 컬럼(150 mm × 2.1 mm × 1.8 μm)을 사용하였고, 주입량은 10 μL, 컬럼오븐 온도는 40 ℃, 자동시료 주입기 온도는 10 ℃로 설정하였다.

이동상[13] 조건(mobile phase condition)에서 이동상 A와 B가 필요하였고, 이동상 A는 15 mM Ammonium

13) 액체크로마토그래피에서 시료가 컬럼(column)을 통과하도록 이동시켜주는 물 또는 유기용매

acetate (pH 6.8)을 사용하였으며, 이동상 B는 100% acetonitrile을 사용하였다. 조제된 이동상은 20분동안 가스제거(degassing) 후 사용하였다. 총 분석시간은 9분으로 설정하였으며 이동상은 표1과 같은 조건으로 흘려주었다.

표 1. LC/MS/MS 기기조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
·컬럼유형 : 150 mm × 2.1 mm× 1.8 μm,
역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
·주입량: 10 μL
·컬럼오븐 온도: 40 ℃
·자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.00	97	3	0.25
2.00	95	5	0.25
3.00	90	10	0.30
5.00	70	30	0.30
6.50	60	40	0.30
7.00	85	15	0.30
7.50	90	10	0.30
8.00	97	3	0.30
9.00	97	3	0.30

▶ MS 조건

충돌에너지 (CE, collision energy)	SPMA: 4 / SPMA-d_5: 8 3-HPMA: 8 / 3-HPMA-d_6: 10 MHBMA: 8 / MHBMA-d_6: 28
단편화전압 (fragmentor voltage)	SPMA: 64 / SPMA-d_5: 82 3-HPMA: 75 / 3-HPMA-d_6: 85 MHBMA: 85 / MHBMA-d_6: 87
모이온 (precursor ion)	SPMA: 238.1 / SPMA-d_5: 243.08 3-HPMA: 219.9 / 3-HPMA-d_6: 219.9 MHBMA: 231.9 / MHBMA-d_6: 238.1
조각이온 (product ion)	SPMA: 109 / SPMA-d_5: 114 3-HPMA: 91 / 3-HPMA-d_6: 97.2 MHBMA: 103.1 / MHBMA-d_6: 77.1
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)
온도(℃)	300

4. 유효화 실험 및 시료분석

확립한 시험 방법이 적합하다는 것을 과학적 기법을 사용하여 이를 객관적으로 입증하기 위해 직선성, 정밀도, 정확도, 검출한계, 정량한계, 반복성, 캐리오버(carryover), 매질효과 등을 산출하여 "시험방법 유효화확인(Method Validation)"을 수행하였다(6-7).

가. 직선성(Linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분하여 면적(area)으로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

나. 정밀도(Precision)

정밀도는 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 기기상의 조작을 반복・측정하여 평가하였다. 규정 범위를 포함하는 최소한 3가지 농도에 대하여 일내[14](intraday)에서 7회, 일간[15](interday)에서 4일에 걸쳐 5회 반복 측정에 대한 분석 값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15 % 이내 기준으로 판단하였다.

다. 정확도(Accuracy)

정확도는 설정된 조건하에서 실측된 값이 이론값, 즉 이미 알고 있는 참값에 근접한 정도를 말하며, 본 실험결과의 정확성은 시료 검출수준을 고려한 세 농도의 표준물질을 소변시료에 첨가하여 조제한 후 실측 값이 첨가한 이론값에 얼마나 일치하는지 백분율(%)로 산출하였으며, 해당

14) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행
15) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

유효화시험 항목에 대한 적합여부는 80~120 % 이내 기준으로 판단하였다.

라. 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하며, 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법정량한계는 방법검출한계의 약 3배 정도이다. 공시료(Blank) 내 표준물질 0에 가까운 3개의 농도를 각각 첨가하여 조제한다. 각 농도별로 7번 반복실험 후 평균값과 표준편차 값을 산출한다. X축을 평균값, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성한다. 이때, 산출된 y절편 값의 3배를 방법검출한계값으로 정하며, 방법정량한계 값은 검출한계 값의 3배로 산출하였다.

마. 반복성(Repeatability)

동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 7개 검체를 짧은 시간차로 반복분석 실험하여 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었으며, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15 % 이내 기준으로 판단하였다.

바. 캐리오버(Carryover)

시료의 연속 측정 시, 직전에 주입된 시료로부터 분석기기 내에 잔류된 분석물질 또는 내부표준물질이 다음 시료 주입 시에 나타내는 반응을 말한다. 캐리오버 시험에서는 고농도 표준시료 주입 직후에 공시료(Blank)를 주입하여 표준시료의 분석물질이 검출되는지 확인하였다.

사. 매질효과(Matrix effect)

생체시료 성분이 분석물질 반응에 영향을 미침으로써 정량의 정확성, 정밀성에 미치는 영향을 확인하기 위해 두 종류의 조제된 표준물질을 이용하여 검정곡선을 작성하여 각 기울기의 차이를 비교하였다. 분석값에 대한 보정필요 여부는 두 검정곡선 기울기의 차이 10 % 이내 기준으로 판단하였다.

▶ 조제시료

· A = 표준물질을 물(water)에 용해하여 조제
· B = 표준물질을 소변(urine)에 용해하여 조제

5. 내부 시험방법 절차서 작성

흡연폐해실험실 시험업무 수행 시 소변 내 SPME, MHBMA, 3-HPMA 정량시험 방법에 대한 규정을 목적으로 시약, 장비, 표준물질 조제, 시료전처리, 분석조건 등에 대한 내부 시험방법 절차서를 마련하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

해당시험법에서 그림 1과 같이 3-HPMA, MHBMA, SPMA가 분리된 크로마토그램(chromatogram)을 얻을 수 있었다.

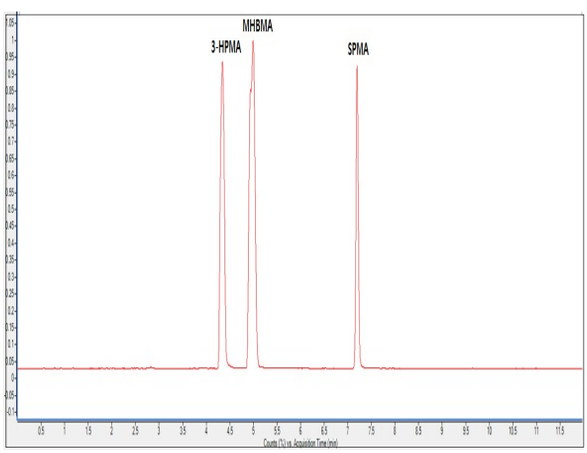
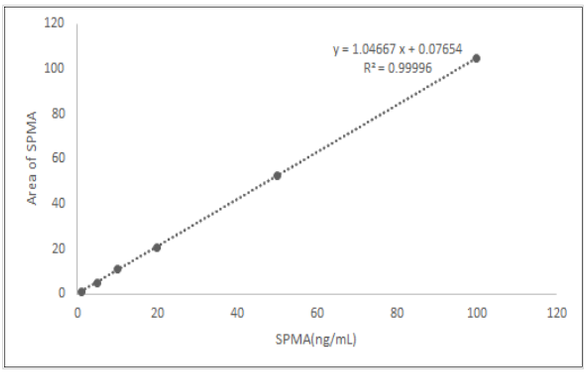


그림 1. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 의 Chromatography

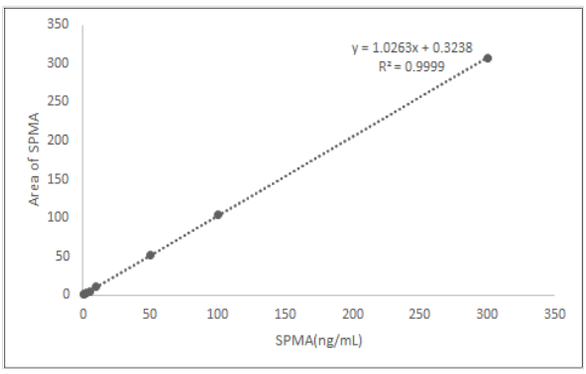
가. 직선성

SPME, MHBMA, 3-HPMA R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 2).

▶ SPMA



▶ MHBMA



▶ 3-HPMA

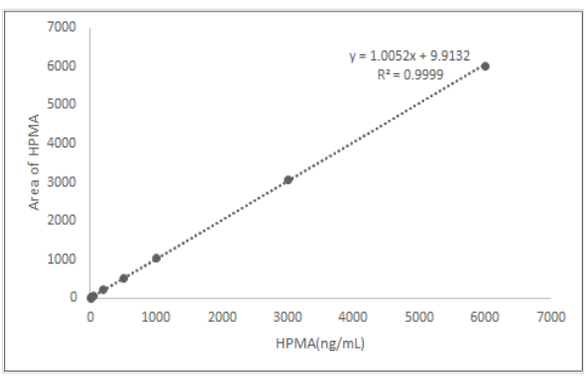


그림 2. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 검정곡선

나. 정밀도

정곡선 세 농도 지점에 대하여 한 개의 소변시료 내 SPMA(1, 5, 10 ng/mL), MHBMA(1, 2, 5 ng/mL), 3-HPMA(10, 50, 200 ng/mL)를 7회 반복 측정하여 일내 정밀성을 확인하였고 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 상대표준편차(RSD)는 각 1.29~3.79 %, 1.85~3.82 %, 0.58~4.25 % 이었다(표 2). 검정곡선 세 농도 지점에 대하여 4일에 걸쳐 5회씩 반복 측정하여 일간 정밀성을 확인하였으며, SPMA, MHBMA, 3-HPMA 상대표준편차(RSD)는 각 1.04~7.67 %, 3.85~6.83 %, 0.86~2.56 %으로 확인되었다(표3).

표 2. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 정밀도(일내)

(단위: ng/mL)

SPMA (n=7)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	RSD (%)
1	1.07	0.04	3.79
5	5.15	0.07	1.29
10	10.77	0.38	3.49

MHBMA (n=7)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	RSD (%)
1	1.06	0.04	3.82
2	2.05	0.04	1.85
5	5.20	0.15	2.88

3-HPMA (n=7)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	RSD (%)
10	10.60	0.45	4.25
50	52.85	1.05	1.98
200	205.95	1.19	0.58

표 3. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 정밀도(일간)

(단위: ng/mL)

SPMA (n=5)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
1	0.97	0.88	1.05	0.92	7.67
5	5.88	5.91	5.84	5.77	1.04
10	10.25	10.32	10.08	9.85	2.07

MHBMA (n=5)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
1	0.93	0.98	1.02	0.89	5.95
2	2.39	2.05	2.11	2.16	6.83
5	5.19	5.53	5.08	5.14	3.85

3-HPMA (n=5)	1일차	2일차	3일차	4일차	RSD (%)
10	10.86	11.05	10.46	10.89	2.32
50	52.46	54.23	51.13	51.73	2.56
200	209.13	205.13	208.52	208.13	0.86

다. 정확도

소변시료 내 표준물질 세 농도를 첨가하여 조제한 후 각 농도별로 5회 반복 측정하여 아래와 같이 정확도를 산출하였으며, SPMA(1, 5, 10 ng/mL), MHBMA(1, 2, 5 ng/mL), 3-HPMA(10, 50, 200 ng/mL) 정확도는 각 농도에서 106.4~107.2 %, 104.0~113.0 %, 101.0~109.0 %으로 확인되었다(표4).

▶ 정확도(Accuracy)

· {(첨가시료 내 검출농도 - 첨가되지 않은 시료 내 검출농도) / 첨가한 표준물질 농도} x 100 %

표 4. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 정확도

(단위: ng/mL)

SPMA (n=5)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
1	0	1.07	107
5	0	5.36	107.2
10	0	10.64	106.4

MHBMA (n=5)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
1	0	1.04	104
2	0	2.26	113
5	0	5.34	107

3-HPMA (n=5)	표준물질 첨가되지 않은 소변시료 내 검출농도	표준물질 첨가소변시료 내 검출농도	정확도 (%)
10	0	10.11	101
50	0	54.26	109
200	0	209.34	105

라. 검출 · 정량한계

공시료(Blank) 내 표준물질 3개의 농도를 첨가하여 조제한 후 각 농도별로 7번 반복 측정하여 평균 값을 X축, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성하였다. 이때, 산출된 y절편 값의 3배는 SPMA(0.1, 1, 5 ng/mL), MHBMA(0.1, 1, 2 ng/mL), 3-HPMA(1, 10, 50 ng/mL) 각 0.19 ng/mL, 0.08 ng/mL, 0.63 ng/mL이었으며, 이 값을 방법검출한계(LOD) 값으로 정하였다. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 방법정량한계(LOQ) 값은 검출한계 값의 3배인 0.57 ng/mL, 0.24 ng/mL, 1.90 ng/mL으로 확인되었다(표5, 표6, 표7).

표 5. SPMA 검출·정량한계

(단위: ng/mL)

SPMA (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
0.1	0.09	0.05
1	0.94	0.3
5	4.92	1.09

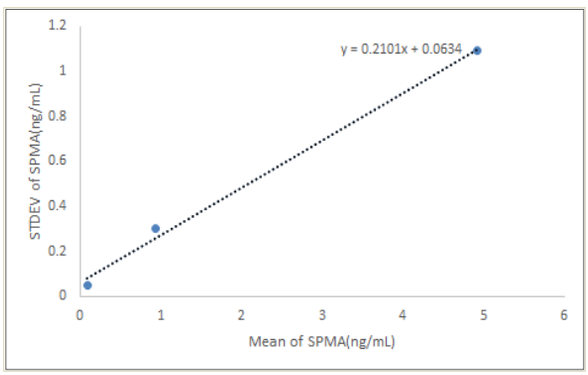


표 6. MHBMA 검출·정량한계

(단위: ng/mL)

MHBMA (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
0.1	0.09	0.04
1	0.95	0.3
2	1.82	0.5

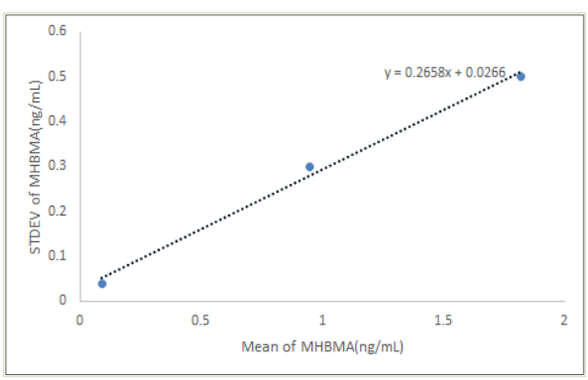
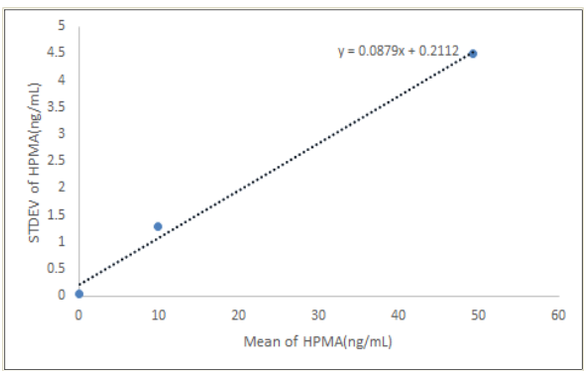


표 7. 3-HPMA 검출·정량한계

(단위: ng/mL)

3-HPMA (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
1	0.09	0.04
10	9.85	1.3
50	49.32	4.5



마. 반복성(Repeatability)

동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 7개 시료를 측정하여 반복성을 확인하였으며, SPMA, MHBMA, 3-HPMA 상대표준편차(RSD)는 각 4.6 %, 1.96 %, 4.13 % 이었다(표8).

표 8. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 반복성

(단위: ng/mL)

Analyte (n=7)	SPMA	MHBMA	3-HPMA
Sample 1	10.8	5.21	53.46
Sample 2	10.5	5.13	50.18
Sample 3	10.0	4.98	49.88
Sample 4	9.9	5.03	51.16
Sample 5	11.2	5.11	52.46
Sample 6	10.0	4.92	49.13
Sample 7	10.6	5.01	55.04
평균	10.4	5.06	51.62
표준편차	0.5	0.10	2.13
상대표준편차 (RSD, %)	4.6	1.96	4.13

바. 캐리오버(Carryover)

고농도 표준시료 주입 직후에 공시료(Blank)를 주입하여 분석한 결과 표준시료의 분석물질이 미검출 되어 캐리오버가 발생하지 않음을 확인하였다(표9).

표 9. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 캐리오버

(단위: ng/mL)

	SPMA	MHBMA	3-HPMA
고농도 표준시료	101	293	3495
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
고농도 표준시료	100	295	3615
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
고농도 표준시료	99	290	3507
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0
공시료(Blank)	0	0	0

사. 매질효과(Matrix effect)

두 종류의 조제된 표준물질을 이용하여 검정곡선을 작성하여 각 기울기의 차이를 비교하였을 때 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 각 13.0 %, 12.6 %, 12.5 %로 확인되었다(표10). 따라서 본 시험법에서는 표준물질 함량 분석 시 매질(소변)에 조제된 표준물질을 사용하여 정량하고자 하였다.

▶ **조제시료**

· A = 표준물질을 물(water)에 용해하여 조제

· B = 표준물질을 소변(urine)에 용해하여 조제

표 10. SPMA, MHBMA, 3-HPMA 매질효과

(단위: ng/mL)

Analyte	시료종류	검정곡선 기울기	기울기 차이 (%)
SPMA	A (Water)	9.90297	13.0
	B (Urine)	8.613251	
MHBMA	A (Water)	0.004468	12.6
	B (Urine)	0.005113	
3-HPMA	A (Water)	1.0053	12.5
	B (Urine)	1.1313	

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 분석

나. 문서번호: KDCA-M-08

다. 제개정일: 2018.11.20.

라. 절차서 내용

1) 사용시약

시약명	주요특성
MHBMA	표준물질
MHBMA-d_6	표준물질
S-(3-Hydroxypropyl)mercapturic Acid-D_6, HPMA-D_6	표준물질
S-(3-Hydroxypropyl)mercapturic Acid, 3-HPMA	표준물질
N-Acetyl-S-phenyl-L-cysteine; N-Acetyl-3-(phenylthio)alanine, SPMA	표준물질
S-Phenyl-d_5-mercapturic Acid, SPMA-d_5	표준물질
Ammonium acetate	이동상 용매
Acetonitrile	이동상 용매

2) 표준물질

Level	SPMA (ng/mL)	내부표준물질 (ng/mL)	총 량 (mL)
1	0.05	10	1
2	0.1	10	1
3	0.5	10	1
4	1	10	1
5	2.5	10	1
6	5	10	1
7	10	10	1
8	20	10	1

Level	MHBMA (ng/mL)	내부표준물질 (ng/mL)	총 량 (mL)
1	0.1	10	1
2	0.5	10	1
3	1	10	1
4	2.5	10	1
5	5	10	1
6	10	10	1
7	20	10	1

Level	3-HPMA (ng/mL)	내부표준물질 (ng/mL)	총 량 (mL)
1	1	5	1
2	5	5	1
3	25	5	1
4	50	5	1
5	100	5	1
6	250	5	1
7	500	5	1
8	1,000	5	1

3) 초자 및 소모품

초자 및 소모품	용량 및 기타
Cryovial	1.2 mL
BD Falcon™ Conical Tubes	15 mL, 50 mL
Media Bottle	500 mL, 1 L, 2L
Tip	10 μL, 20 μL, 200 μL, 1 000 μL
Volumetric flask	100 mL, 2 L
Vial insert	250 μL
LC injector vial	2 mL
e-tube	1.5 mL

4) 보조장비

장비명	사용목적
분석용 전자저울	시약 및 이동상 용매조제
피펫	시료 분주
Vortexer	시료 혼합
pH Meter	버퍼 조제
초저온 냉동고	시료 보관
냉장고	시료 및 시약 보관
Sonicator	이동상 용매 조제

5) 분석장비

- 장비명: LC/MS/MS (액체크로마토그래피- 다중질량분석기)

제조사명 /모델명	장비사양
Agilent 6460 triple quadrupole	• Mass range : m/z 5 to 3,000 • Scanning speed : > 12,500 Da/s • Dynamic range : > 6.0 × 10^6 • Mass accuracy - 0.1 amu from (5-1000) m/z - 0.01% from (1,000-2,000) m/z - 0.02% from (2,000-3,000) m/z • Mass stability : < 0.1 Da in 24 h • Mass resolution - (autotune) : 0.7 Da - (manual tune) : 0.5 Da

6) 시험절차

[희석(dilution) 전처리]
- 시료 50 μL, 내부표준물질 25 μL, 15 mM ammonium acetate 425 μL를 20초 이상 충분히 혼합한다.

마. 시험방법 유효화 보고서

직선성 (Linearity), 정밀도 (Precision), 정확도 (Accuracy), 검출·정량한계 (LOD·LOQ), 반복성 (Repeatability), 캐리오버 (Carryover), 매질효과 (Matrix effect) 등으로 구성되었다. 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였으며, SPMA, MHBMA, 3-HPMA 정확도는 각 농도에서 106.4~107.2 %, 104.0~113.0 %, 101.0~109.0 % 이었다. 검출한계는 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 각 0.19 ng/mL, 0.08 ng/mL, 0.63 ng/mL이었으며, 정량한계는SPMA, MHBMA, 3-HPMA 각 0.57 ng/mL, 0.24 ng/mL, 1.90 ng/mL으로 확인되었다. 반복성은 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였으며, 본 시험법에서는 캐리오버가 발생하지 않는 것을 확인하였다. 생체시료 성분에 의한 영향(매질효과)은 SPMA, MHBMA, 3-HPMA 각 13.0 %, 12.6 %, 12.5 % 으로 확인되어 본 시험법에서는 표준물질 함량 분석 시 매질(소변)에 조제된 표준물질을 사용하여 정량하고자 하였다.

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco- specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
2. Food and Drug Administration. 2012. Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke: Established list.
3. World Health Organization. 2016. Agents classified by the IARC monographs. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. http://monographs. iarc. fr/ENG/Classification. Last Accessed.
4. CDC NHANES. 2011-2012. Volatile Organic Compounds(VOCs).
5. Boettcher, M. I. et al. 2005. Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. Journal of Chromatography B, 824(1-2), 283-294.
6. Food and Drug Administration. 2013. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.
7. 한국인정기구. 2012. KOLAS-G-015 화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침.

④ 흡연 바이오마커(5종) 국외숙련도 참가결과

참가 개요

1. **목적** : ISO17025 시험결과 품질보증을 위해 국외 숙련도평가 참여를 통한 참가시험소간 비교시험 및 흡연폐해실험실의 분석능력 평가

2. **주관기관** : 독일 외부품질 평가기관 (G-EQUAS*)
   * German-External Quality Assessment Scheme

3. **참가항목**

   가. 2016년: (1종) 소변 내 cotinine

   나. 2017년: (2종) 소변 내 cotinine, NNAL

   다. 2018~2020년: (5종*) 소변 내 흡연 바이오마커
   * Cotinine, NNAL, SPMA, MHBMA, 3-HPMA

4. **참가기간**: 2016~2020년, 매년 9월~11월

5. **결과 판정기준**: 주관기관에서 제시한 적합 허용범위 내 검출여부

결 과

2016년부터 2020년 독일 외부품질 평가기관 숙련도 참가결과 통보 시 모든 항목에서 허용범위 내로 측정되어 '적합' 판정을 받았다(1-5).

표 1. 2016년 국제 숙련도시험참가 결과(1종)

평가항목		측정 결과[16]	참조 값[17]	허용 범위[18]	평가 결과
Cotinine (ng/mL)	저농도	214.6	195.5	154.4 -236.6	적합
	고농도	1012.9	883.2	734.7 -1031.7	적합

16) 흡연폐해실험실에서 측정한 결과 값
17) 숙련도시험 주관기관에서 제공한 시료 결과 값
18) 숙련도시험 주관기관에서 제시한 측정 적합 허용범위

표 2. 2017년 국제 숙련도시험참가 결과(2종)

평가항목		측정 결과	참조값	허용범위	평가 결과
Cotinine (ng/mL)	저농도	202.3	182.0	140.6 - 223.4	적합
	고농도	1956.1	1897.7	1505.0 - 2290.4	적합
NNAL (pg/mL)	저농도	255.4	295.1	188.9 - 401.3	적합
	고농도	554.5	630.6	465.9 - 795.3	적합

표 3. 2018년 국제 숙련도시험참가 결과(5종)

평가항목		측정 결과	참조값	허용범위	평가 결과
Cotinine (ng/mL)	저농도	147.9	141.6	111.3 - 171.9	적합
	고농도	1314.5	1263.0	1111.5 - 1414.5	적합
NNAL (pg/mL)	저농도	225.1	220.6	144.1 - 297.1	적합
	고농도	845.9	841.8	675.9 - 1007.7	적합
3-HPMA (ng/mL)	저농도	228.2	224.6	170.3 - 278.9	적합
	고농도	3047.8	2711.9	2223.8 - 3200.0	적합
SPMA (ng/mL)	저농도	3.9	3.0	2.1 - 3.9	적합
	고농도	20.9	18.4	14.2 - 22.6	적합
MHBMA (ng/mL)	저농도	7.4	10.9	5.5 - 16.3	적합
	고농도	76.3	102.4	55.9 - 148.9	적합

표 4. 2019년 국제 숙련도시험참가 결과(5종)

평가항목		측정 결과	참조값	허용범위	평가 결과
Cotinine (ng/mL)	저농도	415.5	447.7	355.0 - 540.4	적합
	고농도	925.8	1002.8	840.2 - 1165.4	적합
NNAL (pg/mL)	저농도	177.6	196.4	148.1 - 244.7	적합
	고농도	870.7	877.5	680.1 - 1074.9	적합
3-HPMA (ng/mL)	저농도	475.1	494.8	333.1 - 656.5	적합
	고농도	3221.2	2766.1	2201.8 - 3330.4	적합
SPMA (ng/mL)	저농도	1.8	1.7	1.1 -2.3	적합
	고농도	17.3	17.3	14.9 - 19.7	적합
MHBMA (ng/mL)	저농도	19.6	17.1	8.7 - 25.5	적합
	고농도	100.6	86.2	52.0 - 120.4	적합

표 5. 2020년 국제 숙련도시험참가 결과(5종)

평가항목		측정 결과	참조값	허용범위	평가 결과
Cotinine (ng/mL)	저농도	710.3	701.3	589.7 -812.9	적합
	고농도	1164.4	1255.9	1078.9 -1432.9	적합
NNAL (pg/mL)	저농도	85	157	85 -229	적합
	고농도	1091	1118	935 -1301	적합
3-HPMA (ng/mL)	저농도	67	69	48 -90	적합
	고농도	2146	2410	1990 -2830	적합
SPMA (ng/mL)	저농도	1.80	1.41	0.99 - 1.83	적합
	고농도	14.90	15.42	11.76 - 19.08	적합
MHBMA (ng/mL)	저농도	8.9	13.3	7.6 - 19.0	적합
	고농도	60.8	49.9	31.3 - 68.5	적합

참고문헌

1. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV58 Final Report, 2016.
2. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV60 Final Report, 2017.
3. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV62 Final Report, 2018.
4. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV64 Final Report, 2019.
5. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV66 Final Report, 2020.

⑤ Cotinine 국외숙련도평가 참가결과

참가 개요

1. **목적** : ISO17025 시험결과 품질보증을 위해 국외 숙련도평가 참여를 통한 참가시험소간 비교시험 및 흡연폐해실험실의 분석능력 평가

2. **주관기관** : Oneworld Accuracy External Quality Assessment (호주 외부품질 평가기관)

3. **참가항목**: (1종) 소변 내 cotinine

4. **참가기간**: 2020년, 4월~10월*

   * 해당 프로그램은 연 3회(TEST1-3) 시료 지급

5. **결과 판정기준**: 주관기관에서 제시한 참조값[19] 대비 측정값[20]의 정확도 비교

결 과

숙련도시험 주관기관에서 제공한 TEST 1-3 시료 중 TEST 2 고농도 시료에서만 cotinine이 검출되었으며, 그 외 시료에서는 cotinine이 Cut-off 값(200 ng/mL) 이하로 검출 되었다(표1). 숙련도 주관기관에서는 10개 이상 참가기관의 결과를 통해 측정값의 적합 허용범위(Acceptable range)를 산출하고 있으나, 해당 프로그램에서는 10개 미만의 기관이 참가하여 시험결과에 대한 적합여부를 평가하지 않았으며(1), 이에 TEST 2 최종결과 보고서에 제시한 cotinine 참조값과 질병관리청 흡연폐해실험실에서 측정한 값과의 비교를 통해 자체적으로 적합성을 판단하라고 답변 받았다. 이에, 숙련도시험 주관기관에서 제시한 참조값 대비 흡연폐해실험실에서 측정한 값의 정확도를 비교함으로써 해당 시험결과에 대한 적합여부를 판단하였다.

< 정확도(Accuracy) >

◇ 시험결과인 측정량이 인정받은 참조값에 얼마나 근접하는가에 대한 평가

◇ 정확도 적합여부는 참조값의 15 % 내외 (85 - 115 %)로 판단

cotinine이 검출된 TEST 2 고농도 시료의 측정 정확도는 103 %로 확인되어 해당 숙련도 시험 결과는 신뢰성 있는 결과로 판단되었다(2).

표 1. 2020년 국제 숙련도시험참가 결과(1종)

	TEST 1		TEST 2		TEST 3	
	저농도	고농도	저농도	고농도	저농도	고농도
측정값	Cut-off 이하 (0.08)	Cut-off 이하 (0.10)	Cut-off 이하 (0.10)	638.3	Cut-off 이하 (0.13)	Cut-off 이하 (0.10)
참조값	Cut-off 이하	Cut-off 이하	Cut-off 이하	619	Cut-off 이하	Cut-off 이하
정확도 (%)	-	-	-	103 %	-	-

참고문헌

1. Oneworld Accuracy External Quality Assessment Proficiency Testing Final Report, 2020.
2. Bioanalytical method validation guidance for industry(미국 FDA 가이드라인). 2018.

19) 숙련도시험 주관기관에서 제공한 시료 결과 값
20) 흡연폐해실험실에서 측정한 결과 값

⑥ 국가 흡연폐해 바이오모니터링 질관리 참여결과

연구 배경

국민건강영양조사(Korea National Health & Nutrition Examination Survey; KNHANES)는 국민건강증진법 제16조에 근거하여 1998년(1기)를 시작으로 국민의 건강행태, 만성질환 유병현황, 식품 및 영양섭취 실태에 관한 법정조사이다. 질병관리본부에서는 국가수준의 직·간접흡연 노출수준을 모니터링하기 위해 2005년 제3기 국민건강영양조사부터 소변시료 내 cotinine함량을 측정하고 있다. 또한 국민건강조사에서는 결과 공표를 위해 진단검사에 대한 질관리를 정책연구 용역을 통해 진행해 오고 있다.

흡연폐해실험실에서는 동 정책연구용역에서 실시하는 소변 코티닌검사의 검사실간 비교평가에 2016년 제7기부터 매년 참여하여 검사결과의 재현성(정밀도) 및 정확성(참값 근접성)을 시행하고 있다.

연구 방법

1. 검사실간 비교평가

가. 비교기관

흡연폐해실험실과 「흡연 생체지표 바이오모니터링」 과제 연구수행기관[21)]

나. 비교검체 및 검사항목

1) 비교 검체 : 국민건강영양조사 질관리팀에서 제작한 소변 검체 50건/연

2) 검사항목 : cotinine 함량 동등성 평가

다. 비교평가 절차

국민건강영양조사 질관리팀에서 검사실간 비교평가에 대해 흡연폐해실험실로 협조 요청 및 시험의뢰를 하였다. 비교검체를 질관리팀에서 제작하여 흡연폐해실험실로 당일 운송하며 실험에서는 인수받은 검체를 분석 전까지 -20 ℃에서 냉동 보관하였다.

비교기관별로 각 정립된 시험법을 활용하며, 흡연폐해실험실에서는 ISO17025 인정시험법인 LC/MS/MS를 이용한 소변 내 cotinine 분석(질병관리청 표준시험법 KDCA-M-01)에 따라 분석하였다.

비교분석되는 두 기관에서 동일한 날짜에 동일한 검체 각 10개를 5일에 걸쳐 분석하며, 검체별로 2회씩 반복 측정한다. 첫번째 측정 시에는 일련번호 순서대로(1~10번) 측정하며, 두번째 측정 시에는 역순(10~1번)으로 측정하였다. 측정완료 후에는 ISO17025 인정시험 기준에 따라 시험성적서를 발행하고, 결과를 질관리팀에 통보하였다(그림1).

① [시험의뢰 접수]
- 국민건강영양조사 질관리팀으로부터 검사실간 비교평가 협조요청 건 접수(1회/연)

▼

② [검체수령 및 보관]
- 아이스박스에 포장된 검체(50건)는 당일 운송·수령
- 수령 후 분석 전까지 냉동(-20℃)보관

▼

③ [검체분석]
- 흡연폐해실험실 ISO17025 인정시험법(KDCA-M-01)에 따라 분석
- 검체 매일 10건씩 5일간 분석
- 검체별 2회 반복 측정
  * 1회는 1-10번, 2회는 10-1번 순서로 분석

▼

④ [시험결과서 발행 및 결과공유]
- 50검체 각 2반복 측정 값에 대한 시험결과서 발행 및 원시자료(raw data) 등 관련자료 공유

그림 1. 검사실 간 비교평가 절차

21) 2016-2018(제7기): 국립암센터
2019-2021(제8기): 삼성서울병원

2. 소변 내 cotinine 분석방법

ISO17025 인정시험법인 LC/MS/MS를 이용한 소변 내 cotinine 분석(질병관리청 표준시험법 KDCA-M-01)에 따라 시료 전처리를 위해 200 μL의 시료(소변)와 내부표준물질 (480 ng/mL) 50 μL, 100 μL water, 0.85 mL의 acetone을 혼합한 후 충분히 섞어주었다. 시료 내 존재하는 염, 단백질, 그 외 효소들을 침전시키기 위해 10분 이상 4 ℃에서 보관 후 13,000 r/min으로 30분간 4 ℃에서 원심분리 하였다. 1.5mL e-tube에 상층액 400 μL을 조심스럽게 옮긴 후 진공원심농축기를 40분 동안 가동하여 acetone을 제거하였다. 전처리가 완료된 시료는 LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량분석기, Agilent 6460 triple quadrupole)를 이용하여 표2와 같은 조건으로 분석하였다.

표 2. LC/MS/MS 소변 내 cotinine 분석조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
- 컬럼유형 : 150 mm × 4.6 mm× 5 μm, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
- 흐름속도: 1 mL/min
- 주입량: 5 μL
- 컬럼오븐 온도: 40 ℃
- 자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.01	97	3	1
1.00	97	3	1
9.00	70	30	1
10.50	70	30	1
10.51	0	100	1
13.50	0	100	1

▶ MS 조건

-	cotinine	cotinine-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	24	28
단편화전압 (fragmentor voltage)	115	115
모이온 (precursor ion)	177.0	180.0
조각이온 (product ion)	80.1	80.0
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)	
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)	
온도(℃)	300	

3. 질관리 평가방법

미FDA (Food and Drug Administration)에서 승인을 획득한 통상적인 검사 방법에 대해 CLSI (clinical and laboratory standards institute) 가이드라인에 따라 국민건강영양조사 진단검사 질관리 정책연구용역 담당 기관에서 최종평가를 실시하였다.

연구 결과

CLSI(clinical and laboratory standards institute) 가이드라인에 따라 두 기관의 소변 내 cotinine의 최고, 최저 농도의 의학적 의사결정농도에서 동등성이 확인되었다. 이 결과는 국민건강영양조사 제7기 (2016-2018) 결과 공표 시 소변 내 cotinine 항목의 질관리 자료로 함께 제공되었다.

⑦ 혈액 내 중금속류(Ni, Cd, Hg, Pb 등 4종) 분석법 마련연구

연구 배경

담배에는 nickel, cadmium, mercury, lead 등 다양한 중금속이 함유되어 있으며, 흡연 시 인체 내에 흡수, 축적되어 암을 비롯한 각종 질병을 유발한다고 알려져 있다. 따라서, 우리나라 인구집단의 체내 중금속 수준을 조사하고, 이에 대한 흡연 기여도를 평가하기 위해 국가 차원의 생물학적 모니터링(Biomonitoring)을 통한 정보 수집이 필요하다. 이에 국민건강영양조사 기반 생체시료를 이용하여 중금속 수준을 파악함으로써 국가건강통계를 생산하고, 흡연 노출 측정을 위한 생체지표로서 활용가능성을 조사하고자 질병관리본부에서는 정책연구용역으로 「흡연폐해 측정지표 조사를 위한 중금속 검사」를 2017.7월부터 2018.5월까지 진행하였다. ICP-MS (7900X ICP-MS, Agilent Technologies, Japan)를 활용하여 대상자(총 의뢰 2,175명)로부터 수집된 혈액에서 납(Pb), 수은(Hg), 카드뮴(Cd) 및 니켈(Ni) 검사를 실시하여 국민건강영양조사 중앙관리시스템에 그 결과를 보고하였고(1), 해당 분석방법을 흡연폐해실험실 내부시험방법 표준절차서를 마련하는데 참고하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 선택

「흡연폐해 측정지표 조사를 위한 중금속 검사('17)」의 분석법(1)을 활용하였으며, 분석장비에 대해서는 에질런트(Agilent)의 샘플 전처리 가이드 및 장비 매뉴얼(2,3) 등을 참고하였다.

2. 시료 전처리

전처리 과정은 먼저 표준용액, 희석용액 및 질산용액을 준비하고 샘플을 준비하였다. 냉동 보관된 샘플을 상온에서 안정화 및 균질화한 후 0.3 mL를 취하여 총 용량이 3 mL가 되도록 하였다. 검정곡선을 위한 표준용액인 혼합표준용액, 내부혼합표준용액을 조제하였다. 별도의 ICP-MS 내부표준물질 주입라인을 이용하지 않을 경우 혼합내부표준용액을 동일량 샘플마다 전부 넣어주었다. 시료분석은 샘플량의 10배를 희석하여 분석하였고, 분석상황에 따라 희석배수 조정이 가능하다. 샘플 총 용량은 3 mL로, 측정순서는 공시료(blank), 검정곡선 저농도, 고농도, 샘플 순이었으며 잔류효과(carry-over)를 최소화하기 위해 시료 중간에 세척액을 넣어주었다(그림 1).

전처리 절차

1) 표준용액, 희석용액 및 질산용액 준비

↓

2) 샘플 준비
- 냉동보관→상온에서 안정화·균질화
- 샘플은 0.3 mL 취함
- 총 용량이 3 mL가 되도록 함(희석용액 2.7 mL 추가)

↓

3) 검정곡선을 위한 표준용액 준비
- 혼합표준용액, 내부혼합표준용액을 조제함

↓

4) 검정곡선 준비
- 별도의 내부표준물질 주입라인 이용하지 않을 경우 샘플 내 혼합내부표준용액 주입

↓

5) 시료분석
- Sample은 최종 10배 희석되도록 준비(희석액 이용, 희석배수 조정 가능)
- Sample 총 용량은 3 mL, 측정순서는 blank, 검정곡선 저농도→고농도, 샘플순
- 20개 샘플마다 1개 이상의 QC(Quality control) 측정
- 시료농도가 검정곡선 농도범위를 벗어날 시, 희석배수 조정

그림 1. 전처리 흐름도

3. 기기분석방법

전처리한 시료를 ICP-MS에 주입하여 분석하기 위해 기기조건 참고치는 고주파 파워(RF power) 1550 V, 에너지 차이(Energy Discrimination) 4.8 V, 헬륨가스 흐름속도 4.0 mL/min으로 통합시료 도입 시스템(Integrated Sample Introduction System, ISIS)의 경우 사전실행(pre-run)에서 샘플 주입은 50초, 0.3 회전/초 속도로 안정화로 25초를 설정하였고, 사후 실행(pre-run)에서 첫 번째 세척은 30초, 0.3 회전/초 속도였고, 두 번째 세척도 첫 번째 설정값과 동일하였다(표 1). 분석항목별 질량으로 Nickel은 60, Cadmium은 111 또는 114, Mercury은 201 또는 202, Lead은 208, 내부표준물질인 Yttrium은 89, Indium은 115, Lutetium은 175였다(표 2).

표 1. ICP-MS 기기조건(사용장비: Agilent 7900)

유도결합플라즈마 질량분석기		
파라미터		설정값
고주파 파워		1550 V
에너지 차이		4.8 V
헬륨 가스		4.0 mL/min
통합 시료 도입 시스템		
사전 실행	샘플주입	50 초, 0.3 회전/초(속도)
	안정화	25 초
사후 실행	세척1	30 초, 0.3 회전/초(속도)
	세척2	30 초, 0.3 회전/초(속도)

표 2. 분석항목별 질량(mass) 등 설정값

연번	분석항목	질량	Integ.Time/Mass [sec]
1	Nickel(Ni)	60	1.0000
2	Cadmium(Cd)	111/114	1.0000
3	Mercury(Hg)	201/202	0.3000
4	Lead(Pb)	208	0.3000
5	Yttrium(Y)	89	0.3000
6	Indium(In)	115	0.3000
7	Lutetium(Lu)	175	0.3000

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 평가(validation)을 위해 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 직선성, 바탕실험 및 잔류효과 실험, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계, 회수율 등이었다.

1) 직선성(linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질 및 내부표준물질을 측정하여 나타난 전기적 신호(counts per seconds, cps)를 이용하여 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.995이상이 되도록 하였다.

2) 바탕실험(blank test) 및 잔류효과실험(carry-over test)

실제 검체 분석시 결과값에 영향을 주는 요소를 고려 또는 제거하기 위해서 실시한다. 검체 내 분석항목 정량시, 전처리과정(희석법 등) 및 기기분석과정에서 시료 농도값에 영향을 줄 수 있는 요인이 발생될 수 있으므로 바탕실험 및 잔류효과실험의 결과를 확인하였고, 검정곡선 농도 0지점(calibration blank) 또는 샘플 공시료를 활용하며 분석직전・중간・직후에 실시하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정확성과 정밀성은 일내(intra-day)[22]으로 검정곡선 농도범위 안의 특정 농도를 하루 동안 최소 3회 반복하여 측정하고, 일간(inter-day)[23]으로 3일에 걸쳐 최소 3회 반복하여 측정한 결과(평균, 표준편차)로 평가하였다. 정확성 실험은 매질을 고려한 공시료(blank) 시료에 서로 다른 3개 농도 (예를 들어 0.5, 1.0, 5.0 μg/L)를 주입(spiking) 한 후, 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하였다.

22) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행
23) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

정밀성 실험은 일내(intra-day) 정밀성과 일간(inter-day) 정밀성을 각각 측정하였다. 일내 정밀성(Intraday precision)은 동일한 날에 1가지 일정 수준의 농도를 3번 이상 반복 측정하여 변동계수를 측정하는 방법을 말하며, 일간 정밀성(interday precision)는 시험 일자를 달리(3일 동안) 하여 서로 다른 3가지 농도 (예를 들어 0.5, 1.0, 5.0 ㎍/L)를 spiking 한 후, 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하였다.

모든 결과에서 평균은 정확성을 판단하는 값으로 (80~120) % 이내인지를 확인하였고, 표준편차는 정밀성을 판단하는 값으로 "편차/평균값 %"로 계산하며 상대표준편차(Relative Standard Deviation, % RSD)가 15 % 이내인지를 확인하였다.

4) 검출 · 정량한계(LOD, LOQ)

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료(0.01 mg/L) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 편차에 10을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

5) 회수율(recovery)

회수율은 실제 샘플에 일정량(저농도, 고농도)을 넣은 후, 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하였다. 최종농도에서 희석배수를 곱해준 결과를 사용하였고, 물질량은 농도와 주입량의 곱으로 계산하고, 주입 전후의 농도는 검정곡선을 통해 산출할 수 있었다. 계산식은 'Recovery(%) = {(주입 후 농도)-(주입전 농도)}×주입량}/주입한 물질량'과 같다.

6) 시험기관간 비교시험

분주한 같은 시료에 대해 정책연구용역 수행기관에서 분석한 결과와 질병관리본부 흡연폐해실험실에서 마련한 분석법으로 측정한 결과를 비교하였다. 검체(혈액)의 수는 10개였고, 검체별로 각 1회씩, 3회 반복측정한 평균값을 반영하였다. 결과판정기준은 질관리용 시료(QC) 허용범위(95 % 신뢰구간) 이내였다. 분석항목별 QC의 95 % 신뢰구간은 니켈의 경우 1.70~2.56 ㎍/L, 카드뮴의 경우 0.23~0.34 ㎍/L, 수은의 경우 1.25~1.88 ㎍/L, 납의 경우 7.9~12.0 ㎍/L이었다.

5. 내부시험방법 절차서 작성

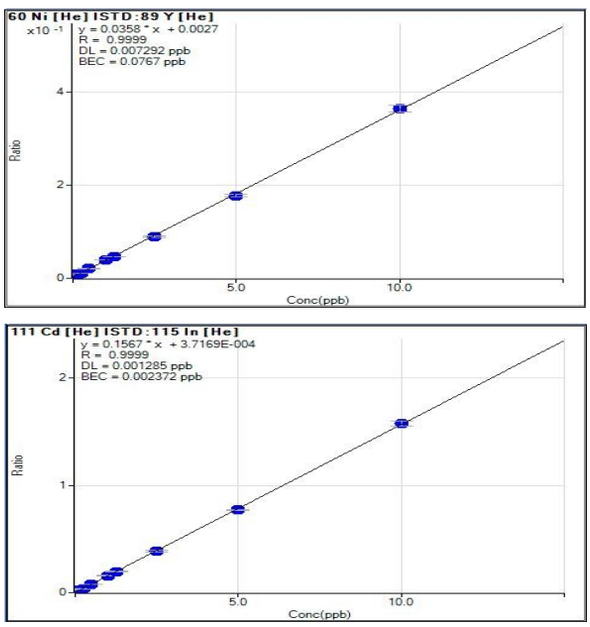
내부시험방법 절차서는 시료 전처리 및 기기분석 방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 희석배수, 시료부피, 농도가 진한 표준용액(stock solution) 조제농도 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 적정수준으로 조정하여 반영하였다.

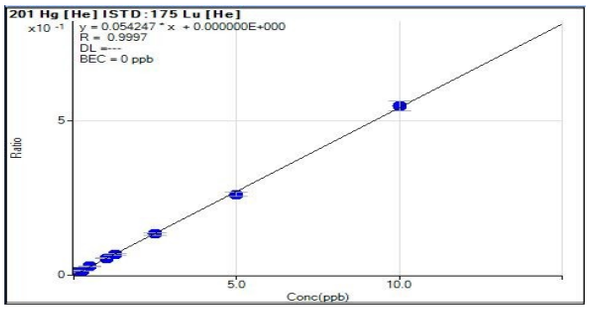
연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 직선성

Cadmium, Lead, Mercury, Nickel의 검정곡선의 직선성은 R^2 0.995 이상임을 확인하였다.(그림 2)





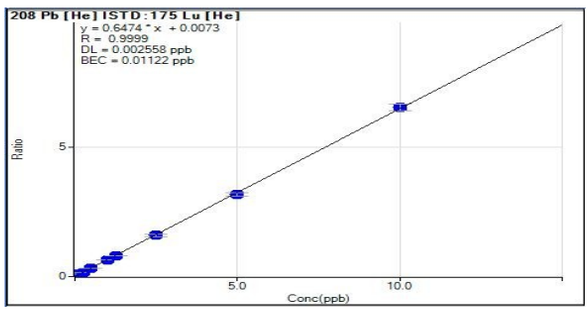


그림 2. 분석항목별 검정곡선

2) 바탕실험 및 잔류효과실험

샘플 전·후로 공시료를 분석한 결과, 분석항목들이 검출되지 않음을 확인하였다(표 3).

표 3. 바탕실험 및 잔류효과실험 결과

샘플분석(분석항목별 농도, μg/L)			
실행	샘플 순서	Nickel	Cadmium
1	공시료	<0.000	<0.000
2	샘플①	0.513	0.501
3	공시료	<0.000	<0.000
4	샘플②	1.030	1.044
5	공시료	<0.000	<0.000
실행	샘플 순서	Mercury	Lead
1	공시료	<0.000	<0.000
2	샘플①	0.494	0.496
3	공시료	<0.000	<0.000
4	샘플②	1.025	1.020
5	공시료	<0.000	<0.000

3) 정밀·정확도 실험

정확성 결과는 nickel의 경우 94.0~106.6 %, cadmium의 경우 92.8~106.3 %, mercury의 경우 95.6~104.6 %, 그리고 lead의 경우 94.3~102.7 %였다(표 4). 정밀성 결과는 일내 정밀성(RSD)의 경우, nickel은 3.9 %, cadmium은 5.9 %, mercury은 3.0 %, lead은 5.6 %였고 일간 정밀성의 경우 nickel은 6.2~7.4 %, cadmium은 1.1~5.5 %, mercury은 2.6~4.6 %, lead은 3.0~4.6 %였다(표 5-6).

표 4. 정확성 결과(n=3)

농도 (μg/L)	Nickel		Cadmium	
	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)
0.5	0.498	99.6	0.495	99.0
1.0	1.066	106.6	1.063	106.3
5.0	4.699	94.0	4.626	92.5
농도 (μg/L)	Mercury		Lead	
	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)
0.5	0.523	104.6	0.497	99.4
1.0	1.041	104.1	1.027	102.7
5.0	4.782	95.6	4.716	94.3

표 5. 일내 정밀성 결과(n=7)

실행	Ni농도 (μg/L)	Cd농도 (μg/L)	Hg농도 (μg/L)	Pb농도 (μg/L)
1	1.22	1.26	1.27	1.22
2	1.23	1.25	1.26	1.24
3	1.29	1.30	1.31	1.33
4	1.16	1.14	1.22	1.18
5	1.17	1.12	1.21	1.12
6	1.16	1.14	1.20	1.16
7	1.20	1.23	1.26	1.23
평균	1.20	1.20	1.25	1.21
편차	0.046	0.071	0.038	0.068
RSD (%)	3.9	5.9	3.0	5.6

표 6. 일간 정밀성 결과(n=3)

Ni 농도 (μg/L)	평균값			평균 /상대 표준 편차(%)
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
0.5	0.498	0.523	0.462	0.49/6.2
1.0	1.066	1.178	1.021	1.09/7.4
5.0	4.699	5.315	5.048	5.02/6.2
Cd 농도 (μg/L)	평균값			평균 /상대 표준 편차(%)
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
0.5	0.495	0.489	0.484	0.49/1.1
1.0	1.063	1.114	0.997	1.06/5.5
5.0	4.626	5.098	5.004	4.91/5.1
Hg 농도 (μg/L)	평균값			평균 /상대 표준 편차(%)
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
0.5	0.523	0.556	0.534	0.54/3.1
1.0	1.041	1.061	1.007	1.04/2.6
5.0	4.782	5.243	5.030	5.02/4.6
Pb 농도 (μg/L)	평균값			평균 /상대 표준 편차(%)
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
0.5	0.497	0.507	0.478	0.49/3.0
1.0	1.027	1.077	1.009	1.04/3.4
5.0	4.716	5.163	5.029	4.97/4.6

4) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Nickel의 경우 검출 및 정량한계는 0.037 μg/L, 0.118 μg/L, cadmium의 경우 0.018 μg/L, 0.058 μg/L, mercury의 경우 0.014 μg/L, 0.044 μg/L, 그리고 lead의 경우 0.012 μg/L, 0.040 μg/L였다(표 7-8).

표 7. 검출 및 정량한계 실험결과(Ni, Cd)

Ni		계산 농도 (μg/L)	Cd		계산 농도 (μg/L)
실행	주입 농도		실행	주입 농도	
1	0.05	0.057	1	0.05	0.063
2	0.05	0.054	2	0.05	0.052
3	0.05	0.045	3	0.05	0.052
4	0.05	0.060	4	0.05	0.064
5	0.05	0.066	5	0.05	0.050
6	0.05	0.033	6	0.05	0.051
7	0.05	0.065	7	0.05	0.056
Mean		0.054	Mean		0.055
SD		0.012	SD		0.006
LOD		0.037	LOD		0.018
LOQ		0.118	LOQ		0.058

표 8. 검출 및 정량한계 실험결과(Hg, Pb)

Hg		계산 농도 (μg/L)	Pb		계산 농도 (μg/L)
실행	주입 농도		실행	주입 농도	
1	0.05	0.046	1	0.05	0.056
2	0.05	0.044	2	0.05	0.047
3	0.05	0.046	3	0.05	0.053
4	0.05	0.038	4	0.05	0.051
5	0.05	0.035	5	0.05	0.048
6	0.05	0.038	6	0.05	0.046
7	0.05	0.039	7	0.05	0.055
Mean		0.041	Mean		0.051
SD		0.004	SD		0.004
LOD		0.014	LOD		0.012
LOQ		0.044	LOQ		0.040

5) 회수율

Nickel의 경우 회수율은 80.0~97.0 %, cadmium의 경우 82.4~95.7 %, mercury의 경우 93.5~111.0 %, 그리고 lead의 경우 85.6~93.6 %였다.

표 9. 회수율 실험결과

주입 추가 농도 (μg/L)	Ni 농도 (μg/L) 전	Ni 농도 (μg/L) 후	Ni 회수율 (%)	주입 추가 농도 (μg/L)	Cd 농도 (μg/L) 전	Cd 농도 (μg/L) 후	Cd 회수율 (%)
20	0.8	16.8	80.0	10	0.2	9.01	88.5
	0	17.6	87.9		0	8.24	82.4
	0.1	19.5	97.0		0	9.57	95.7
40	0.8	34.9	85.4	20	0.2	17.7	87.8
	0	37.0	92.6		0	17.8	89.1
	0.1	36.5	91.2		0	18.6	93.1

주입 추가 농도 (μg/L)	Hg 농도 (μg/L) 전	Hg 농도 (μg/L) 후	Hg 회수율 (%)	주입 추가 농도 (μg/L)	Pb 농도 (μg/L) 전	Pb 농도 (μg/L) 후	Pb 회수율 (%)
40	4.4	43.2	96.9	200	9.2	180	85.6
	0	39.4	98.6		10	184	87.0
	0	44.4	111		9.8	197	93.6
80	4.4	79.2	93.5	400	9.2	353	85.9
	0	76.3	95.3		10	373	90.7
	0	76.1	95.1		9.8	366	89.0

6) 시험기관간 비교시험

정책연구용역수행기관에서 측정한 결과값 대비 56~112 %로 측정되었다. 이 때 QC는 허용범위 이내의 87~118 %를 보여 결과판정 기준을 만족하였다.

QC분석은 각 2회씩 진행하였고, 1회 진행시 3회 반복측정한 평균값을 반영하였다. 니켈은 2.09 μg/L, 2.24 μg/L, 카드뮴은 0.30 μg/L, 0.30 μg/L, 수은은 1.67 μg/L, 1.86 μg/L, 납은 9.82 μg/L, 9.82 μg/L였다(표 10).

표 10. QC 분석결과(단위: μg/L)

No.	니켈 평균	No.	카드뮴 평균
1	2.09	1	0.30
2	2.24	2	0.30
No.	**수은 평균**	**No.**	**납 평균**
1	1.67	1	9.82
2	1.86	2	9.82

10개 검체(혈액) 분석은 각 1회씩, 3회 반복측정한 평균값을 반영하였다. 니켈의 경우 평균 0.36~0.63 μg/L, 카드뮴의 경우 평균 0.28~4.62 μg/L, 수은의 경우 평균 1.23~6.67 μg/L, 카드뮴의 경우 평균 11.15~30.65 μg/L였다(표 11).

표 11. 검체(혈액) 분석결과 비교(단위: μg/L)

No.	니켈 질병청	니켈 녹십자	No.	카드뮴 질병청	카드뮴 녹십자
1	0.36	0.61	1	0.28	0.50
2	0.49	0.61	2	4.62	4.79
3	0.43	0.60	3	1.84	2.05
4	0.50	0.59	4	1.30	1.48
5	0.41	0.56	5	1.20	1.32
6	0.63	0.56	6	0.52	0.79
7	0.50	0.55	7	0.74	0.92
8	0.37	0.55	8	0.59	0.69
9	0.56	0.55	9	3.00	3.27
10	0.50	0.54	10	3.32	3.16
No.	**수은 질병청**	**수은 녹십자**	**No.**	**납 질병청**	**납 녹십자**
1	1.23	1.26	1	22.11	24.5
2	1.38	1.34	2	28.24	30.1
3	2.90	2.89	3	15.28	16.2
4	3.57	3.23	4	11.15	12.0
5	3.06	2.87	5	17.04	17.9
6	2.95	3.25	6	11.80	14.4
7	3.19	3.13	7	30.65	33.2
8	6.67	6.71	8	12.20	12.7
9	2.35	2.40	9	23.39	24.6
10	1.65	1.57	10	22.05	22.6

2. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: (KDCA-M-10) ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법

나. 제개정일: 2019.12.31.

2020.12.31.

다. 분석방법

1) 검체 및 시약

① 검체

검체는 혈액(전혈)을 말하며, 무작위 수집, 침전물 발견, 용기 파손 및 전처리과정 중 소실이 발생한 검체는 부적합검체로 분류하

여 시험하지 않는다. 검체 수령 후 분석상황에 따라 냉장 또는 냉동보관한다. 보관시, tube 등과 같은 용기에 분주한 후 식별이 가능하도록 검체이름, 개봉날짜 등을 기록한다. 채취한 검체는 아이스박스 등을 이용하여 냉동 또는 냉장상태로 당일배송하고, 분석시까지 -20 ℃ 이하에서 동결 보관하며, 동결 검체는 검사 전 상온에서 완전히 해동하여 안정화시킨 다음, 충분히 혼합 후 사용한다. 사용이 완료된 잔여검체는 실험실 생물안전지침에 따라 적합한 폐기용기에 밀봉하여 버린다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품을 사용하고, 그 외는 정량분석용 시약을 사용하며, 구입가능시 인증표준물질을 선택한다(표 12). 표준물질(분석항목) 사용시 유효기간을 확인하고 사용하고, 내부표준물질은 Gallium(^{71}Ga), Germanium(^{72}Ge), Yttrium(^{89}Y), Rhodium(^{103}Rh), Indium(^{115}In), Tellurium(^{125}Te), Rhenium(^{185}Re), Iridium(^{193}Ir), Thallium(^{205}Tl), Lutetium(^{175}Lu) 등 분석에 적합한 물질을 선택적으로 사용하며, 본 시험법에서는 Yttrium(^{89}Y), Indium(^{115}In), Lutetium(^{175}Lu)을 사용하였다. 그리고, 유도결합플라즈마 질량분석기(ICP-MS) 가동을 위해 고순도 아르곤(Ar) 가스 및 초고순도 헬륨(He) 가스를 준비하였다.

표 12. 시약 등 목록

연번	시약명
1	Cadmium(Cd)
2	Lead(Pb)
3	Mercury(Hg)
4	Nickel(Ni)
5	Nitric acid(HNO_3)
6	Hydrochloric acid(HCl)
7	Gold(Au)
8	Triton X-100
9	1-Butanol
10	Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)

③ 조제용 시약

Triton X-100(10 %, 10 mL)의 경우, 10 mL 이상의 플라스틱(polypropylene(PP) or teflon) 용기에 증류수(18 MΩcm)를 5 mL 정도 넣은 후 Triton X-100 1 mL를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 (1~5) % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 총 용량이 10 mL가 되도록 증류수(18 MΩcm)로 채우고 충분히 혼합시키고, 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

Standard solution(1% HNO_3 + 0.5% HCl, 1 L)의 경우, 1 L 플라스틱(polypropylene(PP) or teflon) 용기에 증류수(18 MΩcm)를 반절 정도 넣은 후 질산 10 mL, 염산 5 mL를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 (1~5) % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 총 용량이 1 L가 되도록 증류수(18 MΩcm)로 채우고 충분히 혼합시키고, 실험여건에 따라 질산으로만 조제가능하며, 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

혼합내부표준용액①(20 mg/L, 40 mL)의 경우, 50 mL 이상의 플라스틱(PP or teflon) 용기에 1 % 질산 20 mL 정도를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 5 % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 내부표준물질의 개별 또는 혼합 표준품(또는 stock solution) 농도를 고려하여 일정량을 넣는다. 예를 들어 표준품별로 1 000 mg/L일 경우 0.8 mL를 넣는다(50배 희석). 총 용량이 40 mL가 되도록 1 % 질산 또는 dilution solution으로 채우고, 조제 후 유효기간은 1년으로 한다. 그리고, 구입가능시 인증된 혼합내부표준용액 표준품을 사용한다.

혼합내부표준용액②(10 μg/L, 40 mL)의 경우, 50 mL 이상의 플라스틱(PP or teflon) 용기에 1 % 질산 20 mL 정도를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 5 % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 혼합내부표준용액 20 μL를 넣고 총 용량이 40 mL가 되도록 1 % 질산 또는 dilution solution으로 채운다(2 000배 희석). 조제 후 유효기간은 1년으로 하고, 구입가능시 인증된 혼합내부표준용액 표준품을 사용한다.

Dilution solution의 경우, 표준물질 용액 및 시료 조제시 사용되고, 10 % Triton X-100 5 g, Butanol 15 g(비중 0.81) 넣음, EDTA 0.5 g, 25 % NH_4OH 5 g(비중 약 0.9)을 각각 넣고 총 용량이 1 L가 되도록 증류수로 채운다. 내부표준물질(ISTD)을 추가하여 넣을 수 있고, ICP-MS 라인 세척용(희석 가능)으로 사용 가능하며, 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

ICP-MS rinse solution(0.05 % Triton X-100, 1 L)의 경우, 분석기기 라인 세척시 사용하고 10 % Triton X-100을 5.0 g 넣고 증류수로 총 용량 1 L가 되도록 채운다. 그리고 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

3 % (v/v) Nitric acid (or Hydrochloric acid) solution(1 L)의 경우, 표준물질 용액 조제시와 분석기기 라인 세척시 사용하고 1 L 플라스틱(polypropylene(PP) or teflon) 용기에 증류수(18 MΩcm)를 500 mL 넣고, 30 mL의 고순도(high purity concentrated) 질산(또는 염산)을 넣는다. 총 용량이 1 L가 되도록 증류수를 넣고 % 농도(1 % ~ 5 %)를 달리하여 조제할 수 있다. 금(gold)을 추가하는 등 조제방법을 변경・적용할 수 있으며 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

Stock 혼합표준용액의 경우, 단일 인증표준용액을 사용하여 stock 혼합표준용액 50 g 조제가능하고(표 13), 혼합된 인증표준용액 표준품(e.g. 10 mg/L)을 사용하여 stock 혼합표준용액 10 mL 조제가능하다(표 14).

표 13. 단일인증표준물질 stock 조제방법

Standard	CRM Conc. (mg/L)	Weight (g) of CRM	Total Weight (g)	Final Conc. (mg/L)
Cadmium	1 000	0.020	50	Cd 0.4 mg/L, Ni 0.8 mg/L, Pb 8.0 mg/L, Hg 1.6 mg/L (mixed)
Nickel	1 000	0.040		
Lead	1 000	0.400		
Mercury	1 000	0.080		
HNO_3+HCl	-	Mass-up		

표 14. 혼합인증표준물질 조제방법

Used / Mixed conc.(mg/L)	Stock conc. (mg/L)	Spiked volume (mL)	Standard solution (mL)	비고
0.1	10	0.1	9.9	100배 희석

검정곡선을 위한 혼합표준용액①,②,③,④의 경우, Stock 혼합표준용액 3 g과 standard solution 27 g을 섞어 10배 희석인 혼합표준용액①을 조제하고, 혼합표준용액① 15 g과 standard solution 15 g을 섞어 2배 희석인 혼합표준용액②를 조제한다. 그 다음 혼합표준용액② 15 g과 standard solution 15 g을 섞어 2배 희석인 혼합표준용액③을 조제하고, 혼합표준용액③ 15 g과 standard solution 15 g을 섞어 2배 희석인 혼합표준용액④를 조제한다. 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

검정곡선 작성시 혼합 표준용액의 경우, 1차, 2차, 3차 및 4차 혼합 표준용액을 사용하여 총 용량 7.2 mL로 맞추어 검정곡선은 12배, 샘플은 24배 희석한다(표 15). 분석항목별 적정 농도범위에 해당하는 검정곡선 농도 지점을 표 16을 참고하여 적용가능하며 샘플의 경우 10배 희석한다. 수은(Hg) 분석시, 수은 농도의 50~100배 이상의 금(Au)이 들어가도록 하여 잔류효과(carry-over effect)를 방지하고, 질관리(Quality control, QC) 표준물질은 검정곡선 농도범위 또는 시료검출 농도수준을 고려하여 정하고, 샘플 분석 시 같이 확인한다.

표 15. 단일인증표준물질 검정곡선 준비

Used / Labeling	DW (mL)	Standard (mL)	Dilution solution (mL)	Sample or QC (mL)
Blank	1.2	-	6	-
C0				
C1	0.6	혼합표준① 0.6		-
C2	0.6	혼합표준② 0.6		-
C3	0.6	혼합표준③ 0.6		-
C4	0.6	혼합표준④ 0.6		-
Sample or QC	0.9	-		0.3

표 16. 혼합인증표준물질 검정곡선 준비

Used / Final conc. (μg/L)	Mixed conc. (μg/L)	Spiked volume (mL)	Dilution Solution (mL)	비고
10	100	1	9	Total volume 10 mL
5	100	0.5	9.5	
1	100	0.1	9.9	
0.5	100	0.05	9.95	
0.1	100	0.01	9.99	
0	100	0	10	
-	Sample or QC	0.3	2.7	Total volume 3 mL

2) 장치 및 장비

주요장비인 유도결합 플라즈마(Inductively Coupled Plasma, ICP) system(Agilent 7900과 유사한 기종), 질량분석기(Mass spectrometer, MS)로 기기분석한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초저온 냉동고, 냉장고, 분석용 전자저울, 볼텍서, 초순수제조장치 등이 있다(표 17).

표 17. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL, 5 000 μL	검정곡선, 시료 조제
초저온 냉동고	U-570	검체 보관
냉장고	4 ℃	시약 및 검체 보관
분석용 전자저울	XPE205	시약 조제
볼텍서(Vortexer)	VS-130SH	균질 혼합
초순수 제조장치	MILLI-Q DIRECT 8	시약 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

전처리 절차

1) 표준용액, 희석용액 및 질산용액 준비

↓

2) 샘플 준비(희석배수 조정 가능)
- 냉동보관→상온에서 안정화·균질화
- 샘플은 0.3 mL 취함
- 총 용량이 3 mL가 되도록 함(희석용액 2.7 mL 추가)

↓

3) 검정곡선을 위한 표준용액 준비
- 혼합표준용액, 내부혼합표준용액을 조제함

↓

4) 검정곡선 준비
- 별도의 내부표준물질 주입라인 이용하지 않을 경우 혼합내부표준용액을 동일량 샘플마다 전부 넣어주어야 함.

↓

5) 시료분석
- Sample은 희석액을 사용하여 최종 10배 희석이 되도록 준비(희석배수 조정 가능)
- Sample 총 용량은 3 mL, 측정순서는 blank, 검정곡선 저농도→고농도, 샘플순
- 20개 샘플마다 1개 이상의 QC(Quality control) 측정
- 시료농도가 검정곡선 농도범위를 벗어날 시, 희석배수 조정

그림 3. 절차 흐름도

② ICP-MS 조건

표 18. 분석장비 기기조건

Inductively Coupled Plasma(ICP)-Mass Spectrometer(MS)		
Parameter		Setting
RF power		1550 V
Energy Discrimination		4.8 V
He gas		4.0 mL/min
Integrated Sample Introduction System(ISIS)		
Pre Run	Sample uptake	50 s, 0.3 r/s(speed)
	Stabilize	25 s
Post Run	Rinse1	30 s, 0.3 r/s(speed)
	Rinse2	30 s, 0.3 r/s(speed)

표 19. 분석항목별 mass 및 Integ.Time/Mass[sec]

No.	Standard	Mass	Integ.Time/Mass[sec]
1	Nickel(Ni)	60	1.0000
2	Cadmium(Cd)	111/114	1.0000
3	Mercury(Hg)	201/202	0.3000
4	Lead(Pb)	208	0.3000
5	Yttrium(Y)	89	0.3000
6	Indium(In)	115	0.3000
7	Lutetium(Lu)	175	0.3000

라. 검증보고서 구성 및 내용

직선성(linearity), 바탕실험(blank test)·잔류효과실험(carryover test), 정밀도(precision)·정확도(accuracy), 검출한계(limit of detection)·정량한계(limit of quantification), 회수율(recovery) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.995 이상임을 확인하였다. 바탕실험 및 잔류효과실험 결과, 분석항목들이 검출이 되지 않음을 확인할 수 있다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 8 % 이내였고, 정확도는 92.5 ~ 106.6 % 범위였으며, 검출한계 및 정량한계의 경우 nickel은 0.037 μg/L, 0.118 μg/L, cadmium은 0.018 μg/L, 0.058 μg/L, mercury은 0.014 μg/L, 0.044 μg/L, 그리고 lead은 0.012 μg/L, 0.040 μg/L였다. 회수율의 경우 nickel은 80.0~97.0 %, cadmium은 82.4~95.7 %, mercury은 93.5~111.0 %, lead은 85.6~93.6 %였다.

참고문헌

1. Green Cross Labs. 2018. Determination of Heavy Metals as an Indicator of Hazard from Smoking.
2. Agilent Technologies. 2017. Clinical Sample Preparation Guide(v3) / Agilent 7900 Edition
3. Agilent ICP-MS equipment manual. 2017.

⑧ 담배흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범 연구

연구 배경

담배 주류연(에어로졸 포함) 및 전자장치 내에 존재하는 주요 중금속 성분으로 cadmium, lead, tin, aluminium, nickel, chromium 등 6종을 선정하였다. 카드뮴, 크롬, 니켈, 납은 궐련 주류연 성분(1), 주석과 알루미늄은 궐련형 전자담배 에어로졸 성분(2), 니켈은 액상형 전자담배 기기구성 성분(3), 그리고 알루미늄, 카드뮴, 크롬, 니켈, 납은 액상형 전자담배 에어로졸 성분으로(4), 금속형태의 장치를 활용하여 흡연하는 전자담배, 궐련형 전자담배 등의 경우에도 중금속 노출이 우려되어 소변 내에 존재하는 중금속을 분석하고자 하였다. 이를 위해 소변 내 중금속 분석법을 마련하고, 흡연자 및 비흡연자 소변에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 선택

국립환경과학원(5,6), Veikhman GA et al.(7) 등에서 제시하는 「희석(dilution)-ICP/MS 분석법」을 선택하였고, 분석장비 회사인 에질런트(Agilent)의 샘플 전처리 가이드 및 장비 매뉴얼(8,9) 등을 참고하였다.

2. 시료 전처리

「희석(dilution)-ICP/MS 분석법」에 따른 전처리 과정으로 먼저 표준용액 등 질산용액을 준비하였다. 냉동 또는 냉장보관된 샘플을 상온에서 안정화 후 균질화시켜주고, 1.0 mL를 취한 후 총 용량이 10 mL가 되도록 하였다. 그 다음 검정곡선을 위한 표준용액인 혼합표준용액 10 mg/L를 0.1 mg/L로 100배 희석시키고, 내부표준용액은 10 ㎍/L 수준으로 준비하였다. 검정곡선은 농도지점을 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ㎍/L로 정하고 혼합인증표준물질로 조제하였다. 샘플과 QC는 희석액을 사용하여 최종 10배가 희석되도록 준비하였고, 20개 샘플마다 1개 이상의 QC를 측정하였다(그림 1).

전처리 절차

1) 표준용액 등 질산 용액 준비

↓

2) 샘플 준비
- 냉동 또는 냉장보관→상온에서 안정화·균질화
- 샘플은 1.0 mL 취함
- 총 용량이 10 mL가 되도록 함(희석용액 9 mL 추가)

↓

3) 검정곡선을 위한 표준용액 준비
- 혼합표준용액 10 mg/L를 0.1 mg/L로 100배 희석
- 내부표준용액 10 ㎍/L 수준으로 준비
  (감도를 고려하여 농도 조정 가능)

↓

4) 검정곡선 및 시료분석 준비
- 농도지점을 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ㎍/L로 정하고, 혼합인증표준물질로 조제
- 샘플과 QC는 희석액을 사용하여 최종 10배 희석이 되도록 준비(희석배수 조정 가능)
- 20개 샘플마다 1개 이상의 QC(Quality control) 측정

그림 1. 전처리 흐름도

3. 기기분석방법

전처리한 시료를 ICP-MS에 주입하여 분석하기 위해 기기조건 참고치는 고주파 파워(RF power) 1550 V, 에너지 차이(Energy Discrimination) 4.8 V, 헬륨가스 흐름속도 4.0 mL/min으로 통합시료도입시스템(Integrated Sample Introduction System, ISIS)의 경우 사전실행(pre-run)에서 샘플 주입은 45초, 0.3 회전/초 속도로 안정화로 70초를 설정하였고, 사후 실행(pre-run)에서 첫 번째 세척은 30초, 0.3 회전/초 속도였고, 두 번재 세척도 첫 번째 설정값과 동일하였다(표 1). 분석항목별 질량으로 Aluminium은 27, Chromium은 52, Nickel은 60, Cadmium은 111 또는 114, Tin은 118, Lead은 208이었고, 내부표준물질인 Yttrium은 89, Indium은 115, Lutetium은 175였다(표 2).

표 1. ICP-MS 기기조건(사용장비: Agilent 7900)

유도결합플라즈마 질량분석기		
파라미터		설정값
고주파 파워		1550 V
에너지 차이		4.8 V
헬륨 가스		4.0 mL/min
통합 시료 도입 시스템		
사전 실행	샘플주입	45 초, 0.3 회전/초(속도)
	안정화	70 초
사후 실행	세척1	30 초, 0.3 회전/초(속도)
	세척2	30 초, 0.3 회전/초(속도)

표 2. 분석항목별 질량(mass) 등 설정값

연번	분석항목	질량	Integ.Time/Mass[sec]
1	Aluminium(Al)	27	1.0000
2	Chromium(Cr)	52	1.0000
3	Nickel(Ni)	60	1.0000
4	Cadmium(Cd)	111/114	1.0000
5	Tin(Sn)	118	1.0000
6	Lead(Pb)	208	0.3000
7	Yttrium(Y)	89	0.3000
8	Indium(In)	115	0.3000
9	Lutetium(Lu)	175	0.3000

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 평가(validation)을 위해 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 직선성, 바탕실험 및 잔류효과 실험, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계, 회수율 등이었다.

1) 직선성(linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질 및 내부표준물질을 측정하여 나타난 전기적 신호(counts per seconds, cps)를 이용하여 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.995이상이 되도록 하였다.

2) 바탕실험(blank test) 및 잔류효과실험(carry-over test)

실제 검체 분석시 결과값에 영향을 주는 요소를 고려 또는 제거하기 위해서 실시한다. 검체 내 분석항목 정량시, 전처리과정(희석법 등) 및 기기분석과정에서 시료 농도값에 영향을 줄 수 있는 요인이 발생될 수 있으므로 바탕실험 및 잔류효과실험의 결과를 확인하였고, 검정곡선 농도 0지점(calibration blank) 또는 샘플 공시료를 활용하며 분석직전 · 중간 · 직후에 실시하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정확성과 정밀성은 일내(intra-day)[24]으로 검정곡선 농도범위 안의 특정 농도를 하루 동안 최소 3회 반복하여 측정하고, 일간(inter-day)[25]으로 3일에 걸쳐 최소 3회 반복하여 측정한 결과(평균, 표준편차)로 평가하였다. 정확성 실험은 매질을 고려한 공시료(blank) 시료에 서로 다른 3개 농도 (예를 들어 1.0, 2.5, 5.0 ㎍/L)를 주입(spiking) 한 후, 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하였다.

정밀성 실험은 일내(intra-day) 정밀성과 일간(inter-day) 정밀성을 각각 측정하였다. 일내 정밀성(Intraday precision)은 동일한 날에 1가지 일정 수준의 농도를 3번 이상 반복 측정하여 변동계수를 측정하는 방법을 말하며, 일간 정밀성(interday precision)는 시험 일자를 달리(3일 동안) 하여 서로 다른 3가지 농도 (예를 들어 1.0, 2.5, 5.0 ㎍/L)를 spiking 한 후, 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하였다.

24) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행
25) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

모든 결과에서 평균은 정확성을 판단하는 값으로 (80~120) % 이내인지를 확인하였고, 표준편차는 정밀성을 판단하는 값으로 “편차/평균값 %” 로 계산하며 상대표준편차(Relative Standard Deviation, % RSD)가 15 % 이내인지를 확인하였다.

4) 검출 · 정량한계(LOD, LOQ)

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료(0.01 mg/L) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 편차에 10을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

5) 회수율(recovery)

회수율은 실제 샘플에 일정량(저농도, 고농도)을 넣은 후, 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하였다. 최종농도에서 희석배수를 곱해준 결과를 사용하였고, 물질량은 농도와 주입량의 곱으로 계산하고, 주입 전후의 농도는 검정곡선을 통해 산출할 수 있었다. 계산식은 ‘Recovery(%) = {(주입 후 농도)-(주입전 농도)}×주입량}/주입한 물질량’과 같다.

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 「희석-ICP/MS」 분석법의 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 희석배수, 시료부피, 검정곡선 농도지점 및 내부표준물질 선택 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다.

6. 조사대상 및 시료분석

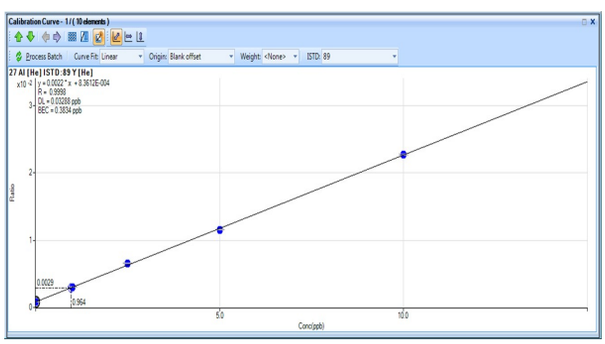
2019년 8월부터 2020년 3월까지 충북 청주시 소재 오송생명과학단지 내 만 19세 이상 65세 이하 성인 남녀를 대상으로 흡연자 28명, 비흡연자 16명의 소변을 채취하였다(IRB번호: 2019-05-03). 흡연자 28명을 담배유형별로 구분하면 궐련 13명, 궐련형 전자담배 11명, 복합 3명, 액상형 전자담배 1명이었고, 마련된 시험법으로 총 44개 소변시료 내 중금속 6종을 분석하였다.

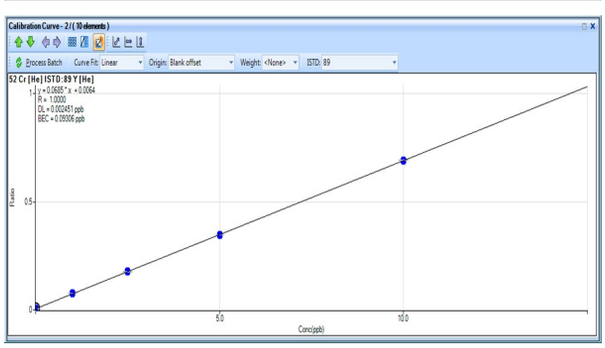
연구 결과

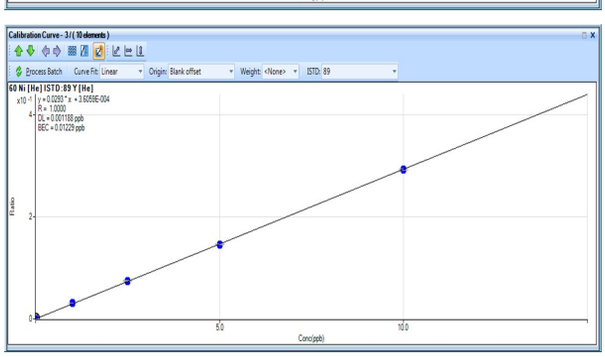
1. 유효화 실험결과

1) 직선성

Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Tin, Lead의 검정곡선의 직선성은 R^2 0.995 이상임을 확인하였다.(그림 2)







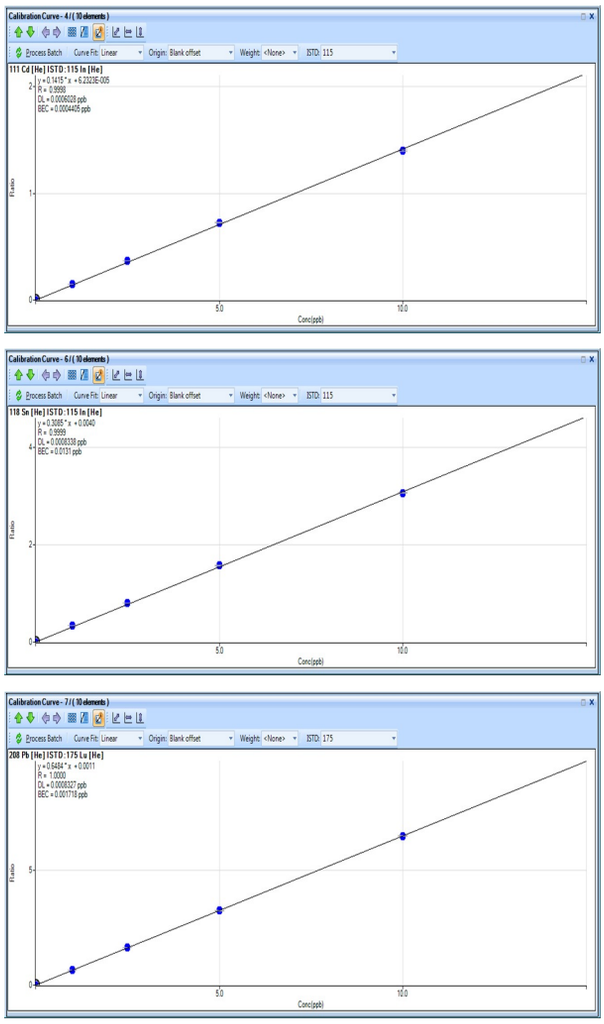


그림 2. 분석항목별 검정곡선

2) 바탕실험 및 잔류효과실험

샘플 전・후로 공시료를 분석한 결과, 분석항목들이 검출되지 않음을 확인하였다(표 3).

표 3. 바탕실험 및 잔류효과실험 결과

샘플분석(분석항목별 농도, μg/L)				
실행	샘플순서	Al	Cr	Ni
1	공시료	<0.1	<0.01	<0.01
2	샘플	2.215	2.213	2.195
3	공시료	<0.1	<0.01	<0.01
4	샘플	2.238	2.194	2.189
5	공시료	<0.1	<0.01	<0.01
실행	샘플순서	Cd	Sn	Pb
1	공시료	<0.01	<0.01	<0.001
2	샘플	2.315	2.361	2.154
3	공시료	<0.01	<0.01	<0.001
4	샘플	2.268	2.351	2.168
5	공시료	<0.01	<0.01	<0.001

3) 정밀・정확도 실험

정확성 결과는 Aluminium의 경우 95.2~98.6 %, Chromium의 경우 98.9~100.4 %, Nickel의 경우 100.5~101.5 %, Cadmium의 경우 103.1~106.3 %, Tin의 경우 102.2~106.9 %, 그리고 Lead의 경우 100.4~101.9 %였다(표 4). 정밀성 결과는 일내 정밀성(RSD)의 경우, Aluminium은 3.9 %, Chromium은 1.2 %, Nickel은 1.4 %, Cadmium은 1.9 %, Tin은 1.6 %, Lead은 0.5 %였고 일간 정밀성의 경우 Aluminium은 1.2~9.5 %, Chromium은 1.1~2.4 %, Nickel은 1.1~3.3 %, Cadmium은 2.05~2.09 %,, Tin은 1.9~2.4 %, Lead은 1.2~2.9 %였다(표 5-6).

표 4. 정확성 결과(n=3)

농도 (μg/L)	Aluminium		Chromium	
	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)
1.0	0.952	95.2	1.004	100.4
2.5	2.417	96.7	2.472	98.9
5.0	4.932	98.6	4.964	99.3
농도 (μg/L)	Nickel		Cadmium	
	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)
1.0	1.015	101.5	1.063	106.3
2.5	2.512	100.5	2.578	103.1
5.0	5.040	100.8	5.156	103.1
농도 (μg/L)	Tin		Lead	
	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)	평균농도 (μg/L)	정확성 (%)
1.0	1.069	106.9	1.019	101.9
2.5	2.566	102.6	2.509	100.4
5.0	5.109	102.2	5.056	101.1

표 5. 일내 정밀성 결과(n=7)

실행	Al 농도 (μg/L)	Cr 농도 (μg/L)	Ni 농도 (μg/L)
1	0.942	1.012	1.032
2	0.984	0.993	0.996
3	0.968	1.011	1.030
4	0.951	0.984	1.009
5	0.884	0.999	1.024
6	0.929	1.018	1.002
7	0.992	1.004	1.020
평균	0.95	1.00	1.02
편차	0.037	0.012	0.014
RSD (%)	3.9	1.2	1.4

실행	Cd 농도 (μg/L)	Sn 농도 (μg/L)	Pb 농도 (μg/L)
1	1.053	1.072	1.031
2	1.087	1.098	1.023
3	1.023	1.052	1.021
4	1.070	1.066	1.025
5	1.062	1.079	1.018
6	1.050	1.064	1.027
7	1.054	1.048	1.017
평균	1.06	1.07	1.02
편차	0.020	0.017	0.005
RSD (%)	1.9	1.6	0.5

표 6. 일간 정밀성 결과(n=3)

Al 농도 (μg/L)	평균값			평균 /상대 표준 편차(%)
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
1.0	0.952	0.912	1.091	0.99/9.54
2.5	2.417	2.361	2.398	2.39/1.19
5.0	4.932	4.731	5.074	4.91/3.51
Cr 농도 (μg/L)	**평균값**			**평균 /상대 표준 편차(%)**
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
1.0	1.004	0.997	1.018	1.01/1.06
2.5	2.472	2.438	2.359	2.42/2.39
5.0	4.964	4.852	5.008	4.94/1.63
Ni 농도 (μg/L)	**평균값**			**평균 /상대 표준 편차(%)**
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
1.0	1.015	0.999	1.019	1.01/1.05
2.5	2.512	2.464	2.355	2.44/3.29
5.0	5.040	4.895	4.994	4.98/1.49
Cd 농도 (μg/L)	**평균값**			**평균 /상대 표준 편차(%)**
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
1.0	1.063	1.025	1.063	1.05/2.09
2.5	2.578	2.523	2.474	2.53/2.06
5.0	5.156	4.965	5.132	5.08/2.05
Sn 농도 (μg/L)	**평균값**			**평균 /상대 표준 편차(%)**
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
1.0	1.069	1.029	1.049	1.05/1.91
2.5	2.566	2.506	2.461	2.51/2.10
5.0	5.109	4.924	5.152	5.06/2.39
Pb 농도 (μg/L)	**평균값**			**평균 /상대 표준 편차(%)**
	1일 (μg/L)	2일 (μg/L)	3일 (μg/L)	
1.0	1.019	0.996	1.016	1.01/1.24
2.5	2.509	2.458	2.371	2.45/2.85
5.0	5.056	4.920	5.009	5.00/1.38

4) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

Aluminium의 경우 검출 및 정량한계는 0.050 μg/L, 0.167 μg/L, Chromium의 경우 0.003 μg/L, 0.012 μg/L, Nickel의 경우 0.008 μg/L, 0.025 μg/L, Cadmium의 경우 0.003 μg/L, 0.011 μg/L, Tin의 경우 0.003 μg/L, 0.011 μg/L, 그리고 Lead의 경우 0.004 μg/L, 0.014 μg/L였다(표 7-9).

표 7. 검출 및 정량한계 실험결과(Al, Cr)

Al		계산 농도 (μg/L)	Cr		계산 농도 (μg/L)
실행	주입 농도		실행	주입 농도	
1	0.1	0.105	1	0.1	0.097
2	0.1	0.117	2	0.1	0.096
3	0.1	0.086	3	0.1	0.097
4	0.1	0.085	4	0.1	0.096
5	0.1	0.081	5	0.1	0.094
6	0.1	0.098	6	0.1	0.095
7	0.1	0.124	7	0.1	0.097
Mean		0.099	Mean		0.096
SD		0.017	SD		0.001
LOD		0.050	LOD		0.003
LOQ		0.167	LOQ		0.012

표 8. 검출 및 정량한계 실험결과(Ni, Cd)

Ni		계산 농도 (μg/L)	Cd		계산 농도 (μg/L)
실행	주입 농도		실행	주입 농도	
1	0.1	0.096	1	0.1	0.100
2	0.1	0.093	2	0.1	0.100
3	0.1	0.098	3	0.1	0.102
4	0.1	0.098	4	0.1	0.099
5	0.1	0.101	5	0.1	0.101
6	0.1	0.097	6	0.1	0.099
7	0.1	0.095	7	0.1	0.101
Mean		0.097	Mean		0.100
SD		0.003	SD		0.001
LOD		0.008	LOD		0.003
LOQ		0.025	LOQ		0.011

표 9. 검출 및 정량한계 실험결과(Sn, Pb)

Sn		계산 농도 (μg/L)	Pb		계산 농도 (μg/L)
실행	주입 농도		실행	주입 농도	
1	0.1	0.100	1	0.1	0.098
2	0.1	0.099	2	0.1	0.097
3	0.1	0.099	3	0.1	0.099
4	0.1	0.100	4	0.1	0.096
5	0.1	0.098	5	0.1	0.100
6	0.1	0.098	6	0.1	0.097
7	0.1	0.097	7	0.1	0.097
Mean		0.099	Mean		0.098
SD		0.001	SD		0.001
LOD		0.003	LOD		0.004
LOQ		0.011	LOQ		0.014

5) 회수율

Aluminium의 경우 회수율은 101~107 %, Chromium의 경우 94.0~98.4 %, Nickel의 경우 89.4~90.8 %, Cadmium의 경우 97.4~99.6 %, Tin의 경우 102~105 %, 그리고 Lead의 경우 86.8~89.8 %였다.

표 10. 회수율 실험결과

주입 추가 농도 (μg/L)	Al 농도 (μg/L) 전	Al 농도 (μg/L) 후	Al 회수율 (%)	주입 추가 농도 (μg/L)	Cr 농도 (μg/L) 전	Cr 농도 (μg/L) 후	Cr 회수율 (%)
2	0.1	2.20	103	2	0.1	1.98	96.2
	0.1	2.26	106		0.1	1.97	95.4
	0.1	2.28	107		0.1	2.03	98.4
4	0.2	4.21	101	4	0.1	3.87	95.3
	0.1	4.29	104		0.1	3.82	94.0
	0.1	4.39	106		0.1	3.88	95.5

주입 추가 농도 (μg/L)	Ni 농도 (μg/L) 전	Ni 농도 (μg/L) 후	Ni 회수율 (%)	주입 추가 농도 (μg/L)	Cd 농도 (μg/L) 전	Cd 농도 (μg/L) 후	Cd 회수율 (%)
2	0.1	1.90	90.7	2	0.04	2.03	99.6
	0.1	1.86	89.4		0.04	2.01	98.6
	0.1	1.89	90.8		0.04	2.00	98.0
4	0.1	3.68	90.0	4	0.04	3.97	98.1
	0.1	3.69	90.2		0.04	3.94	97.4
	0.1	3.69	90.3		0.04	3.94	97.6

주입 추가 농도 (μg/L)	Sn 농도 (μg/L) 전	Sn 농도 (μg/L) 후	Sn 회수율 (%)	주입 추가 농도 (μg/L)	Pb 농도 (μg/L) 전	Pb 농도 (μg/L) 후	Pb 회수율 (%)
2	0.1	2.15	105	2	0.1	1.89	89.8
	0.1	2.16	105		0.1	1.84	87.6
	0.1	2.11	102		0.1	1.83	87.1
4	0.1	4.17	103	4	0.1	3.62	88.3
	0.1	4.15	102		0.1	3.56	86.8
	0.1	4.15	102		0.1	3.59	87.4

2. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: (KDCA-M-12) ICP-MS를 이용한 소변 내 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Tin 및 Lead 시험검사법

나. 제개정일: 2020.06.30.

2020.12.31.

다. 분석방법

1) 검체 및 시약

① 검체

검체는 소변을 말하며, 무작위 수집, 침전물 발견, 용기 파손 및 전처리과정 중 소실이 발생한 검체는 부적합검체로 분류하여 시험

하지 않는다. 검체 수령 후 미사용시 보관가능 유효기간을 고려하여 냉장 또는 냉동보관을 할 수 있다. 보관시, tube 등과 같은 용기에 분주한 후 식별이 가능하도록 검체이름, 개봉날짜 등을 기록한다. 검체는 아이스박스 등을 이용하여 냉동 또는 냉장상태로 가능한 당일 배송하고, 동결 검체는 검사 전 상온에서 완전히 해동하여 안정화시킨 다음, 충분히 혼합 후 사용한다. 그리고 사용이 완료된 잔여검체는 실험실 생물안전지침에 따라 적합한 폐기용기에 밀봉하여 버린다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품을 사용하고, 그 외는 정량분석용 시약을 사용하며, 구입가능시 인증표준물질을 선택한다(표 11). 표준물질(분석항목) 사용시 유효기간을 확인하고 사용하고, 내부표준물질은 Gallium(^{71}Ga), Germanium(^{72}Ge), Yttrium(^{89}Y), Rhodium(^{103}Rh), Indium(^{115}In), Tellurium(^{125}Te), Rhenium(^{185}Re), Iridium(^{193}Ir), Thallium(^{205}Tl), Lutetium(^{175}Lu) 등 분석에 적합한 물질을 선택적으로 사용하며, 본 시험법에서는 Yttrium(^{89}Y), Indium(^{115}In), Lutetium(^{175}Lu)을 사용하였다. 그리고, 유도결합플라즈마 질량분석기(ICP-MS) 가동을 위해 고순도 아르곤(Ar) 가스 및 초고순도 헬륨(He) 가스를 준비하였다.

표 11. 시약 등 목록

연번	시약명
1	Aluminium(Al)
2	Chromium(Cr)
3	Nickel(Ni)
4	Cadmium(Cd)
5	Tin(Sn)
6	Lead(Pb)
7	Nitric acid(HNO_3)

③ 조제용 시약

Standard solution, dilution solution(1% HNO_3, 1 L)의 경우, 1 L 플라스틱(polypropylene(PP) or teflon) 용기에 증류수(18 MΩcm)를 반절 정도 넣은 후 질산 10 mL를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 (1~5) % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 총 용량이 1 L가 되도록 증류수(18 MΩcm)로 채우고 충분히 혼합시키며, Rinse solution으로도 사용한다. % 농도(1 % ~ 5 %)를 달리하여 조제할 수 있고, 조제 후 유효기간은 1년으로 한다.

혼합내부표준용액①(20 mg/L, 40 mL)의 경우, 50 mL 이상의 플라스틱(PP or teflon) 용기에 1 % 질산 20 mL 정도를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 (1~5) % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 내부표준물질의 개별 또는 혼합 표준품(또는 stock solution) 농도를 고려하여 일정량을 넣는다. 예를 들어 표준품별로 1 000 mg/L일 경우 0.8 mL를 넣고(50배 희석), 총 용량이 40 mL가 되도록 1 % 질산으로 채운다. 조제 후 유효기간은 1년으로 하되, 감도 확인 후 유효기간 연장이 가능하며, 구입가능시 인증된 혼합내부표준용액 표준품을 사용한다.

혼합내부표준용액②(10 μg/L, 40 mL)의 경우, 50 mL 이상의 플라스틱(PP or teflon) 용기에 1 % 질산 20 mL 정도를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 5 % 질산 등으로 충분히 워싱한다. 혼합내부표준용액① 20 μL를 넣고 총 용량이 40 mL가 되도록 1 % 질산으로 채운다(2 000배 희석). 조제 후 유효기간은 1년으로 하되, 감도 확인 후 유효기간 연장이 가능하고, 구입가능시 인증된 혼합내부표준용액 표준품을 사용한다.

농도가 진한(Stock) 혼합표준용액의 경우, 혼합된 인증표준용액 표준품(e.g. 10 mg/L)을 사용하여 stock 혼합표준용액 10 mL 조제 가능하고, 조제 후 유효기간은 1년으로 한다(표 12).

표 12. 혼합인증표준물질 조제방법

Used / Mixed conc.(mg/L)	Stock conc. (mg/L)	Spiked volume (mL)	Standard solution (mL)	비고
0.1 (Mix STD ①,② 2종)	10 (Mix①)	0.1	9.8	100배 희석
	10 (Mix②)	0.1		

검정곡선 작성시 혼합 표준용액의 경우, 분석 항목별 적정 농도범위에 해당하는 검정곡선 농도 지점을 표 13을 참고하여 적용가능하다. 질관리(Quality control, QC) 표준물질은 검정곡선 농도범위 또는 시료검출 농도수준을 고려하여 정하고, 샘플 분석시 같이 확인한다.

표 13. 혼합인증표준물질 검정곡선 준비

Used / Final conc. (μg/L)	Mixed conc. (μg/L)	Spiked volume (mL)	Dilution Solution (mL)	비고
10	100	1	9	Total volume 10 mL
5	100	0.5	9.5	
1	100	0.1	9.9	
0.5	100	0.05	9.95	
0.1	100	0.01	9.99	
0	100	0	10	
-	Sample or QC	0.5	4.5	Total volume 5 mL

2) 장치 및 장비

주요장비인 유도결합 플라즈마(Inductively Coupled Plasma, ICP) system(Agilent 7900과 유사한 기종), 질량분석기(Mass spectrometer, MS)로 기기분석한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초저온 냉동고, 냉장고, 분석용 전자저울, 볼텍서, 초순수제조장치 등이 있다(표 14).

표 14. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL, 5 000 μL	검정곡선, 시료 조제
초저온 냉동고	U-570	검체 보관
냉장고	4 ℃	시약 및 검체 보관
분석용 전자저울	XPE205	시약 조제
볼텍서(Vortexer)	VS-130SH	균질 혼합
초순수 제조장치	MILLI-Q DIRECT 8	시약 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

전처리 절차

1) Standard solution 등 질산 용액 준비

↓

2) Sample 준비
- 냉동 또는 냉장보관→상온에서 안정화·균질화
- Sample은 1.0 mL 취함
- 총 용량이 10 mL가 되도록 함
(sample 1.0 mL, dilution solution 9.0 mL)

↓

3) 검정곡선을 위한 표준용액 준비
- Mix 10 mg/L → 0.1 mg/L
(100배 희석)
- 내부표준용액 10 μg/L 수준으로 준비
(감도를 고려하여 농도 조정 가능)

↓

4) 검정곡선 및 시료분석 준비
- 농도지점을 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μg/L로 정하고, 혼합인증표준물질로 조제
- Sample, QC는 희석액을 사용하여 최종 10배 희석이 되도록 준비
- 20개 샘플마다 1개 이상의 QC(Quality control) 측정

그림 3. 절차 흐름도

② ICP-MS 조건

표 15. 분석장비 기기조건

Inductively Coupled Plasma(ICP)-Mass Spectrometer(MS)		
Parameter		Setting
RF power		1550 V
Energy Discrimination		4.8 V
He gas		4.0 mL/min
Integrated Sample Introduction System(ISIS)		
Pre Run	Sample uptake	45 s, 0.3 r/s(speed)
	Stabilize	70 s
Post Run	Rinse1	30 s, 0.3 r/s(speed)
	Rinse2	30 s, 0.3 r/s(speed)

표 16. 분석항목별 mass 및 Integ.Time/Mass[sec]

No.	Standard	Mass	Integ.Time/Mass[sec]
1	Aluminium(Al)	27	1.0000
2	Chromium(Cr)	52	1.0000
3	Nickel(Ni)	60	1.0000
4	Cadmium(Cd)	111/114	1.0000
5	Tin(Sn)	118	1.0000
6	Lead(Pb)	208	0.3000
7	Yttrium(Y)	89	0.3000
8	Indium(In)	115	0.3000
9	Lutetium(Lu)	175	0.3000

라. 표준절차서 목차

목적, 적용범위 및 측정원리, 용어의 정의, 책임과 권한, 검체 및 시약, 초자(용기) 세척방법, 장치 및 장비, 시험방법 및 결과산출, 기록 및 보존, 관련문서 등으로 구성되었다.

마. 검증보고서 구성 및 내용

직선성(linearity), 바탕실험(blank test)・잔류효과실험(carryover test), 정밀도(precision)・정확도(accuracy), 검출한계(limit of detection)・정량한계(limit of quantification), 회수율(recovery) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.995 이상임을 확인하였다. 바탕실험 및 잔류효과실험 결과, 분석항목들이 검출이 되지 않음을 확인할 수 있다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 10 % 이내였고, 정확도는 95.2 ~ 106.9 % 범위였으며, 검출한계 및 정량한계의 경우 Aluminium은 0.050 ㎍/L, 0.167 ㎍/L, Chromium은 0.003 ㎍/L, 0.012 ㎍/L, Nickel은 0.008 ㎍/L, 0.025 ㎍/L, Cadmium은 0.003 ㎍/L, 0.011 ㎍/L, Tin은 0.003 ㎍/L, 0.011 ㎍/L, 그리고 Lead은 0.004 ㎍/L, 0.014 ㎍/L였다. 회수율의 경우 Aluminium은 101~107 %, Chromium은 94.0~98.4 %, Nickel은 89.4~90.8 %, Cadmium은 97.4~99.6 %, Tin은 102~105 %, 그리고 Lead은 86.8~89.8 %였다.

3. 시료 분석결과

1) 비흡연자 소변

검출범위와 평균은 Aluminium의 경우 ND[26)]~9.2 ㎍/L, 1.7 ㎍/L, Chromium의 경우 ND~1.2 ㎍/L, 0.6 ㎍/L, Nickel의 경우 0.3~5.8 ㎍/L, 1.3 ㎍/L, Cadmium은 ND~3.9 ㎍/L, 0.6 ㎍/L, Tin은 ND~1.4 ㎍/L, 0.24 ㎍/L 그리고 Lead은 ND~1.9 ㎍/L, 0.6 ㎍/L였다(표 17).

2) 흡연자 소변

흡연자 중 궐련사용자 13명에 대한 검출범위와 평균은 Aluminium의 경우 ND~7.7 ㎍/L, 2.0 ㎍/L, Chromium의 경우 0.19~1.3 ㎍/L, 0.7 ㎍/L, Nickel의 경우 ND~2.4 ㎍/L, 0.9 ㎍/L, Cadmium은 ND~1.1 ㎍/L, 0.5 ㎍/L, Tin은 ND~0.5 ㎍/L, 0.2 ㎍/L 그리고 Lead은 ND~1.3 ㎍/L, 0.7 ㎍/L였다. 흡연자 중 궐련형 전자담배 사용자 11명에 대한 검출범위와 평균은 Aluminium의 경우 ND~7.7 ㎍/L, 3.0 ㎍/L, Chromium의 경우 0.18~1.0 ㎍/L, 0.6 ㎍/L, Nickel의 경우 0.3~1.3 ㎍/L, 0.8 ㎍/L, Cadmium은 ND~0.6 ㎍/L, 0.3 ㎍/L, Tin은 ND~0.7 ㎍/L, 0.2 ㎍/L 그리고 Lead은 0.2~1.1 ㎍/L, 0.5 ㎍/L였다. 흡연자 중 복합사용자 3명에 대한 검출범위와 평균은 Aluminium의 경우 ND~5.0 ㎍/L, 2.5 ㎍/L, Chromium의 경우 0.2~1.1 ㎍/L, 0.6 ㎍/L, Nickel의 경우 0.4~1.4 ㎍/L, 0.8 ㎍/L, Cadmium은 0.2~0.4 ㎍/L, 0.3 ㎍/L, Tin은 ND~0.3 ㎍/L, 0.14 ㎍/L 그리고 Lead은 0.4~0.6 ㎍/L, 0.5 ㎍/L였다. 그리고 흡연자 중 액상형 전자담배 사용자 1명에 대한 결과값은 Aluminium의 경우 ND, Chromium의 경우 0.47 ㎍/L, Nickel의 경우 1.3 ㎍/L, Cadmium은 0.54 ㎍/L, Tin은 0.13 ㎍/L 그리고 Lead은 0.67 ㎍/L였다(표 18).

26) Not Detected, 정량한계(LOQ) 미만

표 17. 비흡연자 소변 내 중금속 분석결과(단위: μg/L)

No.	흡연유형	Al	Cr	Ni	Cd	Sn	Pb
	LOQ(정량한계)	1.67	0.12	0.25	0.11	0.11	0.14
1	비 흡 연 자	ND	ND	0.257	ND	ND	0.168
2	비 흡 연 자	ND	ND	0.435	0.170	ND	0.257
3	비 흡 연 자	ND	0.523	1.295	0.552	ND	0.838
4	비 흡 연 자	3.511	0.446	0.450	0.146	ND	0.259
5	비 흡 연 자	ND	1.083	1.372	0.225	0.589	0.543
6	비 흡 연 자	ND	ND	0.483	0.301	ND	ND
7	비 흡 연 자	ND	0.553	0.594	0.415	0.512	0.502
8	비 흡 연 자	ND	1.163	1.322	0.820	0.271	0.740
9	비 흡 연 자	1.821	1.219	2.879	1.678	1.359	1.748
10	비 흡 연 자	8.595	1.130	5.764	3.899	0.868	1.872
11	비 흡 연 자	0.543	0.131	1.113	ND	ND	0.218
12	비 흡 연 자	9.213	0.379	0.945	0.267	ND	0.376
13	비 흡 연 자	ND	0.539	0.270	0.178	ND	0.144
14	비 흡 연 자	ND	0.760	1.311	0.211	ND	0.459
15	비 흡 연 자	ND	0.861	1.182	1.196	ND	1.382
16	비 흡 연 자	ND	0.554	0.378	0.071	ND	ND
최 소 값		ND	ND	0.257	ND	ND	ND
최 대 값		9.213	1.219	5.764	3.899	1.359	1.872
평 균		1.669	0.594	1.253	0.644	0.235	0.610

표 18. 흡연유형별 소변 내 중금속 분석결과(단위: μg/L)

No.	흡연유형		Al	Cr	Ni	Cd	Sn	Pb
	LOQ(정량한계)		1.67	0.12	0.25	0.11	0.11	0.14
1	흡연자	궐련	2.992	1.014	1.376	0.674	0.547	1.176
2		궐련	1.861	1.325	2.364	0.524	0.462	1.343
3		궐련	ND	0.371	0.502	0.278	ND	0.262
4		궐련	ND	0.815	0.482	0.176	ND	0.282
5		궐련	ND	0.848	0.469	0.178	0.238	0.264
6		궐련	2.990	0.481	0.764	0.610	0.236	0.762
7		궐련	ND	0.891	1.922	1.138	0.493	1.138
8		궐련	ND	0.189	ND	ND	ND	ND
9		궐련	3.056	0.671	0.658	0.257	ND	0.669
10		궐련	ND	0.459	0.460	0.369	ND	0.269
11		궐련	3.065	0.799	1.119	0.943	0.412	0.821
12		궐련	7.695	1.177	1.553	0.382	0.506	0.727
13		궐련	3.348	0.540	0.512	0.853	0.223	0.813
최 소 값			ND	0.189	ND	ND	ND	ND
최 대 값			7.695	1.325	2.364	1.138	0.547	1.343
평 균			2.035	0.737	0.946	0.499	0.247	0.666

No.	흡연유형		Al	Cr	Ni	Cd	Sn	Pb
	LOQ(정량한계)		1.67	0.12	0.25	0.11	0.11	0.14
1	흡연자	궐련형 전자담배	ND	0.324	0.679	ND	ND	0.250
2		궐련형 전자담배	ND	0.277	0.313	ND	ND	0.168
3		궐련형 전자담배	ND	0.802	0.929	0.406	0.152	0.258
4		궐련형 전자담배	3.343	0.820	0.992	0.404	0.682	0.544
5		궐련형 전자담배	7.746	0.957	0.663	0.325	0.264	0.587
6		궐련형 전자담배	5.894	0.267	1.348	0.110	0.520	0.523
7		궐련형 전자담배	4.692	1.002	1.010	0.592	0.232	0.857
8		궐련형 전자담배	3.706	0.744	1.160	0.544	0.251	1.124
9		궐련형 전자담배	4.443	0.176	0.539	0.233	ND	0.252
10		궐련형 전자담배	ND	0.442	0.469	0.229	0.116	0.619
11		궐련형 전자담배	2.152	0.364	0.368	ND	0.033	0.453
최 소 값			ND	0.176	0.313	ND	ND	0.168
최 대 값			7.746	1.002	1.348	0.592	0.682	1.124
평 균			3.008	0.561	0.770	0.282	0.204	0.512

No.	흡연유형		Al	Cr	Ni	Cd	Sn	Pb
	LOQ(정량한계)		1.67	0.12	0.25	0.11	0.11	0.14
1	흡연자	복합	ND	0.162	0.370	0.192	ND	0.515
2		복합	2.511	0.554	1.390	0.436	0.316	0.591
3		복합	5.003	1.131	0.602	0.223	0.026	0.365
최 소 값			ND	0.162	0.370	0.192	ND	0.365
최 대 값			5.003	1.131	1.390	0.436	0.316	0.591
평 균			2.505	0.615	0.788	0.284	0.136	0.490

No.	흡연유형		Al	Cr	Ni	Cd	Sn	Pb
	LOQ(정량한계)		1.67	0.12	0.25	0.11	0.11	0.14
1	흡연자	전자	ND	0.473	1.285	0.541	0.129	0.667
최 소 값			-	-	-	-	-	-
최 대 값			-	-	-	-	-	-
평 균			ND	0.473	1.285	0.541	0.129	0.667

참고문헌

1. 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 첨단분석팀. 2015. 담배 주류연 중 7개 그룹의 유해성분(HPHC) 분석법 확립 및 유효성 평가, Analytical Science & Technology
2. Ruprecht, A. A. et al. 2017. Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. Aerosol science and technology, 51(6), 674-684.
3. Palazzolo, D. L. et al. 2017. Trace metals derived from electronic cigarette (ECIG) generated aerosol: potential problem of ECIG devices that contain nickel. Frontiers in physiology, 7, 663.
4. Mishra, V. K. et al. 2017. Review on metallic components released due to the use of electronic cigarettes. Environmental Engineering Research, 22(2), 131-140.
5. 환경부 국립환경과학원. 2008. ICP/MS를 이용한 혈액 및 요중 중금속 분석방법 확립을 위한 연구(Ⅰ)
6. 환경부 국립환경과학원. 2009. ICP/MS를 이용한 혈액 및 요중 중금속 분석방법 확립을 위한 연구(Ⅱ)
7. Veikhman, G. A. et al. 2016. Determination of Toxic and Essential Elements in Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Современные технологии в медицине, 8(3 (eng)).
8. Agilent Technologies. 2017. Clinical Sample Preparation Guide(v3) / Agilent 7900 Edition
9. Agilent ICP-MS equipment manual. 2017.

⑨ 담배유형별 흡연자의 호기 내 성분분석 조사 시범연구

연구 배경

우리나라의 흡연율은 2019년 전체 21.5% (남성 35.7%, 여성 6.7%)에 이른다.(1) 금연광고 및 홍보, 금연교육 및 상담 등 국가 차원의 다양한 금연지원 서비스 노력으로 전체 흡연율은 감소 추세에 있으나 아이코스, 릴 등 다양한 신종담배의 판매가 이루어진 2018년 기준 청소년(여)(2) 및 여성 흡연율의 증가(1)가 확인되었고, 최근 쥴 등과 같이 궐련의 전형적인 모습을 하지 않은 다양한 형태의 전자담배 기기가 개발・유통되고 있다.(3) 이와 같은 신종담배의 등장으로 기존 궐련 사용자는 복합사용자가 되어 금연의지를 방해받을 수 있으며, 여전히 약 20%대를 유지하는 흡연율로 비추어보아 간접흡연의 피해는 계속 일어날 수 있다.(1) 간접흡연은 흡연자의 높은 밀도(흡연구역 주변 등), 밀폐된 공간(엘리베이터 내부 등), 낮은 바람 조건뿐만 아니라 '흡연자와의 근접성' 에도 영향을 받을 수 있다.(4)

미국 국무감 금연보고서(Surgeon General)(2006, 2014)에 따르면 간접흡연은 폐암, 간암, 대장암을 비롯하여 천식 악화, 심혈관질환, 만성폐쇄성폐질환(Chronic Obstruction Pulmonary Disease, COPD), 뇌졸중, 면역기능 손상, 염증 유발, 결핵 악화, 선천성 기형, 자궁외 임신, 남성 성기능 저하, 안구질환, 당뇨병, 자가면역질환, 류마티스 관절염 등 다양한 질병을 야기할 수 있다.(5,6)

간접흡연 관련 연구로, 흡연구역으로부터의 거리에 따른 연기노출 PM2.5 측정,(7)과 카페・레스토랑의 실내・외 간접흡연 노출에 따른 니코틴 분석,(8) 등이 수행되었고, 2017-2018년 유럽에서는 궐련 뿐 아니라, '전자담배' 에 의한 간접흡연 영향 조사 연구가 이루어졌다.(9) 또한, 신종담배인 아이코스 등 궐련형 전자담배의 배출물 내 성분분석 연구가 지속되고 있으며, toluene, pyridine 등이 확인되었다.(10,11)

Torres S 등(2018)은 간접흡연 등 담배 배출물 노출에 따른 바이오마커 연구를 호기(exhaled breath, 날숨이라고도 함), 머리카락(hair), 혈액(blood), 침(saliva), 피부(skin), 소변(urine)으로 구분하여, 날숨에서는 CO, 머리카락에서는 nicotine, cotinine, N-nitrosonornicotine(NNN), 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)을 조사하였고, 혈액에서 니코틴(nicotine), 코티닌(cotinine), 카드뮴(cadmium), 납(lead), 카르복시헤모글로빈(carboxy-hemoglobin), 침에서 nicotine, cotinine, NNN, NNK, NNK의 대사체(4-(methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanol, NNAL) 등을 분석하였다. 이 중 NNN, NNK는 1급 발암물질로 담배특이니트로스아민류(Tobacco-Specific Nitrosamines, TSNAs)로 분류된다. 또한 피부에서는 nicotine, 소변에서는 nicotine, cotinine, 트랜스-3'-하이드록시코티닌(trans-3'-hydroxycotinine), NNAL, 다환방향족탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 바이오마커(biomarkers), VOCs 바이오마커, cadmium 등이 활용되었다.(12) 호기의 경우는 흡연자와 비흡연자의 호기 내 VOCs를 비교 분석하거나,(13-16) 숨(breath) 중 호기 내 CO 측정을 통해 흡연상태를 확인한 연구가 있었고,(17) 호기 내 폐암의 바이오마커 관련 연구도 진행된 바 있다.(18,19) 흡연자의 호기에서는 isoprene, 1,3-pentadiene, 2-butanone, 2-methylfuran, benzene, 2-pentanone, cyclopentanol, toluene, 1-butanol, pyridine, 1-pentanol, pyrrole 등이 검출되었으며, benzene과 같은 1급 발암물질도 포함되어 있었다.(13)

흡연자의 호기는 비흡연자가 흡연자의 내뿜은 담배 연기를 마시는 2차 간접흡연에 해당된다. 현재 비흡연자의 건강을 위협하는 간접흡연을 방지하기 위해 흡연구역(smoking zone) 등을 별도로 운영하고 있지만 실생활에서는 흡연자가 흡연 후 실내에 돌아와 호흡할 때 발생하는 호기로 인한 간접흡연이 발생 할 수 있다. 호기 내에 포함된 담배 성분에는 후각으로 쉽게 감지되는 것과 감지되지 않는 것이 있으며, 그 중에는 후각을 통해 불쾌감을 주거나 건강에 유해한 성분이 있다.

이번 연구에서는 흡연자의 호기 내 VOCs 성분을 조사하기 위해, 흡연자 30명을 모집하였고, 흡연자가 사용하는 담배유형을 고려하여 궐련, 궐련형 전자담배, 액상형 전자담배, 복합 사용자 등으로 구분하여 비교하였다. 우리는 이 연구를 통해 호기에 의한 2차 간접흡연 가능성분(VOCs 등)을 확인하고자 하였다.

연구 방법

1. 조사대상

2019년 8월부터 2020년 3월까지 충북 청주시 소재 오송생명과학단지 내 만 19세 이상 65세 이하 성인 남녀를 대상으로 흡연자 및 비흡연자를 모집하여 실시하였다. 흡연자군은 총 30명으로 평균 나이는 41세이며 모두 남성이었고, 비흡연자군은 총 10명으로 평균 나이는 43세이며 남성 4명, 여성 6명으로 구성되었다(IRB번호: 2019-05-03)(표 1).

2. 담배 유형조사

흡연자군의 담배유형을 조사하기 위해 설문조사를 진행하였고, 설문문항에는 출생년도, 성별, 흡연빈도, 담배 제품명, 마지막 흡연 후 경과시간 등이 있었으며 대면조사 방식으로 연구대상자가 직접 작성하도록 하였다. 비흡연자군은 출생년도와 성별만 확인하였다. 담배유형별 용어는 국민건강증진법 제23조에서 '궐련'과 전자담배 중에서는 '니코틴 용액을 사용하는 경우', '연초 및 연초 고형물을 사용하는 경우'로 나뉘는데 후자의 경우 궐련형, 기타유형으로 분류된다. 여기서 궐련형은 아이코스 등 가열담배을 말하며, 니코틴 용액을 사용하는 경우가 액상형 전자담배를 말한다. 표 2와 같이, 흡연자의 모집 기준은 최근 1달 이내 흡연 경험이 있는 경우였으며, 실제 참가자의 호기 포집 전 흡연간격을 확인한 결과 평균 1-8시간 이전으로 확인되었다. 복합사용자 5명 중 4명은 궐련와 궐련형 전자담배 이중사용자였고 나머지 1명은 액상형 전자담배와 궐련형 전자담배 이중사용자였다.

표 1. 연구대상자의 특성

	흡연자		비흡연자	
	인원	%	인원	%
전체	30	100	10	100
나이				
≤30	2	7	2	20
31-50	23	76	6	60
>50	5	17	2	20
성별				
남	30	100	4	40
여	0	0	6	60
흡연유형				
궐련	11	37	-	-
궐련형 전자담배	12	40	-	-
액상형 전자담배	2	7	-	-
이중사용자	5	16	-	-
궐련+궐련형 전자담배	4	13		
액상형 전자+궐련형 전자담배	1	3		

3. 호기 채취 및 CO 측정

흡연 후의 호기를 분석하기 위해 흡연 직전, 흡연 후 1분 이내, 10분, 20분 내외 등 총 4회 채취하였고, 채취를 위해 SKC Inc.(Eighty Four, USA)의 1회용 breath-gas 분석용 tedlar bag (1 L)을 사용하였으며, 새 제품이지만 사용 전 극미량 존재할 수 있는 잔류 성분까지 제거하기 위해 고순도 질소로 충분히 세척하였으며 깨끗한 세척상태를 고순도 질소를 넣은 시료분석를 통해 확인하였다. 대상자는 비흡연자 10명, 흡연자 30명(궐련 사용자 11명, 궐련형 전자담배 사용자 12명, 액상형 전자담배 사용자 2명, 복합 사용자 5명)으로 채취시 CO 측정기(Bedfont, All new Micro+ADV Smokerlyzer)로 CO를 측정하였다.

4. 호기 내 성분분석 및 통계분석

호기 내 성분분석 대상 물질들은 휘발성이 높은 isoprene, 2-methylfuran, benzene, toluene 등 VOCs를 중심으로 선정하였고, 각 성분의 표준물질 농도가 표기된 제품을 우선 선택하였다. 본 연구에 분석항목 희석용매로 사용된 메탄올은 Fisher(Hampton, USA) 제품을 사용하였고, 내부표준물질(internal standard, IS)을 포함한 각종 표준물질들은 유효기간 내의

표 2. 흡연습관에 대한 흡연자들의 설문지 응답

흡연 유형	흡연빈도 (횟수/일)	흡연 후 시간경과 (시간)	흡연 제품
	평균±편차(범위)	평균±편차(범위)	
궐련 (인원 11명)	13.3±7.2(6-30)	1.4±0.6(0.5-2.5)	에쎄(3), 보헴시가(3), 더원, 레종(2), 말보로 골드, 던힐
궐련형 전자담배 (인원 12명)	11.4±6.1(3-20)	1.8±1.4(0.5-6)	아이코스(9), 릴, 글로(2)
액상형 전자담배 (인원 2명)	7.5±3.5(5-10)	1.5±0.7(1-2)	부푸, 캘리번
이중사용자 담배+궐련형 전자담배 (인원 4명)	5.8±5.3(1-13) :궐련 5.5±3.7(1-10) :궐련형 전자담배	8.3±10.9(0.1-24)	레종(3), 말보로 하이브리드 아이코스(3), 릴
이중사용자 액상형 전자담배 + 궐련형 전자담배 (인원 1명)	20 :액상형 전자담배 15 :궐련형 전자담배	2.5	몬스터 글로

Merck (Darmstadt, Germany), SPEX Certiprep. (Metuchen, USA), Accustandard (New Haven, USA), TCI (Tokyo, Japan)등의 제품을 사용하였다. 제조사별로 나누어보았을 때 Merck 표준품은 cis-3-hexen-1-ol, pyrrole, 2-pentanone, cyclopentanol, 1,3-pentadiene이었고, SPEX Certiprep. 표준품은 1-pentanol, isoprene, 1-butanol, 2-butanone이었다. Accustandard 표준품은 benzene-d_6, toluene, benzene, pyridine이었고, TCI 표준품은 2-methylfuran이었다.

본 연구에서는 시료채취 및 전처리 · 분석과정을 대기오염공정시험기준 <고체흡착법[27]> 및 관련 국외문헌들을 참고하여(14,20,21) 정립하였다. 포집한 호기가 담겨있는 tedlar bag을 열탈착 튜브(thermal desorption tube, TD tube) (Tenax TA+Carbopack X)에 연결하여 흡착시킨 다음 해당 튜브를 밀봉하여 분석전까지 냉장보관하였다. 포집시료 내 성분 흡착시 대상물질별 TD tube의 파과부피(breakthrough volume)를 고려하였고, TD tube는 200℃ 이상의 온도에서 충분히 가열하여 세척 후 사용하였다. 호기 내 성분들은 열탈착(Thermal Desorption, TD) 전처리장비인 MARKES Ultra-xr (Liantrisant, England)를 이용하여 열탈착 후 가스크로마토그래피 질량분석법(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)로 분석하였다. GC-MS는 Agilent 7890B/5977A MSD (Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, 선택이온 모니터링(Selected Ion Monitoring, SIM) 모드로 분석하였다. 컬럼은 DB-WAX (30 m×0.25 mm I.D×0.5 ㎛, film thickness)를 사용하였고, 총 분석시간은 26분이었으며, 시료 분석시마다 고순도 질소를 담은 공시료(blank sample) 분석값을 고려하였다. 그리고 미국환경보호청(Environmental Protection Agency, EPA) 시험기관 등에서 따르는 방법에 준하여 검출한계(the limit of detection, LOD)와 정량한계(the limit of quantitation, LOQ)를 산출하여 적용하였다. 통계분석은 R 프로그램을 이용하여 비모수검정(nonparametric test)을 수행하였다.

27) 공기 중 휘발성 유기화합물(VOCs)에 대해 흡착관/기체 크로마토그래피에 기반을 둔 시료채취 및 분석방법

연구 결과

30명의 흡연자의 호기 내 성분별 분석결과(흡연 전, 후 0, 10, 20분 중 최대값)와 10명의 비흡연자의 호기 내 성분별 분석결과를 표 3에 나타내었다. 표 3은 흡연자 및 비흡연자의 성분별 검출수준은 평균값의 범위와 빈도수로 표기했다. Isoprene은 신진대사로부터 발생하는 주요 호흡가스로 분석항목 중 유일하게 흡연자, 비흡연자 모두에서 검출되었으며 검출된 농도수준도 가장 높았다. (trans)1,3-pentadiene와 2-pentanone은 전 대상 자에서 검출되지 않았으며 흡연자에서의 검출농도수준(평균값 기준)을 내림차순으로 정리하면 isoprene, 2-butanone, benzene, toluene, 2-methylfuran, pyridine, pyrrole, cis-3-hexen- 1-ol, 1-butanol, cyclopentanol, 1-pentanol 순이었다(표 3).

또한, 분석항목 중 cis-3-hexen-1-ol의 경우 궐련 사용자 그룹에서 pyridine과 pyrrole, cyclopentanol은 액상형 전자담배 그룹에서, 그리고 2-butanone은 궐련형 전자담배 및 액상형 전자담배 사용자 그룹에서 불검출(Not Detected, ND)되었다. 반면, 1-butanol은 궐련 사용자(복합사용자 포함) 그룹에서만 검출되었다(표 3).

호기 내 성분분석 대상 물질 중 호기 내에 검출빈도가 높은 2-methylfuran, benzene, isoprene, pyridine을 대상으로 비흡연자와 검출농도를 비교한 결과, 전체흡연자의 호기 내 검출농도는 비흡연자보다 유의(wilcoxon rank sum test, $P<0.05$)하게 높았고, 특히 궐련 사용자의 평균 검출농도는 전체 흡연자의 평균보다 모두 높았다. 또한, 비흡연자와 담배유형에 따른 흡연 그룹간 유의한 차이가 있음을 크루스칼왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)으로 확인하고, 비흡연자와 각 담배유형별 차이를 윌콕슨 순위합 검정(Wilcoxon rank sum test)과 벤자민-호치버그 교정(Benjamin-Hochberg correction)을 통해 확인한 결과, 궐련 사용자의 경우에는 비흡연자에 비해 4개의 검출빈도가 높은 물질에서 모두 유의한 차이가 확인되었고, 액상형 전자담배 사용자의 경우에는 그 차이를 확인할 수 없었다. 궐련형 전자담배 사용자

와 복합사용자는 2-methylfuran, benzene, pyridine에서만 유의한 차이가 나타났다(그림 1).

다음으로는 흡연자의 흡연 전 호기와 흡연 후 20분 이내 호기의 최대 검출농도를 윌콕슨 부호순위검정(Wilcoxon signed rank test)으로 비교하였다. 2-methylfuran, benzene, isoprene, pyridine은 모두 흡연 전보다 흡연 후에 유의(P< 0.001)하게 증가하였다(그림 2).

측정 대상물질 중 검출빈도가 높았던 2-methylfuran, benzene, isoprene, pyridine의 흡연자의 흡연 전후의 호기 내 검출 농도를 각 담배유형별로 살펴본 결과, 액상형 전자담배 사용자와 복합사용자의 경우에는 모두 유의성을 확인할 수 없었으며(P >0.05), 궐련 사용자는 4개의 물질이 모두 흡연 전에 비해 유의(P=0.00098)하게 증가하였다. 궐련형 전자담배 사용자는 benzene(P=0.44)을 제외한 나머지 3개의 물질에서는 흡연 후 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(그림 3).

고 찰

최근에는 아이코스 등 담배스틱을 가열하는 방식의 '궐련형 전자담배'와 프로필렌글리콜과 글리세롤를 용매로 사용하는 액상을 가열하여 에어로졸화하여 흡입하는 '액상형 전자담배'를 다양한 연령층의 흡연자가 사용하고 있다. 일반담배는 담배에 불을 붙여 800℃ 정도로 연소시켜 발생하는 연기(주류연)를 흡입하는 방식이지만, 궐련형 전자담배 또는 액상형 전자담배는 일반담배보다 상대적으로 낮은 온도(~350℃)로 담배스틱 또는 액상을 가열하여 발생하는 에어로졸 등을 흡입하는 방식을 선택하고 있다. 따라서 일반 궐련은 연소에 의한 생성물을, 전자담배는 가열에 의한 생성물을 흡입하는 차이가 있다.

이번 연구에서 궐련형 전자담배, 궐련, 액상형 전자담배, 복합 사용자 등 4가지 담배유형별 흡연자(n=30)와 비흡연자(n=10)를 모집하여 CO 농도를 측정한 결과, 전체흡연자와 비흡연자 간의 차이가 있음(wilcoxon rank sum test, P< 0.005)을 확인하였고, 궐련 사용자와 그 외 그룹들간에 분명한 값 분포 차이를 보였다. 액상형 전자담배 사용자 그룹에서는 비흡연자와 비슷한 수준인 1-2 ppm 수준의 CO 농도가 측정되었고, 궐련형 전자담배 사용자 등에서는 비흡연자와 비슷하거나 약간 높은 수준인 1-5 ppm 수준이었다. 반면, 궐련 담배 사용자의 경우 CO농도가 최대 31 ppm까지 나왔다. CO 측정은 흡연 직전, 흡연 후 20분 내외에 각각 측정하였고 전 · 후의 값차이는 흡연자 그룹에서 0-4 ppm 범위를 보였는데 궐련 사용자 그룹에서만 3-4 ppm 정도의 차이를 보일 뿐, 그 외의 담배유형에서는 0-2 ppm 차이로 적게 나타났다. 표 4와 같이 궐련 흡연자의 경우에는 CO 검출수준이 최소 5 ppm 이상으로 높았으나 비흡연자(1-2 ppm), 궐련형 전자담배 흡연자(1-5 ppm), 액상형 전자담배 흡연자(1-2 ppm) 그룹의 경우 값이 상대적으로 낮았으며 이들 그룹간 차이도 거의 없었다(표 4). 따라서 CO 측정값으로 비흡연자, 궐련형 전자담배 및 액상형 전자담배 사용자를 명확히 구분하기는 어려울 것으로 판단되며, 이와 같은 측정결과들은 궐련과 비교하여 궐련형 전자담배 및 액상형 전자담배의 배출물 내 CO가 100배 수준 또는 그 이상 낮게 검출되는 것과 연관이 있다.(22,23)

Capone S et al.(13)에 따르면, 흡연자의 호기 내 isoprene, 2-methylfuran, benzene, pyridine 농도범위는 각각 0-2.29, 0-0.03, 0-0.11, 0-0.07 mg/m3이었다. 이는 본 연구에서 산출한 농도인 0.69-11.25, 0.03-0.49, 0.04-0.65, 0.01-0.30 mg/m3 (표 3)에 비해 비교적 낮은 수준이었다. 그 이유는 국외의 경우 많이 피우는 흡연자(heavy smoker, ≥10 cigarettes/day)가 연구대상자 중 없었고, 호기 측정을 흡연 후 1시간 경과 후 진행하였기 때문으로 판단된다. 이번 연구에서는 대상자 중 심한흡연자가 다수 포함되어있었고, 호기 측정을 흡연 후 20분 이내로 진행하였다. 이 결과로 미루어 호기 내 유해성분 양은 흡연 후 경과시간에 따라 감소할 가능성이 있다. 특히 2-methylfuran, benzene, pyridine은 담배유형 중 궐련 사용자의 호기에서 다른 분석항목에 비해 높은 수치로 확인되었는데, 해당 성분들은 모두 궐련 배출물 내 존재하는 것으로 알려져 있다.(24)

표 3. 호기 내 대상물질의 분석범위 및 빈도(흡연 직전을 포함한 흡연 후 20분 이내 최대값)

분류	물질명	흡연자, 30명 (mg/m3)					비흡연자, 10명 (mg/m3)	P-값* (흡연자-비흡연자)
		궐련, 11명	궐련형 전자담배, 12명	액상형 전자담배, 2명	이중사용자, 5명	전체		
Alcohols	1-Butanol	0.00-0.02 (4/36%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	0.05 (1/20%)	0-0.05 (5/17%)	불검출 (0/0%)	0.183
	1-Pentanol	0.00-0.01 (2/18%)	0.00-0.01 (1/8%)	0.00-0.01 (1/50%)	불검출 (0/0%)	0-0.01 (4/13%)	불검출 (0/0%)	0.242
	Cyclopentanol	0.00-0.01 (1/9%)	0.00-0.01 (1/8%)	불검출 (0/0%)	0.00-0.01 (1/20%)	0-0.01 (3/10%)	불검출 (0/0%)	0.321
	Cis-3-hexen-1-ol	ND (0/0%)	0.00-0.04 (2/17%)	0.00-0.04 (1/50%)	0.00-0.13 (1/20%)	0-0.13 (4/13%)	불검출 (0/0%)	0.242
Alkenes	Isoprene	0.69-11.25 (11/100%)	0.30-1.78 (12/100%)	0.51-0.74 (2/100%)	0.42-7.87 (5/100%)	0.30-11.25 (30/100%)	0.28-1.22 (10/100%)	0.014
	(trans)1,3-Pentadiene	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	사용불가
Aromatics	Benzene	0.04-0.65 (11/100%)	0.00-0.15 (8/67%)	0.00-0.12 (1/50%)	0.00-0.27 (4/80%)	0-0.65 (24/80%)	불검출 (0/0%)	<0.001
	Toluene	0.00-0.71 (10/91%)	0.00-0.09 (6/50%)	0.00-0.07 (1/50%)	0.00-0.26 (4/80%)	0-0.71 (21/70%)	불검출 (0/0%)	<0.001
	Pyridine	0.01-0.30 (11/100%)	0.01-0.06 (12/100%)	불검출 (0/0%)	0.02-0.16 (5/100%)	0-0.30 (28/93%)	불검출 (0/0%)	<0.001
	Pyrrole	0.00-0.26 (8/73%)	0.00-0.03 (9/75%)	불검출 (0/0%)	0.00-0.08 (4/80%)	0-0.26 (21/70%)	불검출 (0/0%)	<0.001
Furans	2-Methylfuran	0.03-0.49 (11/100%)	0.01-0.03 (12/100%)	0.00-0.01 (1/50%)	0.01-0.24 (5/100%)	0-0.49 (29/97%)	불검출 (0/0%)	<0.001
Ketones	2-Butanone	0.00-1.88 (10/91%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	0.00-1.25 (3/60%)	0-1.88 (13/43%)	불검출 (0/0%)	0.015
	2-Pentanone	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	불검출 (0/0%)	사용불가

(n/%): (검출 수/빈도); 정량한계(mg/m^3): isoprene 0.015, (trans)1,3-pentadiene <2.0, 2-methylfuran 0.005, 2-butanone 0.115, benzene 0.042, 2-pentanone 0.018, toluene 0.038, 1-butanol 0.019, pyridine 0.008, 1-pentanol 0.007, cycolpentanol 0.006, cis-3-hexen-1-ol 0.019, pyrrole 0.010; 불검출: 정량한계 미만. *비모수 윌콕슨 순위합 검정.

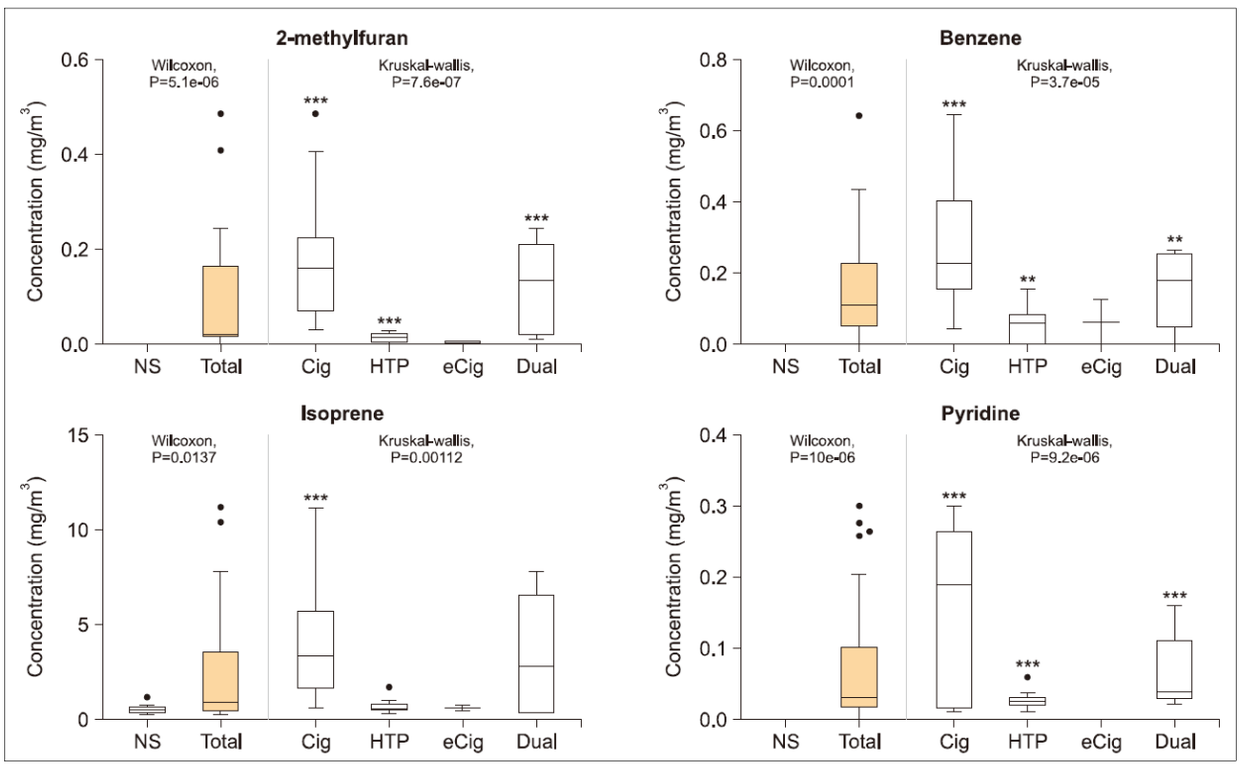


그림 1. 흡연유형에 따른 호기 내 분석항목 양 비교(흡연 직전을 포함한 흡연 후 20분 이내 최대값)

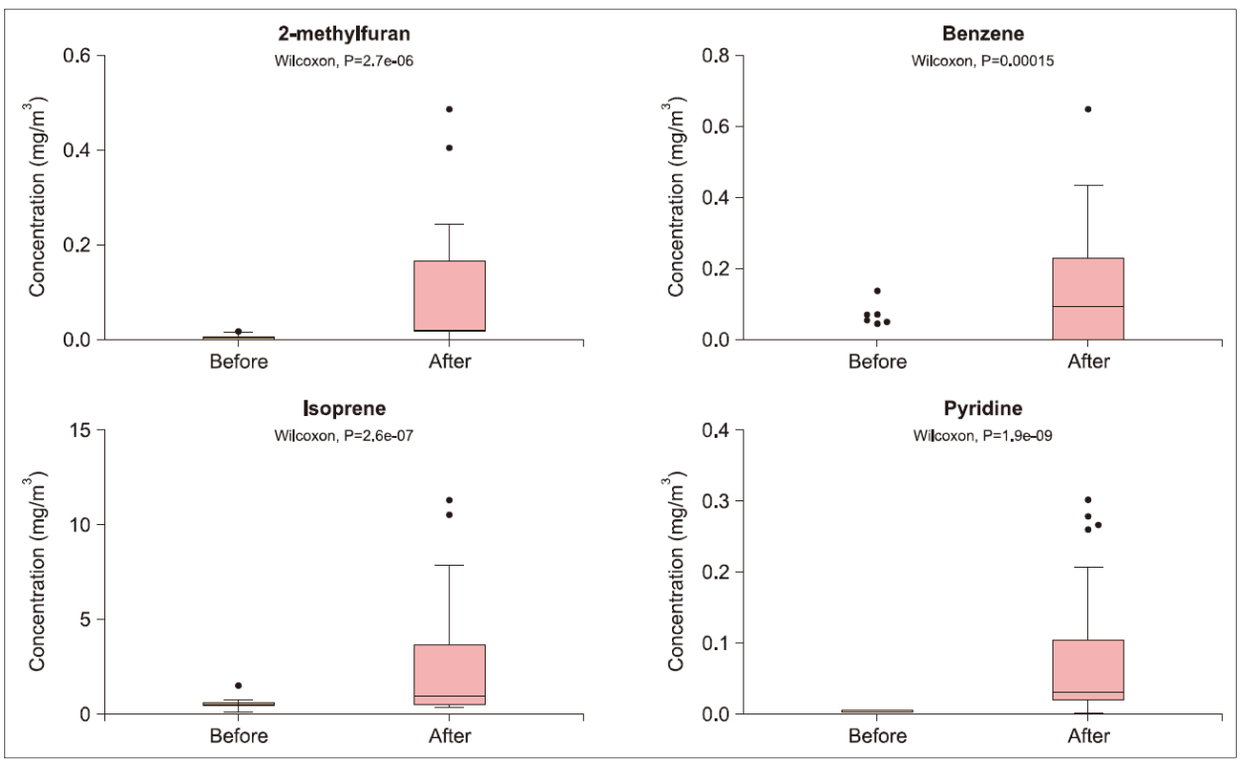


그림 2. 흡연으로 인한 검출항목의 비교(20분 이내 최대값). Before, 흡연직전; After, 흡연 후

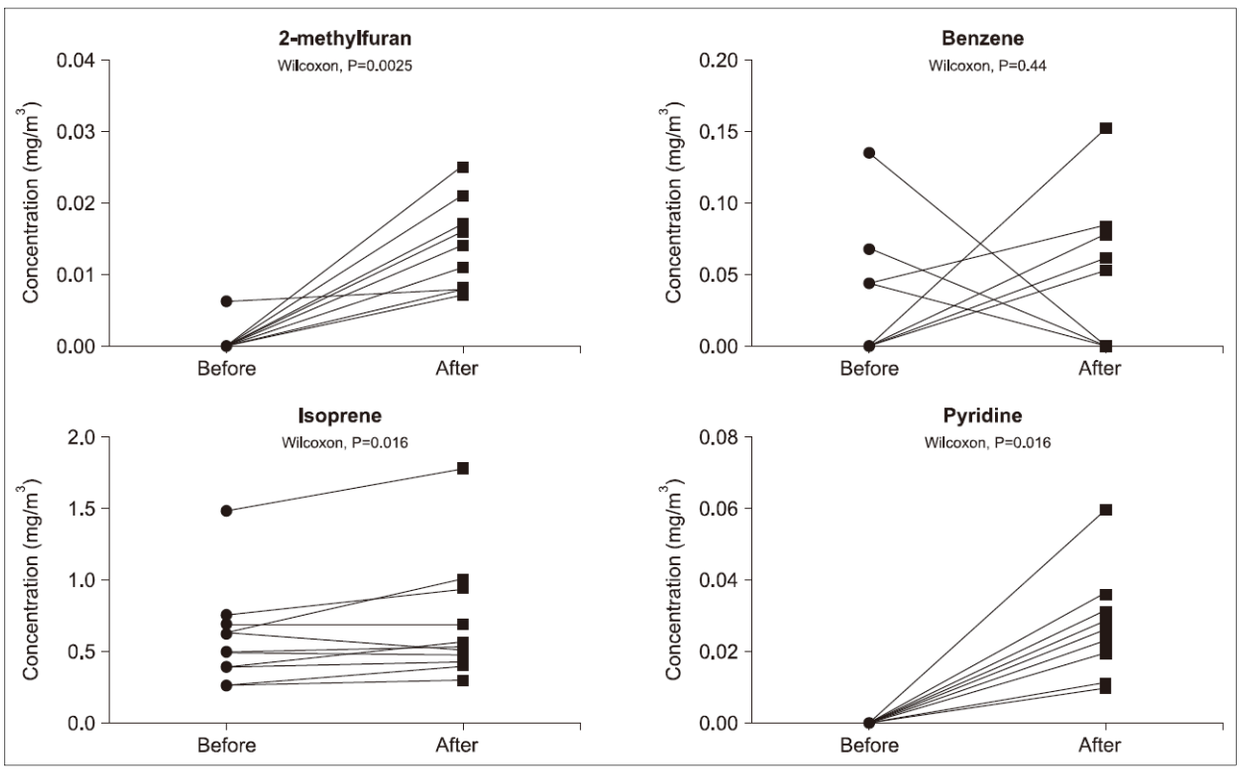


그림 3. 궐련형 전자담배 사용자의 호기 내 2-methylfuran, benzene, isoprene and pyridine(20분 이내 최대값). Before, 흡연직전; After, 흡연 후

표 4. 흡연유형에 따른 호기 내 일산화탄소(CO) 분포

흡연 유형	인원 수	일산화탄소 (ppm)		
		≤4	5-10	>10
비흡연자	10	10	0	0
궐련	11	0	6	5
궐련형 전자담배	12	11	1	0
액상형 전자담배	2	2	0	0
이중사용자	5	3	1	1

본 연구에서 호기 내 검출된 성분은 근접거리나 밀폐된 실내에서 호기를 통해 전달할 수 있는 물질로, 흡연자의 흡연 후 유의하게 증가하는 물질은 비흡연자에게 간접흡연의 영향을 줄 가능성이 제기된다. 검출된 분석항목 중 발암성 정보가 있는 성분은 isoprene (IARC 2B), benzene (IARC 1), toluene (IARC 3), pyridine (IARC 3) 총 4종이 있고, 이외 성분들도 물질안전보건자료(MSDS)에 따르면 2-methylfuran은 급성독성(흡입:증기)이 있고, 2-butanone은 눈 · 호흡기계 자극을 줄 수 있으며, 1-butanol, 1-pentanol, cyclopentanol, cis-3-hexen-1-ol, pyrrole 등은 피부 · 눈 자극을 줄 수 있다. 표 3과 같이 분석항목 중 흡연자의 호기에서만 90% 이상의 높은 검출빈도를 보인 2-methylfuran, pyridine 등은 액상형 전자담배를 제외한 궐련, 궐련형 전자담배 및 복합 사용자 그룹에서 100% 검출되었다(표 3). 앞선 연구에서는 흡연에 따른 호기 바이오마커로 nonanal,(16) 폐암을 판별하는 호기 바이오마커로 1-butanol, 3-hydroxy-2- butanone 등이 확인된 바 있다.(19)

이번 연구를 통해 궐련 및 궐련형 전자담배 사용자(복합 사용자 포함)의 경우에 2-methylfuran, pyridine이 100% 검출이 확인되어 해당성분들의 검출 여부에 따라 흡연자 중 궐련 및 궐련형 전자담배 사용자 구분이 가능하였다. 그러나 benzene의 경우는 2-methylfuran, pyridine이 궐련형 전자담배 67%, 액상형 전자담배 50%, 복합사용자 80%에서 검출되어 명확한 구분이 어려웠으며, isoprene은 담배 전 유형에서 모두 100% 검출되었지만 비흡연자 또한 검출되어, 두 성분 모두 흡연자의 특이적인 분별 물질로 적합하지 않았다. 2-Methylfuran의 경우 궐련(표준담배) 주류연에서 175 μg/item이 검출되었고, pyridine의 경우 궐련(표준담배) 주류연에서 68.4 μg/item이 검출되었으며, item은 cigarette 또는 heated tobacco "stick"을 의미한다.(25) 본 연구 호기에서의 2-methylfuran 최대값 0.49 mg/m^3, pyridine 최대값 0.30 mg/m^3 임을 미루어 흡입한 주류연 내 성분 양에 의해 호기 내 같은 성분 양 증가에 영향을 줄 수 있음이 확인된다.

호기의 경우 숨의 채취시점(초기 날숨, 중간 날숨, 마지막 날숨 등) 또는 내뱉는 방식(얕고 짧은 날숨, 깊고 긴 날숨 등)에 따라 호기 내 성분 조성(종류, 양 등)이 달라질 수 있으나 시료 제공자 의 편의를 고려하여 주로 편안히 내뱉는 방식으로 숨을 채취하였다. 흡연자(흡연 전 · 후) 및 비흡연자 호기를 받아 그 안에 들어있는 성분의 양을 비교하고 간접흡연의 가능성을 확인하는 연구목적에는 영향을 거의 미치지 않은 것으로 사료된다. 그러나 시료대상자 모집과정에서 액상형 전자담배 그룹(n=2)과 복합 사용자 그룹(n=5)의 수가 적어 담배유형별 호기 내 성분비교 결과 해석에 한계가 다소 존재하였다. 그리고 복합사용자 중에서 궐련+궐련형 전자담배 이중사용자가 4명, 궐련형 전자담배＋액상형 전자담배 이중사용자가 1명인데 이들의 값을 복합사용자로 합쳐서 지칭하기에는 궐련 사용 유무에 따라 편차가 발생되어 복합사용자 중에서도 여러 조합에 따라 결과가 달라질 수 있는 한계가 있다.

본 연구는 흡연 후 경과시간(흡연직전-흡연 후 20분)에 따른 호기 내 성분 양을 확인하였고, 흡연 여부 판별지표로 기존 호기 내 CO를 포함하여 VOCs를 추가하여 연구를 수행하였다. 호기와 관련하여 궐련형 전자담배, 액상형 전자담배를 포함한 다양한 담배유형을 적용한 연구사례는 아직 보고된 바 없으며, 우리 연구는 특히 궐련형 전자담배 또한 2-methylfuran, isoprene, pyridine 등이 흡연 전후에서 유의미한 양 차이를 보이는 것을 밝혀냈다. 이번 결과는 2-methylfuran, pyridine이 흡연 여부의 판별지표로 활용될 수 있는 가능성을 보여주었으며, 궐련 뿐 아니라 궐련형 전자담배 등 신종담배 흡연자의 호기 또한 간접흡연을 일으킬 수 있음을 다시 확인시켜 주는 결과였다.

참고문헌

1. 질병관리본부, 국민건강영양조사
2. 질병관리본부, 청소년건강행태조사
3. Rammamurthi D. et al. 2019. JUUL and other stealth vaporisers: hiding the habit from parents and teachers. Tob Control, 28, 610-6.
4. Sureda X. et al. 2013. Secondhand Tobacco Smoke Exposure in Open and Semi-Open Settings: A Systematic Review. Environ. Health Perspect, 121(7), 766-73.
5. U.S. Dept. of Health and Human Services. 2006. The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: A Report of the Surgeon General. Centers for Disease Control and Prevention.
6. U.S. Dept. of Health and Human Services. 2014. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Centers for Disease Control and Prevention.
7. Hwang J, Lee K. 2014. Determination of Outdoor Tobacco Smoke Exposure by Distance From a Smoking Source. Nicotine Tob. Res, 16(4), 478-84.
8. Fu M. et al. 2016. Second-hand smoke exposure in indoor and outdoor areas of cafés and restaurants: Need for extending smoking regulation outdoors? Environ. Res, 148, 421-8.
9. Amalia B. et al. 2021. Exposure to secondhand aerosol of electronic cigarettes in indoor settings in 12 European countries: data from the TackSHS survey. Tob Control, 30(1), 49-56.
10. Ilies BD. et al. 2020. Identification of volatile constituents released from IQOS heat-not-burn tobacco HeatSticks using a direct sampling method. Tob Control, 0, 1-7.
11. Uchiyama S. et al. 2018. Simple Determination of Gaseous and Particulate Compounds Generated from Heated Tobacco Products. Chem. Res. Toxicol, 31, 585-93.
12. Torres S. et al. 2018. Biomarkers of Exposure to Secondhand and Thirdhand Tobacco Smoke: Recent Advances and Future Perspectives. Int. J. Environ. Res. Public Health, 15, 2693.
13. Capone S. et al. 2017. Chromatographic analysis of VOC patterns in exhaled breath from smokers and nonsmokers. Biomed. Chromatogr, e4132.
14. Buszewski B. et al. 2009. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/ mass spectrometry. Biomed. Chromatogr, 23, 551-6.
15. Hamblin D, Almirall J. 2017. Analysis of exhaled breath from cigarette smokers using CMV-GC/MS. Forensic Chem, 4, 67-74.
16. Jareno-Esteban JJ. et al. 2013. Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath in a Healthy Population: Effect of Tobacco Smoking. Arch Bronconeumol, 49(11), 457-61.
17. Park SS. et al. 2007. Validity of Expired Carbon Monoxide and Urine Cotinine Using Dipstick Method to Assess Smoking Status. J Prev Med Public Health, 40(4), 297-304.
18. Wang Y. et al. 2012. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines. Cancer Biomark, 11, 129-37.
19. Song G. et al. 2010. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. Lung Cancer, 67, 227-31.
20. National Institute of Environmental Research. 2016. Methods for Determination of Hazardous and Volatile Organic Compounds in Ambient Air-Adsorbent Trap Method(ES 01804.2). Korean Ministry of Environment.

21. Lawal O. et al. 2017. Exhaled breath analysis: a review of ‘breath-taking’ methods for off-line analysis. Metabolomics, 13, 110.

22. St.Helen G. et al. 2018. examination of Philip Morris International’s claim of reduced exposure. Tob control, 27, s30-s36.

23. Tayyarah R, Long GA. 2014. Comparison of select analytes in aerosol from e-cigarettes with smoke from conventional cigarettes and with ambient air. Regul. Toxicol. Pharmacol, 70, 704-10.

24. Phares DJ. et al. 2017. In-situ analysis of the gas- and particle-phase in cigarette smoke by chemical ionization TOF-MS. J. Aerosol Sci, 106, 132-41.

25. Bentley MC. et al. 2020. Comprehensive chemical characterization of the aerosol generated by a heated tobacco product by untargeted screening. Anal. Bioanal. Chem, 412, 2675-85.

※ 본 논문은 2021년 6월 대한금연학회지(JKSRNT)에 게재(2021;12(1):24-33)

⑩ 궐련과의 복합사용에 따른 소변 내 cotinine, NNAL 함량 비교 시범연구

연구 배경

우리나라 흡연율은 21.5%(남성 35.7%, 여성 6.7%, 2019년)으로, 감소추세에 있으나, 아이코스, 릴 등 다양한 궐련형전자담배가 도입되면서 여성 청소년 및 성인에서 증가세가 2018년에 확인된 바 있다(1-2). 또한, 쥴(JUUL) 등 궐련의 전형적인 모습을 하지 않은 다양한 형태의 전자담배 기기가 개발·유통(3)이 되면서, 궐련과 복합사용 등 새로운 금연방해요인이 될 우려가 있다. 따라서, WHO는 담배는 어떤 형태든 건강에 치명적이며 담배로 인해 발생한 폐질환은 일단 발병하면 발병하기 전 상태로 되돌릴 수 없으므로 가능한 조속히 담배사용 중단을 권고(4)하고 있으며, 미국 식품의약국(FDA)에서는 담배회사의 '위해성 저감담배 제품'으로 궐련형전자담배를 신청('16.12.)한 건에 대해 '노출저감'제품으로 승인('20)하였으나, '위험저감'으로는 인정하지 않은 바 있다. 특히, 우리나라 국가금연지원센터에서 실시한 초점집단면접(Focus group interview, '17) 조사결과 흡연자, 비흡연자 모두 신종담배가 연기와 냄새 뿐 아니라 건강에 대한 해로움도 적다고 인식하고 있다는 것이 확인되어, 복합사용 등에 대한 위해성을 규명하여 안내할 필요가 있다. 이에 담배유형별 흡연자 소변 내 대표적 흡연 바이오마커인 cotinine[28]과 NNAL[29]의 함량 비교분석과 복합 사용 등 흡연행태에 대한 기초연구를 진행하여 향후 흡연폐해 건강영향 연구에 활용하고자 한다.

연구 방법

1. 조사대상

2019년 8월부터 2020년 3월까지 충북 청주시 소재 오송생명과학단지 내 만 19세 이상 65세 이하 성인 남녀를 대상으로 흡연자 및 비흡연자를 모집하여 실시하였으며, 표1과 같이 흡연자군은 총 27명, 비흡연자군은 총 16명으로 구성되었다(IRB 승인번호: 2019-05-03-T-A).

28) 담배 주요성분인 nicotine의 대사산물
29) 담배특이니트로스아민류(TSNAs)인 1급 발암물질 NNK의 대사산물, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol;

표 1. 연구대상자현황 및 담배유형

	흡연자		비흡연자	
	인원	%	인원	%
전체	27	100	16	100
나이				
≤30	2	7	3	19
31-50	23	86	11	69
>50	2	7	2	12
성별				
남	30	100	6	38
여	0	0	10	62
담배유형				
궐련	11	41	-	-
궐련형 전자담배	12	44	-	-
이중사용자 (궐련+궐련형 전자담배)	4	15	-	-

2. 담배 유형조사

흡연자군의 담배유형을 조사하기 위해 설문조사를 진행하였고, 설문문항에는 흡연빈도, 담배 제품명, 마지막 흡연 후 경과시간 등이 있었으며 대면조사 방식으로 연구대상자가 직접 작성하도록 하였다. 비흡연자군에 대해서는 해당 내용은 조사하지 않았다.

담배유형별 용어는 국민건강증진법 제23조에서 '궐련' 과 전자담배 중에서는 '니코틴 용액을 사용하는 경우', '연초 및 연초 고형물을 사용하는 경우' 로 나뉘는데 후자의 경우 궐련형, 기타유형으로 분류된다. 여기서 궐련형은 아이코스 등 가열담배을 말한다. 흡연자의 모집 기준은 최근 1달 이내 흡연 경험이 있는 경우로 하였다.

3. 시료채취

연구 참여자에게 시료용기(50mL palcon tube)를 제공하여 흡연 후 4시간 이내에 제공된 용기에 소변시료를 직접 채취하도록 안내하였다. 채취 후 소변 시료를 아이스박스에 넣어 실험실까지 이동하여 분석 전 까지 냉동(-20℃) 보관하였다.

4. 성분분석

가. 소변 내 cotinine 분석

흡연폐해실험실 ISO17025 인정시험법 'KDCA-M-01'에 따라 분석하였다. 분석 전 시료 전처리를 위해 200 μL의 시료(소변)와 내부표준물질 (480

ng/mL) 50 μL, 100 μL water, 0.85 mL의 acetone을 혼합한 후 충분히 섞어주었다. 시료 내 존재하는 염, 단백질, 그 외 효소들을 침전시키기 위해 10분 이상 4 ℃에서 보관 후 13,000 r/min으로 30분간 4 ℃에서 원심분리하였다. 1.5mL e-tube에 상층액 400 μL을 조심스럽게 옮긴 후 진공원심농축기를 40분 동안 가동하여 acetone을 제거하였다. 전처리가 완료된 시료는 LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량분석기, Agilent 6460 triple quadrupole)를 이용하여 표2와 같은 조건으로 분석하였다.

표 2. LC/MS/MS 소변 내 cotinine 분석조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
- ·컬럼유형 : 150 mm × 4.6 mm× 5 μm, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
- ·흐름속도: 1 mL/min
- ·주입량: 5 μL
- ·컬럼오븐 온도: 40 ℃
- ·자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.01	97	3	1
1.00	97	3	1
9.00	70	30	1
10.50	70	30	1
10.51	0	100	1
13.50	0	100	1

▶ MS 조건

-	cotinine	cotinine-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	24	28
단편화전압 (fragmentor voltage)	115	115
모이온 (precursor ion)	177.0	180.0
조각이온 (product ion)	80.1	80.0
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)	
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)	
온도(℃)	300	

나. 소변 내 NNAL 분석

흡연폐해실험실 ISO17025 인정시험법 'KDCA-M-06'에 따라 분석하였다. 분석 전 그림1과 같이 시료를 전처리한 후 LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량분석기, Agilent 6460 triple quadrupole)를 이용하여 표3과 같은 조건으로 분석하였다.

① [SPE(고체상추출) 컬럼 조화]
- 0.1 N KOH(수산화칼륨) 5mL 주입 후 3분 정제
- 10 mL methylene chloride을 이용하여 용출 (해당과정 두 번 반복)
- 질소가스(10 psi, 20분)를 유입하고 60℃ 오븐에서 48시간 이상 건조

▼

② [SPE(고체상추출)]
- 5 mL 시료에 10 ng/mL 내부표준물질 1mL을 첨가
- 0.5 mL β-glucuronidase (20 000 units/mL)을 첨가하여 37℃에서 24시간 보관
  * Free form 분석 시 해당과정 생략
- 10 N NaOH(수산화나트륨) 100 μL 첨가
- SPE 컬럼에 주입 후 3-4분 후 7 mL methylene chloride를 이용하여 용출 (해당과정 두 번 반복)

▼

③ [LLE(액체상 추출)]
- 시료에 0.1 N HCl(염산) 3 mL을 첨가
- 10분동안 교반기에서 혼합
- 원심분리기를 통해 층분리된 HCl(염산) 용액층을 TEST Tube에 분리
- 10 N NaOH(수산화나트륨) 30 μL을 이용해 중화
- 3 mL phosphate buffer(완충용액) 첨가

▼

④ [MIP SPE(고체상 추출)]
- MIP 컬럼을 1 mL methylene chloride, 1 mL methanol, 1 mL 증류수를 이용해 세척
- 시료를 주입하고 0.5 mL/min 속도로 용출
- 질소가스(20 psi, 5분)를 유입하여 컬럼건조
- 15 psi 압력을 걸고 1 mL 증류수, 1 mL toluene, 1 mL toluene/methylene chloride(9:1)을 이용해 컬럼 내 불순물을 제거
- 3 mL methylene chloride를 이용해 시료용출
- 용출된 시료는 질소 농축기를 이용해 20 μL로 농축

그림 1. NNAL 전처리흐름도

표 3. LC/MS/MS 소변 내 NNAL 분석조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
·컬럼유형 : 150 mm × 3 mm× 5 μm,
역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
·흐름속도: 0.6 mL/min
·주입량: 10 μL
·컬럼오븐 온도: 40 ℃
·자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.00	95	5	0.6
0.50	85	15	0.6
4.50	15	85	0.6
5.00	85	15	0.6
6.00	95	5	0.6
8.00	95	5	0.6

▶ MS 조건

-	NNAL	NNAL-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	18	18
단편화전압 (fragmentor voltage)	65	65
모이온 (precursor ion)	210.2	213.2
조각이온 (product ion)	93.0	93.1
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)	
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)	
온도(℃)	300	

연구 결과

27명의 흡연자, 16명의 비흡연자의 성분별 검출 수준은 평균값의 범위와 빈도수를 확인한 결과, 담배 내 주요성분인 nicotine의 대사물질인 cotinine은 흡연자 그룹에서 78~4,675 ng/mL으로 검출되었으며, 비흡연자 그룹에서는 0.45-1.54 ng/mL 수준으로 검출되었다(표4, 그림1). 흡연자 27명 중 궐련, 궐련형전자담배, 이중사용자 그룹간 cotinine 함량은 유의적 차이가 없었다(P<0.05).

담배 내 특이적으로 존재하는 1급 발암물질인 NNK의 대사물질 NNAL은 흡연자 그룹에서 0~87 pg/mL으로 검출되었으며, 비흡연자 그룹에서는 불검출 되었다(표4, 그림2). 흡연자 27명 중 궐련형 전자담배 흡연자 그룹의 NNAL 함량은 궐련담배 흡연자에 비해 유의적으로 낮은 함량으로 검출되었으나, 궐련담배 흡연자와 이중사용자 그룹간 NNAL 함량은 유의적 차이가 없었다(P< 0.05).

표 4. 소변 내 Cotinine, NNAL 분석범위

성분	흡연자, 27명				비흡연자, 16명
	궐련, 12명	궐련형 전자담배, 11명	이중 사용자, 4명	전체, 27명	
Cotinine (ng/mL)	159-4232 (12/41%)	148-4675 (12/44%)	78-3244 (5/15%)	78-4675 (27/100%)	0.45-1.54 (16/100%)
NNAL (pg/mL)	0-87 (9/33%)	0-42 (7/26%)	3-18 (4/15%)	0-87 (20/74%)	불검출 (0/0%)

(n/%): (검출 수/빈도); 정량한계: cotinine 0.1 ng/mL, NNAL: 1 pg/mL; 불검출: 정량한계 미만;

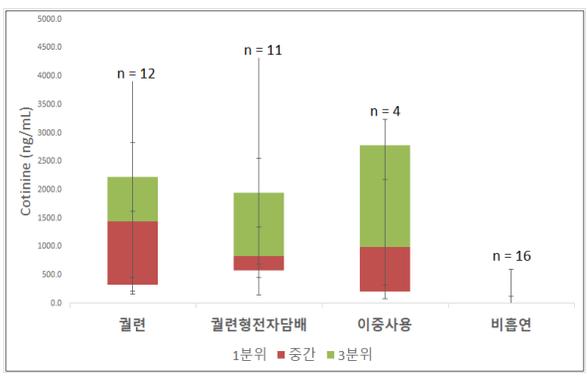


그림 1. 담배유형에 따른 소변 내 cotinine 함량

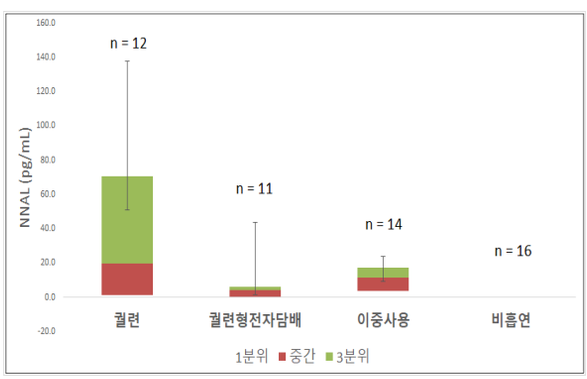


그림 2. 담배유형에 따른 소변 내 NNAL 함량

연구 고찰

본 시범연구 결과에서 소변 내 cotinine 함량이 궐련과 궐련형전자담배에서 유의적 차이가 없었던 점을 통해 궐련형전자담배 흡연으로 인한 nicotine 중독 가능성은 여전히 높게 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, 1급 발암물질인 NNAL은 불검출된 비흡연자 그룹에 비해 궐련형전자담배 그룹에서는 여전히 검출되고 있는 점을 통해 궐련형전자담배 흡연으로 인한 발암물질 노출이 배제될 수 없음을 확인하였으며, 궐련형전자담배 단일사용으로 완전하게 전환되지 않는 이중사용자의 경우궐련담배 흡연으로 인한 체내 NNAL 노출정도와 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 질병관리본부, 국민건강영양조사
2. 질병관리본부, 청소년건강행태조사
3. Rammamurthi D. et al. 2019. JUUL and other stealth vaporisers: hiding the habit from parent s and teachers. Tob Control, 28, 610-6.
4. World Health Organization. 2019. Don't let tobacco take your breath away.

2 담배제품 및 담배 배출물 관련 연구

① 담배주류연 내 Tar 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

세계보건기구(WHO)가 운영하는 '담배연구소간 네트워크(TobLabNet)'는 2005년 담배규제 기본협약(FCTC)에 따라 담배제품이나 연기 등 배출물 검사를 위한 시험법을 개발하고 표준화하기 위해 구성된 협의체로 미국(FDA), 영국(Department of Health), 캐나다(Health Canada), 일본(국립보건의료과학원, NIPH) 등 29개국 37개 기관이 가입[30]되어 있다. 최근 사용이 늘어나고 있는 전자담배의 경우 주요 성분(Nicotine 등)에 대한 시험법이 궐련형 담배와 크게 다르지 않아 적용이 가능하다. 따라서 WHO 담배규제기본협약(FCTC)의 권고하는 측정이 필요한 담배성분측정의 인프라를 구축하여 다양한 연구결과들을 국제사회와 지속적으로 공유해 나갈 계획으로 궐련 주류연 내 Nicotine, Water 시험을 통해 Tar 시험방법 절차서를 마련하여 이를 표준담배(궐련)에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

흡연폐해실험실의 담배연기성분 중 Nicotine 및 Tar함량 분석법은 ISO 3402:1999(E), ISO 4387:2000(E), ISO 10315-2013(E), ISO 10362-1:1999, KS Q ISO 24153을 근거로 작성하였다.

측정원리는 흡연 장비(Smoking Machine)로 궐련으로부터 연기성분만을 추출하여 GC로 Nicotine 과 Water를 측정하여 Tar 함량을 계산한다. 기체상태의 혼합 시료를 추출액으로부터 추출한 후 분리관, 즉 컬럼을 이용하여 각각의 단일 화합물로 분리한 후, 검출기로 각 성분을 검출하여 시료를 정성 및 정량 분석을 한다. Nicotine 과 Water에 대한 기체상의 시료를 정확하고 일정한 기체 흐름으로 분리하여 감도 높은 검출을 적용한다. 이 방법은 모든 종류의 담배시료에 적용 가능하다.

2. 시료 전처리

ISO3402방법에 따른 전처리 과정으로 궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관 후(1) 궐련의 꽁초길이를 ISO 4387(2)에 따라 궐련의 입물림부에 적용되는 겉포장(overwrap)의 길이에 3 mm를 추가한 길이로 표시하였다. 회전형 흡연자동장치(RM20H, Borgwaldt)(그림 1) 흡연조건은 ISO 3308(3)과 HCI T-115[31]에 따라 국제표준화기구(ISO) 조건과 캐나다(HCI) 조건을 설정값으로 흡입부피는 ISO 35 mL, HCI 55 mL이고, 흡입간격은 ISO 60초, HCI 30초이며, 환기차단율(%)은 ISO 0 %, HCI 100 %였다(표 1). 이 흡연조건으로 10~20개비의 담배연기를 캠브리지필터패드에 포집하여 각각 분석대상에 해당하는 내부표준물질을 첨가하여 추출용액(2-Propanol)을 통해 160 rpm에서 30분동안 진탕하여 용출시킨 후 0.45 um PTFE 필터를 통과시켜 적정양을 바이알에 옮겨 담아 GC로 분석하였다(그림 2).

그림 1. 회전형자동흡연장치

30) 담배규제기본협약(Framework Convention on Tobacco Control: FCTC): WHO에서 '03년 5월 채택한 담배규제 분야 국제협약('15.1월 현재 179개국 비준)

31) Health Canada Official Method T-115(1999): 주류연 담배연기 내 타르, 니코틴, 일산화탄소 분석

표 1. 흡연조건

내용	ISO	HCI
흡입부피 (mL)	35	55
흡입간격 (s)	60	30
흡입지속시간 (s)	2	2
환기차단율 (%)	0	100

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화
▶ 꽁초 길이 표시

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 회전형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록
▶ 연기포집기 무게를 측정하여 총 입자상물질 계산

↓

④ 담배연기 포집 및 용출
▶ 포집된 캠브리지필터패드를 60mL 갈색병에 옮김
▶ 각각의 분석대상성분에 해당하는 내부표준물질을 포함한 추출용매(2-Propanol)를 추가
- 회전형(92mm CFP) 50mL, 선형(44mm CFP) 20mL
▶ 파라필름으로 밀봉 후 진탕기에서 160 rpm, 30분 흔들어 용출

↓

⑤ 시료 분석
▶ 처음 1-2 mL 정도의 추출액은 버리고, 0.45 μm PTFE로 필터 후 2 mL 바이알에 옮겨 기기분석

그림 2. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

캠브리지필터패드 내 포집된 담배연기를 기기분석하기 위한 GC 기기조건은 표 2과 같다. Water 및 Nicotine 분석을 위한 컬럼은 HP-PLOT Q (15 m x 0.32 mm x 20 um, HP-Ultra2 (25 m x 0.32 mm x 0.52um)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 150 ℃(2분 유지), 온도상승은 30 ℃/min, 최종온도는 270 ℃, 최종온도에서의 유지시간은 5분으로 설정하였으며 총 분석시간은 11분이었다. 검출순서는 각각 정량을 위한 내부표준물질 먼저 검출되고 그다음으로 분석항목인 Nicotine, Water순으로 검출되었다.

표 2. 궐련 주류연 내 Tar 분석을 위한 기기조건

GC 기기조건

- 자동주입기
▷ 방법 : GC 동시 주입
▷ 주입량 : 2 uL

- Water(검출기: TCD)
▷ 컬럼 : HP-PLOT Q (15 m x 0.32 mm x 20 um)
▷ 주입 온도(℃) : 250 ℃
▷ 운반기체 유속: He Contant pressure (10 psi)
▷ 주입 모드(비율) : Split(20:1)
- Nicotine(검출기: FID)
▷ 컬럼 : HP-Ultra2 (25 m x 0.32 mm x 0.52um)
▷ 주입 온도(℃) : 250 ℃
▷ 운반기체 유속: He Contant pressure (10 psi)
▷ 주입 모드(비율) : Split(40:1)

- 검출기(검출기: TCD)
▷ 온도(℃) : 270 ℃
▷ 기준가스 유속 : 20 mL/min
▷ Makeup 가스 유속(He) : 7 mL/min
- 검출기(검출기: FID)
▷ 온도(℃) : 280 ℃
▷ H_2 유속 : 40 mL/min
▷ Air 유속 : 450 mL/min
▷ Makeup 가스 유속(He) : 45 mL/min

▷ [GC 오븐 프로그램]
총 분석시간 : 11 min

초기온도(℃)	온도상승 (℃/min)	최종온도(℃)	유지시간 (min)
150	-	-	2
170	30	270	5

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 표준담배를 시료로 활용하여 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 선택성, 직선성, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계 등이었다.

1) 특이성(Selectivity)

특이성 검증은 결과판독에 영향을 주는 방해 물질을 인위적으로 시료에 첨가하여 동일한 시험방법으로 분석한 후, 방해물질 첨가 전, 후의 결과가 동일한지 확인한다.

2) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분한 면적(area)을 내부표준물질 피크를 적분한 면적(area)으로 나눈 비(ratio)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정확성은 시료 검출수준을 고려한 농도범위의 검정곡선에 범위 내 농도를 적용하여 그 값이 얼마나 일치하는지를 백분율(%)로 나타내었다. 정밀성은 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 반복・측정하여 평가하였다. 본 실험결과의 정밀성은 일내(interday) 즉, 같은 실험을 같은 날 시간을 두고 7반복 실시하고, 일간[32](interday)에서 3일에 걸쳐 3회 반복 측정에 대한 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었다.

4) 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 방법검출한계에 3을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

32) 동일한 조건하에 실험일을 달리하여 반복적인 작업 시행

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 ISO10315:2013, 10362-1:2019, 4387:2019방법을 참고하여 시료전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준물질 및 검정곡선 조제방법, GC 기기분석 조건(분할모드 및 비율, 검출기온도 등) 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 특이성

Nicotine 표준액 1 mg과 내부표준물질인 Anethole 1.1865 mg/mL 첨가하여 추출용매인 Propan-2-ol과 Nicotine, ISTD가 다른 매트리스 성분들의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인한다(그림 3).

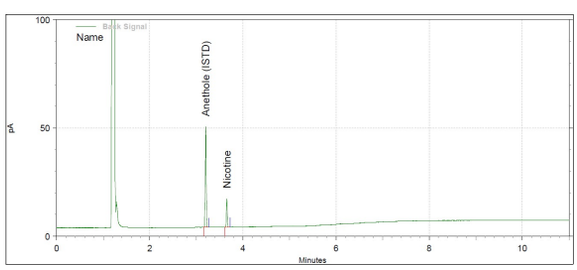


그림 2. Nicotine 표준물질 및 내부표준물질(ISTD)

Water 표준액 5 mg과 내부표준물질인 Methanol 0.0988 mg/mL 첨가하여 추출용매인 Propan-2-ol과 Nicotine, ISTD가 다른 매트리스 성분들의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인한다(그림 4).

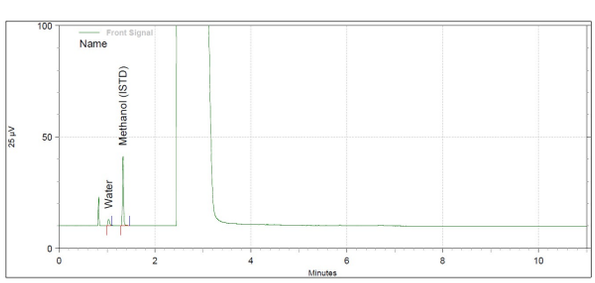


그림 3. Water 표준물질 및 내부표준물질(ISTD)

2) 직선성

분석대상물질인 Nicotine, Water의 R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 5).

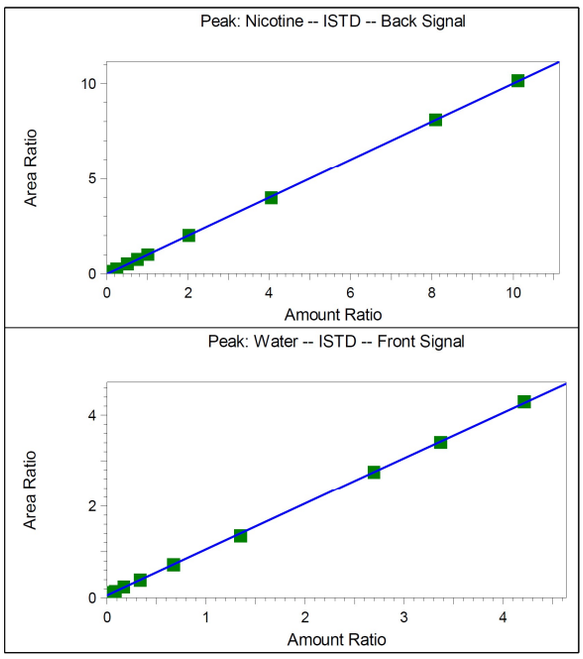


그림 4. 정량분석을 위한 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

검정곡선 농도범위 내 12, 25, 50 ug/mL에 대하여, 7회 반복 측정하여 회수율(%R)로 계산하여 정확성을 확인하였다. 또한 정밀성은 일내 1가지 농도에 대하여 7회 이상 측정하여 상대표준편차(RSD %)로 반복 측정하였고, 알간 정밀은 총 4일에 걸쳐 4반복하여 확인하였다.

Nicotine 정확성은 0.012 mg/mL 농도지점에서 정확도 93 %, RSD 0.4 %이었고, 0.025 mg/mL 농도지점에서 정확도 96 %, RSD 0.3 %이었고, 0.05 mg/mL 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %이었다.

Water 정확성은 0.05 mg/mL 농도지점에서 정확도 87 %, RSD 8.3 %이었고, 0.1 mg/mL 농도지점에서 정확도 112 %, RSD 4.8 %이었고, 0.2 ug/mL 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 1.9 %이었다(표 3).

Nicotine 일내 정밀성은 RSD 0.3 %이었고, 1일 일간 정밀 · 정확도는 0.012 mg/mL 농도지점에서 정확도 93 %, RSD 0.4 %, 0.025 mg/mL 농도지점에서 정확도 96 %, RSD 0.2 %, 0.05 mg/mL 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %이었다.

2일 일간 정밀 · 정확도는 0.012 mg/mL 농도지점에서 정확도 88 %, RSD 0.3 %, 0.025 mg/mL 농도지점에서 정확도 96 %, RSD 0.6 %, 0.05 mg/mL 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.2 %이었다.

3일 일간 정밀 · 정확도는 0.012 mg/mL 농도지점에서 정확도 92 %, RSD 0.4 %, 0.025 mg/mL 농도지점에서 정확도 97 %, RSD 0.2 %, 0.05 mg/mL 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %이었다.

4일 일간 정밀 · 정확도는 0.012 mg/mL 농도지점에서 정확도 97 %, RSD 0.2 %, 0.025 mg/mL 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.2 %, 0.05 mg/mL 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.1 %이었다.

Water 일내 정밀성은 RSD 4.4 %이었고, 1일 일간 정밀 · 정확도는 0.2 mg/mL 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 1.8 %, 0.4 mg/mL 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.5 %, 0.8 mg/mL 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.5 %이었다.

2일 일간 정밀 · 정확도는 0.2 mg/mL 농도지점에서 정확도 98 %, RSD 2.1%, 0.4 mg/mL 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 1.4 %, 0.8 mg/mL 농도지점에서 정확도 104 %, RSD 1.0 %이었다.

3일 일간 정밀 · 정확도는 0.2 mg/mL 농도지점에서 정확도 106 %, RSD 1.6 %, 0.4 mg/mL 농도지점에서 정확도 104 %, RSD 3.2 %, 0.8 mg/mL 농도지점에서 정확도 104 %, RSD 1.0 %이었다.

4일 일간 정밀 · 정확도는 0.2 mg/mL 농도지점에서 정확도 103 %, RSD 3.8 %, 0.4 mg/mL 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.3 %, 0.8 mg/mL 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.5 %이었다(표 4).

표 3. 일내 정확도

Nicotine 농도 (ug/mL)	정확도 (%)	RSD (%)
0.012	93	0.4
0.025	96	0.3
0.05	99	0.1

Water 농도 (mg/mL)	정확도 (%)	RSD (%)
0.05	87	8.3
0.1	112	4.8
0.2	99	1.9

표 4. 일간 정밀·정확도

<Nicotine>

분석횟수	측정값(mg/mL)	평균(mg/mL)	RSD(%)
1	0.72	0.719	0.33
2	0.72		
3	0.72		
4	0.72		
5	0.72		
6	0.72		
7	0.72		

농도 / 일차	0.012 mg/mL		0.025 mg/mL		0.05 mg/mL	
	RSD (%)	정확도 (%)	RSD (%)	정확도 (%)	RSD (%)	정확도 (%)
1	0.4	93	0.2	96	0.1	99
2	0.3	88	0.6	96	0.1	100
3	0.4	92	0.2	97	0.1	100
4	0.2	97	0.2	100	0.1	101

<Water>

분석횟수	측정값(mg/mL)	평균(mg/mL)	RSD(%)
1	0.86	0.88	4.4
2	0.88		
3	0.96		
4	0.86		
5	0.85		
6	0.88		
7	0.86		

농도 / 일차	50 mg/L		250 mg/L		500 mg/L	
	RSD (%)	정확도 (%)	RSD (%)	정확도 (%)	RSD (%)	정확도 (%)
1	1.8	99	0.5	100	0.5	100
2	2.1	98	1.4	100	0.8	100
3	1.6	106	3.2	104	1.0	104
4	3.8	103	0.3	99	0.5	101

4) 검출 · 정량한계

검출이 가능한 수준의 농도를 분석장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 각각의 Nicotine과 Water의 검출한계와 정량한계를 산출하였다(표 5, 6).

표 5. Nicotine의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/mL)	평균 (mg/mL)	표준 편차 (mg/mL)	검출 한계 (mg/mL)	정량 한계 (mg/mL)
1	0.0247	0.0247	0.00005	0.0002	0.0005
2	0.0248				
3	0.0248				
4	0.0247				
5	0.0247				
6	0.0247				
7	0.0247				

표 6. Water의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/mL)	평균 (mg/mL)	표준 편차 (mg/mL)	검출 한계 (mg/mL)	정량 한계 (mg/mL)
1	0.08	0.078	0.002	0.007	0.023
2	0.08				
3	0.08				
4	0.08				
5	0.08				
6	0.07				
7	0.08				

2. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: GC를 이용한 담배 주류연 내 NFDPM (Tar)분석

나. 제개정일: 2020.11.06.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)' 를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관 시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버 [ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ± 3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관 한다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품을 사용하고, 그 외는 HPLC용 또는 정량분석용 시약을 사용한다(표 22). 표준물질 사용 시 유효기간을 확인하고 사용한다(표 7).

표 7. 시약 등 목록

연번	시약명
1	trans-anethole
2	Propan-2-ol, anhydrous
3	-(-) Nicotine
4	methanol, anhydrous
5	De-ionized water

③ 조제용 시약

추출 용액은 2-propanol 1 L에 anethole을 100 μL와 anhydrous methanol 1.5 mL 넣어 뚜껑을 닫은 후 10회 inversion하여 충분히 섞어준다.

농도가 진한 표준용액(stock solution)는 매일 새롭게 조제하여 사용하는 것을 권장한다. 되도록 인증표준물질(Certified Reference Materials, CRM)을 사용하고, 구입한 CRM의 보관방법을 따를 수 있다.

검정곡선 혼합 표준용액의 경우는 표 8과 같다.

표 8. 검량곡선 표준용액 조제방법

No	Nicotine Stock (μL)	Nicotine (mg/mL)	H2O Stock (μL)	H2O (mg/mL)
1	2500	1.000	3125	5.000
2	2000	0.800	2500	4.000
3	1000	0.400	2000	3.200
4	500	0.200	1000	1.600
5	250	0.100	500	0.800
6	187.5	0.075	250	0.400
7	125	0.050	125	0.200
8	62.5	0.025	62.5	0.100
9	30	0.012	31	0.050
10	10	0.004	NO WATER	0

2) 장치 및 장비

주요장비인 GC system(Agilent 7890B와 유사한 기종), TCD, FID로 기기분석하고, 회전형 담배연기분석장치(Borgwaldt KC GmbH / RM20H와 유사한 기종)로 담배연기를 포집한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초음파세척기, 냉장고, 분석용 전자저울, 항온항습챔버, 볼텍서, 오븐, 데시게이터, 초순수제조장치 등이 있다(표 9).

표 9. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	20 μL, 200 μL, 1 000 μL	검정곡선, 시료분석
용량플라스크	100 mL, 250 mL, 1 L, 2 L	표준액 및 이동상 조제
초음파분해기 (Ultrasonic Cleaner)	-	이동상 용매 조제
냉장고	-	검액 보관
분석용 전자저울	-	시약 조제
항온항습챔버	-	시료 조화
Vortexer	-	표준액 조제
Dry oven	-	초자 건조
Desiccator	-	초자 보관
초순수 제조장치	-	이동상 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화(꽁초 길이 표시)

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 회전형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기 포집 및 용출
▶ 연기 포집기에서 filter disc를 분리하여, 플라스크에 넣은 후 추출용액을 넣어 160 r/min, 30분 교반
- 회전형(92mm CFP) 50mL, 선형(44mm CFP) 20mL
▶ 파라필름으로 밀봉 후 진탕기에서 160 rpm, 30분 이상 충분히 흔들어 용출

↓

⑤ 시료 분석
▶ 0.45 μm PTFE로 필터 후 2 mL 갈색바이알에 옮겨 기기분석

그림 6. 시험방법 절차흐름도

② 담배 주류연 성분분석을 위한 흡연조건

표 10. 흡연조건

흡연조건	ISO	HC
흡입부피 (mL)	35 ± 0.3	55 ± 0.5
흡입지속시간 (s)	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.02
흡입 빈도 (s)	60 ± 0.5	30 ± 0.3
공기 속도 (mm/s)	200 ± 30	200 ± 30
환기 차단율 (%)	0	100
꽁초 길이 (mm)	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것

③ GC 조건

표 11. 분석장비 기기조건

기체 크로마토그래프(GC)	
파라미터	설정값
TCD	
컬럼	HP-PLOT Q (15 m x 0.32 mm x 20 um)
주입구 온도	250°C
헬륨 이동가스 유속	Constant pressure (10 psi)
모드(비율)	Split(20:1)
FID	
컬럼	HP-Ultra2 (25 m x 0.32 mm x 0.52um)
주입구 온도	250°C
헬륨 이동가스 유속	Constant pressure (10 psi)
모드(비율)	Split(40:1)
검출기	
TCD	
온도	270°C
기준가스 유속	20 mL/min
Makeup 가스 유속(He)	7 mL/min
Makeup 가스 유속(He)	45 mL/min
FID	
온도	280°C
H_2 유속	40.0 mL/min
air 유속	450 mL/min
오븐 온도 프로파일	
초기온도 및 유지시간	150°C for 2 min
온도 램프	30°C/min to 270°C
최종온도 및 유지시간	270°C for 5min

라. 검증보고서 구성 및 내용

특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision) · 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection) · 정량한계(limit of quantification), 표준담배(3R4F) 시료분석 등으로 구성되었다.

특이성은 시료에 있는 모든 것 중에서 특별히 분석물질을 구별해 내는 정도를 확인하였고, 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.999 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였고, 정확도는 87 ~ 105 % 범위였다. 검출한계 및 정량한계는 Nicotine은 0.0001 mg/mL, 0.0005 ng/cigarette, Water는 0.008 mg/mL, 0.02 mg/mL였다. 시료분석은 담배연기(3R4F) 포집을 ISO조건과 HCI조건에서 각각 진행하였고, 일내 실험에서는 7회 반복실험을, 일간 실험에서는 3회 반복실험을 실시하여 결과를 산출하였다.

참고문헌

1. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
3. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.
4. International Organization for Standardization. 1991. ISO 10315:1991 (E) 「Cigarettes - Determination of nicotine in smoke condensates - Gaschromatographic method」.
5. International Organization for Standardization. 1991. ISO 10362-1:1991 (E) 「Cigarettes - Determination of water in smoke condensates - Part 1: Gaschromatographic method」.

② 담배 주류연 내 Tar 국외숙련도 참가결과

참가 개요

□ **목적** : ISO17025 시험결과 품질보증을 위한 국외 숙련도평가 참여를 통한 참가시험소 간 비교시험 및 흡연폐해실험실의 분석능력 평가

□ **주관기관** : 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터[33](Center for Tobacco Reference Products, CTRP)

□ **참가항목**

○ **분석 및 측정항목**: 담배 주류연 내 Tar, 니코틴, 수분

- **흡입횟수** : 흡입조건별 1개비 당 횟수로 측정
- **흡입조건(장비/방법)**: 회전형자동흡연장비 / 국제표준화기구(ISO), 캐나다보건부(HCI)

□ **참가기간**

- 2020. 4. 30 ~ 7. 30.

□ **결과판정기준**: |z| 스코어가 2이내일 경우 적합

결 과

2020년 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터의 숙련도참가결과 통보 시 모든 항목에서 |z| 스코어 2 이내로 산출되어 '적합' 판정을 받았다(5).

Tar는 ISO조건에서 -0.27, HCI조건에서 -0.91이었고, 니코틴은 ISO조건에서 -0.61, HCI조건에서 -0.43이었다. 수분은 ISO조건에서 0.64, HCI조건에서 -1.40이었다(표 1).

표 1. 2020년 국제 숙련도시험참가 결과

참가항목	Z 스코어	
	ISO	HCI
Tar	-0.27	-0.91
니코틴	-0.61	-0.43
수분	0.64	-1.40

참고문헌

1. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.
3. International Organization for Standardization. 1991. ISO 10315:1991 (E) 「Cigarettes - Determination of nicotine in smoke condensates - Gaschromatographic method」.
4. International Organization for Standardization. 1991. ISO 10362-1:1991 (E) 「Cigarettes - Determination of water in smoke condensates - Part 1: Gaschromatographic method」.
5. University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products. Proficiency Testing Round CIG-2020B Final Report, 2020

33) ILAC(국제시험기관인정협력체)과 국제상호인정(MRA) 체계에 있는 A2LA(미국)에 의해 공인된 기관으로, 국제적 수준의 담배관련 실험실 분석능력에 대한 숙련도 검증 수행

③ 배주류연 내 CO 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

세계보건기구(WHO)의 흡연실태보고서에 따르면, 전세계적으로 흡연으로 인해 매년 700만명 이상이 사망하는 것으로 추정하고 있다. 특히, 담배연기에는 유해물질인 타르, 니코틴, 일산화탄소가 다량 함유되어 있으며, 국제 암연구소(international agency for research on cancer, IARC)에 따르면 담배연기에는 약 4,700여 종의 유해물질과 약 60여 가지의 발암물질이 포함되어 있다고 하였다(2). 또한, 신종담배인 궐련형 전자담배, 액상형 전자담배의 배출물에서도 일산화탄소 등 다수의 유해물질이 검출되어 담배제품사용에 따른 건강위해우려가 지속되고 있다. 이에 궐련 주류연기내 Carbon monoxide 시험방법 절차서를 마련하여 이를 표준담배(궐련)에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

흡연폐해실험실의 CO 시험검사법 표준절차서는 CDC에서 사용 중인 Determination of Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide in Cigarette Smoke을 근거로 작성하였다. 이 방법은 궐련 연기의 증기상에 포함되어 있는 일산화탄소(CO)의 양을 측정하는 방법을 규정한다. ISO 4387:2000에 기술된 과정대로 궐련 흡연 시 발생되는 연기 중 증기상[34]을 포집하고, 일산화탄소로 보정된 비분산형 적외선 분석기(non-dispersive infrared analyser, NDIR)를 사용하여 일산화탄소를 측정하며, 궐련당 일산화탄소의 양을 계산한다.

2. 시료 포집

ISO3402방법에 따른 전처리 과정으로 궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관 후(1) 궐련의 꽁초길이를 ISO 4387(2)에 따라 궐련의 입물림부에 적용되는 겉포장(overwrap)의 길이에 3 mm를 추가한 길이로 표시하였다. 회전형 흡연자동장치(RM20H, Borgwaldt)(그림 1) 흡연조건은 ISO 3308(3)과 HCI T-115[35]에 따라 국제표준화기구(ISO) 조건과 캐나다(HCI) 조건을 설정값으로 흡입부피는 ISO 35 mL, HCI 55 mL이고, 흡입간격은 ISO 60초, HCI 30초이며, 환기차단율(%)은 ISO 0 %, HCI 100 %였다(표 2). 이 흡연조건으로 10~20개비의 담배연기를 발생시켜 NDIR로 분석한다(그림 2)(4, 5).

그림 1. 회전형자동흡연장치

표 2. 흡연조건

내용	ISO	HCI
흡입부피 (mL)	35	55
흡입간격 (s)	60	30
흡입지속시간 (s)	2	2
환기차단율 (%)	0	100

34) vapour phase : ISO 3308:2012에 적합한 흡연 장치를 사용하여 ISO 4387:2000에 따라 흡연하는 동안 입자상 포집 장치를 통과하는 연기 성분

35) Health Canada Official Method T-115(1999): 주류연 담배연기 내 타르, 니코틴, 일산화탄소 분석

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화
▶ 꽁초 길이 표시

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 회전형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

⑤ 시료 분석
▶ 분석기의 검정곡선을 체크한 후 분석기에 표시되는 이산화탄소의 농도를 확인

그림 2. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

분석기의 검정 곡선을 체크하고, 분석기에서 표시되는 이산화탄소의 농도를 읽는다.

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 표준담배를 시료로 활용하여 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 직선성, 정밀도 등이었다.

1) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 값으로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99 이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision)

정밀성은 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 반복·측정하여 평가하였다. 본 실험결과의 정밀성은 일내(interday) 즉, 같은 실험을 같은 날 시간을 두고 반복 실시하고, 일간[36](interday)에서 3일에 걸쳐 3회 반복 측정에 대한 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었다. 해당시험법(전처리 등)의 절차를 고려하여 별도의 전처리과정 없이 기기분석한 결과를 제시하였다.

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 CDC 방법을 참고하여 시료 포집, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준물질 및 검정곡선 방법 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 그리고, 실험결과는 아래 식과 같이 mg/cig. 단위로 계산하였다.

㈎ 궐련당 평균 일산화탄소 부피 계산

$$V_{as} = \frac{C \times V \times N \times p \times T_0}{S \times 100 \times p_0 \times (t + T_0)}$$

Vas : 궐련당 일산화탄소의 평균 부피(mL)

C : 측정된 일산화탄소의 부피 기준 백분율(%)

V : 흡연 부피(puff volumn)(mL)

N : 측정한 시료의 흡연 횟수이며 공흡연을 포함(smoked puff + clear puff)

p : 주위 압력(kPa)

p0 : 표준 대기 압력(kPa)

S : 흡연한 궐련의 수

T0 : 물의 삼중점 온도(K)

t : 주위 온도(℃)

$$V_{as} = 0.9432 \times \frac{C \times N \times p}{S \times (t + T_0)}$$ (V = ISO기준, 35 mL)

$$V_{as} = 1.4822 \times \frac{C \times N \times p}{S \times (t + T_0)}$$ (V = HCI기준, 55 mL)

36) 동일한 조건하에 실험일을 달리하여 반복적인 작업 시행

㈏ 궐련당 일산화탄소의 평균 질량계산

$$m_{cig} = V_{as} \times \frac{M_{co}}{V_m}$$

mcig : 궐련당 일산화산소의 평균 질량(mg)

MCO : 일산화탄소의 몰 질량(g/mol)

Vm : 이상기체의 몰 부피(L/mol)

반올림한 Mco(28 g/mol)와 Vm(22.4 L/mol)이 위의 계산에 사용된다.

최종계산식 : $m_{cig} = F \times \frac{C \times N \times p}{S \times (t+273)}$

F : for 1.1790 (V가 35mL일 경우)

for 1.8528 (V가 55mL일 경우)

C : 측정된 일산화탄소의 부피 기준 백분율(%)

N : 측정한 시료의 흡연 횟수이며 공흡연을 포함 (smoked puff + clear puff)

p : 주위 압력(kPa)

S : 흡연한 궐련의 수

t : 주위 온도(℃)

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 직선성

분석대상물질인 CO의 R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 3).

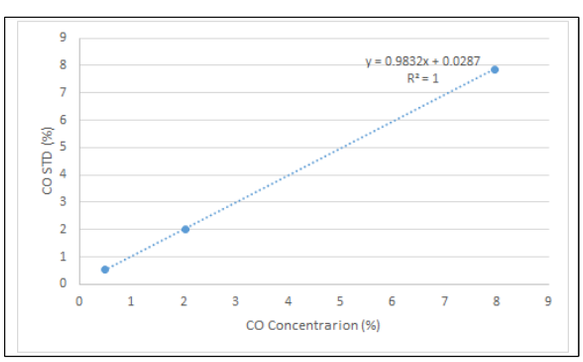


그림 4. 정량분석을 위한 검정곡선

2) 정밀도

검정곡선 농도범위 내 일내 1가지 농도에 대하여 7회 이상 측정하여 상대표준편차(RSD %)로 반복 측정하였고, 알간 정밀은 총 3일에 걸쳐 3반복하여 확인하였다(표 4-6).

일내 정밀성은 RSD 0.1 %이었고, 1일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.2 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.1 %이었다.

2일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 102 %, RSD 0.5 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.2 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %이었다.

3일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 90 %, RSD 1.0 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 103 %, RSD 0.2 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 102 %, RSD 0.1 %이었다.

3일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 95%, RSD 0.1 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.1 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.1 %이었다(표 5).

표 4. 일내 정밀도

분석횟수	측정값(mg/L)	평균(mg/L)	RSD(%)
1	28.7	27.3	3.5
2	27.4		
3	28.7		
4	26.5		
5	27.0		
6	28.9		
7	2.73		

표 4. 일간 정밀도

(mg/cig.)	DAY1	DAY2	DAY3
1	27.23	28.66	26.37
2	27.61	27.41	27.06
3	26.99	28.86	26.88
average	27.28	28.31	26.77
SD	0.313	0.786	0.358
CV (%)	1.15	2.78	1.34

2. 시료분석 결과

표준담배 1종(1R6F)을 대상으로 인증값과 비교하여 불확도 범위내에 있는 것을 확인하였다.

3. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: NDIR법을 이용한 담배연기의 증기상내 일산화탄소 분석

나. 제개정일: 2020.12.21.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)' 를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관 시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버[ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ± 3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관 한다.

2) 장치 및 장비

주요장비인 회전형 담배 연기분석장치(Borgwaldt KC GmbH / RM20H와 유사한 기종)로 담배연기를 포집한다.

3) 시험방법

① 절차흐름도

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s
▶ Puff volume 매일 점검(bubble soap meter사용)
· ISO regimen 기준 : 35 mL ± 0.3 mL
· CI regimen 기준 : 55 mL ± 0.5 mL

↓

③ CO 분석 검량곡선
▶CO calibration gas uses 1 CO gas (highest value ex. 8.05 %)
▶CO linearity check uses 3 CO gas (0.49 %, 2.03 %, 7.96 %)
▶자동흡연장치
· 44 mm 필터 disc, TPM 최대 150 mg
· 92 mm 필터 disc, TPM 최대 600 mg
▶담배 개비수와 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기발생 및 시료농도측정
▶ISO 4387 에 따라 흡연 실시
▶분석기의 검정 곡선을 체크한 후 분석기에 표시되는 이산화탄소의 농도를 읽음

그림 6. 시험방법 절차흐름도

② 담배 담배연기의 증기상내 성분분석을 위한 흡연조건

표 10. 흡연조건

흡연조건	ISO	HC
흡입부피 (mL)	35 ± 0.3	55 ± 0.5
흡입지속시간 (s)	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.02
흡입 빈도 (s)	60 ± 0.5	30 ± 0.3
공기 속도 (mm/s)	200 ± 30	200 ± 30
환기 차단율 (%)	0	100
꽁초 길이 (mm)	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것

라. 검증보고서 구성 및 내용

직선성(linearity), 정밀도(precision) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.999 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였다. 시료분석은 담배연기(3R4F) 포집을 ISO조건과 HCI조건에서 각각 진행하였고, 일내 실험에서는 7회 반복실험을, 일간 실험에서는 3회 반복실험을 실시하여 결과를 산출하였다.

참고문헌

1. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
3. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.
4. International Organization for Standardization. 2007. ISO 8454:2007 「Cigarettes - Determination of carbon monoxide in the vapour phase of cigarette smoke - NDIR method」.
5. World Health Organization. 2016. TobLabNet Official Method SOP 10. Standard operating procedure for determination of nicotine and carbon monoxide in mainstream cigarette smoke under intense smoking conditions.

④ 담배 주류연 내 CO 국외숙련도 참가결과

참가 개요

□ **목적** : ISO17025 시험결과 품질보증을 위한 국외 숙련도평가 참여를 통한 참가시험소 간 비교시험 및 흡연폐해실험실의 분석능력 평가

□ **주관기관** : 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터[37](Center for Tobacco Reference Products, CTRP)

□ **참가항목**

○ **분석 및 측정항목**: 담배 주류연 내 CO (일산화탄소), TPM (Total particulate matter), 흡입횟수(puff count)

- **흡입횟수** : 흡입조건별 1개비 당 횟수로 측정
- **흡입조건(장비/방법)**: 회전형자동흡연장비 / 국제표준화기구(ISO), 캐나다보건부(HCI)

□ **참가기간**

- 2020. 4. 30 ~ 7. 30.

□ **결과판정기준**: |z| 스코어가 2이내일 경우 적합

결 과

2020년 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터의 숙련도참가결과 통보 시 모든 항목에서 |z| 스코어 2 이내로 산출되어 '적합' 판정을 받았다(6).

CO는 ISO조건에서 0.97, HCI조건에서 0.75이었고, TPM은 ISO조건에서 0.27, HCI조건에서 -1.35이었다. 흡입횟수는 ISO조건에서 -0.36, HCI조건에서 -0.29이었다(표 1).

37) ILAC(국제시험기관인정협력체)과 국제상호인정(MRA) 체계에 있는 A2LA(미국)에 의해 공인된 기관으로, 국제적 수준의 담배관련 실험실 분석능력에 대한 숙련도 검증 수행

표 1. 2020년 국제 숙련도시험참가 결과

참가항목	Z 스코어	
	ISO	HCI
CO	0.97	0.75
TPM	0.27	-1.35
흡입횟수	-0.36	-0.29

참고문헌

1. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
3. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.
4. International Organization for Standardization. 2007. ISO 8454:2007 「Cigarettes - Determination of carbon monoxide in the vapour phase of cigarette smoke - NDIR method」.
5. World Health Organization. 2016. TobLabNet Official Method SOP 10. Standard operating procedure for determination of nicotine and carbon monoxide in mainstream cigarette smoke under intense smoking conditions.
6. University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products, Proficiency Testing Round CIG-2020B Final Report, 2020.

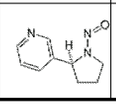
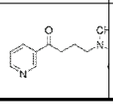
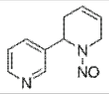
⑤ 담배주류연 내 TSNAs 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

흡연자의 건강에 대한 관심의 증대로 현대인들에게 담배는 매우 중요한 문제가 되고 있다. TSNAs는 국제암연구소(IARC)에서 발암성 물질로 분류되고 있다. TSNAs에는 포름알데히드와 같은 1급 발암물질도 포함되어 있다. 특히, 4-메틸니트로스아미노-1-(3-피리딜)-1-부타논은 NNK로 불리는 니코틴 분해산물이다. NNK는 씹는 담배 혹은 흡연, 간접흡연에 의해 인체로 흡수되어 대사되어 뇨로 배설되며 임신 중 흡연 시 태반을 통해 태아에 전달된다. 세포 및 동물실험에서 변이원성을 보이며 여러 동물실험에서 발암성을 보인다. N-Nitrosonornicotine(NNN) N-나이트로소노르니코틴은 담배의 니코틴에 의해 유도되는 물질로서 유연 및 무연 등 다양한 형태의 담배 이용 시 노출될 수 있는 강력한 발암물질이다. 주류연 및 부류연에서 모두 검출되며, 물에 잘 녹기 때문에 무연 담배제품 이용자의 경구암 원인 물질로 작용할 수 있어, 세계보건기구에서는 담배 함유 유해물질 9대 목록 중 NNN은 NNK 다음으로 두번째 중요 물질로 지정하고 있으며, 국제암연구소(IARC)와 국립독성프로그램(National Toxicology Program; NTP)에서 인체 발암성 물질로 분류하고 있다(표1). NAB는 쥐에서 식도암을 유발시킨 것으로 나타났으며 NAT는 발암성을 갖지 않는 것으로 보고되고 있다.

TSNAs는 천연적으로 또는 조제과정에서 전구체가 산화되어 생성되는 것으로 판단되어 원료나 조제과정의 철저한 관리가 요망된다. 따라서 흡연으로 인한 담배연기 성분 중 발암물질인 Nitrosamines 4종 특히, NNK, NNN은 매우 강력한 발암물질로서 이에 대한 분석법을 정립하여 WHO TabLabNet 공동연구 등에 참여하고자 표준담배를 대상으로 유해성분 분석을 진행하였다.

표 1. 물리적·화학적 특성 및 독성

	NNN	NNK	NAT	NAB
IUPAC 명명	3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone	N-nitrosoanatabine	N-nitrosoanabasine
분자식	$C_9H_{11}N_3O$	$C_{10}H_{11}N_3O$	$C_{10}H_{13}N_3O$	$C_{10}H_{13}N_3O_2$
발암성	IARC as a Group 1 carcinogen	IARC as a Group 3 carcinogen	IARC as a Group 3 carcinogen	IARC as a Group 1 carcinogen
구조				

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

흡연폐해실험실의 담배 특이성 Nitrosamines 측정법은 World Health Organization Tobacco Laboratory Network에서 사용 중인 Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions을 근거로 작성하였다(1).

이 방법은 자동흡연장치를 이용하여 담배시료를 자동으로 연소시켜 얻어지는 담배연기성분을 Cambridge filter등의 다양한 포집장치를 이용해 담배연기 중 주류연(흡연자가 들이마신 후 내뿜는 연기)의 특정 Nitrosamines의 정량분석에 대하여 적용한다.

측정원리는 전자분무이온화로 연결되는 액체크로마토그래프/삼중극자질량분석법을 적용하여 담배연기 중 주류연내 존재하는 담배 특이성 Nitrosamines을 정량적으로 분석한다. 분석대상 물질은 엔-나이트로소노르니코틴, 엔-나이트로소아나타빈, 엔-나이트로소아나바신과 4-(메틸나이트로스아미노)-1-(3-피리딜)-1-부타논으로 질량분석기로 측정한다. 먼저 자동흡연장치를 이용하여 연기를 생성시켜 주류연을 포집하였다. 포집기로부터 추출하여 담배 특이성 나이트로스아민을 측정 위하여 액체크로마토그래프/질량분석법(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) 을 적용한다.

2. 시료 전처리

ISO3402(2)에 따른 전처리 과정으로 궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관 후 궐련의 꽁초길이를 ISO 4387(3)에 따라 궐련의 입물림부에 적용되는 겉포장(overwrap)의 길이에 3 mm를 추가한 길이로 표시하였다. 회전형 흡연자동장치(RM20H, Borgwaldt)(그림 1) 흡연조건은 ISO 3308(4)과 HCI T-115[38]에 따라 국제표준화기구(ISO) 조건과 캐나다(HCI) 조건을 설정값으로 흡입부피는 ISO 35 mL, HCI 55 mL이고, 흡입간격은 ISO 60초, HCI 30초이며, 환기차단율(%)은 ISO 0 %, HCI 100 %였다(표 2). 이 흡연조건으로 10~20개비의 담배연기를 캠브리지필터패드에 포집하여 내부표준물질(50 ng/mL)이 포함한 추출용액(Ammonium acetate 100 mmol/L)에 250 rpm에서 30분동안 진탕하여 용출시킨 후 처음 1~2 mL정도의 추출액은 버리고, 0.45 um PTFE 필터를 통과시켜 적정양을 바이알에 옮겨 담아 LC/MS/MS로 분석하였다(그림 2).

그림 1. 회전형자동흡연장치

38) Health Canada Official Method T-115(1999): 주류연 담배연기 내 타르, 니코틴, 일산화탄소 분석

표 2. 흡연조건

내용	ISO	HCI
흡입부피 (mL)	35	55
흡입간격 (s)	60	30
흡입지속시간 (s)	2	2
환기차단율 (%)	0	100

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화
▶ 꽁초 길이 표시

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 회전형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기 포집 및 용출
▶ 포집된 캠브리지필터패드를 60mL 갈색병에 옮김
▶ 내부표준물질(50 ng/mL)을 포함한 추출용매(100 mmol/L ammonium acetate)를 추가
- 회전형(92mm CFP) 50mL, 선형(44mm CFP) 20mL
▶ 파라필름으로 밀봉 후 진탕기에서 250 rpm, 30분 이상 충분히 흔들어 용출

↓

⑤ 시료 분석
▶ 처음 1-2 mL 정도의 추출액은 버리고, 0.45 μm PTFE로 필터 후 2 mL 바이알에 옮겨 기기분석

그림 2. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

캠브리지필터패드 내 포집된 담배연기를 기기분석하기 위한 LC/MS/MS 기기조건은 표 3과 같다. 컬럼은 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18(2.1 X 150 mm, 3.5 μm particle size)을 사용하였고, 컬럼온도는 40 ℃, 주입 용량은 5 μm, 용매는 이동상 A(0.1% Acetic acid

in water), 이동상 B(0.1% Acetic acid in Methanol)로 유속은 0.2 mL/min, 총 분석시간은 12분이었다. 분석모드는 전자분무이온화로 연결되는 액체크로마토그래프/삼중극자질량분석법(ESI-MS)으로 스캔 형태는 Positive ion mode, 이온분무전압은 1500V, Turbolonspray 온도는 20 ℃, Curtain gas. Collision-induced dissociation gas, Nebulizing gas는 질소로 검출 질량은 표3과 같다.

표 3. 궐련 주류연 내 TSNAs 분석을 위한 기기조건

LC/MS/MS 기기조건

▷ 주입 부피 : 5 μL
▷ 컬럼 온도(℃) : 40 ℃
▷ 컬럼 : Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 X 150 mm, 3.5 μm particle size)

▷ 이동상 농도구배 조건
총 분석시간 : 12 min

시간	[%] B	Curve
0	50	6
3.0	90	6
4.0	100	6
5.0	100	6
5.5	50	6
12.0	50	6

▷ [검출질량(Quantificaion and confirmation ion pairs)]

분석물질	Ion pair 선구 이온(Q1)/ 생성 이온(Q3) (m/z)
NNN : Quantification	178/148
NNN : Confirmation	178/120
NNN-d4	182/152
NNK : Quantification	208/122
NNK : Confirmation	208/106
NNK-d4	212/126
NAT : Quantification	190/160
NAT : Confirmation	190/106
NAT-d4	194/164
NAB : Quantification	192/162
NAB: Confirmation	192/133
NAB-d4	196/166

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 표준담배를 시료로 활용하여 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 특이성, 직선성, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계 등이었다.

1) 특이성(Specificity)

시료에 있는 모든 것 중에서 특별히 분석물질을 구별해 내는 정도이다.

2) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분한 면적(area)을 내부표준물질(TSNAs-d_4) 피크을 적분한 면적(area)으로 나눈 비(ratio)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정확성은 시료 검출수준을 고려한 농도범위의 검정곡선에 범위 내 농도를 적용하여 그 값이 얼마나 일치하는지를 백분율(%)로 나타내었다. 정밀성은 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 반복 · 측정하여 평가하였다. 본 실험결과의 정밀성은 일내(interday) 즉, 같은 실험을 같은 날 시간을 두고 반복 실시하고, 일간[39](interday)에서 3일에 걸쳐 3회 반복 측정에 대한 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었다. 해당시험법(전처리 등)의 절차를 고려하여 별도의 전처리과정 없이 기기분석한 결과를 제시하였다.

39) 동일한 조건하에 실험일을 달리하여 반복적인 작업 시행

4) 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료0.2 ng/mL) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 방법검출한계에 3을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 WHO SOP 03:2014방법을 참고하여 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준물질 및 검정곡선 조제방법(농도 지점 등), GC-MS 기기분석 조건(주입부피, 분할비율, 정성 · 정량이온 등) 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 그리고, 실험결과는 아래 식과 같이 포집용액의 농도(ng/mL)와 부피(volume) 및 사용한 담배개비수(number of cigarettes)를 활용하여 ng/cigarette 단위로 산출하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 특이성

NNN, NNK, NAT, NAB Working standard 8개와 NNN, NNK, NAT, NAB 50 ng/mL 농도의 Internal standard spiking solution의 Total ion chromatogram (TIC) 그림2 와 Extraction ion chromatogram (EIC) 및 MS spectrum은 그림4, 5와 같다.

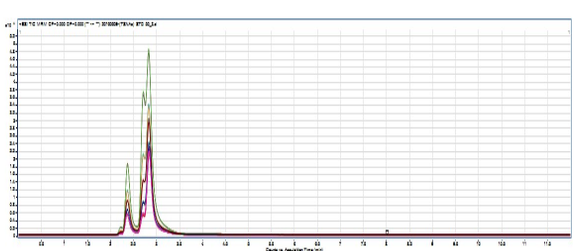


그림 3. TSNAs 의 Total Ion Chromatography(TIC)

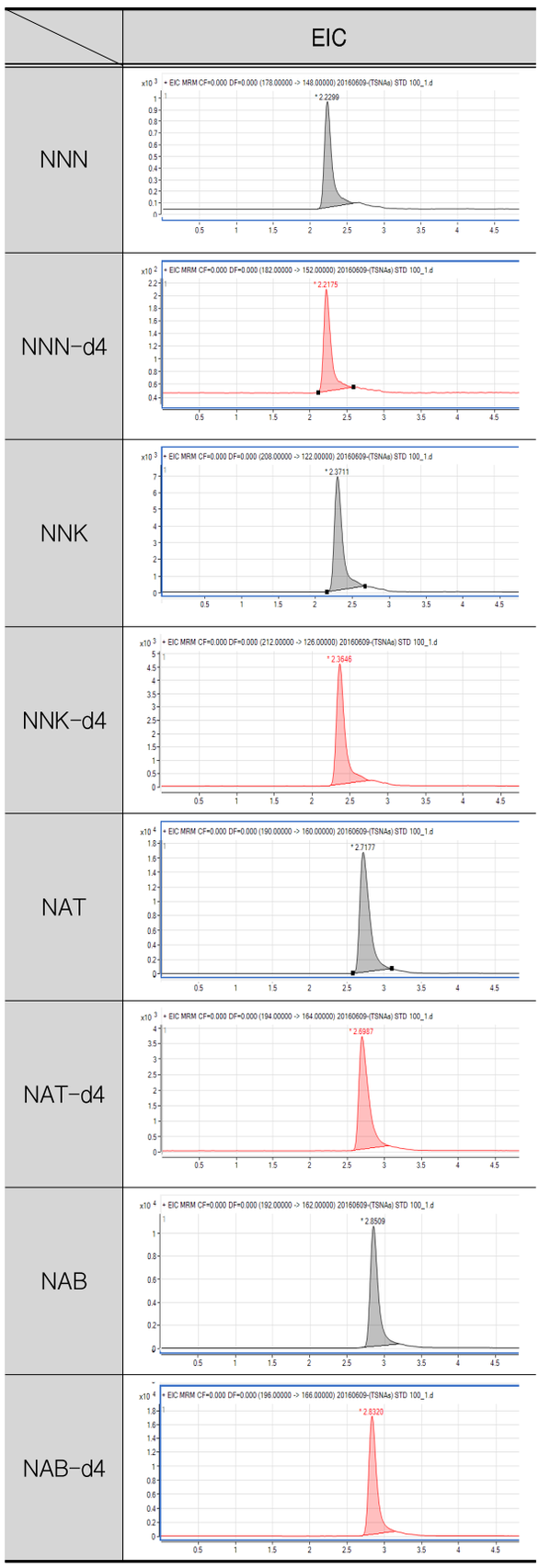


그림 4. 표준용액과 내부표준용액의 EIC

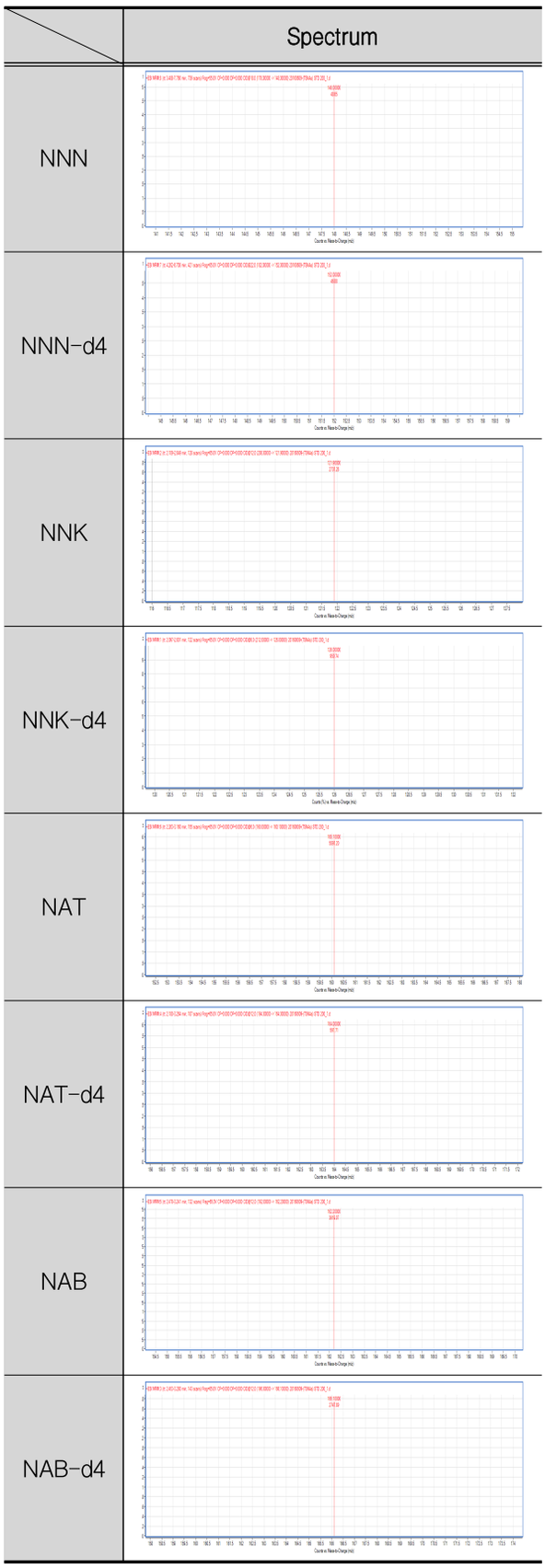


그림 5. 표준용액과 내부표준용액의 MS spectrum

2) 직선성

NNK, NNN, NAT, NAB 등 TSNAs 4종 모두 R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 6).

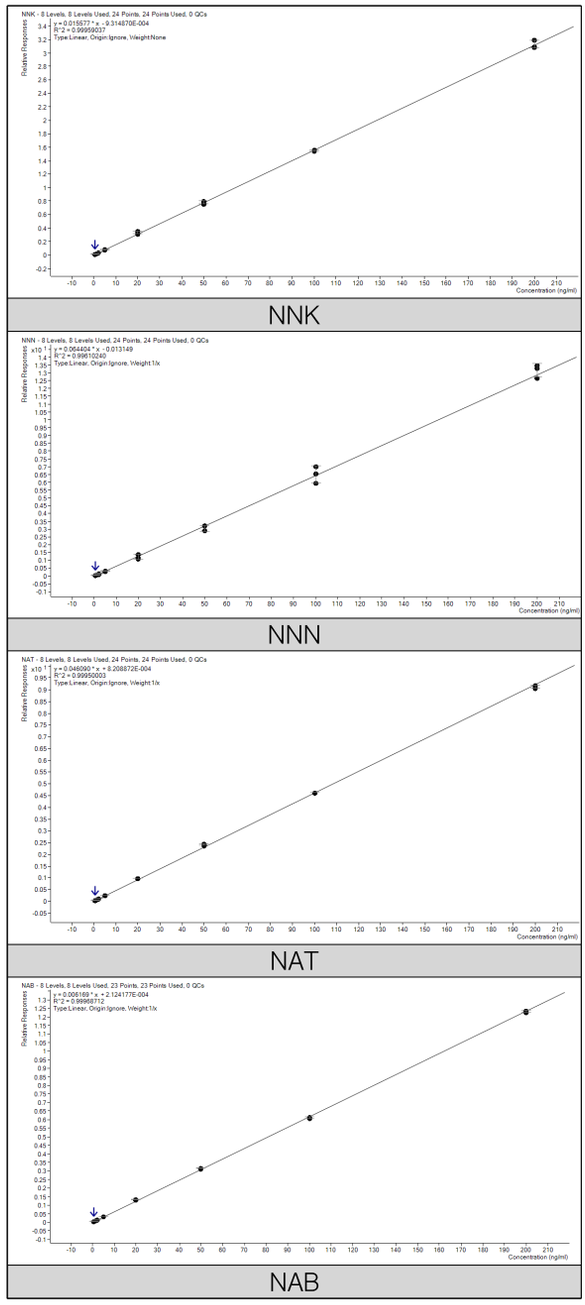


그림 6. 분석항목별 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

NNK, NNN, NAT, NAB의 검정곡선 농도범위 내에서 하루동안 7개의 시료를 조제하여 일내 정밀도를 확인하고, 총 3일에 걸쳐 3반복하여 일간 정밀을 확인하였다.

일내 정밀 · 정확도는 NNK은 정확도 99~104 %, RSD 4.1~8.1 %, NNN은 정확도 95~101%, RSD 5.0~8.7 %, NAT은 정확도 105~109 %, RSD 4.6~5.8 %, NAB은 정확도 82~102 %, RSD 3.7~5.8 %이었다(표 4).

1일 일간 정밀 · 정확도는 NNK은 정확도 97~100%, RSD 0.4 %, NNN은 정확도 99~102 %, RSD 1.6~8.7 %, NAT은 정확도 100~106 %, RSD 3.2~3.4 %, NAB은 정확도 82~84 %, RSD 4.8~13.2%이었다.

2일 일간 정밀 · 정확도는 NNK은 정확도 97~100%, RSD 0.4 %, NNN은 정확도 99~102 %, RSD 1.6~8.7 %, NAT은 정확도 100~106 %, RSD 3.2~3.4 %, NAB은 정확도 82~84 %, RSD 4.8~13.2%이었다.

3일 일간 정밀 · 정확도 NNK은 정확도 97~100%, RSD 0.4 %, NNN은 정확도 99~102 %, RSD 1.6~8.7 %, NAT은 정확도 100~106 %, RSD 3.2~3.4 %, NAB은 정확도 82~84 %, RSD 4.8~13.2%이었다(표 5).

표 4. 일내 정밀·정확도

Intense	NNK	NNN	NAT	NAB
Conc. (ng/cig.)	252	297	279	31.2
Mean (ng/cig.)	254.18	295.62	264.87	42.58
SD	10.47	14.68	12.09	2.48
RSD (%)	4.12	4.97	4.56	5.82
Accuracy (%)	99.14	100.47	105.33	101.54

ISO	NNK	NNN	NAT	NAB
Conc. (ng/cig.)	97.1	115	113	13.0
Mean (ng/cig.)	93.82	120.82	103.88	15.92
SD	7.56	10.53	6.07	0.58
RSD (%)	8.06	8.71	5.84	3.65
Accuracy (%)	103.50	95.18	108.78	81.63

표 5. 일간 정밀·정확도

Intense	NNK	NNN	NAT	NAB
Conc. (ng/cig.)	252	297	279	31.2
Mean (ng/cig.)	251.83	290.00	278.33	38.11
SD	1.18	4.75	9.43	5.02
RSD (%)	0.47	1.64	3.39	13.17
Accuracy (%)	100.07	102.41	100.24	81.86

ISO	NNK	NNN	NAT	NAB
Conc. (ng/cig.)	97.1	115	113	13.0
Mean (ng/cig.)	99.74	116.76	106.46	15.50
SD	0.43	8.35	3.35	0.74
RSD (%)	0.43	8.71	3.15	4.79
Accuracy (%)	97.36	98.49	106.15	83.86

4) 검출 · 정량한계

검출이 가능한 수준의 농도인 0.2 ng/mL를 분석장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 TSNAs 4종의 검출한계와 정량한계를 산출하였다. NNK의 경우 검출한계 0.06 ng/mL, 정량한계 0.06 ng/mL(표 7), NNN의 경우 검출한계 0.05 ng/mL, 정량한계 0.05 ng/mL(표 8), NAT의 경우 검출한계 0.02 ng/mL, 정량한계 0.02 ng/mL(표 9), NAB의 경우 검출한계 0.08 ng/mL, 정량한계 0.08 ng/mL이었다(표 6).

표 6. TSNAs의 검출·정량한계

Analyte	Linear range (ng/mL)	SD	LOD (ng/cig.)	LOQ (ng/cig.)
NNN	0.5 - 200	0.020	0.063	0.060
NNK		0.015	0.047	0.045
NAT		0.007	0.022	0.021
NAB		0.027	0.085	0.081

2. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: LCMSMS를 이용한 담배 주류연 내 TSNAs 분석

나. 제개정일: 2020.11.06.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)' 를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관 시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버 [ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ±

3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관 한다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품을 사용하고, 그 외는 HPLC용 또는 정량분석용 시약을 사용한다(표 22). 표준물질 사용 시 유효기간을 확인하고 사용한다(표 7).

표 7. 시약 등 목록

연번	시약명
1	N-Nitrosonornicotine (NNN)
2	4-(N-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)
3	N-Nitrosoanatabine (NAT)
4	N-Nitrosoanabasine (NAB)
5	N-Nitrosonornicotine-2,4,5,6-d4 (NNN-d4)
6	4-(N-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-2,4,5,6-d4 (NNK-d4)
7	N-Nitrosoanatabine-2,4,5,6-d4 (NAT-d4)
8	N-Nitrosoanabasine-2,4,5,6-d4 (NAB-d4)
9	Acetic acid (glacial)
10	Ammonium acetate
11	Acetonitrile
12	Methanol
13	Glacial acetic acid

③ 조제용 시약

추출 용액(100 mmol/L Ammonium acetate)의 경우, 1 L 부피플라스크에 일정량의 water과 Ammonium acetate (MW 77.08) 7.7 g 을 넣은 후 최종 1 L로 맞춘다. 이 때 Ammonium acetate를 녹이기 위해 초음파 분해(sonication)를 통해 완전히 녹인다.

이동상 용매 A의 경우, 1 L 유리병에 water 700 mL, glacial acetic acid 용액 1 mL을 첨가한 뒤 초음파 세척기로 degassing 시켜 충분히 섞은 후 최종 1L로 맞춘다. 이 용액은 사용 전 4 ℃에서 냉장보관 한다.

이동상 용매 B의 경우, 1 L 유리병에 methaol 700 mL, glacial acetic acid 용액 1 mL을 첨가한 뒤 초음파 세척기로 degassing 시켜 충분히 섞은 후 최종 1L로 맞춘다. 이 용액은 사용 전 4 ℃에서 냉장보관 한다.

농도가 진한 표준용액(stock solution)의 경우, 조제한 표준용액은 냉동고에 보관하고, 필요시 해동하여 사용한다. 되도록 인증표준물질(Certified Reference Materials, CRM)을 사용하고, 구입한 CRM의 보관방법을 따를 수 있다.

검정곡선 1차 혼합 표준용액의 경우, 1차 혼합 표준용액 50 mg/L 1 mL를 조제할 수 있다(표 8).

표 8. 검량곡선 표준용액 조제방법

Level	TSNA mixed 표준물질 (1 μg/mL) (mL)	TSNA mixed 내부표준물질 (5 μg/mL) (mL)	총 량 (mL)	TSNA 최종 표준 용액 (ng/mL)
1	0.005	0.100	10	0.5
2	0.010			1.0
3	0.020			2.0
4	0.050			5.0
5	0.200			20.0
6	0.500			50.0
7	1.000			100.0
8	2.000			200.0

2) 장치 및 장비

주요장비인 LC/MS/MS system(Agilent 6460 TQ과 유사한 기종), ESI/MS로 기기분석하고, 회전형 담배 연기분석장치(Borgwaldt KC GmbH / RM20H와 유사한 기종)로 담배연기를 포집한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초음파세척기, 냉장고, 분석용 전자저울, 항온항습챔버, 볼텍서, 오븐, 데시게이터, 초순수제조장치 등이 있다(표 9).

표 9. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	20 ㎕, 200 ㎕, 1 000 ㎕	검정곡선, 시료분석
용량플라스크	100 mL, 250 mL, 1 L, 2 L	표준액 및 이동상 조제
초음파분해기 (Ultrasonic Cleaner)	-	이동상 용매 조제
냉장고	-	검액 보관
분석용 전자저울	-	시약 조제
항온항습챔버	-	시료 조화
Vortexer	-	표준액 조제
Dry oven	-	초자 건조
Desiccator	-	초자 보관
초순수 제조장치	-	이동상 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화(꽁초 길이 표시)

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 회전형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기 포집 및 용출
▶ 포집된 캠브리지필터패드를 60mL 갈색병에 옮김
▶ 내부표준물질(50 ng/mL)을 포함한 추출용매(100 mmol/L ammonium acetate)를 추가
- 회전형(92mm CFP) 50mL, 선형(44mm CFP) 20mL
▶ 파라필름으로 밀봉 후 진탕기에서 250 rpm, 30분 이상 충분히 흔들어 용출

↓

⑤ 시료 분석
▶ 처음 1-2 mL 정도의 추출액은 버리고, 0.45 ㎛ PTFE로 필터 후 2 mL 바이알에 옮겨 기기분석

그림 7. 시험방법 절차흐름도

② 담배 주류연 성분분석을 위한 흡연조건

표 10. 흡연조건

흡연조건	ISO	HC
흡입부피 (mL)	35 ± 0.3	55 ± 0.5
흡입지속시간 (s)	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.02
흡입 빈도 (s)	60 ± 0.5	30 ± 0.3
공기 속도 (mm/s)	200 ± 30	200 ± 30
환기 차단율 (%)	0	100
꽁초 길이 (mm)	Filter 길이 + 8, Tip 길이+3 중 긴 것	Filter 길이 + 8, Tip 길이+3 중 긴 것

③ LC./MS/MS 조건

표 11. 분석장비 기기조건

액체 크로마토그래프(LC)	
파라미터	설정값
컬럼	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 X 150 mm, 3.5 ㎛ partide size)
흐름속도	0.2 mL/min
주입부피	5 ㎕
컬럼오븐 온도	40 ℃
검출기	
전자분무이온화/삼중극자질량분석법 (ESI/MS)	
이온화 조건	ESI (전자분무이온화)
스캔 형태	Positive ion mode
이온 분무전압 (Ionspray voltage) (V)	1500
Turbolonspray temperature (℃)	20
Curtain gas	Nitrogen
Collision-induced dissociation gas	Nitrogen
Nebulizing gas	Nitrogen

라. 검증보고서 구성 및 내용

특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision) · 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection) · 정량한계(limit of quantification), 표준담배(3R4F) 시료분석 등으로 구성되었다.

특이성은 시료에 있는 모든 것 중에서 특별히 분석물질을 구별해 내는 정도를 확인하였고, 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.999 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였고, 정확도는 81 ~ 106 % 범위였다. 검출한계 및 정량한계는 NNK는 0.06 ng/cigarette, 0.06 ng/cigarette, NNN는 0.05 ng/cigarette, 0.05 ng/cigarette, NAT은 0.02 ng/cigarette, 0.02 ng/cigarette, NAB은 0.09 ng/cigarette, 0.08 ng/cigarette였다. 시료분석은 담배연기(3R4F) 포집을 ISO조건과 HCI조건에서 각각 진행하였고, 일내 실험에서는 7회 반복실험을, 일간 실험에서는 3회 반복실험을 실시하여 결과를 산출하였다.

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
3. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
4. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.

⑥ 담배 주류연 내 TSNAs 4종 국외숙련도 참가결과

참가 개요

□ **목적** : ISO17025 시험결과 품질보증을 위한 국외 숙련도평가 참여를 통한 참가시험소간 비교시험 및 흡연폐해실험실의 분석능력 평가

□ **주관기관** : 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터[40](Center for Tobacco Reference Products, CTRP)

□ **참가항목**

○ **분석 및 측정항목**: 담배 주류연 내 TSNAs 4종 (NNK, NAB, NNN, NAT), TPM, 흡입횟수

- **흡입횟수** : 흡입조건별 1개비 당 횟수로 측정
- **흡입조건**: 국제표준화기구(ISO), 캐나다보건부(HCI)

□ **참가기간**

1) 2017년 : 10월 23일 ~ 12월 5일

2) 2020년 : 8월 6일 ~ 10월 29일

□ **결과판정기준**: |z| 스코어가 2 이내일 경우 적합

결 과

2017년과 2020년 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터의 숙련도참가결과 통보 시 모든 항목에서 |z| 스코어가 2 미만으로 산출되어 '적합' 판정을 받았다(5,6).

2017년 NNK는 ISO조건에서 -0.59, HCI조건에서 -0.36이었고, NAB는 ISO조건에서 -0.71, HCI조건에서 -0.90이었다. NNN은 ISO조건과 HCI조건에서 각각 0.16, 0.53였으며, NAT는 ISO조건에서 -1.39, HCI조건에서 0.16이었다. TPM은 ISO조건과 HCI조건에서 각각 -0.01, -0.51이었고, 흡입횟수(개비당)는 ISO조건에서 -0.90, HCI조건에서 -0.74였다(표 1).

40) ILAC(국제시험기관인정협력체)과 국제상호인정(MRA) 체계에 있는 A2LA(미국)에 의해 공인된 기관으로, 국제적 수준의 담배관련 실험실 분석능력에 대한 숙련도 검증 수행

표 1. 2017년 국제 숙련도시험참가 결과

참가 항목	NNK		NAB	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	-0.59	-0.36	-0.71	-0.90
참가 항목	NNN		NAT	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	0.16	0.53	-1.39	0.16
참가 항목	TPM		흡입횟수	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	-0.01	-0.51	-0.90	-0.74

2020년 NNK는 ISO조건에서 0.35, HCI조건에서 -0.42이었고, NAB는 ISO조건에서 0.84, HCI조건에서 0.31이었다. NNN은 ISO조건과 HCI조건에서 각각 0.69, 0.82였으며, NAT는 ISO조건에서 0.39, HCI조건에서 0.64이었다. TPM은 ISO조건과 HCI조건에서 각각 -0.17, -0.26이었고, 흡입 횟수(개비당)는 ISO조건에서 -0.10, HCI조건에서 -0.02였다(표 2).

표 2. 2020년 국제 숙련도시험참가 결과

참가 항목	NNK		NAB	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	0.35	-0.42	0.84	0.31
참가 항목	NNN		NAT	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	0.69	0.82	0.39	0.64
참가 항목	TPM		흡입횟수	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	-0.17	-0.26	-0.10	0.02

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
3. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
4. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.
5. University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products, Proficiency Testing Round CIG-2017C Final Report, 2017.
6. University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products, Proficiency Testing Round CIG-2020C Final Report, 2020.

⑦ 담배주류연 내 알데히드류 3종 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

Formaldehyde, acetaldehyde, acrolein의 경우 WHO 담배실험실네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시 항목에 모두 포함되어있어(1) 국제공인시험기관 인정 분석항목으로 선정하였다. Formaldehyde와 acetaldehyde는 각각 1급과 2급 발암물질이며(2), acrolein은 비발암 독성물질이다(3). 그리고 formaldehyde는 발암성 · 흡입독성, acetaldehyde는 발암성 · 흡입독성 · 중독성, acrolein은 흡입독성 · 심혈관독성이 확인되었다.(4) WHO 우선항목인 formaldehyde, acetaldehyde, acrolein 등 3종에 대한 담배 주류연 내 알데히드류(aldehydes) 분석법을 ISO 17025 인정 시험법으로 마련 후 결과의 유효성 보장을 위해 해당 시험법으로 숙련도시험에 참가하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

WHO에서 알데히드류에 대한 표준시험절차서가 마련되어 있지 않아(2016년 기준) 관련 시험절차서를 조사하였다. 총 3종에 시험절차서가 확인되었는데 British American Tobacco(BAT)의 「주류연 담배연기 내 카르보닐류 분석」(5), 담배관련 과학연구협력센터(CORESTA)의 「HPLC에 의한 담배 주류연 내 선택된 카르보닐류 분석」(6), 캐나다 보건부(Health Canada)의 「주류연 담배연기 내 선택된 카르보닐류 분석」(7) 규격에 대해 내용을 조사하였다. 3가지 방법 비교결과, 2,4-Dinitrophenylhydrazine(DNPH) 용액으로 담배연기 포집 후 액체크로마토그래피-자외선법(Liquid Chromatography-Ultraviolet, LC-UV)을 이용하여 분석하는 방식으로 모두 유사하였으며, 전처리과정에서 용액부피가 적으면서 포집이 용이한 2개의 임핀저를 활용하는 BAT방법(5)을 선택하였다(표 1). 향후 WHO에서 2018년 8월에 발간된 SOP08 「Standard Operating Procedure For Determination of Aldehydes in Mainstream Cigarette Smoke Under ISO and Intense Smoking Conditions」로 수정하여 적용할 계획이다.

표 1. 시험방법 비교(표)

규격명 (발간년도)	기기분석		전처리	
	분석 방식	자외선 파장 (nm)	포집 방법	용액부피 (임핀저별)
브리티쉬 아메리칸 토바코(BAT) 방법(2008)	LC-UV	380	2개 임핀저	25
담배관련 과학연구협력센터(CORESTA) 추천방법(2014)	LC-UV	365	2개 임핀저	35
캐나다보건부 (Health Canada) 시험방법(1999)	LC-UV	365	1개 임핀저	80

2. 시료 전처리

BAT방법에 따른 전처리 과정으로 궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관 후(8) 흡연장치를 준비하였다. 이 때 궐련의 꽁초길이는 ISO 4387(9)에 따라 궐련의 입물림부에 적용되는 겉포장(overwrap)의 길이에 3 mm를 추가한 길이로 정하였다. 흡연장치는 흡연폐해실험실에서 보유중인 선형흡연자동장치(SM450, Cerulean)을 사용하였다(그림 1).

그림 1. 선형자동흡연장치

담배 주류연 내 알데히드류를 포집하기 위해 담배연기를 발생시키는 흡연장치의 흡연조건은 ISO 3308(10)과 WHO SOP(1)에 따라 국제표준화기구(ISO) 조건과 캐나다(HCI) 조건을 설정값으로 흡입부피는 ISO 35 mL, HCI 55 mL이고, 흡입간격은 ISO 60초, HCI 30초이며, 환기차단율(%)은 ISO 0 %, HCI 100 %였다(표 2). 이 흡연조건으로 담배연기를 발생시켜 담배연기를 DNPH(2.5g/L in acetonitrile) 용액에 포집 후 pH 4 완충용액에 2배 희석 후 바이알에 담아 액체크로마토그래피-다이오드어레이검출기(Liquid Chromatography-Diode Array Detector, LC-DAD)로 분석하였다(그림 2). 담배연기 포집시 DNPH 용액은 2개의 임핀저에 25 mL씩 담아 통과하도록 하였다(5)(그림 3).

표 2. 흡연조건

내용	ISO	HCI
흡입부피 (mL)	35	55
흡입간격 (s)	60	30
흡입지속시간 (s)	2	2
환기차단율 (%)	0	100

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화
▶ 꽁초 길이 표시

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 선형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 2 개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기 포집
▶ 2개의 임핀저로 담배 주류연 포집
▶ 각각의 임핀저에는 25 mL의 DNPH* 포집용액을 넣음
*2,4-Dinitrophenylhydrazine(유도체화물질)
▶ 공시료 샘플에서도 동일한 절차로 시행함

↓

⑤ 시료 분석
▶ 2개의 임핀저의 DNPH 포집용액 총 50 mL 중 0.5 mL(0.45 μm 필터 필요)와 완충 용액(pH 4) 0.5 mL를 2 mL 바이알에 넣고 기기분석

그림 2. 시험방법 절차흐름도

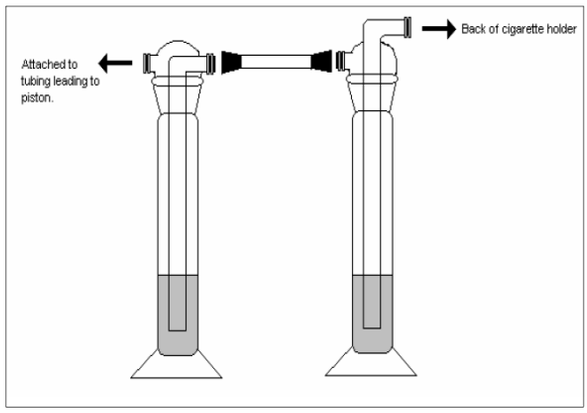


그림 3. 담배연기 임핀저 포집방법

3. 기기분석방법

전처리한 담배 주류연 시료를 기기분석하기 위한 LC-DAD 기기조건은 표 3과 같다. 컬럼은 역상 C18 컬럼(250 mm × 4.6 mm× 5 μm)을 사용하였고, 흐름속도는 0.8 mL/min, 주입부피는 10~20 μL, 컬럼오븐 온도는 30 ℃, 자동샘플러 트레이 온도는 4～5 ℃로 설정하였으며, DAD 검출기의 자외선(Ultraviolet, UV) 파장은 365 nm였다.

이동상[41] 조건(mobile phase condition)에서 이동상 A와 B가 필요하였고, 이동상 A는 2 L 유리병에 정제수 1180 mL, acetonitrile 600 mL, tetrahydrofuran 200 mL, isopropanol 20 mL를 넣고, 잘 혼합시킨 후 (30 ± 5) ℃에서 10분간 초음파처리(sonication)하였다. 그리고 이동상 B는 1 L 유리병에 acetonitrile 650 mL, 정제수 330 mL, tetrahydrofuran 10 mL, isopropanol 10 mL를 넣고, 잘 혼합시킨 후 (30 ± 5) ℃에서 10분간 초음파처리하였다. 이동상 조건 설정은 초기 이동상 A만 100 %에서 시작하여 8분에서 이동상 A 70 %/이동상 B 30 %, 20분에서 이동상 A 47 %/이동상 B 53 %였으며, 25분에서 이동상 A 15 %/이동상 B 85 %, 27분에서 초기조건인 이동상 A 100 %로 설정하였으며 펌프 안정화를 위해 8분의 시간을 더해 35분까지 같은 조건에서 이동상을 흘려주었다(표 3).

41) 액체크로마토그래피에서 시료가 컬럼(column)을 통과 하도록 이동시켜주는 물 또는 유기용매

표 3. LC-DAD 기기조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
·컬럼유형 : 250 mm × 4.6 mm× 5 μm,
역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
·흐름속도: 0.8 mL/min
·주입부피: 10 ~ 20 μL
·컬럼오븐 온도: 30 ℃
·자동샘플러 트레이 온도: 4 ~ 5 ℃
·DAD 검출기: UV 365 nm

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.0	100	0	0.8
8.0	70	30	0.8
20.0	47	53	0.8
25.0	15	85	0.8
27.0	100	0	0.8
35.0	100	0	0.8

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 표준담배를 시료로 활용하여 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 선택성, 직선성, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계, 안정성, 회수율, 최적파장 선별, acetaldehyde의 정량방식 타당성 등이었다.

1) 선택성

결과판독에 영향을 주는 방해 물질을 인위적으로 시료에 첨가하여 동일한 시험방법으로 분석한 후, 방해물질 첨가 전, 후의 결과에서 알데히드류 3종의 피크 간섭여부를 확인하였다.

2) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분하여 면적(area)으로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.999이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

규정 범위를 포함하는 최소한 3가지 농도에 대하여 기기상의 조작을 최소 7회 반복(일내[42], intraday)하여 측정한 결과로 정확도를 평가하였다. 본 실험결과의 정확성은 시료 검출수준을 고려한 농도범위의 검정곡선에 범위 내 농도를 적용하여 그 값이 얼마나 일치하는지를 백분율(%)로 나타내었다. 정밀성은 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 기기상의 조작을 반복・측정하여 평가하였다. 본 실험결과의 정밀성은 일내(intraday)에서 7회, 일간[43](interday)에서 3일에 걸쳐 3회 반복 측정에 대한 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었다. 해당 시험법(전처리 등)의 절차를 고려하여 별도의 전처리과정 없이 기기분석한 결과를 제시하였다.

4) 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료(0.01 mg/L) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 편차에 10을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

5) 안정성

안정성(stability)은 분석항목인 formaldehyde, acrolein의 농도 범위를 0.125 ~ 5.000 mg/L, acetaldehyde의 농도 범위를 0.125 ~ 25.0 mg/L로 하여 각 농도별 표준용액을 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 시간 경과 후에 분석하였다.

42) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행
43) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

6) 회수율

회수율(recovery)은 표준물 첨가법(standard addition method)을 이용하여 산출하였다. 2종(1R6F, 3R4F)의 표준담배 주류연을 ISO와 HCI 흡연조건에서 포집한 impinger 내 2,4-DNPH 추출용액 50 mL를 100 mL 삼각플라스크에 옮겨 담은 후, 이 용액을 필터(0.45 ㎛)하여 2 mL 엠버 바이알에 0.5 mL를 넣고, 완충용액 0.5 mL를 넣는다. 그 다음 고농도인 표준용액을 활용하여 소량(0.025 ~ 0.050 mL) 넣었다. 본 회수율 실험은 포집용액의 매트릭스(matrix) 영향을 보기 위한 것으로, acetonitrile 넣은 것을 공시료(blank)로 하여 이 값과의 차이를 백분율(%)로 표현하였다.

7) 최적파장 선별

LC-DAD 기기분석 조건 중 하나인 최적파장은 BAT방법(5)에 따라 345 ~ 380 nm 범위 내에서 확인하였으며 타 분석조건인 CORESTA방법(6), 캐나다보건부 방법(7)에도 파장 범위 내에 있는지 확인하였다.

8) Acetaldehyde의 정량방식 타당성

Acetaldehyde의 경우, DNPH 유도체화물질과 반응하면 입체이성질체가 생성되어 피크가 주요(major) 피크와 부수적(minor) 피크 2개로 나뉘게 된다(그림 4). 주요 피크로 정량을 실시하였으며 이 방식이 타당한지를 확인하기 위해 7개 샘플에 대해서 2가지 정량 방식(① 주요피크, ② 주요+부수적 피크)을 적용하여 결과값을 비교하였다. 결과값 비교시, 시료는 ISO조건에서 포집한 표준담배(3R4F)를 사용하였다.

9) 시료분석

시료분석은 담배연기 포집을 ISO조건과 HCI조건에서 각각 진행하였고, 시료로 표준담배인 1R6F와 3R4F을 선택하였다. 일내 실험에서는 7회 반복실험을, 일간 실험에서는 3회 반복실험을 실시하였다.

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 BAT방법을 참고하여 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준용액 및 검정곡선 조제방법(농도 지점 등), LC 기기분석 조건(주입부피, 컬럼, 이동상 흐름속도 등) 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 그리고, 실험결과는 아래 식과 같이 희석배수, 포집용액의 농도(mg/L)와 부피(volume) 및 사용한 담배개비수(number of cigarettes)를 활용하여 ㎍/cigarette 단위로 산출하였다.

$$Carbonyl\ concentration(\mu g/cigarette) = \frac{Carbonyl\ concentration\ (mg/L) \times volume(mL)}{Number\ of\ cigarettes} \times \text{희석배수}$$

연구 결과

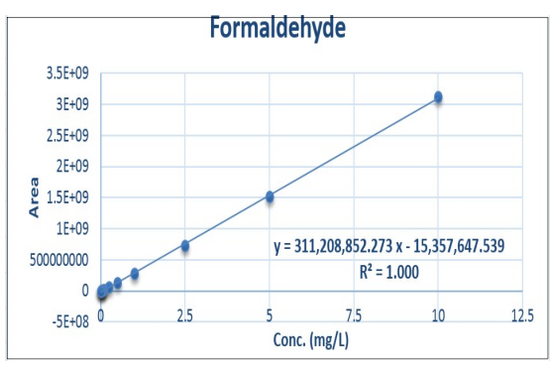
1. 유효화 실험결과

1) 선택성

담배연기 추출액을 첨가한 전 · 후에 formaldehyde-DNPH, acetaldehyde-DNPH, acrolein-DNPH의 크로마토그램이 다른 매트릭스 성분들의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인하였다(그림 5,6).

2) 직선성

Formaldehyde, acetaldehyde, acrolein 등 알데히드류 3종 모두 R^2가 1.000으로 R^2 0.999 이상임을 확인하였다(그림 7).



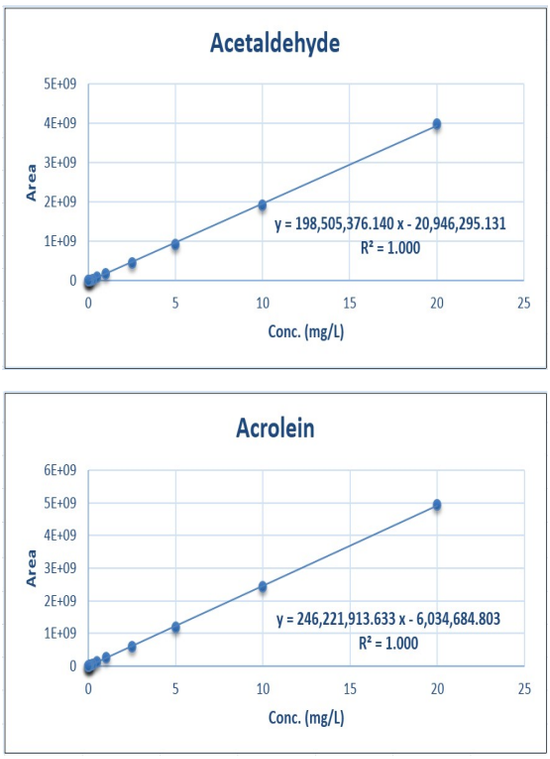


그림 4 분석항목별 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

Formaldehyde-DNPH, acetaldehyde-DNPH, acrolein-DNPH를 이용한 검정곡선 농도범위 내 0.1, 1.0, 5.0 mg/L에 대하여 7회 반복 측정하여 정밀・정확성을 확인하였고(일내)(표 4), formaldehyde-DNPH, acetaldehyde-DNPH, acrolein-DNPH를 이용한 검정곡선 세 농도지점에 대하여 3회씩 반복 측정하여 3일에 걸쳐 정밀・정확성을 확인하였다(일간)(표 5-7). 일내 정밀 · 정확도의 경우, 0.1 mg/L 농도지점에서 formaldehyde는 정확도 103 %, RSD 0.18 % 이었고, acetaldehyde는 정확도 104 %, RSD 0.38 % 이었으며, acrolein은 정확도 101 %, RSD 0.13 %이었다. 0.5 mg/L 농도지점에서는 formaldehyde의 정확도 100 %, RSD 1.20 % 이었고, acetaldehyde의 정확도 101 %, RSD 0.80 % 이었으며, acrolein의 정확도 101 %, RSD 0.92 %이었다. 그리고 5.0 mg/L 농도지점에서 formaldehyde는 정확도 102 %, RSD 5.69 % 이었고, acetaldehyde는 정확도 112 %, RSD 2.52 % 이었으며, acrolein은 정확도 110 %, RSD 2.54 %이었다(표 4).

표 4. 알데히드류 3종 정밀・정확도(일내)

Analyte (n=7)	0.100 mg/L			
	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)	Accuracy (%)
Formaldehyde	0.1032	0.0002	0.18	103
Acetaldehyde	0.1040	0.0004	0.38	104
Acrolein	0.1007	0.0001	0.13	101

Analyte (n=7)	1.000 mg/L			
	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)	Accuracy (%)
Formaldehyde	0.999	0.012	1.20	100
Acetaldehyde	1.009	0.008	0.80	101
Acrolein	1.014	0.009	0.92	101

Analyte (n=7)	5.000 mg/L			
	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)	Accuracy (%)
Formaldehyde	5.114	0.291	5.69	102
Acetaldehyde	5.603	0.141	2.52	112
Acrolein	5.483	0.140	2.54	110

일간 정밀 · 정확도의 경우, formaldehyde의 결과 0.1 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 108 %, RSD 2.14 %이었고, 2일차는 정확도 105 %, RSD 6.50 %이었으며, 3일차는 정확도 106 %, RSD 0.15 %이었다. 1.0 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 105 %, RSD 1.20 %이었고, 2일차는 정확도 99.0 %, RSD 0.48 %이었으며, 3일차는 정확도 98.8 %, RSD 0.18 %이었다. 그리고 5.0 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 103 %, RSD 0.97 %이었고, 2일차는 정확도 104 %, RSD 9.20 %이었으며, 3일차는 정확도 101 %, RSD 0.12 %이었다.(표 5).

표 5. Formaldehyde 정밀・정확도(일간)

Analyte (n=3)		0.100 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Formaldehyde	1일차	0.1078	0.0023	2.14	108
	2일차	0.1051	0.0068	6.50	105
	3일차	0.1060	0.0002	0.15	106
Analyte (n=3)		1.000 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Formaldehyde	1일차	1.047	0.013	1.20	105
	2일차	0.990	0.005	0.48	99.0
	3일차	0.988	0.002	0.18	98.8
Analyte (n=3)		5.000 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Formaldehyde	1일차	5.144	0.050	0.97	103
	2일차	5.206	0.479	9.20	104
	3일차	5.046	0.006	0.12	101

Acetaldehyde의 결과 0.1 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 108 %, RSD 1.90 %이었고, 2일차는 정확도 101 %, RSD 4.23 %이었으며, 3일차는 정확도 108 %, RSD 0.27 %이었다. 1.0 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 104 %, RSD 1.19 %이었고, 2일차는 정확도 100 %, RSD 0.20 %이었으며, 3일차는 정확도 93.5 %, RSD 0.20 %이었다. 그리고 5.0 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 102 %, RSD 0.98 %이었고, 2일차는 정확도 112 %, RSD 4.17 %이었으며, 3일차는 정확도 100 %, RSD 0.13 %이었다.(표 6).

표 6. Acetaldehyde 정밀・정확도(일간)

Analyte (n=3)		0.100 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Acetaldehyde	1일차	0.1076	0.0020	1.90	108
	2일차	0.1009	0.0043	4.23	101
	3일차	0.1082	0.0003	0.27	108
Analyte (n=3)		1.000 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Acetaldehyde	1일차	1.043	0.012	1.19	104
	2일차	1.002	0.002	0.20	100
	3일차	0.935	0.002	0.20	93.5
Analyte (n=3)		5.000 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Acetaldehyde	1일차	5.110	0.050	0.98	102
	2일차	5.600	0.234	4.17	112
	3일차	5.012	0.006	0.13	100

Acrolein의 결과 0.1 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 108 %, RSD 1.55 %이었고, 2일차는 정확도 106 %, RSD 4.22 %이었으며, 3일차는 정확도 104 %, RSD 0.17 %이었다. 1.0 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 104 %, RSD 1.17 %이었고, 2일차는 정확도 101 %, RSD 0.18 %이었으며, 3일차는 정확도 98.1 %, RSD 0.16 %이었다. 그리고 5.0 mg/L 농도지점에서 1일차는 정확도 102 %, RSD 0.88 %이었고, 2일차는 정확도 110 %, RSD 4.21 %이었으며, 3일차는 정확도 102 %, RSD 0.08 %이었다.(표 7).

표 7. Acrolein 정밀・정확도(일간)

Analyte (n=3)		0.100 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Acrolein	1일차	0.1078	0.0017	1.55	108
	2일차	0.1056	0.0045	4.22	106
	3일차	0.1042	0.0002	0.17	104
Analyte (n=3)		1.000 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Acrolein	1일차	1.044	0.012	1.17	104
	2일차	1.005	0.002	0.18	101
	3일차	0.981	0.002	0.16	98.1
Analyte (n=3)		5.000 mg/L			
		Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Acrolein	1일차	5.113	0.045	0.88	102
	2일차	5.480	0.231	4.21	110
	3일차	5.077	0.004	0.08	102

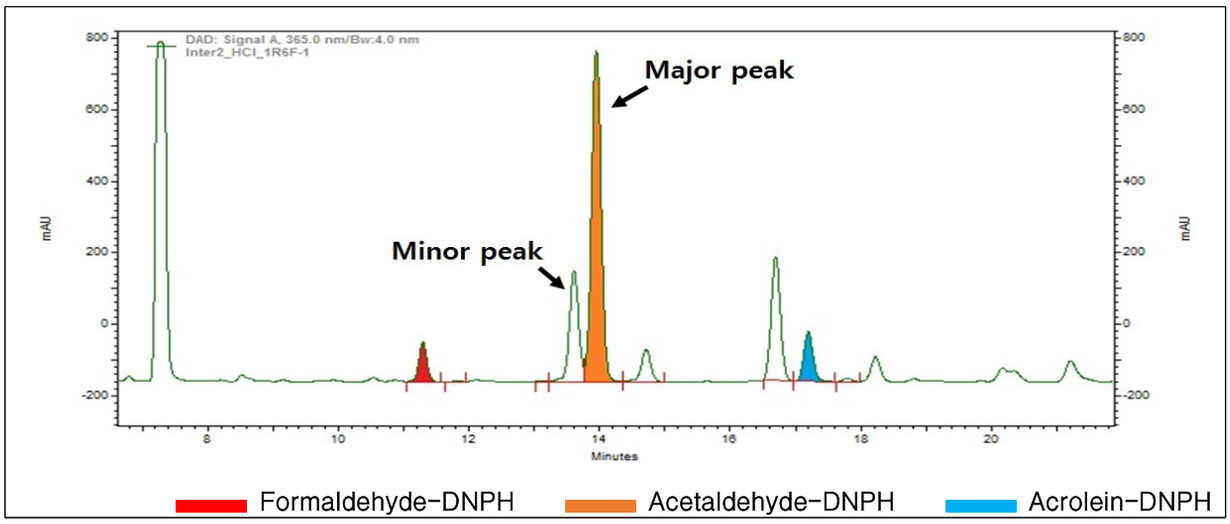


그림 5. Acetaldehyde-DNPH의 주요 피크(major peak)와 부수적 피크(minor peak)

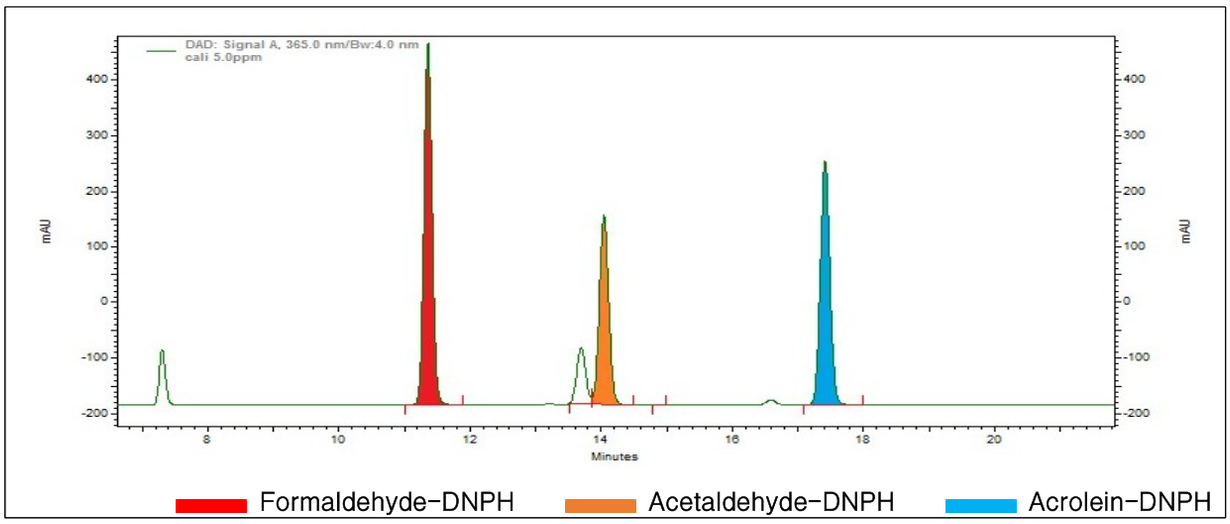


그림 6. 담배연기 추출액 첨가 전인 알데히드류 3종 검정곡선 크로마토그램

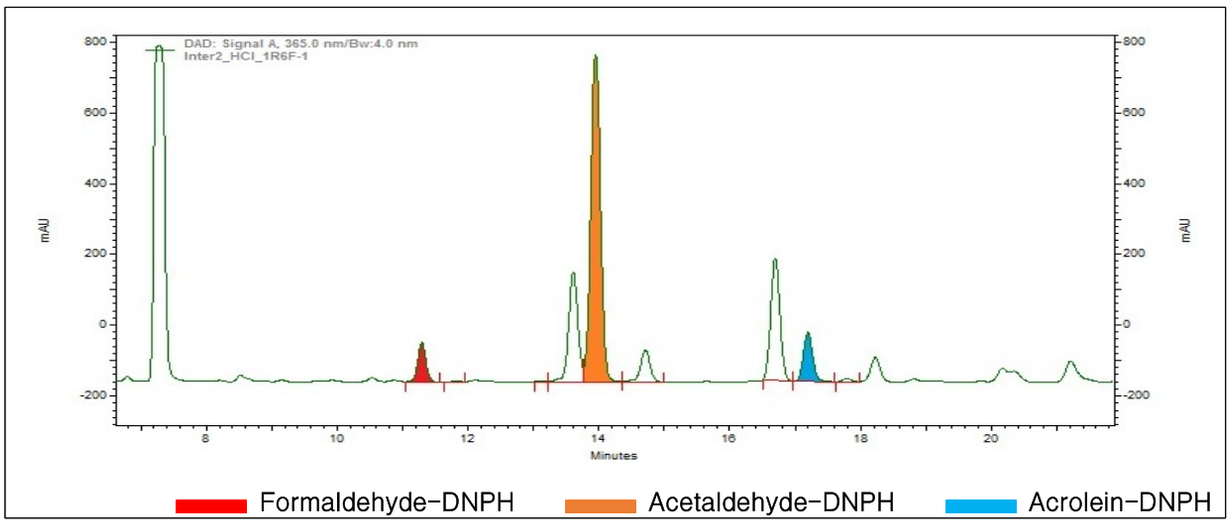


그림 7. 담배연기 추출액 첨가 후인 실제 담배 추출액 내 알데히드류 3종 검정곡선 크로마토그램

4) 검출·정량한계

검출이 가능한 수준의 농도인 0.01 mg/L를 분석장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 알데히드류 3종의 검출한계와 정량한계를 산출하였다. Formaldehyde의 경우 검출한계 0.002 mg/L, 정량한계 0.007 mg/L였고(표 8), acetaldehyde의 경우 검출한계 0.002 mg/L, 정량한계 0.005 mg/L였다(표 9). 그리고 acrolein의 경우 검출한계 0.0003 mg/L, 정량한계 0.001 mg/L였다(표 10).

표 8. Formaldehyde의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.0097	0.009	0.0007	0.002	0.007
2	0.0101				
3	0.0096				
4	0.0092				
5	0.0092				
6	0.0086				
7	0.0082				

표 9. Acetaldehyde의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.0093	0.008	0.0005	0.002	0.005
2	0.0086				
3	0.0085				
4	0.0083				
5	0.0082				
6	0.0081				
7	0.0078				

표 10. Acrolein의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.0099	0.010	0.0001	0.0003	0.001
2	0.0099				
3	0.0101				
4	0.0099				
5	0.0100				
6	0.0101				
7	0.0099				

5) 안정성

검출된 피크 면적을 통해 시간경과에 따라 지속적으로 같은 농도가 유지되는지를 분석한 결과, 알데히드류 3종 모두 최소 24시간동안은 안정적인 것으로 확인되었다. Formaldehyde는 0.125~5.00 mg/L 농도범위 내에서 평균 99~101 %, RSD 0.1~0.7 %이었고, acetaldehyde는 0.125~25.00 mg/L 농도범위 내에서 평균 100~101 %, RSD 0.2~1.1 %이었으며, acrolein은 0.125~5.00 mg/L 농도범위 내에서 평균 101 %, RSD 0.6~1.0 %이었다(표 15).

6) 회수율

ISO 또는 HCl 조건을 통해 주류연을 포집한 용액과 각 분석항목별 200 mg/L 표준용액, 완충용액, Acetonitrile을 준비하여 회수율을 3회 반복 측정한 결과, 알데히드류 3종 모두 회수율 82.7~117 %, RSD 0.07~12.1 % 범위 안에 들었다. Formaldehyde는 평균 107~109 %, RSD 0.11~0.61 %였고(표 16), acetaldehyde는 평균 82.7~117 %, RSD 0.31~12.1 %였으며(표 17), acrolein은 평균 102~106 %, RSD 0.07~3.53 %였다(표 18).

7) 최적파장 선별

345 ~ 380 nm 파장 범위(x축)에서의 area ratio (y축, 365 nm에서의 area 기준)를 나타내었고(그림 8), 최적 파장을 365 nm로 선택하였다.

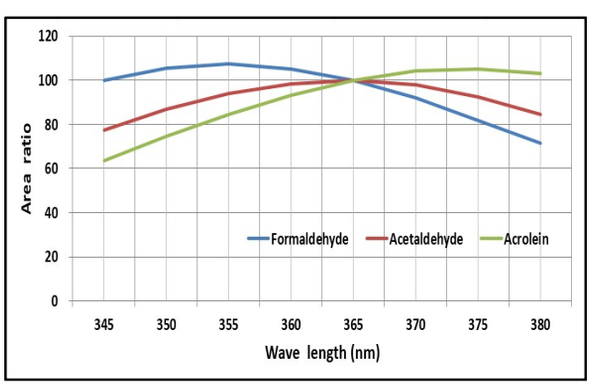


그림 8. 최적 파장 선별

8) Acetaldehyde의 정량방식 타당성

2가지 정량 방식(① 주요 피크, ② 주요+부수적 피크)으로 적용하여 결과값을 비교한 결과 2가지 방식 모두 7개의 샘플에서 유사한 결과값이 확인되었다. ①의 방식으로 정량하였을 때 평균이 497.7

μg/cig, ②의 방식으로 정량하였을 때 평균이 497.1로 두 결과의 차이는 거의 없었다(표 11).

표 11. Acetaldehyde의 정량방식 비교결과

No.	방법 및 대상	Acetaldehyde 정량 방식 (μg/cig)	
		①	②
1	ISO / 3R4F	433.7	433.0
2		479.9	479.5
3		518.6	518.2
4		507.7	507.0
5		536.1	535.6
6		488.1	487.4
7		519.8	519.2
①, ② 정량방식 평균		497.7	497.1

2. 시료분석 결과

표준담배 2종(1R6F, 3R4F)을 대상으로 ISO와 HCI 흡연조건에서 일내 실험(7회 반복)한 결과, formaldehyde는 ISO조건에서 1R6F 함량측정시 평균 24.1 μg/cig., RSD 2.6 %이었고, 3R4F 함량측정시 평균 17.3 μg/cig., RSD 9.8 %이었다. HCI조건에서는 1R6F 함량측정시 평균 93.1 μg/cig., RSD 4.1 %이었고, 3R4F 함량측정시 평균 76.5 μg/cig., RSD 4.7 %이었다(표 12). Acetaldehyde는 ISO조건에서 1R6F 함량측정시 평균 458.0 μg/cig., RSD 3.5 %이었고, 3R4F 함량측정시 평균 512.7 μg/cig., RSD 4.2 %이었다. HCI조건에서는 1R6F 함량측정시 평균 1356.8 μg/cig., RSD 3.0 %이었고, 3R4F 함량측정시 평균 1524.2 μg/cig., RSD 2.5 %이었다(표 13). Acrolein은 ISO조건에서 1R6F 함량측정시 평균 38.1 μg/cig., RSD 3.6 %이었고, 3R4F 함량측정시 평균 42.4 μg/cig., RSD 6.1 %이었다. HCI조건에서는 1R6F 함량측정시 평균 137.1 μg/cig., RSD 2.8 %이었고, 3R4F 함량측정시 평균 143.3 μg/cig., RSD 3.9 %이었다(표 14).

표 12. Formaldehyde 일내 실험결과

분석항목	방법	대상	함량 (μg/cig)		RSD (%)
			평균	표준편차	
Formaldehyde	ISO, n=7	1R6F	24.1	0.6	2.6
		3R4F	17.3	1.7	9.8
	HCI, n=7	1R6F	93.1	3.8	4.1
		3R4F	76.5	3.6	4.7

표 13. Acetaldehyde 일내 실험결과

분석항목	방법	대상	함량 (μg/cig)		RSD (%)
			평균	표준편차	
Acetaldehyde	ISO, n=7	1R6F	458.0	15.9	3.5
		3R4F	512.7	21.7	4.2
	HCI, n=7	1R6F	1356.8	41.3	3.0
		3R4F	1524.2	37.5	2.5

표 14. Acrolein 일내 실험결과

분석항목	방법	대상	함량 (μg/cig)		RSD (%)
			평균	표준편차	
Acrolein	ISO, n=7	1R6F	38.1	1.4	3.6
		3R4F	42.4	2.6	6.1
	HCI, n=7	1R6F	137.1	3.9	2.8
		3R4F	143.3	5.6	3.9

표준담배 2종(1R6F, 3R4F)을 대상으로 ISO와 HCI 흡연조건에서 일간 실험(3회 반복)한 결과, formaldehyde는 ISO조건에서 1R6F 함량측정시 19.6~24.0 μg/cig., RSD 2.6~14.1 %이었고, 3R4F 함량측정시 17.7~21.4 μg/cig., RSD 7.5~14.0 %이었다. HCI조건에서는 1R6F 함량측정시 86.3~96.5 μg/cig., RSD 1.0~5.8 %이었고, 3R4F 함량측정시 73.1~78.0 μg/cig., RSD 5.7~9.8 %이었다(표 19). Acetaldehyde는 ISO조건에서 1R6F 함량측정시 397.4~479.0 μg/cig., RSD 1.8~4.1 %이었고, 3R4F 함량측정시 514.7~578.4 μg/cig., RSD 4.6~7.4 %이었다. HCI조건에서는 1R6F 함량측정시 1335.1~1364.6 μg/cig., RSD 1.3~4.2 %이었고, 3R4F 함량측정시 1497.7~1537.2 μg/cig., RSD 1.3~3.4 %이었다(표 20). Acrolein은 ISO조건에서 1R6F 함량측정시 31.8~40.2 μg/cig., RSD 4.8~5.3 %이었고, 3R4F 함량측정시 42.3~47.0 μg/cig., RSD 6.0~8.4 %이었다. HCI조건에서는 1R6F 함량측정시 140.5~148.4 μg/cig., RSD 3.2~4.6 %이었고, 3R4F 함량측정시 144.9~159.1 μg/cig., RSD 2.0~4.0 %이었다(표 21).

표 15. Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein의 안정성

분석항목	농도 (mg/L)	주입시간, %							평균 (%)	편차 (%)	RSD (%)
		0 hr	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr	20 hr	24 hr			
Formaldehyde	0.125	100	99	99	99	99	99	99	99	0.5	0.5
	0.500	100	100	100	100	100	100	100	100	0.1	0.1
	2.50	100	100	101	101	101	100	102	101	0.7	0.7
	5.00	100	100	100	101	101	101	101	101	0.3	0.3

분석항목	농도 (mg/L)	주입시간 (시간), %							평균 (%)	편차 (%)	RSD (%)
		0 hr	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr	20 hr	24 hr			
Acetaldehyde	0.125	100	100	101	100	101	99	98	100	1.0	1.0
	0.500	100	100	100	99	101	100	100	100	0.6	0.6
	2.50	100	100	100	100	100	97	100	100	1.0	1.1
	5.00	100	101	101	101	101	101	101	101	0.4	0.4
	12.5	100	100	100	100	100	100	100	100	0.2	0.2
	25.0	100	100	100	101	100	101	100	100	0.3	0.3

분석항목	농도 (mg/L)	주입시간 (시간), %							평균 (%)	편차 (%)	RSD (%)
		0 hr	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr	20 hr	24 hr			
Acrolein	0.125	100	101	102	101	102	102	102	101	0.7	0.7
	0.500	100	100	101	101	101	102	102	101	0.6	0.6
	2.50	100	100	101	102	102	100	103	101	1.0	1.0
	5.00	100	101	101	101	102	102	102	101	0.7	0.7

※ 0 시간(첫 주입시간)을 100%로 가정하여 계산

표 16. Formaldehyde의 회수율

분석항목	방법	대상 (n=3)	주입량 (μg)	회수율(%)		RSD(%)
				평균	표준편차	
Formaldehyde	ISO	1R6F	5 μg	109	0.1	0.11
		3R4F		108	0.3	0.28
	HCl	1R6F		108	0.3	0.35
		3R4F		108	0.6	0.61
	ISO	1R6F	10 μg	107	0.3	0.33
		3R4F		108	0.3	0.36
	HCl	1R6F		107	0.2	0.26
		3R4F		107	0.4	0.48

표 17. Acetaldehyde의 회수율

분석항목	방법	대상 (n=3)	주입량 (μg)	회수율(%)		RSD(%)
				평균	표준편차	
Acetaldehyde	ISO	1R6F	5 μg	113	0.7	0.79
		3R4F		117	0.8	0.89
	HCl	1R6F		90.4	11.1	10.0
		3R4F		87.2	8.6	7.53
	ISO	1R6F	10 μg	115	0.3	0.31
		3R4F		115	0.3	0.34
	HCl	1R6F		97.7	6.7	6.59
		3R4F		82.7	14.6	12.1

표 18. Acrolein의 회수율

분석항목	방법	대상 (n=3)	주입량 (μg)	회수율(%)		RSD(%)
				평균	표준편차	
Acrolein	ISO	1R6F	5 μg	102	0.2	0.19
		3R4F		103	0.1	0.07
	HCl	1R6F		102	0.6	0.57
		3R4F		103	1.1	1.15
	ISO	1R6F	10 μg	106	0.2	0.19
		3R4F		106	0.5	0.48
	HCl	1R6F		106	0.2	0.22
		3R4F		104	3.4	3.53

표 19. Formaldehyde 일간 실험결과

No.	방법	대상	함량 (μg/cig)		RSD(%)
			평균	표준편차	
1일차	ISO	1R6F, n=3	24.0	1.1	4.4
2일차			25.9	0.7	2.6
3일차			19.6	2.8	14.1
1일차	ISO	3R4F, n=3	17.7	1.3	7.5
2일차			21.4	3.0	14.0
3일차			19.0	2.0	10.7
1일차	HCI	1R6F, n=3	96.5	1.0	1.0
2일차			86.8	5.0	5.8
3일차			86.3	4.8	5.6
1일차	HCI	3R4F, n=3	78.0	4.4	5.7
2일차			66.9	6.6	9.8
3일차			73.1	4.8	6.5

표 20. Acetaldehyde 일간 실험결과

No.	방법	대상	함량 (μg/cig)		RSD(%)
			평균	표준편차	
1일차	ISO	1R6F, n=3	469.0	13.1	2.8
2일차			479.0	8.6	1.8
3일차			397.4	16.3	4.1
1일차	ISO	3R4F, n=3	514.7	23.7	4.6
2일차			578.4	42.8	7.4
3일차			560.7	41.5	7.4
1일차	HCI	1R6F, n=3	1364.6	57.3	4.2
2일차			1335.1	30.7	2.3
3일차			1354.9	17.6	1.3
1일차	HCI	3R4F, n=3	1537.2	20.0	1.3
2일차			1497.7	34.4	2.3
3일차			1507.0	51.2	3.4

표 21. Acrolein 일간 실험결과

No.	방법	대상	함량 (μg/cig)		RSD(%)
			평균	표준편차	
1일차	ISO	1R6F, n=3	38.9	1.9	4.8
2일차			40.2	2.0	5.0
3일차			31.8	1.7	5.3
1일차	ISO	3R4F, n=3	42.3	2.5	6.0
2일차			45.5	3.8	8.4
3일차			47.0	3.4	7.2
1일차	HCI	1R6F, n=3	140.5	3.2	2.3
2일차			146.2	3.2	2.2
3일차			148.4	4.6	3.1
1일차	HCI	3R4F, n=3	144.9	2.9	2.0
2일차			151.3	4.8	3.2
3일차			159.1	6.4	4.0

3. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: (KDCA-M-05) LC를 이용한 담배 주류연 내 formaldehyde, acetaldehyde 및 acrolein 분석

나. 제개정일: 2020.03.09.
2020.09.21.
2020.11.06.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)' 를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관 시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버 [ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ± 3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관한다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품(유도체화 물질 포함)을 사용하고, 그 외는 HPLC용 또는 정량분석용 시약을 사용한다(표 22). 표준물질 사용 시 유효기간을 확인하고 사용한다.

표 22. 시약 등 목록

연번	시약명
1	Formaldehyde-DNPH
2	Acetaldehyde-DNPH
3	Acrolein-DNPH
4	Acetonitrile
5	Tetrahydrofuran
6	Isopropanol
7	2,4-DNPH(2,4-Dinitrophenylhydrazine)
8	Sodium hydroxide solution
9	Acetic acid (glacial)

③ 조제용 시약

DNPH 포집 용액의 경우, 1 L 부피플라스크에 500 mL acetonitrile과 DNPH (2,4-dinitrophenyl hydrazine) 2.5 g을 넣은 후, acetonitrile을 넣어 1 L로 맞춘다. 이 때 DNPH를 녹이기 위해 초음파 분해(sonication)은 하지 않고 미열(40 ℃ 정도)과 약한 교반을 통해 완전히 녹인다.

이동상 용매 A의 경우, 2 L 유리병에 water 1180 mL, acetonitrile 600 mL, tetrahydrofuran 200 mL, isopropanol 20 mL를 넣고, 잘 혼합시킨다. 이 용액은 사용 전 (30 ± 5) ℃에서 10분간 초음파분해 해주고 필요시 가스제거(degassing)을 진행한다.

이동상 용매 B의 경우, 1 L 유리병에 acetonitrile 650 mL, water 330 mL, tetrahydrofuran 10 mL, isopropanol 10 mL를 넣고, 잘 혼합시킨다. 이 용액은 사용 전 (30 ± 5) ℃에서 10분간 초음파분해 해준다. 필요시 가스제거를 진행한다.

완충 용액 (pH 4)의 경우, 200 mL 부피플라스크에 증류수 60 mL, 10 M sodium hydroxide 20 mL, glacial acetic acid 100 mL를 넣은 후 증류수를 넣어 표선까지 맞추고 pH를 확인한다. 단, H+와 OH-의 비율을 고려하여 조제할 수 있다.

농도가 진한 표준용액(stock solution)의 경우, 조제한 표준용액은 냉동고에 보관하고, 필요시 해동하여 사용한다. 되도록 인증표준물질(Certified Reference Materials, CRM)을 사용하고, 구입한 CRM의 보관방법을 따를 수 있다.

검정곡선 1차 혼합 표준용액의 경우, 1차 혼합 표준용액 50 mg/L 1 mL를 조제할 수 있다(표 23).

표 23. 혼합표준용액 50 mg/L 조제방법

Standard	CRM concentration (mg/L)	Volume (mL) of CRM	Final Volume (mL)	Final concentration (mg/L)
Formaldehyde -DNPH	100	0.5	1.0	50 mg/L (mixed)
Acetaldehyde -DNPH	1 000	0.05		
Acrolein-DNPH	1 000	0.05		
Acetonitrile	-	0.4		

검정곡선 2차 혼합 표준용액의 경우, 혼합 표준용액 5 mg/L 1 mL 조제 시, 1차 혼합 표준용액 0.1 mL와 acetonitrile 0.9 mL를 넣어 만들 수 있다. 혼합 표준용액 0.5 mg/L 1 mL 조제 시, 2차 혼합 표준용액(5 mg/L) 0.1 mL와 acetonitrile 0.9 mL를 넣어 만들 수 있다.

검정곡선 작성 시 혼합 표준용액의 경우, stock, 1차 및 2차 혼합 표준용액을 사용하여 총 1 mL로 맞출 수 있다. 분석항목별 적정 농도범위에 해당하는 검정곡선 농도 지점을 선택하여 조제한다(표 24). QC(Quality control) 표준물질은 검정곡선 농도범위의 중간 농도수준 또는 시료검출 농도수준으로 정하고, 샘플 분석 시 같이 확인한다.

표 24. 혼합표준용액 50 mg/L 조제방법

사용용액 / 농도(mg/L)	혼합액 농도 (mg/L)	주입 부피 (mL)	완충용액 [pH4] (mL)	Acetonitrile (mL)
0	-	0	0.5	0.500
0.0125	0.5	0.025	0.5	0.475
0.0250	0.5	0.050	0.5	0.450
0.0500	0.5	0.100	0.5	0.400
0.125	5.0	0.025	0.5	0.475
0.250	5.0	0.050	0.5	0.450
0.500	5.0	0.100	0.5	0.400
1.25	50.0	0.025	0.5	0.475
2.50	50.0	0.050	0.5	0.450
5.00	50.0	0.100	0.5	0.400
10.0	50.0	0.200	0.5	0.300
	진한용액 (acetaldehyde)			
12.5	500	0.025	0.5	0.475
25.0	500	0.050	0.5	0.450

2) 장치 및 장비

주요장비인 LC system(Agilent 1260과 유사한 기종), diode array detector로 기기분석하고, 선형 담배 연기분석장치(Cerulean / SM450와 유사한 기종)로 담배연기를 포집한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초음파분해기, 초저온 냉동고, 냉장고, 분석용 전자저울, 항온항습챔버, 볼텍서, 오븐, 데시게이터, 초순수제조장치 등이 있다(표 25).

표 25. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	20 μL, 200 μL, 1 000 μL	검정곡선, 시료분석
초음파분해기 (Ultrasonic Cleaner)	-	이동상 용매 조제
초저온 냉동고	-	시료 보관
냉장고	-	검액 보관
분석용 전자저울	-	시약 조제
항온항습챔버	-	시료 조화
Vortexer	-	버퍼 조제
Dry oven	-	초자 건조
Desiccator	-	초자 보관
초순수 제조장치	-	이동상 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

샘 플 링

ISO 8243 및 내부계획에 따라 담배확보

↓

궐련 준비

ISO 3402에 따라 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) % 로 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습챔버에서 조화
ISO 4387에 따라 꽁초 길이 표시

↓

흡연 장치 준비

ISO 3308에 따른 흡연에 대한 환경조건 및 사양
ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]
· 흡연시간 : 2.0 s ± 0.02 s
· 흡연주기 : 60[30] s ± 0.5 s
· 흡입량 : 35[55] mL ± 0.3[0.5] mL
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

담배연기 발생

선형 흡연장치
소모한 담배(2개)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

담배연기 포집

2개의 임핀저로 담배 주류연 포집
각각의 임핀저에는 25 mL의 DNPH 포집용액을 넣음
Blank smoke trap에서도 동일한 절차로 시행함

↓

시료 분석

2개의 임핀저의 DNPH 포집용액 총 50 mL 중 0.5 mL(0.45 μm 필터 필요)와 완충 용액(pH 4) 0.5 mL를 2 mL vial에 넣고 잘 섞어준 후 기기분석

이동상조건

Time (min)	Mobile Phase A	Mobile phase B	Flow rate (mL/min)
0.0	100	0	0.8
8.0	70	30	0.8
20.0	47	53	0.8
25.0	15	85	0.8
27.0	100	0	0.8
35.0	100	0	0.8

그림 9. 시험방법 절차흐름도

② 담배 주류연 성분분석을 위한 흡연조건

표 26. 흡연조건

흡연조건	ISO	HC
흡입부피 (mL)	35 ± 0.3	55 ± 0.5
흡입지속시간 (s)	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.02
흡입 빈도 (s)	60 ± 0.5	30 ± 0.3
공기 속도 (mm/s)	200 ± 30	200 ± 30
환기 차단율 (%)	0	100
꽁초 길이 (mm)	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것

③ LC-DAD 조건

표 27. 분석장비 기기조건

액체 크로마토그래프(GC)	
파라미터	설정값
컬럼	250 mm × 4.6 mm × 5 μm, Reversed phase C18 column or equivalent
흐름속도	0.8 mL/min
주입부피	10 μL
컬럼오븐 온도	30 ℃
자동샘플러 온도	4~5 ℃
검출기	
다이오드 어레이 검출기(DAD)	
파장범위	(190 ~ 950) nm
선택파장	365 nm

라. 검증보고서 구성 및 내용

선택성(selectivity), 직선성(linearity), 정밀성(precision) · 정확성(accuracy), 회수율(recovery), 최적파장 선별, 안정성(stability), acetaldehyde의 정량방식 타당성, 검출한계(limit of detection) · 정량한계(limit of quantification), 표준담배(1R6F, 3R4F) 시료분석 등으로 구성되었다.

선택성은 결과판독에 영향을 주는 담배연기추출물을 인위적으로 시료에 첨가하여 첨가 전·후의 결과가 동일한지 확인하였고, 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.999 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 10 % 이내였고, 정확도는 93.5 ~ 112 % 범위였으며, 회수율은 평균 82~117 % 범위였다. 최적파장 선별에서는 345 ~ 380 nm 범위에서 가장 감도가 좋은 365 nm을 선택하였고, 안정성은 전항목 평균 1 % 이내로 최소 24시간동안은 안정적인 것으로 확인하였다. Acetaldehyde의 정량방식 타당성 확인에서는 주요피크와 '주요피크+부수적피크의 합'의 정량결과를 비교하여 서로 유사한 분석값을 보이는 것을 확인하였다. 검출한계 및 정량한계는 formaldehyde는 0.002 mg/L, 0.007 mg/L, acetaldehyde는 0.002 mg/L, 0.005 mg/L, acrolein은 0.0003 mg/L, 0.001 mg/L였다. 시료분석은 담배연기(1R6F, 3R4F) 포집을 ISO 조건과 HCI조건에서 각각 진행하였고, 일내 실험에서는 7회 반복실험을, 일간 실험에서는 3회 반복실험을 실시하여 결과를 산출하였다.

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
2. World Health Organization. 2018. Agents Classified by the IARC Monographs, Vol. 1-122.
3. World Health Organization. 2008. The Scientific Basis of Tobacco Product Regulation (WHO Technical Report Series 951).
4. Food and Drug Administration. 2012. Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke: Established list.
5. British American Tobacco(BAT). 2008. Group Research and Development Method. Determination of carbonyls in mainstream cigarette smoke.
6. CORESTA. 2014. RECOMMENDED METHOD N° 74. Determination of selected carbonyls in mainstream cigarette smoke by HPLC.
7. Health Canada, 1999. Test Method T-104 - Determination of Selected Carbonyls in Mainstream Tobacco Smoke.
8. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
9. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
10. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.

⑧ 담배 주류연 내 알데히드류 3종 국외숙련도 참가결과

참가 개요

□ **목적** : ISO17025 시험결과 품질보증을 위한 국외 숙련도평가 참여를 통한 참가시험소간 비교시험 및 흡연폐해실험실의 분석능력 평가

□ **주관기관** : 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터[44](Center for Tobacco Reference Products, CTRP)

□ **참가항목**

○ **분석 및 측정항목**: Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein, 흡입횟수(puff count), 흡입조건

* BAT 방법(2018) 「Determination of carbonyls in mainstream cigarette smoke」(1)

- **흡입횟수** : 흡입조건별 1개비 당 횟수로 측정
- **흡입조건**: 국제표준화기구(ISO), 캐나다보건부(HCI)

□ **참가기간**

1) 2017년 : 2월 15일 ~ 5월 15일

2) 2020년 : 2월 20일 ~ 4월 16일

□ **결과판정기준**: |z| 스코어가 2이하일 경우 적합

결 과

2017년과 2020년 미국 켄터키 대학 내 담배참조제품센터의 숙련도참가결과 통보 시 모든 항목에서 |z| 스코어가 1 미만으로 산출되어 '적합' 판정을 받았다(2,3).

2017년의 formaldehyde는 ISO조건에서 -0.97, HCI조건에서 -0.37이었고, acetaldehyde는 ISO조건에서 -0.79, HCI조건에서 -0.98이었다. Acrolein은 ISO조건과 HCI조건에서 각각 -0.86, -0.25였으며, 흡입 횟수(개비당)는 ISO조건에서 0.91, HCI조건에서 -0.92이었다(표 1).

표 1. 2017년 국제 숙련도시험참가 결과

참가 항목	Formaldehyde		Acetaldehyde	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	-0.97	-0.37	-0.79	-0.98
참가 항목	Acrolein		흡입 횟수	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z 스코어	-0.86	-0.25	0.91	-0.92

2020년에는 formaldehyde는 ISO조건에서 -0.57, HCI조건에서 -0.63이었고, acetaldehyde는 ISO조건에서 -0.64, HCI조건에서 -0.79이었다. Acrolein은 ISO조건과 HCI조건에서 각각 -0.16, -0.10였으며, 흡입 횟수(개비당)는 ISO조건에서 -0.09, HCI조건에서 -0.42였다(표 2).

표 2. 2020년 국제 숙련도시험참가 결과

참가 항목	Formaldehyde		Acetaldehyde	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z score	-0.57	-0.63	-0.64	-0.79
참가 항목	Acrolein		흡입 횟수	
	ISO	HCI	ISO	HCI
z score	-0.16	-0.10	-0.09	-0.42

참고문헌

1. British American Tobacco(BAT). 2008. Group Research and Development Method. Determination of carbonyls in mainstream cigarette smoke.
2. University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products, Proficiency Testing Round CIG-2017A Final Report, 2017.
3. University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products, Proficiency Testing Round CIG-2020A Final Report, 2020.

44) ILAC(국제시험기관인정협력체)과 국제상호인정(MRA) 체계에 있는 A2LA(미국)에 의해 공인된 기관으로, 국제적 수준의 담배관련 실험실 분석능력에 대한 숙련도 검증 수행

⑨ 담배필러 내 Nicotine 분석(ISO17025공인시험법)

연구 배경

세계보건기구(WHO)가 운영하는 '담배연구소간 네트워크(TobLabNet)'는 2005년 담배규제 기본협약(FCTC)에 따라 담배제품이나 연기 등 배출물 검사를 위한 시험법을 개발하고 표준화하기 위해 구성된 협의체로 미국(FDA), 영국(Department of Health), 캐나다(Health Canada), 일본(국립보건의료과학원, NIPH) 등 29개국 37개 기관이 가입되어 있다. 최근 사용이 늘어나고 있는 가열담배(궐련형 전자담배)의 경우 필러 내 Nicotine에 대한 시험법이 궐련형 담배와 크게 다르지 않아 적용이 가능하다. 따라서 WHO 담배규제기본협약(FCTC)의 권고하는 측정이 필요한 담배성분측정의 인프라를 구축하여 다양한 연구결과들을 국제사회와 지속적으로 공유해 나갈 계획으로 궐련 filler내 Nicotine 시험방법 절차서를 마련하여 이를 표준담배(궐련)에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

흡연폐해실험실의 Nicotine 시험검사법 표준절차서는 World Health Organization Tobacco Laboratory Network에서 사용 중인 Standard operating procedure for determination of nicotine in cigarette tobacco filler을 근거로 작성하였다. WHO TobLabNet 는 국제흡연학회 내 기구로서 Nicotine측정에 대한 SOP를 제공하며 참값측정을 그 목적으로 하고 있다. 기체크로마토그래프는 Nicotine 항목에 대하여 정확성과 정밀성이 뛰어나고 민감도와 특이도 또한 뛰어나 참값을 측정해야 하는 표준검사법으로써 사용하기에 적합하다. 이에 따라 기체크로마토그래프을 적용하여 각초 내 Nicotine을 정량적으로 분석한다. 적용범위는 담배 또는 제품담배 시료 중의 Nicotine 함량을 n-hexane 으로 추출한 후 내부표준물질을 사용하여 불꽃 이온화 검출기가 부착된 GC로 분석하여 측정한다. 이 방법은 모든 종류의 담배시료에 적용 가능하다.

2. 시료 전처리

담배로부터 filler만 꺼내어 분쇄하여 혼합한 후 4mm mesh screen을 통과시켜 ISO 3402에 따라 궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관하여 조화시킨다. 조화시킨 filler를 0.5 ~ 1.5 g 무게를 측정하여 갈색용기에 넣은 후 Di-water 20 mL를 넣어 충분히 섞어준다. 40 mL의 추출용액을 넣고 추가로 10 mL의 2 mol/L sodium hydroxide solution을 첨가한다. 추출용기를 마개로 닫은 후 shaker에서 (60 ± 2) 분간 진탕한다. 평평한 곳에 20분간 상온에 방치하여 상층액만 따로 분리하여 0.45 um PTFE 필터를 통과시켜 적정량을 옮겨 담아 GC로 분석하였다(그림 1).

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화

↓

② 샘플 추출
▶ 조화시킨 filler를 0.5 ~ 1.5 g 무게를 측정하여 갈색용기에 담아 Di-water 20 mL + 추출용매 40 mL + 2N NaOH 10 mL로 용출, 진탕기로 (60 ± 2) min 교반
▶ 용기를 꺼내어 상온에 20 min 동안 방치시켜 상층액만 분리하여 차광 후 냉장(4 ~ 8) ℃ 보관[최대 24시간 방치]

↓

⑤ 시료 분석
▶ 추출 용기로부터 적정양을 0.45 μm PTFE로 필터 후 갈색 2 mL 바이알에 옮겨 기기분석

그림 1. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

궐련 내 filler를 기기분석하기 위한 GC 기기조건은 표 3과 같다. 컬럼은 CP-WAX 51(25 m, 0.25 mm, 0.20 ㎛)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 온도 170 ℃ 설정하였으며 총 분석시간은 10분이었다. 정량을 위한 내부표준물질인 n-heptadecane이 먼저 검출되고 그다음으로 분석항목인 Nicotine이 검출되었다. (표 1).

표 1. 궐련 내 Nicotine 분석을 위한 기기조건

GC 기기조건

- 주입구
▷ 컬럼 : CP-WAX 51(25 m, 0.25 mm, 0.20 μm)
▷ 주입 온도(℃) : 270 ℃
▷ 컬럼 온도(℃) : 170 ℃
▷ 운반기체 유속 : He 1.5 mL/min
▷ 주입 모드(비율) : Split(10:1)
▷ 주입 부피 : 1 μL
- 검출기
▷ 온도(℃) : 270 ℃
▷ H_2 유속 : 40 mL/min
▷ Air 유속 : 450 mL/min

▷ [GC 오븐 프로그램]
총 분석시간 : 10 min

초기온도(℃)	온도상승 (℃/min)	최종온도(℃)	유지시간 (min)
170	등온	170	10

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 표준담배를 시료로 활용하여 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 선택성, 직선성, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계 등이었다.

1) 선택성(Selectivity)

선택성 검증은 분석에 있어서 간섭이 될만 한 물질에 이미 알고있는 농도를 첨가하여 확인한다.

2) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분한 면적(area)을 내부표준물질(n-heptadecane) 피크을 적분한 면적(area)으로 나눈 비(ratio)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99 이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정확성은 시료 검출수준을 고려한 농도범위의 검정곡선에 범위 내 농도를 적용하여 그 값이 얼마나 일치하는지를 백분율(%)로 나타내었다. 정밀성은 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 반복・측정하여 평가하였다. 본 실험결과의 정밀성은 일내(interday) 즉, 같은 실험을 같은 날 시간을 두고 반복 실시하고, 일간[45](interday)에서 3일에 걸쳐 3회 반복 측정에 대한 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었다. 해당시험법(전처리 등)의 절차를 고려하여 별도의 전처리과정 없이 기기분석한 결과를 제시하였다.

4) 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료0.2 ng/mL) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 방법검출한계에 3을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

45) 동일한 조건하에 실험일을 달리하여 반복적인 작업 시행

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 WHO TabLabNet SOP 04방법을 참고하여 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준물질 및 검정곡선 조제방법(농도 지점 등), GC 기기분석 조건(분할모드 및 비율, 검출기온도 등) 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 그리고, 실험결과는 아래 식과 같이 포집용액의 농도(mg/mL)와 부피(volume) 및 사용한 담배무게(g)로 mg/g 단위로 산출하였다.

$$m_n = \frac{m_t \times V_e}{m_0 \times 1000}$$

m_t 시험시료에서 Nicotine 농도(mg/L)

V_e 사용되는 추출액의 양(mL)

m_o 시험시료의 질량(g)

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 선택성

담배에서 filler 와 filter 를 제거한 나머지 종이를 Nicotine 표준액 1000 mg/L 농도를 첨가하여 시료를 분석하여 확인하였다(그림2).

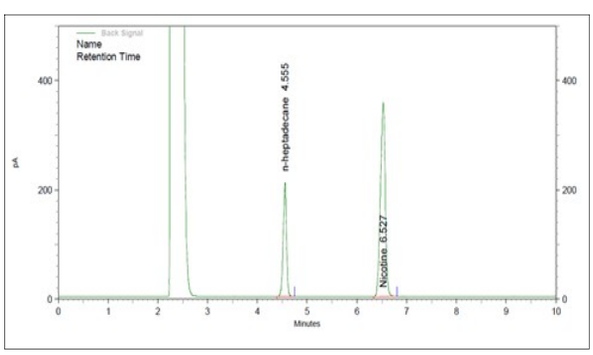


그림 2. Nicotine 표준물질 및 내부표준물질(ISTD)

2) 직선성

분석대상물질인 Nicotine의 R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 3).

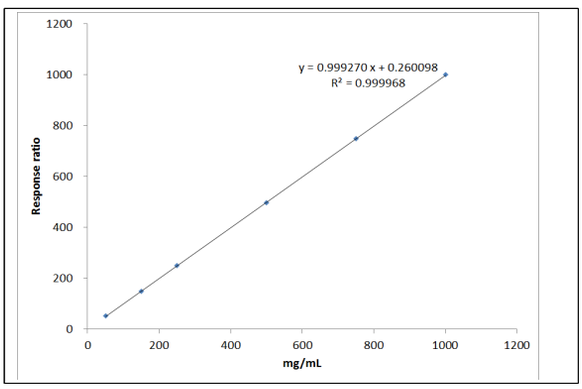


그림 3. 정량분석을 위한 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

검정곡선 농도범위 내 7회 반복 측정하여 회수율(%R)로 계산하여 정확성을 확인하였다. 또한 정밀성은 일내 1가지 농도에 대하여 7회 이상 측정하여 상대표준편차(RSD %)로 반복 측정하였고, 알간 정밀은 총 4일에 걸쳐 3반복하여 확인하였다(표 2, 3).

확성은 50 mg/L 농도지점에서 정확도 95 %, RSD 0.1 %이었고, 150 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.1 %이었고, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.1 %이었다(표 4).

일내 정밀성은 RSD 0.1 %이었고, 1일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.2 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.1 %이었다.

2일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 102 %, RSD 0.5 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.2 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 99 %, RSD 0.1 %이었다.

3일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 90 %, RSD 1.0 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 103 %, RSD 0.2 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 102 %, RSD 0.1 %이었다.

4일 일간 정밀 · 정확도는 50 mg/L 농도지점에서 정확도 95%, RSD 0.1 %, 250 mg/L 농도지점에서 정확도 100 %, RSD 0.1 %, 500 mg/L 농도지점에서 정확도 101 %, RSD 0.1 %이었다(표 5)..

표 2. 일내 정확도

Nicotine 농도 (mg/L)	정확도 (%)	RSD (%)
50	95	0.1
150	101	0.1
250	100	0.1

표 3. 일간 정밀·정확도

분석횟수	측정값(mg/L)	평균(mg/L)	RSD(%)
1	234.4	234.5	0.09
2	234.5		
3	234.6		
4	234.4		
5	234.0		
6	234.6		
7	234.7		

농도 / 일차	50 mg/L		250 mg/L		500 mg/L	
	RSD (%)	정확도 (%)	RSD (%)	정확도 (%)	RSD (%)	정확도 (%)
1	0.2	101	0.1	99	0.1	101
2	0.5	102	0.2	100	0.1	99
3	1.0	90	0.2	103	0.1	102
4	0.1	95	0.1	100	0.1	101

4) 검출 · 정량한계

검출이 가능한 수준의 농도인 50 mg/L를 분석장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 Nicotine의 검출한계와 정량한계를 산출하였다. 검출한계 0.019 ng/mL, 정량한계 0.061 ng/mL이었다(표 4).

표 4. Nicotine의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	52.5	52.5	0.063	0.2	0.6
2	52.6				
3	52.5				
4	52.6				
5	52.6				
6	52.5				
7	52.5				

2. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: GC를 이용한 담배 중 filler 내 Nicotine 분석

나. 제개정일: 2020.09.21.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)' 를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관 시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버[ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ± 3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관 한다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품을 사용하고, 그 외는 HPLC용 또는 정량분석용 시약을 사용한다(표 22). 표준물질 사용 시 유효기간을 확인하고 사용한다(표 5).

표 5. 시약 등 목록

연번	시약명
1	*n*-Hexane (< 1.0 g/L water)
2	-(-)Nicotine
3	Sodium hydroxide solution
4	*n*-Heptadecane
5	Distilled Water

③ 조제용 시약

n-Heptadecane (d;0.777 g/mL)의 해당량 650 μL를 취하여 n-Hexane 1 L에 첨가 뚜껑을 닫은 후 10회 inversion하여 충분히 섞어준다.

농도가 진한 표준용액(stock solution)는 냉장보관하고 인증표준물질(Certified Reference Materials, CRM)을 사용하고, 구입한 CRM의 보관방법을 따를 수 있다.

검정곡선 혼합 표준용액의 경우는 표 6과 같다.

표 6. 검량곡선 표준용액 조제방법

No	Nicotine Stock(mL)	Total volumn (mL)	Nicotine (mg/L)
1	0.25	10	50
2	0.75	10	150
3	1.25	10	250
4	2.5	10	500
5	3.75	10	750
6	5	10	1 000

2) 장치 및 장비

주요장비인 GC system(Agilent 7890B와 유사한 기종), TCD, FID로 기기분석한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초음파세척기, 냉장고, 분석용 전자저울, 항온항습챔버, 볼텍서, 오븐, 데시게이터, 초순수제조장치 등이 있다(표 7).

표 7. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	20 μL, 200 μL, 1 000 μL	검정곡선, 시료분석
용량플라스크	100 mL, 250 mL, 1 L, 2 L	표준액 및 이동상 조제
초음파분해기 (Ultrasonic Cleaner)	-	이동상 용매 조제
냉장고	-	검액 보관
분석용 전자저울	-	시약 조제
항온항습챔버	-	시료 조화
Vortexer	-	표준액 조제
Dry oven	-	초자 건조
Desiccator	-	초자 보관
초순수 제조장치	-	이동상 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

① 궐련 준비
▶ 담배로부터 filler만 꺼내어 분쇄하여 혼합한 후 4 mm mesh screen을 통과시켜 ISO 3402에 따라 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) % 로 궐련을 적어도 48시간에서 10일 미만 동안 항온항습 챔버에서 조화

↓

② 담배연기 포집 및 용출
▶ 조화시킨 filler를 (1 ± 0.5) g 무게를 측정하여 갈색용기에 담아 Di-water 20 mL + 추출용매 40 mL + 2N NaOH 10 mL로 용출, 진탕기로 (60 ± 2) min 교반
▶ 용기를 꺼내어 상온에 20 min 동안 방치시켜 상층액만 분리하여 차광 후 냉장 보관[최대 24시간 방치]
▶ 추출 용기로부터 적당량을 syringe filter로 여과하여 GC용 차광용기로 옮겨서 분석

↓

③ 시료 분석
▶ 0.45 μm PTFE로 필터 후 2 mL 차광용기에 옮겨 기기분석

그림 3. 시험방법 절차흐름도

② GC 조건

표 11. 분석장비 기기조건

기체 크로마토그래프(GC)	
파라미터	설정값
컬럼	CP-WAX 51 (25 m, 0.25 mm, 0.20 μm)
주입구 온도	270 ℃
헬륨 이동가스 유속	1.5 mL/min
모드(비율)	Split(10:1)
검출기	
FID	
온도	270 ℃
수소 유속	40.0 mL/min
에어 유속	450 mL/min
오븐 온도 프로파일	
온도 램프	270°C

라. 검증보고서 구성 및 내용

선택성(Selectivity), 직선성(linearity), 정밀성(precision) · 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection) · 정량한계(limit of quantification), 표준담배(3R4F) 시료분석 등으로 구성되었다.

선택성은 분석에 있어서 간섭이 될만한 물질에 이미 알고있는 농도를 첨가하여 확인하였고, 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도 범위에서 R^2 0.99 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 15 % 이내였고, 정확도는 95 ~ 101% 범위였다. 검출한계 및 정량한계는 0.2mg/mL, 0.6 mg/L 였다. 시료분석은 담배연기(3R4F) filler를 이용하여 진행하였고, 일내 실험에서는 7회 반복실험을, 일간 실험에서는 3회 반복실험을 실시하여 결과를 산출하였다.

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 04. Standard operating procedure for determination of nicotine in cigarette Tobacco filler.
2. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
3. National Standard of Canada. 1992. Preparation of Cigarettes from Cigarette Tobacco for Testing. Canadian General Standards Board. CAN/CGSB-176, 1-92
4. Health Canada. 1999. Test Method T-401. Preparation of cigarettes from packaged leaf tobacco for testing.
5. Health Canada. 1999. Official Method T-301. Determination of Alkaloids in Whole Tobacco..

⑩ 담배연기추출물(Cigarette Smoke Extract, CSE)에서의 니코틴 성분분석 연구

연구 배경

세계보건기구(WHO)의 흡연실태보고서에 따르면, 전세계적으로 흡연으로 인해 매년 700만명 이상이 사망하는 것으로 추정하고 있다(1). 특히, 담배 연기에는 유해물질인 타르, 니코틴, 일산화탄소가 다량 함유되어 있으며, 국제 암연구소(international agency for research on cancer, IARC)에 따르면 담배연기에는 약 4,700여 종의 유해물질과 약 60여가지의 발암물질이 포함되어 있다고 한다(2). 또한, 신종담배인 궐련형 전자담배, 액상형 전자담배의 배출물에서도 휘발성 유기화합물 등 다수의 유해물질이 검출되어(3,4) 담배제품사용에 따른 건강위해우려가 지속되고 있다. 이에 질병관리본부 흡연폐해실험실에서는 건강영향연구의 기반 마련을 위하여 담배배출물 추출물(Cigarette Smoke Extract, CSE)에서의 니코틴 성분 분석연구를 수행하였다.

연구 내용 및 방법

1. CSE 제조 및 니코틴 성분분석

CSE는 주류연, 부류연 등 연소 중인 궐련(그림1)을 비롯하여 담배제품에서 발생하는 배출물을 포집한 추출물로서, 담배에서의 유해물질이 녹아있다. 이에 따라 CSE를 세포에 직접 노출시켜 산화스트레스(oxidative stress) 및 세포독성(cytotoxicity) 등을 확인하는 실험연구가 국외문헌에서 확인된 바 있다(5,6).

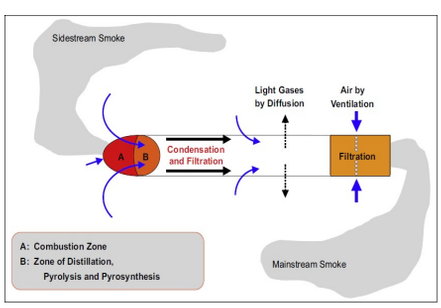


그림 1. 연소중인 담배(Thielen A et al., 2008)

CSE 제조는 Mark Taylor et al.(2016)(6) 및 식품의약품안전평가원에서 2015년에 발간한 담배분석법(Ⅰ)(7)을 참고하여 제조하였다. 또한 CSE 내 nicotine은 Mark Taylor et al.(2016)(6)를 참고하여 분석하였다. CSE를 제조하기 위해 담배 배출물 발생의 자동흡연장치(그림2)로 흡연폐해실험실 내 선형흡연장치(SM450), 회전형흡연장치(RM20H), 부류연흡연장치(LM5S) 총 3대를 핵심장비로 사용하였으며, 이중선형 및 회전형 흡연장치는 ISO17025 인정시험법(02.008 기타재료 및 제품)을 활용하였고, 부류연흡연장치는 해당 장치 매뉴얼에 따라 분석하였다.

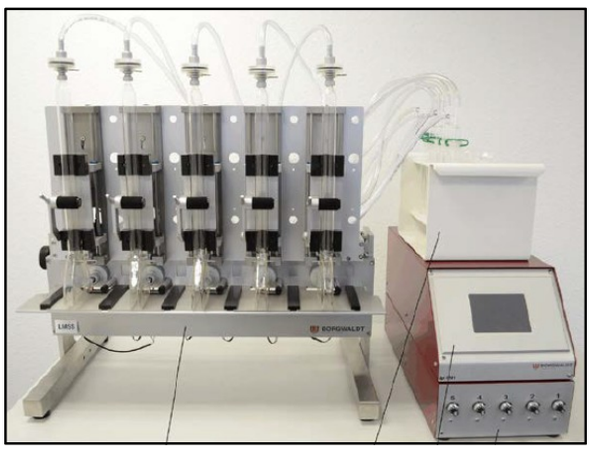


그림 2. 자동흡연장치(LM5S)

1) CSE 제조법 마련

주류연 또는 부류연 포집을 통한 CSE 제조과정은 다음 절차대로 진행하였다. 먼저, 포집 전에 실린지와 진공펌프의 활성화가 필요하여 20분 이상 워밍업(warming up)을 시켜주었고, 부류연 포집용 유리케이스(fishtail)를 위치조정하여 연소중인 담배를 감쌀 수 있도록 하였다. 그 다음 담배 주류연 및 부류연 포집시 공기 누출이 없는지 누출감지장치(leakage tester)를 통해 확인하였고, 주류연의 흡입부피가 설정조건(ISO 또는 HCI)와 동일한지 부피측정기(volumeter)로 확인하였다. 그리고 부류연을 포집할 때 규정된 속도(3 L/min)로 흡입될

수 있도록 흐름 측정기(flow meter)로 조정하였다. 세포실험에 사용할 담배연기 포집용액(PBS[46] 등)을 임핀저 안에 일정량 넣어 준비하고 튜빙(tubing)으로 흡연장치와 누출 없이 연결되도록 한 후 마지막으로 담배를 흡연장치의 홀더에 꽂고 불을 붙인 다음 담배연기가 포집용액을 통과하도록 하여 CSE를 제조하였다(그림 3).

① [흡연장치 가동준비(warming up)]
실린지(syringe)와 진공펌프(vacuum pump)가 충분히 활성화되도록 20분 이상 미리 작동시킨다.

▼

② [부류연 포집용 유리케이스(fishtail) 준비]
부류연 발생시 연소중인 담배를 감쌀 수 있도록 위치조정을 해준다.

▼

③ [누출 체크(leakage test)]
담배연기 흡입시 공기 누출은 없는지 누출감지장치(leakage tester)로 확인한다.

▼

④ [흡입부피 체크(puff volume check)]
주류연의 흡입량이 ISO조건(35 mL) 또는 HCI조건(55 mL)가 맞는지 부피측정기(volumeter)로 확인한다.

▼

⑤ [공기 흐름속도(air flow check) 조정]
부류연 포집시 일정속도(3 L/min)로 흡입될 수 있도록 흐름 측정기(flow meter)로 조정한다.

▼

⑥ [담배연기 포집용액 준비]
세포실험에 사용할 포집용액(PBS 등)을 임핀저 안에 일정량(ex. 30 mL) 넣고 튜빙으로 누출없이 흡연장치와 연결한다.

▼

⑦ [담배연기 발생(smoking) 및 CSE 제조]
담배를 홀더에 꽂고, 담배 끝에 불을 붙여 담배연기(주류연 또는 부류연)이 포집용액을 통과하도록 하여 CSE를 제조한다.

그림 3. CSE 제조 흐름도

46) 인산완충생리식염수(Phosphate-Buffered Saline)

2) CSE 내 nicotine 분석법 마련

① 시료 전처리

먼저 제조된 CSE중 일부(0.1~1.0 mL)를 취하여 정제수로 5~50배로 희석시켰다. 총 부피를 5 mL로 만든 후 내부표준물질(phenanthrene-d10, quinoline, nicotine-d4 등)을 넣은 후 염기성조건으로 만들어주기 위해 2 N 수산화나트륨을 넣어주었다. 그 다음 추출유기용매인 메틸 터 뷰틸 이터(methyl tert butyl ether, MTBE) 또는 메틸렌클로라이드(methylene chloride, MC)를 넣어준 후 5분간 250 r/min 속도로 교반(shaking) 시켜주었다. 층분리된 추출유기용매 일부를 바이알에 옮겨 담아 GC-MS[47]로 분석하였다(그림 4).

① [제조된 CSE(시료) 준비]
제조된 CSE중 일부를 취하여 정제수로 희석시켜 총 5 mL로 만들어준다.

▼

② [내부표준물질 주입]
희석된 시료(5 mL)에 내부표준물질(phenanthrene-d10 등)을 일정량(ex. 20 mg/L, 100 μL) 넣어준다.

▼

③ [수산화나트륨 주입]
시료가 염기성 조건이 되도록 2 N 수산화나트륨을 100 μL 넣어준다.

▼

④ [추출유기용매 주입]
시료 내 nicotine 성분을 추출하기 위해서 유기용매인 MTBE 또는 MC를 일정량(ex. 1~2 mL) 넣어준다.

▼

⑤ [교반 후 GC-MS 분석]
5분간 250 r/min의 속도로 교반(shaking) 후 층분리된 유기용매 일부(ex. 500 μL)를 바이알에 옮겨담아 GC-MS로 분석한다.

그림 4. CSE 전처리 흐름도

47) 가스크로마토그래피 질량분석법(Gas chromatrography- mass spectrometry)

② 기기분석

전처리한 CSE 시료를 기기분석하기 위한 GC-MS 기기조건은 표 1과 같다. 컬럼은 DB-5MS(30 m×250 μm×0.25 μm)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 50 ℃(0분 유지), 온도상승은 20 ℃/min, 최종온도는 300 ℃, 최종온도에서의 유지시간은 0분으로 설정하였으며 총 분석시간은 12.5분이었다. 분석모드는 선택된 이온 모니터링(selected Ion Monitoring)으로 물질별 특정 질량이온 값을 입력하여 감도를 높여 분석하는 방법이다. 분석항목인 nicotine은 정량이온 162, 정성이온 84이었다. 내부표준물질인 phenanthrene-d10은 정량이온 188, 정성이온 189이었고, quinoline은 정량이온 129, 정성이온 102였으며, nicotine-d4는 정량이온 166, 정성이온 136이었다(표 1).

표 1. CSE 내 니코틴 분석을 위한 기기조건

GC-MS 기기조건

▷ 주입 부피 : 1 μL
▷ 주입구 온도(℃) : 300 ℃
열전달통로 온도(℃) : 280 ℃
▷ 분할모드: 분할비율 5:1
▷ 용매흐름시간 : 3 min
▷ 컬럼 : DB-5MS (30 m × 250 μm × 0.25 μm)

▷ [GC 오븐 프로그램]
총 분석시간 : 12.5 min

초기온도(℃)	온도상승 (℃/min)	최종온도(℃)	유지시간 (min)
50	-	-	0
-	20	300	0

▷ [분석모드: 선택된 이온 모니터링(SIM)]

물질명	정량이온	정성이온
Nicotine	162	84
Phenanthrene-d10	188	189
Quinoline	129	102
Nicotine-d4	166	136

2. 시료(CSE) 적용: 니코틴 성분분석

1) 담배 준비

CSE 분석을 위해 궐련 2종(표준담배 3R4F, 저타르 시판담배), 궐련형 전자담배 1종, 액상형 전자담배 2종(A, B) 총 5종을 준비하였다.

2) 주류연 및 부류연 CSE 내 니코틴 성분분석

담배시료로 궐련 2종은 5개비, 궐련형 전자담배은 10개비의 담배를 사용하였다. 궐련 2종의 경우 주류연과 부류연의 CSE를 각각 분석하였다.

3) 담배유형별 시료 및 포집조건

담배유형으로 표준담배(3R4F) 8개, 저타르 시판담배 2개, 궐련형 전자담배 8개, 액상형 전자담배 2종(A, B)을 선정하였다. 궐련과 궐련형 전자담배 담배개비수는 각각 5개비, 10개비였으며, 액상형 전자담배의 경우 흡입횟수 10회로 설정하였다.

4) 시료 안정성(1년) 및 회수율 개선

CSE시료 내 니코틴 성분 안정성을 확인하기 위해 냉동보관한 1년전 시료 12개를 분주하여 재측정하였다. 정확도 계산법은 1년 후 측정결과를 1년전 측정결과로 나눠 백분율을 산출하였다.

현재 CSE 제조방법의 니코틴 회수율을 개선하기 위해 기존 임핀저 방법에서 필터패드 방법을 추가하였다. 니코틴은 대부분 입자상 물질로 필터패드에 포집되기 때문에 필터패드에 니코틴(액상)을 일정량 첨가한 후 포집용액에 넣어 용출시키는 방법을 적용하였다. 총3개의 샘플로 분석하였으며, 회수율계산은 회수된 니코틴 양을 첨가한 니코틴 양으로 나눈 후 백분율을 산출하였다.

연구 결과

1. 주류연 및 부류연 CSE 내 니코틴 성분 분석결과

궐련형 전자담배는 주류연 2회, 표준담배(3R4F) 및 저타르 시판담배는 주류연, 부류연 각각 1회씩 포집하였고 각 2회씩 전처리하여 분석하였다. 공시료(blank)에서는 니코틴이 거의 검출되지 않았다. 궐련형 전자담배 주류연 1번 시료는 22.39, 25.52 mg/L로 측정되었고, 2번 시료는 22.18, 26.63 mg/L로 측정되었다. 표준담배 주류연 시료는 20.36. 20.30 mg/L로 측정되었고, 부류연 시료는 79.67, 78.52 mg/L로 측정되었다. 그리고 저타르담배 주류연 시료는 25.09, 22.07 mg/L로 측정되었고, 부류연 시료는 55.24, 49.94 mg/L로 측정되었다(표 2).

표 2. 주류연 및 부류연의 CSE 내 니코틴 분석결과

분석항목 / 샘플명		Nicotine			
		담배 수	연기 유형	농도 (mg/L)	
				결과①	결과②
1	궐련형 전자담배①	10	주류연	22.39	25.52
2	궐련형 전자담배②	10	주류연	22.18	26.63
3	표준담배	5	주류연	20.36	20.30
4	표준담배	5	부류연	79.67	78.52
5	저타르	5	주류연	25.09	22.07
6	저타르	5	부류연	55.24	49.94

2. 담배유형별 CSE 내 니코틴 성분 분석결과

표준담배 분석결과, 니코틴 평균농도 14 mg/L, 흡입횟수 50, 1회 흡입당 니코틴 농도가 0.28 mg/L였다. 저타르담배의 분석결과, 니코틴 평균농도 9.5 mg/L, 흡입횟수 35, 1회 흡입당 니코틴 농도가 0.27 mg/L였다. 궐련형 전자담배는, 니코틴 평균농도 28 mg/L, 흡입횟수 120, 1회 흡입당 니코틴 농도가 0.23 mg/L였다. 액상형 전자담배는 A시료에서는, 니코틴 평균농도 2.0 mg/L, 흡입횟수 10, 1회 흡입당 니코틴 농도가 0.20 mg/L였다. B시료에서는 니코틴 평균농도 5.6 mg/L, 흡입횟수 10, 1회 흡입당 니코틴 농도가 0.56 mg/L였다(표 3).

표 3. 담배유형별 CSE 내 니코틴 분석결과

구분	니코틴 평균농도 (mg/L)	흡입횟수	1회 흡입당 니코틴 농도 (mg/L)
표준담배	14	50	0.28
저타르담배	9.5	35	0.27
궐련형 전자담배	28	120	0.23
액상형 전자담배A	2.0	10	0.20
액상형 전자담배B	5.6	10	0.56

3. 시료(CSE) 안정성(1년) 및 회수율 개선결과

① 시료안정성

니코틴 농도범위는 18.7~83.8 mg/였고, 정확도는 74.8~113 %였다(표 4).

표 4. CSE 내 니코틴 안정성(1년) 결과

내용	결과
니코틴 농도범위 (mg/L), n=12	18.7 ~ 83.8
정확도 (%)	74.8 ~ 113

② 회수율 개선 결과

궐련 기준 약 5 %의 니코틴 회수율을 약 70~80 %대로 개선하였다. 니코틴 농도범위는 22.4~24.8 mg/L로, 회수율이 74.5~82.3 %였다(표 5).

표 5. 필터패드를 활용한 추출율 개선결과

내용	결과
니코틴 농도범위 (mg/L), n=3	22.4 ~ 24.8
회수율 (%)	74.5 ~ 82.3

참고문헌

1. WHO Reprot on the global tobacco epidemic, 2017.
2. Thielen, A. et al. 2008. Tobacco smoke: unraveling a controversial subject. Experimental and Toxicologic Pathology, 60(2-3), 141-156.
3. Helen, G. S. et al. 2018. IQOS: examination of Philip Morris International's claim of reduced exposure. Tobacco control, 27(Suppl 1), s30-s36.
4. Lee, M. S. et al. 2017. Nicotine, aerosol particles, carbonyls and volatile organic compounds in tobacco-and menthol-flavored e-cigarettes. Environmental Health, 16(1), 1-10.
5. Breheny, D. et al. 2017. A novel hybrid tobacco product that delivers a tobacco flavour note with vapour aerosol (Part 2): In vitro biological assessment and comparison with different tobacco-heating products. Food and Chemical Toxicology, 106, 533-546.
6. Taylor, M. et al. 2016. E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress in vitro when compared to tobacco smoke. Toxicology mechanisms and methods, 26(6), 465-476.
7. 식품의약품안전평가원, 2015. 담배분석법(Ⅰ), 담배 및 주류연 성분 분석법.
8. Borgwaldt. 2017. Operating Instructions Sidestream Smoking Machine LM5S.
9. Joongwon Lee et al. 2018. Effects of storage conditions and cell types on the cytotoxicity of aqueous extracts of heated tobacco products aerosols, 한국독성학회 정기학술대회(poster).
10. Joongwon Lee et al. 2019. Toxic effects of airborne particulate matter and cigarette smoke extracts in human endometrial mesenchymal stem cells in vitro, 북미 환경독성화학회(poster).

⑪ Tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구

연구 배경

담배 연기는 7,000가지 이상의 화학성분이 포함하고 있으며, 그 중 최소 69가지 성분은 발암물질로 알려져 있다[1]. 세계보건기구(WHO)는 흡연이 폐암, 후두암, 구강암, 식도암 등 각종 암과 주된 사망의 주요 원인이며, 심혈관질환, 만성호흡기질환 등 다양한 만성질환의 위험요인 중 하나로 발표하였다[2].

흡연이 건강에 미치는 영향에 대한 연구결과가 늘어나면서, 흡연을 지속하면서도 담배 연기 내 발암물질 등 각종 유해성분의 노출을 줄이고 싶은 소비자의 수요도 증가하였다. 이에 따라 현재도 다양한 담배제품이 개발되고 있으며, 대표적으로 1960년대 말에서 1970년대 출현하여 순한 담배로 잘못 인식되고 있는 저타르·니코틴 담배(low tar and nicotine cigarette)가 있다[3]. 국내 흡연자를 대상으로 저타르담배에 대한 인식조사 결과에 따르면, 저타르담배 사용경험이 있는 흡연자의 62.3%가 '저타르담배가 일반 담배 보다 건강에 덜 해롭다'고 인식하고 있는 것으로 나타나, 상당수의 사람들이 저타르담배에 대해 오도된 인식을 가지고 있는 것으로 나타났다[4].

담배갑에 표기되는 타르 함량은 국제표준화기구(International Organization for Standardization, ISO)에서 제시한 시험방법(ISO법)에 따라 담배연기 중 주류연(담배필터를 통해 흡연자가 흡입하는 연기)을 측정한 결과이다. ISO법은 자동흡연장비에 담배를 물린 후 주류연을 일정한 시간과 부피로 빨아들이고, 흡입된 주류연을 장비 내부에 위치한 필터(캠브리지필터)에 통과 시키는데, 이때 필터에 걸러진 성분의 무게를 측정하는 방법이다[5].

저타르담배는 자동흡연장비에 물리는 위치인 담배 필터에 많은 공기구멍(Ventilation hole)이 뚫려있는 제품이다(그림 1). ISO법으로 필터에 공기구멍이 있는 담배를 측정하는 경우, 자동흡연장비가 주류연을 빨아들이는 순간 필터 공기구멍을 통해 흡입된 공기가 담배연기를 희석시킨다. 공기에 희석된 주류연이 자동흡연장비로 들어감에 따라 장비 내부 필터에 걸러지는 유해성분 양이 줄어들고 타르함량이 실제보다 낮게 측정되는 결과가 나타난다. 또한 담배필터의 공기구멍을 통해 공기가 들어오면서 담배가 보다 완전히 연소되기 때문에 일산화탄소, 일산화질소, 일부 알데하이드 등의 유해성분 생성이 감소하는 효과도 보고되었다[3].

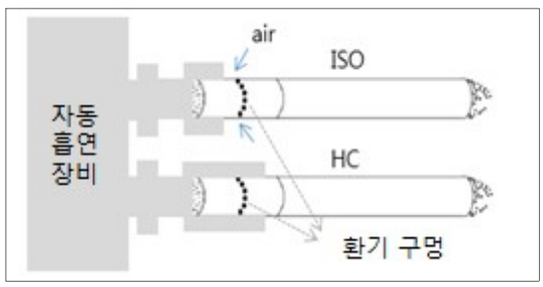


그림 1. 담배 환기 구멍으로 조절되는 주류연기 2가지 조건

그러나 자동흡연장비를 사용하는 경우와 달리, 실제 흡연하는 상황에서 담배필터의 공기구멍은 담배를 잡은 손가락이나 입술에 막히게 되어 주류연이 희석되는 효과가 없어지고, 체내로 흡입되는 타르, 니코틴의 양은 줄어들지 않게 된다. 이런 이유로 WHO는 담배 내 유해성분 측정시 담배필터의 공기구멍을 완전히 차단하고 측정하는 방법(Health Canada 시험법, HC법)을 사용하도록 권고하고 있다[6].

따라서 저타르담배에 대한 인식 제고를 위하여 국내 시판담배를 대상으로 타르 함량에 따른 담배 주류연 내 주요 유해성분 측정 결과를 제시하고자 한다.

연구내용 및 방법

국내 담배 판매율과 타르 함량 수준을 고려하여 저타르담배(1mg) 4품목, 고타르담배(5.5~6mg) 4품목을 선정하였다. 선정된 담배 8품목은 전국 소재 담배소매점 20곳에서 품목별 2갑씩 구입한 후 측정에 사용하였다. 담배 주류연을 포집하는 방법은 ISO법과 HC법을 사용하였다. ISO법은 담배 필터의 공기구멍을 막지 않고 자동흡연장비를 이용하여 담배연기를 1분에 1회, 2초 동안 35mL

부피로 빨아들인다. HC법은 담배 필터의 공기 구멍을 완전히 막은 후 진행되며, 30초에 1회, 2초 동안 55mL 부피로 빨아들인다. 두 가지 포집방법의 비교는 표 1과 같다.

담배 주류연 내 유해성분 측정은 타르, 니코틴, 카르보닐류 3종(Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein), 담배특이니트로사민 4종(NNK, NNN, NAT, NAB)을 대상으로 하였다. 이중 Formaldehyde, Acetaldehyde, NNK, NNN은 담배연기 내 주요 발암물질로 분류되어 있으며, Acrolein은 중추신경계, 호흡기 및 심혈관계 독성이 있으며, NAT, NAB는 담배에서 검출되는 경구급성독성을 보이는 성분이다[7].

유해성분은 질병관리본부 흡연폐해실험실이 국제공인 시험기관 인정(ISO/IEC 17025)을 획득한 시험법으로 측정하였다. 자동흡연장비에서 포집된 주류연 중 내부 필터에 걸러진 물질인 TPM(Total Particulate Matter)에서 니코틴과 수분을 가스크로마토그래피 (Gas Chromatography, GC)로 분석하였고[8-9], TPM 함량에서 니코틴과 수분 함량을 제외한 나머지를 타르 함량으로 계산하였다[5-7]. 카르보닐류 3종은 액체크로마토그래피(Liquid Chromatography, LC)로 분석하였고[10], 담배 특이니트로사민류 4종은 액체크로마토그래피-질량분석기(Triple Quadrupole Liquid Chromatography -Mass Spectrometry, LC-MS)를 이용하였다[11].

연구결과

국내 시판담배 8품목의 주류연에서 유해성분 9종을 분석한 결과는 표 2와 같다.

현재 담배갑에 표시되는 1개비 당 타르 함량 측정방법은 ISO법이기 때문에 실제 흡연행태를 반영한 HC법과 비교하였다. 담배 1개비 당 타르 함량은 ISO법으로 측정시 0.9~6.2mg, HC법으로 측정시 17.2~23.1mg로 나타났으며, 니코틴은 ISO법은 0.1~0.6mg, HC법은 1.4~2.0mg으로 측정되었다. 담배 1개비 당 포름알데히드, 아세트알데히드, 아크롤레인은 ISO법으로 분석시 각각 0.7~8.3㎍, 38.6~251.6㎍, 2.0~21.1㎍, HC법은 각각 65.1~76.0㎍, 1126.4~1304.8㎍, 157.6~169.8㎍이 검출되었다. 담배특이니트로사민류 4종인 NNK, NNN, NAT, NAB의 1개비 당 함량은 ISO법에 따라 분석시 각각 5.2~18.1ng, 7.8~29.3ng, 10.6~38.3ng, 1.3~4.9ng, HCI법은 각각 48.4~52.3ng, 66.3~79.6ng, 86.7~106.9ng, 10.8~13.8ng이 검출되었다.

측정된 결과를 통해 개비 당 저타르담배 대비 고타르담배의 유해물질 수준은, 타르의 경우 ISO법으로 측정시 약 7배 차이가 있었으나 HC법으로 측정할 경우 그 차이는 1.3배 수준이었고, 니코틴 함량은 ISO법에서 약 5배 차이가 보였으나, HC법에서는 1.4배로 나타났다. 카르보닐류 3종에 대한 저타르담배 대비 고타르담배의 함량 측정 결과는 ISO법에서 약 6~12배, HC법에서 1.1~1.2배 수준이었다. 담배특이니트로사민류 4종 또한 ISO법에서 약 4배 차이가 있었지만, HC법으로 측정시 1.1~1.3배 수준이었다.

고타르담배와 저타르담배 간의 유해물질 함량은 ISO법으로 측정한 경우 모든 성분에서 통계적으로 의미있는 차이가 있었으나($p<0.001$), HC법 으로 측정한 경우 타르($p<0.001$), 니코틴($p<0.001$), 아세트알데히드($p<0.01$), NAB ($p<0.05$)를 제외한 다른 측정 성분에서는 통계적 의미가 없었다(그림 2).

한편, 고타르담배 및 저타르담배의 각 유해성분 함량을 연구용 표준담배(1R6F) 함량과 비교하였다 (Figure 2). ISO법에서 표준담배 대비 타르, 니코틴의 평균함량 수준은 고타르담배 72%, 79%, 저타르담배 11%, 16% 수준이었다. 그러나 HC법으로 측정시 표준담배 대비 타르, 니코틴의 평균함량 수준은 고타르담배 112%, 116%, 저타르담배 83%, 80% 수준으로 높아졌으며, 이런 경향은 담배특이 니트로사민류 및 카르보닐류에서 동일하게 나타 났다.

표 1. 자동흡연장치 조건

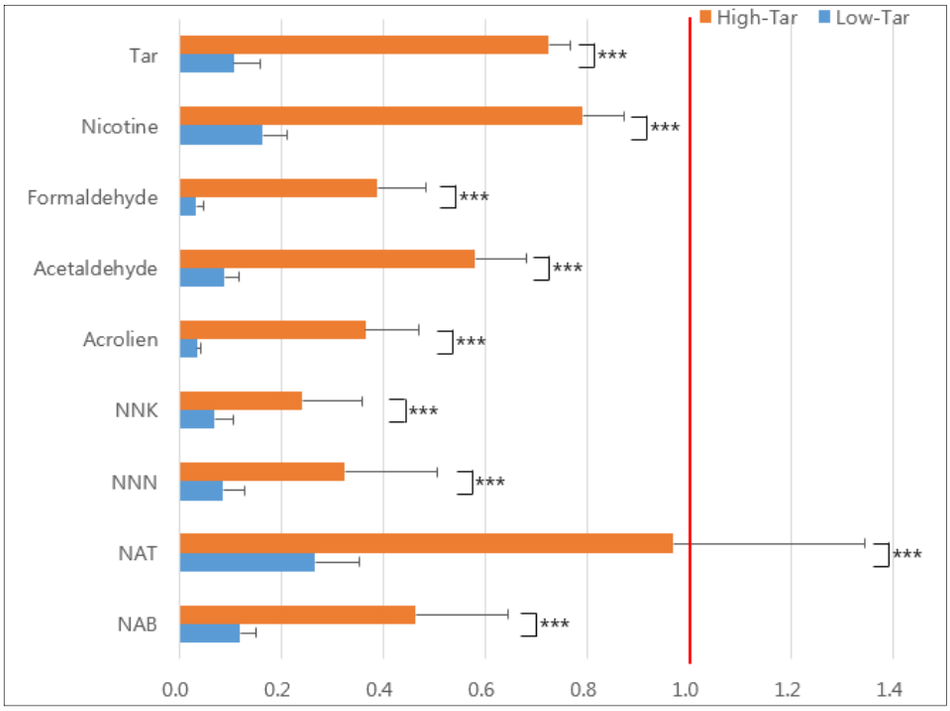
변수	ISO법	HC법
흡입량 (mL)	35 ± 0.3	55 ± 0.5
흡입 빈도 (sec)	1 puff / 60 ± 0.5	1 puff / 30 ± 0.5
흡입 지속시간 (sec)	2 ± 0.02	2 ± 0.02
환기 구멍 차단율 (%)	None	100

표 2. ISO / HC 기계흡연 조건에서의 담배연기 수율 분석

분석물질(단위)	ISO법				High tar /Low tar (%)	HC법				High tar /Low tar (%)
	Low tar		High tar			Low tar		High tar		
	Mean	SD	Mean	SD		Mean	SD	Mean	SD	
Tar (mg/cig)	0.9	(0.4)	6.2	(0.4)	688.9	17.2	(1.1)	23.1	(2.5)	134.3
Nicotine (mg/cig)	0.12	(0.03)	0.57	(0.06)	475.0	1.36	(0.20)	1.96	(0.25)	144.1
Carbonyls (μg/cig)										
Formaldehyde	0.7	(0.3)	8.3	(2.0)	1185.7	65.2	(19.4)	76.0	(13.7)	116.6
Acetaldehyde	38.6	(12.1)	251.6	(43.4)	651.8	1126.3	(204.1)	1304.8	(67.4)	115.8
Acrolein	2.0	(0.5)	21.1	(6.1)	1004.8	157.5	(17.0)	169.8	(19.2)	107.8
Tobacco-specific N-nitrosamines (ng/cig)										
NNK	5.2	(2.7)	18.1	(8.7)	348.1	48.4	(14.6)	52.3	(28.9)	108.1
NNN	7.8	(3.8)	29.3	(16.4)	375.6	66.3	(20.8)	79.6	(43.5)	120.1
NAT	10.6	(3.4)	38.3	(14.9)	361.3	86.7	(14.8)	106.9	(44.9)	123.3
NAB	1.3	(0.3)	4.9	(1.9)	376.9	10.8	(1.5)	13.8	(5.6)	127.8

* NNK, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1 - butanone; NNN, 3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine; NAT, N-nitrosoanatabine; NAB, N-nitrosoanabasine. Results are presented as mean ± standard deviation. Each values are mean of quadruplicate determinations.

(A) ISO



(B) HC

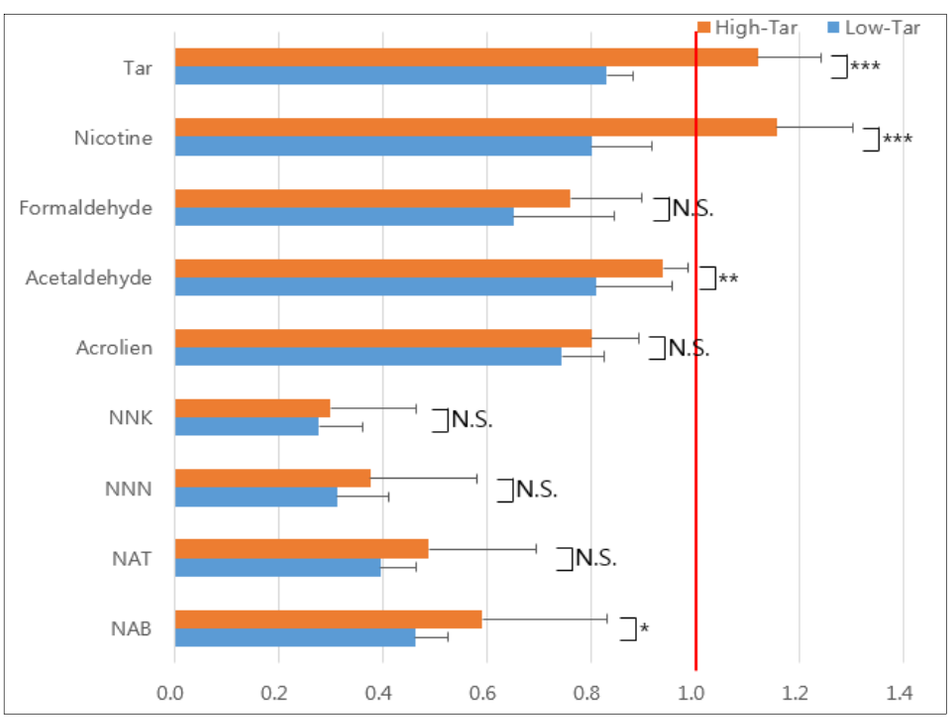


그림 2. ISO/HC 조건에 따른 유통담배/표준담배(1R6F) 주요 독성 배출물 비율

Significance: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, N.S. not significant.

상기 결과를 종합하면 주류연 내 존재하는 유해성분별 함량은 국제표준화기구에서 담배제품의 일정한 품질 관리를 위해 개발한 ISO법으로 측정시 저타르담배 대비 고타르담배에서 약 3.5~10.6배 차이를 보이지만, WHO에서 흡연자의 흡연행태를 고려하여 선호하는 측정법인 HC법에서는 저타르담배 대비 고타르담배의 유해성분별 함량은 1.1~1.4배 수준으로 나타났다.

고찰

타르 함량에 따른 국내 시판담배 8품목에서 ISO법과 HC법을 통해 실제 유해물질의 함량 수준을 비교하였다. 주류연 내 유해성분은 같은 브랜드의 담배제품일지라도 자동흡연장비를 이용한 측정조건에 따라 달라지는데, HC법으로 측정시 저타르담배와 고타르담배의 유해성분 함량은 유사한 수준을 나타내었다. 우리나라 흡연자의 흡연행태를 조사한 자료에 따르면, HC법에 의한 조건보다 1회 흡입시 많은 양의 주류연을 흡입하며(남 62.7mL, 여 53.5mL), 흡입간의 간격도 짧은 것으로 나타났다(남 8.9초, 여 8.3초)[12]. 이를 요약하면 실제 흡연시 담배 주류연 내 유해성분의 노출량은 흡연자의 담배 흡입행태에 따라 달라지며, 우리나라 흡연자는 일반적으로 WHO에서 권고하는 HC법으로 측정한 담배연기 내 유해성분의 함량보다 더 많은 양의 유해성분에 노출되고 있는 것으로 판단된다.

국제사회는 흡연으로 인한 사망 및 만성질환을 줄이기 위해 WHO 주도하에 담배규제기본협약 (Framework Convention on Tobacco Control, FCTC)을 채택하였으며, 2005년 2월 정식 국제법 으로 발효하였다. WHO FCTC 제11조(담배 제품의 포장 및 라벨)는 소비자의 오도 및 기만 예방을 위해 특정 담배제품이 다른 담배제품 보다 덜 유해하다는 잘못된 인상을 줄 수 있는 용어(저타르low tar, 라이트light, 마일드mild 등)나 표시를 포함하지 않도록 하여야 하며, 타르 등 배출물 수치를 포장 및 라벨에 표기하는 것을 규제하도록 제시하였다[13]. 이는 자동흡연장비를 이용해 측정한 타르 등 유해성분의 함량이 흡연 시 흡연자에게 노출되는 수준을 정확히 반영하지 못하며, 유해성분 함량이 낮게 측정된 담배가 높게 측정된 담배보다 덜 해롭다는 어떤 과학적 근거도 없기 때문이다 [13].

현재 FCTC 제11조에 따라 오스트레일리아, 뉴질랜드, 캐나다, 멕시코, 케냐 등의 국가는 담배갑에 주류연 내 유해성분에 대한 함량 표기를 하지 않고 있으며, '담배연기에는 발암을 일으킬 수 있는 화학성분들이 포함되어 있습니다', '담배연기에는 미세입자가 포함되어 있으며, 호흡기계에 손상을 줄 수 있습니다'와 같이 담배연기가 건강에 미치는 특성만을 담배갑에 표기하고 있다[14].

담배연기에는 최소 69가지 이상의 발암성분이 존재하며, 중추신경계, 심혈관계, 생식기계 등에 영향을 주는 다양한 독성성분이 포함되어 있다. 소비자는 흡연으로 인한 건강 폐해를 줄이기 위해 주류연 내 유해성분 함량이 낮다고 홍보되는 새로운 담배제품을 찾는 경향이 있으나, 개개인의 흡연행태에 따라 유해성분 노출량은 다를 뿐만 아니라 암을 일으킬 수 있는 발암성분에 대한 허용 가능한 노출수준은 없다고 알려져 있다. 소비자의 오해를 줄이고 담배제품에 대한 경각심을 높이기 위하여 국내에서도 담배갑 포장에 표시되는 유해성분 및 함량 표기 방법에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 국내 시판담배 중 8품목에 대한 타르함량 수준에 따른 9가지 유해성분 분석결과로서 현재 시판되고 있는 150여종이 넘는 모든 제품담배의 성분함량을 대표할 수 없으며, 해당 결과를 통해서 인체의 건강에 미치는 직접적인 위해성을 평가할 수는 없다.

참고문헌

1. U.S. Department of Health and Human Services. 2010. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking Health; Atlanta.
2. U.S. Department of Health and Human Services. 2014. The health consequences of smoking: 50 years of progress. A report of the surgeon general. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking Health; Atlanta.
3. 담배 해로움 줄이기(Tobacco Harm Reduction)의 역사와 근거, 가정의학회지. 2007.
4. 저타르 담배 등이 흡연 행태 및 금연에 미치는 영향 분석, 보건복지포럼. 한국보건사회연구원. 2008.
5. International Organization for Standardization. 2008. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
6. 담배의 성분 및 제조 형태에 따른 오도성과 위해성 분석, 한국보건사회연구원. 2007.
7. Tox-info독성정보제공시스템, 식품의약품안전평가원. 2014.
8. International Organization for Standardization. 2013. ISO 10315:2013 (E) 「Cigarettes - Determination of nicotine in smoke condensates - Gaschromatographic method」.
9. International Organization for Standardization. 2011. ISO 10362-1:2011 (E) 「Cigarettes - Determination of water in smoke condensates - Part 1: Gaschromatographic method」.
10. British American Tobacco(BAT). 2008. Group Research and Development Method. Determination of carbonyls in mainstream cigarette smoke.
11. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
12. Kim, S., & Yu, S. 2018. Smoking topography among Korean smokers: intensive smoking behavior with larger puff volume and shorter interpuff interval. International journal of environmental research and public health, 15(5), 1024.
13. WHO FCTC. 2008. Guidelines for implementation of Articles 11.
14. Tobacco Labelling Resource Centre 2013

⑫ 궐련 주류연 내 휘발성 유기화합물(VOCs) 분석법 마련연구

연구 배경

궐련담배의 배출물 형성 메카니즘은 900 ℃ 이상에서의 담배잎(tobacco) 열분해와 연소이며, 이 과정에서 6500가지 이상의 화학물질과 150가지 이상의 독성물질이 생성된다(1). 이 중 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Comounds, VOCs)인 1,3-butadiene, benzene은 1급 발암물질로 WHO 담배실험실네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시항목으로 포함되어있으며, 이외에도 2급 발암물질인 isoprene과 acrylonitrile, 3급 발암물질인 toluene이 있다. 발암성 외에도 1,3-butadiene은 호흡기독성, 생식 또는 발달독성, benzene은 심장혈관 독성, 생식 또는 발달독성, toluene은 호흡기독성, 생식 또는 발달독성, 그리고 acrylonitrile은 호흡기독성이 확인된 바 있다(3). 질병관리본부 흡연폐해실험실에서는 2016년 WHO에서 휘발성 유기화합물류에 대한 표준시험절차서가 마련되어 있지 않아 관련 시험절차서 유무를 조사하였고, 궐련 주류연 내 VOCs 5종 시험방법 절차서를 마련하여 이를 표준담배(궐련)에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

총 3종의 시험절차서가 확인되었는데 British American Tobacco(BAT)의 「주류연 내 선택된 휘발성 물질류 분석」(4), 담배관련 과학연구협력센터(CORESTA)의 「GC-MS에 의한 담배 주류연 내 선택된 휘발성 유기화합물류 분석」(5), 캐나다 보건부(Health Canada)의 「주류연 담배연기 내 1,3-butadiene, isoprene, acrylonitrile, benzene, toluene 분석」(6)이다. 이 방법들을 비교한 결과, 극저온의 methanol 유기용매로 담배연기 포집 후 가스크로마토그래피-질량분석법(Gas Chromatography-Mass Chromatrography, GC-MS)을 이용하여 분석하는 방식으로 모두 유사하였으며, 임핀저 내 용액부피가 많아 담배연기 포집에 유리하여 CORESTA방법을 선택하여 시험절차를 마련하였다(표 1).

표 1. 시험방법 비교(표)

규격명 (발간년도)	기기분석		전처리	
	분석 방식	포집 용액	포집 방법	용액부피 (임핀저별)
브리티쉬 아메리칸 토바코(BAT) 방법(2010)	GC-MS	극저온 methanol	2개 임핀저	10
담배관련 과학연구협력센터 (CORESTA) 추천방법(2014)	GC-MS	극저온 methanol	2개 임핀저	20
캐나다보건부 (Health Canada) 시험방법(1999)	GC-MS	극저온 methanol	2개 임핀저	10

2. 시료 전처리

CORESTA방법에 따른 전처리 과정으로 궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관 후(7) 궐련의 꽁초길이를 ISO 4387(8)에 따라 궐련의 입물림부에 적용되는 겉포장(overwrap)의 길이에 3 mm를 추가한 길이로 표시하였다. 회전형 흡연자동장치(RM20H, Borgwaldt)(그림 1) 흡연조건은 ISO 3308(9)과 HCI T-115[48]에 따라 국제표준화기구(ISO) 조건과 캐나다(HCI) 조건을 설정값으로 흡입부피는 ISO 35 mL, HCI 55 mL이고, 흡입간격은 ISO 60초, HCI 30초이며, 환기차단율(%)은 ISO 0 %, HCI 100 %였다(표 2). 이 흡연조건으로 담배연기를 발생시켜 담배연기를 2개의 임핀저 내 극저온 methanol 용액에 포집(희석) 후 바이알에 옮겨 담아 GC-MS로 분석하였다(그림 2)(5).

48) Health Canada Official Method T-115(1999): 주류연 담배연기 내 타르, 니코틴, 일산화탄소 분석

그림 1. 회전형자동흡연장치

표 2. 흡연조건

내용	ISO	HCI
흡입부피 (mL)	35	55
흡입간격 (s)	60	30
흡입지속시간 (s)	2	2
환기차단율 (%)	0	100

① 궐련 준비
▶ 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화
▶ 꽁초 길이 표시

↓

② 흡연장치 준비
▶ ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]시 포집환경
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
▶ 회전형 흡연장치
▶ 소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기 포집
▶ 2개의 임핀저로 담배 주류연 포집
▶ 각각의 임핀저에는 20mL의 포집용매(메탄올)을 넣음
▶ 포집시 2-propanol과 드라이아이스를 이용하여 극저온 상태 (-70℃) 유지
▶ 공시료 샘플에서도 동일한 절차로 시행함

↓

⑤ 시료 분석
▶ 2개의 임핀저의 methanol 포집용액 총 40 mL 중 1 mL와 내부표준물질(benzene-d6)을 2 mL 바이알에 넣고 기기분석

그림 2. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

전처리한 CSE 시료를 기기분석하기 위한 GC-MS 기기조건은 표 3과 같다. 컬럼은 DB-624(30 m × 0.25 mm × 1.4 ㎛)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 40 ℃(6분 유지), 온도상승은 20 ℃/min, 최종온도는 225 ℃, 최종온도에서의 유지시간은 6분으로 설정하였으며 총 분석시간은 21.25분이었다. 분석모드는 선택된 이온 모니터링(selected Ion Monitoring)으로 물질별 특정 질량이온 값을 입력하여 감도를 높여 분석하는 방법이다. 분석항목인 1,3-butadiene은 정량이온 54, 정성이온 53이었고, acrylonitrile은 정량이온 53, 정성이온 52였으며, benzene은 정량이온 78, 정성이온 77였다. 그리고, isoprene은 정량이온 67, 정성이온 68이었고, toluene은 정량이온 91, 정성이온 92였다. 내부표준물질인 benzene-d6는 정량이온 84, 정성이온 82이었다(표 3).

표 3. 궐련 주류연 내 VOCs 분석을 위한 기기조건

GC-MS 기기조건

▷ 주입 부피 : 1 μL
▷ 주입구 온도(℃) : 150 ℃
열전달통로 온도(℃) : 240 ℃
▷ 분할모드: 분할비율 10:1
▷ 컬럼 : DB-624 (30 m × 0.25 mm × 1.4 μm)

▷ [GC 오븐 프로그램]
총 분석시간 : 21.25 min

초기온도(℃)	온도상승 (℃/min)	최종온도(℃)	유지시간 (min)
40	-	-	6
-	20	225	6

▷ [분석모드: 선택된 이온 모니터링(SIM)]

물질명	정량이온	정성이온
1,3-butadiene	54	53
Acrylonitrile	53	52
Benzene	78	77
Isoprene	67	68
Toluene	91	92
Benzene-d6	84	82

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 표준담배를 시료로 활용하여 유효화 실험을 수행하였다. 유효화 항목은 선택성, 직선성, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계, 안정성 등이었다.

1) 선택성

결과판독에 영향을 주는 담배연기 추출액을 인위적으로 시료에 첨가하여 동일한 시험방법으로 분석한 후, 담배연기 추출액 첨가 전, 후의 결과에서 VOCs 5종의 피크 간섭여부를 확인하였다.

2) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분한 면적(area)을 내부표준물질(benzene-d_6) 피크을 적분한 면적(area)으로 나눈 비(ratio)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정확성은 시료 검출수준을 고려한 농도범위의 검정곡선에 범위 내 농도를 적용하여 그 값이 얼마나 일치하는지를 백분율(%)로 나타내었다. 정밀성은 단시간 사이에 동일 조건 하에서 반복 측정하는 경우의 차이 정도를 말하는 것으로 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 반복・측정하여 평가하였다. 본 실험결과의 정밀성은 일간[49](interday)에서 3일에 걸쳐 5회 반복 측정에 대한 분석값의 편차를 상대표준편차(RSD, %)로 나타내었다. 해당 시험법(전처리 등)의 절차를 고려하여 별도의 전처리과정 없이 기기분석한 결과를 제시하였다.

49) 동일한 조건하에 실험일을 달리하여 반복적인 작업 시행

4) 검출 · 정량한계

검출한계(limit of detection, LOD)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료(0.01 mg/L) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 검출한계(LOD), 편차에 10을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

5) 안정성

안정성(stability)은 분석항목인 1,3-butadiene, acrylonitrile, benzene, toluene의 농도를 8 mg/L 수준, isoprene의 농도를 100 mg/L 수준으로 하여 각 농도별 표준용액을 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 시간 경과 후에 분석하였다.

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 CORESTA방법을 참고하여 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준물질 및 검정곡선 조제방법(농도 지점 등), GC-MS 기기분석 조건(주입부피, 분할비율, 정성 · 정량이온 등) 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 그리고, 실험결과는 아래 식과 같이 포집용액의 농도(mg/L)와 부피(volume) 및 사용한 담배개비수(number of cigarettes)를 활용하여 μg/cigarette 단위로 산출하였다.

$$VOCs\ concentration(\mu g/cigarette) = \frac{VOCs\ concentration\,(mg/L) \times volume\,(mL)}{Number\ of\ cigarettes}$$

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 선택성

담배연기 추출액을 첨가한 전 · 후에 1,3-butadiene, acrylonitrile, benzene, isoprene, toluene의 크로마토그

램이 다른 매트릭스 성분들의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인하였다.

2) 직선성

1,3-butadiene, acrylonitrile, benzene, isoprene, toluene 등 VOCs 5종 모두 R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 3).

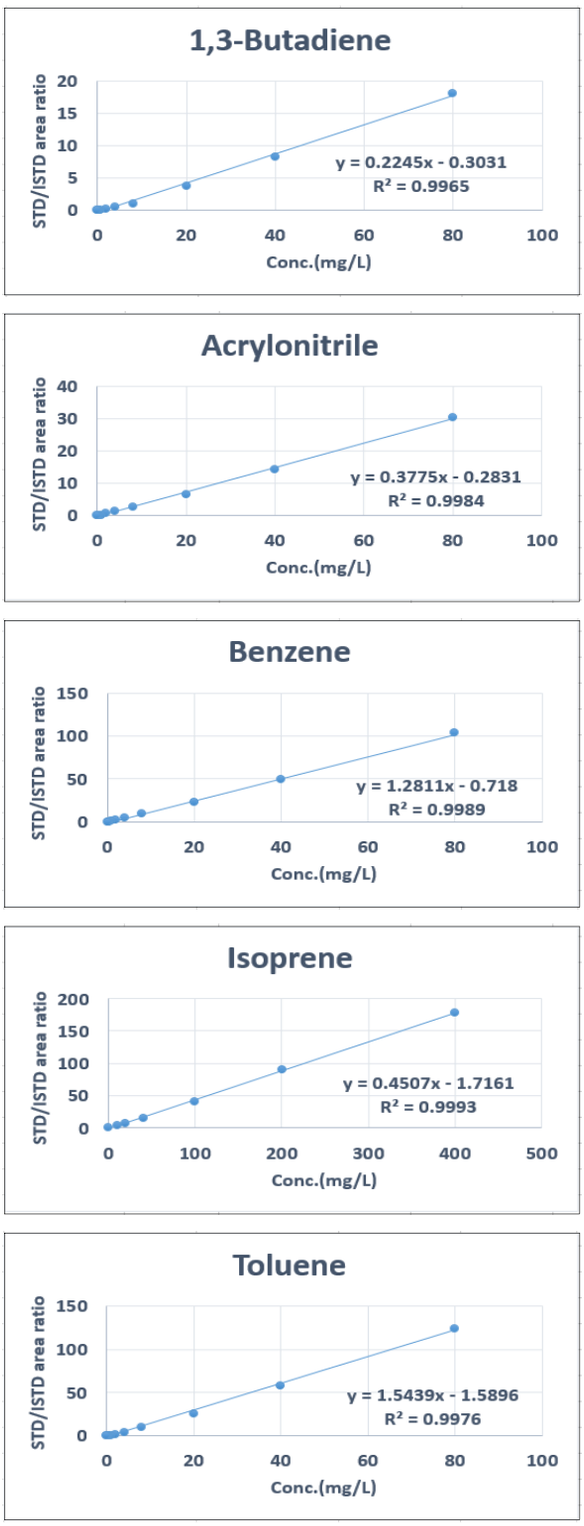


그림 3. 분석항목별 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

1,3-butadiene, acrylonitrile, benzene, toluene의 경우 검정곡선 농도범위 내 4, 40 mg/L에 대하여, isoprene의 경우 검정곡선 농도범위 내 20, 200 mg/L에 대하여 5회 반복 측정하여 총 3일에 걸쳐 일간 정밀・정확성을 확인하였다(표 4-6). 1일 일간 정밀 · 정확도의 경우 4 mg/L 농도지점에서 1,3-butadiene은 정확도 86 %, RSD 2.1 %, acrylonitrile은 정확도 102 %, RSD 4.8 %, benzene은 정확도 103 %, RSD 4.7 %, toluene은 정확도 102 %, RSD 4.1 %이었고, 20 mg/L 농도지점에서 isoprene은 정확도 94 %, RSD 1.6 %이었다. 그리고 40 mg/L 농도지점에서 1,3-butadiene은 정확도 92 %, RSD 1.6 %, acrylonitrile은 정확도 99 %, RSD 1.7 %, benzene은 정확도 102 %, RSD 2.7 %, toluene은 정확도 103 %, RSD 1.9 %이었고, 200 mg/L 농도지점에서 isoprene은 정확도 106 %, RSD 2.1 %이었다(표 4).

2일 일간 정밀 · 정확도의 경우 4 mg/L 농도지점에서 1,3-butadiene은 정확도 87 %, RSD 2.6 %, acrylonitrile은 정확도 94 %, RSD 4.1 %, benzene은 정확도 97 %, RSD 3.4 %, toluene은 정확도 93 %, RSD 4.2%이었고, 20 mg/L 농도지점에서 isoprene은 정확도 87 %, RSD 3.1 %이었다. 그리고 40 mg/L 농도지점에서 1,3-butadiene은 정확도 90 %, RSD 1.6 %, acrylonitrile은 정확도 93 %, RSD 1.8 %, benzene은 정확도 96 %, RSD 2.2 %, toluene은 정확도 97 %, RSD 1.9 %이었고, 200 mg/L 농도지점에서 isoprene은 정확도 102 %, RSD 5.7 %이었다(표 5).

3일 일간 정밀 · 정확도의 경우 4 mg/L 농도지점에서 1,3-butadiene은 정확도 85 %, RSD 5.8 %, acrylonitrile은 정확도 90 %, RSD 4.6 %, benzene은 정확도 92 %, RSD 3.9 %, toluene은 정확도 90 %, RSD 4.0 %이었고, 20 mg/L 농도지점에서 isoprene은 정확도 92 %, RSD 2.1 %이었다. 그리고 40 mg/L 농도지점에서 1,3-butadiene은 정확도 83 %, RSD 3.0 %, acrylonitrile은 정확도 100 %, RSD 3.1 %, benzene은 정확도 102 %, RSD 3.1 %, toluene은 정확도 102 %, RSD 2.8 %이었고, 200 mg/L 농도지점에서 isoprene은 정확도 99 %, RSD 1.7 %이었다(표 6).

표 4. 1일 일간 정밀·정확도

물질명		측정농도 (mg/L)	평균 ±표준편차	정확도 (%)	RSD (%)
1,3-butadiene	4	3.4, 3.4, 3.5, 3.5, 3.4,	3.4±0.1	86	2.1
	40	37, 37, 36, 37, 37	37±0.6	92	1.6
Acrylonitrile	4	3.9, 3.8, 4.2, 4.2, 4.2	4.1±0.2	102	4.8
	40	39, 40, 40, 40, 40	40±0.7	99	1.7
Benzene	4	4.0, 3.9, 4.3, 4.3, 4.2	4.1±0.2	103	4.7
	40	40, 41, 42, 41, 42	41±1.1	102	2.7
Isoprene	20	18, 19, 19, 19, 19	19±0.3	94	1.6
	200	216, 208, 210, 208, 208	211±4	106	2.1
Toluene	4	3.9, 3.9, 4.2, 4.3, 4.1	4.1±0.2	102	4.1
	40	40, 41, 42, 41, 42	41±0.8	103	1.9

표 5. 2일 일간 정밀·정확도

물질명		측정농도 (mg/L)	평균 ±표준편차	정확도 (%)	RSD (%)
1,3-butadiene	4	3.4, 3.6, 3.5, 3.3, 3.5	3.5±0.1	87	2.6
	40	35, 36, 36, 33, 34	36±0.6	90	1.6
Acrylonitrile	4	3.6, 3.7, 3.8, 3.7, 4.0	3.8±0.2	94	4.1
	40	37, 38, 37, 41, 40	37±0.7	93	1.8
Benzene	4	3.7, 3.8, 4.0, 3.8, 4.0	3.9±0.1	97	3.4
	40	38, 39, 38, 41, 41	38±0.9	96	2.2
Isoprene	20	17, 17, 17, 17, 18	17±0.5	87	3.1
	200	193, 217, 203, 201, 206	204±12	102	5.7
Toluene	4	3.6, 3.7, 3.8, 3.6, 4.0	3.7±0.2	93	4.2
	40	38, 39, 38, 42, 41	39±0.8	97	1.9

표 6. 3일 일간 정밀·정확도

물질명		측정농도 (mg/L)	평균 ±표준편차	정확도 (%)	RSD (%)
1,3-butadiene	4	3.1, 3.6, 3.5, 3.4, 3.3	3.4±0.2	85	5.8
	40	32, 34, 34, 34, 34	33±1.0	83	3.0
Acrylonitrile	4	3.3, 3.6, 3.8, 3.7, 3.6	3.6±0.2	90	4.6
	40	39, 41, 41, 42, 42	40±1.2	100	3.1
Benzene	4	3.4, 3.7, 3.8, 3.8, 3.7	3.7±0.1	92	3.9
	40	39, 41, 42, 43, 43	41±1.2	102	3.1
Isoprene	20	18, 19, 19, 18, 18	18±0.4	92	2.1
	200	194, 199, 201, 204, 200	198±3.4	99	1.7
Toluene	4	3.4, 3.6, 3.7, 3.7, 3.6	3.6±0.1	90	4.0
	40	39, 42, 41, 43, 43	41±1.2	102	2.8

4) 검출 · 정량한계

검출이 가능한 수준의 농도인 0.2 mg/L를 분석장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 VOCs 5종의 검출한계와 정량한계를 산출하였다. 1,3-butadiene의 경우 검출한계 0.015 mg/L, 정량한계 0.049 mg/L(표 7), acrylonitrile의 경우 검출한계 0.021 mg/L, 정량한계 0.066 mg/L(표 8), benzene의 경우 검출한계 0.021 mg/L, 정량한계 0.066 mg/L(표 9), isoprene의 경우 검출한계 0.019 mg/L, 정량한계 0.061 mg/L(표 10), toluene의 경우 검출한계 0.016 mg/L, 정량한계 0.050 mg/L이었다(표 11).

표 7. 1,3-butadiene의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.23	0.22	0.005	0.015	0.049
2	0.22				
3	0.22				
4	0.22				
5	0.21				
6	0.21				
7	0.22				

표 8. Acrylonitrile의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.21	0.21	0.007	0.021	0.066
2	0.21				
3	0.20				
4	0.21				
5	0.21				
6	0.21				
7	0.20				

표 9. Benzene의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.23	0.22	0.007	0.021	0.066
2	0.21				
3	0.22				
4	0.22				
5	0.23				
6	0.23				
7	0.22				

표 10. Isoprene의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.22	0.21	0.006	0.019	0.061
2	0.20				
3	0.21				
4	0.20				
5	0.22				
6	0.21				
7	0.21				

표 11. Toluene의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준 편차 (mg/L)	검출 한계 (mg/L)	정량 한계 (mg/L)
1	0.22	0.21	0.005	0.016	0.050
2	0.21				
3	0.21				
4	0.22				
5	0.22				
6	0.22				
7	0.21				

5) 안정성

검출된 피크 면적을 통해 시간경과에 따라 지속적으로 같은 농도가 유지되는지를 분석한 결과, VOCs 5종 모두 최소 24시간동안은 안정적인 것으로 확인되었다. 1,3-butadiene은 평균 99 %, acrylonitrile은 평균 102 %, benzene은 평균 101 %, isoprene은 평균 99 %, toluene은 평균 100 %였다(표 12).

2. 시료분석 결과

표준담배 1종(1R6F)을 대상으로 ISO흡연조건에서 일간 실험한 결과, 1,3-butadiene은 1일 평균 45.1 ㎍/cigarette, RSD 3.5 %, 2일 평균 46.9 ㎍/cigarette, RSD 5.1 %, 3일 평균 36.2 ㎍/cigarette, RSD 6.9 %이었고, acrylonitrile은 1일 평균 7.9 ㎍/cigarette, RSD 3.7 %, 2일 평균 7.8 ㎍/cigarette, RSD 3.0 %, 3일 평균 8.1 ㎍/cigarette, RSD 2.3 %이었으며, benzene은 1일 평균 42.0 ㎍/cigarette, RSD 3.7 %, 2일 평균 43.5 ㎍/cigarette, RSD 6.7 %, 3일 평균 42.8 ㎍/cigarette, RSD 4.3 %이었다. 그리고, isoprene은 1일 평균 294.4 ㎍/cigarette, RSD 2.9 %, 2일 평균 321.0 ㎍/cigarette, RSD 6.2 %, 3일 평균 282.3 ㎍/cigarette, RSD 8.6 %이었고, toluene은 1일 평균 48.5 ㎍/cigarette, RSD 9.2 %, 2일 평균 47.1 ㎍/cigarette, RSD 10.0 %, 3일 평균 56.4 ㎍/cigarette, RSD 3.2 %이었다(표 13).

HCI흡연조건에서 일간 실험한 결과, 1,3-butadiene은 1일 평균 80.0 ㎍/cigarette, RSD 14.4 %, 2일 평균 103.4 ㎍/cigarette, RSD 13.7 %, 3일 평균 89.9 ㎍/cigarette, RSD 2.7 %이었고, acrylonitrile은 1일 평균 20.2 ㎍/cigarette, RSD 6.8 %, 2일 평균 18.5 ㎍/cigarette, RSD 4.9 %, 3일 평균 19.6 ㎍/cigarette, RSD 4.5 %이었으며, benzene은 1일 평균 89.7 ㎍/cigarette, RSD 6.5 %, 2일 평균 89.5 ㎍/cigarette, RSD 4.5 %, 3일 평균 86.7 ㎍/cigarette, RSD 4.5 %이었다. 그리고, isoprene은 1일 평균 685.9 ㎍/cigarette, RSD 4.9 %, 2일 평균 600.1 ㎍/cigarette, RSD 4.2 %, 3일 평균 702.2 ㎍/cigarette, RSD 8.9 %이었고, toluene은 1일 평균 124.1 ㎍/cigarette, RSD 11.4 %, 2일 평균 134.5 ㎍/cigarette, RSD 7.1 %, 3일 평균 122.5 ㎍/cigarette, RSD 8.4 %이었다(표 14).

표 12. 분석항목별 안정성 결과

물질명	주입시간, %							평균 (%)
	0 시간	4 시간	8 시간	12 시간	16 시간	20 시간	24 시간	
1,3-butadiene	100	91	89	89	86	90	90	91
Acrylonitrile	100	101	103	103	103	103	104	102
Benzene	100	101	101	101	101	101	102	101
Isoprene	100	99	99	99	99	98	96	99
Toluene	100	102	104	102	91	101	101	100

※ 0 시간(첫 주입시간)을 100%로 가정하여 계산

표 13. 표준담배(1R6F)의 ISO조건 분석결과

단위 : μg/cigarette

구분 \ 물질명		1,3-Butadiene	Acrylonitrile	Benzene	Isoprene	Toluene
1일 (n=7)	평균	45.1	7.9	42.0	294.4	48.5
	표준편차	1.6	0.3	1.6	8.5	4.5
	RSD(%)	3.5	3.7	3.7	2.9	9.2
2일 (n=3)	평균	46.9	7.8	43.5	321.0	47.1
	표준편차	2.4	0.2	2.9	19.8	4.7
	RSD(%)	5.1	3.0	6.7	6.2	10.0
3일 (n=3)	평균	36.2	8.1	42.8	282.3	56.4
	표준편차	2.5	0.2	1.9	24.1	1.8
	RSD(%)	6.9	2.3	4.3	8.6	3.2

표 14. 표준담배(1R6F)의 HCI조건 분석결과

단위 : μg/cigarette

구분 \ 물질명		1,3-Butadiene	Acrylonitrile	Benzene	Isoprene	Toluene
1일 (n=7)	평균	80.0	20.2	89.7	685.9	124.1
	표준편차	11.5	1.4	5.8	33.6	14.1
	RSD(%)	14.4	6.8	6.5	4.9	11.4
2일 (n=3)	평균	103.4	18.5	89.5	600.1	134.5
	표준편차	14.2	0.9	4.1	25.3	9.5
	RSD(%)	13.7	4.9	4.5	4.2	7.1
3일 (n=3)	평균	89.9	19.6	86.7	702.2	122.5
	표준편차	2.4	0.9	3.9	62.4	10.3
	RSD(%)	2.7	4.5	4.5	8.9	8.4

3. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: (KDCA-M-13) GC-MS를 이용한 담배 주류연 내 휘발성 유기화합물 5종 분석

나. 제개정일: 2020.12.31.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)' 를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관 시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버[ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ± 3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관한다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품(유도체화 물질 포함)을 사용하고, 그 외는 HPLC용 또는 정량분석용 시약을 사용한다(표 15). 표준물질 사용 시 유효기간을 확인하고 사용한다.

표 15. 시약 등 목록

연번	시약명
1	1,3-Butadiene
2	Benzene
3	Benzene-d6
4	Isoprene
5	Toluene
6	Toluene-d8
7	Acrylonitrile
8	Methanol
9	2-propanol
10	Dry ice

③ 조제용 시약

1차 표준용액의 경우, 표준물질들은 각각 약 50 mg ~ 350 mg이 되도록 각각의 10 mL 부피플라스크 안에 직접 넣어 저울로 측정하고 메탄올로 표선까지 채운 다음 마개를 하고 플라스크를 흔들어서 제조살 수 있다. 단, 저울로 측정 후 바로 마개를 하여 분석 물질의 손실을 막는다. 표준물질의 양이 적을 경우, 소량의 표준물질에 자동피펫으로 메탄올일정량 적게 넣어 고농도 1차 표준용액을 제조할 수 있다. 제조시마다 해당 물질의 순도(purity)를 고려하여 농도를 계산한다. 이 용액은 갈색 바이알에 되도록 공기층이 남지 않도록 넣은 다음 밀봉하여 냉동고(freezer)에서 보존하고, 12 개월 이내에 사용한다. 단, 2차 표준용액을 만들기 위해 개봉할 경우 뚜껑이 연 시간을 최소한으로 하고 바로 밀봉하여 냉동보관(-20 ℃)한다. 고농도인 1차 표준물질일지라도 분석 전 감도 확인과정에서 이전의 intensity보다 20 %이상의 감도 저하가 발견되면 반드시 다시 제조하여 사용하여야 한다. 1차 표준용액을 직접 제조하거나 시중에서 제조하여 판매하는 표준용액을 구입하여 사용할 수 있으며, 특히 끓는점이 낮은 1,3-butadiene는 되도록 인증된 농도가 표기된 표준품을 구입하여 사용한다.

2차 표준용액의 경우, 각각의 10 mL 부피플라스크에 반 정도 메탄올을 넣고, 해당 물질의 1차 표준용액(2.3.1) 1.0 mL을 각각 넣고 메탄올로 표선까지 채운 다음 마개를 하고 플라스크를 흔들어서 혼합하여 제조한다. 이 용액은 가능한 갈색 바이알에 공기층이 남지 않도록 넣은 다음 밀봉하여 냉동고(freezer)에서 보존하고, 제조 후 4주 이내에 사용한다. 단, 끓는점이 낮은 1,3-butadiene, isoprene의 경우 특별히 휘발되어 손실되는 것을 고려하여 유효기간이 확보된 ampoule(ex. 200 mg/L in MeOH) 개봉 후 1주일 이내에 사용한다. 분석 전 기기분석을 통해 감도가 낮아지면 다시 제조하여 사용한다.

내부표준용액(benzene-d6 등)의 경우, 제조하여 판매하는 내부표준용액을 구입하여 사용

하거나 희석하여 사용하고 냉동고(freezer)에 보존한다. 이 용액은 갈색 바이알에 되도록 공기층이 남지 않도록 넣은 다음 밀봉하여 냉동고(freezer)에서 보존하고, 농도(감도)를 고려하여 12개월 이내에 사용한다. 분석 전 기기분석을 통해 감도가 낮아지면 다시 제조하여 사용한다.

검정곡선 표준용액 준비시, 검정곡선 작성을 위해 분석항목별 제조된 표준용액(선택 농도) 1.5 mL을 amber glass autosampler vials에 넣고 parafilm으로 감싼 후 냉동고(freezer)에 보관한다. 가능하다면 혼합하여 사용해도 무방하다. 검정곡선 범위 내 농도 1개 point는 추가적으로 더 만들어 GC를 작동시킬 때 GC 시스템이 기능을 제대로 하는지 QC(Quality Control)로 사용한다.

2) 장치 및 장비

주요장비인 GC system(Agilent 7890B와 유사한 기종), MS system으로 기기분석하고, 회전형 자동흡연장치(Borgwaldt / RM20H와 유사한 기종) 또는 선형자동흡연장치(Cerulean / SM450)로 담배연기를 포집할 수 있다.

보조장비 목록으로 피펫, 초저온 냉동고, 냉장고, 분석용 전자저울, 볼텍서, 오븐, 데시게이터, 초순수제조장치 등이 있다(표 16).

표 16. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	20P, 200P, 1000P, 5000P	시약 제조
초저온 냉동고	U-570	시료 보관
냉장고	LEFS-1041HRF	시약 보관
분석용 전자저울	XPE205	시약 제조
항온항습챔버	VS-9111H-150	검체 조화
Vortexer	VS-130SH	시약 제조
Dry oven	VS1202D3	초자 건조
Desiccator	DCG204	초자 보관
초순수제조장치	MILLI-Q DIRECT 8	초자 세척

3) 시험방법

① 절차흐름도

샘 플 링

ISO 8243 및 내부계획에 따라 담배확보

↓

궐련 준비

ISO 3402에 따라 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) % 로 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습챔버에서 조화
ISO 4387에 따라 꽁초 길이 표시

↓

흡연 장치 준비

ISO 3308에 따른 흡연에 대한 환경조건 및 사양
ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]
· 흡연시간 : 2.0 s ± 0.02 s
· 흡연주기 : 60[30] s ± 0.5 s
· 흡입량 : 35[55] mL ± 0.3[0.5] mL
· 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

담배연기 발생

회전형 흡연장치(선형도 가능), 필터패드 무게 확인
소모한 담배(ex. 10개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

담배연기 포집

2개의 임핀저로 담배 주류연 포집
각각의 임핀저에는 20mL의 추출용매(메탄올)을 넣음
포집시 2-propand과 dry ice를 이용하여 극저온 상태(-70℃) 유지
Blank smoke trap에서도 동일한 절차로 시행함

↓

시료 분석

GC 운영
·운반가스: 헬륨
·분석순서: 추출용액(메탄올), Blank, 표준용액(검정곡선), 샘플 순

MS 조건
·선택된 이온 모니터링

물질명	정량이온	정성이온
1,3-butadiene	54	53
Acrylonitrile	53	52
Benzene	78	77
Benzene-d6	84	82
Isoprene	67	68
Toluene	91	92
Toluene-d8	98	100

그림 4. 전처리방법 절차흐름도

② 담배 주류연 성분분석을 위한 흡연조건

표 17. 흡연조건

흡연조건	ISO	HC
흡입부피 (mL)	35 ± 0.3	55 ± 0.5
흡입지속시간 (s)	2.0 ± 0.02	2.0 ± 0.02
흡입 빈도 (s)	60 ± 0.5	30 ± 0.3
공기 속도 (mm/s)	200 ± 30	200 ± 30
환기 차단율 (%)	0	100
꽁초 길이 (mm)	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것	Filter 길이 + 8, Tip 길이 + 3 중 긴 것

③ GC-MS 조건

표 18. 분석장비 기기조건

가스 크로마토그래프(GC)	
파라미터	설정값
컬럼	DB-624 (30 m x 0.25 mm x 1.4 μm)
주입구 온도	150°C
컬럼 온도	40℃ (6분), 20℃/min to 225℃ (6분)
주입 모드	분할(Spilit)
주입 분할비율	10:1
주입 분할 흐름속도	30 mL/min
주입 부피	1 μL
검출기	
질량 분석기 검출기(MSD)	
열전달통로 온도	240 ℃
MS 소스온도	240 ℃
분석모드	SIM (or SCAN)
용매 흐름시간	컬럼에 맞게 설정
작은 질량	40.0
높은 질량	200.0

라. 검증보고서 구성 및 내용

선택성(selectivity), 직선성(linearity), 정밀도(precision) · 정확도(accuracy), 안정성(stability), 검출한계(limit of detection) · 정량한계(limit of quantification), 표준담배(1R6F) 시료 적용 등으로 구성되었다.

선택성은 결과판독에 영향을 주는 담배연기추출물을 인위적으로 시료에 첨가하여 첨가 전・후의 결과가 동일한지 확인하였고, 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상임을 확인하였다. 정밀도는 상대표준편차(RSD) 6 % 이내였고, 정확도는 83 ~ 106 % 범위였으며, 안정성은 1,3-butadiene 10 % 이내, 나머지 항목은 3 % 이내로 최소 24시간동안은 안정적인 것으로 확인하였다. 검출한계 및 정량한계는 1,3-butadiene은 0.015 mg/L, 0.049 mg/L, acrylonitrile은 0.021 mg/L, 0.066 mg/L, benzene은 0.021 mg/L, 0.066 mg/L, isoprene은 0.019 mg/L, 0.061 mg/L, 그리고 toluene은 0.016 mg/L, 0.050 mg/L였다.

표준담배(1R6F) 시료를 ISO조건으로 적용한 결과, 평균값 기준으로 1,3-butadiene은 36.2~46.9 μg/cigarette, acrylonitrile은 7.8~8.1 μg/cigarette, benzene은 42.0~43.5 μg/cigarette, isoprene은 282.3~321.0 μg/cigarette, toluene은 47.1~56.4 μg/cigarette였다. HCI조건으로 적용한 결과, 평균값 기준으로 1,3-butadiene은 80.0~103.4 μg/cigarette, acrylonitrile은 18.5~20.2 μg/cigarette, benzene은 86.7~89.7 μg/cigarette, isoprene은 600.1~702.2 μg/cigarette, toluene은 122.5~134.5 μg/cigarette였다.

참고문헌

1. Murphy, J. et al. 2018. Assessment of tobacco heating product THP1. 0. Part 9: the placement of a range of next-generation products on an emissions continuum relative to cigarettes via pre-clinical assessment studies. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 93, 92-104.
2. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
3. Food and Drug Administration. 2012. Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke: Established list.
4. British American Tobacco(BAT). 2010. Group Research and Development Method. Determination of selected volatiles in mainstream smoke.

5. CORESTA. 2014. RECOMMENDED METHOD N° 70. Determination of selected volatile organic compounds in mainstream cigarette smoke by GC-MS.
6. Health Canada, 1999. Test Method T-116 - Determination of 1,3-butadiene, isoprene, acrylonitrile, benzene and toluene in mainstream tobacco smoke.
7. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
8. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
9. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3308 「Routine analytical cigarette-smoking machine - Definitions and standard conditions」.

⑬ 담배 필러 및 담배(캡슐 포함) 주류연 내 가향성분 등 스크리닝 정성연구

연구 배경

최근 국내 캡슐담배 판매가 늘고 있는 추세이지만, 캡슐담배성분 현황 및 관련 분석에 대해 조사되지 않았다(1). 그래서 질병관리본부에서는 정책연구용역으로「국내외 캡슐담배 현황조사」를 2015.11월부터 2016.5월까지 진행하여 성분정성분석 등 캡슐성분 조사결과를 얻었고 관련 후속연구로 흡연폐해실험실에서 캡슐담배 내 캡슐성분 및 담배 필러 내 성분을 확인과, 캡슐을 깨뜨리기 전·후의 배출물 내에서의 성분 차이를 비교하였다.

연구 내용 및 방법

1. 담배 준비

캡슐담배 성분분석을 위해 캡슐담배 2종(A, B)를 준비하였으며, 담배필러 내 성분 분석을 위해 가향·무가향담배 각각 1종, 표준담배(reference cigarette) 1종, 총 3종을 준비하였다.

2. 시료 전처리

1) 캡슐담배

캡슐 성분 분석은 질병관리본부에서 2016년에 수행한 정책연구과제(1)를 참고하여 전처리를 수행하였다. 먼저 담배의 필터 팁 내 캡슐을 분리하여 시험튜브 안에 넣고 깨뜨린 후 추출용매인 메탄올 3 mL를 넣고 30분간 180 r/min으로 교반하였다. 그리고 4000 r/min으로 15분간 원심 분리하여 상등액을 0.45 μm PTFE 실린지 필터로 여과한 후 바이알에 담아 가스크로마토그래프 질량분석기(Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS)로 분석하였다.

캡슐 담배의 주류연 포집시, 입자상과 가스상 내 유기물질을 포집하는 방법을 제시한 Pang X.er all(2011)(2)을 참고하여 각 샘플당 3개비씩 사용하여, 필터패드(filter pad)와 임핀저(impinger)법을 동시에 적용하여 분석하였다. 필터패드는 캡슐 깨뜨리기 전·후의 주류연 내 입자상 물질을 포집하였고, 임핀저는 이중(dual)으로 연결하여 필터패드를 통과한 주류연 내 가스상 물질을 포집하였으며, 각각의 임핀저 안에 포집용액인 메탄올을 20 mL씩 넣고 진행하였다. 포집 후 필터패드는 추출용매인 메탄올 20 mL로 30분간 추출(180 r/min, 교반기 사용)하였고, 이중으로 연결한 임핀저의 포집용액은 하나로 합쳤다. 그 다음 각각의 추출물을 0.45 μm 폴리테트라플루오로에틸렌(polytetrafluoroethylene, PTFE) 실린지 필터로 여과한 후 바이알에 담아 GC-MS로 분석하였다.

2) 담배필러

담배필러 내 가향성분 중심의 성분분석을 위한 담배필러 내 담배 알칼로이드(tobacco alkaloids)[50]를 GC-MS로 분석하는 방법을 제시한 Lisko JG et all(2013)(3)을 참고하여 액액추출(liquid-liquid extraction, LLE) 방법으로 전처리하였다. 먼저 담배 400 mg 정도를 갈색바이알에 넣고 내부표준물질인 nicotine-methyl-d_3를 넣는다. 그 다음 수산화나트륨을 넣어 pH를 염기성으로 만든 후 추출유기용매인 메틸터부틸이터(methyl tert-butyl ether, MTBE)를 10 mL를 넣고 안정화시킨다. 밀봉 후 교반기로 10분간 혼합시켜 추출 후 MTBE 1 mL를 필터링 한 후 GC 바이알에 담아 GC-MS로 분석하였다(그림1).

50) 질소 함유 알칼리성의 유기물질로 동·식물에서 발견됨

① [샘플 준비]
담배 400 mg(± 0.5 mg) 샘플을 갈색 바이알에 넣고, 무게를 측정, 기록한다.

▼

② [내부표준물질 주입]
내부표준물질(nicotine-methyl-d_3, 500 mg/L) 50 μL를 넣고 5분정도 흡수되도록 기다린다.

▼

③ [pH 조절 및 추출용매 주입]
2N 수산화나트륨 1 mL와 MTBE(methyl tert-butyl ether) 추출용매 10 mL를 넣은 후 10분 동안 상온에서 기다린다.

▼

④ [추출 과정]
갈색 바이알 뚜껑으로 밀봉한 후 교반기로 180 r/min으로 10분동안 시료와 추출용매를 충분히 혼합시킨다.

▼

⑤ [필터링 및 GC-MS 분석]
추출 후 추출용매인 MTBE 1 mL를 0.45 μm 실린지 필터링하여 바이알에 담은 후 GC-MS 분석을 한다.

그림 1. 담배필러 전처리흐름도

3. 기기분석방법 및 시료 정성분석

전처리 과정을 포함한 GC-MS 분석과정에서 발생할 수 있는 오염정도를 확인하여 실제 시료로부터 검출되었는지 여부를 확인하기 위해 공시료 분석을 같이 실시하였는 데 공시료로 추출용매(메탄올 또는 MTBE)를 사용하였다.

1) 기기분석

① 캡슐담배

전처리한 캡슐담배(캡슐, 주류연 포집) 시료를 기기분석하기 위한 GC-MS 기기조건은 표 1과 같다. 컬럼은 DB-5MS(30 m×250 μm×0.25 μm)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 40 ℃(5분 유지), 온도상승은 10 ℃/min, 최종온도는 300 ℃, 최종온도에서의 유지시간은 15분으로 설정하였으며 총 분석시간은 46분이었다.

표 1. 캡슐담배 성분분석을 위한 기기조건

GC-MS 기기조건(캡슐담배)

▷ 주입 부피 : 1 μL
▷ 주입구 온도(℃) : 280 ℃
열전달통로 온도(℃) : 280 ℃
▷ 분할모드: 분할비율 10:1
▷ 용매흐름시간 : 0 min(없음)
▷ 컬럼 : DB-5MS (30 m × 250 μm × 0.25 μm)
▷ [GC 오븐 프로그램]
총 분석시간 : 46 min(SCAN 모드)

초기온도(℃)	온도상승 (℃/min)	최종온도(℃)	유지시간 (min)
40	-	-	5
-	10	300	15

② 담배필러

전처리한 담배필러 시료를 기기분석하기 위한 GC-MS 기기조건은 표 2와 같다. 컬럼은 DB-5MS (30 m×250 μm×0.25 μm)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 35 ℃(5분 유지), 온도상승은 10 ℃/min, 최종온도는 285 ℃, 최종온도에서의 유지시간은 1분으로 설정하였으며 총 분석시간은 31분이었다.

표 2. 담배필러 성분분석을 위한 기기조건

GC-MS 기기조건(담배필러)

▷ 주입 부피 : 1 μL
▷ 주입구 온도(℃) : 250 ℃
열전달통로 온도(℃) : 285 ℃
▷ 분할모드: 분할비율 5:1
▷ 용매흐름시간 : 0.5 min
▷ 컬럼 : DB-5MS (30 m × 250 μm × 0.25 μm)
▷ [GC 오븐 프로그램]
총 분석시간 : 31 min(SCAN 모드)

초기온도(℃)	온도상승 (℃/min)	최종온도(℃)	유지시간 (min)
35	-	-	5
-	10	285	1

2) 정성분석

GC-MS로 기기분석 후 MS 라이브러리(Library)의 데이터베이스[51]를 이용하여 시료 정성분석을 실시하였다. 정성분석은 질량패턴 MS 라이브러리 일치도(match factor)(또는 역-일치도) 결과, 80 % 이상 동일할 경우를 분석을 위한 후보물질로 정하였다.

연구 결과

1. 캡슐담배 분석결과

1) 캡슐담배 내 캡슐성분 정성결과

GC-MS법을 통해 캡슐담배 2종(A, B) 내 캡슐과 공시료를 정성분석한 결과, 피크를 보인 물질들과 MS 라이브러리의 데이터베이스와 가장 일치도가 높은 물질이 확인되었다(그림 2). 캡슐담배 A에서는 menthol, glycerol tricaprylate, 2-(decanoyloxy)propane-1,3-diyl dioctanoate, 2-(octanoyloxy)propane-1,3-diyl bis(decanoate) 등 4종, 캡슐담배 B의 경우에는 캡슐담배 A에서 피크를 보인 물질들이 모두 동일하게 확인되었고, D-limonene이 추가로 확인되었다. D-limonene은 레몬과 유사한 향을 내게 하는 첨가제이다.

2) 캡슐담배 주류연 성분 정성결과

① 캡슐담배 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 주류연 포집: 필터패드 분석 결과

GC-MS법을 통해 캡슐담배A에서의 캡슐 깨뜨리기 전후의 주류연과 공시료에 대해 정성분석한 결과 피크를 보인 물질들과 MS 라이브러리의 데이터베이스와 가장 일치도가 높은 물질이 확인되었다(그림 3). 캡슐담배 A는 캡슐을 깨뜨리기 전에 없었던 menthol 성분이 캡슐을 깨뜨린 후에 검출되었다. 검출된 menthol 성분은, 캡슐 내에 다량 함유되어 있었으며(그림 2,3), 이 외에 glycerol tricaprylate, 2-(decanoyloxy)propane-1,3-diyl dioctanoate, 2-(octanoyloxy)propane-1,3-diyl bis(decanoate) 3종은 캡슐 내에서는 확인되었지만 캡슐을 깨뜨린 전후의 주류연에서는 확인되지 않았다.

캡슐담배 B도 동일한 시험법으로 정성분석을 실시하여, 피크를 보인 물질들과 MS 라이브러리 데이터베이스와 가장 일치도가 높은 물질을 확인하였다(그림 4), 캡슐담배 B는 캡슐을 깨뜨리기 전에는 없었던 menthol과 D-limonene 성분이 캡슐을 깨뜨린 후에는 검출되었으며, menthol과 D-limonene 성분은, 캡슐 내에 다량 함유되어 있었다(그림 2,4). 이 외에 glycerol tricaprylate, 2-(decanoyloxy)propane-1,3-diyl dioctanoate, 2-(octanoyloxy)propane-1,3-diyl bis(decanoate) 3종은 캡슐담배 A와 동일하게 캡슐 내에서는 확인되었지만 캡슐을 깨뜨린 전후의 주류연에서는 확인되지 않았다.

② 캡슐담배 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 주류연 포집: 임핀저 분석 결과

GC-MS법을 통해 캡슐담배 A에서의 캡슐 깨뜨리기 전후의 주류연과 공시료에 대해 정성분석한 결과 피크를 보인 물질들과 MS 라이브러리의 데이터베이스와 가장 일치도가 높은 가스상 물질이 확인되었다(그림 5). 캡슐담배 A에서 캡슐을 깨뜨리기 전에 없었던 isoamyl acetate(banana oil)와 eucalyptol 성분이 캡슐을 깨뜨린 후에는 검출되었으며, 검출된 isoamyl acetate(banana oil), eucalyptol 성분은, 캡슐 내에 다량 함유되어 있었다(그림 3). Isoamyl acetate은 바나나와 유사한 향을 내게 하는 첨가제이고, eucalyptol은 청량한(cool) 맛을 나게 하는 첨가제이다.

캡슐담배 B도 동일한 시험법으로 정성분석을 실시하여 가장 일치도가 높은 가스상 물질이 확인되었다(그림 6,7). 캡슐담배 B는 캡슐을 깨뜨리기 전에 없었던 D-limonene과 α-pinene 성분이 캡슐을 깨뜨린 후에 검출되었다. 검출된 D-limonene, α-pinene 성분의 경우, 캡슐 내에 다량 함유되어 있다.(그림 4) D-limonene은 레몬과 유사한 향을 내게 하는 첨가제이고, α-pinene은 상쾌한 향을 내게 하는 첨가제이다.

51) 화학물질별 고유한 질량패턴 정보를 통해 식별을 지원하는 참조 데이터의 집합

3) 정성결과 종합

캡슐담배 2종에 대한 정성분석 결과, 2종 모두에서 menthol이 검출되었고 이 외에도 담배종류별 고유의 향과 맛을 내게 하는 첨가제인 D-limonene, isoamyl acetate(banana oil), eucalyptol, α-pinene 등도 검출되었다.(표 3)

캡슐 깨뜨리기 전후의 주류연 성분 차이 비교결과에서는 캡슐에서 피크로 확인된 menthol, D-limonene, isoamyl acetate(banana oil), eucalyptol, α-pinene 등 5종이 모두 주류연에서도 나오는 것을 확인하였다. 검출된 물질들은 입자 크기에 따라 입자상 물질은 필터패드에, 필터패드를 통과한 가스상 물질은 임핀저에 포집되었으며 대부분 끓는점이 낮은 휘발성 물질(menthol의 경우 끓는점 104℃ 정도)이었다.

표 3. 캡슐담배 정성결과

시료 / 종류	캡슐	주류연	
		입자상	가스상
캡슐담배 A	·Menthol ·Isoamyl acetate ·Eucalyptol	·Menthol	·Isoamyl acetate ·Eucalyptol
캡슐담배 B	·Menthol ·D-limonene ·α-pinene	·Menthol ·D-limonene	·D-limonene ·α-pinene

2. 담배필러 분석결과

담배(표준담배 1종, 무가향 1종, 가향 1종)의 필러 내 유기물질 스크리닝 분석결과, 향 성분으로 알려져있는 methyl isovalerate, benzyl alcohol, methyl benzoate, phenylethyl alcohol, dihydro-γ-terpineol, p-anisyl alcohol, triacetrin 등 7종을 확인하였다. 표준담배의 필러에서는 methyl benzoate, triacetin 등 2종이 확인되었고, 무가향담배의 필러에서는 methyl benzoate, phenylethyl alcohol, triacetin 등 3종이 확인되었으며, 가향담배의 필러에서는 dihydro-γ-terpineol, p-anisyl alcohol 등 2종이 확인되었다.

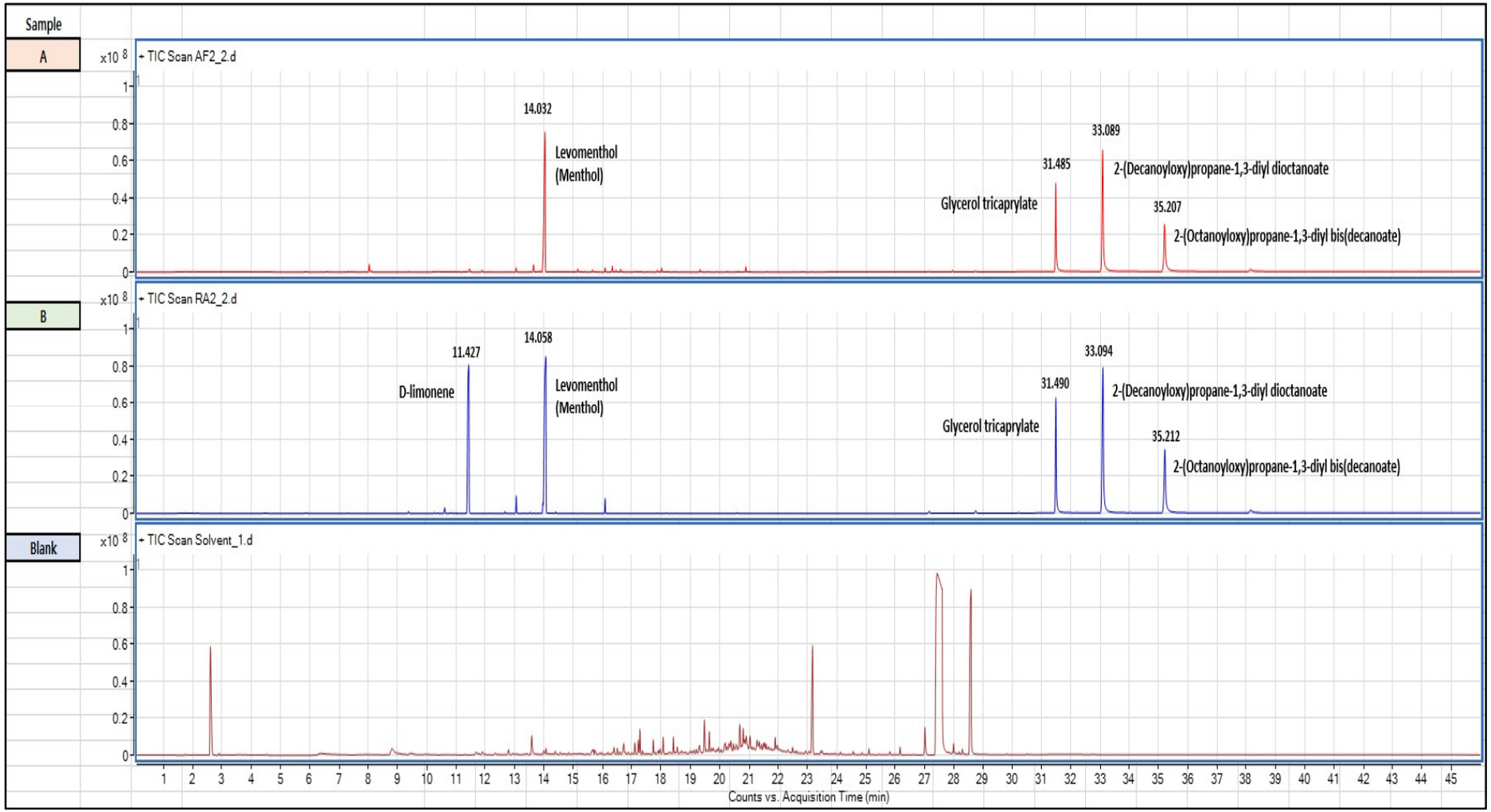


그림 2. 캡슐담배 2종(A, B) 내 캡슐성분 크로마토그램

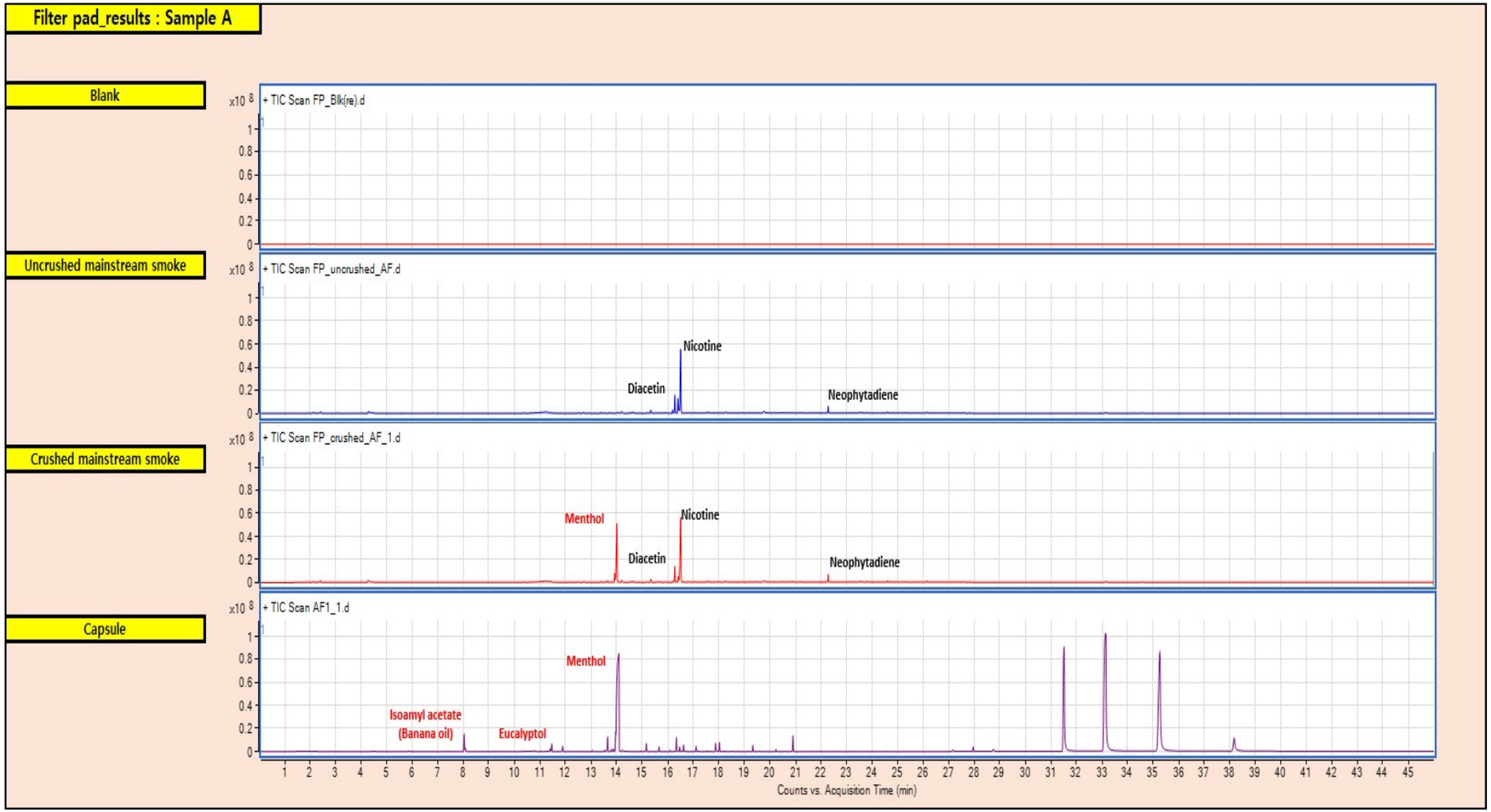


그림 3. 캡슐담배(A) 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 필터 패드에 포집된 주류연 성분 및 캡슐 성분 크로마토그램

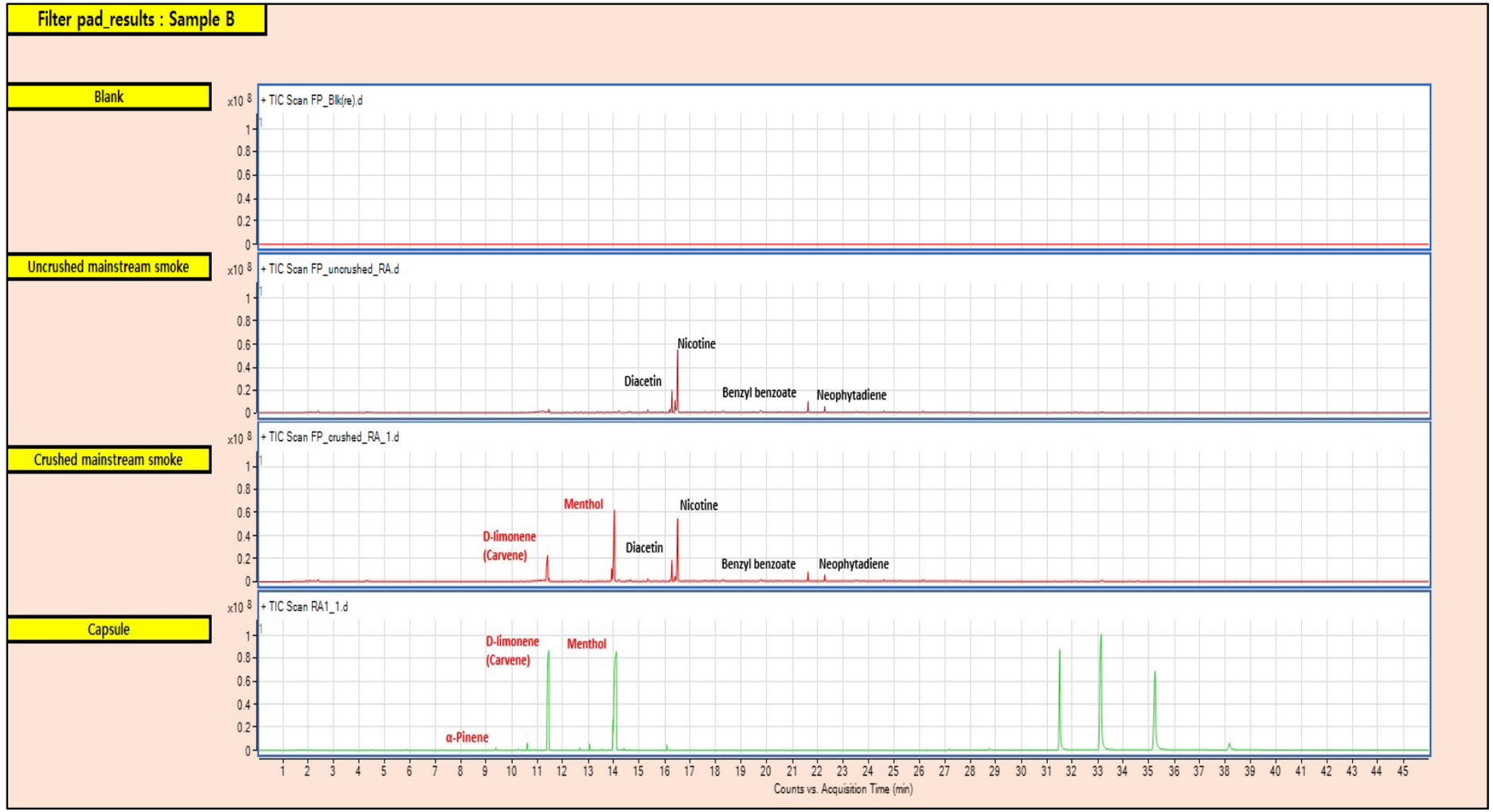


그림 4. 캡슐담배(B) 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 필터 패드에 포집된 주류연 성분 및 캡슐 성분 크로마토그램

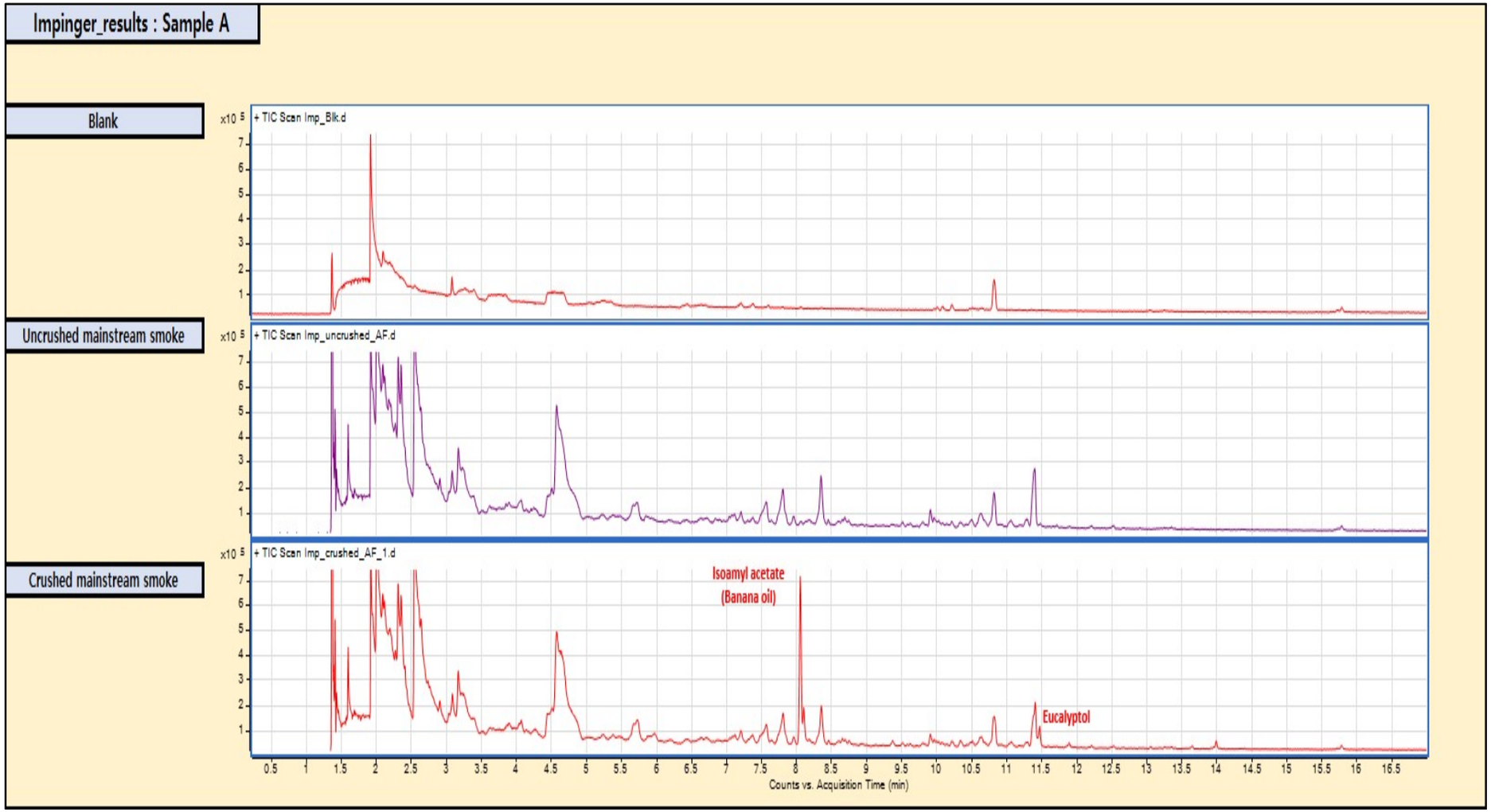


그림 5. 캡슐담배(A) 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 임핀저에 포집된 주류연 성분 크로마토그램

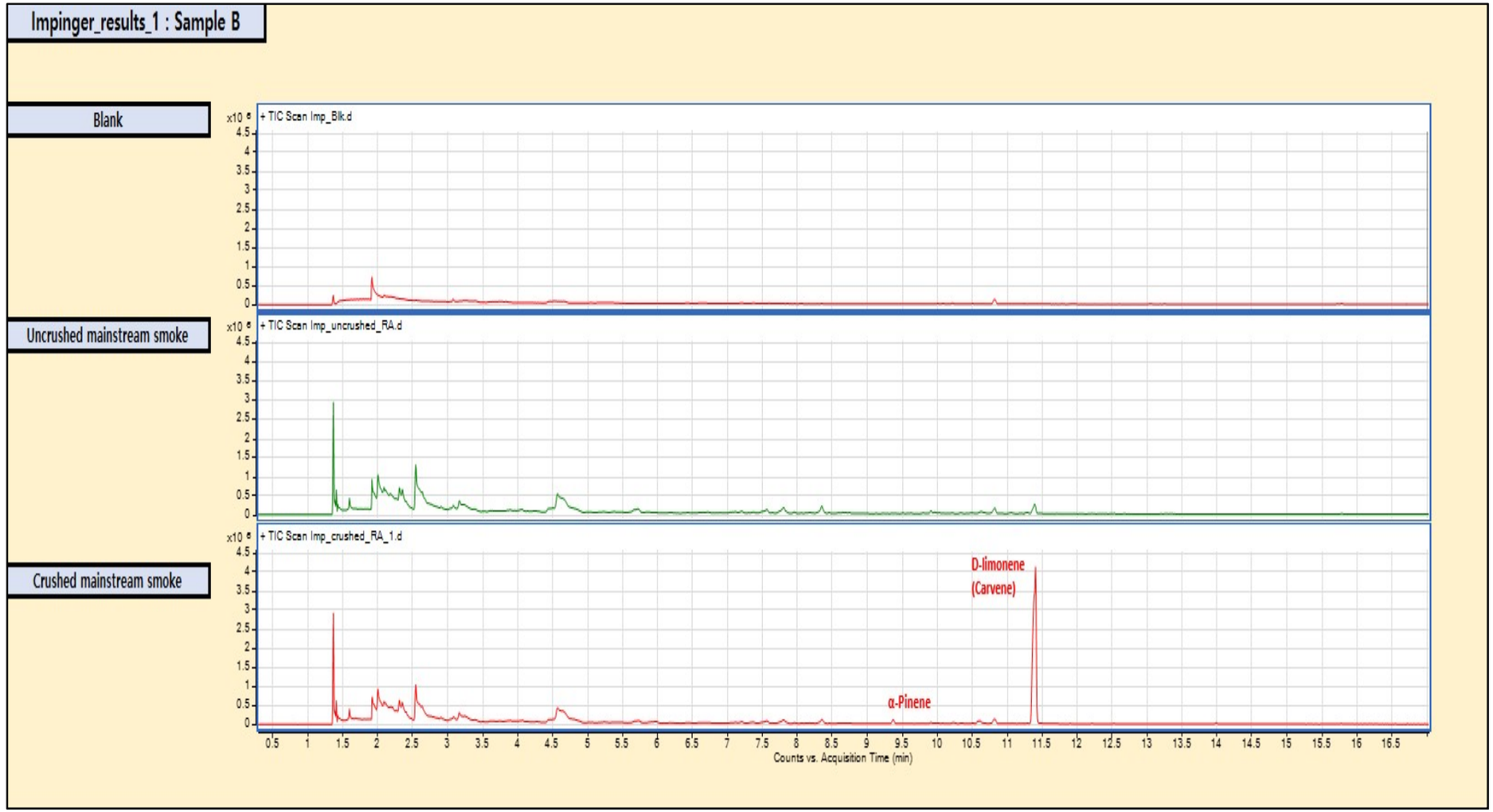


그림 6. 캡슐담배(B) 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 임핀저에 포집된 주류연 성분 크로마토그램

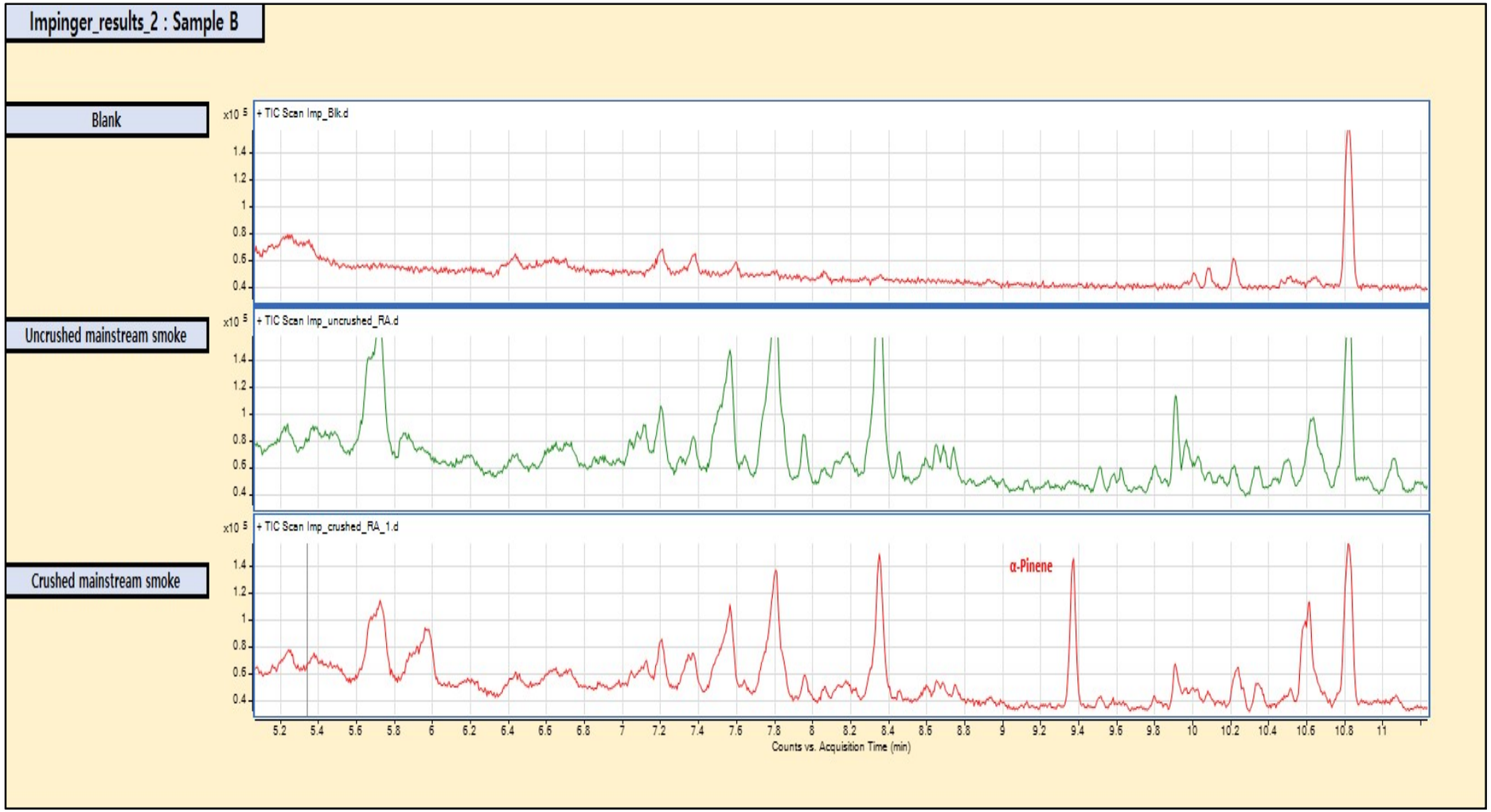


그림 7. 캡슐담배(B) 내 캡슐 깨뜨리기 전후의 임핀저에 포집된 주류연 성분 ‘α-pinene’ 확대 크로마토그램

참고문헌

1. 권경희, 국내외 캡슐담배 현황조사, 질병관리본부, 2016.
2. Pang, X., & Lewis, A. C. 2011. Carbonyl compounds in gas and particle phases of mainstream cigarette smoke. Science of the total environment, 409(23), 5000-5009.
3. Lisko, J. G. et al. 2013. Application of GC-MS/MS for the analysis of tobacco alkaloids in cigarette filler and various tobacco species. Analytical chemistry, 85(6), 3380-3384.

⑭ 액상형 전자담배 배출물 내 알데히드류 시험법 개선연구

연구 배경

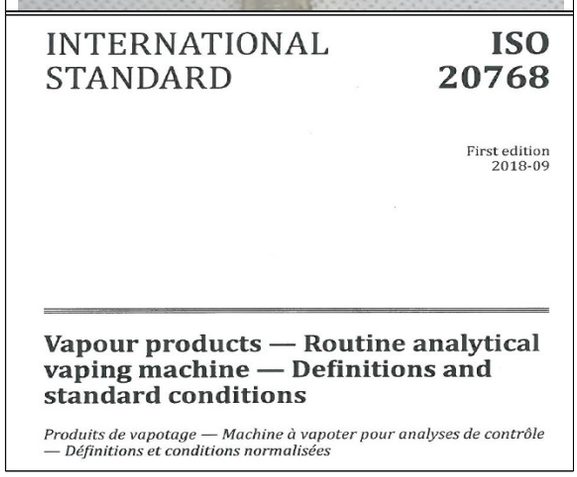
쥴(JUUL)을 비롯하여 액상형 전자담배와 같은 신종담배가 지속 도입되고 있어 담배제품별 배출물 흡입으로 인한 인체영향을 파악하기 위해 성분의 종류 및 양에 대한 정보가 필요하다. 액상형 전자담배는 250 ℃에서 액상을 기화(vaporisation) 시켜 배출물을 발생시키며(1), Farsalinos KE et al.(2018)에서는 높은 온도에서 액상형 전자담배를 사용했을 경우 등에서는 퍼프(puff)당 formaldehyde, acetaldehyde, acrolein의 배출양이 증가되는 것이 확인된 바 있다(2).

따라서 2019년도에 개발한 궐련담배 주류연 내 알데히드류 동시분석법(3)을 개선하여 액상형 전자담배의 배출물 내 알데히드류도 분석가능하도록 확대적용을 위한 시험법 개선연구를 하고자 한다. 해당 시험법 개선을 통해 담배유형별(궐련, 액상형 전자담배 등) 배출물 내 알데히드류 분석이 가능할 것이다.

연구 내용 및 방법

1. 시험방법 절차서 내용보완

시료대상을 궐련의 주류연에서 담배제품의 배출물로 확대적용하기 위해 '주류연(mainstream smoke)'을 '배출물(emission)'으로 수정하였다. 그리고 '담배' 용어를 액상형 전자담배가 포함되도록 수정하였고, '배출물'의 용어도 추가하였다. 신종담배 대상 실험조건이 충족되기 위해서는 액상형 전자담배 쥴의 경우, 쥴 전용홀더와 액상형 전자담배 배출물 포집을 위한 국제규격(국제표준화기준(ISO) 등)이 필요하였다. 따라서, 전용홀더와 ISO 표준문서(ISO 20768)(4)를 준비하였고(그림 1), 해당내용도 실험절차 및 관련문서에 추가하였다. 그리고 기존 전처리과정을 보완하였다.


INTERNATIONAL STANDARD

ISO 20768

First edition 2018-09

Vapour products — Routine analytical vaping machine — Definitions and standard conditions

Produits de vapotage — Machine à vapoter pour analyses de contrôle — Définitions et conditions normalisées

그림 1. 쥴 전용홀더(위) 및 ISO 20768 문서(아래)

ISO 20768 문서에는 「액상형 전자담배-일상적 분석 베이핑 기계 - 정의 및 표준조건(Vapour products - Routine analytical vaping machine - Definitions and standard conditions)」(2018)에 대해 작성되어 있고, 이 문서를 기준으로 선형흡연장치 내 흡연조건 등을 설정하여 배출물 포집을 진행하였고, 흡입부피는 캐나다 조건(HCI)과 동일한 55 mL, 흡입간격도 캐나다조건과 동일한 1분에 2회인 30초, 흡입지속시간의 경우 ISO와 HCI조건의 경우 모두 2초이지만 액상형 전자담배 포집시에는 3초를 설정하였다. 그리고 흡입 프로파일의 경우 ISO와 HCI조건의 경우 종형태(bell shape)이지만 액상형 전자담배 포집시에는 직사각형 형태로 설정하였다(4)(표 1).

표 1. 액상형 전자담배 포집조건(ISO 20768)

구분	액상형 전자담배
흡입부피 (mL)	(55 ± 0.6) mL
흡입간격 (s)	(30 ± 0.5) s
흡입 지속시간 (s)	(3 ± 0.1) s
흡입 프로파일	직사각형 형태 (Rectangular shape)

2. 알데히드류 18종 안정성 확인

분석항목은 담배 및 담배연기 내 해롭거나 잠재적으로 해로운 구성성분 리스트(FDA, 2012)(5)에서 제시한 acetaldehyde, acrolein, crotonaldehyde, formaldehyde, propanal를 비롯하여 동시분석이 가능한 알데히드류를 포함시켜 총 18종이다(표 2)(3). 분석항목의 구조형태에 따라 ① 이중결합 등이 있는 불포화형태인 acrolein, crotonaldehyde, 3-methyl-2-butenal ② 지방족(aliphatic) 형태인 formaldehyde를 비롯하여 선형(linear) 탄소갯수에 따라 acetaldehyde ~decanal ③ 포화된 형태이면서 가지달린 알데히드 형태인 isobutyraldehyde, 2-methylbutyraldehyde ④ 벤젠 고리가 들어있는 방향족 형태인 benzaldehyde, piperonal ⑤ 산소가 포함된 고리가 들어있는 헤테로고리 형태인 furfural 등 5가지 그룹으로 나누어 볼 수 있다.

각 분석항목별 유도체화반응을 통해 생성된 물질들은 구조적 형태가 다르고 물리·화학적 성질도 달라 각기 시간의존(time-dependent) 안정성이 다를 수 있다. 그러므로 시험법 유효화 항목 중 하나인 안정성(stability) 시험을 추가로 수행하였다. 안정성이 확인되어야 반응 후 물질 양에 대한 신뢰성을 높일 수 있다.

표 2. 분석항목(알데히드류) 18종 목록

연번	CAS no.	분석항목
1	50-00-0	Formaldehyde
2	75-07-0	Acetaldehyde
3	123-38-6	Propanal
4	123-72-8	Butanal
5	110-62-3	Pentanal
6	66-25-1	Hexanal
7	111-71-7	Heptanal
8	124-13-0	Octanal
9	124-19-6	Nonanal
10	112-31-2	Decanal
11	107-02-8	Acrolein
12	100-52-7	Benzaldehyde
13	4170-30-3	Crotonaldehyde
14	98-01-1	Furfural
15	78-84-2	Isobutyraldehyde
16	120-57-0	Piperonal
17	96-17-3	2-Methylbutyraldehyde
18	107-86-8	3-Methyl-2-butenal

연구 결과

1. 표준절차서 내용 보완

기존 표준절차서(KDCA-M-09)를 개선한 결과, 시험법 제목을 「GC-MS를 이용한 담배 배출물 내 Aldehydes 18종 시험검사법」 수정하였고, 담배의 정의를 액상형 전자담배까지 확대하였으며, 궐련의 용어를 담배로 수정한 후 적합한 홀더를 준비하도록 명시하였다. 그리고 표준문서인 ISO 20768를 추가작성하였다(표 3).

표 3. 시험법 개선 전·후 대비표

연번	개선(전)	개선(후)
1	GC-MS를 이용한 담배 주류연 내 Aldehydes 18종 시험검사법	GC-MS를 이용한 담배 배출물 내 Aldehydes 18종 시험검사법
2	3.1 담배(궐련) 궐련, 즉 담배는 연초의 잎을 원료의 전부 또는 일부로 하여 피우거나, 빨거나, 증기로 흡입하거나, 씹거나, 냄새 맡기에 적합한 상태로 제조한 것을 말한다(기획재정부, 담배사업	3.1 담배 궐련(기획재정부, 담배사업법 제2조), 액상형 전자담배(탱크형 등)를 포함하며, 궐련 주류연 형태와 유사한 배출물(에어로졸 등)을 흡입을 하여 사용하는 제품을 말한다.

	법 제2조).	(추가) 3.3 배출물(emission) 3.1에서 규정한 담배에서 흡연시 배출되어 인체에 흡입되는 물질(연기 포함)을 말한다.
3	2) 궐련 준비 - ISO 3402에 따라 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) % 로 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온 항습 챔버에서 조화	2) 담배 준비 - 궐련의 경우 ISO 3402에 따라 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로 최소 48시간에서 10일까지 항온 항습 챔버에서 조화, 그 외 담배는 적합한 홀더(holder) 준비
4	-	(추가)11.4 ISO 20768, 2018, Vapour products — Routine analytical vaping machine — Definitions and standard conditions, 2018

그리고, 반복실험시 안정적인 결과산출을 위해 기존 전처리 실험과정의 절차(순서)를 일부 보완하였다. 기존 내부표준용액, 유도체화용액, 표준용액(또는 샘플) 순서가 표준용액(또는 샘플), 유도체화용액, 내부표준용액으로 조정하였고, 유도체화용액 넣기 전후에 희석절차를 추가한 후 반응시간이 3분 이내가 되도록 명시하였다(표 4).

표 4. 전처리방법 보완 전·후 대비표

연번	보완(전)	보완(후)
1	검정곡선 및 샘플을 준비할 시 반드시 1 mL의 완충용액(5.3.2)을 넣고 난 다음 20 % 메탄올, 내부표준용액(5.3.5), 유도체화용액(5.3.3), 표준용액(5.3.7-8) 또는 샘플(포집시료) 순으로 넣는다.	검정곡선 및 샘플을 준비할 시 반드시 1 mL의 완충용액(5.3.2)을 넣고 난 다음 20 % 메탄올, 표준용액(5.3.7-8) 또는 샘플(포집시료), 유도체화용액(5.3.3) 순으로 넣고 shaking 직전에 내부표준용액(5.3.5)을 마지막으로 넣는다.
2	희석(vortex) 및 3분 반응 후 후 추출용매인 methylene chloride 0.7 mL를 넣고 1분간 shaking (250 r/min 정도)시킨다.	이 때 vortex mixer를 이용하여 유도체화용액 넣기 전·후에 1초간 짧게 희석시키고, 3분(되도록 해당시간을 넘기지 않을 것) 반응 후 추출용매인 methylene chloride 0.7 mL를 넣은 후에도 1초간 짧게 희석시킨 다음 1분간 shaking(250 r/min 정도)을 진행한다.

보완 후 전처리 과정은 pH를 12로 유지하기 위한 완충용액과 포집용액인 20 % 메탄올을 넣은 다음 희석(vortexing)시키고 검정곡선 최고농도 대비 약 3배의 유도체화용액(3-amino-1-propanethiol)을 넣었다. 희석(vortexing) 후 3분 이내로 반응시킨 후 내부표준물질인 '유도체화된 trimethylacetaldehyde'를 넣고 추출유기용매인 methylene chloride를 넣었다. 희석(vortexing) 후 1분간 교반기(shaker)에 희석 후 물층 아래의 유기용매층(methylene chloride layer)의 일부를 GC-MS 바이알 내 인서트에 넣는다. 이 때 기포가 발생되지 않도록 유의하였고, GC-MS로 분석하였다(그림 2).

① 완충용액(pH 12)
↓
② 20 % 메탄올 (표준용액 또는 시료 포함)
↓
③ 소용돌이(Vortexing) 희석 1초(짧게)
↓
④ 유도체화용액 약 3배 넣고 소용돌이(Vortexing) 희석 1초(짧게)
↓
⑤ 3분(이내) 반응 후 내부표준물질
↓
⑥ 추출용매(메틸렌 클로라이드)
↓
⑦ 소용돌이(Vortexing) 희석 1초(짧게)
↓
⑧ 1분 교반(shaking) 후 층분리, GC-MS 분석

그림 2. 보완 후 전처리 과정

2. 알데히드류 18종 안정성 확인결과

시험방법 유효성 보완을 위해 시간경과에 따른 분석항목별 감도비교를 통한 안정성(stability) 테스트를 혼합물(분석항목 18종) 10 mg/L 농도에서 실시하였다. 실험결과는 분석항목 전 항목 8시간 안정성(초기 농도대비 70~120 % 이내)이 확인되었다. 분석항목 중 3-methyl-2-butenal, piperonal 2개 항목을 제외한 모든 항목에서는 38시간(이상) 안정성이 확인되었다. 특히 ±10 % 오차 이내인 안정적인 분석항목은 formaldehyde, acetaldehyde, propanal, butanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, benzaldehyde, furfural, isobutyraldehyde, 2-methylbutyraldehyde 등 12종이었다.(표 5)

표 5. 분석항목별 안정성 결과(38시간 후)

연번	분석항목	초기농도 대비(%)
1	Formaldehyde	106
2	Acetaldehyde	108
3	Propanal	106
4	Butanal	109
5	Pentanal	112
6	Hexanal	112
7	Heptanal	106
8	Octanal	106
9	Nonanal	103
10	Decanal	93
11	Acrolein	77
12	Benzaldehyde	93
13	Crotonaldehyde	80
14	Furfural	104
15	Isobutyraldehyde	106
16	Piperonal	151
17	2-Methylbutyraldehyde	107
18	3-Methyl-2-butenal	62

3. 흡연폐해실험실 표준절차서 마련

가. 제목: (KDCA-M-09) GC-MS를 이용한 담배 배출물 내 Aldehydes 18종 시험검사법

나. 제개정일: 2019.12.31.
2020.12.31.

다. 분석방법

1) 시료 및 시약

① 시료

담배는 ISO 8243 및 내부계획에 따른 담배로서 '시험품목 관리(KDCA-P-10)'를 따른다. 시료는 구입 후 -20 ℃(또는 장기간 보관시 -70 ℃)로 보관하고, 조화 전 4 ℃에서 충분히 해동시키며, 조화를 위해 시험 실시 전 항온 항습 챔버 [ISO 3402; 온도: (22 ± 1) ℃, 상대습도: (60 ± 3) %]에 48시간 이상 보관한다. 시험시료를 조화시키기 전에 10일 이상 오래 보관할 경우 시료가 들어갈 수 있는 밀폐된 곳에 냉동보관 한다.

② 시약

시약은 시중에 판매되는 표준품을 사용하고, 그 외는 정량분석용 시약을 사용하며, 되도록 인증표준물질을 선택하고, 표준물질(Standard, STD) 사용시 유효기간을 확인하고 사용한다. 내부표준물질(Internal standard, ISTD)은 유도체화된 trimethylacet- aldehyde(CAS no. 630-19-3) 등 분석에 적합한 물질을 선택하여 적용할 수 있으며(표 6), GC-MS(기체크로마토그래프 질량분석기) 가동을 위해 초고순도 헬륨(He) 가스를 준비한다.

표 6. 시약 등 목록

연번	CAS no.	시약명
1	50-00-0	Formaldehyde
2	75-07-0	Acetaldehyde
3	123-38-6	Propanal
4	123-72-8	Butanal
5	110-62-3	Pentanal

연번	CAS no.	시약명
6	66-25-1	Hexanal
7	111-71-7	Heptanal
8	124-13-0	Octanal
9	124-19-6	Nonanal
10	112-31-2	Decanal
11	107-02-8	Acrolein
12	100-52-7	Benzaldehyde
13	4170-30-3	Crotonaldehyde
14	98-01-1	Furfural
15	78-84-2	Isobutyraldehyde
16	120-57-0	Piperonal
17	96-17-3	2-Methylbutyraldehyde
18	107-86-8	3-Methyl-2-butenal
ISTD	630-19-3	Trimethylacetaldehyde
Deriv.	7211-54-3	3-Amino-1-propanethiol

③ 조제용 시약

20 % Methanol의 경우, 1 L volumetric flask에 200 mL methanol을 넣은 후, 증류수를 넣어 1 L로 맞추며 필요에 따라 조제용량을 조절할 수 있다.

완충 용액 (pH 10 이상 염기성 조건)의 경우, 500 mL 부피플라스크에 증류수 470 mL, 2 N sodium hydroxide 30 mL, 를 넣은 후 충분히 섞어주고 pH를 확인하며 필요에 따라 조제용량을 조절할 수 있다.

유도체화용액(1-propanethiol, 3-amino-, hydrochloride, 50 000 mg/L in water)의 경우, 20 mL 갈색유리병에 순도를 고려하여 유도체화물질을 넣은 후 증류수 20 mL를 넣어 5 000 mg/L를 만드며 필요에 따라 조제농도 또는 용량을 달리할 수 있다.

Pre-내부표준용액(trimethylacetaldehyde, 10 000 mg/L in methanol)의 경우, 20 mL 갈색유리병에 순도를 고려하여 반응전 trimethylacetaldehyde를 넣고 20 % 메탄올 20 mL를 넣어 5 000 mg/L를 만들며 필요에 따라 조제농도 또는 용량을 달리할 수 있다.

내부표준용액(유도체화물질과 반응한 trimethylacetaldehyde, 50 mg/L in 20 % methanol)의 경우, 20 mL 갈색유리병에 pre-내부표준물질 0.1 mL와 유도체화용액 0.1 mL 넣은 후 20 % 메탄올 19.8 mL를 넣어 200배 희석시키고 상온에서 충분히 반응시킨 후 사용한다. 그리고 필요에 따라 조제용량을 조절할 수 있다.

농도가 진한 표준용액(stock solution)의 경우, 조제한 표준용액은 냉동고에 보관하고, 필요시 상온에서 안정화 시킨 후 사용하며 되도록 CRM(Certified Reference Materials)을 사용하고, CRM이 없는 경우 순도를 고려하여 RM을 조제한다.

검정곡선 1차 혼합 표준용액의 경우, 1차 혼합 표준용액 100 mg/L 20 mL를 조제하여 사용할 수 있다(표 7).

표 7. 혼합표준용액 100 mg/L 조제방법

Standard	CRM or RM concentration (mg/L)	Volume (mL) of CRM	Final Volume (mL)	Final concentration (mg/L)
Formaldehyde외 17종 <총 18종>	2 500	각각 0.8 <총 16.8>	20	100 <mixed>
20% Methanol	-	3.2		

검정곡선 2차 혼합 표준용액(10 mg/L in 20 % methanol)의 경우, 검정곡선 1차 혼합표준용액을 10배 희석하여 만들며 필요에 따라 일정비율 희석하여 추가 혼합표준용액을 만들 수 있다.

검정곡선 작성 시 혼합 표준용액의 경우, 검정곡선 작성을 위해 아래 표를 참고하여 1차 및 2차 혼합 표준용액을 사용하며, 분석항목별 적정 농도범위에 해당하는 검정곡선 농도 지점을 선택할 수 있다(표 8). QC(Quality control) 표준물질은 검정곡선 농도범위의 중간 농도수준 또는 시료검출 농도수준으로 정하고, 샘플 분석 시 같이 확인한다.

표 8. 검정곡선 각 농도별 사용되는 표준용액

용액 / 농도 (mg/L)	Mix STD concent ration (mg/L)	STD Spiked volume (mL)	20% 메탄올 (mL)	유도체화 용액 (mL)	Sample (mL)
0	-	0	1.000	0.15	-
0.25	10	0.025	0.975	0.15	-
0.50	10	0.050	0.950	0.15	-
1.0	10	0.100	0.900	0.15	-
2.5	100	0.025	0.975	0.15	-
5.0	100	0.050	0.950	0.15	-
10.0	100	0.100	0.900	0.15	-
Sample	-	-	-	0.15	1.000

검정곡선 검정곡선 및 샘플을 준비할 시 반드시 1 mL의 완충용액을 넣고 난 다음 20 % 메탄올, 표준용액 또는 샘플(포집시료), 유도체화용액 순으로 넣고 shaking 직전에 내부표준용액을 마지막으로 넣는다. 이 때 vortex mixer를 이용하여 유도체화용액 넣기 전・후에 1초간 짧게 희석시키고, 3분(되도록 해당 시간을 넘기지 않을 것) 반응 후 추출용매인 methylene chloride 0.7 mL를 넣은 후에도 1초간 짧게 희석시킨 다음 1분간 shaking(250 r/min 정도)을 진행한다. Shaking 후 층분리가 잘 되도록 가볍게 흔들어주고 정체시킨 후 층분리가 확인되면 아래층인 추출용매를 취한 후 기기분석한다. 이 때 물층이 들어가지 않도록 조심한다.

2) 장치 및 장비

주요GC system(Agilent 7890과 유사한 기종), mass spectrometer detector로 기기분석하고, 선형 담배 연기분석장치(Cerulean / SM450와 유사한 기종)로 담배연기를 포집한다.

보조장비 목록으로 피펫, 초저온 냉동고, 냉장고, 분석용 전자저울, 항온항습챔버, 볼텍서, 오븐, 데시게이터, 초순수제조장치 등이 있다(표 9).

표 9. 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
피펫	20P, 200P, 1000P, 5000P	검정곡선, 시료분석
초저온 냉동고	U-570	시료 보관
냉장고	LEFS-1041HRF	검액 보관
분석용 전자저울	XPE205	시약 조제
항온항습챔버	VS-9111H-150	시료 조화
Vortexer	VS-130SH	시약 및 시료 조제
Dry oven	VS1202D3	초자 건조
Desiccator	DCG204	초자 보관
초순수제조장치	MILLI-Q DIRECT 8	시약 조제

3) 시험방법

① 절차흐름도

샘 플 링

ISO 8243 및 내부계획에 따라 담배확보

↓

담배 준비

- 궐련의 경우 ISO 3402에 따라 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) % 로 최소 48시간에서 10일까지 항온 항습 챔버에서 조화, 그 외 담배는 적합한 홀더(holder) 준비
- ISO 4387에 따라 꽁초 길이 표시
  ※ 다음 3개중 가장 긴 것을 따르거나 또는 별도로 권고하는 길이로 한다: 23 mm, 필터길이 +8 mm, Overwrap 길이 +3 mm.

↓

흡연 장치 준비 및 담배연기 발생

- ISO 3308에 따른 흡연에 대한 환경조건 및 사양 ISO 흡연조건 [캐나다 흡연조건]
  · 흡연시간 : 2.0 s ± 0.02 s
  · 흡연주기 : 60[30] s ± 0.5 s
  · 흡입량 : 35[55] mL ± 0.3[0.5] mL
  · 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s
- 선형 흡연장치, 소모한 담배에 대한 puff수 기록

↓

담배연기 포집 및 시료 전처리 <vortex mixer 이용>
- 2개 임핀저 사용, 각 25 mL 20 % 메탄올 넣음 - 층분리 가능 tube에 완충용액 1 mL + 시료 1 mL, 유도체화용액 및 ISTD 일정량 넣은 후, 3분 반응시킴 - 추출용매인 methylene chloride 0.7 mL를 넣고 1분간 shaking(250 r/min 수준), 층분리 확인

↓

기기 분석
- 추출용매를 vial(insert)에 넣고 GC-MS 분석 ※ 수분이 들어가지 않도록 주의

MS 조건
·선택된 이온 모니터링

물질명	정량이온	정성이온
Formaldehyde	103	75
Acetaldehyde	117	102
Propanal	102	131
Butanal	102	145
Pentanal	102	130
Hexanal	102	173
Heptanal	102	187
Octanal	102	201
Nonanal	102	215
Decanal	102	229
Acrolein	82	129
Benzaldehyde	132	179
Crotonaldehyde	96	143
Furfural	122	169
Isobutyraldehyde	102	145
Piperonal	176	223
2-Methylbutyraldehyde	102	159
3-Methyl-2-butenal	110	157
Trimethylacetaldehyde	102	159

그림 3. 전처리방법 절차흐름도

유도체화 반응 시, 반응온도 20 ℃(상온), 반응pH 12, 반응시간 3분(되도록 3분을 넘기지 않을 것), 추출pH 12, 추출시간 1분, 추출용매 MC, 유도체화시약 양 2배 이상(분석항목 총몰수 대비)임을 고려하여 진행한다.

② GC-MS 조건

표 10. 분석장비 기기조건(Agilent 7890B/5977A MSD)

▶ GC 조건
·Column type : 30 m × 0.25 mm× 0.25 μm, DB-5MS or equivalent
·Inlet temp. : 300 ℃
·Aux temp. : 280 ℃
·Injection volume: 1 μL
·Split mode (5:1)
·Total run time : 32 min

▶ Temperature program

Time (min)	Initial temp. (℃)	Final emp. (℃)	℃/min	Hold time (min)
0.0	40	0	-	3.0
30.0	40	300	10	3.0
32.0	310	310	-	1

라. 검증보고서 구성 및 내용

선택성(selectivity), 직선성(linearity), 정밀도(precision) · 정확도(accuracy), 방법검출한계(method detection limit) · 정량한계(limit of quantification), 표준담배(1R6F, 3R4F) 시료분석 등으로 구성되었다.

선택성은 담배연기추출물로 인한 분석항목 18종의 크로마토그램 영향정도를 확인하기 위한 것으로 정성 및 정량분석을 위해 필요하며, 분석항목의 유도체화물이 담배연기추출물의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인하였다. 직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상임을 확인하였고, 정밀도는 상대표준편차(RSD) 1.4 ~ 11.6 %, 정확도는 86 ~ 105 % 범위였다. 방법검출한계 및 정량한계는 각각 0.003~0.067 mg/L, 0.008~0.214 mg/L 범위로 나왔다.

표준담배 2종(1R6F, 3R4F) 시료를 HCI조건으로 분석한 결과, 1R6F, 3R4F 모두 분석항목 총 18종 중 11종이 검출, 나머지 7종은 불검출(LOQ 미만 포함)되었다. 검출항목은 formaldehyde, acetaldehyde, propanal, acrolein, isobutyraldehyde, butanal, crotonaldehyde, 2-methylbutyraldehdye, pentanal, hexanal, furfural이었다.

참고문헌

1. Murphy, J. et al. 2018. Assessment of tobacco heating product THP1. 0. Part 9: the placement of a range of next-generation products on an emissions continuum relative to cigarettes via pre-clinical assessment studies. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 93, 92-104.
2. Farsalinos, K. E. et al. 2018. Aldehyde levels in e-cigarette aerosol: Findings from a replication study and from use of a new-generation device. Food and Chemical Toxicology, 111, 64-70.
3. Cho YH. 2020. Development and Validation of Simultaneous Analysis of Aldehydes in Mainstream Smoke of Cigarette Tobacco, Kongju University.
4. International Organization for Standardization. 2018. ISO 20768 「Vapour products — Routine analytical vaping machine — Definitions and standard conditions」.
5. Food and Drug Administration. 2012. Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke: Established list.

⑮ 신종담배 배출물 내 휘발성 유기화합물 스크리닝 기초연구

연구 배경

궐련형 전자담배의 유해성에 대한 논란이 있는 가운데, 표준담배(3R4F) 대비 궐련형 전자담배(아이코스)에서 높게 검출되는 물질들을 확인할 수 있다. 특히 아이코스에서 2-furanmethanol, 2-methylcyclobutane-1,3-dione, butyrolactone, glycidol, propylene glycol 등에서 차이가 컸고, 3-methylvaleric acid, ergosterol, ethyl 2,4-dioxo hexanoate, furfural, glycerol, isolinderanolide, phenylacetaldehyde, pyranone, pyranone 등 다수의 물질에서 표준담배에 비해 더 많은 양이 측정되었다고 보고된 바 있다(1).

이에 따라 신종담배 배출물 내 특징적 유해성분 그룹 중 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Compounds, VOCs)을 중심으로 공시료와 비교하여 검출가능한 성분이 무엇인지 확인하고자 하였다. 흡연폐해실험실에서는 2016년부터 궐련의 주류연 내 tar, nicotine, 담배특이니트로스아민류(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs), 일산화탄소, 알데히드류, 휘발성 유기화합물 등을 분석하였고, 최근 신종담배 출현에 따른 건강위해대응연구의 일환으로 배출물 성분 중 휘발성 유기화합물에 적합한 전처리 및 기기분석방법을 준비하고 신종담배에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 담배 준비

궐련 1종, 궐련형 전자담배(가열담배와 같음) 1종, 액상형 전자담배 2종을 준비하였다. 궐련인 표준담배 1R6F는 국제숙련도시험(미국 켄터키대학) 참가 시료이고, 담배관련 연구문헌에서 1R6F를 선택하고 있으며(4), 궐련형 전자담배와 액상형 전자담배는 시판중인 제품을 선택하였다.

2. 시료 전처리

「흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범연구('19.08.19.~'20.5.31.)」의 시험방법(7) 및 가스타이트실린지샘플링법(Gas- tight syringe sampling)(8)을 포함한 Strongin RM(9), Herrington JS et al.(10)을 참고하여 배출물을 포집하고 흡착하였다. 고체흡착법은 대기오염공정시험기준 「환경대기 중 유해 휘발성 유기화합물(VOCs) 시험방법」으로 대기환경 중에 존재하는 미량의 휘발성 유기화합물 측정에 활용한다(7). 전통적인 방법의 임핀저법의 경우, 포집용액의 부피가 수십 mL로 미량성분을 분석하는데 불리하므로 '가스타이트실린지법' (8)을 응용하여 배출물 포집 시 사용하였다. 그리고 전자담배 분석을 위한 다양한 샘플링 및 기기분석방법(9)과 전처리를 위해 가스타이트실린지와 흡착관(TD tube)을 활용한 내용(10)을 참고하여 전처리 방법을 최종 준비하였다. 액상형 전자담배를 가스타이트실린지에 연결시 중간에 흡착관(TD tube)를 넣어 배출물 발생 즉시 흡착관을 통과하면서 분석항목을 흡착하도록 하는 방식이다(그림 1). 이 방식을 선택할 경우, 기기분석결과 크로마토그램의 기준선(baseline)이 높아져서 작은 피크가 묻힐 수 있고, 다수의 피크가 겹쳐 나오거나 큰 피크가 다른 피크를 가릴 확률이 있다.

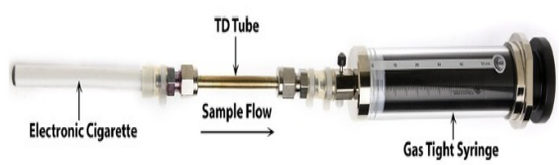


그림 1. 전자담배 배출물 포집방식(Herrington JS et al.)

그래서 배출물 시료의 매트릭스 영향을 최소화하기 위해 호기 분석시 사용한 테들러백에 가스타이트실린지로 포집한 배출물을 일부 넣은 후 고순도 질소로 희석시켰다. 최종적으로 이 시료를 공기포집기(미니펌프)로 흡착관을 통과시켜 휘발성 유

기화합물을 흡착 후 GC-MS 기기주입 전 탈착시켜 분석되도록 하였다.

담배유형별로 궐련, 궐련형 전자담배, 액상형 전자담배를 준비하고 가스타이트실린지에 각각의 배출물을 포집하기 위해 해당담배와 가스타이트실린지가 누출(leak)없이 연결되도록 튜빙(tubing) 등을 사용하였다. 공시료(blank)의 경우 담배 포집시와 모두 동일하지만 담배만 꽂지 않고 진행하였다. 즉 담배 배출물을 포집하는 것이 아닌 주변 공기를 포집하였다. 궐련의 경우, 라이터를 이용하여 불을 붙였고, 궐련형 및 액상형 전자담배의 경우 해당기기의 버튼을 누른 후 가스타이트실린지의 피스톤을 당기는 방식으로 배출물이 생성되도록 하였다. 배출물이 가스타이트실린지 내에 포집된 상태에서 되도록 바로 테들러백(호기용)에 포집된 일부를 옮겨 넣었다. 장시간 보관 후 사용 시 가스타이트실린지 내벽에 일부 물질들이 흡착되는 등 소실(loss)의 우려가 있으므로 포집 후 바로 테들러백에 옮겼다. 담배 배출물 중 특히 궐련의 경우 매트릭스가 매우 복잡하여 기기분석 시 성분 검출이 어려울 수 있으므로 희석배수를 늘리는 등의 방법을 통해 이를 극복하고자 하였다. 예를 들어 1 L의 테들러백에 20 mL를 넣고 나머지를 고순도 질소로 채워 50배 희석시켰다. 따라서서 담배유형별로 10~50배 범위에서 희석하여 준비하였다. 이렇게 준비된 테들러백 내 시료를 공기포집기와 연결된 흡착관(TD tube)에 튜빙으로 누출없이 연결한 후 공기포집기를 가동시켜 0.1 L/min(호기연구와 동일) 속도로 1분간 포집하였으며, 전처리의 전 과정을 요약하면 그림 2와 같다.

① 궐련(표준담배 1R6F), 궐련형 전자담배, 액상형 전자담배 A, B를 각각 가스타이트실린지와 튜빙(tubing)으로 연결(공시료 포함)

↓

② 가스타이트실린지에 포집된 담배유형별 배출물은 테들러 백(tedlar bag)에 넣음, 이 때 고농도 배출물 희석을 위해 고순도 질소를 같이 넣어줌
※ 최종 부피는 테들러백 최대 허용부피인 1 L가 됨

↓

③ 고순도 질소를 넣어 배출물을 희석시킨 배출물이 담긴 테들러백을 흡착튜브(TD tube)와 튜빙으로 연결 후 공기포집기(미니펌프)를 작동시켜 샘플이 해당 튜브를 통과하도록 하여 흡착시킴
※ 흡착튜브는 TD장비에서 가열시켜 탈착 후 GC-MS로 주입되어 분석 진행됨

그림 2. 전처리 흐름도

GC-MS 등 고감도 분석장비에 적합한 상태의 시료를 만들어주는 것이 중요하다. 2019년부터 수행한 호기 내 성분연구의 전처리법을 적용하여 시료를 '호기' 대신 '고순도 질소로 희석된 담배유형별 배출물'를 전처리하였다. 이 분석방법의 장점은 첫째, 매트릭스 제거가 효과적이고 둘째, 작은 피크도 잡아내어 미량 물질을 검출할 수 있다. 그러나 단점으로는 해당 분석법으로 모든 VOCs를 흡착(capture)하는 것은 불가능하다. 왜냐하면 TD tube의 규격에 따라 흡착가능물질이 다를 수 있기 때문이다. 본 연구의 시험법은 'Tenax TA+ Carbopack X' 규격의 TD tube를 사용하였다. 특히 궐련형・액상형 전자담배의 경우 예열 또는 예비퍼핑(pre-puffing)을 통해 어느정도 담배기기가 퍼핑(puffing) 준비가 된 후에 진행하였다. 왜냐하면 예열의 정도에 따라 배출물 양이 달라질 수 있기 때문이다.

3. 기기분석방법 및 시료 정성분석

1) 기기분석

공기포집기를 통해 전처리한 흡착관은 GC-MS와 연결된 열탈착 장비(Thermal Desorption, TD)를 통해 탈착 후 GC-MS에 주입, 분석이 진행되었다. GC-MS 분석조건은 「흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범연구('19.08.19.~'20.5.31.)」의 시험방법(7)을 참고하였다. 사용장비는 Agilent 789B/5977A MSD로, 컬럼은 DB-WAX를 사용하였으며 열전달통로 온도는 230 ℃, 총 분석시간은 26분이었다.(표 1)

그리고 열탈착 장비는 MARKES Ultra-xr thermal desroption autosampler와 Unity-xr thermal desorber를 사용하였고, 흐름속도는 10 mL/min, 흐름

온도는 150 ℃, 튜브 탈착온도는 280 ℃, 탈착시간은 8분, 트랩퍼지시간은 1분, 트랩퍼지 흐름속도는 50 mL/min, 트랩 최대온도는 300 ℃, 트랩탈착시간은 4분 등으로 설정하였다.(표 2)

표 1. GC-MS 조건

파라미터	설정 내용				
컬럼	DB-WAX (30m x 0.25mmI.D x 0.5μm, 필름두께)				
열전달통로 온도	230 ℃				
오븐온도 프로그램	초기 온도 (℃)	초기 시간 (분)	비율 (℃/분)	최종 온도 (℃)	최종 시간 (분)
	40	5	10	200	5
총 분석시간	*26 분*				

표 2. 열탈착 장비 조건

파라미터	설정 내용
일반사항	
대기 분할 가동	*흐름 10 mL/min*
흐름 경로 온도	*150 ℃*
최소 운반 압력(psi)	*5*
예비-탈착	
예비퍼지 시간	*1 분*
분할 가동	*분할 흐름 50 mL/min*
튜브 탈착	
탈착 시간 1	*8 min*
탈착 온도 1	*280 ℃*
트랩 라인	*트랩 흐름 50 mL/min*
트랩 설정	
트랩퍼지시간	*1 min*
트랩퍼지흐름	*50 mL/min*
트랩낮은온도	*5 ℃*
트랩 열 비율	*MAX ℃/s*
트랩높은온도	*300 ℃*
트랩탈착시간	*4 min*
탈착 분할 가동	*분할 흐름 20 mL/min*

2) 정성분석

GC-MS로 기기분석 후 MS 라이브러리(Library)의 데이터베이스를 이용하여 시료 정성분석을 실시하였다. 가스타이트실린지에 시료 포집 후 테들러백, 질소가스, 공기포집기 등을 이용하여 열탈착용 튜브에 흡착 후 가열하여 탈착, GC-MS 기기에 주입하여 분석이 이루어졌다(그림 3). 정성분석은 질량패턴 MS 라이브러리 일치도(match factor)(또는 역-일치도) 결과, 80 % 이상 동일할 경우 후보물질로 선정하였다.(11)

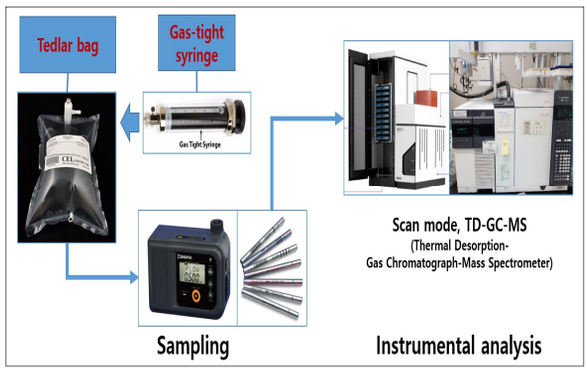


그림 3. 기기분석을 위한 과정

연구 결과

고체흡착법(7), 테들러백/공기포집기 및 가스타이트실린지법(8) 등을 활용하여 준비된 전처리법으로 TD-GC/MS 기기분석을 통한 신종담배 배출물 내 휘발성 유기화합물 정성연구 결과를 아래와 같이 크로마토그램 비교결과와 담배유형별 VOCs 검출결과, 2가지로 정리하였다.

1. 크로마토그램 비교결과

GC-MS의 전체 스캔모드(SCAN mode) 정성연구 과정에서 다음과 같은 크로마토그램을 얻을 수 있었다.(그림 4-7) 그림 4는 공시료와 표준담배(1R6F), 그림 5는 공시료와 궐련형 전자담배, 그림 6은 공시료와 액상형 전자담배(A) 그리고 그림 7은 공시료와 액상형 전자담배(B)의 결과를 겹쳐서 비교한 결과이다.

그림 4의 경우, 궐련(표준담배)의 크로마토그램으로 다른 담배유형(궐련형 및 액상형 전자담배)의 크로마토그램(그림 5,6,7)에 비해 상대적으로 높고 많은 피크(peak)를 보였다. 이는 매트릭스가 복잡하여 다성분이 포함되어 있다는 뜻으로 이를 고려하여 전처리단계에서 흡착/탈착 방식과 희석방법을 선택하였다. 이 방식을 통해 복잡한 매트릭스로 인해 질량이 겹쳐 질량기반 검출방식을 선택하고 있는 GC-MS에서 발견(검출)되지 않는 현상을 어느 정도 줄여줄 수 있었다.

그림 5의 경우, 궐련형 전자담배의 크로마토그램으로 그림 4보다는 피크의 수(검출성분 수)가 적고 피크의 높이(검출량과 비례)도 낮은 것을 알 수 있다.

그림 6의 경우, 액상형 전자담배(A)의 크로마토그램으로 머무름 시간(Retention time, x축)이 16.5분 부근에서 단연 높은 피크를 발견할 수 있었다. 이 피크는 프로필렌글리콜(propylene glycol)로 배출물 흡입 시 타격감 등을 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그림 7의 경우, 액상형 전자담배(B)의 크로마토그램으로 쥴에서 발견된 프로필렌글리콜을 포함하여 피크 높이가 비슷한 여러 물질들이 발견되었다. 이 물질들은 대부분 향수, 향료 등에 쓰이는 가향성분으로 확인되었다.

2. 담배유형별 VOCs 검출결과

흡착튜브를 이용한 열탈착 등의 전처리를 통해 배출물 내 매트릭스 제거한 후 담배유형별 휘발성 유기물질류 중심의 특이성분을 확인하였고, VOCs 성분으로 furfural, propylene glycol, ethyl lactate, ethyl acetate, benzyl alcohol 등이 포함되었다. 궐련형 전자담배의 경우 검출성분으로 총 13종을 선택하였는데 acetic acid, furfural, propylene glycol, ethyl lactate, ethyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, ethyl 2-methylpentanoate, 2-hydroxypropyl acetate, α-methylbenzyl acetate, benzyl alcohol, isobutyraldehyde, vinyl acetate, 2,3-pentanedione이었고, 액상형 전자담배(A)의 경우 acetic acid, propylene glycol, ethanol, ethyl lactate, trimethylpyrazine, propyl propionate, 2-hydroxypropyl acetate 등 7종이었다. 그리고 액상형 전자담배(B)의 경우 acetic acid, propylene glycol, ethanol, ethyl lactate, ethyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, ethyl 2-methylpentanoate, 2-hydroxypropyl acetate, α-methylbenzyl acetate, benzyl alcohol, 1-methyl-4-(1-methylethyl) cyclohexanol 등 11종이었다.(표 3)

표 3. 담배유형별 검출성분 목록

구분	검출 성분	종수
궐련형 전자 담배	Acetic acid, furfural, propylene glycol, ethyl lactate, ethyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, ethyl 2-methylpentanoate, 2-hydroxypropyl acetate, α-methylbenzyl acetate, benzyl alcohol, isobutyraldehyde, vinyl acetate, 2,3-pentanedione	13
액상형 전자 담배 (A)	Acetic acid, propylene glycol, ethanol, ethyl lactate, trimethylpyrazine, propyl propionate, 2-hydroxypropyl acetate	7
액상형 전자 담배 (B)	Acetic acid, propylene glycol, ethanol, ethyl lactate, ethyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, ethyl 2-methylpentanoate, 2-hydroxypropyl acetate, α-methylbenzyl acetate, benzyl alcohol, 1-methyl-4-(1-methylethyl) cyclohexanol	11

표 3의 최종결과를 보완하기 위한 추가 자료로, 담배유형별 배출물 내 검출이 확인된 물질을 용도 및 독성정보를 포함하여 표 4에 정리하였고, 표 5는 정성연구를 통해 신종담배에서 검출된 타겟 성분 22종을 선정 후 담배유형별 검출여부를 비교한 결과이다. 표 4와 같이 담배유형별 배출물 내 검출된 성분으로 궐련형 전자담배의 경우 isobutyraldehyde, vinyl acetate, 2,3-pentanedione, acetic acid 등 12종이 확인되었고, 이 중 발암성 그룹(IARC)인 물질로는 IARC 2B인 vinyl acetate, IARC 3인 toluene, D-limonene, pyridine, furfural 등이 있었다.

액상형 전자담배(A)의 경우 propylene glycol, ethyl lactate 등 4종이 확인되었고, 액상형 전자담배(B)의 경우 총 9종을 확인하였는데, ethyl acetate, ethyl propanoate, ethyl isobutyrate, n-propyl acetate, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, propylene glycol, 1-methyl-4-(1-methylethyl) cyclohexanol, α-methylbenzyl acetate이었다. 9종 대부분이 향료, 향수 등 첨가제로 주로 쓰이고, 노출시 눈・코・목・피부 등 자극을 줄 수 있다. 궐련의 경우는 총 8종을 확인하였고, 1,4-pentadiene, 2-butanone, benzene, 2,5-dimethylfuran, vinyl acetate, toluene, 2,3-pentanedione, 1-methyl-4-(1-methylethyl)cyclohexanol이었다. 이 중 발암성 그룹(IARC)은 benzene(IARC 1), vinyl acetate(IARC 2B), toluene(IARC 3) 등 3종이었다.

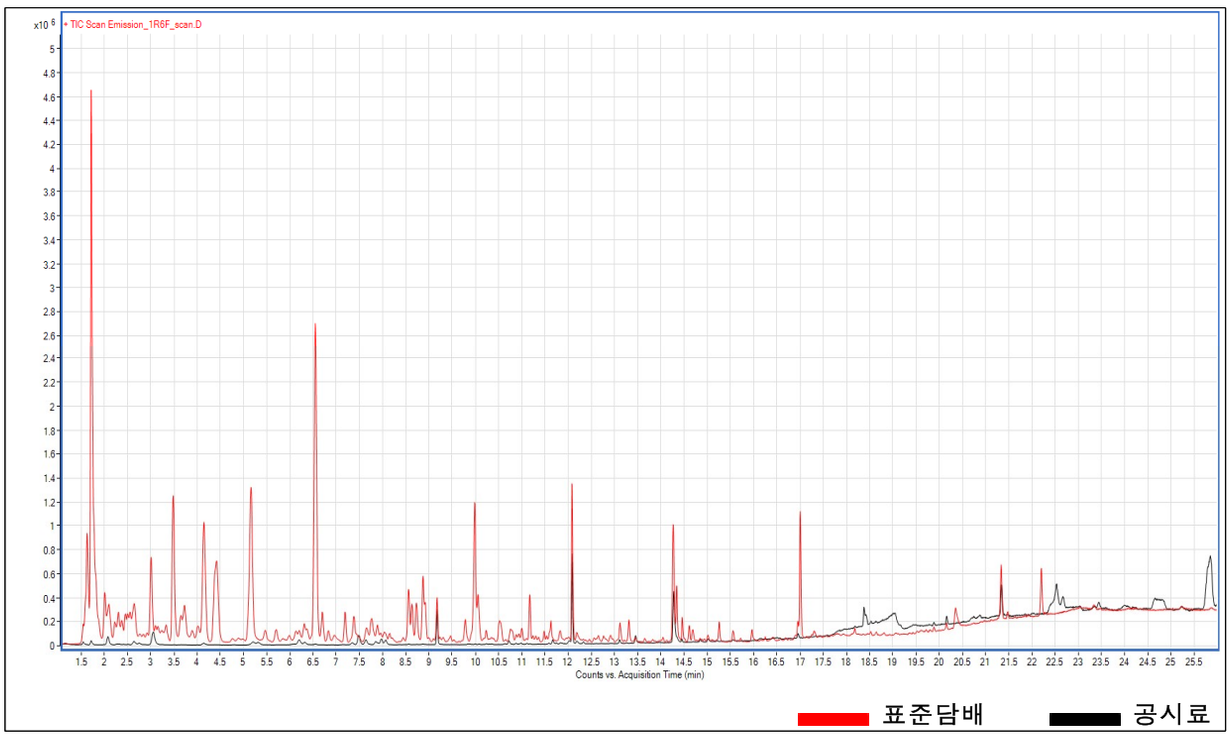


그림 4. 공시료와 표준담배(1R6F)의 크로마토그램 비교

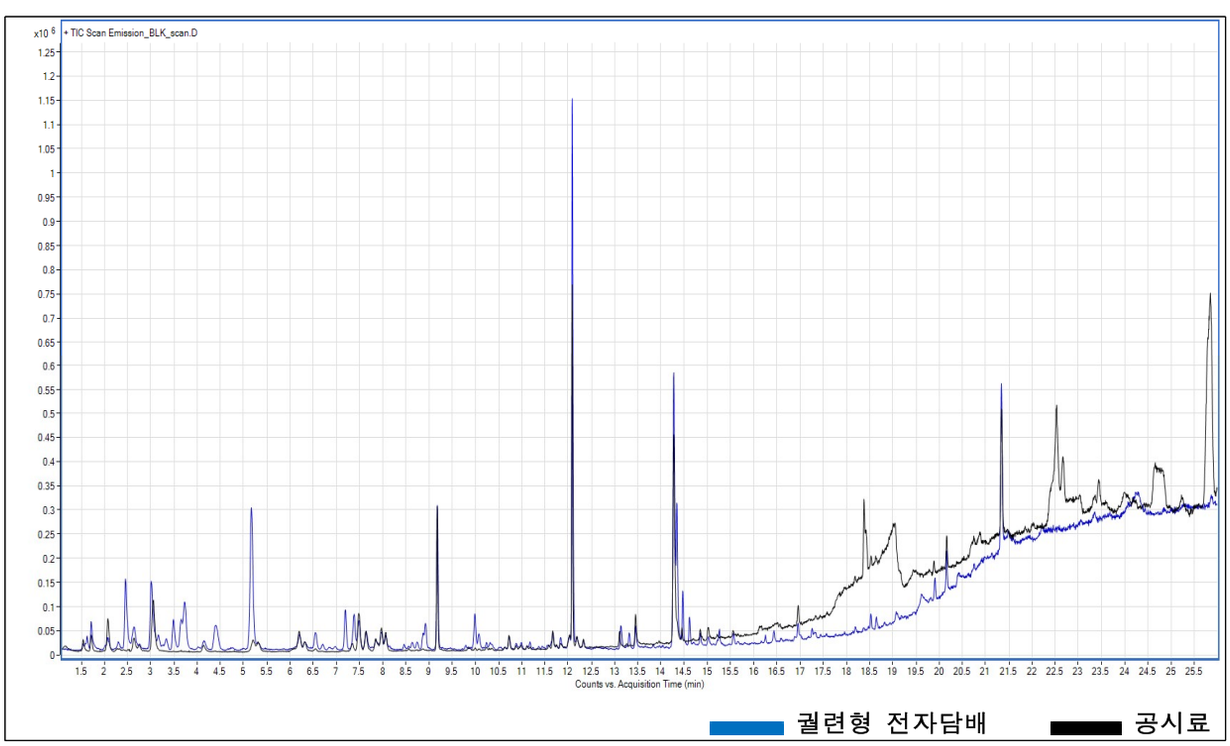


그림 5. 공시료와 궐련형 전자담배의 크로마토그램 비교

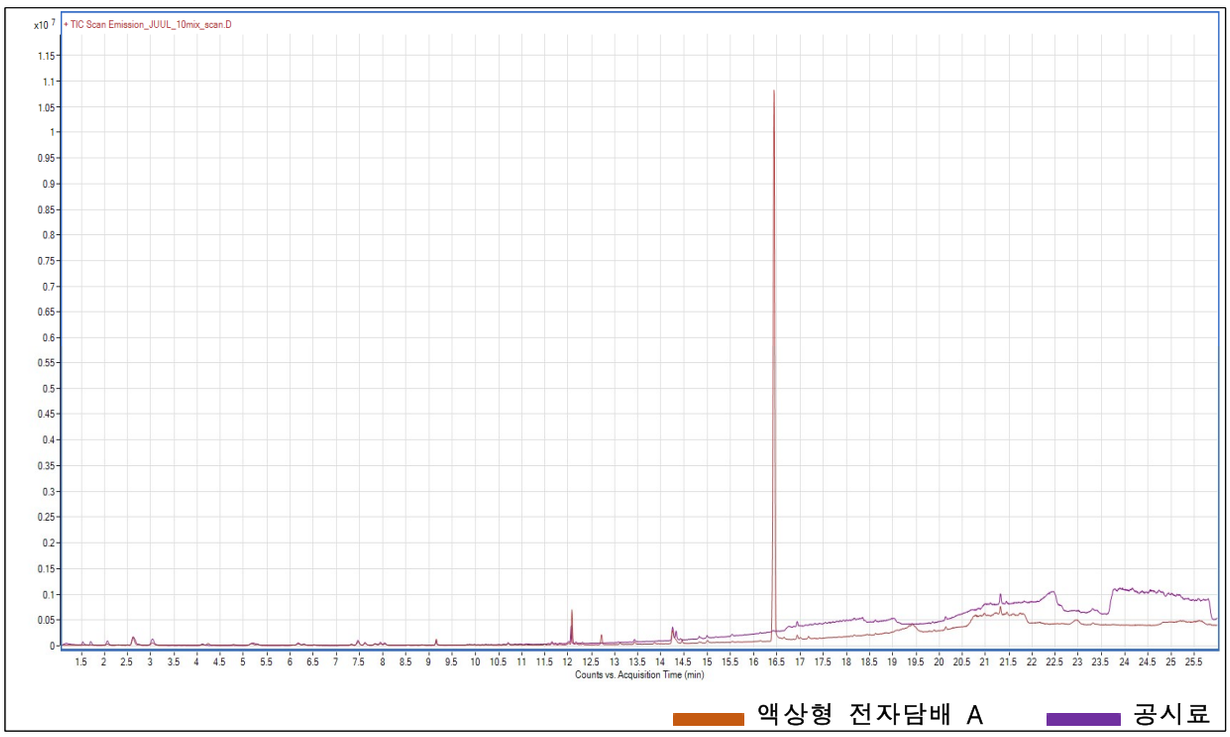


그림 6. 공시료와 액상형 전자담배(A)의 크로마토그램 비교

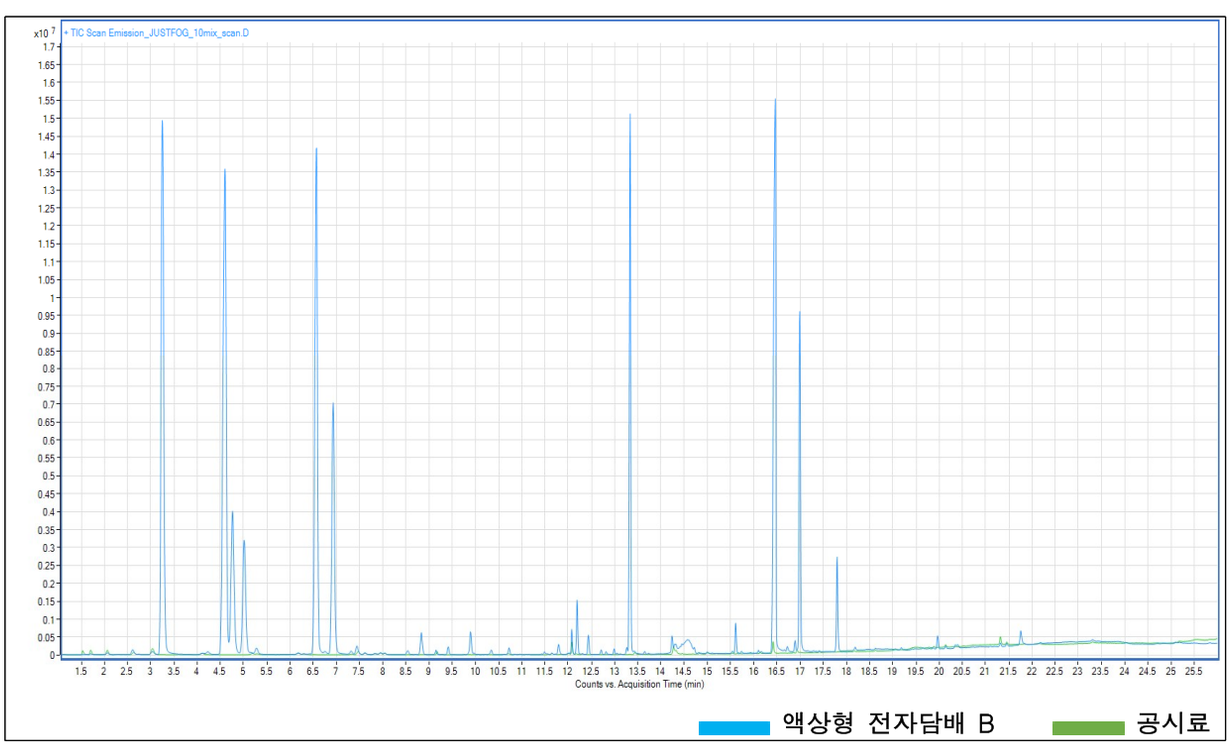


그림 7. 공시료와 액상형 전자담배(B)의 크로마토그램 비교

표 4. 담배유형별 배출물 성분 스크리닝 결과

구 분			화학물질명(CAS No.[52])	용도 / 독성 정보 (식약처, 안전보건공단 등 참고)
궐련형 전자담배		총 12종	Isobutyraldehyde(78-84-2)	향수, 향료 / 폐부종(급성 흡입)
			Vinyl acetate(108-05-4)	접착제 성분 / IARC 2B
			2,3-Pentanedione(600-14-6)	아로마 성분 / 폐 손상
			Acetic acid(64-19-7)	유기 합성 / 피부염, 알레르기반응
			α-Methylfuran(534-22-5)	급성독성(흡입:증기), 마취작용, 눈자극
			Toluene(108-88-3)	살충제, 산업용제 / IARC 3
			2,3-Dithiabutane(624-92-0)	살충제, 식품첨가물 / 피부자극
			o-Xylene(95-47-6)	의약품, 살충제 / 피부·눈·코·인후 자극
			1-Methylpyrrole(96-54-8)	눈 자극·손상
			D-Limonene(5989-27-5)	향료, 살충제 / 폐·신장 급성독성, IARC 3
			Pyridine(110-86-1)	화학합성 중간체 / 눈·호흡기 자극, IARC 3
			Furfural(98-01-1)	살충제, 제초제 / 눈·호흡기 자극, IARC 3
액상형 전자담배	A	총 4종	Propylene glycol(57-55-6)	보습제, 방부제 / 안구·호흡기 약간 자극
			Ethyl lactate(97-64-3)	페인트, 향료 / 피부 자극·코 후각 손상
			Ethanol(64-17-5)	식음료, 용매 / 눈·피부 자극
			Trimethylpyrazine(14667-55-1)	급성독성(경구)
	B	총 9종	Ethyl acetate(141-78-6)	식품 향료, 의약품 / 눈 자극, 피부염
			Ethyl propanoate(105-37-3)	수지 용매, 향료 / 눈·피부 점막 자극
			Ethyl isobutyrate(97-62-1)	향료 추출물/ 피부·눈·기도 자극
			n-Propyl acetate(109-60-4)	향료, 수지 용매 / 눈·코·목 자극
			Ethyl butanoate(105-54-4)	착향료, 향수 / 눈·코·목 자극
			Ethyl 2-methylbutanoate(7452-79-1)	향수, 화장품 첨가제 / 피부·눈 자극
			Propylene glycol(57-55-6)	보습제, 방부제 / 안구·호흡기 약간 자극
			1-Methyl-4-(1-methylethyl)cyclohexanol(21129-27-1)	자료 없음
			α-Methylbenzyl acetate(93-92-5)	세탁 제품, 향수 / 뇌 괴사(동물)
궐련 (1R6F)		총 8종	1,4-Pentadiene(591-93-5)	피부·눈 염증 및 화상
			2-Butanone(78-93-3)	코팅제·살충제 용제 / 중추신경계 억제, 신경독성, 눈·호흡기 자극
			Benzene(71-43-2)	희석제(페인트), 용매, 연료첨가제 / 빈혈, 백혈병(장기 노출 시), IARC 1
			2,5-Dimethylfuran(625-86-5)	자료 없음
			Vinyl acetate(108-05-4)	화학반응 중간제, 접착제 / 심장기능 이상, 호흡기·피부 자극, IARC 2B
			Toluene(108-88-3)	살충제, 산업용제 / IARC 3
			2,3-Pentanedione(600-14-6)	향, 아로마 성분 / 폐·상피 손상
			1-Methyl-4-(1-methylethyl)cyclohexanol(21129-27-1)	자료 없음

52) 이제까지 알려진 모든 화합물, 중합체 등을 기록하는 번호, 모든 화학물질을 중복없이 찾기 가능

표 5. 담배유형별 검출성분 탐색비교 결과

연번	CAS No.	화학물질명	용도/독성 정보	담배유형별 검출여부(○, ×)			
				1R6F (비교군)	궐련형 전자담배	액상형 전자담배A	액상형 전자담배B
1	64-19-7	Acetic acid	유기 합성 / 피부염, 알레르기반응	○	○	○	○
2	600-14-6	2,3-Pentanedione	아로마 성분 / 폐 손상	○	○	×	×
3	624-92-0	Methyl disulfide	살충제, 식품첨가물 / 피부자극	○	○	×	×
4	5989-27-5	D-Limonene	향료 / 폐·신장 급성독성, IARC 3	○	○	×	○
5	3658-80-8	Dimethyl trisulfide	자료 없음	○	○	×	×
6	98-01-1	Furfural	살충제, 제초제 / 눈·호흡기 자극, IARC 3	○	○	○	○
7	534-22-5	2-Methylfuran	급성독성(흡입:증기), 마취작용, 눈자극	○	○	○	○
8	590-86-3	Isovaleraldehyde	향수 / 피부·눈·호흡기 자극	○	○	×	×
9	96-17-3	α-Methylbutanal	피부·눈·호흡기 자극	○	○	×	×
10	930-27-8	3-Methylfuran	자료 없음	○	○	○	○
11	57-55-6	Propylene glycol	보습제, 방부제 / 안구·호흡기 약간 자극	○	○	○	○
12	64-17-5	Ethanol	식음료, 용매 / 눈·피부 자극	×	○	○	○
13	97-64-3	Ethyl lactate	페인트, 향료 / 피부 자극·코 후각 손상	○	○	○	○
14	14667-55-1	Trimethylpyrazine	급성독성(경구)	×	×	○	○
15	141-78-6	Ethyl acetate	식품 향료, 의약품 / 눈 자극, 피부염	○	○	×	○
16	928-96-1	cis-3-Hexen-1-ol	향수 / 피부·눈·호흡기 자극	○	○	×	○
17	106-36-5	Propyl propionate	급성 독성(경구,경피)	×	○	○	○
18	39255-32-8	Ethyl 2-methylpentanoate	향 제조	○	○	×	○
19	627-69-0	2-Hydroxypropyl acetate	자료 없음	○	○	○	○
20	93-92-5	α-Methylbenzyl acetate	세탁 제품, 향수 / 뇌 괴사(동물)	○	○	×	○
21	100-51-6	Benzyl alcohol	향미제, 보존제 / 눈 손상·자극, 피부과민	○	○	○	○
22	54-11-5	Nicotine	피부·눈 자극, 호흡 부전	○	○	○	○

참고문헌

1. Helen, G. S. et al. 2018. IQOS: examination of Philip Morris International' s claim of reduced exposure. Tobacco control, 27(Suppl 1), s30-s36.
2. Talih, S. et al. 2019. Characteristics and toxicant emissions of JUUL electronic cigarettes. Tobacco control, 28(6), 678-680.
3. Lee, M. S. et al. 2017. Nicotine, aerosol particles, carbonyls and volatile organic compounds in tobacco-and menthol-flavored e-cigarettes. Environmental Health, 16(1), 1-10.
4. Forster, M. et al. 2018. Assessment of novel tobacco heating product THP1. 0. Part 3: comprehensive chemical characterisation of harmful and potentially harmful aerosol emissions. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 93, 14-33.
5. Farsalinos, K. E. et al. 2018. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. Addiction, 113(11), 2099-2106.
6. Huang, J. et al. 2019. Vaping versus JUULing: how the extraordinary growth and marketing of JUUL transformed the US retail e-cigarette market. Tobacco control, 28(2), 146-151.
7. Korean Ministry of Environment. National Institute of Environmental Research. 2016. Methods for Determination of Hazardous and Volatile Organic Compounds in Ambient Air-Adsorbent Trap Method(ES 01804.2).
8. Cho, Y. H., & Shin, H. S. 2015. Use of a gas-tight syringe sampling method for the determination of tobacco-specific nitrosamines in E-cigarette aerosols by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Methods, 7(11), 4472-4480.
9. Strongin, R. M. 2019. E-cigarette chemistry and analytical detection. Annual Review of Analytical Chemistry, 12, 23-39.
10. Herrington, J. S., & Myers, C. 2015. Electronic cigarette solutions and resultant aerosol profiles. Journal of chromatography A, 1418, 192-199.
11. 권경희, 국내외 캡슐담배 현황조사, 질병관리본부, 2016.

⑯ 궐련담배 주류연 내 알데히드류 동시분석법 개발 연구

연구 배경

Formaldehyde 등 알데히드류는 발암물질의 일종으로, 흡입·피부 등 독성이 있는 물질로 알려져 있으며, 생활용품, 화장품 등에서도 널리 사용되는 물질이다. 신종담배제품이 지속 출시되고 담배제품 형태도 다양해지고 있기 때문에 기존에 알려져 있던 물질 외에도 건강위해여부에 대한 연구를 확충할 필요가 있다. 또한 2016년에 질병관리본부 정책연구용역으로 수행된 '국내유통 배의 형태 및 구조적 특성 규명' 및 '가향담배기 흡연시도에 미치는 영향연구' 등에서 규명된 담배에서의 가향성분에는 다량의 알데히드류가 포함되어 있다. 현재 질병관리본부 흡연폐해실험실서는 알데히드류에 대해서 WHO 담배실험실 트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시항목(1)에 따라, formaldehyde, acetaldehyde, acrolein에 대한 공인시험법을 보유고 있다(2).

이에 발암물질 등으로 알려진 3종의 알데히드류 외에 향후 건강위해 발생에 대비하기 위한 기초연구로서 알데히드류에 대한 확대 분석연구를 수행하고자 한다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 선택

1) 분석방법 조사

알데히드류를 분석하기 위해서는 담배관련과학연구협력센터 추천방법(CORESTA recommended method)(3), WHO 표준절차서(standard operation procedure, SOP)(4) 등에서 2,4-디니트로페닐히드라진(2,4-dinitrophenylhydrazine, 2,4-DNPH) 유도체화시약을 이용하여 담배연기 주류연에서 알데히드류를 분석하고 있다.

공인시험법으로 주로 사용되는 LC-DAD(UV)법은 액체상태에서 알데히드류를 추출하는 방법으로 유도체화물질인 2,4-DNPH를 사용한다. 그러나 이 유도체화물질은 분자량이 커서 기체상태로 전환이 어려워 여러 물질을 동시에 정성이 가능한 GC-MS 분석법에 적합하지 않다(표 1).

따라서, 다수의 알데히드류를 분석하기 용이한 상태인 기체상태에서 분석되는 GC-MS법을 적용해보기 위해 알데히드류 유도체화방법, 담배배출물 포집방법, 전처리방법, 기기분석방법을 개발하였다.

표 1. 기기분석방법 비교

장비명	장 점	단 점
LC-UV(DAD)	• 공인시험법의 유도체화물질인 2,4-DNPH는 분자량이 크고 반응성이 좋은 구조를 가지며 생성물이 안정적임	• 동시분석항목이 많을 경우 정성을 머무름시간(retention time, R.T)에 의존하므로 불리함 • 분석 전 충분한 압력 안정화 시간 필요
GC-MS	• 질량 스펙트럼을 통해 정확한 정성이 가능하고, 많은 항목을 동시분석하는데 유리함 • 분석 전 별도의 기기준비시간 필요없음	• 분자량이 크고 끓는 점이 높은 물질에 불리함

2) 알데히드류 유도체화방법

GC-MS법을 이용하여 알데히드류를 분석하기 위해서는 분석하기 용이한 형태로 전환해줘야 한다. 이를 유도체화반응이라고 하는 데, Ferreira AMC et al.(5)의 연구에 따르면, 첫째, 히드라존(hydrazone), 둘째, 티아졸리딘(thiazolidine), 셋째, 옥심(oxime) 생성이 있다(그림 1-3). 기체상태로 GC 분석에 안정적인 형태 중 하나인 티아졸리딘 생성반응을 선택하여 진행하였다.

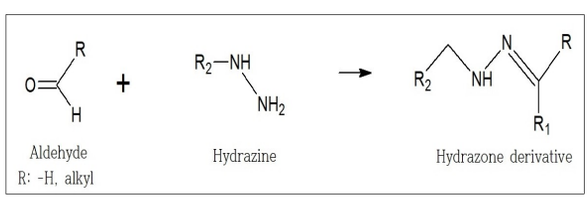


그림 1. 히드라존 생성반응

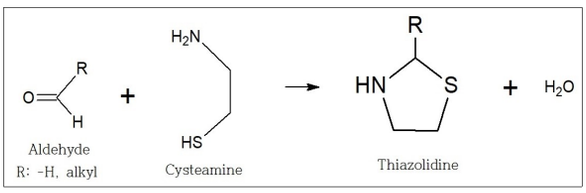


그림 2. 티아졸리딘 생성반응

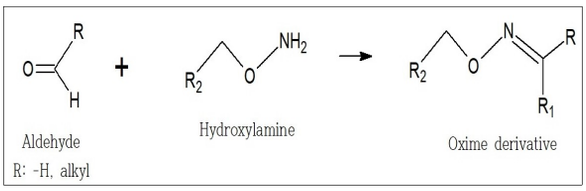


그림 3. 옥심 생성반응

3) 담배 배출물 포집방법

국내 식약처에서 발간한 담배 및 주류연 성분 분석법(6)을 비롯하여 담배 주류연 성분 분석방법과 관련한 담배관련과학연구협력센터 추천방법 N° 74(3), Pang X et al.(7), Wright C(8)에서는 그림 4와 같이 임핀저(impinger)를 활용한 연기포집법을 이용하였다.

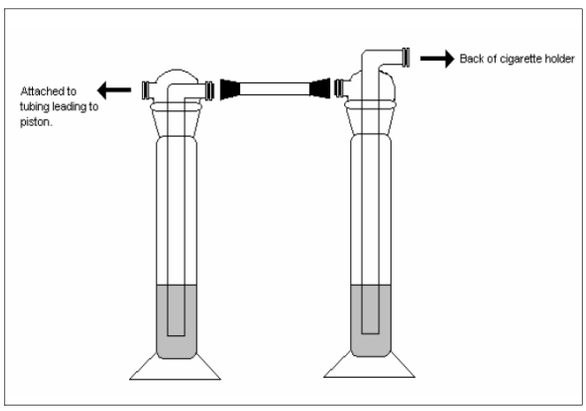


그림 4. 담배연기 임핀저 포집방법

2. 시료 전처리

GC기기를 이용한 전처리 방법은 액액추출법(liquid liquid extraction, LLE), 고상추출법(solid phase extraction, SPE), 고상미량추출법(solid phase micro extraction, SPME)등(표 2)(5).이 있는데, 유도체화생성물의 구조를 고려했을 때 아미노기가 있으므로 pH조절시 높은 회수율을 얻을 수 있는 액액추출법을 전처리 방법으로 선택하였다.

표 2. 전처리방법 비교

추출과정	장 점	단 점
액액 추출법	친유성이 있는 (hydrophobic) 분석항목의 경우 적절한 유기용매를 선택함에 따라 높은 회수율을 얻을 수 있음	친수성이 있는 (hydrophilic) 분석항목의 경우 추출이 어려움
고상 추출법	인체에 유해한 유기용매를 많이 사용하지 않음	소모성 재료인 고체상의 높은 가격과 전처리 과정에 많은 시간과 노동력이 소요됨
고상미량 추출법	간단히 추출·농축이 가능하고 독성이 있는 유기용매를 사용하지 않음	소모성 파이버(fiber) 등의 구입으로 분석비용 증가

3-아미노-1-프로판티올 유도체화시약을 활용하여 개발된 「유도체화-LLE- GC/MS 분석법」의 전처리 방법은 반응·추출 pH 모두 12, 반응온도는 상온(20 ℃), 반응시간 3분, 추출시간 1분, 추출용매 메틸렌 클로라이드, 유도체화 시약 양 2배 이상(검정곡선 농도범위 내 최고값의 동시분석항목 몰농도 대비)으로 최적화 실험결과(표 3)를 바탕으로 전처리 과정에 반영하였다(그림 6).

표 3. 유도체화시약 실험결과

실험항목	실험 범위	실험결과
반응 pH	pH 4 ~ 12	pH 12
추출 pH	pH 6 ~ 12	pH 12
반응온도	상온(20 ℃) ~ 80 ℃	상온(20 ℃)
반응시간	1 ~ 30 분	3 분
추출시간	1 ~ 10분	1 분
추출용매	메틸렌 클로라이드(MC), 에틸 아세테이트(EA), 메틸-터-부틸-에터(MTBE), 클로로포름(chloroform), 헥산(hexane)	메틸렌 클로라이드 (MC)
유도체화 시약 양	(검정곡선 농도범위 내 최고값의 동시분석항목 몰농도 대비) 0.5~5배	2배 이상

궐련을 항온항습챔버에 최소 48시간 이상 보관 후(9) 흡연장치를 준비하였다. 이 때 궐련의 꽁초

길이는 ISO 4387(10)에 따라 궐련의 입물림부에 적용되는 겉포장(overwrap)의 길이에 3 mm를 추가한 길이로 정하였다. 흡연장치는 흡연폐해실험실에서 보유중인 선형흡연자동장치(SM450, Cerulean)을 사용하였다(그림 5).

그림 5. 선형자동흡연장치

담배 주류연 내 알데히드류를 포집하기 위해 담배연기를 발생시키는 흡연장치의 흡연조건은 WHO SOP(1)에 따라 캐나다(HCI) 조건을 설정값으로 흡입부피는 55 mL이고, 흡입간격은 30초이며, 흡입지속시간 2초, 환기차단율(%)은 100 %였다. 이 흡연조건으로 담배연기를 발생시켜 담배연기를 20 % 메탄올 용액에 포집 후 바로 포집용액을 합쳐 50 mL로 만들고 이 용액을 시료로 사용하였다. 시험튜브(test tube)에 포집용액 중 1 mL를 넣고 pH 12가 되도록 미리 조제한 완충용액 1.0 mL을 넣는다. 검정곡선인 경우 일정 농도의 표준용액을 1 mL 넣어 총 2 mL를 만든다. 그 다음 고농도의 유도체화시약(약 5000 ~ 8000 mg/L 수준)를 일정량 넣고, 소용돌이 혼합(vortex mix) 후 상온(20 ℃)에서 3분 동안 반응시킨다. 유도체화시약에 의해 유도체화된 내부표준물질(Trimethylacetaldehdye)을 일정량 넣고 추출용매(메틸렌 클로라이드)를 700 μL 넣고, 1분 동안 교반(shaking) 해준다. 층 안정화 후 층분리하여 GC-MS로 분석하였다(그림 6). 담배연기 포집시 포집용액은 2개의 임핀저에 25 mL씩 담아 통과하도록 하였다.

① 궐련 준비
- 실험실 온도 (22 ± 1) ℃, 상대습도 (60 ± 3) %로, 궐련을 적어도 48시간에서 10일까지 항온항습 챔버에서 조화
- 꽁초 길이 표시

↓

② 흡연장치 준비
- 캐나다 흡연조건 포집환경

※ 공기유속 : 200 mm/s ± 30 mm/s

↓

③ 담배연기 발생
- 선형 흡연장치
- 소모한 담배(ex. 1 개비)에 대한 총 퍼프의 수 기록

↓

④ 담배연기 포집
- 2개의 임핀저로 담배 주류연 포집
- 각각의 임핀저에는 20 % 메탄올 포집용액(시료)을 넣음
- 공시료 샘플에서도 동일한 절차로 시행함

↓

⑤ [반응 pH: 12]
pH12 완충용액 1 mL + 20 % 메탄올(시료) 1 mL

↓

⑥ [유도체화시약 양: 2배 이상]
유도체화시약(3-아미노-1-프로판티올) 7500 mg/L 50 μL

↓

⑦ [반응온도 및 시간: 상온, 3분]
볼텍스 믹서로 혼합 후 3분동안 상온에서 반응

↓

⑧ 내부표준물질(트리메틸아세트알데히드 유도체화물)
50 mg/L 25 μL

↓

⑨ [추출용매: 메틸렌 클로라이드]
메틸렌 클로라이드(유기용매) 700 μL

↓

⑩ [추출시간: 1분]
1분간 교반기로 섞어줌(250 r/min)

↓

⑪ 메틸렌 클로라이드 층분리하여 바이알(인서트)로 옮긴 후 GC-MS 분석

그림 6. 시험방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

주요 분석장비인 GC-MS는 Agilent사(Palo Alto, CA, USA))의 7890B GC system과 질량분석을 위한 5977A MSD(agilent technologies, palo alto, CA, USA)를 사용하였다. 유도체화된 aldehydes의 GC-MS의 기기분석 조건은 아래 표 4-5에 정리하였다. 컬럼은 DB-5MS(30 m x 0.25 mmI.D x 0.25 ㎛)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 40 ℃(3분 유지), 온도상승은 10 ℃/min, 최종온도는 300 ℃, 최종온도에서의 유지시간은 3분이었으며, 총 분석시간은 32분이었다(표 4).

표 4. 주류연 내 aldehydes 분석을 위한 GC조건

파라미터	조 건				
컬럼	DB-5MS (30m x 0.25mmI.D x 0.25μm, film thickness)				
운반기체 흐름	초고순도 헬륨(1 mL/min)				
주입모드	분할 (5 : 1)				
주입구 온도	300 ℃				
열전달통로 온도	280 ℃				
오븐온도 프로그램	초기 온도(℃)	초기 시간(min)	비율 (℃/min)	최종 온도(℃)	최종 시간(min)
	40	3	10	300	3
실행 후	310 ℃, 1 min				
총 분석시간	32 min				

분석모드는 선택된 이온 모니터링(Selected Ion Mornitoring)으로 물질별 특정 질량이온 값을 입력하여 감도를 높여 분석하는 방법이다. 분석항목인 Formaldehyde의 선택이온은 103, 75, 56, Acetaldehyde의 선택이온은 117, 102, 84, Propanal의 선택이온은 102, 131, 84, Butanal의 선택이온은 102, 145, 98, Pentanal의 선택이온은 102, 130, Hexanal의 선택이온은 102, 173, 130, 126, Heptanal의 선택이온은 102, 187, 140, 130, Octanal의 선택이온은 102, 201, 154, 140, Nonanal의 선택이온은 102, 215, 168, 154, Decanal의 선택이온은 102, 229, 186, 168, Acrolein의 선택이온은 82, 129, 68, Benzaldehyde의 선택이온은 132, 179, 118, Crotonaldehyde의 선택이온은 96, 143, 68, Furfural의 선택이온은 122, 169, Isobutyraldehyde의 선택이온은 102, 145, 84, 70, Piperonal의 선택이온은 176, 223, 162, 2-Methylbutyraldehyde의 선택이온은 102, 159, 144, 130, 3-Methyl-2-butenal의 선택이온은 110, 157, 142였고, 내부표준물질인 Trimethylacetaldehyde의 선택이온은 102, 159, 144, 84였다(표 4).

표 5. Aldehydes의 선택이온

물질명	1선택	2선택	3선택	4선택
Formaldehyde	103	75	56	-
Acetaldehyde	117	102	84	-
Propanal	102	131	84	-
Butanal	102	145	98	-
Pentanal	102	130	-	-
Hexanal	102	173	130	126
Heptanal	102	187	140	130
Octanal	102	201	154	140
Nonanal	102	215	168	154
Decanal	102	229	186	168
Acrolein	82	129	68	-
Benzaldehyde	132	179	118	-
Crotonaldehyde	96	143	68	-
Furfural	122	169	-	-
Isobutyraldehyde	102	145	84	70
Piperonal	176	223	162	-
2-Methylbutyraldehyde	102	159	144	130
3-Methyl-2-butenal	110	157	142	-
Trimethylacetaldehyde	102	159	144	84

4. 유효화 실험 및 시료분석

개발한 시험방법의 평가(validation)을 위해 유효화 실험을 수행하였는데, 유효화 항목으로 선택성, 직선성, 정밀 · 정확도, 검출 · 정량한계, 국외문헌 결과비교로 하였다.

1) 선택성

초순수에 10 mg/L의 농도가 되도록 첨가한 시료를 전처리 과정을 거쳐 선택이온 모니터링(selected ion monitoring, SIM) 모드로 분석한 결과, 총 18종 분석항목간 정량이 가능한 상태의 분리능 확보 및 피크 간섭여부 등을 확인하였다.

2) 직선성

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상물질을 측정하여 나타난 피크을 적분한 면적(area)을 내부표준물질(유도체화된 trimethyacet aldehyde) 피크을 적분한 면적(area)으로 나눈 비(ratio)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2값이 평균 0.99이상이 되도록 하였다.

3) 정밀도(Precision) · 정확도(Accuracy)

정밀도는 검정곡선을 그리기 위해 포집시료 전처리방법과 동일하게 검정곡선 시료를 n=3으로 전처리한 후 같은 농도 지점에서 얼마만큼 변동없이 정밀하게 나오는지를 말한다. 상대표준오차(relative standard deviaton, RSD)는 25 % 이내이어야 한다. 정확도도 정밀도와 같이 검정곡선을 그리기 위해 포집시료 전처리방법과 동일하게 검정곡선 시료를 n=3으로 전처리한 후 같은 농도 지점에서 얼마만큼 동일한 값이 나오는지를 말하고, 75～125 % 이내이어야 한다.

4) 방법검출한계 · 정량한계

방법검출한계(method detection limit, MDL)는 실제 시험법을 적용하였을 때의 검출가능한 최소 농도를 말하고, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 편차에 3.14를 곱한 값을 방법검출한계(MDL), 편차에 10을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 정하였다.

5) 시료분석

시료는 표준담배인 1R6F와 3R4F을 선택하여 일내 실험으로 3회 반복실험을 실시하였다.

6) 국외문헌 결과 비교

담배 주류연 내 알데히드류 양 등 국외문헌 조사결과와 본 연구에서 개발한 시험법 적용시 산출된 데이터 결과를 비교하였다.

5. 분석항목 선정

WHO 담배실험실네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP)에서 제시하는 formaldehyde, acetaldehyde, acrolein 3종과 담배 주류연 내에서 동 3종을 제외한 알데히드류 분석결과를 제시한 국외문헌 St.Helen G et al.(11)은 crotonaldehyde, propanal, butanal 등 3종, Pang X et al.(12)은 2-methyl-2-propenal, 3-methylbutyraldehyde, pentanal, hexanal, 2-furfural, benzaldehyde 등 6종, Forster M et al.(13)은 isobutyraldehyde 1종 등을 참고하여 총 18종의 알데히드류를 선정하였다(표 6).

표 6. 알데히드류 분석항목

No.	CAS no.	물질명
1	50-00-0	Formaldehyde
2	75-07-0	Acetaldehyde
3	123-38-6	Propanal
4	123-72-8	Butanal
5	110-62-3	Pentanal
6	66-25-1	Hexanal
7	111-71-7	Heptanal
8	124-13-0	Octanal
9	124-19-6	Nonanal
10	112-31-2	Decanal
11	107-02-8	Acrolein
12	100-52-7	Benzaldehyde
13	4170-30-3	Crotonaldehyde
14	98-01-1	Furfural
15	78-84-2	Isobutyraldehyde
16	120-57-0	Piperonal
17	96-17-3	2-Methylbutyraldehyde
18	107-86-8	3-Methyl-2-butenal

연구 결과

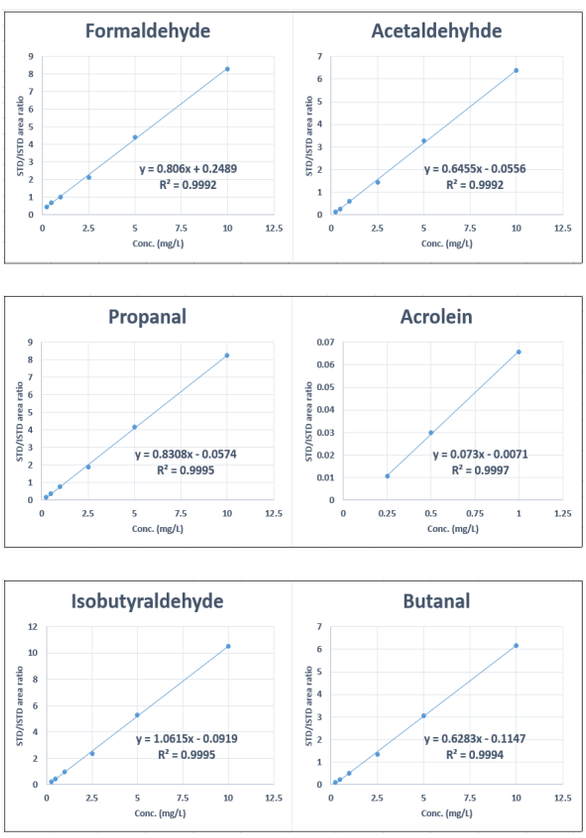
1. 유효화 실험결과

1) 선택성

초순수에 분석항목이 10 mg/L의 농도가 되도록 첨가한 후 전처리 과정을 거쳐 만든 시료의 총 18종 알데히드류에 대한 크로마토그램을 확인한 결과 다른 매트릭스 성분들의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인하였다.

2) 직선성

Formaldehyde, acetaldehyde, propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, acrolein, crotonaldehyde, 3-methyl-2-butenal, isobutyraldehyde, 2-methyl butyraldehyde, benzaldehyde, piperonal, furfural 등 aldehydes 18종 모두 R^2가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 7).



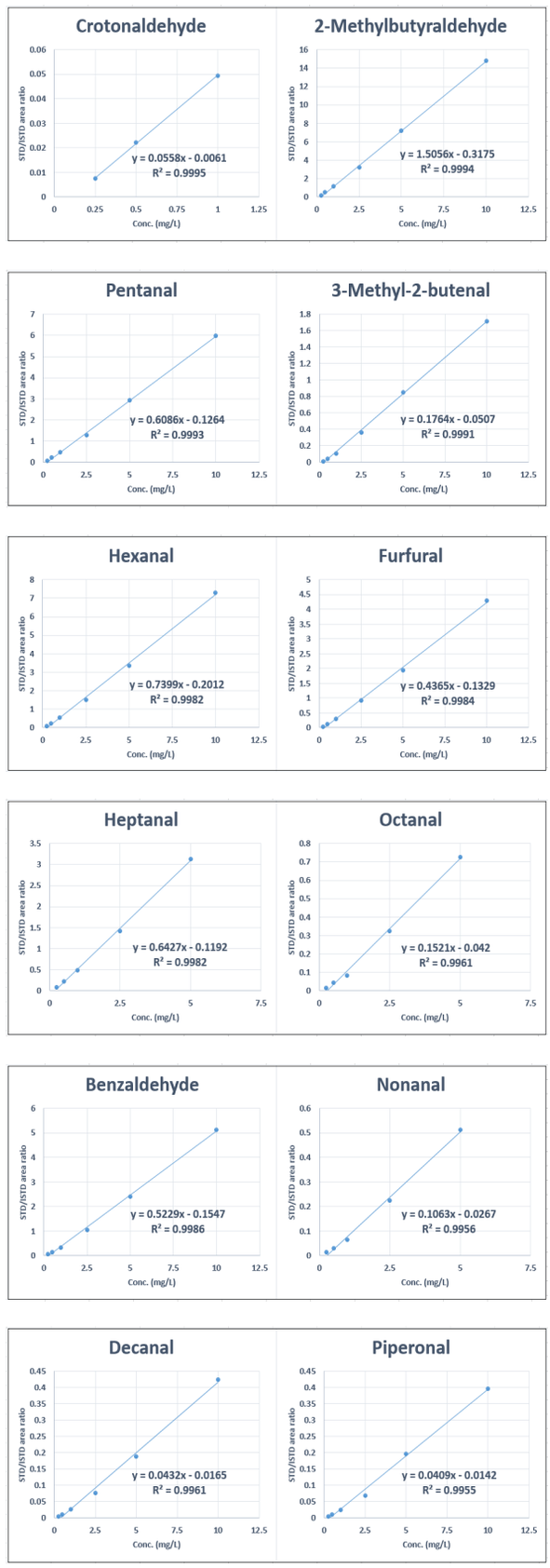


그림 7. 분석항목별 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

분석성분이 검출되지 않은 3개 이상의 포집용액(20 % methanol)에 표준물질을 각각 1 mg/L와 5 mg/L의 농도로 넣은 후 실제 시료 전처리 절차와 동일하게 최적화 조건(반응온도 20 ℃, 반응pH 12, 반응시간 3분, 추출pH 12, 추출시간 1분, 유도체화시약 양 2배 이상) 하에서 실험하여 결과를 얻었다. 아래 표 11과 같이 동시분석항목 18종에서 정확도는 86～105 %, 정밀도는 1.4～11.6 % 범위로 나왔다(표 7).

4) 검출 · 정량한계

분석성분이 검출되지 않은 포집용액(20 % methanol)에 예상되는 검출한계 수준 농도를 첨가한 후 실제 시료 전처리 절차와 동일하게 최적화 조건(반응온도 20 ℃, 반응pH 12, 반응시간 3분, 추출pH 12, 추출시간 1분, 유도체화시약 양 2배 이상) 하에서 실험한 결과값의 표준편차(SD) 3.14배를 방법검출한계(method detection limit, MDL), 10배를 정량한계(limit of quantitation/ quantification, LOQ)로 정하였다. 표 10과 같이 동시분석항목 18종 방법검출한계는 0.003～0.067 mg/L, 정량한계는 0.008～0.214 mg/L 범위로 나왔다(표 8).

5) 시료분석 결과

1R6F와 3R4F 2종 모두 분석항목 총 18종 중 11종이 검출, 나머지 7종은 불검출(LOQ 미만 포함)되었다. 검출항목은 formaldehyde, acetaldehyde, propanal, acrolein, isobutyraldehyde, butanal, crotonaldehyde, 2-methyl-butyraldehyde, pentanal, hexanal, furfural이었다. 1R6F의 경우, formaldehyde는 평균 89.48(± 4.6) μg/cigarette, acetaldehyde는 평균 1903.3(± 137.0) μg/cigarette, propanal은 평균 229.57(± 18.39) μg/cigarette, acrolein은 평균 138.01(± 10.05) μg/cigarette, isobutyraldehyde는 평균 46.47(± 2.70) μg/cigarette이었다. Butanal은 평균 28.52(± 2.75) μg/cigarette, crotonaldehyde는 평균 24.07(± 1.21) μg/cigarette, 2-methylbutyraldehyde는 평균 32.41(± 2.49) μg/cigarette, pentanal은 평균 3.79(± 0.41) μg/cigarette, hexanal은 평균 1.35(± 0.37) μg/cigarette, furfural은 평균 16.41(± 2.45) μg/cigarette이었다. 3R4F의 경우, formaldehyde는 평균 79.24(± 2.32) μg/cigarette, acetaldehyde는 평균 2357.3(± 70.3) μg/cigarette, propanal은 평균 284.41(± 5.41) μg/cigarette, acrolein은 평균 176.38(± 10.51) μg/cigarette, isobutyraldehyde는 평균 58.80(± 0.94) μg/cigarette이었다. Butanal은 평균 37.02(± 0.89) μg/cigarette, crotonaldehyde는 평균 34.27(± 2.43) μg/cigarette, 2-methylbutyraldehyde는 평균 43.39(± 1.26) μg/cigarette, pentanal은 평균 5.12(± 0.21) μg/cigarette, hexanal은 평균 1.98(± 0.31) μg/cigarette, furfural은 평균 19.35(± 2.85) μg/cigarette이었다(표 9).

표 9. 표준담배의 주류연 내 aldehydes의 측정결과

물질명	1R6F, μg/cig.		3R4F, μg/cig.	
	평균	표준편차	평균	표준편차
Formaldehyde	89.48	4.63	79.24	2.32
Acetaldehyde	1903.3	137.0	2357.3	70.3
Propanal	229.57	18.39	284.41	5.41
Acrolein	138.01	10.05	176.38	10.51
Isobutyraldehyde	46.47	2.70	58.80	0.94
Butanal	28.52	2.75	37.02	0.89
Crotonaldehyde	24.07	1.21	34.27	2.43
2-Methylbutyraldehyde	32.41	2.49	43.39	1.26
Pentanal	3.79	0.41	5.12	0.21
3-Methyl-2-butenal	불검출	-	불검출	-
Hexanal	1.35	0.37	1.98	0.31
Furfural	16.41	2.45	19.35	2.85
Heptanal	불검출	-	불검출	-
Octanal	불검출	-	불검출	-
Benzaldehyde	불검출	-	불검출	-
Nonanal	불검출	-	불검출	-
Decanal	불검출	-	불검출	-
Piperonal	불검출	-	불검출	-

6) 국외문헌 비교결과

st.Helen G et al.(11), Forster M et al.(13), CTRP(14), Roemer E et al.(15), Margham J et al.(16), Eldridge A et al.(17), Bodnar JA et al.(18) 등의 문헌상 표준담배 국외결과와 본 연구에서 개발한 시험법으로 분석한 결과 비교시, formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, isobutyraldehyde 등 4종에서 유사한 결과를 확인하였다(표 10).

표 10. 문헌조사 결과와의 비교

연번	물질명	문헌조사 결과 (기존 시험법)		분석결과 (개발 시험법)	
		1R6F	3R4F	1R6F	3R4F
1	Formaldehyde	68 ~104	54 ~95	89	79
2	Acetaldehyde	1552 ~1859	1235~2 200	1903	2357
3	Acrolein	148 ~154	125 ~172	138	176
4	Isobutyraldehyde	39	46	46	59

표 11. Aldehydes의 정밀·정확도 분석결과, 3회 반복실험

물질명		측정농도 (mg/L)	평균±편차	정확도 (%)	정밀도 (%)	물질명		측정농도 (mg/L)	평균±편차	정확도 (%)	정밀도 (%)
Formaldehyde	1	1.02, 0.81, 0.96	0.93±0.108	93	11.6	3-Methyl-2-butenal	1	1.02, 0.88, 1.02	0.97±0.083	97	8.5
	5	4.90, 5.05, 4.76	4.90±0.144	98	2.9		5	4.66, 5.03, 4.60	4.76±0.231	95	4.9
Acetaldehyde	1	1.02, 0.96, 1.03	1.01±0.038	101	3.7	Hexanal	1	0.93, 0.90, 0.93	0.92±0.018	92	2.0
	5	4.83, 5.04, 4.83	4.90±0.125	98	2.6		5	4.59, 4.89, 4.67	4.72±0.153	94	3.2
Propanal	1	1.01, 0.93, 0.98	0.97±0.044	97	4.5	Furfural	1	0.83, 0.85, 0.90	0.86±0.034	86	4.0
	5	4.81, 5.07, 4.85	4.91±0.139	98	2.8		5	4.74, 4.94, 4.89	4.86±0.103	97	2.1
Acrolein	1	1.17, 0.93, 1.06	1.05±0.117	105	11.1	Heptanal	1	0.90, 0.90, 0.93	0.91±0.014	91	1.5
	5	5.06, 5.44, 4.81	5.10±0.318	102	6.2		5	4.70, 4.83, 4.73	4.76±0.068	95	1.4
Isobutyraldehyde	1	1.01, 0.94, 0.96	0.97±0.033	97	3.4	Octanal	1	0.90, 0.88, 0.87	0.88±0.018	88	2.0
	5	4.84, 5.12, 4.80	4.92±0.173	98	3.5		5	4.39, 4.74, 4.58	4.57±0.180	91	3.9
Butanal	1	1.02, 0.93, 0.96	0.97±0.050	97	5.1	Benzaldehyde	1	0.97, 0.91, 0.90	0.93±0.035	93	3.8
	5	4.75, 5.04, 4.84	4.88±0.147	98	3.0		5	4.56, 5.04, 4.86	4.82±0.243	96	5.0
Crotonaldehyde	1	1.02, 0.87, 0.90	0.93±0.080	93	8.6	Nonanal	1	0.90, 0.94, 0.99	0.94±0.046	94	4.9
	5	5.18, 5.36, 4.54	5.03±0.432	101	8.6		5	5.13, 4.59, 4.76	4.83±0.275	97	5.7
2-Methylbutyraldehyde	1	0.94, 0.89, 0.92	0.92±0.028	92	3.0	Decanal	1	0.92, 0.93, 0.97	0.94±0.027	94	2.9
	5	4.80, 5.09, 4.85	4.91±0.154	98	3.1		5	4.92, 5.21, 5.26	5.13±0.185	103	3.6
Pentanal	1	0.98, 0.92, 0.96	0.95±0.032	95	3.4	Piperonal	1	0.91, 0.83, 0.92	0.88±0.047	88	5.4
	5	4.76, 4.99, 4.79	4.85±0.128	97	2.6		5	5.09, 5.45, 4.81	5.12±0.322	102	6.3

표 8. Aldehydes의 방법검출한계와 정량한계

물질명	분석 결과 (mg/L)								검출수준 정보		
									(mg/L)		(μg/cig.)
	데이터 (n=7)							편차	방법검출한계	정량한계	정량한계
Formaldehyde	0.032	0.028	0.027	0.027	0.025	0.028	0.031	0.002	0.008	0.024	1.2
Acetaldehyde	0.024	0.023	0.020	0.021	0.019	0.017	0.021	0.002	0.007	0.023	1.2
Propanal	0.026	0.026	0.025	0.024	0.023	0.023	0.024	0.001	0.004	0.012	0.6
Acrolein	0.038	0.024	0.031	0.017	0.021	0.017	0.039	0.010	0.030	0.095	4.8
Isobutyraldehyde	0.026	0.026	0.025	0.025	0.023	0.024	0.024	0.001	0.004	0.011	0.6
Butanal	0.040	0.039	0.039	0.037	0.038	0.039	0.039	0.001	0.003	0.008	0.4
Crotonaldehyde	0.250	0.239	0.265	0.250	0.236	0.232	0.208	0.018	0.056	0.179	9.0
2-Methylbutyraldehyde	0.025	0.024	0.024	0.023	0.021	0.023	0.024	0.001	0.004	0.012	0.6
Pentanal	0.025	0.024	0.024	0.023	0.023	0.023	0.023	0.001	0.003	0.008	0.4
3-Methyl-2-butenal	0.022	0.020	0.027	0.021	0.020	0.020	0.018	0.003	0.009	0.027	1.4
Hexanal	0.028	0.026	0.027	0.026	0.025	0.024	0.026	0.001	0.004	0.013	0.7
Furfural	0.021	0.017	0.019	0.019	0.017	0.015	0.023	0.003	0.008	0.026	1.3
Heptanal	0.024	0.023	0.024	0.022	0.021	0.021	0.023	0.001	0.004	0.011	0.6
Octanal	0.023	0.021	0.023	0.024	0.023	0.021	0.024	0.001	0.004	0.013	0.7
Benzaldehyde	0.232	0.258	0.216	0.269	0.250	0.222	0.266	0.021	0.067	0.214	10.7
Nonanal	0.223	0.262	0.206	0.242	0.223	0.208	0.231	0.020	0.061	0.195	9.8
Decanal	0.029	0.026	0.026	0.024	0.014	0.020	0.024	0.005	0.016	0.050	2.5
Piperonal	0.207	0.213	0.183	0.167	0.221	0.201	0.203	0.019	0.058	0.185	9.3

참고문헌

1. World Health Organization. 2014. TobLabNet Official Method SOP 03. Standard operating procedure for determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke under ISO and intense smoking conditions.
2. 질병관리청. 2020. KDCA-M-05 LC를 이용한 담배 주류연 내 formaldehyde, acetaldehyde 및 acrolein 분석법(개정).
3. CORESTA. 2014. RECOMMENDED METHOD N° 74. Determination of selected carbonyls in mainstream cigarette smoke by HPLC.
4. World Health Organization. 2018. TobLabNet Official Method SOP 08. Standard Operating Procedure For Determination of Aldehydes in Mainstream Cigarette Smoke Under ISO and Intense Smoking Conditions.
5. Ferreira, A. M. C. et al. 2013. In situ aqueous derivatization as sample preparation technique for gas chromatographic determinations. Journal of Chromatography A, 1296, 70-83.
6. 식품의약품안전평가원, 2015. 담배분석법(Ⅰ): 담배 및 주류연 성분 분석법.
7. Pang, X., & Lewis, A. C. 2011. Carbonyl compounds in gas and particle phases of mainstream cigarette smoke. Science of the total environment, 409(23), 5000-5009.
8. Wright, C. 2015. Standardized methods for the regulation of cigarette-smoke constituents. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 66, 118-127.
9. International Organization for Standardization. 1991. ISO 3402 「Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing」.
10. International Organization for Standardization. 1991. ISO 4387 「Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical cigarette smoking machine」.
11. Helen, G. S. et al. 2018. IQOS: examination of Philip Morris International' s claim of reduced exposure. Tobacco control, 27(Suppl 1), s30-s36.
12. Forster, M. et al. 2018. Assessment of novel tobacco heating product THP1. 0. Part 3: comprehensive chemical characterisation of harmful and potentially harmful aerosol emissions. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 93, 14-33.
13. CTRP. 2017. Certificate of analysis, 1R6F certified reference cigarette.
14. Roemer, E. et al. 2012. Mainstream smoke chemistry and in vitro and in vivo toxicity of the reference cigarettes 3R4F and 2R4F. Beitr Tabakforsch Int, 25(1), 316-335.
15. Margham, J. et al. 2016. Chemical composition of aerosol from an e-cigarette: a quantitative comparison with cigarette smoke. Chemical research in toxicology, 29(10), 1662-1678.
16. Eldridge, A. et al. 2015. Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. Regulatory toxicology and pharmacology, 71(3), 409-427.
17. Bodnar, J. A. et al. 2012. Mainstream smoke chemistry analysis of samples from the 2009 US cigarette market. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 64(1), 35-42.

3 정책연구용역 협력연구

① 여성 흡연조사 개선방안연구

정책연구용역 개요

1. **과제명** : 여성 흡연조사 개선방안 연구
2. **수행기관(연구책임자) :** 신한대학교(김현숙)
3. **연구기간:** 2016.10.~2017.7.
4. **연구주요내용:** 여성 흡연율 추정의 정확도를 향상시키기 위한 설문조사 항목 개발 및 흡연 행태 조사

협력 연구내용 및 방법

1. **협력연구 내용:** 소변 내 니코틴 노출여부 분석을 통한 설문조사 참여대상자의 흡연여부 응답 정확도 검증
2. **분석대상:** 만 19세이상 여성 중 설문조사에서 비흡연으로 응답한 대상자
3. **분석검체량:** 소변 367건
4. **분석항목:** 코티닌 (니코틴 대사산물)
5. **분석방법:** 흡연폐해실험실 내부 확립 시험방법*

* KDCA-M-01 (LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 시험방법)

200 μL의 시료(소변)와 내부표준물질 (480 ng/mL) 50 μL, 100 μL water, 0.85 mL의 acetone을 혼합

▼

10분 이상 4 ℃에서 보관

▼

13,000 r/min으로 30분간 4℃에서 원심분리

▼

상층액 400 μL을 진공원심농축기를 40분 동안 가동하여 acetone 제거

그림 1. Cotinine 및 OH-Cotinine 시험절차표

표 1. LC/MS/MS 기기조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
- ·컬럼유형 : 150 mm × 4.6 mm× 5 μm, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
- ·흐름속도: 1 mL/min
- ·주입량: 5 μL
- ·컬럼오븐 온도: 40 ℃
- ·자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.01	97	3	1
1.00	97	3	1
9.00	70	30	1
10.50	70	30	1
10.51	0	100	1
13.50	0	100	1

▶ MS 조건

-	cotinine	cotinine-d_3	OH-cotinine	OH-cotinine-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	24	28	24	28
단편화전압 (fragmentor voltage)	115	115	135	115
모이온 (precursor ion)	177.0	180.0	192.9	195.9
조각이온 (product ion)	80.1	80.0	80.1	80.0
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)			
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)			
온도(℃)	300			

결 과

설문조사에서 비흡연으로 응답한 만 19세 이상 여성 367명의 검체 분석결과, 316건은 방법검출한계 값 이하(0.1 ng/mL)로 측정 되었으며, 51건은 0.1-24.0 ng/mL로 측정되었다. 총 367건의 소변검체 내 코티닌 함량은 흡연자로 구분 할 수 있는 cut-off 농도인 50 ng/mL 이하로 측정되어 설문조사에 응답한 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

② 흡연이 천식 혹은 COPD 환자의 기도면역계와 마이크로바이옴에 미치는 영향연구

정책연구용역 개요

1. **과제명** : 흡연이 천식 혹은 COPD 환자의 기도면역계와 마이크로바이옴에 미치는 영향연구
2. **수행기관(연구책임자) :** 중앙대학교(정재우)
3. **연구기간:** 2016.10.~2017.9.
4. **연구주요내용:** 천식 혹은 만성폐쇄성폐질환(COPD)에 있어 흡연과 마이크로바이옴의 상관관계 분석

협력 연구내용 및 방법

1. **협력연구 내용**: 소변 내 니코틴 노출여부 분석을 통한 천식 혹은 만성폐쇄성폐질환(COPD) 환자의 흡연여부 확인
2. **조사대상**: 천식 혹은 만성폐쇄성폐질환(COPD) 진단받은 대상자
3. **분석검체량:** 소변 40건
   - 비흡연천식 9건, 흡연천식 21건, 천식-COPD 중복증후군 10건
4. **분석항목:** 코티닌 (니코틴 대사산물)
5. **분석방법:** 흡연폐해실험실 내부 확립 시험방법*

* KDCA-M-01 (LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 시험방법)

200 μL의 시료(소변)와 내부표준물질 (480 ng/mL) 50 μL, 100 μL water, 0.85 mL의 acetone을 혼합

▼

10분 이상 4 ℃에서 보관

▼

13,000 r/min으로 30분간 4℃에서 원심분리

▼

상층액 400 μL을 진공원심농축기를 40분 동안 가동하여 acetone 제거

그림 1. Cotinine 및 OH-Cotinine 시험절차표

표 1. LC/MS/MS 기기조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograh, LC) 조건
·컬럼유형 : 150 mm × 4.6 mm× 5 μm, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)
·흐름속도: 1 mL/min ·주입량: 5 μL
·컬럼오븐 온도: 40 ℃ ·자동시료주입기 온도: 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.01	97	3	1
1.00	97	3	1
9.00	70	30	1
10.50	70	30	1
10.51	0	100	1
13.50	0	100	1

▶ MS 조건

-	cotinine	cotinine-d_3	OH-cotinine	OH-cotinine-d_3
충돌에너지 (CE, collision energy)	24	28	24	28
단편화전압 (fragmentor voltage)	115	115	135	115
모이온 (precursor ion)	177.0	180.0	192.9	195.9
조각이온 (product ion)	80.1	80.0	80.1	80.0
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)			
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)			
온도(℃)	300			

결 과

천식환자 중 흡연자라고 응답한 21명의 소변 내 코티닌 분석결과 19개 검체에서 흡연자 농도(110~3,382 ng/mL)로 측정되었으며, 2개 검체에서는 비흡연자 농도(50 ng/mL 이하)로 측정되었다. 천식환자 중 비흡연자라고 응답한 9명의 소변 내 코티닌 분석결과 1개 검체에서 흡연자 농도(490 ng/mL)로 측정되었으며, 8개 검체에서는 비흡연자 농도(50 ng/mL 이하)로 측정되었다. 또한, 흡연여부를 알지 못하는 천식-COPD 중복증후군 대상자 검체 10건 중 5건은 흡연자 농도(765~2,535 ng/mL)로 측정되었으며, 5건은 비흡연자 농도(50 ng/mL 이하)로 측정되었다. 일부 환자가 응답한 흡연여부와 소변 내 니코틴 노출 분석을 통한 흡연여부 검증결과 상이한 것을 확인할 수 있었다.

③ 액상형 전자담배 사용으로 인한 인체유해성 관련 분석

개요

□ **배경 및 필요성** : 급성 폐손상 의심사례 발생 접수에 따른 '생체지표 분석' 수행

<의뢰검체 개요>

◇ **(종류 및 양)**
소변(40 mL), 전혈(whole blood, 3 mL)

◇ **(채취일·접수일)**
'19.10.3.(목), '19.10.4.(금)

◇ **(검체 ID 및 기타정보)**
20298806, 생년월일(890825), M/30

□ **연구기간** : 2019.10.4.~10.15.

□ **목표** : 급성 폐손상 의심환자의 생체지표 분석 결과 제공

연구내용 및 방법

□ **내용 및 방법**

① 소변 내 생체지표: 질병관리청 표준절차서* (ISO17025 인정 및 In-House 시험법)

* KDCA-M-01 (LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 시험방법), KDCA-M-06 (LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 시험방법)

- 질병관리청 표준절차서(In-House 시험법)

* KDCA-M-08 (LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, HPMA, MHBMA 시험방법)

○ 분석항목: Cotinine, NNAL, SPMA, HPMA, MHBMA

* NNAL, 4-(Methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (담배특이 물질(NNK) 대사체)

SPMA, N-Acetyl-S-(phenyl)-L-cysteine (Benzene 대사체)

HPMA, N-Acetyl-S- (3-hydroxypropyl)-L-cysteine (Acrolein 대사체)

MHBMA, N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl-2-propenyl)-L-cysteine (1,3-butadiene 대사체)

② 혈액 내 중금속: 국내·외 문헌을 참고하여 자체개발(in-house method)한 시험법*에 따라 진행

- Green Cross Laboratories(Korea), Agilent (분석장비 제조사), CDC(USA)

* ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법

○ 분석항목: 니켈(Ni), 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 납(Pb)

결 과

□ **주요결과**

① 소변 내 생체지표 결과: 3회 반복측정 평균값

Cotinine (ng/mL)	NNAL (pg/mL)	HPMA (ng/mL)	SPMA (ng/mL)	MHBMA (ng/mL)	비고
not detected	not detected	260.5	not detected	7.0	QC를 통한 95% 신뢰구간 확인

* 반감기: Cotinine 16-18시간, NNAL 1-2주, SPMA 24시간 이내, HPMA / MHBMA 30시간 이내

○ 결과해석:

- Cotinine, NNAL, SPMA는 생체 내 반감기 등 영향으로 미검출

- HPMA: 선행연구 흡연자 측정 범위(80.9-4030 ng/mL) 내 검출

- MHBMA: 선행연구 흡연자 측정 범위(2.0-17.5 ng/mL) 내 검출

* HPMA 및 MHBMA는 직업적, 환경적 노출에 의해서도 검출 가능

② 혈액 내 중금속 결과: 3회 반복측정 평균값

(단위 : μg/L)

구 분	Ni	Cd	Hg	Pb	비 고
의뢰 1건	0.85	0.20	3.21	12.7	QC를 통한 95% 신뢰구간 확인

○ 결과해석: 국민건강영양조사(이하 국건영)* 중금속 분석 결과 비교 시,

- Cd, Hg, Pb: 평균값(각각 0.91, 3.56, 15.6 μg/L) 이하 검출
- Ni: 평균값(0.33 μg/L) 보다 높음(국건영 결과 범위 0.10~3.81 μg/L)

* 흡연폐해 측정지표 조사를 위한 중금속 검사(2017~2018)

□ **활용내용**

○ 인체 유해성 연구(정책연구용역사업)

- 연구개요

구 분	연구수행기관 연구대상 성분
세포독성 (침지 노출, 에어로졸 형태 노출)	대구가톨릭대학교 의과대학 (용매) 프로필렌글리콜, 글리세린 VEA, 니코틴 (가향) 아세틸, 아세토인, 2,3-펜탄디온
실험동물 흡입독성 (마우스 기도 내 점적 투여)	안전성평가연구소(협력연구) (용매) 프로필렌글리콜, 글리세린 VEA, 니코틴

< 세포독성시험 >

- (침지* 노출) 용매 및 가향물질 2종(디아세틸, 2,3-펜탄디온)의 고용량에서 세포 생존율 감소와 활성산소 발생이 유의미하게 확인

  * 시험물질을 배양액에 희석하여 세포배양 접시에 처리

- (에어로졸 노출) 프로필렌 글리콜의 경우 대부분 처리 농도에서 세포 생존율 감소와 활성산소 발생이 유의미하게 확인

< 실험동물 흡입독성시험 >

- (실험동물 흡입독성) 프로필렌 글리콜(용매) 고용량, 비타민E 아세테이트 전체 농도에서 폐중량 증가, 세포 수 증가, 지질 침착 등 유해성 확인됨. 다만, 국내 액상형 전자담배 내 검출량은 독성이 관찰된 농도보다 낮은 수준

○ 제한점・한계

- 금번 인체 유해성 연구는 단일 성분・단기 노출 결과이므로, 복합 및 장기 노출, 흡연 행태(이중, 삼중), 호흡기 이외의 타 장기에 미치는 영향 등의 연구 필요

Ⅳ 부 록

2015~2020년 흡연폐해실험실 운영 성과보고서

질병관리청
건강위해대응과

Ⅳ. 부록

붙임 1 WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 현황

□ 배경 및 필요성

○ WHO는 2005년 담배규제기본협약(FCTC*)에 따라 **담배 제품** 및 **배출물 (담배연기)** 성분의 **측정** 및 **공개**를 위한 협의체를 구성

* Framework Convention on Tobacco Control

- 담배 규제에 필요한 **담배제품 시험** 및 **연구**의 **글로벌 역량** 확보, 담배제품 및 배출물 검사를 위한 **시험법 개발·개선, 신설 실험실 지원**, 담배제품 모니터링 결과에 대한 **정보교환** 등

* '21.5월 미국, 캐나다, 중국, 일본 등 31개국 가입, 우리나라는 식약처('16.3월), 질병관리청('17.10월)

□ 추진경과

○ ('16.01.) 舊질병관리본부 흡연폐해실험실 WHO TobLabNet 가입 신청서 제출 및 관심회원* 자격 획득

* 담배성분 분석을 위한 설비는 없지만 관련이 많은 기관(예: US 국립암센터 등) 또는 현재 최소 충족조건을 갖추지 못했지만 실험실을 갖추려는 기관

○ ('17.08.21) 흡연폐해실험실, 담배성분시험법 'ISO17025' 기준 인정

○ ('17.10.16) WHO TobLabNet 분석회원* 자격 획득

< *분석회원 요건 >

✓ (궐련) 주류연의 nicotine·tar·carbon monoxide 측정역량 보유

✓ (담배) nicotine 측정역량 보유

✓ **국제공인**(ISO 17025) **인정 획득**

✓ 담배성분 분석에 관한 품질보증 절차 이행의지 (숙련도시험 등)

< 참고① : WHO TobLabNet에 의한 표준시험법 현황('20.12월 기준)>

구분	시험법	분석성분	분석대상	최종업데이트일
SOP 1	자동흡연장비 분석조건	-	궐련	2012.04
SOP 2	담배 성분 및 배출물 분석 검증	-	담배 주류연기·filler	2016.12
SOP 3	담배 주류연기 내 담배특이니트로사민류 분석(ISO/HCI조건)	NNN,NNK,NAT,NAB	담배 주류연기	2014.06
SOP 4	담배 filler 내 nicotine 분석.	nicotine	담배 filler	2014.06
SOP 5	담배 주류연기 내 벤조아피렌 분석(ISO/HCI조건)	벤조아피렌	담배 주류연기	2015.02
SOP 6	담배 filler 내 흡습성물질류 분석	프로필렌글리콜, 글리세린,트리에틸렌 글리콜	담배 filler	2016.06
SOP 7	담배 filler 내 암모니아 분석	암모니아	담배 filler	2016.07
SOP 8	담배 주류연기 내 aldehydes 분석(ISO/HCI조건)	formaldehyde, acetaldehyde, acrolein	담배 주류연기	2018.08.
SOP 9	담배 주류연기 내 휘발성 유기화합물류 분석 (ISO/HCI조건)	benzene, 1,3-부타디엔	담배 주류연기	2018.08.
SOP 10	담배 주류연기 내 nicotine, carbon monoxide 분석 (HCI조건)	nicotine, carbon monoxide	담배 주류연기	2016.09.

< 참고② : WHO TobLabNet 회원 실험실현황('18.3.기준, 28개국, 34기관)>

연 번	국 가(기관)	참여 기관
1	부르키나파소(1)	Laboratoire National de Santé Publique
2	캐나다(1)	Labstat International ULC
3	코스타리카(1)	Instituto Constaricence de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud(INCIENSA)
4	멕시코(1)	National Institute of Public Health
5	미국(5)	Centers for Disease Control and Prevention
		Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau(TBB)
		Battelle Public Health Center for Tobacco Research
		Virginia Commonwealth University
		National Cancer Institute
6	인도(1)	Directorate General of Health Services
7	인도네시아(1)	National Agency of Drug and Food control
8	알바니아(1)	Institute of Public Health
9	불가리아(1)	Tobacco and Tobacco Products Institute
10	핀란드(1)	National Supervisory Authority for Welfare and Health
11	프랑스(1)	Laboratoire National de Métrologie et d'Essais
12	독일(1)	Federal Institute for Risk Assessment(BfR)
13	그리스(1)	General Chemical State Laboratory of Greece
14	아일랜드(1)	State Laboratory
15	이탈리아(1)	European Commission, Joint Research Centre
16	리투아니아(1)	National Public Health Surveillance Laboratory
17	네덜란드(1)	Laboratory for Health Protection Research of the Dutch National Institute for Public Health and the Environment
18	러시아 연방(1)	All-Russia Research Institute of Tobacco, Makhorka and Tobacco Products
19	스페인(1)	Agrarian and Food Laboratory
20	스위스(1)	L'Institut universitaire romand de santé au travail(IST) Lausanne
21	우크라이나(1)	L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology
22	레바논(1)	American University of Beirut
23	아랍에미리트 연합국(1)	National Laboratory and Research Center
24	중국(2)	China Centers for Disease and Control and Prevention
		Institute of Tobacco Safety and Control
25	일본(1)	National Institute of Public Health
26	대한민국(2)	Ministry of Food and Drug Safety(식품의약품안전처)
		Korea Centers for Disease Control and Prevention(舊 질병관리본부)
27	싱가포르(1)	Health Sciences Authority
28	베트남(1)	National Institute of Occupational and Environmental Health

※ 출처: WHO Tobacco Product Regulation: Building laboratory testing capacity, 2018

붙임 2 흡연폐해실험실 바이오마커 측정기술 확보 현황

<table>
<tr><th>구분</th><th>모성분</th><th colspan="3">Nicotine</th><th colspan="3">Cotinine</th></tr>
<tr><td rowspan="4">니코틴
(Nicotine)</td><td>대사체</td><td colspan="3">① Cotinine</td><td colspan="3">② OH-Cotinine</td></tr>
<tr><td>정립
배경</td><td colspan="6">○ Nicotine은 美FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있음
○ Nicotine의 70-80%가 cotinine으로 대사되며, 체내 반감기가 짧은 nicotine(약 2시간)에 비해 cotinine은 상대적으로 반감기가 18-20 시간으로 길어, nicotine 노출여부를 확인하기 위한 바이오마커로 활용
○ cotinine으로부터 대사되는 OH-cotinine을 측정함으로써, cotinine과 OH-cotinine의 함량비를 이용하여 nicotine 대사율(NMR)을 산출하는데 활용하기 위해 우선 선정</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="6">(KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 및 trans-3'-hydroxycotinine 분석 지침서</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="6">○ 흡연폐해실험실* 분석기반 역량강화
* WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원
○ 국제공인기관 시험법(화학시험/임상, 02.029) 인정
* 국내 화학시험/임상(02.029) 분야 인정기관은 질병관리청이 유일함
○ 외부연구과제 정도관리 참여 및 협력연구</td></tr>
<tr><td rowspan="5">담배특이
니트로스
아민류
(TSNAs)</td><td>모성분</td><td colspan="3">NNK</td><td colspan="3">NNN</td></tr>
<tr><td>대사체</td><td colspan="3">③ NNAL</td><td colspan="3">④ NNN</td></tr>
<tr><td>정립
배경</td><td colspan="6">○ NNK와 NNN은 담배로부터 발생하는 특이지표성분으로써, 美FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있으며, 1급 발암물질로 지정되었음
○ NNK로부터 대사되는 NNAL은 체내 반감기가 약 2-3주로 길어 직·간접 흡연 노출 생체지표로 유용하게 활용되며, NNAL과 동시분석법에 적용하여 2개 발암물질 노출여부를 분석하는데 활용하기 위해 우선 선정</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="6">(KDCA-M-06) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석 지침서</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="6">○ 흡연폐해실험실* 분석기반 역량강화
* WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원
○ 국제공인기관 시험법(화학시험/임상, 02.029) 인정
* 국내 화학시험/임상(02.029) 분야 인정기관은 질병관리청이 유일함</td></tr>
<tr><td rowspan="4">휘발성
유기
화합물
(VOCs)</td><td>모성분</td><td colspan="2">Acrolein</td><td colspan="2">Benzene</td><td colspan="2">1,3-Butadiene</td></tr>
<tr><td>대사체</td><td colspan="2">⑤ 3-HPMA</td><td colspan="2">⑥ SPMA</td><td colspan="2">⑦ MHBMA</td></tr>
<tr><td>정립
배경</td><td colspan="6">○ Acrolein, Benzene, 1,3-Butadiene은 美FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있으며, 1급 또는 3급 발암물질로 지정되었음
○ 흡연 또는 환경적 영향에 의해 소변에서 검출되는 바이오마커로 활용되는 휘발성 유기화합물(VOCs)의 대사체 3종을 우선적으로 선정하여 정립함</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="6">(KDCA-M-08) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, 3-HPMA, MHBMA 분석 지침서</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="6">○ 흡연폐해실험실* 분석기반 역량강화
* WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원</td></tr>
</table>

<table>
<tr><th>구분</th><th>혈액
(4종)</th><th colspan="2">Nickel</th><th colspan="2">Cadmium</th><th colspan="2">Mercury</th><th colspan="2">Lead</th></tr>
<tr><td rowspan="4">중금속류
(Heavy metals)</td><td>소변
(6종)</td><td colspan="2">Aluminium</td><td colspan="2">Chromium</td><td colspan="2">Nickel</td><td colspan="2">Cadmium</td><td colspan="2">Tin</td><td colspan="2">Lead</td></tr>
<tr><td>정립
배경</td><td colspan="12">(혈액)
○ 흡연폐해실험실 내 중금속 분석실 마련('17) 및 흡연폐해 관련연구·대응을 위한 분석역량 확보
○ 흡연폐해실험실 임상분야 공식분석법 마련(공문시행, '19.12)

(소변)
○ 가열담배 등 다양한 유형의 담배가 출시되고 있고, 기존 궐련담배 대비 위험저감효과를 홍보하며 흡연자의 건강을 위협하고 있음
○ 금속형태의 장치를 활용하여 흡연하는 전자담배, 가열담배 등의 경우에도 중금속 노출이 우려됨
○ 다양한 흡연유형(궐련담배, 가열담배, 전자담배, 듀얼유저 등)별 흡연자의 소변 내 중금속 양 측정을 통해 노출정도 파악 필요</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="12">○ ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법
○ ICP-MS를 이용한 소변 내 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Tin 및 Lead 시험검사법</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="12">○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화
○ 흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범 연구(소변 내 중금속 분석을 중심으로) 수행에 활용</td></tr>
<tr><td rowspan="5">휘발성
유기
화합물
(VOCs)</td><td rowspan="3">성분
(13종)</td><td colspan="3">Isoprene</td><td colspan="3">1,3-Pentadiene</td><td colspan="3">2-Methylfuran</td><td colspan="3">2-Butanone</td></tr>
<tr><td colspan="3">Benzene</td><td colspan="3">2-Pentanone</td><td colspan="3">Toluene</td><td colspan="3">1-Butanol</td></tr>
<tr><td colspan="2">Pyridine</td><td colspan="3">1-Pentanol</td><td colspan="3">Cyclopentanol</td><td colspan="3">Cis-3-hexen-1-ol</td><td colspan="2">Pyrrole</td></tr>
<tr><td>정립
배경</td><td colspan="12">○ 흡연자의 담배연기(주류연, 부류연)로부터 발생하는 간접흡연 이외에도 흡연 후 실내에서 호흡하는 가운데 호기(날숨)에서 유래하는 간접흡연의 피해를 비흡연자들은 겪고 있음
○ 간접흡연 연구의 일환으로, 흡연자의 흡연 후 호기 내 성분분석을 통한 과학적 근거자료 마련</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="12">GC-MS를 이용한 호기 내 VOCs(Isoprene 외 12종)시험검사법</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="12">○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화
○ 흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범 연구(호기 내 유해성분 분석을 중심으로) 수행에 활용, 논문 게재
○ 신종담배 배출물 성분 스크리닝 기초연구('20) 시험법으로 활용</td></tr>
</table>

<참고 : 흡연폐해실험실 바이오마커 측정관련 품질보증현황>

구분		필요성	수행주기	세부내용
시험방법의 유효성 확인		채택한 시험 방법이 의도한 목적에 적합하다는 것을 시험, 평가 등 과학적 기법을 사용하여 이를 객관적으로 입증하기 위함	최초 시험법 정립 시	○ 시험법별* 유효화보고서 마련 - 직선성, 정확성, 정밀성, 매질효과, 회수율 재현성 등 시험방법에 대한 유효성 확인 * (KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 Cotinine 및 trans-3'-hydroxycotinine 분석 지침서 * (KDCA-M-06) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석 지침서 * (KDCA-M-08) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, 3-HPMA, MHBMA 분석 지침서 * ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법 * ICP-MS를 이용한 소변 내 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Tin 및 Lead 시험검사법 * GC-MS를 이용한 호기 내 VOCs (Isoprene 외 12종)시험검사법
측정불확도 평가		측정값의 불확실한 정도를 산출함으로써 측정값의 합리적인 추정값을 제공하기 위함	시험성적서 발행* 또는 내·외부 교정 시 * 고객이 요구한 경우에 한함	○ 시험항목별 측정불확도 산출보고서 마련 - 측정값에 영향을 줄 수 있는 주요 요인*에 따른 불확실한 정도 반영 * 표준물질의 순도, 피펫 및 초자의 불확도, 시험자의 재현정밀도 등
결과의 유효성 보장	내부 정도관리	결과의 변동성을 확인하고 안정된 방식으로 그 결과가 유지되는지 검증하기 위함	연1회	○ 시험자간 비교시험 - 화학/임상(02.029) 시험자간 비교시험 결과 산출 * 결과의 적절성 여부는 t-검정, 분산분석 등의 통계적 기법을 활용
	외부 정도관리		연1회	○ 국외숙련도 시험참가 - 운영기관: G-EQUAS (독일외부품질평가기관) - 참가시료: 소변 - 참가항목 · (2016, 1종) Cotinine · (2017, 2종) Cotinine, NNAL · (2018 - 2020, 5종) Cotinine, NNAL, SPMA, MHBMA, HPMA - 참가결과: 적합
				○ 국외숙련도 시험참가 - 운영기관 Oneworld Accuracy External Quality Assessment (호주외부품질평가기관) - 참가시료: 소변 - 참가항목 · (2020, 1종) Cotinine - 참가결과: 적합

붙임 3 흡연폐해실험실 담배성분 측정기술 확보 현황

구분	세 부 내 용				
	성분명	Nicotine	Water	Tar	CO
니코틴등 (Nicotine)	정립 배경	○ 국가 금연정책이 필요로 하는 과학적 근거(Evidence)를 지속·체계적으로 창출 ○ WHO 담배규제기본협약(FCTC) 이행* * 회원국에 담배성분 규제를 위한 성분분석 역량을 보유할 것을 권고 ○ WHO TobLabNet 가입을 위한 필수 시험법			
	정립 시험법	(KDCA-M-02) GC를 이용한 담배 주류연 내 NFDPM(Tar) 분석 (KDCA-M-03) GC를 이용한 담배 중 filler 내 Nicotine 분석 (KDCA-M-07) NDIR법을 이용한 담배연기의 증기상 내 carbon monoxide 분석			
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화 ○ tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구수행에 활용 ○ 국제공인기관 시험법(화학시험/기타재료 및 제품, 02.008) 인정 * WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원 자격 요건 충족 ○ 국외숙련도 참가를 통한 측정값 적합 유지			
담배특이 니트로스 아민류 (TSNAs)	성분명	NNK	NNN	NAT	NAB
	정립 배경	○ 국가 금연정책이 필요로 하는 과학적 근거(Evidence)를 지속·체계적으로 창출 ○ WHO 담배규제기본협약(FCTC) 이행* * 회원국에 담배성분 규제를 위한 성분분석 역량을 보유할 것을 권고 ○ WHO TobLabNet Official Method SOP 우선순위 제시항목(NNN, NNK)으로 TSNAs 동시시험법 정립			
	정립 시험법	(KDCA-M-04) LC-MS/MS를 이용한 담배 주류연 내 TSNAs 분석			
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화 ○ tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구수행에 활용 ○ 국제공인기관 시험법(화학시험/기타재료 및 제품, 02.008) 인정 ○ 국외숙련도 참가를 통한 측정값 적합 유지			
카르보닐류 (Carbonyls)	성분명	Formaldehyde	Acetaldehyde	Acrolein	
	정립 배경	○ WHO TobLabNet Official Method SOP 우선순위 제시항목에 모두 포함되고, 3종 모두 발암물질로 인체유해성이 확인됨 ○ formaldehyde는 1급 발암물질(IARC 1), acetaldehyde는 2급 발암물질(IARC 2B), acrolein은 3급 발암물질(IARC 3)에 해당되며, 담배 연기 내 함량을 파악하기 위해 우선 선정			
	정립 시험법	(KDCA-M-05) LC를 이용한 담배 주류연 내 formaldehyde, acetaldehyde 및 acrolein 분석			
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화 ○ tar함량별 담배 주류연 내 성분분석 연구수행에 활용 ○ 국제공인기관 시험법(화학시험/기타재료 및 제품, 02.008) 인정 ○ 국외숙련도 참가를 통한 측정값 적합 유지			

<table>
<tr><th rowspan="3">구분</th><th colspan="7">세 부 내 용</th></tr>
<tr><th rowspan="3">성분명</th><th>Formaldehyde</th><th>Acetaldehyde</th><th>Propanal</th><th>Butanal</th><th>Pentanal</th><th>Hexanal</th></tr>
<tr><th>Heptanal</th><th>Octanal</th><th>Nonanal</th><th>Decanal</th><th>Acrolein</th><th>Benzaldehyde</th></tr>
<tr><th>Crotonaldehyde</th><th>Furfural</th><th>Isobutyraldehyde</th><th>Piperonal</th><th>2-Methylbutyraldehyde</th><th>3-Methyl-2-butenal</th></tr>
<tr><td rowspan="3">알데히드류
(Aldehydes)</td><td>정립
배경</td><td colspan="6">○ 발암물질이 다수 포함되어 있는 aldehydes(formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, 푸르푸랄, 크로톤알데히드 등)는 다양한 유형의 담배 배출물 내에서 계속 검출되고 있음
○ WHO TobLabNet Official Method SOP 우선순위 제시항목에 포함되는 formaldehyde, acetaldehyde, acrolein을 비롯하여 담배 연기 내 다양한 aldehydes를 동시에 신속분석할 수 있는 시험법 개발</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="6">GC-MS를 이용한 담배 주류연 내 Aldehydes 18종 시험검사법</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="6">○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화
○ 신종담배 배출물 내 aldehydes 시험법 개선('20)에 활용</td></tr>
<tr><td rowspan="4">휘발성
유기
화합물류
(VOCs)</td><td>성분명</td><td>1,3-Butadiene</td><td>Benzene</td><td>Isoprene</td><td>Toluene</td><td>Acrylonitrile</td><td></td></tr>
<tr><td>정립
배경</td><td colspan="6">○ 1,3-부타디엔, benzene 등은 WHO TobLabNet Official Method SOP 우선순위 제시항목에 포함되고, 5종 모두 발암물질로 인체유해성이 확인되며 동시분석이 가능함
○ 1,3-부타디엔은 1급 발암물질(IARC 1), benzene은 1급 발암물질(IARC 1), 이소프렌은 2급 발암물질(IARC 2B), 톨루엔은 3급 발암물질(IARC 3), 아크릴로니트릴은 2급 발암물질(IARC 2B)에 해당되며, 담배 연기 내 함량을 파악하기 위해 우선 선정</td></tr>
<tr><td>정립
시험법</td><td colspan="6">GC-MS를 이용한 담배 주류연 내 휘발성 유기화합물 5종 분석</td></tr>
<tr><td>활용
성과</td><td colspan="6">○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화</td></tr>
</table>

<참고 : 흡연폐해실험실 담배(배출물 포함)성분 측정관련 품질보증현황>

구분		필요성	수행주기	세부내용
시험방법의 유효성 확인		채택한 시험 방법이 의도한 목적에 적합하다는 것을 시험, 평가 등 과학적 기법을 사용하여 이를 객관적으로 입증하기 위함	최초 시험법 정립 시	○ 시험법별* 유효화보고서 마련 - 직선성, 정밀·정확성(회수율), 검출한계, 정량한계 등 시험방법에 대한 유효성 확인 * (KDCA-M-02) GC를 이용한 담배 주류연 내 NFDPM(Tar) 분석 지침서 * (KDCA-M-03) GC를 이용한 담배 중 filler 내 Nicotine 분석 지침서 * (KDCA-M-04) LC-MS/MS를 이용한 담배 주류연 내 TSNAs 분석 * (KDCA-M-05) LC를 이용한 담배 주류연 내 formaldehyde, acetaldehyde 및 acrolein 분석 * (KDCA-M-07) NDIR법을 이용한 담배연기의 증기상 내 carbon monoxide 분석 지침서
측정불확도 평가		측정값의 불확실한 정도를 산출함으로써 측정값의 합리적인 추정값을 제공하기 위함	시험성적서 발행* 또는 내·외부 교정 시 * 고객이 요구한 경우에 한함	○ 시험항목별 측정불확도 산출보고서 마련 - 측정값에 영향을 줄 수 있는 주요 요인*에 따른 불확실한 정도 반영 * 표준물질의 순도, 피펫 및 초자의 불확도, 시험자의 재현정밀도 등
결과의 유효성 보장	내부 정도관리	결과의 변동성을 확인하고 안정된 방식으로 그 결과가 유지되는지 검증하기 위함	연1회	○ 시험자간 비교시험 - 화학/기타재료 및 제품(02.008) 시험자간 비교시험 결과 산출 * 결과의 적절성 여부는 F-검정, t-검정 등의 통계적 기법을 활용
	외부 정도관리		1회 이상/3년 (숙련도시험 프로그램에 준함)	○ 국외 숙련도 시험참가 - 운영기관: CTRP(Center for Tobacco Reference Products)* * 美켄터키대학 내 담배참조제품센터 - 참가시료: 표준담배(1R6F) 주류연 - 참가항목 및 조건(ISO/HCI법) · (2016, 4종) Nicotine, CO, Water, Tar · (2017, 3종) Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein · (2018, 4종) NNK, NNN, NAT, NAB · (2020, 3종) Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein · (2020, 4종) Nicotine, CO, Water, Tar · (2021, 5종) NNK, NNN, NAT, NAB - 참가결과: 모두 적합

붙임 4 시험법 정립 및 공인시험기관 인정현황

구분	내용	세부 분석대상	시험법* 정립						KOLAS 인정				
			´16	´17	´18	´19	´20	´21	´17	´18	´19	´20	´21
담배 성분	Nicotine	Nicotine							○				◎
담배 연기	Tar	Nicotine							○				◎
		Water							○				◎
		Tar							○				◎
	TSNAs	NNN							○				◎
		NNK											
		NAB											
		NAT											
	Carbonyls	Formaldehyde							○				◎
		Acetaldehyde											
		Acrolein											
	CO	CO								○			◎
	Benzo[a]pyrene	Benzo[a]pyrene											
	VOCs	Benzene											
		1,3-Butadiene											
생체 시료	Nicotine	Cotinine								○			◎
		OH-Cotinine								○			◎
	NNK	NNAL								○			◎
	NNN	NNN								○			◎
	Heavy metals (Blood) ※Urine: Al, Cr, Ni, Cd, Tin, Pb	Lead											
		Mercury											
		Cadnium											
		Nickel											
	Benzene	SPMA											
	1,3-Butadiene	MHBMA											
	Acrolein	HPMA											

* 시험법선정기준 : WHO TobLabNet Official Method SOP 우선순위 제시항목 등 참고

** TSNAs, Tobacco Specific Nitrosamines; NNN, 3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine; NNK, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; NAB, N-nitrosoanabasine; NAT, N-nitrosoanatabine; VOCs, Volatile Organic Compounds; Tar=Total Particle Matters(TPM)-Nicotine - Water; CO, Carbon monoxide; NNAL, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; SPMA, S-phenyl mercapturic acid MHBMA, monohydroxy-3-butenyl mercapturic acid; HPMA, 3-hydroxypropyl mercapturic acid

※ ◎ : 갱신

< 외부기관 숙련도시험 참가 >

참여항목	분석대상	주관기관
담배 주류연 내 aldehydes	Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein	University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products
담배 주류연 내 tar 등	Tar, nicotine, water, CO, TPM, puff count	University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products
소변 내 Cotinine	Cotinine	Oneworld Accuracy External Quality Assessment
소변 내 흡연 바이오마커 5종	Cotinine, NNAL, SPMA, 3-HPMA, MHBMA	German-External Quality Assessment Scheme
담배 주류연 내 TSNAs 4종	NNK, NAB, NNN, NAT	University of Kentucky Center for Tobacco Reference Products

< 교육훈련 >

교육명	교육기관
KOLAS 종사자 보수교육	한국시험인증산업협회
KS Q ISO/IEC 17025:2017 (시험)	한국인정지원센터
AAS, ICP, ICP-MS를 활용한 금속 분석 실무	한국건설생활환경 시험연구원(KCL)
천연물 유효(지표)성분 분석 실무	한국건설생활환경 시험연구원(KCL)

붙임 5 흡연폐해실험실 수행 과제 리스트('15-'20)

연도	연번	구분	항목	세부내용	연구기간	소요예산 (천원)	건수
2015	1	-	통계	시험소활용 통계 및 비교시험 실습	'15.05	-	-
	2	-	ISO17025 인정	화학(환경)분야 불확도 추정실무	'15.08	-	-
	3	-	시험법 기술이전 (Tobacco Products and Biomarkers Method Training)	美CDC 흡연관련 분석프로그램 참여	'15.08	-	-
2016	4	궐련담배 주류연	시험법 정립	aldehydes 3종(Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein)	'16.05 ~ '16.08 (4개월)	10,000	1
	5		시험 기관간* 비교시험	Tar, Nicotine, Water, Carbon monoxide, ISO/HCI 조건 *재)한국건설생활환경시험연구원 vs 충북대 vs 한국필립모리스(주)	'16.02. ~ '16.04. (3개월)	2,000	2
	6		국외 숙련도 참가		'16.04. ~ '16.05. (2개월)	2,000	1
	7	담배filler	시험법 정립	Nicotine	'16.09 ~ '16.10. (2개월)	1,000	1
	8		내부 연구	가향성분 등 스크리닝 정성분석	'16.08 ~ '16.10 (3개월)	1,000	5
	9	캡슐담배 내 캡슐 2종				1,000	2
	10	캡슐담배 주류연				1,000	8
	11	생체시료 (nicotine 대사체)	시험법 정립	소변 내 2종 (Cotinine, OH-cotinine)	'16.07 ~ '16.10 (4개월)	3,000	1
	12		내부 연구	소변 내 7종 (Nicotine, Cotinine N-oxide, Norcotinine, Anatabine, Nicotine N-oxide, Nornicotine, Anabasine) 정성분석	'16.05 (1개월)	3,000	1
	13		시험 기관간* 비교시험	소변 내 Cotinine * 국립암센터 vs 씨젠의료재단 vs 질병관리본부	'16.07 ~ '16.11 (5개월)	3,000	120
	14			소변 내 Cotinine * 순천향대학교 vs 질병관리본부			3
	15		국외 숙련도 참가	소변 내 Cotinine	'16.11 (1개월)	2,000	1

연도	연번	구분	항목	세부내용	연구기간	소요예산 (천원)	건수
2017	16	궐련담배 주류연	시험법 정립	Benzene, 1,3-Butadiene, Toluene, Isoprene, Acrylonitrile, Vinyl Chloride 등 휘발성 유기화합물 6종	'16.10 ~ '17.03 (6개월)	10,000	1
	17			담배 특이니트로사민류 4종(NNK, NNN, NAT, NAB), ISO/HCI 조건	'17.03. ~ '17.05. (3개월)	2,500	1
	18		국외 숙련도 참가		'17.10. ~ '17.12. (2개월)	2,500	1
	19			Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein 등 3종, ISO/HCI 조건	'17.03 ~ '17.05 (3개월)	7,000	1
	20	생체시료 (nicotine 대사체)	정책 연구용역 시료분석 지원	소변 내 Cotinine (건강영양조사과 발주(2016~2017), 여성흡연조사 개선방안 연구)	'17.05 ~ '17.06 (4개월)	8,000	367
	21			소변 내 Cotinine (호흡기알레르기질환과 발주(2016~2017), 흡연이 천식 혹은 COPD 환자의 기도면역계와 마이크로바이옴에 미치는 영향연구)	'17.07 (1개월)	1,000	40
	22		국외 숙련도 참가	소변 내 Cotinine	'17.11 (1개월)	2,000	1
	23	생체시료 (담배특이 성분(TSNAs) 대사체)		소변 내 NNAL			1
	24		시험법 정립	소변 내 2종 (NNAL, NNN)	'17.07 ~ '17.10 (4개월)	10,000	1
2018	25	궐련형 전자담배 (iQOS) 배출물	내부 연구	Tar, Nicotine, Water	'17.12. ~ '18.01. (2개월)	3,000	1
	26	궐련담배 주류연		Tar, Nicotine, Water, Carbon monoxide, 담배 특이니트로사민류 4종(NNK, NNN, NAT, NAB)	'17.09 ~ '18.02 (6개월)	14,000	16
	27			Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein 등 3종			16
	28	담배연기 추출물 (CSE)	시험법 정립	Nicotine *세포독성실험 공동연구	'18.10 ~ '18.11 (2개월)	2,000	1
	29		내부 연구*				18
	30	생체시료 (중금속류)	시험법 정립	혈액 내 니켈(Ni), 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 납(Pb)	'18.03 ~ '18.11 (9개월)	10,000	1

연도	연번	구분	항목	세부내용	연구기간	소요예산 (천원)	건수
	31	생체시료 (nicotine 대사체)	시험 기관간 비교 시험	소변 내 Cotinine * 국립암센터 vs 질병관리본부 (국민건강영양조사 제7기 진단의학검사 질관리 검체)	'18.07 (1개월)	1,000	50
	32		국외 숙련도 참가	소변 내 Cotinine	'18.11 (1개월)	5,000	1
	33	생체시료 (담배특이 성분(TSNAs) 대사체)		소변 내 NNAL			1
	34	생체시료 (휘발성 유기화합물 (VOCs) 대사체)		소변 내 3종 (SPMA, 3-HPMA, MHBMA)			1
	35		시험법 정립		'18.07 ~ '18.10 (4개월) (1개월)	9,000	1
2019	36	궐련담배 주류연	시험법 정립	Formaldehyde, acetaldehyde, propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, acrolein, crotonaldehyde, 3-methyl-2-butenal, isobutyraldehyde, 2-methyl butyraldehyde, benzaldehyde, piperonal, furfural 등 aldehydes 18종	'18.01 ~ '19.12 (24개월)	20,000	1
	37	담배연기 추출물 (CSE)	내부 연구*	Nicotine *서포독성실험 공동연구	'19.04 ~ '19.05 (2개월)	2,000	8
	38	생체시료 (VOCs, semi-VOCs)	시험법 정립	흡연자(비흡연자 포함) 호기 내 Isoprene, 1,3-pentadiene, 2-methylfuran, 2-butanone, benzene, 2-pentanone, toluene, 1-butanol, pyridine, 1-pentanol, cyclopentanol, cis-3-hexen-1-ol, pyrrole 등 13종	'19.06 ~ '19.10 (5개월)	10,000	1
	39	생체시료 (중금속류)	시험법 정립	소변 내 알루미늄(Al), 크롬(Cr), 니켈(Ni), 카드뮴(Cd), 주석(Sn), 납(Pb) 등 중금속류 6종	'19.09 ~ '19.10 (2개월)	5,000	1
	40		시험 기관간 비교 시험	혈액 내 니켈(Ni), 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 납(Pb) 등 4종, 시험법 유효화에 활용 * 녹십자 의료재단(용역과제 수행기관) vs 질병관리본부 흡연폐해실험실	'19.07 ~ '19.09 (3개월)	5,000	10
	41	외부 의뢰시료	액상형 전자담배 폐손상 의심사례	혈액 내 니켈(Ni), 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 납(Pb) 등 4종	'19.10 (1개월)	1,000	1

연도	연번	구분	항목	세부내용	연구기간	소요예산 (천원)	건수
	42			소변 내 5종(Cotinine, NNAL, SPMA, 3-HPMA, MHBMA)		2,000	1
	43	생체시료 (nicotine 대사체)	시험 기관간 비교 시험	소변 내 Cotinine * 삼성서울병원 vs 질병관리본부 (국민건강영양조사 제8기 진단의학검사 질관리 검체)	'19.10 ~ '19.11 (1개월)	2,000	96
	44		국외 숙련도 참가	소변 내 Cotinine	'19.11 (1개월)	5,000	1
	45	생체시료 (담배특이 성분(TSNAs) 대사체)		소변 내 NNAL			1
	46	생체시료 (휘발성 유기화합물 (VOCs) 대사체)		소변 내 3종 (SPMA, 3-HPMA, MHBMA)			1
2020	47	표준담배 주류연	국외 숙련도 참가	Tar, Nicotine, Water, Carbon monoxide, ISO/HCI 조건	'20.05. ~ '20.06. (2개월)	5,000	1
	48			담배 특이니트로사민류 4종(NNK, NNN, NAT, NAB), ISO/HCI 조건	'20.08. ~ '20.10. (10.29. 완료예정)	4,000	1
	49			Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein 등 3종, ISO/HCI 조건	'20.03 ~ '20.04 (2개월)	5,000	1
	50	신종담배 배출물	시험법 정립	Formaldehyde, acetaldehyde, propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, acrolein, crotonaldehyde, 3-methyl-2-butenal, isobutyraldehyde, 2-methyl butyraldehyde, benzaldehyde, piperonal, furfural 등 aldehydes 18종	'20.08 ~ '20.09 (2개월)	5,000	1
	51		내부 연구	Non-target(screening) 정성 기초연구	'20.03 ~ '20.5 (3개월)	2,000	1
	52	담배연기 추출물 (CSE)	내부 연구*	Nicotine *세포독성확인	'20.02 ~ '20.08 (7개월)	2,000	18
	53	생체시료 (VOCs, semi-VOCs)	내부 연구	흡연자(비흡연자 포함) 호기 내 Isoprene, 1,3-pentadiene, 2-methylfuran, 2-butanone, benzene, 2-pentanone, toluene, 1-butanol, pyridine, 1-pentanol, cyclopentanol, cis-3-hexen-1-ol, pyrrole 등 13종	'19.11 ~ '20.09 (10개월)	10,000	40

연도	연번	구분	항목	세부내용	연구기간	소요예산 (천원)	건수
	54	생체시료 (중금속류)	내부 연구	흡연자(비흡연자 포함) 소변 내 알루미늄(Al), 크롬(Cr), 니켈(Ni), 카드뮴(Cd), 주석(Sn), 납(Pb) 등 중금속류 6종	'20.03 ~ '20.04 (2개월)	5,000	44
	55	생체시료 (nicotine, TSNAs, VOCs 대사체)	시험 기관간 비교 시험	소변 내 Cotinine * 삼성서울병원 vs 질병관리본부 (국민건강영양조사 제8기 진단의학검사 질관리 검체)	'20.10 (10.30.완료예정)	1,000	50
	56		국외 숙련도 참가	소변 내 Cotinine	'20.11 (11.19.완료예정)	6,000	2
	57			소변 내 NNAL			1
	58			소변 내 3종 (SPMA, 3-HPMA, MHBMA)			1
	59		내부 연구	궐련과의 복합사용에 따른 소변 내 cotinine, NNAL 함량 비교 시범연구	'20.06 ~ '20.07 (2개월)	9,000	44
	60	생체시료 (가열담배 특이 바이오마커)	내부 연구	궐련담배 대비 가열담배 흡연으로 인해 다량 노출되는 물질 조사 및 3종 표준물질 시험법 정립	'19.12 ~ '20.07 (8개월)		1

붙임 6 흡연폐해실험실 장비현황(표)

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액
1	가스크로마토그라피 GC	Agilent technologies, CN/7890B	Nicotine, Water(tar측정), Humectants (Triethylene glycol, Glycerol, Propylene glycol)	1	43,899,620	43,899,620
2	가스크로마토그라피 질량분석기GC/MS_만성예산	Agilent technologies, US/5977A, GC/MSD	Benzene, Toluene, 1,3-Butadiene, Isoprene, Vinyl Chloride, 가향유기물질, 나프틸아민(1-Aminonaphthalene 등)	1	96,966,100	96,966,100
3	고성능액체크로마토그라피 HPLC	Agilent, DE/1260, HPLC	Formaldehyde, Acetaldehyde, Acrolein, Crotonaldehyde 등 알데하이드류 및 케톤류	1	102,034,690	102,034,690
4	흡연발생장치 (로타리형)	Borgwaldt KC, DE/RM20H	담배 주류연 일괄포집 (휘발성 유기화학물질, 중금속, TSNAs 등)	1	151,424,230	151,424,230
5	흡연발생장치 (리니어형)	Cerulean, GB/SM 450, 50~120mm	담배 주류연 개별포집 (Aldehydes, Benzo[a]pyrene 등)	1	237,894,280	237,894,280
6	공기조화기	KSAH-150M	흡연실(Smoking Room) 항온항습을 위해 옥상에 설치한 공기조화기	1	15,921,250	15,921,250
7	질량분석기 (ICP-MS)	Agilent, JP/7900 ICP-MS	Cadmium, Nickel, Arsenic 등 담배(연기) 및 생체시료 내 중금속 분석	1	150,862,440	150,862,440
8	실험실용 주입기	Aglient techniligyies, SZ/PAL3 RTC 120	휘발성 및 준휘발성 유기화학물질 분석을 위해 GC-MS내 시료주입 (Headspace, Solid phase Microextraction[SPME] 방법 적용)	1	46,332,650	46,332,650
9	진공또는원심 농축기	Eyela, JP/MGS-2200D	미량의 분석시료 농축(1.5ml, 소량)	1	3,195,000	3,195,000
10	액체크로마토그래피(IC)	Thermo fisher scientific US/Dionex ICS-5000+HPIC System	담배(연기) 내 암모니아, 당류 분석	1	138,042,341	138,042,341
11	흡연발생장치 (부류연)	Borgwaldt DE/LM5S	부류연 내 유해물질 분석을 위한 포집장치	1	101,941,560	101,941,560
12	기체크로마토그래프(TD)	Markes, GB/UNITY-xr, 2~500mL/min GB/ULTRA-xr, 2~500mL/min	호흡시 기체성분, 대기환경 시료 내 기체상(입자상) 성분 포집/분석을 위한 열탈착 포집장비	1	59,534,930	59,534,930
13	공기건조기	디에이치와이, DHC-5C, 310×575×535mm	자동흡연장치(Smoking Machine) 사용후 습기차는 것을 방지하기 위해 잔여공기를 건조시키는 장비	1	785,400	785,400

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액
14	진공 또는 원심농축기	Biotage, GB/TurboVap LV ASE	분석시료 농축(1.5-30ml,대량)	1	24,026,000	24,026,000
15	액체크로마토그라피 질량분석기 LC/MS/MS	Agilent technologies, US/6460, triple quadrupole LCMS	Cotinine, NNAL, TSNAs(NNN, NAT, NAB, NNK)	1	287,896,980	287,896,980
16	디스펜서	Beckman US/Biomek NX	시료 자동 분주용	1	141,572,270	141,572,270
17	실험실용가스 발생기	Peak scientific instruments, GB/NM32LA-A	LC-MS/MS 분석을 위한 질소가스 공급	1	25,610,000	25,610,000
18	분석저울	Mettler toledo, CH/XPE205, 0~220g	표준용액(Stock solution) 제조 및 극미량 시료무게 측정(mg단위)	1	15,730,000	15,730,000
19	시료보관용 냉장고	유니크대성, UDS-30RFDRE-B	시약, 검체 보관	2	1,354,270	2,708,540
20	Linear shaker (회전식진탕기)	비전과학, VS-202D	성분 추출시 시료와 용매를 균질하게 섞는 장비	1	1,507,000	1,507,000
21	탁상형냉장원심분리기 (미량냉장)	비전과학, VS-180CFi, 18000rpm, -10~40℃	시료 내 섞여있는 용액의 분리(1.5ml)	1	3,410,000	3,410,000
22	무진동테이블	천평대, 대일시스템, DVID-L-0608-R500	극미량분석 전자저울 받침대	1	3,113,000	3,113,000
23	온습도계	온습도측정기, Testo, DE/175 H1	실험실 온도, 습도 측정	3	671,000	2,013,000
24	pH 측정기	Mettler toledo, CH/SevenCompact pH/Ion S220-K	시약 pH 측정	1	1,764,000	1,764,000
25	자동습도조절 시약장(데시케이터)	Sicco, DE/Maxi 2-Desiccator Antistatic	Water 분석 등 습도에 민감한 실험을 위한 초자류 보관	1	1,705,000	1,705,000
26	가열자석 교반기	비전과학, VS-130SH-E	가열 및 교반을 통해 시료를 균질하게 섞는 장비	1	594,000	594,000
27	실험실용 가열기(Heat Block)	Miulab, CN/DKT200-2A	시료 열처리	1	1,386,000	1,386,000
28	초순수제조기	초순수제조장치 Millipore, FR/Milli-Q Direct 8, 8L/h	시약용 증류수 제조	1	19,151,000	19,151,000

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액
29	초저온냉동고 (Deep Freezer)	Nihon freezer, JP/CLN-51U	시약, 시료 보관	1	11,055,000	11,055,000
30	담배보관 냉동고	Nihon freezer, JP/GS-5210HC	시약, 시료 보관	1	5,914,900	5,914,900
31	Vortex	소용돌이식진탕기, 비전과학, KMC-1300V	시약, 시료 등을 균질하게 섞는 장비	2	220,000	440,000
32	건조캐비닛 또는 오븐	건조기, 비전과학, VS-1202D3	실험도구 건조	1	1,707,000	1,707,000
33	분동 및 추	Mettler-toledo, CH/15880	극미량 전자저울의 정확성 점검	1	611,000	611,000
34	실험실용연기 후드 및 찬장	씨애치씨랩, CLE-001-05, 암후드	유해물질 취급시 실험자 보호	6	652,533	3,915,200
35	진공청소기	금호전자, GE-15PR	실험실 청소	1	187,000	187,000
36	가스조절기	Harris, US/801, two stage	분석장비에 공급되는 가스(헬륨 등) 양 조절	1	148,500	148,500
37	진공 또는 원심농축기	Thermo fisher scientific US/SC250EXP P1	(생체)시료 농축 등 전처리용	1	54,044,650	54,044,650
38	질량분석기	AB sciex US/QTRAP 4500	생체시료 내 바이오마커 분석 및 미량물질 탐색	1	327,223,700	327,223,700
39	마이크로웨이브오븐	Milestone IT/ETHOS EASY	중금속 분석을 위한 전처리용	1	36,119,240	36,119,240
40	온습도계	온습도측정기, Testo, DE/175 H1	실험실 온도, 습도 측정	2	673,500	1,347,000
41	무정전 전원장치	무정전전원장치, 대아전력전자, inv1200, 3상/1상, 12kVA, 30분	분석장비의 전력 공급용	2	4,500,000	9,000,000
42	액체질소통	액체질소통, Taylor-wharton, US/XL-160, 160L	LC-MS/MS 분석용	1	4,000,000	4,000,000
43	냉장냉동 겸용장치	냉장고, 삼성전자, TH/RT25HAR4DWW, 255L	시료 및 시약 보관용	1	371,990	371,990
44	오토샘플러	오토샘플러, Agilent technologies, AU/SPS4, 300~3000μL	GC-MS 분석 보조장비	1	13,970,000	13,970,000

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액
45	순환식수조	냉온식순환조, Polyscience, US/6100 series 1HP Chiller, 2.65L	ICP-MS 분석 보조장비	1	7,200,000	7,200,000
46	실험실용 배기기	실험실용배기기, 유니온이엔지, UN-PPF150, 1500×800×2350mm	중금속 분석용 후드	1	7,150,000	7,150,000
47	실험실용히터	가열기, SCP science, US/DigiPREP Jr(010-505-105), 180℃	중금속 분석을 위한 전처리용	1	9,040,000	9,040,000
48	도트매트릭스 프린터	충격식프린터, Mettler toledo, CN/RS-P26	저울 무게 기록	1	990,000	990,000
49	실험실용가스 발생기	실험실용가스발생기, Peak scientific, GB/Precision Hydrogen 1	GC 분석을 위한 수소발생기	1	13,200,000	13,200,000
50	실험실용가스 발생기	실험실용가스발생기, Peak scientific, GB/Zero Air Trace 1500,	GC 분석을 위한 공기발생기	1	14,850,000	14,850,000
51	초음파세척기	초음파세척기, Branson, US/CPX8800H-E, 20.8L	초음파를 발생시켜 실험도구 세척(Soniator), 분석용액 제조(LC 및 LC-MS/MS 분석시 mobile phase 제조, 유도체화 포집용액 제조 등)	1	3,514,000	3,514,000
52	견본기체추출 장치또는수집 장치	가스채집기, Sibata, JP/MP-Σ30KNⅡ, 0.05~0.5L/min	공기 중 가스 채취용	1	2,214,000	2,214,000
53	실험실용가스 발생기	실험실용가스발생기, 구정엔지니어링, EvaN-0600, 60mL/min, 질	시료 농축 등 전처리를 위한 질소 발생기	1	17,099,000	17,099,000
54	소용돌이식 진탕기	소용돌이식진탕기, Grant instruments, GB/PV-1, 3000rpm	희석 등 전처리용	2	291,500	583,000
55	항온항습조	항온항습조, Memmert, DE/HPP260, 256L, 0~70℃	궐련담배 등 조화용	1	22,858,000	22,858,000
56	실험실용 배기기	실험실용배기기, 제이오텍, EFS-75S-3160HC, 암후드	이동식 배기기	1	2,211,280	2,211,280

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액
57	탁상형 원심분리기	탁상형원심분리기, 한일과학산업, Fleta 4, 4000rpm	시료 전처리용	1	1,900,000	1,900,000
58	흡연 시뮬레이터	흡연시뮬레이터, Borgwaldt KC, US/CreSS Pocket, 35×68×70mm	흡연자의 흡연행태분석 및 흡연자별 흡연습관 기록	2	6,930,000	13,860,000
59	실험실용 배기기	실험실용배기기, 광동산업, 1800×800×2400mm	실험용 후드	2	2,563,000	5,126,000
60	항온항습조	항온항습조, 비전과학, VS-9111H-150, 150L	궐련담배 등 조화용	1	15,785,000	15,785,000
61	공기, 가스탱크 또는 실린더	가스탱크, 한국고압실린더, HK-40.2L, 40.2L	GC 분석용 가스	1	374,000	374,000
62	공기, 가스탱크 또는 실린더	고압가스용기, MS종합가스, 47L, 철제, 질소용	GC 분석용 가스	2	1,000,000	2,000,000
63	공기, 가스탱크 또는 실린더	가스탱크, Labts엔지니어링, DY-H2, 수소탱크실린더 47L	GC 분석용 가스	1	3,547,520	3,547,520
64	공기, 가스탱크 또는 실린더	고압가스용기, Labts엔지니어링, DY-AIR, 공기실린더47L	GC 분석용 가스	1	1,000,000	1,000,000
65	공기, 가스탱크 또는 실린더	가스탱크, Labts엔지니어링, DY-H2, 수소탱크실린더 47L	GC 분석용 가스	1	100,000	100,000
66	진공청소기	삼성전자, VN/VS80N8061KW, 핸디/스틱형	흡연실 청소	1	532,860	532,860

붙임 7 용어집

1	담배규제기본협약	담배소비와 흡연율 감소를 위한 보건 분야 최초의 국제협약 ※ 우리나라는 2005년 5월 비준
2	국민건강증진법	국민의 건강을 증진시키기 위해 제정한 법률(1995)로서 국민에게 건강에 대한 가치와 책임의식을 함양하도록 건강에 관한 바른 지식을 보급하고 스스로 건강생활을 실천할 수 있는 여건을 조성함으로써 국민의 건강을 증진함을 목적으로 함
3	담배실험실네트워크	WHO 주관 담배제품 및 배출물(담배연기) 성분의 측정 및 공개를 위한 협의체로, 역할로는 담배 규제에 필요한 담배제품 시험 및 연구의 글로벌 역량 확보, 담배제품 및 배출물 검사를 위한 시험법 개발·개선, 신설 실험실 지원, 담배제품 모니터링 결과에 대한 정보교환 등이 있음
4	ISO17025	국제표준화기구에 의해 제정된 시험소 또는 교정기관의 능력에 관한 일반요구사항의 국제표준규격
5	KOLAS	한국인정기구로, 국가표준기본법 및 ISO/IEC Guide 규정에 따라 우리나라의 검사, 교정, 시험 등에 대해 평가하여 특정 분야에 능력을 공식적으로 인정해주는 업무를 수행하는 인정기구
6	국제공인시험기관	KOLAS 인정시험기관으로, 법률 또는 국제기준에 적합한 인정기구를 통해 KS Q ISO/IEC 17025에 따라 품질시스템과 기술능력을 평가받아 특정분야에 대한 시험능력이 있다는 것을 공식적으로 승인받은 기관

7	담배특이니트로스아민류	담배에서만 특이적으로 검출되는 니트로스아민류로, 대표적인 물질로는 1급 발암물질인 NNN, NNK 등이 있음
8	MS Library Match	GC-MS 소프트웨어 내 질량패턴 기반 화학물질 database
9	IARC	국제암연구소, 국제연합 세계보건기구 산하 기관으로 암의 원인에 관한 연구를 지휘하고 조정하는 역할을 함
10	CORESTA	담배규격위원회(담배관련 과학연구를 위한 협력센터의 약어)로, 프랑스법에 의해 1956년에 설립된 산업협회이며 담배와 관련된 과학연구에서 국제협력을 촉진하는 것이 목적임
11	1R6F, 3R4F	미국 켄터키대학 내 Center for Tobacco Reference Products(CTRP)에서 생산한 표준담배

붙임 8 약어(표)

약어	영어	한글
WHO	World Health Organization	세계보건기구
FCTC	Framework Convention on Tobacco Control	담배규제기본협약
ISO	International Organization for Standardization	국제표준화기구
KOLAS	Korea Laboratory Accreditation Scheme	한국인정기구
GC	Gas Chromatograph	가스크로마토그래프
GC-MS	Gas Chromatograph-Mass Spectrometer	가스크로마토그래프 질량분석기
IC	Ion Chromatograph	이온크로마토그래프
LC	Liquid Chromatograph	액체크로마토그래프
LC-MS/MS	Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer	액체크로마토그래프 텐덤질량분석기
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer	유도결합플라즈마 질량분석기
NNK	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone	담배특이니트로스아민류
NNN	3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine	담배특이니트로스아민류
NAT	N-nitrosoanatabine	담배특이니트로스아민류

약어	영어	한글
NAB	N-nitrosoanabasine	담배특이니트로스아민류
VOCs	Volatile Organic Compounds	휘발성 유기화합물류
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol	4-메틸나이트로스아미노-1-(3-피리딜)-1-부타놀
COPD	Chronic Obstruction Pulmonary Disease	만성 폐쇄성 폐질환
SPMA	S-phenyl mercapturic acid	S-페닐머캅튜릭산
MHBMA	monohydroxy-3-butenyl mercapturic acid	모노하이드록시 부테닐머캅튜릭산
3-HPMA	3-hydroxypropyl mercapturic acid	하이드록시프로필 머캅튜릭산
CSE	Cigarette Smoke Extract	담배연기추출물
TobLabNet	Tobacco Laboratory Network	담배실험실네트워크(WHO)
FID	Flame Ionizartion Detector	불꽃이온화검출기
TCD	Thermal Conductivity Detector	열전도도검출기
DAD	Diode Array Detector	다이오드어레이검출기
IARC	International Agency for Research on Cancer	국제암연구소

약어	영어	한글
LOD	Limit Of Detection	검출한계
LOQ	Limit Of Quantification	정량한계
RSD	Relative Standard Deviation	상대표준편차
HPHCs	Harmful and Potentially Harmful Constituents	유해하고 잠재적으로 유해한 성분
FDA	Food and Drug Administration	식품의약국
MDL	Method Detection Limit	방법검출한계
LLE	Liquid-Liquid Extraction	액(체)-액(체) 추출
SOP	Standard Operation Procedure	표준운영절차(서)
ISTD	Internal Standard	내부표준물질
STD	Standard	표준물질
ND	Not Detected	불검출(=LOQ 미만)
BAT	British American Tobacco	브리티쉬 아메리칸 토바코(담배회사)
DNPH	Dinitrophenylhydrazine	디니트로페닐히드라진

약어	영어	한글
PBS	Phosphate-buffered saline	인산완충생리식염수
TD	Thermal Desorption	열탈착
JKSRNT	Journal of the Korean Society for Research on Nicotine and Tobacco	대한금연학회지
QC	Quality Control	표준시료
HPHCs	Harmfull and Potentially Harmfull Constituents	유해하거나 잠재적 유해성분
NMR	Nicotine metabolite ratio	니코틴대사율
CRM	Certified Reference Material	인증표준물질

1. 본 책자에 수록된 내용은 법적 효력이 있는 사항이 아니며, 개별사항에 따라 다르게 해석할 수 있으니 참고용으로만 활용하시기 바랍니다.

2. 이 책자의 내용을 참고문헌, 세미나, 기타 분석 등에 인용 시에는 건강위해대응과와 사전에 협의하여 주시기 바랍니다.

2015~2020 흡연폐해실험실 운영 성과보고서

발 행 일	2021년 9월
발 행 처	질병관리청
발 행 인	정은경
편집위원장	조은희
편 집 위 원	황호평, 나경인, 이도연, 이슬기, 이은지, 조영환
문 의 처	건강위해대응과 흡연폐해실험실 (주소) 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 125 고려대학교의생명공학연구원 202호 (연락처) 043) 219-2918

2015~2020년

흡연폐해실험실
운영 성과보고서

질병관리청

비매품/무료
95510
9 788968 388866
ISBN 978-89-6838-886-6 (PDF)