

혈액과 모유 시료 중 과불화화합물 분석을 위한 전처리법 평가

이응선¹ · 김희영¹ · 심원진^{1,2} · 이지현^{1,2} · 오정은^{1†} · 김형식³

¹부산대학교 사회환경시스템공학과, ²한국화학시험연구원, ³부산대학교 약학과

Evaluation of Pretreatment Method for Analysis of Perfluorinated Compounds in Human Blood and Breast Milk Samples

Eung-Sun Lee¹, Hee-Young Kim¹, Won-Jin Sim^{1,2}, Ji-Hyun Lee^{1,2},
Jeong-Eun Oh^{1†}, and Hyung sik Kim³

¹Department of Civil and Environmental Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Korea Testing & Research Institute, Ulsan 681-340, Korea

³Department of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received March 15, 2011/Accepted March 25, 2011

In this study, we evaluated extraction methods for the analysis of perfluorinated compounds (PFCs) in human serum and breast milk samples. The recovery efficiencies of ion pairing extraction (IPE) and solid phase extraction (SPE) in each serum and breast milk were examined. For serum samples, IPE was more efficient (recovery efficiency: 81-105%) than SPE. For breast milk samples, except for perfluorododecanoic acid (PFDoA), SPE showed better recoveries (80-98%) than IPE. As results of validity test, accuracy and precision were in the range of 81~130% and 1~18% in serum, and 54~130% and 2~17% in breast milk, respectively. We also analyzed PFCs in the cord serum and breast milk from 13 pregnant women using the method established in this study. In the cord serum, all PFCs except for perfluorobutane sulfonate, perfluoroheptane sulfonate and perfluorohexanoic acid were detected. In the breast milk, perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid and PFDoA were detected dominantly compared with other PFCs.

Key words: breast milk, human blood, IPE, PFCs, SPE

1. 서 론

과불화화합물(perfluorinated compounds, PFCs)은 탄소와 불소로 이루어진 불소화화합물로 화학적, 열역학적으로 안정한 특성 때문에 방수(water-resistant) 및 방유(oil-resistant)의 목적으로 자동차, 건설, 화학공정, 섬유 등 다양한 산업분야에서 이용되어 왔다¹⁾. 미국과 유럽 등 주요생산국을 중심으로 PFOS (Perfluorooctane sulfonate)와 PFOA (Perfluorooctanoic acid)는 관련 물질들과 함께 각각 연간 4,500톤과 600톤 가량 생산된 것으로 보고되었고, 특히 PFOS와 그 관련물질의 경우 지금까지 누적생산량이 100,000톤에 이르는 것으로 추정되고 있다^{2,3)}.

PFCs는 환경에 배출된 후 쉽게 분해되지 않아 잔류성이 큰 것으로 알려져 있으며 대기 및 수계를 통해 이동하여 환경 및 인체에 광범위하게 노출됨에 따라, PFCs에 대한 인체 위해성이 우려되고 있다^{4,5)}. 이에 유럽연합 국가들을 중심으로 PFCs의 오염상태와 인체 위해성 평가에 대한 체계적인 연구와 제도적인 관리가 진행되고 있다. 유럽의회 및 이사회(EU)에서 PFOS의 제조 및 사용을 규제하고 PFOA와 관련 물질에 대한 지속적인 위해성 평가가 필요하다고 보고하였으며, 최근에는 PFOS와 관련 물질들을 스톡홀름 협약을 통해 잔류성유기오염물질(persistent organic pollutants, POPs)로 지정하여 생산 및 사용 등에 대한 관리가 국제적으로 이루어지고 있다^{6,7)}.

[†]To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-(0)51-582-3964, Fax: 82-(0)51-582-3965, E-mail: jeoh@pusan.ac.kr

지금까지 동물 실험을 통해 PFCs의 노출에 따른 발암성, 면역장애, 갑상선 장애 및 생식발생독성과 같은 다양한 생체유해성이 보고되었다. PFOS에 노출된 설치류에서 갑상선과 간에 종양이 유발되는 것으로 알려졌다. PFOS와 PFOA는 포유동물에서 갑상선 호르몬의 항상성과 지질대사를 방해하여 간과 폐와 같은 장기들의 기능적 성숙을 방해할 뿐만 아니라 태아 성장을 방해하는 것으로 보고되었다^{2,8,9}. 한편 인체의 경우, 제대혈을 통해 노출된 PFOS와 PFOA의 농도가 태아의 성장에 영향을 미치는 것으로 보고한 연구도 있으나 또 다른 연구에서는 PFCs와 태아의 성장과는 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않는 것으로 보고하고 있어 PFCs의 인체위해성을 평가하기 위해 더 많은 연구 결과가 필요한 실정이다¹⁰⁻¹².

PFCs의 유해성에 대한 연구와 더불어 인체에서의 PFCs 노출 수준을 파악하기 위한 연구도 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. 미국을 포함한 여러 국가를 대상으로 한 연구에 따르면 우리나라 성인 혈액 시료의 경우 PFOS와 PFOA의 평균 농도는 각각 21.1 ng/mL와 61.8 ng/mL로 검출되었으며, 특히 PFOA의 농도는 조사 대상 국가 중 최상위 수준인 것으로 보고되었다¹³. 또한 지역별 PFOS와 PFOA의 노출 정도를 조사한 연구에서는 산업지역 거주자에게서 가장 높은 농도를 보이는 것으로 나타났다¹⁴. 이처럼 생체시료에 존재하는 PFCs를 추출하기 위해 다양한 방법들이 개발되어 사용되어 왔으며 제단백 방식(protein precipitation), 이온쌍 추출법(ion pairing extraction)과 고체상 추출법(solid phase extraction) 등이 있다¹⁵. 제단백 방식은 아세토니트릴과 같은 용매를 사용하여 이들 물질을 단백질로부터 유리

시켜 바로 분석하는 방법으로 사용 용매에 따라 실험결과가 영향을 많이 받는 단점이 있다¹⁵. 이온쌍 추출법은 PFCs 이온과 반대부호 이온이 정전기 적으로 회합한 이온쌍 형태로 추출하는 방법으로 2001년 Hansen에 의해 methyl-*tert*-butyl ether (MTBE)를 이용한 방법이 적용된 이후 많이 사용되고 있다^{12,16,17}. 한편 고체상 추출법은 컬럼 내 흡착제와 PFCs간의 상호작용을 이용하여 대상물질을 정제 및 추출하는 방법으로 다양한 인체시료 분석에 이용되고 있다¹⁸⁻²². 이처럼 최근 연구에서는 이온쌍 추출법과 고체상 추출법이 관련 연구에 많이 이용되고 있으나 연구자들에 따라 각기 다른 방법이 적용되고 있다. 하지만 이들 연구를 통한 분석방법에 따른 결과들을 비교하고 평가하는 것은 제한적인 것으로 보인다. 따라서 이온쌍 추출법과 고체상 추출법을 비교하여 인체시료에서의 PFCs를 분석하기 위한 최적의 전처리법을 확립할 필요가 있다고 평가된다.

따라서 본 연구에서는 기존 연구에서 생체시료의 전처리법으로 주로 사용되고 있는 이온쌍 추출법과 고체상 추출법을 적용 및 비교하여 각 시료의 매트릭스에 따라 적합한 PFCs 전처리법을 확립하고 각 방법에 대한 유효성 검증 자료를 제시하고자 한다. PFOS와 PFOA를 포함한 10종의 PFCs를 대상물질로 하였으며 확립된 방법을 실제 시료에 적용하여 국내 인체 시료에서의 PFCs 노출 정도도 파악하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 표준물질 및 시약

본 연구의 대상물질은 PFOS를 포함한 PFASs

Table 1. Target compounds in this study

	n	Compound	Abbreviate
<i>Perfluoroalkane sulfonates</i>	4	Perfluoro-1-butanefulfonate	PFBS
	6	Perfluoro-1-hexanesulfonate	PFHxS
	7	Perfluoro-1-heptanesulfonate	PFHpS
	8	Perfluoro-1-octanesulfonate	PFOS
<i>Perfluorocarboxylic acids</i>	6	Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA
	8	Perfluoro-n-octanoic acid	PFOA
	9	Perfluoro-n-nonanoic acid	PFNA
	10	Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA
	11	Perfluoro-n-undecanoic acid	PFUdA
	12	Perfluoro-n-dodecanoic acid	PFDoA
	<i>Internal standard</i>		Perfluoro-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanoic acid

(Perfluoroalkane sulfonates) 계열 4종과 PFOA를 포함한 PFCAs (Perfluorocarboxylic acids) 계열 6종으로 Table 1에 나타내었으며, 연구 대상 10종의 표준물질은 Wellington (Guelph, Ontario, Canada)사의 PFASs 5종 혼합표준물질(PFS-MXA)과 PFCAs 11종 혼합표준물질(PFC-MXA)을 혼합하여 혼합표준물질로 사용하였다. 내부표준물질로는 MPFOA (Perfluoro-n-[1,2,3,4-¹³C₄]octanoic acid)를 동일 회사로부터 구입하여 사용하였다. 시료의 정제 및 추출을 위해 사용한 고체상 추출장치는 Supelco (Bellefonte In, PA, USA)의 Visiprep™ SPE Vacuum manifold를 사용하였으며 OASIS HLB (60 mg, 3 mL)는 Waters (Milford, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. MTBE와 메탄올 등의 유기용매는 J.T Baker 사(Phillipsberg, NJ, USA)의 HPLC용 분석용매를 사용하였으며, 포름산(99%) 등 분석에 사용된 시약은 모두 특급시약을 구매하여 분석하였다.

2.2. 시료 전처리 방법

2.2.1. 이온쌍 추출법(Ion Pairing Extraction, IPE)

인체로부터 채취한 혈액(혈청)과 모유시료에서 PFCs의 추출정제 과정을 위해 Monroy 등(2008)¹²⁾에 의해 수행된 방법을 바탕으로 수정된 이온쌍 추출법을 검토하였다. 시료 500 µL를 15 mL의 폴리프로필렌 관에 취하고 25 ng/mL의 내부표준물질(MPFOA) 40 µL를 첨가한 후 0.5 M tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBA) 용액 1 mL와 0.25 M 탄산나트륨 완충용액 2 mL를 주입하였다. 시료의 균질화를 위해 10분간 초음파 처리를 실시한 후 5 mL MTBE를 넣고 300 rpm에서 30분간 교반하였다. 5분간 3500 rpm으로 원심분리 시킨 후 상부의 유기용매 층 4 mL를 또 다른 폴리프로필렌 관으로 옮겼다. 다시 MTBE를 넣고 이 과정을 총 3회 반복 실시하였다. 최종 분리된 MTBE 추출액은 질소가스를 이용하여 100 µL 이하까지 농축시킨 후 200 µL의 메탄올로 재 용해하여 분석 시료로 하였다.

2.2.2. 고체상 추출법(Solid-phase Extraction, SPE)

혈액(혈청)과 모유시료에서 PFCs의 추출정제과정을 위해 Kuklenyik 등(2004)²⁰⁾에 의해 수행된 고체상 추출법을 일부 수정하여 검토하였다. 시료 500 µL에 25 ng/mL 농도의 내부표준물질(MPFOA) 40 µL를 첨가한 후 0.1 M 포름산 3 mL를 넣고 vortex를 이용해 10

초간 교반 후 20분간 초음파 처리하여 혼합하였다. 메탄올과 0.1 M 포름산을 2 mL씩 순서대로 1 mL/min의 속도로 흘려 OASIS HLB 카트리지를 활성화 시킨 후 1 mL/min의 속도로 시료를 활성화 된 카트리지에 주입하였다. 방해물질 제거를 위해, 혈액시료의 경우는 0.1 M 포름산 3 mL, 0.1 M 포름산과 50%의 0.1 M 포름산과 메탄올 혼합용액 6 mL, 1% 암모니아 수용액 1 mL를 시료 주입 후 더 흘려주었다. 모유시료의 경우는 0.1 M 포름산과 50%의 0.1 M 포름산과 메탄올 혼합용액을 3 mL씩 흘려 카트리지를 세척하였다. 방해물질이 제거된 카트리지는 5분 동안 진공펌프로 감압하여 수분을 제거한 후 1 mL의 1% 수산화암모늄/아세트니트릴 용액으로 PFCs를 추출하였다. PFCs 추출액은 질소를 이용하여 100 µL 이하로 농축시킨 후 200 µL의 메탄올로 재 용해하여 분석시료로 하였다.

2.3. 기기분석

PFCs의 기기분석은 Agilent (Palo Alto, USA)의 1200 HPLC가 결합된 6410 Triple-quadrupole 질량분석기를 사용하였다. 컬럼은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm)을 사용하였으며 이동상은 메탄올을 용매 A로, 10 mM 암모늄 아세테이트를 용매 B로 하여 gradient program을 사용하여 분석하였다. 이온화는 전자 분무 이온화(Electrospray ionization, ESI) 방법을 사용하였으며 각 대상물질에 대한 전구이온(precursor ion)과 생성이온(product ion)을 각각 선정하여 multiple reaction monitoring (MRM)으로 분석 하였다. 자세한 기기분석조건 및 전구이온과 생성이온 정보는 각각 Table 2와 Table 3에 나타내었다.

2.4. 분석법 비교 평가 및 정도 관리

이온쌍 추출법과 고체상 추출법을 비교평가 하기 위해 혈액(혈청)시료와 모유 시료에 10 ng/mL의 혼합표준물질 20 µL와 25 ng/mL의 내부표준물질 40 µL를 각각 첨가한 후 각각의 전처리 과정을 3회에 걸쳐 반복 실시하여 회수율을 측정하였다. 확립된 방법의 유효성을 평가하기 위해 시료 내 환산농도가 0.04, 0.4, 4 ng/mL인 세 단계의 농도로 혼합표준물질이 주입된 시료를 3회 이상 분석하였다. 참값에 대한 측정값의 비를 정확도(Accuracy)로 나타내었고 구해진 정확도의 RSD를 구하여 정밀도(Precision)를 평가하였다. 시료의 양이 한정적인 혈액과 모유시료의 특성 상 모든 단계에서 동일한 시료를 사용하지 못했으나 각 단계마다 3회

Table 2. LC-MS/MS conditions for analysis of PFCs

Parameters	Conditions						
Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm)						
Mobile phase	A: Methanol B: 10 mM ammonium acetate in water						
Gradient	Time (min)	0	0.5	25	28	29	35
	B (%)	95	95	5	5	95	95
Column flow rate	0.3 mL/min						
Column temperature	40°C						
Injection volume	10 μL						
Ionization mode	Negative ion electrospray						
Scan type	MRM (multiple reaction monitoring)						
Gas flow	9 L/min						
Gas temperature	350°C						
Nebulizer pressure	45 psi						
Capillary voltage	4000 V						

Table 3. Retention time, precursor ion and product ion of PFCs

Compound	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragment voltage (V)	Collision Energy (V)
PFBS	14.0	299	80	110	35
PFHxS	18.3	399	80	170	40
PFHpS	19.7	449	80	130	45
PFOS	20.8	499	80	200	55
PFHxA	16.2	313	269	70	5
PFOA	19.6	413	369	50	5
PFNA	20.8	463	419	100	5
PFDA	21.8	513	469	100	10
PFUdA	22.7	563	519	90	5
PFDoA	23.4	613	569	100	5
MPFOA	19.6	417	372	50	10

반복 실험 된 시료는 동일한 것을 사용하였다. 기존 시료에 함유되어 있을 분석물질을 파악하기 위해 각 과정마다 실험에 사용된 것과 동일한 시료에 혼합표준물을 주입하지 않고 내부표준물질만 주입하여 바탕시료로 하였다. 그리고 각 단계마다 동일한 3개의 시료에서 검출된 농도를 바탕시료에서 검출된 분석물질의 농도로 보정해주었다. 또한 검출한계(LOD, Limit of detection)와 정량한계(LOQ, Limit of quantitation)는 7개의 실제시료에 0.04 ng/mL의 혼합표준물질을 주입하고 동일한 전처리 과정을 거쳐 반복 분석한 결과의 표준편차를 각각 3.14배와 10배 하여 구하였다²³⁾.

검정곡선은 내부표준물질이 포함된 10종의 대상 PFCs를 시료에서 검출되고 있는 농도범위와 LOD 수

준을 고려하여 8단계의 농도범위(0.05~10 ng/mL)로 제조한 혼합 표준용액을 사용하여 작성하였다. 검정곡선의 상관관계수(R^2)는 모든 물질에서 0.99 이상으로 양호한 직선성을 보였고 기준량의 역수(1/X)를 적용하여 정량하였다. 기기분석 전 메탄올을 기기에 주입하여 기기의 오염여부를 판단하였고 10개의 시료 당 각각 1개의 바탕시료(field blank)와 검정곡선의 중간농도범위인 표준용액(0.5 ng/mL)을 분석하여 실험 도중 발생할 수 있는 오염과 기기분석 중 검정곡선의 변경여부를 확인하였다.

2.5. 실제 시료의 분석

본 연구에서 확립된 PFCs 분석법을 혈액과 모유 실

제 시료에 적용하여 PFCs 노출 정도를 파악하였다. 서울시에 위치한 여성전문병원의 산부인과에서 출산하는 13명의 산모로부터 신생아 체대혈을 채취하고 출산 후 모유를 채취하였다. 본 연구에서 확립된 결과를 토대로 체대혈(혈청)은 이온쌍 추출법으로 추출하였고 모유는 고체상 추출법으로 추출하였으며 작성한 검량곡선을 통해 PFCs를 정량 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 회수율 결과

이온쌍 추출법과 고체상 추출법을 혈액과 모유 각각에 적용하고 3회 반복하여 얻은 회수율 결과를 Table 4에 나타내었다. 혈액 시료를 이온쌍 추출법으로 추출했을 경우 평균 81~105%의 회수율을 보였으며 이때의 상대표준편차(RSD, relatively standard deviation)는 1~21% 범위로 나타났다. 이러한 결과는 혈액시료를 이온쌍 추출법으로 전처리하였던 이전의 다른 연구결과와 유사한 것이었다^{12,19,24,25}. 하지만 이들 연구는 대부분 PFOS와 PFOA를 조사대상물질로 한정된 반면

본 연구에서는 두 물질 이외의 다른 8종에 대해서도 이온쌍 추출법이 안정한 회수율 결과를 보인다는 것을 확인하였다. 반면, 고체상 추출법이 적용된 경우, 대부분 물질의 회수율은 73~118% 범위로 나타났으나 일부 물질(PFBS, PFHxA, PFNA, PFDoA)에 대해서는 비정상적인 범위(-104~38%)의 회수율이 나타났다. 고체상 추출법을 사용한 기존 연구결과에 따르면 대부분 물질들의 경우는 81~112% 범위의 안정적인 회수율을 보이거나 PFBS와 PFHxA 같은 일부 물질들은 본 연구와 마찬가지로 낮은 회수율을 보였다^{12,20,21}. 특히 본 연구에서는 long alkyl chain carboxylates를 가지는 물질들(PFDA, PFUdA, PFDoA)의 경우, alkyl chain의 길이가 증가할수록 회수율이 85%, 73%, 38%로 점차 감소하는 경향을 보였다. 선행연구에서도 고체상 추출법을 이용하여 PFCs를 분석했을 때 PFNA부터 PFDoA까지 alkyl chain의 길이가 점차 증가할수록 회수율이 감소하는 것으로 나타났다^{20,26,27}. 이러한 결과는 alkyl chain이 길어질수록 흡착제와 강하게 결합하지 않는 carboxylates의 특성 때문에 컬럼을 통과하거나 세척과정 중 손실된 것이라 추측된다.

Table 4. Comparison of recoveries of PFCs according to extraction method (unit: %)

	PFBS	PFHxS	PFHpS	PFOS	PFHxA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUdA	PFDoA
Serum										
IPE-1	82	92	95	92	92	88	79	97	104	96
IPE-2	95	94	100	111	105	114	93	107	106	104
IPE-3	80	81	92	71	89	68	70	97	106	104
mean	86	89	95	91	95	90	81	100	105	101
RSD	8	7	3	18	7	21	12	5	1	4
SPE										
SPE-1	7	116	125	66	7	68	-163	75	56	30
SPE-2	56	112	123	109	49	112	-141	92	79	44
SPE-3	39	93	107	23	4	105	-8	87	83	39
mean	34	107	118	66	20	95	-104	85	73	38
RSD	60	9	7	53	104	20	-66	8	16	16
Breast milk										
IPE-1	70	87	132	76	98	88	86	108	89	55
IPE-2	57	93	140	106	83	80	88	104	82	53
IPE-3	55	81	113	93	84	62	76	96	86	52
mean	61	87	128	92	88	77	83	103	86	53
RSD	11	5	9	13	8	14	6	5	4	2
SPE										
SPE-1	76	90	83	96	90	76	88	98	89	53
SPE-2	78	94	79	88	89	78	94	96	81	54
SPE-3	85	103	93	93	104	91	94	99	89	46
mean	80	96	85	92	94	82	92	98	87	51
RSD	5	6	7	3	7	8	3	1	4	8

RSD: relative standard deviation

반면 모유의 경우 PFDoA를 제외한 모든 대상 물질에서 이온쌍 추출법을 적용한 경우 평균 61~128%의 회수율과 4~14%의 RSD를 보였고 고체상 추출법을 적용하였을 경우 평균 80~98%의 회수율과 1~8%의 RSD를 보였다. 모유의 경우 이온쌍 추출법을 사용한 기존 연구결과가 거의 없어 회수율을 비교하기 어려웠으나 고체상 추출법은 본 연구결과와 유사하거나 낮은 범위의 회수율을 보이는 것을 알 수 있었다^{20,28,29}. 모유에서는 두 방법 모두 alkyl chain이 길어질수록 carboxylates의 회수율이 점차 감소하는 경향을 보였으나 고체상 추출법이 이온쌍 추출법에 비해 물질별 회수율이 비교적 안정적이며 편차가 크지 않았다. 따라서 각 전처리 법에 따른 PFCs의 회수율 결과와 RSD에 근거하여 혈액 시료는 이온쌍 추출법이 모유시료는 고체상 추출법이 더 적합한 전처리 방법으로 평가된다.

3.2. 분석방법의 유효성 평가

본 연구에서 검토한 추출법을 이용하여 0.04, 0.4, 4 ng/mL의 농도에서 혼합표준물질을 각 시료 매체에 주입하여 분석방법의 유효성을 검토하였다(Table 5). 이온쌍 추출법을 이용한 혈액 시료의 경우, 4 ng/mL의 PFDoA (130%)를 제외한 모든 물질이 세 범위의 농도에서 81~118% 범위의 정확도를 보였다. 0.4, 4 ng/mL의 PFCs를 주입한 시료에서는 모든 물질이 10% 이내의 RSD를 보였으나 0.04 ng/mL 시료에서의 RSD는 5~18%를 나타내어 0.4, 4 ng/mL에 비하여 비교적 넓은 범위를 보였다. 조사 대상 PFCs 물질에 대한 혈액시료의 평균 RSD는 세 범위의 농도에서 각각

12%, 5%, 4%로 나타났다.

모유의 경우 대부분의 물질이 세 범위의 농도에서 81~122%의 비교적 양호한 정확도를 나타냈으나 PFDoA가 상대적으로 낮은 정확도(<68%)를 보였고, PFNA가 4 ng/mL에서 129%, PFDA가 0.04 ng/mL에서 130%로 비교적 불안정한 정확도를 보였다. PFDoA를 제외한 모든 물질이 0.4, 4 ng/mL에서는 10% 이내의 RSD를 보인 반면 0.04 ng/mL에서는 6~17%의 범위를 보여 0.4, 4 ng/mL보다는 비교적 넓은 범위를 나타내었다. 조사대상 PFCs 물질에 대한 모유시료의 평균 RSD는 세 농도범위에서 각각 11%, 7%, 5%로 나타났다. 이러한 결과는 이온쌍 추출법¹⁶과 고체상 추출법^{20,24}을 적용한 이전 연구결과와 유사한 수준이었다. 그리고 위 결과는 비교적 제한적으로 존재하는 이온쌍 추출법을 적용한 경우의 정확도를 판단하는 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서 혈액시료의 LOD 범위는 0.006-0.027 ng/mL로 기존의 Haug 등(2009)³⁰에 의해 조사된 결과(0.002-0.050 ng/mL)와 유사하거나 Kuklenyik 등(2005)²⁶의 결과(0.05-0.8 ng/mL), Kärman 등(2005)²¹의 결과(0.1-2.0 ng/mL)보다 낮은 수준이었다. 또한 모유의 LOQ 결과(0.018-0.065 ng/mL)는 기존의 Tao 등(2008)²⁹의 결과(0.001-0.024 ng/mL)와 Völkel 등(2008)³¹이 발표한 결과(0.02-0.2 ng/mL)의 LOQ 범위와 유사하거나 약간 높은 수준이었다. 따라서 본 연구의 전처리 방법이 혈액과 모유 각각에서 적용이 가능할 것으로 판단된다.

전처리 및 기기분석 중 시료의 오염여부를 확인하기

Table 5. Accuracy (Acc) and precision (RSD) of serum and breast milk spiked at three different levels (unit: %)

Compound	Serum						Breast milk					
	0.04 ng/mL (n = 7)		0.4 ng/mL (n = 3)		4 ng/mL (n = 3)		0.04 ng/mL (n = 7)		0.4 ng/mL (n = 3)		4 ng/mL (n = 3)	
	Acc	RSD	Acc	RSD	Acc	RSD	Acc	RSD	Acc	RSD	Acc	RSD
PFBS	99	16	95	3	96	3	100	12	96	3	111	3
PFHxS	81	12	88	4	101	4	101	8	104	3	103	4
PFHpS	104	17	100	3	99	4	104	7	99	7	94	2
PFOS	99	15	104	1	99	4	98	17	108	11	115	2
PFHxA	109	5	94	2	88	5	108	10	104	4	122	3
PFOA	90	18	101	3	110	4	104	15	97	3	106	3
PFNA	102	17	82	8	109	3	123	13	106	5	129	2
PFDA	97	8	96	4	112	5	130	6	106	7	116	7
PFUdA	95	5	101	9	118	4	81	11	92	9	100	8
PFDoA	117	6	101	8	130	3	54	8	55	15	68	15

Table 6. LODs, LOQs and Blank of PFCs in serum(IPE) and breast milk(SPE) (ng/mL)

Compound	Serum			Breast milk		
	LOD	LOQ	Blank	LOD	LOQ	Blank
PFBS	0.017	0.056	0.011-0.013 (<LOQ)	0.014	0.044	ND-0.028 (<LOQ)
PFHxS	0.011	0.036	0.007-0.013 (<LOQ)	0.009	0.030	0.004-0.007 (<LOQ)
PFHpS	0.027	0.085	ND-0.093	0.008	0.026	ND-0.012 (<LOQ)
PFOS	0.018	0.058	ND	0.020	0.065	ND
PFHxA	0.006	0.019	0.009-0.010 (<LOQ)	0.013	0.042	ND-0.021 (<LOQ)
PFOA	0.020	0.063	0.006-0.011 (<LOQ)	0.020	0.062	0.102-0.110
PFNA	0.022	0.070	0.003-0.082 (<LOQ)	0.020	0.063	ND-0.041 (<LOQ)
PFDA	0.010	0.030	0.008-0.009 (<LOQ)	0.010	0.030	0.009-0.016 (<LOQ)
PFUdA	0.007	0.022	0.009-0.010 (<LOQ)	0.011	0.036	0.011-0.017 (<LOQ)
PFDoA	0.009	0.030	ND-0.009 (<LOQ)	0.006	0.018	0.009-0.012 (<LOQ)

위해 바탕시료(field blank)를 분석하였다(Table 6, Fig. 1). 혈액시료의 경우 PFHpS만이 0.093 ng/mL의 수준으로 검출되었으나 이는 LOQ와 비슷한 수준이었다. 반면 모유의 경우 PFOA가 바탕시료에서 0.110 ng/mL로 검출되었다. 이러한 결과는 이전의 연구에서도 보여지고 있는 테플론 재질의 실험기구와 분석기기 라인에 의한 오염이라 판단된다^{32,33}. 특히 OASIS HLB 카트리지를 사용하는 고체상 추출법에서 PFOA가 높게 검출된 것으로 보아 카트리지의 오염 및 분해에 의한 것이라 사료된다. 따라서 테플론 폴리머 재질의 실험기구 및 카트리지의 사용에서 발생할 수 있는 오염을 최소화 할 수 있는 노력이 필요하다.

3.3. 실제시료에의 적용

본 연구에서 확립한 전처리 방법을 실제 채취한 13개의 혈액(제대혈)과 모유시료에 적용하여 PFCs를 분석하였으며, 대표적인 LC-MS/MS 크로마토그램 정량 결과를 각각 Fig. 1과 Table 7에 나타내었다. 제대혈의 경우, PFOA와 PFOS가 가장 높은 농도(평균 1.048 ng/mL, 0.874 ng/mL)로 검출되었으며 PFBS, PFHpS와 PFHxA를 제외한 대상 물질이 모든 혈액 시료에서

검출되었다.

반면 모유의 경우, PFNA가 가장 높은 평균농도(0.160 ng/mL)를 나타내었으나 두 개의 시료에서만 검출되었다. PFOS, PFOA와 PFDoA는 5개 이상의 시료에서 검출(0.096 ng/mL, 0.042 ng/mL, 0.014 ng/mL)되었으나 이외의 물질들은 3개 이하의 검출빈도를 보여 연구대상 산모의 모유에 잔류하는 PFCs의 농도 및 검출빈도는 전반적으로 낮았다. 이러한 결과는 모유에서 PFOA를 포함한 일부 물질의 검출 빈도가 낮고 모유가 혈액에 비해 각 물질 별로 10~100배 정도 낮은 농도를 보인다고 보고한 기존 연구결과와도 일치한다²¹.

본 연구의 결과는 외국문헌에서 조사된 제대혈과 모유의 PFCs 농도결과와 유사하거나 낮은 수준이었다^{10,12,24,31}. 국내에서는 제대혈과 모유에서 PFCs의 조사가 많지 않으며, 2007년 수행된 모체 혈액, 제대혈, 모유를 대상으로 조사한 연구 결과와 비교하면 제대혈에서는 PFOS (2 ng/mL)를 제외하고 유사한 수준이었었고 모유의 경우 PFOA (41 pg/mL)는 유사한 수준을 보였지만 나머지는 높거나 낮은 등 유사한 경향을 보이지 않았다³⁴.

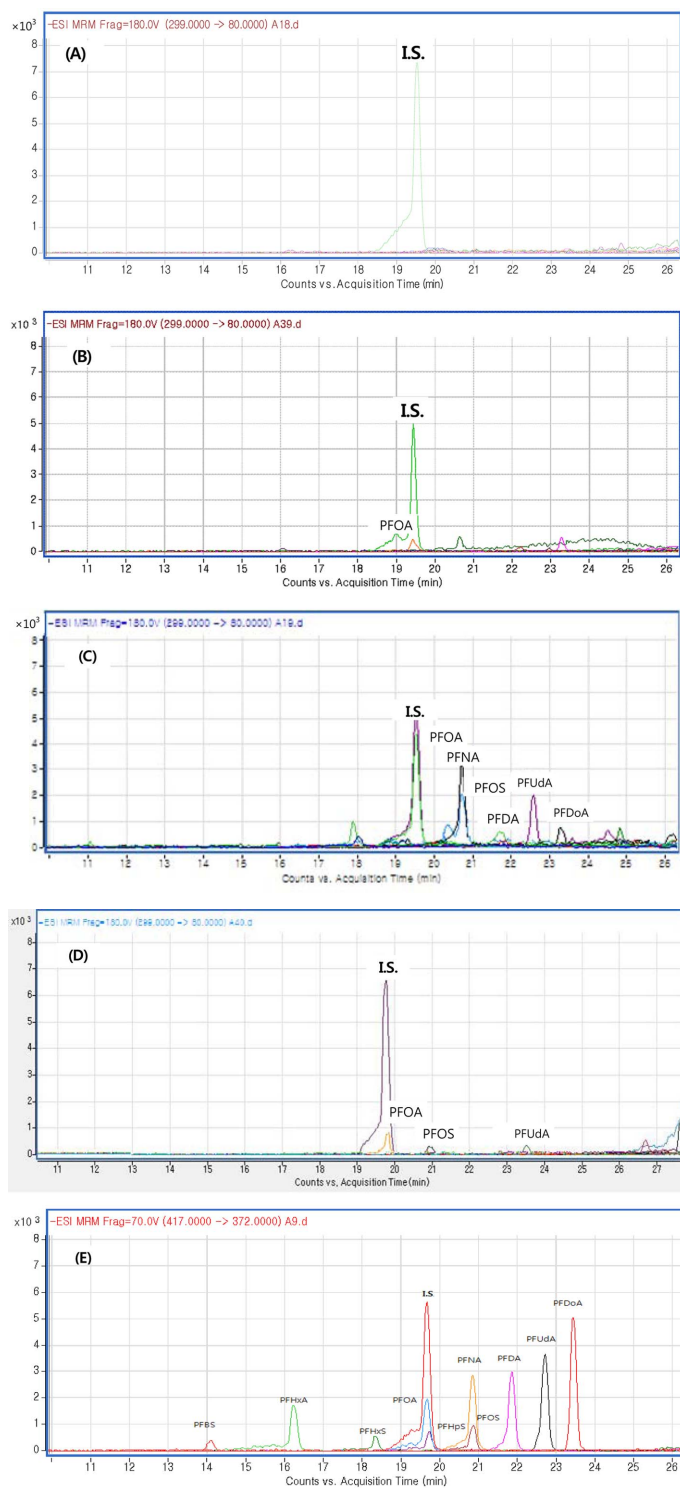


Fig. 1. MRM chromatograms of (A) blank spiked with I.S. for serum sample; (B) blank spiked with I.S. for breast milk sample; (C) serum sample spiked with I.S.; (D) breast milk sample spiked with I.S.; (E) 10 ng/mL spiked standard.

Table 7. Concentration (ng/mL) of PFCs in cord serum and breast milk in 13 pregnant women in Korea

	PFBS	PFHxS	PFHpS	PFOS	PFHxA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUdA	PFDoA
Serum										
No.>LOQ	0	13	5	13	11	13	13	13	13	13
mean	<LOQ	0.562	0.018	0.874	0.127	1.048	0.371	0.163	0.351	0.144
max	<LOQ	1.126	0.050	1.877	0.199	1.814	0.548	0.309	0.541	0.205
min	<LOQ	0.170	0.0004	0.410	0.039	0.461	0.191	0.095	0.216	0.103
SD	NA	0.291	0.020	0.462	0.055	0.442	0.107	0.054	0.110	0.029
Breast milk										
No.>LOQ	0	3	1	9	1	5	2	1	0	8
mean	<LOQ	0.040	0.047	0.096	0.093	0.042	0.160	0.035	<LOQ	0.014
max	<LOQ	0.051	NA	0.154	NA	0.070	0.200	NA	<LOQ	0.026
min	<LOQ	0.032	NA	0.066	NA	0.020	0.120	NA	<LOQ	0.010
SD	NA	0.009	NA	0.031	NA	0.022	0.057	NA	NA	0.005

NA; Not available

4. 결 론

본 연구에서는 혈액과 모유의 PFCs를 분석하기 위하여 이온쌍 추출법과 고체상 추출법을 비교하여 효율적인 분석방법을 확립하였으며 각 분석방법에 대하여 검증(validation)을 실시하였다. 또한 확립된 분석방법을 적용하여 국내에 거주하는 산모를 대상으로 혈액(제대혈)과 모유에서의 PFCs를 분석하였으며 본 연구결과는 향후 PFCs의 국내인구노출조사 등의 관련 연구 분야에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 김승규, *J Environ Toxicol.*, **2008**, 23(3), 143-164.
2. U.S. Environmental Protection Agency, **2002**, Revised draft hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts. Office of Pollution Prevention and Toxic Risk Assessment Division, Washington, DC. Available from: URL: http://74.84.128.62/files/EPA_PFOA_110402.pdf
3. Pistocchi A, Loos R. *Environ Sci Technol.*, **2009**, 43, 9237-9244.
4. Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S,

Uno A, Saijo Y, Sata F, Yoshimura Y, Kishi R, Nakazawa H. *Environ Health Persp.* **2004**, 112(11), 1204-1207.

5. Jahnke A, Berger U. *J Chromatogr A.*, **2009**, 1216, 410-421.
6. Directive 2006/122/ECOF of the European Parliament and of the Council of 12 December **2006**. Official Journal of the European Union, L/372/32-34, 27. 12. 2006. Available from: URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:372:0032:0034:en:PDF>
7. UNEP, United Nations Environmental Programme (2009): Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the Work of Its Fourth Meeting. May 4-8, **2009**. UNEP, Geneva. Available from:URL:<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/COP4/UNEP-POPS-COP4-38.English.pdf>
8. Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Rogers JM, Grey BE, Stanton ME, Butenhoff JL, and Stevenson LA, *Toxicol Sci.*, **2003**, 74, 382-392.
9. Martin MT, Brennan RJ, Hu W, Ayanoglu E, Lau C, and Ren H, *Toxicol Sci.*, **2007**, 97(2), 595-613.
10. Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB, Calafat AM, Halden RU, Needham LL, Goldman LR, *Environ Health Persp.*, **2007**, 115(11), 1670-1677.
11. Fei C, McLaughlin JK, Tarone R, Olsen J. *Environ Health Persp.*, **2007**, 115(11), 1677-1682.
12. Monroy R, Morrison K, Teo K, Atkinson S, Kubwabo C, Stewart B, Foster WG. *Environ Res.*, **2008**, 108,

- 56-62.
13. Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, Wouwe NV, Yang JH, Aldous KM. *Environ Sci Technol.*, **2004**, 38, 4489-4495.
 14. Chung JY, Yoon HS, Ryu HY, Won JU, Paeng KJ, and Kim YJ, *Anal Sci Technol.*, **2008**, 21(3), 183-190.
 15. Villagrasa M, Alda ML, and Barceló D, *Anal Bioanal Chem.*, **2006**, 386, 953-972.
 16. Sottani C, and Minoia C, *Rapid Commun Mass SP.*, **2002**, 16, 650-654.
 17. Olsen GW, Church TR, Larson EB, van Belle G, Lundberg JK, Hansen KJ, Burris JM, Mandel JH, and Zobel LR, *Chemosphere.*, **2004**, 54, 1599-1611.
 18. Voogt P and Saez M, *Trends Anal Chem.*, **2006**, 25(4), 326-342.
 19. 장상환, 이채관, 김대환, 김권복, 안진홍, 김희동, 이창희, 김정호, 이종태, *대한산업의학회지*, **2008**, 20(3), 233-244.
 20. Kuklennyk Z, Reich JA, Tully JS, Needham LL, and Calafat AM, *Environ Sci Technol.*, **2004**, 38, 3698-3704.
 21. Kärman A, van Bavel B, Jarnberg U, Hardell L, and Lindstrom G, *Anal Chem.*, **2005**, 77, 864-870.
 22. von Ehrenstein OS, Fenton SE, Kato K, Kuklennyk Z, Calafat AM, and Hines EP, *Reprod Toxicol.*, **2009**, 27, 239-245.
 23. Official test methods of water quality, *Ministry of Environment*, 2010.
 24. Hansen KJ, Clemen LA, Ellefson ME, and Johnson HO, *Environ Sci Technol.*, **2001**, 35, 766-770.
 25. Harada K, Koizumi A, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Date C, Fujii S, Hachiya N, Hirosawa I, Koda S, Kusaka Y, Murata K, Omae K, Shimbo S, Yakenaka K, Yakeshita T, Todoriki H, Wada Y, Watanabe T, and Ikeda M, *Chemosphere.*, **2007**, 66, 293-301.
 26. Kuklennyk Z, Needham LL, and Calafat AM, *Anal Chem.*, **2005**, 77, 6085-6091.
 27. Kärman A, Mueller JF, van Bavel B, Harden F, Toms LM, and Lindström G, *Environ Sci Technol.*, **2006**, 40, 3742-3748.
 28. Kärman A, Ericson I, van Bavel B, Darnerud PO, Aune M, Glynn A, Lignell S, and Lindström G, *Environ Health Persp.*, **2007**, 115(2), 226-240.
 29. Tao L, Ma J, Kunisue T, Libelo EL, Tanabe S, and Kannan K, *Environ Sci Technol.*, **2008**, 42, 8597-8602.
 30. Haug LS, Thomsen C, and Becher G, *J Chromatogr A.*, **2009**, 1216, 385-393.
 31. Völkel W, Genzel-Boroviczény O, Demmelmair H, Gebauer C, Koletzko B, Twardella D, Raab U, and Fromme H, *Int J Hyg Envir Heal.*, **2008**, 211, 440-446.
 32. 최재원, 김정희, 김용연, 정팔진, *한국환경분석학회지*, **2008**, 11(3), 222-231.
 33. Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Okazawa T, Petrick G, and Gamo T, *Environ Sci Technol.*, **2004**, 38, 5522-5528.
 34. Kim SK, Lee KT, Kang CS, Tao L, Kannan K, Kim KR, Kim CK, Lee JS, Park PS, Yoo YW, Ha JY, Shin YS, and Lee JH, *Environ Pollut.*, **2011**, 159, 169-174.