

발 간 등 록 번 호

11-1790387-000812-01

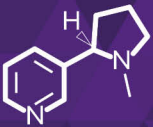


2021 - 2022

흡연폐해실험실

운영 성과보고서

2023. 8.



질병관리청
건강위해대응과

발간사

흡연은 거의 모든 장기에 질병을 일으킬 수 있으며, 대표적으로 암, 허혈성 심장질환, 뇌졸중, 만성폐쇄성폐질환 등 전세계 사망원인의 절반 이상을 차지하는 만성질환 발생에 영향을 미칩니다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 의하면, 전 세계에서 흡연에 의한 질환으로 연간 약 700만 명(직접흡연 600만 명, 간접흡연 100만 명)이 사망하고, 사회·경제적 손실은 약 1,200조(2012)에 달합니다. 국내에서도 2019년 직접흡연에 기인한 사망자는 58,036명(남 50,942명, 여 7,094명)이며 사회·경제적 비용은 12조 1,913억 원이 발생하는 것으로 추산되었습니다.

이에, 세계보건기구(WHO)는 담배규제기본협약(FCTC)을 2005년에 비준하여 담배규제 정책의 방향성을 제시하고 있으며 모든 회원국가가 협력하여 흡연에 의한 건강위해를 해소하기 위해 함께 노력하고 있습니다. 우리나라도 WHO 회원국가로서 협약이행 의무가 있으며, 특히 제9조와 10조의 검증된 실험실에서의 담배 성분 분석 등을 위해 질병관리청(舊 질병관리본부)에 국제공인시험기관(ISO17025) 기준의 ‘흡연폐해실험실’을 2015년 11월에 설립하였습니다.

흡연폐해실험실은 2017년부터 WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet)의 분석회원으로서 국제표준시험법 마련, 품질보증 절차 참여 등의 국제협력공동연구에 참여해오고 있으며, 흡연으로 인한 인체 건강영향평가 및 면역학·유전학적 연구 등 세포를 기반으로 한 연구기능을 확충하기 위해 2021년 11월에 ‘흡연폐해세포실험실’을 신규 구축하였습니다.

이에 따라, ‘21~’22년에 신종담배 제품에 대한 표준시험법 마련 및 확립을 비롯하여, 우리나라의 직간접흡연에 따른 흡연유해물질 노출정도를 파악하기 위한 바이오모니터링사업을 주관하고 있으며, 담배 유형별 사용자의 행태변화, 흡연습성 등을 반영한 건강영향연구와 관련 대사물질의 변화양상, 세포독성 등의 연구를 수행하고 있습니다.

동 보고서가 관련분야를 연구하는 전문가, 국가기관 등 관계기관 및 국민들께 유용한 자료로 활용되기를 바랍니다. 앞으로도, 질병관리청은 ‘흡연폐해예방을 위한 조사연구사업’이 전문적이고 객관적으로 수행되어 우리나라를 비롯한 WHO 등 국제사회가 활용할 수 있는 과학적 근거 창출에 적극 기여해 나가겠습니다. 감사합니다.

2023년 8월

질병관리청장 지 영 미

목차

I . 흡연폐해실험실 현황

1. 설립근거 및 추진경과	1
2. 조직 및 임무	2
3. 인력·시설·장비 및 예산	5
4. 중점연구분야 및 과제현황	10

II . 연구분야

1. 흡연노출에 따른 인체 바이오마커 관련 연구	12
2. 담배제품 및 담배 배출물 관련 연구	13
3. 흡연노출에 따른 세포 변화 관련 연구	14

III . 주요연구성과

1. 흡연노출 바이오마커 관련 연구	15
① 소변 내 니코틴 대사체 및 알칼로이드(5종) 분석	15
② 소변 내 중금속 6종(Ni, Cd, Hg, Cr, Al, Pb) 분석	26
③ ISO17025 내부정도관리(임상분야(02.029))	38
④ 흡연 바이오마커 국외숙련도 참가결과	39
⑤ 흡연폐해 바이오모니터링 질관리	41
⑥ 흡연 노출평가를 위한 검체채취 및 관리지침 마련	45

2. 담배제품 및 담배 배출물 관련 연구	48
① 전자담배 액상 내 니코틴, 글리세롤 및 프로필렌 분석	48
② 무연담배 내 Nicotine 함량분석	53
③ 무연담배 수분함량 분석	58
④ 무연담배 pH(수소이온농도) 분석	61
⑤ 국내 판매 액상형 전자담배 액상 내 성분분석	64
⑥ 국내 판매 무연담배 내 성분분석	65
⑦ ISO17025 기타재료 및 제품분야(02.008) 내부정도관리	66
3. 흡연 노출에 따른 세포 변화 관련 연구	67
① 흡연구성물질 농도별 침지 노출에 따른 세포생존율 및 활성산소 검증	67

IV. 부록

붙임1. WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 운영 현황	71
붙임2. 흡연폐해실험실 바이오마커 측정기술 확보 현황	74
붙임3. 흡연폐해실험실 담배성분 측정기술 확보 현황	77
붙임4. 시험법 확립 및 공인시험기관 인정현황	80
붙임5. 흡연폐해성분실험실 장비현황(표)	82
붙임6. 흡연폐해세포실험실 장비현황(표)	87
붙임7. 용어집(표)	89
붙임8. 약어(표)	90

I

흡연폐해실험실 현황

2021 ~ 2022 흡연폐해실험실 운영 성과보고서



질병관리청
건강위해대응과

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 발생하는 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), 호흡기알레르기질환과(실험연구)
- 질병관리청 승격에 따라 '건강위해대응관 건강위해대응과(신설)'로 통합('20.9~)
- '흡연폐해세포실험실' 개소('21.11.)

조직

- 질병관리본부 흡연폐해예방TF(~'16.12), 호흡기·알레르기질환과('17.1~'20.9)
- 질병관리청 건강위해대응관 건강위해대응과('20.9~ 현재)

('23.4월 현재)



■ 임무

○ WHO 담배규제기본협약(FCTC)에 따른 실험실 운영 및 WHO 담배실험실 네트워크(Tobacco Laboratory Network, TobLabNet) 분석회원 활동

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

* 내부 정도관리, 시험기관 간 비교시험, 국외숙련도 평가 등을 통한 정기적인 기술력 검증 및 한국인정기구를 통해 ISO17025 자격 지속 갱신 중

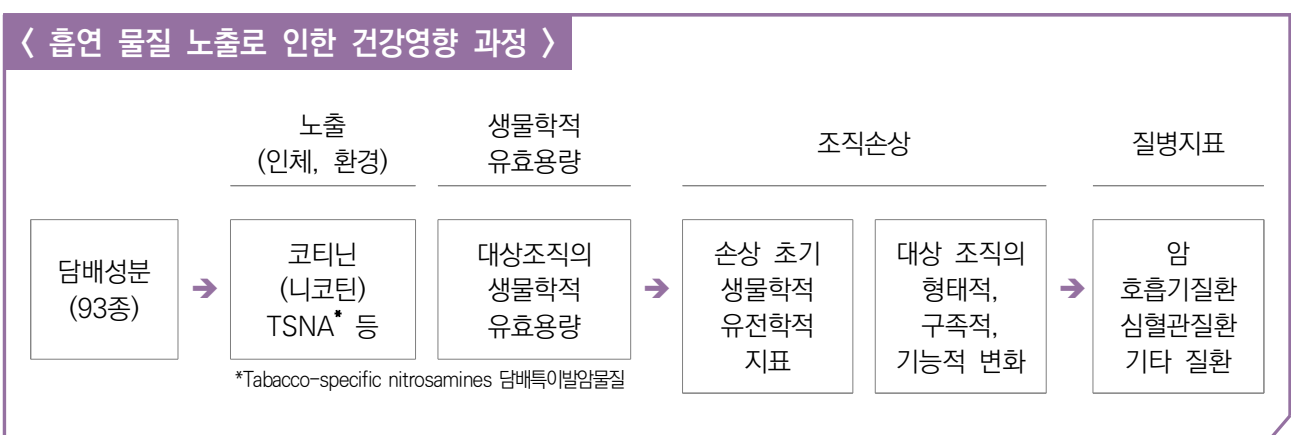
- 니코틴, 타르 등의 성분의 WHO 표준시험법에 따른 시험법 정립·적용

○ 국가수준 흡연바이오모니터링을 통한 흡연물질 노출수준 파악 및 담배유형별 특성, 흡연습성 등에 따른 바이오마커 분석

- 국민건강영양조사 등 공공자료원을 활용한 니코틴대사체 및 중금속 등의 흡연 특이 바이오마커 측정

* (니코틴대사체 및 알칼로이드) Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine (중금속) 니켈(Ni), 납(Pb), 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 알루미늄(Al), 크롬(Cr)

○ 가향·신종담배건강영향, 흡연행태·흡연습성, 흡연기인 질환 발생 등 심층조사결과와 연계된 실험연구 수행



○ '19년 미국 액상형전자 담배사용 중증폐손상 사례(EVALI)*등의 신종건강영향 사례 발생 대비 연구

* EVALI, E-cigarette or Vaping product use Associated Lung Injury

〈 흡연폐해실험실 ISO17025 시험인정 항목 〉

('23.4월 현재)

구분	한국인정기구 분류	규격명
담배성분	기타재료 및 제품 (02.008)	담배 필터 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'-Hydroxy cotinine 분석
		LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL, NNN* 분석

* 담배특이니트로사민(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs) : ①NNN 3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine,
②NNK: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, ③NAT: N-nitrosoanatabine, ④NAB: N-nitrosoanabasine

〈 WHO 표준시험법에 따른 흡연폐해실험실 시험법 정립현황 〉

('23.4월 현재)

SOP 번호	연구내용	정립 여부
1	담배연기 발생을 위한 흡연장비 조건	○
2	담배 제품 및 배출물 분석방법에 대한 유효성검증 절차	○
3	결련담배 주류연 내 TSNAs*(NNN, NNK, NAT, NAB) 분석	○
4	결련담배 filler 내 Nicotine 분석	○
5	결련담배 주류연 내 Benzo[a]pyrene 분석	○
6	결련담배 filler 내 Humectants(propylene glycol, glycerol, triethylene glycol) 분석	○
7	결련담배 filler 내 Ammonia 분석	○
8	결련담배 주류연 내 Aldehydes(acetaldehyde, acrolein, formaldehyde) 분석	○
9	결련담배 주류연 내 VOCs**(benzene, 1,3-butadiene) 분석	○
10	결련담배 주류연 내 CO(carbon monoxide) 분석	○
11	액상형전자담배 액상 내 Nicotine, Glycerol, Propylene glycol 분석	○
12	무연담배 내 Nicotine 분석	○
13	무연담배 내 수분함량 분석	○
14	무연담배 내 pH(수소이온농도) 분석	○

* 담배특이니트로사민(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs) : ①NNN 3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine,
②NNK: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, ③NAT: N-nitrosoanatabine, ④NAB: N-nitrosoanabasine

** 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Components, VOCs)

인력

○ 건강위해대응과 ‘흡연폐해예방을 조사연구’ 담당 9명 중 실험인력 총 5명

('23.4월 현재)

소속	직위	역할	
		주요임무	ISO17025
건강위해 대응과	보건연구관	* 흡연폐해예방을 위한 조사연구 총괄	품질책임자(정)
	보건연구사	* 흡연폐해 조사·연구 관련 중장기 계획 등 정책과제 관리 업무	-
	실험 연구	선임공무직A	* (공통)흡연폐해성분분석실험실 운영
			* 흡연폐해관련 중금속분야 바이오마커관련업무
			* 실험실 장비 교정 및 유지보수 관련 업무
			* 실험실 시험환경(시설, 온·습도 및 정보 시스템 등) 관리
		선임공무직B	* (공통)흡연폐해성분분석실험실 운영
			* 시약초차류 등 구매 및 재고관리
			* WHO 주관 공동 연구 수행
		선임공무직C	* (공통)흡연폐해성분분석실험실 운영
			* 흡연폐해관련 니코틴대사물질 바이오마커 관련 연구
	조사 연구	선임공무직D	* 국내 및 국외기관 숙련도시험 참가
			* 실험실 안전관리 및 폐기물관리
	조사 연구	선임공무직E	* (공통)흡연폐해성분분석실험실 운영
			* 흡연폐해관련 바이오모니터링 질관리
	조사 연구	선임공무직F	* 흡연폐해실험실 운영 정기보고서 작성 총괄
			* 흡연습성으로 인한 인체세포변화 및 질병에 미치는 영향연구
	조사 연구	선임공무직G	* 흡연폐해세포실험실 운영
			* 흡연에 노출되는 방식 모사한 세포독성, 활성산소생성, 염증지표 분석연구
	조사 연구	선임공무직H	* 흡연노출물에 의한 암 등 질병 기전 관련 연구
			-
	조사 연구	선임공무직I	* 인구대상별 흡연행태파악 및 변화·영향요인 연구
			* 국가건강조사 흡연통계 관련 조사문항 개선연구 및 흡연을 변화추이 모니터링
	조사 연구	선임공무직J	* 금연사업협의체 등 국내외 흡연폐해연구 네트워크 구축 및 자료 관리 업무
			* 금연정책 및 흡연폐해연구 성과보고체계 운영 업무

■ 시설

1) 흡연폐해성분분석실험실

- 위치: 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 187 질병관리청 2동 508호
- 규모: 1실(7구획), 총 140 m²
- 조건: 담배연기 배출시스템 구비, 항온(22±1℃) 및 항습(60±3%) 유지
- 안전관리등급: 생물안전 1등급

〈 흡연폐해성분실험실 배치도 〉



- . 담배연기발생실 약 15 m²
- . 중금속 분석실 약 10 m²
- . 기기분석실1 약 10 m²
- . 기기분석실2 약 20 m²
- . 생체시료 분석실 약 30 m²
- . 시료전처리실 약 35 m²
- . 물품보관실 약 20 m²

2) 흡연폐해세포실험실

○ 위치: 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 187 국가병원체자원은행 305호

○ 규모: 56.2 m²

○ 조건: 담배연기 배출시스템 구비, 항온(22±1℃) 및 항습(60±3%) 유지

○ 안전관리등급: 생물안전 2등급*(일반)

* 유전자 변형 생물체 Simian Virus-40(SV-40): 세포의 불멸화를 유도하는 바이러스로 생물안전 2등급에 해당

〈 흡연폐해세포실험실 배치도 〉



- | | |
|---------|-----------------------|
| · 세포배양실 | 약 7 m ² |
| · 분석실 | 약 41.8 m ² |
| · 전실 | 약 5 m ² |

장비

- 1) 흡연폐해성분분석실험실 : 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	SM450	Cerulean	담배 주류연(배출물) 포집
	회전형	RM20H	Borgwaldt	담배 주류연 포집
	부류연	LM5S	Borgwaldt	담배 부류연(배출물) 포집
정밀 분석 장비	가스크로마토그래피 (GC)	7890B, GC-FID/TC	Agilent	Nicotine, Water(tar 포함), Humectants(Glycerol, Propylene glycol) 측정
		5977A, GC-MS	Agilent	Benzene, 1,3-Butadiene 등 VOCs 분석
	이온크로마토그래피 (IC)	ICS-5000	Thermo	암모니아, 이온류 등 분석
	액체크로마토그래피 (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
	유도결합 플라즈마 (ICP)	7900, ICP-MS	Agilent	Cadmium, Nickel, Lead, Mercury 등 중금속류 분석

※ 세부 품목 불임6 참조

〈 용어참고 〉

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

2) 흡연폐해세포실험실 : 담배연기 세포노출 시스템(먼지, 액체미립자 포함), 마이크로플레이트, 겔도큐멘테이션 시스템 등 총 33품목 보유 중

〈 주요장비 현황 〉

기기명	모델명 등	제조사	주요 용도
중합효소 연쇄반응	BR1851196	Biorad	DNA 서열 중 확인하고자 하는 서열을 대량으로 증폭시킴
전기영동장치	Mupid-exU	타카라	수평형의 전기영동 장치로 전압을 이용하여 단백질 및 유전자를 크기별로 분류
겔도큐멘테이션 시스템	Chemidoc XRS	휴먼앤 사이언스	단백질 및 DNA 밴드 확인이 가능하며, 내장 프로그램을 이용한 밴드 분석
담배-세포 노출 시스템	DE/VC-10	Vitrocell systems	배양세포 및 박테리아 등 세균류에 담배연기 발생장치에 의해 발생한 담배주류연기(분자상 물질 및 가스상 혼합물질)를 배양세포에 담배주류연기를 폭로시켜 생체영향 확인
마이크로 플레이트 리더기	spectra max i3x	molecular devices	세포에 흡연 및 흡연추출물 노출 후, 세포의 생존율(흡광도)과 활성산소(형광도) 생성 확인 및 RNA 정량
생물안전 작업대	PCHC-777A2-04	CHC lab	세포 배양시에 외부 공기에 의한 오염 방지와 흡연물질에 의한 실험자의 안전 보호

※ 세부 품목 불임7 참조

예산

○ 연간 약 28억원 中 시험연구비 등 약 5억원 규모

- 회계명 : 국민건강증진기금
- 예산과목 : 흡연폐해예방을 위한 조사연구(6535-305)
- 세부내역

(단위 : 백만원)

내역	'21	'22
흡연폐해조사연구 인건비	607	619
일반연구비(정책연구용역포함)	1,736 (실험연구 1,170)	1,486 (실험연구 945)
자산취득비	50	50
시험연구비(재료비 등 포함)	370	350
시설장비유지비	40	85
교육훈련 및 여비 등	59	58
총계	2,862	2,648

1 흡연노출-인체 바이오마커 관련 연구

○ 흡연바이오마커관련 국제공인시험기관(ISO17025)기준 시험법* 운영

* 소변 내 ①코티닌, 하이드록시코티닌, ②담배특이니트로사민류(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs) NNN(3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine), NNK(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) 분석

○ 국가수준의 흡연폐해바이오모니터링 사업

- 국민건강영양조사* 소변시료를 이용한 Cotinine 등 총 11종을 측정하여 직간접 흡연 노출 수준 추이 파악

* 국민건강영양조사 제7기('16-'18), 제8기('19-'21), 제9기('22-'24)

- '22-'24 소변 내 흡연노출 바이오마커* 측정을 위해 흡연폐해실험실 분석법 확립('22.12월)

* (니코틴대사체 및 알칼로이드) Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine (중금속) 니켈(Ni), 납(Pb), 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 알루미늄(Al), 크롬(Cr)

2 담배제품 및 담배 배출물 관련 연구

○ 담배 성분분석관련 국제공인시험기관(ISO17025)기준 시험법* 운영

* 담배 성분 및 주류연 내 ①총입자 및 니코틴을 제외한 건조입자, ②니코틴, ③담배특이니트로사민류(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs), ④카르보닐류, ⑤일산화탄소 분석

○ WHO TobLabNet의 신규 국제표준시험법(SOP 11-14*) 내부 시험법 정립

* ①액상형 전자담배 액상 내 nicotine, glycerol, propylene glycol 분석(SOP11) ②무연담배 내 nicotine(SOP12), 수분함량(SOP13), pH(SOP14) 분석

○ 액상형 전자담배 성분분석 표준시험 절차서*를 적용한 국내 판매 전자담배 액상** (11종) 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜 분석('21.9월)

* WHO SOP11 : Determination of nicotine, glycerol and propylene glycol in e-liquid('21.3월)

** 니코틴(줄기, 솔트, 합성) 종류별 전자담배 액상(e-liquid) 제품

- **WHO 발간 무연담배 표준시험 절차서***를 적용한 국내 시판 머금은 담배 스누스(SNUS) 4종 내 3종(니코틴, 수분, pH) 분석('22.9월)

* 무연담배 내 nicotine(SOP12), 수분함량(SOP13), 수소이온농도(pH, SOP14) 분석

3 흡연 노출에 따른 세포 변화 관련 연구

- 흡연구성물질 침지 노출에 따른 세포 생존율 및 활성산소 생성 측정
 - 액상형 전자담배의 주요 구성물질인 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜에 대한 세포 침지노출 후, 세포 생존율 및 활성산소 측정
- 흡연의 직접 노출에 따른 세포 생존율 측정 준비
 - 폐암 세포주(폐선암, 기관지)에 인체모사장비*를 이용하여 국제표준 노출법 (ISO, HC)과 한국인의 습성**을 반영한 흡연노출에 따른 흡연유해성 실험
 - * 연기-세포 간 노출 최단거리를 기준으로 한 인체모사장비로, 세포 내 결련 연기 및 전자담배 에어로졸 노출에 따른 염증반응 등 면역학적 기전 측정(세포 노화방지 ISO3305:2021 요구사항 충족)
 - ** 국제표준 노출법과 한국인의 습성 비교로 국제표준 노출법간의 유해성 비교 및 국제표준 노출법과 한국인 흡연습성의 유해성 분석

〈흡연폐해세포실험실 흡연 노출 조건〉

내용	ISO* 방법	HCI** 방법	한국인 흡연 습성
흡입부피 (ml)	35	55	73
흡입간격 (s)	60	30	9
흡입지속시간 (s)	2	2	1.6
개비당 퍼프 수	8	9	9
총 담배 개수	8	8	8

* 국제표준노출법 International Organization for Standardization(ISO)

** 국제표준노출법 Health Canada Intense(HCI)

(참고문헌) ① Development, qualification, validation and application of the neutral red uptake assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using a VITROCELL® VC10® smoke exposure system, ② Characterisation of a Vitrocell® VC 10 in vitro smoke exposure system using dose tools and biological analysis

II

연구분야

2021 ~ 2022 흡연폐해실험실 운영 성과보고서



질병관리청
건강위해대응과

1

흡연노출에 따른 인체 바이오마커 관련 연구

○ 흡연바이오마커관련 국제공인시험기관(ISO17025)기준 시험법* 운영

* 국제공인시험기관 인정항목 생체시표 총 2종(4성분) : 소변 내 ①코티닌, ②하이드록시코티닌, 담배특이니트로사민류(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNA) ③NNAL, ④NNN 분석

- 신뢰성 있는 시험결과 확보를 위한 품질보증 방안 운영

구분	연도	구분	주요내용	수행일
내부 정도관리	'21	흡연 생체지표 바이오모니터링 질관리('19-'21)	시험기관간 비교시험 (삼성서울병원-질병청 흡연폐해실험실)	'21.8월
	'22	ISO17025	시험자간 비교시험 (소변 내 cotinine, NNAL 분석)	'22.6월
		흡연폐해 바이오모니터링 질관리('22-'24)	흡연폐해 바이오모니터링 현장평가 및 내부 정도관리 평가 실시	'22.12월
외부 정도관리	'21	ISO17025	소변 내 흡연 바이오마커 5종* 국외 숙련도 참가 * cotinine, NNAL, SPMA, 3'-HPMA, MHBMA	'21.10월
	'22	흡연폐해 바이오모니터링 질관리('22-'24)	소변 내 흡연 바이오마커 3종* 국외 숙련도 참가 * nicotine, cotinine, anabasine	'22.11월

○ 국가수준 흡연폐해 바이오모니터링 소변 내 흡연노출 바이오마커 측정의 일부 직접수행에 따른 흡연폐해실험실 내부 분석법 확립

구분	연도	분석법	수행일
시험법 정립	'22	LC-MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴 대사체 및 알칼로이드 5종* 시험법 * nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxy cotinine, nornicotine, anabasine	'22.11월~ 12월
		ICP-MS를 이용한 소변 내 중금속 6종* 시험법 * Cr(크롬), Ni(니켈), Al(알루미늄), Hg(수은), Pb(납), Cd(카드뮴)	'22.11월~ 12월

○ 흡연 노출평가를 위한 검체채취 및 관리지침 마련('21.10월)

○ 담배 성분 분석 관련 국제공인시험기관(ISO17025)기준 시험법* 운영

* 국제공인시험기관 인정항목 담배 및 담배연기 내 성분 총 7종: ①담배 필터 내 니코틴 분석, 담배 주류연 내 ②총입자 및 니코틴을 제외한 건조입자, ③니코틴, ④물, ⑤담배특이니트로사민류, ⑥카르보닐류, ⑦일산화탄소 분석

- WHO TobLabNet 담배제품 및 담배 배출물 관련 신규 국제표준 시험법(SOP 11-14)를 실험실 내부 시험법으로 확립

구분	연도	WHO SOP	주요내용	수행일
시험법 정립	'21	SOP 11	액상형 전자담배 액상 내 nicotine, glycerol, propylene glycol 분석('21.3.31.)	'21.6월
	'22	SOP 12	무연담배 내 nicotine 분석('22.4.19.)	'22.9월
		SOP 13	무연담배 내 수분함량 분석('22.4.19.)	'22.9월
		SOP 14	무연담배 내 pH(수소이온농도) 분석('22.4.19.)	'22.9월

- 신뢰성 있는 시험결과 확보를 위한 품질보증 방안 운영

구분	연도	주요내용	수행일
내부 정도관리	'22	시험자간 비교시험 1차 (담배 중 필터 내 nicotine 함량분석)	'22.5월
		시험자간 비교시험 2차 (담배 중 필터 내 nicotine 함량분석)	'22.9월

○ WHO 발간 표준절차서를 적용하여 국내 시판 담배 성분 분석

구분	연도	WHO SOP	주요내용	수행일
시판 담배 분석	'21	SOP 11	국내 시판 전자담배 액상(11종) 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜 분석	'21.6월
	'22	SOP 12-14	국내 시판 머금는 담배 스누스(SNUS) 4종 내 니코틴, 수분, pH 분석	'22.9월

- 흡연 직·간접 노출에 따른 인체 건강영향평가를 위해 인체모사장비*를 이용하여 쉼련 연기 노출에 따른 세포독성시험법 마련

* 연기-세포 간 노출 최단거리로서 세포 노화방지(ISO3305:2021 요구사항 충족)

- 폐포암세포주(A549)에 담배 주요 구성물질 3개(니코틴, 프로릴렌 글리콜, 글리세롤)를 농도별 노출시킨 후, 형광도 파장*을 이용하여 세포독성 확인

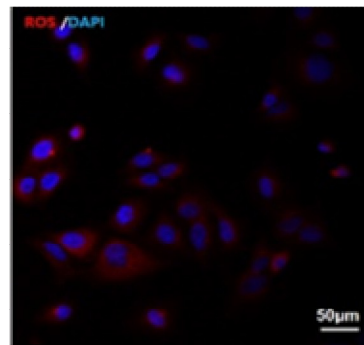
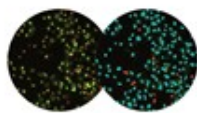
* 형광도 파장: 세포생존율 측정(460 nm), 활성산소 측정(665~640 nm)

구분	연도	분석법	수행일
시험법 정립	'21	세포생존율 측정 Cell Counting Kit-8(CCK-8)	'21.12월
	'22	활성산소 측정(ROS* 형광측정 및 공초점현미경 촬영) * Reactive Oxygen Species(ROS): 활성산소	'22.5월~ '22.7월

< 세포생존율과 활성산소 측정 및 이미지 촬영 >



흡광도
형광도
측정



Ⅲ

주요연구성과

2021 ~ 2022 흡연폐해실험실 운영 성과보고서



질병관리청
건강위해대응과

주요연구성과

1

흡연노출 바이오마커 관련 연구

① 소변 내 니코틴 대사체 및 알칼로이드(5종) 분석

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 파악하기 위해, 담배 내 주성분인 Nicotine과 그 대사물질인 Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, 알칼로이드 성분인 Anabasine을 포함하여 총 5종을 우선순위 성분으로 선정하고 바이오마커 측정 역량을 확보 하였다.

Nicotine은 WHO(세계보건기구) 담배실험실 네트워크 공식방법 표준절차서(TobLabNet Official Method SOP) 우선순위 제시항목 및 미 FDA(식품의약국)이 지정한 담배 내 유해성분이다. 중추와 말초신경을 흥분시키고 중독성이 강한 물질로써 간에서 20개 이상의 화합물로 대사된다(1-2). **Nor nicotine**은 담배잎에 존재하는 알칼리성 성분으로 체내에서 Nicotine의 대사를 통해 생성되며, 흡연 과정에서 1급 발암물질인 담배특이니트로스 아민류(TSNAs) NNN을 생성한다고 알려져 있다(3).

Nicotine의 70-80%는 **Cotinine**으로 대사되며, 체내 반감기가 약2시간인 Nicotine에 비해 Cotinine은 상대적으로 반감기가 18-20 시간으로 길어 Nicotine 노출여부를 확인하기 위한 유용한 생체지표로 활용되고 있다(4-5). 또한, Cotinine으로부터 대사되는 **3'-OH Cotinine**과 Cotinine의 함량비를 이용하여 니코틴대사율(NMR)을 산출하며, 이는 개인 간 체내 니코틴 대사속도 비교 및 니코틴의존도 등 기타 흡연습성과의 상관성을 연구하는데 활용할 수 있다(6).

Anabasine은 담배잎에 존재하는 알칼로이드 성분으로, 금연치료제인 니코틴 대체제에서는 검출되지 않아 금연치료 중 흡연여부 확인지표로 활용할 수 있다(7).

아울러, 본 시험법은 ISO17025 인정시험법으로 확대할 계획이다('23.8월에정).

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 조사 및 선택

국가 수준의 직·간접 흡연 노출정도 파악하기 위해 운영중인 '흡연폐해 바이오모니터링'사업에서는 각 조사주기에 따라 분석기관 간 시험방법 호환성 및 분석결과에 대한 편차 최소화가 필요하다. 이에, 흡연폐해실험실에서 제9기('22-'24)에 일부 직접 분석하기 위해 제8기('19-'21) 수행기관(삼성서울병원)에서 확립한 시험법을 참고하여(8) 분석장비(LC/MS/MS) 사양에 맞게 조건을 맞춰 확립하였다. 삼성서울병원의 분석장비인 Waters Xevo TQ-S triple quadrupole mass spectrometer와 흡연폐해실험실의 Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer를 비교하여, 성분분석을 위한 질량분석기의 이온화 에너지 및 전압, 액체크로마토그래피의 펌프 내 이동상 흐름조건 등 기기 분석조건을 변경하였다. 또한, 흡연폐해실험실 보유 장비·환경에 적합한 시험절차 및 분석방법을 내부시험방법(In-house method) 절차서로 확립하고, 유효화시험을 통해 Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine 정량분석의 타당성을 검증하였다(9-12).

2. 시료 전처리

소변시료 30 μ L와 내부표준물질 90 μ L를 혼합한 후 1분간 Vortex를 이용하여 충분히 섞어준다. 그 후 13200 rpm/min에서 10분간 원심분리하여, 1.5 mL tube에 상층액 30 μ L를 옮겨담는다. 추가적으로 3차증류수 120 μ L를 넣고 1분간 Vortex를 이용하여 충분히 섞어준다. HPLC 분석용 바이알에 옮겨 LC/MS/MS로 분석한다.

3. 기기분석방법

LC/MS/MS(액체크로마토그래피 다중질량 분석기, Agilent 1290 HPLC/ 6460 triple quadrupole)를 이용하여 Nicotine, Nornicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine을 정량분석하였다. 사용된 기기 및 분석조건은 표 1과 같다. 컬럼은 역상 C18 컬럼(150 mm \times 2.1 mm \times 5 μ m)을 사용하였고, 흐름속도는 0.4 mL/min, 주입량은 5 μ L, 컬럼오븐 온도는 45 $^{\circ}$ C, 자동시료 주입기 온도는 10 $^{\circ}$ C로 설정하였다.

이동상¹⁾ 조건(mobile phase condition)에서 이동상 A와 B가 필요하고, 이동상 A는 20 mM ammonium bicarbonate (0.1% formic acid)을, 이동상 B는 100% methanol을 사용하였다. 조제된 이동상은 20분동안 가스제거(degassing) 후 기기에 연결하였다. 총 분석시간 6분동안 이동상은 표1과 같은 조건으로 흘러주었고, 분석 후 안정화 시간(post time)은 1분으로 설정하였다.

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

표 1. LC/MS/MS기기조건

▶ 액체크로마토그래피(Liquid Chromatograph) 조건

· 컬럼유형 : 150 mm × 2.1 mm× 5 μm,
역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)

· 흐름속도 : 0.4 mL/min

· 주입량 : 5 μL

· 컬럼오븐 온도 : 45 ℃

· 자동시료주입기 온도 : 10 ℃

▶ 이동상 조건

시간 (min)	이동상 A (%)	이동상 B (%)	흐름속도 (mL/min)
0.90	95	5	0.4
0.91	90	10	0.4
2.00	90	10	0.4
2.01	50	50	0.4
2.90	50	50	0.4
2.91	40	60	0.4
4.20	40	60	0.4
4.21	95	5	0.4
6.00	95	5	0.4
post time	1 min		

▶ 질량분석기(Mass Spectrum) 조건

Compound	MRM	Dwell	Fragmentor voltage	CE, collision energy
Nicotine	163.0 → 84.3	40	110	18
Nornicotine	149.1 → 132.1	40	115	10
Cotinine	177.2 → 80.2	40	145	16
3'-OH Cotinine	193.1 → 134.1	40	145	18
Anabasine	163.2 → 94.2	40	125	18
Nicotine-d ₄	167.2 → 136.1	40	115	8
Nornicotine-d ₄	153.2 → 136.1	40	115	12
Cotinine-d ₃	180.2 → 101.2	40	145	16
3'-OH Cotinine-d ₃	196.2 → 134.1	40	145	16
Anabasine-d ₄	167.2 → 150.1	40	125	16
분석모드	다중반응탐색법 (MRM, multiple reaction monitoring)			
이온화방법	전자분무이온화 (ESI, electrospray ion)			
온도(℃)	300			

4. 유효화 실험 및 시료분석

확립한 시험 방법이 적합하다는 것을 입증하기 위해 ‘시험방법 유효화확인(Method Validation)’을 수행하여, 최저정량한계, 측정가능범위, 직선성, 재현성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 캐리오버(carryover), 매질효과, 안정성 등을 산출하였다.

가. 최저정량한계(LLOQ) 및 측정가능범위(AMR)

최저정량한계(Lower Limit Of Quantification, LLOQ)는 정확성과 정밀성이 입증된 범위에서 분석물질을 정량할 수 있는 가장 낮은 농도를 말하며, 일반적인 의미로는 검량선의 가장 낮은 농도이다. 측정가능범위(Analytical Measurement Range, AMR)란 검체를 희석하거나 농축과정 없이 검체를 측정하여 결과값을 얻을 수 있는 범위를 말한다. 측정가능범위의 타당성을 확보하기 위해서는 측정범위 내에서 분석물질의 농도가 이미 알고있는 참값으로 나오는지 확인한다.

최저정량한계와 측정가능범위를 산출하기 위해, 소변 공시료(Blank urine)를 이용하여 1-6 단계 농도로 표준물질을 조제한 뒤, 농도별로 5회 반복 전처리 및 분석을 한다. 반복측정 평균 값을 이용해 R^2 값과 정확성(Accuracy, %), 변동계수(CV, %)를 산출하여, 평가기준에 따라 최저 검출한계와 측정가능범위를 결정한다.

〈 평가기준 〉

- ① LLOQ: Accuracy(%), CV(%) \pm 20% 이내
- ② AMR: Linearity R^2 값 0.99 이상,
Accuracy(%), CV(%) \pm 15% 이내

나. 직선성(Linearity)

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

다. 재현성(Repeatability) 및 정확성(Accuracy)

재현성(Repeatability)은 동일 실험실 내에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기구, 동일제조 번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 진행된다. 균일한 검체로부터 얻은 7개 검체를 짧은 시간차로 반복분석 실험하고 그 분석 값의 편차를 변동계수(CV, %)로 나타내어, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15% 이내 기준으로 적합 판단하였다.

정확도(Accuracy)는 설정된 조건하에서 실측된 값이 이론값 즉, 이미 알고 있는 참값에 근접한 정도를 말한다. 본 실험결과의 정확성은 시료 검출수준을 고려한 두 농도의 표준물질을 소변 시료에 첨가하여 분석을 진행하였다. 실측 값이 첨가한 이론값에 얼마나 일치하는지 백분율(%)로 산출하여, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합 여부는 85~115% 이내 기준으로 판단하였다.

라. 정밀성(Precision)

정밀성(Precision)은 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 일내²⁾(intraday)에서 5회, 일간³⁾(interday)에서 5일에 걸쳐 5회 반복 측정을 진행하였다. 이에 대한 분석 값의 편차를 변동계수(CV, %)로 나타내어, 해당 유효화시험 항목에 대한 적합여부는 15% 이내 기준으로 판단하였다.

마. 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 말하며, 검출한계의 약 3배 정도이다. 공시료(Blank) 내 표준물질에 가까운 3개의 농도를 각각 첨가하여 조제하였다. 각 농도별로 7번 반복실험 후 평균값과 표준편차 값을 산출하였고, X축을 평균값, 표준편차 값을 Y축으로 회귀선을 작성하였다. 이때, 산출된 y절편 값의 3배를 검출한계값으로 정하며, 정량한계 값은 검출한계 값의 3배로 산출하였다.

바. 캐리오버(Carryover)

캐리오버(Carryover)는 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.

2) 동일한 조건하에 하루동안 반복적인 실험 시행

3) 동일한 조건하에 날짜를 달리하여 반복적인 실험 시행

사. 매질효과(Matrix effect)

매질효과(Matrix effect)는 생체시료 바탕물질이 분석물질 반응에 미치는 영향을 말한다. 정량의 정확성, 정밀성에 미치는 영향을 확인하기 위해 두 종류(A, B)로 조제된 Calibrator를 분석하여 매질효과를 확인하였다. 두 종류의 Calibrator 간 기울기의 차이가 10% 이상이면, 매질에 의해 영향을 받는다고 평가하며, 결과 값 보정이 필요하다고 판단하였다.

< 매질효과 >

A = Water를 이용하여 조제한 Calibrator (STD1-5)

B = Blank urine을 이용하여 조제한 Calibrator (STD1-5)

※ 평가기준: 기울기의 차이 > 10% = matrix effect

5. 내부 시험방법 절차서 작성

흡연폐해실험실 시험업무 수행 시 소변 내 Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine 정량시험 방법에 대한 규정을 목적으로 시약, 장비, 표준물질 조제, 시료전처리, 분석조건 등에 대한 내부 시험방법 절차서를 마련하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

가. 최저정량한계(LLOQ) 및 측정가능범위(AMR)

소변 공시료(Blank urine)를 이용하여 1-6 단계 농도로 표준물질을 조제한 후, 농도별로 5회 반복 전처리 및 분석하였다. 평균 값을 이용해 R^2 값과 정확성(Accuracy, %), 변동계수(CV, %)를 산출하였다. 산출한 결과값을 이용해 평가기준에 따라 최저검출한계와 측정가능범위를 결정하였다(표 2).

〈 평가기준 〉

- ① LLOQ: Accuracy(%), CV(%) \pm 20% 이내
 ② AMR: Linearity R^2 값 0.99 이상, Accuracy(%), CV(%) \pm 15% 이내

표 2. 최저정량한계(LLOQ) 및 측정가능범위(AMR)

(단위: ng/mL)

Analyte (n=5)	LLOQ (ng/mL)	AMR (ng/mL)
Nicotine	1.10	1-10000
Nornicotine	1.11	1-10000
Cotinine	1.09	1-10000
3'-OH Cotinine	5.21	5-50000
Anabasine	1.07	1-10000

나. 직선성(Linearity)

Nicotine, Nornicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine의 표준물질을 측정하여 나타난 피크를 적분하여 면적(area)으로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였고, 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해, R^2 가 0.999 이상임을 확인하였다.

다. 재현성(Repeatability) 및 정확성(Accuracy)

값을 알고있는 Reference 물질(NIST, Clinchek control)을 이용하여, 각 7회 반복 전처리 및 분석한 후 평균값을 이용하여 실험의 재현성과 정확성을 산출하였으며, Nicotine, Nornicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine의 재현성, 정확도는 변동계수(CV) \pm 15% 이내로 확인되었다(표 3-4).

표 3. 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 재현성

(단위: ng/mL)

Analyte (n=7)	Target value (ng/mL)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
Nicotine	13	12.5	1.2	9.5
	180	186.6	4.0	2.1
Nornicotine	20	21.2	2.2	10.5
	200	203.9	8.9	4.3
Cotinine	1.09	1.2	0.1	8.5
	165	167.7	6.3	3.7
3'-OH Cotinine	493.9	481.8	21.7	4.5
	348	343.6	4.9	1.4
Anabasine	20	21.6	2.2	10.0
	200	202.8	12.7	6.3

표 4. 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 정확성

(단위: ng/mL)

Analyte (n=5)	Target value (ng/mL)	Mean (ng/mL)	Accuracy (%)
Nicotine	13	12.5	96.0
	180	186.6	96.4
Nornicotine	20	21.2	106.1
	200	203.9	101.9
Cotinine	1.09	1.2	93.4
	165	167.7	98.4
3'-OH Cotinine	493.9	481.8	102.5
	348	343.6	101.3
Anabasine	20	21.6	107.8
	200	202.8	101.4

라. 정밀성(Precision)

Nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine은 시중에서 판매중인 참조물질(NIST, Clinchek control)을 이용하여, Nor nicotine, Anabasine은 Blank urine에 2개 농도(저, 고농도)로 조제한 물질을 이용하여 정밀성을 평가하였다. 각 전처리 시료를 5회 반복 주입(injection)한 후 평균값을 이용하여 일내 정밀도를 평가 하였으며, 5일동안 각 5회 반복 전처리 및 분석을 진행하였다. 평균값을 이용하여 일간 정밀도를 평가하였으며 일내, 일간 정밀도는 각 변동계수(CV) 15% 이내로 확인되었다(표 5-6).

표 5. 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 일내 정밀도

(단위: ng/mL)

Analyte (n=5)	Target value (ng/mL)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
Nicotine	13	15.4	0.3	2.2
	180	174.5	1.9	1.1
Nor nicotine	20	22.5	0.4	1.7
	200	209.0	0.9	0.4
Cotinine	1.09	1.2	0.0	3.5
	165	171.6	0.5	0.3
3'-OH Cotinine	493.9	486.4	1.5	0.3
	348	339.6	1.2	0.4
Anabasine	20	18.9	0.3	1.8
	200	192.1	0.8	0.4

표 5. 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 일간 정밀도

(단위: ng/mL)

Analyte (n=5)	Target value (ng/mL)	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
Nicotine	13	12.3	0.8	6.8
	180	178.6	6.3	3.5
Nor nicotine	20	22.0	1.0	4.5
	200	201.5	5.1	2.5
Cotinine	1.09	1.10	0.10	9.27
	165	164.2	5.18	3.15
3'-OH Cotinine	493.9	493.5	13.5	2.7
	348	349.1	9.5	2.7
Anabasine	20	20.2	1.7	8.3
	200	196.1	6.5	3.3

마. 검출 · 정량한계

소변 공시료(Blank urine) 내 표준물질 0에 가까운 3개의 농도로 각각 첨가한 후, 각 농도별로 7번 반복 전처리 및 분석하여 각 농도별 평균값과 표준편차 값을 구하였다. X축을 평균값, Y축을 표준편차 값으로 설정하여 회귀선을 작성하였다.

이때, 산출된 y절편의 3배를 LOD 값으로 지정하며, LOQ는 LOD 값의 3배로 지정하였다 (표 7-11, 그림 1-5).

표 7. Nicotine 검출·정량한계

- 검출한계: 0.09 ng/mL
- 정량한계: 0.28 ng/mL

(단위: ng/mL)

Nicotine (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
1	0.86	0.05
10	9.94	0.30
50	49.20	1.09

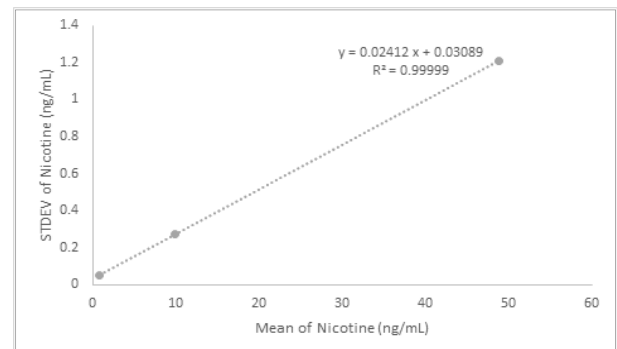


그림 1. Nicotine 검출·정량한계

표 8. Nornicotine 검출·정량한계

- 검출한계: 0.01 ng/mL
- 정량한계: 0.03 ng/mL

(단위: ng/mL)

Nornicotine (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
1	0.88	0.04
10	9.91	0.19
50	49.1	1.04

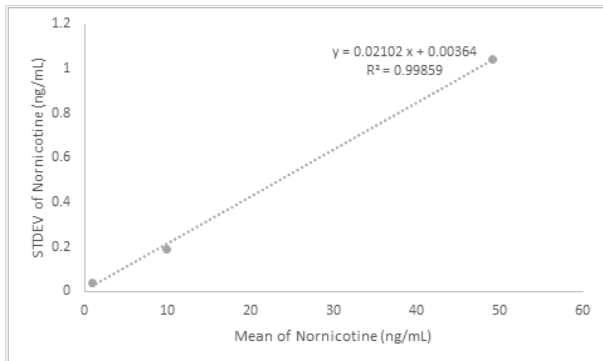


그림 2. Nornicotine 검출·정량한계

표 9. Cotinine 검출·정량한계

- 검출한계: 0.06 ng/mL
- 정량한계: 0.19 ng/mL

(단위: ng/mL)

Cotinine (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
1	0.91	0.05
10	9.98	0.11
50	50.2	0.98

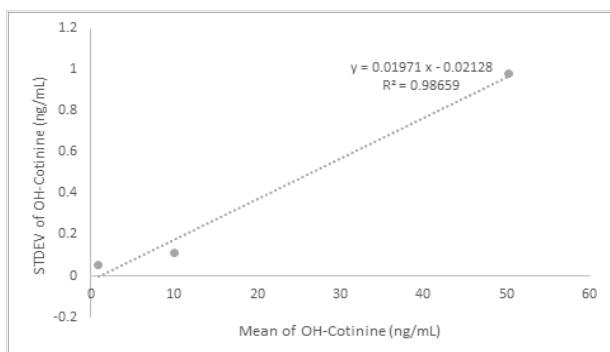


그림 3. Cotinine 검출·정량한계

표 10. 3'-OH Cotinine 검출·정량한계

- 검출한계: 0.63 ng/mL
- 정량한계: 1.89 ng/mL

(단위: ng/mL)

3'-OH Cotinine (n=7)	평균 (X축)	표준편차 (Y축)
5	4.89	0.32
50	49.84	0.69
100	101.37	1.43

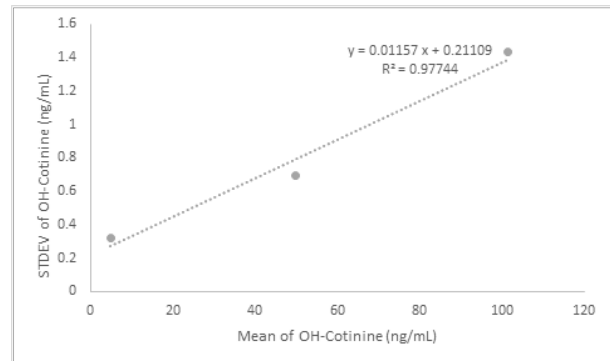


그림 4. 3'-OH Cotinine 검출·정량한계

표 11. Anabesine 검출·정량한계

- 검출한계: 0.05 ng/mL
- 정량한계: 0.14 ng/mL

(단위: ng/mL)

Anabesine (n=7)	평균(X축)	표준편차(Y축)
1	0.98	0.02
10	10.04	0.21
50	49.31	0.89

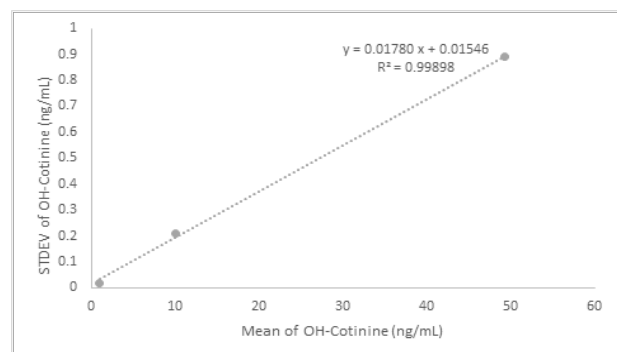


그림 5. Anabesine 검출·정량한계

바. 캐리오버(Carryover)

고농도의 5개 표준물질을 1번 주입(Injection)한 후, Blank 시료(only ISTD)를 5번 연속 주입하여, 3번 반복 실시한 결과 Blank 시료에서 분석물질이 미검출 되어 캐리오버가 발생하지 않음을 확인하였다 (표12).

표 12. 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 캐리오버

(단위: ng/mL)

	Nicotine	Normicotine	Cotinine	3'-OH Cotinine	Anabasine
고농도 표준시료	989	993	1013	4893	988
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
고농도 표준시료	991	990	1037	4912	991
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
고농도 표준시료	987	997	1031	4907	993
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0
공시료	0	0	0	0	0

사. 매트릭스효과(Matrix effect)

Calibrator를 소변(urine)과 물(water)에 각 조제한 후, 검정곡선의 기울기 차이를 확인하였다. 그 결과, 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 성분은 Matrix(소변)에 의해 검정곡선의 기울기 차이가 10%에 근접하게 차이나는 것을 확인하였다 (표13). 따라서 본 시험법을 이용한 정량분석 시 검정곡선은 매트릭스(소변)에 조제된 표준물질을 이용하는 것을 권장한다.

표 13. 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 매트릭스효과

(단위: ng/mL)

Analyte	Sample	Slope	R ²	Slope diff. (%)
Nicotine	Water	1.0065	0.999	9.6
Nicotine	Urine	1.1133	0.999	
Normicotine	Water	1.0037	0.999	10.4
Normicotine	Urine	1.1197	0.999	
Cotinine	Water	1.0379	0.999	9.0
Cotinine	Urine	1.1411	0.999	
3'-OH Cotinine	Water	1.0332	0.999	9.1
3'-OH Cotinine	Urine	1.1365	0.999	
Anabasine	Water	1.0075	0.999	8.7
Anabasine	Urine	1.1036	0.999	

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴
대사체 및 알칼로이드(5종) 분석

나. 문서번호: KDCA-M-01

다. 제개정일: 2022.12.22.

라. 절차서 내용

1) 사용시약

시약명	주요특성
S(-)-Nicotine (CRM)	표준물질
(±)-Nicotine-d ₄ (CRM)	내부표준물질
(±)-Nornicotine (CRM)	표준물질
(±)-Nornicotine-d ₄ (CRM)	내부표준물질
(-)-Cotinine (CRM)	표준물질
(±)-Cotinine-d ₃ (CRM)	내부표준물질
trans-3'-Hydroxy cotinine (CRM)	표준물질
trans-3'-Hydroxy cotinine-d ₃ (CRM)	내부표준물질
(+)-Anabasine hydrochloride solution (CRM)	표준물질
(R)-Anabasine-d ₄	내부표준물질
Ammonium bicarbonate	이동상 용매
Methanol, HPLC grade	이동상 용매
Formic acid for LC-MS, 97.5-98.5%	이동상 용매
Mass Spect Gold Human Urine	표준물질 및 정도관리물질 조제 (Blank urine)

2) 표준물질

성분명	농도 (ng/mL)				
	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
Nicotine	1	5	50	500	1000
Nornicotine	1	5	50	500	1000
Cotinine	1	5	50	500	1000
3'-OH Cotinine	5	25	250	2500	5000
Anabasine	1	5	50	500	1000

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
Sonicator	이동상 용매 조제

5) 분석장비

장비명: LC/MS/MS (액체크로마토그래피-다중질량분석기)

제조사명 /모델명	장비사양
Agilent 1290 HPLC/ 6460 triple quadrupole	<ul style="list-style-type: none"> • Mass range : m/z 5 to 3,000 • Scanning speed : > 12,500 Da/s • Dynamic range : > 6.0×10^6 • Mass accuracy <ul style="list-style-type: none"> - 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 <ul style="list-style-type: none"> - (autotune) : 0.7 Da - (manual tune) : 0.5 Da

6) 시험절차

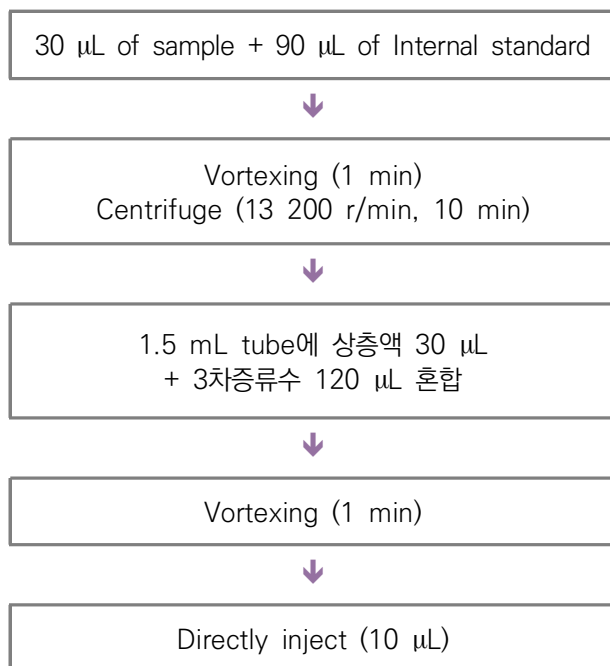


그림 6. 니코틴 대사체 및 알칼로이드(5종) 시험절차

마. 시험방법 유효화 보고서

최소정량한계(LLOQ), 측정가능범위(AMR), 직선성(Linearity), 재현성(Repeatability), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 캐리오버(Carryover), 매트릭스효과(Matrix effect), 안정성(Stability) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상으로 확인하였다. 정밀성은 변동계수(CV) 15% 이내였으며, 정확성은 각 농도에서 $\pm 15\%$ 로 확인하였다. 검출한계는 Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine 각 0.09 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.06 ng/mL, 0.63 ng/mL, 0.05 ng/mL 이었으며, 정량한계는 Nicotine, Nor nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine 각 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 1.0 ng/mL으로 확인되었다. 재현성은 변동계수(CV) 15% 이내였으며, 본 시험법에서는 캐리오버가 발생하지 않는 것을 확인하였다. 생체시료 성분에 의한 영향(매트릭스효과)은 각 항목별 기울기 차이가 10%에 근접한 것을 확인 하였으며, 이에 본 시험법에서는 표준물질을 Urine을 이용하여 조제하고 표준물질 함량 분석 시 내부표준물질과의 함량비를 이용하여 정량하고자 하였다.

참고문헌

1. Kim, S. (2016) Overview of cotinine cutoff values for smoking status classification. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13, 1236.
2. Florescu, A., Ferrence, R., Einarson, T., Selby, P., Soldin, O., Koren, G. (2009) Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology. Therapeutic Drug

- Monitoring, 31, 14–30.
3. Ramsey S. Lewis et al., 2008. RNA interference (RNAi)-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves.
 4. Benowitz, N.L., Hukkanen, J., Jacob, P. (2009) Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. In Henningfield, J.E., London, E.D., and Pogun, S. (eds), Nicotine psychopharmacology, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 29–60.
 5. Ko, K., Kwon, M.J., Yang, S.H., Moon, C.J., Lee, E.H., Woo, H.Y., et al. (2016) Evaluation of serum cotinine cut-off to distinguish smokers from nonsmokers in the Korean population. *Annals of Laboratory Medicine*, 36, 427–433.
 6. Julie-Anne Tanner et al., 2015. Nicotine Metabolite Ratio (3'-hydroxy cotinine/cotinine) in Plasma and Urine by Different Analytical Methods and Laboratories: Implications for Clinical Implementation.
 7. Jacob, P., Hatsukami, D., Severson, H., Hall, S., Yu, L., Benowitz, N.L. (2002) Anabasine and anatabine as biomarkers for tobacco use during nicotine replacement therapy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 11, 1668–1673.
 8. Jongwon Oh et al., 2022. A Simple and High-Throughput LC-MS-MS method for Simultaneous Measurement of Nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Nornicotine and Anabasine in Urine and Its Application in the General Korean Population. *Journal of Analytical Toxicology*.
 9. NATA General Accreditation Guidance- Validation and verification of quantitative and qualitative test methods, 2018.
 10. FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2013.
 11. KOLAS-G-015 화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침, 2012.
 12. 생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인, 식품의약품 안전처, 2013.

② 소변 내 중금속 6종(Al, Cr, Ni, Cd, Hg, Pb) 분석

연구 배경

담배에는 니켈(Nickel), 카드뮴(Cadmium), 수은(Mercury), 납(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 이용한 「흡연폐해 바이오모니터링」 사업에 알루미늄(Al), 크롬(Cr), 납(Pb), 수은(Hg), 카드뮴(Cd) 및 니켈(Ni)의 중금속을 2022년부터 포함하였으며, 이를 통해 정기적으로 모니터링 및 통계공개를 시행할 예정이다. 또한, ICP-MS(7900 ICP-MS, Agilent Technologies, Japan) 방법을 적용하여 흡연폐해실험실 내부시험방법 표준 절차를 마련하였다.

연구 내용 및 방법

1. 분석방법 선택

소변 내 중금속 측정으로 흡연폐해 바이오모니터링 중금속 분석('22-'24)」의 분석법(1)을 활용하여 시험법을 확립하였으며, 에질런트(Agilent) 분석 장비 매뉴얼(2, 3, 5)을 참고하여 질량분석기의 이온렌즈 값, 운반 및 보조가스 주입량 등 기기 상태에 적합한 분석조건을 설정하였다. 흡연폐해 실험실 보유 장비·환경에 적합한 시험절차 및 분석방법을 내부시험법 절차서로 확립하고, 유효화 시험을 통해 소변시료 내 알루미늄(Al), 크롬(Cr), 납(Pb), 수은(Hg), 카드뮴(Cd) 및 니켈(Ni)의 정량 분석을 검증하였다(6, 7).

2. 시료 전처리

시료 전처리 과정으로는 그림 1과 같이 먼저 표준용액, 희석용액, 질산용액을 제조하였고, 냉동보관된 샘플은 상온에서 안정화 후 균질화하였다. 그 후 샘플 0.1 mL를 취한 후 내부표준물질이 포함된 희석용액 1.9 mL 추가하여 총 용량이 2 mL 되도록 하였다. 그 다음 검정곡선을 위한 표준용액인 혼합표준용액, 내부혼합표준용액을 조제하고 검정곡선을 준비하였다. 혼합내부표준용액을 동일량 샘플마다 전부 넣어 주었고, 시료분석은 샘플량의 20배를 희석하여 분석하였다. 이때, 분석상황에 따라 희석배수 조정이 가능하다. 샘플의 총 용량은 2 mL로, 측정순서는 공시료(blank), 검정곡선 저농도에서 고농도, 그리고 샘플 순으로 진행하였고, 잔류효과(carry-over)를 최소화하기 위해 시료 중간에 세척용액을 넣어주었다.

전처리 절차

1) 표준용액, 희석용액 및 질산용액 준비



2) 검정곡선을 위한 표준용액 준비
- 혼합표준용액, 내부혼합표준용액을 조제함



3) 샘플 준비
- 냉동보관→상온에서 안정화·균질화
- 샘플은 0.1 mL 취함
- 총 용량이 2 mL가 되도록 함(내부표준물질이 포함된 희석용액 1.9 mL 추가)



4) 시료분석
- Sample은 내부표준물질이 포함된 희석액을 사용하여 최종 20배 희석이 되도록 준비(희석배수 조정 가능)
- Sample 총 용량은 2 mL, 측정순서는 blank, 검정 곡선 저농도→고농도, 샘플순
- 20개 샘플마다 1개 이상의 QC(Quality control) 측정

그림 1. 전처리 흐름도

① 검체

검체의 종류는 소변이며, 무작위 수집이나 침전물 발견, 용기 파손 및 전처리과정 중 소실이 발생한 검체는 부적합검체로 분류하여 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 °C 이하에서 동결 보관한다. 분석 시에는 동결 검체는 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 가능한 인증 표준물질을 선택한다(표 1). 표준물질(분석항목) 사용 시, 유효기간을 확인하여 사용하고, 내부표준 물질은 Gallium(^{71}Ga), Germanium(^{72}Ge), Yttrium(^{89}Y), Rhodium(^{103}Rh), Indium(^{115}In), Tellurium(^{125}Te), Lutetium(^{175}Lu), Rhenium(^{185}Re), Iridium(^{193}Ir), Thallium(^{205}Tl), 등 분석에 적합한 물질을 선택적으로 사용한다. 본 시험법에서는 Scandium(^{45}Sc), Germanium(^{72}Ge), Rhodium(^{103}Rh), Indium(^{115}In)을 사용였고, 유도결합플라즈마 질량분석기(ICP-MS) 가동을 위해 고순도 아르곤(Ar) 가스 및 초고순도 헬륨(He) 가스를 준비하였다.

표 1. 전처리 및 분석 시약

연번	시약명
1	Aluminium(Al)
2	Chromium(Cr)
3	Nickel(Ni)
4	Cadmium(Cd)
5	Lead(Pb)
6	Mercury(Hg)
7	Nitric acid(HNO_3)
8	Hydrochloric acid(HCl)
9	Indium(In)
10	Rhodium(Rh)
11	Nitric acid(HNO_3)
12	Hydrochloric acid(HCl)
13	Gold(Au)
14	Triton X-100
15	1-Butanol
16	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 M Ω cm)를 5 mL와 Triton X-100 1 mL를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 (1~5)% 질산 등으로 충분히 위상이 필요하다. 총 용량이 10 mL가 되도록 증류수(18 M Ω cm)로 채우고 충분히 혼합시킨다.

Standard solution(1% HNO_3 + 0.5% HCl, 1 L)의 경우, 1 L 플라스틱(polypropylene(PP) or teflon) 용기에 증류수(18 M Ω cm) 500 mL를 넣은 후 질산 10 mL과 염산 5 mL를 넣는다. 단, 용기 사용전에는 (1~5)% 질산 등으로 충분히 위상한다. 총 용량이 1 L가 되도록 증류수(18 M Ω cm)로 채우고 충분히 혼합시킨다.

Dilution solution의 경우, 표준물질 용액 및 시료 조제 시에 필요하며, 10% Triton X-100 5 g, Butanol 15 g(비중 0.81)와 EDTA 0.5 g, 25% NH_4OH 5 g(비중 약 0.9)을 넣고 총 용량이 1 L가 되도록

중류수로 채운다. 내부표준물질(ISTD)을 추가하여 넣을 수 있고, ICP-MS 라인 세척용(희석 가능)으로 사용 가능하다. ICP-MS rinse solution의 경우 Au 200 μ L을 dilution solution으로 사용하여 최종 부피가 1,000 mL이 되도록 희석한다.

혼합내부표준용액①의 경우, 내부표준물질의 개별 또는 혼합 표준품(또는 stock solution) 농도를 고려하여 총 용량이 50 mL가 되도록 standard solution(1% HNO₃ + 0.5% HCl) 으로 채운다.

혼합내부표준용액②의 경우 분석용 희석용액으로 사용되며, 50 mL 이상의 플라스틱(PP or teflon) 혼합내부표준용액 250 μ L를 넣고 총 용량이 500 mL가 되도록 dilution solution으로 채운다.

검정곡선을 위한 혼합표준용액①의 경우 표2와 같이 각 표준품에 해당하는 농도별로 총 50mL가 되도록 standard solution(1% HNO₃ + 0.5% HCl) 으로 채운다. 조제된 stock solution을 각 농도별 표준용액 4가지 농도로 희석하여 조제한다(표 3).

표 2. 혼합표준용액① stock 조제방법

Standard	CRM Conc. (mg/L)	Weight (g) of CRM	Total Weight (g)	Final Conc. (mg/L)
Aluminum	1,000	0.100	50	Al 2.0 mg/L, Cr 0.8 mg/L, Ni 0.8 mg/L, Cd 0.8 mg/L, Hg 1.0 mg/L, Pb 2.0 mg/L (mixed)
Chromium	1,000	0.040		
Cadmium	1,000	0.040		
Nickel	1,000	0.040		
Mercury	1,000	0.050		
Lead	1,000	0.100		
HNO ₃ +HCl	-	Mass-up		

표 3. 혼합표준용액 최종농도

Standard	농도(μ g/L)				
	Blank	STD1	STD2	STD3	STD4
Aluminum	0	25	50	100	200
Chromium	0	10	20	40	80
Cadmium	0	10	20	40	80
Nickel	0	10	20	40	80
Mercury	0	12.5	25	50	100
Lead	0	25	50	100	200

분석항목별 적정 농도범위에 해당하는 검정곡선 농도 지점을 표3을 참고하여 적용가능하며, 샘플의 경우 20배 희석하며 희석배수는 조정 가능하다. 수은(Hg) 분석 시에는 수은 농도 대비 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 정하여 샘플 분석 시 같이 확인한다.

표 4. 초자·소모품 및 보조장비 목록

장비명	규격	사용목적
sample tube	15 mL	시료 조제
PP 메스실린더	500 mL, 1 L, 2L	시료 조제
Teflon bottle	250 mL, 500 mL, 1,000 mL	시료 조제
Tip	100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L, 5,000 μ L	검정곡선, 시료 조제
피펫	10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1,000 μ L, 5,000 μ L	검정곡선, 시료 조제
초저온 냉동고	U-570	검체 보관
냉장고	4 $^{\circ}$ C	시약 및 검체 보관
분석용 전자저울	XPE205	시약 조제
볼텍서(Vortexer)	VS-130SH	균질 혼합
초순수 제조장치	MILLI-Q DIRECT 8	시약 조제

3. 기기분석방법

전처리한 시료를 ICP-MS에 주입하여 분석하기 위한 기기조건 참고치는 고주파 파워(RF power) 1550 V, 에너지 차이(Energy Discrimination) 5.0 V, 헬륨가스 흐름속도 5.0 mL/min으로 설정하였다. 통합시료 도입시스템(Integrated Sample Introduction System, ISIS)의 경우, 사전실행(pre-run)에서 샘플 주입은 50초, 0.5 회전/초 속도로 안정화하여 45초로, 사후 실행(pre-run)에서 첫 번째, 두번째 세척은 50초, 0.5 회전/초 속도로 설정하였다(표 6). 분석항목별 질량을 맞추는 때에는 Aluminium은 27, Chromium은 52 또는 53, Nickel은 58 또는 60, Cadmium은 111, Mercury은 201 또는 202, Lead은 208, 내부표준물질인 Scandium은 45, Germanium은 72, Rhodium은 103, Indium은 115였다(표 7).

표 5. ICP-MS 장비사양

제조사명 /모델명	장비사양
Agilent 7900 ICP/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Mass range : 2 to 260 μ • Range : < 1ppt ~ 1,000 • Abundanced sensitivity(at Cs) <ul style="list-style-type: none"> - Low mass side: 5×10^{-7} - High mass side: 1×10^{-7} • Mass calibration stability : < 0.05 μ per day < 0.1 μ per 6 months • Mass resolution: variable from 0.3 to 1.0 μ

표 6. ICP-MS 기기조건

유도결합플라즈마 질량분석기		
파라미터		설정값
고주파 파워		1550 V
에너지 차이		5.0 V
헬륨 가스		5.0 mL/min
통합 시료 도입 시스템		
사전 실행	샘플주입	30 초, 0.5 회전/초(속도)
	안정화	45 초
사후 실행	세척1	50 초, 0.5 회전/초(속도)
	세척2	50 초, 0.5 회전/초(속도)

표 7. 분석항목별 질량(mass) 등 설정값

연번	분석항목	질량	Integ.Time/ Mass[sec]
1	Aluminum(Al)	27	0.3000
2	Chromium(Cr)	52/53	0.3000
3	Nickel(Ni)	58/60	0.3000
4	Cadmium(Cd)	111	0.3000
5	Mercury(Hg)	201/202	0.3000
6	Lead(Pb)	208	0.3000
7	Scandium(Sc)	45	0.3000
8	Germanium(Ge)	72	0.3000
9	Rhodium(Rh)	103	0.3000
10	Indium(In)	115	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 등으로 진행하였다.

1) 직선성(linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석 대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다. 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 평가하였다. 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산하였으며, 이 때 R^2 값이 최소 0.995 이상이 되도록 하였다.

2) 바탕실험 및 잔류효과실험

실제 검체 분석시 결과값에 영향을 주는 요소를 고려 또는 제거하기 위해서 실시한다. 검체 내 분석항목 정량시, 전처리과정(희석법 등) 및 기기 분석과정에서 시료 농도값에 영향을 줄 수 있는 요인이 발생될 수 있으므로 바탕실험 및 잔류효과 실험의 결과를 확인하였고, 검정곡선 농도 0지점(calibration blank) 또는 분석가능한 최소 농도의 시료를 활용하여 분석직전·중간·직후에 실시하였다.

3) 정밀도(Precision) 및 정확도(Accuracy)

정확성과 정밀성은 일내(intra-day)으로 검정곡선 농도범위 안의 특정 농도를 하루 동안 최소 3회 반복하고, 일간(inter-day)으로 3일에 걸쳐 최소 3회 반복하여 측정한 결과를 평균과 표준편차로 평가한다. 정확성 및 정밀성 평가 방법으로는

내부정도관리 시료를 이용하여 서로 다른 3개 농도(예를들어, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g/L}$)를 주입(spiking) 한 후 각 농도별로 최소 3회 이상 반복 분석하거나, 동일한 전처리과정으로 각 5회 반복분석하여 평균값을 이용하여 평가한다.

정확성 평가를 위해서는 내부정도관리 시료를 이용해 동일한 전처리 과정을 진행하여 각 시료를 5회 반복분석하여 일내 정밀도를 평가하였다.

정밀성 평가를 위해서 일내(intra-day) 정밀성과 일간(inter-day) 정밀성을 각각 측정하였다. 일내 정밀성(Intraday precision)은 동일한 날에 1가지 일정 수준의 농도를 5번 반복 측정하여 변동계수를 측정하였다. 일간 정밀성(interday precision)는 시험 일자를 달리하여 5일 동안 서로 다른 동일한 전처리 과정을 진행하여 각 시료를 5회 반복분석 하였다.

정확성은 (80~120)% 이내인지를 확인하였고, 정밀성 판단은 상대표준편차(Relative Standard Deviation, % RSD)가 10% 이내인지를 확인하였다.

4) 검출한계(LOD) 및 정량한계(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. 검출가능한 농도 시료(0.4 ~ 1 $\mu\text{g/L}$) 7개를 시험법에 적용 후 측정하여 구한 (편차÷검정곡선 기울기)에 3.3배 값을 검출한계(LOD)로 정하였으며, 정량한계(LOQ)는 검출한계(LOD)의 3배 값으로 산출하였다.

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 흡연폐해 실험실 분석환경에 맞게 적정수준으로 조정하여 반영하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 직선성, 정량한계 및 분석가능 범위

각 원소에 대한 최저정량한계는 Aluminium의 경우 $1 \mu\text{g/L}$, Chromium, Nickel, Cadmium의 경우 $0.04 \mu\text{g/L}$, Mercury의 경우 $0.05 \mu\text{g/L}$, Lead의 경우 $0.1 \mu\text{g/L}$ 을 나타내었으며, 모든 검정 곡선의 직선성은 R^2 0.999 이상임을 확인하였다 (그림 2). 분석가능 범위로는 Aluminium의 경우 $1\sim 400 \mu\text{g/L}$, Chromium, Nickel, Cadmium의 경우 $0.04\sim 160 \mu\text{g/L}$, Mercury의 경우 $0.05\sim 200 \mu\text{g/L}$, Lead의 경우 $0.1\sim 400 \mu\text{g/L}$ 의 분석가능 범위를 나타내었다(표 8).

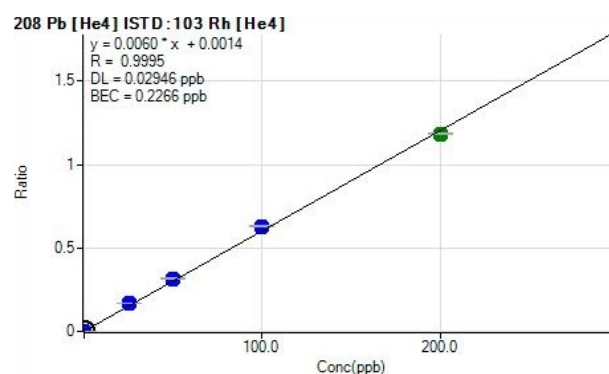
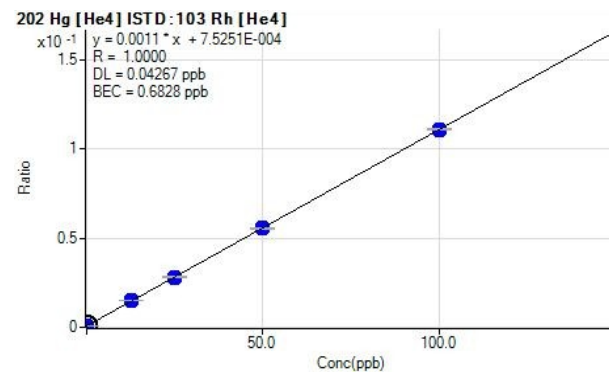
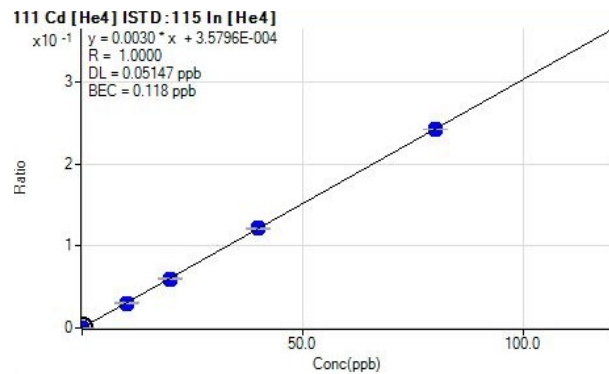
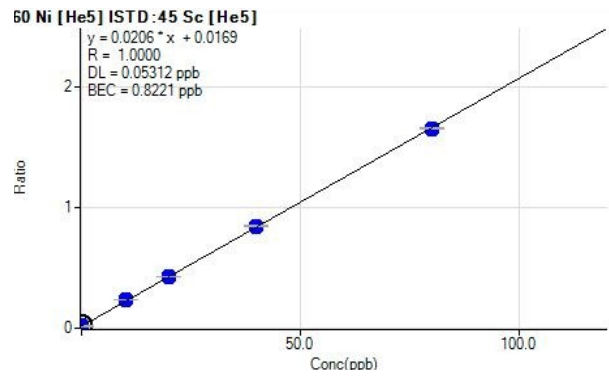
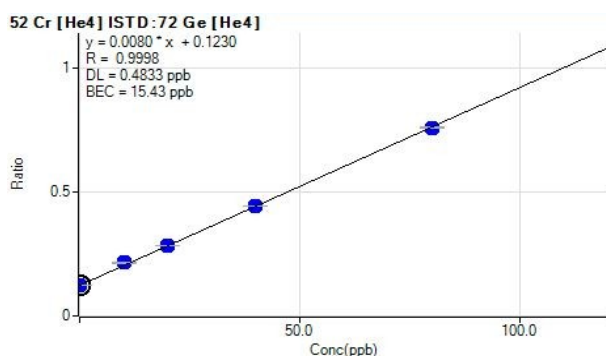
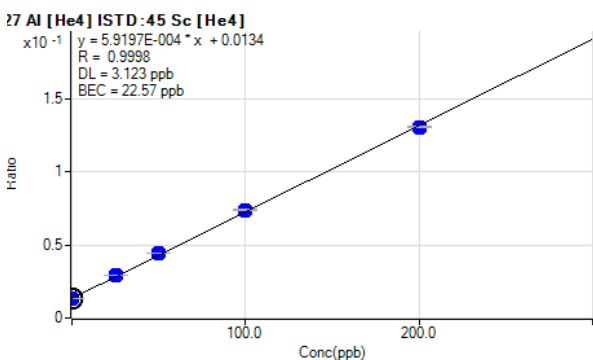


그림 2. 분석항목별 검정곡선

표 8. 분석항목별 분석가능 범위

Aluminium				
조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	측정농도 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	정확도 (%)	R^2
1	1.084	5.2	108.4	0.9999
2	1.868	6	93.4	
5	4.924	5.2	98.5	
10	10.022	2.5	100.2	
100	97.417	1.7	97.4	
200	199.609	1.5	99.8	
300	301.073	1.7	100.3	
400	400.134	2.0	100.0	

Chromium				
조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	측정농도 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	정확도 (%)	R^2
0.04	0.042	19.9	105.0	0.9999
0.08	0.083	9.7	103.7	
0.2	0.216	5.0	108.0	
0.4	0.374	6.8	93.5	
0.8	0.808	6.6	101	
2	1.884	3.9	94.2	
4	3.868	2.7	96.7	
20	19.687	2.1	98.4	
40	39.400	1.5	98.5	
80	79.006	1.3	98.7	
120	119.422	1.5	99.5	
160	161.124	1.7	100.7	

Nickel				
조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	측정농도 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	정확도 (%)	R^2
0.04	0.04	10.0	100.0	0.9999
0.08	0.083	4.9	103.7	
0.2	0.196	5.3	98.0	
0.4	0.392	2.1	98.0	
0.8	0.806	1.7	100.7	
2	1.981	3.0	99.1	
4	4.033	2.8	100.8	
20	20.375	3.3	101.8	
40	39.072	2.1	97.7	
80	77.776	1.9	97.2	
120	120.36	2.8	100.3	
160	161.024	2.5	100.6	

Cadmium				
조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	측정농도 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	정확도 (%)	R^2
0.04	0.045	10.4	112.5	0.9999
0.08	0.080	5.2	100.0	
0.2	0.208	11.0	104.0	
0.4	0.410	7.5	102.5	
0.8	0.792	3.2	99.0	
2	1.969	2.7	98.4	
4	4.073	0.4	101.8	
20	20.607	0.6	103.0	
40	41.611	0.6	104.0	
80	83.469	0.9	104.3	
120	118.174	1.0	98.5	
160	159.154	0.4	99.5	

Mercury				
조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	측정농도 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	정확도 (%)	R^2
0.05	0.05	10.5	100.0	0.9999
0.1	0.100	8.1	100.0	
0.25	0.244	11.2	97.6	
0.5	0.485	7.5	97.0	
1	1.009	2.7	100.9	
2.5	2.391	3.2	95.6	
5	4.983	1.0	99.7	
25	26.325	0.6	105.3	
50	52.785	0.4	405.6	
100	99.779	0.6	99.8	
150	150.478	0.4	100.3	
200	198.891	0.5	99.4	

Lead				
조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	측정농도 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	정확도 (%)	R^2
0.1	0.100	7.3	100.0	0.9999
0.2	0.201	5.2	100.5	
0.5	0.504	5.0	100.8	
1	1.000	4.1	100.0	
2	1.997	2.5	99.8	
5	4.963	3.0	99.3	
10	9.565	1.5	95.6	
50	49.231	0.7	98.5	
100	100.183	1.3	100.2	
200	199.853	0.9	99.9	
300	300.364	1.1	100.1	
400	399.861	1.2	99.9	

2) 바탕실험 및 잔류효과실험

샘플 전·후로 공시료를 분석한 결과, 분석항목들이 검출되지 않음을 확인하였다(표 9).

표 9. 바탕실험 및 잔류효과실험 결과

샘플분석(분석항목별 농도, $\mu\text{g/L}$)			
연번	샘플순서	Aluminium	Chromium
1	공시료	<0.1	<0.01
2	샘플①	5.121	5.052
3	공시료	<0.1	<0.01
4	샘플②	5.202	5.073
5	공시료	<0.1	<0.01
연번	샘플순서	Nickel	Cadmium
1	공시료	<0.01	<0.01
2	샘플①	5.112	5.047
3	공시료	<0.01	<0.01
4	샘플②	5.080	5.101
5	공시료	<0.01	<0.01
연번	샘플순서	Mercury	Lead
1	공시료	<0.01	<0.001
2	샘플①	5.202	5.091
3	공시료	<0.01	<0.001
4	샘플②	5.151	5.250
5	공시료	<0.01	<0.001

3) 정밀·정확도 실험

내부정도관리 물질 저·고농도 2가지를 이용한 일간 정확성 결과는 Aluminium의 경우 90.2~99.1%, Chromium의 경우 97.4~103.8%, Nickel의 경우 105.8~106.6%, Cadmium의 경우 94.1~98.5%, Mercury의 경우 96.4~112.6%, 그리고 Lead의 경우 99.1~99.7%였다. 일간 정밀성(RSD)의 경우, Aluminium의 경우 1.1~4.5%, Chromium의 경우 0.4~0.5%, Nickel의 경우 0.5~0.6%, Cadmium의 경우 0.1~0.8%, Mercury의 경우 0.3~6.0%, 마지막으로 Lead의 경우 0.7~2.6% 였다(표 10-11).

표 10. 일내 정확도·정밀성 결과(n=5)

Al	평균농도($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
1 day	30.1	1.25	4.2	90.1
	83.9	0.76	0.9	102.2
2 day	29.5	1.0	3.3	88.2
	80.0	1.3	1.6	97.3
3 day	30.8	1.83	5.9	88.5
	80.3	0.82	1.0	97.7
4 day	30.3	1.05	3.4	90.7
	81.1	1.6	1.9	98.6

Cr	평균농도($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
1 day	3.95	0.11	2.7	96.7
	10.3	0.2	1.9	103.2
2 day	4.12	0.08	1.9	100.9
	9.97	0.12	1.2	99.7
3 day	4.23	0.07	1.6	103.8
	9.99	0.1	1.0	99.9
4 day	4.11	0.08	1.9	102.7
	9.86	0.08	0.8	98.7

Ni	평균농도($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
1 day	3.28	0.04	1.2	100.8
	15.51	0.08	0.5	106.3
2 day	3.59	0.04	1.1	110.4
	15.3	0.14	0.9	105.2
3 day	3.38	0.07	2.0	104.0
	15.5	0.26	1.7	106.1
4 day	3.5	0.03	0.8	108.6
	15.53	0.19	1.2	106.4

Cd	평균농도($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
1 day	2.32	0.06	2.6	90.5
	14.5	0.09	0.6	98.9
2 day	2.43	0.04	1.6	94.8
	14.47	0.10	0.7	98.5
3 day	2.39	0.03	1.3	93.4
	14.32	0.11	0.8	97.4
4 day	2.50	0.02	0.8	97.8
	14.66	0.12	0.8	99.8

Hg	평균농도($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
1 day	2.11	0.05	2.4	110.01
	12.54	0.38	3.0	103.31
2 day	1.99	0.02	1.0	104.06
	12.52	0.39	3.1	90.23
3 day	2.27	0.05	2.2	118.13
	13.56	0.3	2.1	97.55
4 day	1.98	0.07	3.5	103.1
	13.34	0.3	2.2	96.00

Pb	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
1 day	27.72	0.34	1.2	105.03
	55.53	0.16	0.3	107.40
2 day	27.03	0.33	1.2	102.40
	49.79	0.53	1.1	96.31
3 day	25.15	1.20	4.7	95.29
	50.01	0.56	1.1	96.73
4 day	25.45	0.87	3.4	96.42
	49.56	0.20	0.4	95.8

표 11. 일간 정확성·정밀성 결과

Al	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
Level 1	30.13	1.36	4.5	90.2
Level 2	81.4	0.96	1.1	99.1

Cr	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
Level 1	4.10	0.02	0.4	103.8
Level 2	10.3	0.05	0.5	97.4

Ni	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
Level 1	3.43	0.02	0.6	106.6
Level 2	15.46	0.07	0.5	105.8

Cd	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
Level 1	2.41	0.02	0.8	94.1
Level 2	14.48	0.01	0.1	98.5

Hg	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
Level 1	2.16	0.13	6.0	112.6
Level 2	12.99	0.05	0.3	96.4

Pb	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	CV (%)	정확도 (%)
Level 1	26.33	0.68	2.6	99.7
Level 2	51.22	0.36	0.7	99.1

4) 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)

검출한계 및 정량한계는 Aluminium의 경우 $0.318 \mu\text{g/L}$, $0.963 \mu\text{g/L}$, Chromium의 경우 $0.024 \mu\text{g/L}$, $0.073 \mu\text{g/L}$, Nickel의 경우 $0.011 \mu\text{g/L}$, $0.034 \mu\text{g/L}$, Cadmium의 경우 $0.037 \mu\text{g/L}$, $0.112 \mu\text{g/L}$, Mercury의 경우 $0.018 \mu\text{g/L}$, $0.055 \mu\text{g/L}$, Lead의 경우 $0.026 \mu\text{g/L}$, $0.079 \mu\text{g/L}$ 였다(표 12).

표 12. 검출한계 실험결과

	조제농도 ($\mu\text{g/L}$)	평균농도 ($\mu\text{g/L}$)	편차	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Al	1.000	1.149	0.096	0.318	0.963
Cr		0.401	0.007	0.024	0.073
Ni		0.396	0.003	0.011	0.034
Cd		0.391	0.011	0.037	0.112
Hg		0.487	0.005	0.018	0.055
Pb		1.020	0.008	0.026	0.079

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: ICP-MS를 이용한 소변 내 중금속(6종) 분석

나. 문서번호: KDCA-M-09

다. 제개정일: 2022.12.22.

라. 절차서 내용

1) 사용시약

시약명	주요특성
Aluminium(Al)	표준물질
Chromium(Cr)	표준물질
Nickel(Ni)	표준물질
Cadmium(Cd)	표준물질
Lead(Pb)	표준물질
Mercury(Hg)	표준물질
Nitric acid(HNO ₃)	표준물질 및 분석용액 조제
Scandium	내부표준물질
Germanium	내부표준물질
Indium	내부표준물질
Rhodium	내부표준물질
Hydrochloric acid(HCl)	표준물질 및 분석용액 조제
Gold(Au)	표준물질 및 분석용액 조제
Triton X-100	분석용액 조제
1-Butanol	분석용액 조제
Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)	분석용액 조제

2) 표준물질

성분명	농도 (μg/L)				
	Blank	STD2	STD3	STD4	STD5
Aluminium	0	25	50	100	200
Chromium	0	10	20	40	80
Cadmium	0	10	20	40	80
Nickel	0	10	20	40	80
Mercury	0	12.5	25	50	100
Lead	0	25	50	100	200

3) 초자·소모품 및 보조장비

장비명	규격	사용목적
sample tube	15 mL	시료 조제
PP 메스실린더	500 mL, 1 L, 2L	시료 조제
Teflon bottle	250 mL, 500 mL, 1,000 mL	시료 조제
Tip	100 μL, 200 μL, 1,000 μL, 5,000 μL	검정곡선, 시료 조제
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 °C	시약 및 검체 보관
분석용 전자저울	XPE205	시약 조제
볼텍서(Vortexer)	VS-130SH	균질 혼합
초순수 제조장치	MILLI-Q DIRECT 8	시약 조제

4) 분석장비

장비명: ICP-MS (유도결합플라즈마 질량분석기)

제조사명/모델명	장비사양
Agilent 7900 ICP/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Mass range : 2 to 260 μ • Range : < 1ppt ~ 1,000 • Abundanced sensitivity(at Cs) <ul style="list-style-type: none"> - Low mass side: 5 × 10⁻⁷ - High mass side: 1 × 10⁻⁷ • Mass calibration stability : < 0.05 μ per day < 0.1 μ per 6 months • Mass resolution: variable from 0.3 to 1.0 μ

5) 시험절차

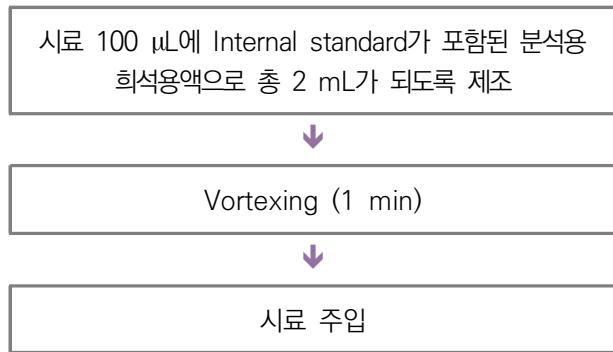


그림 3. 소변 내 중금속(6종) 분석 시험절차

마. 시험방법 유효화 보고서

최저정량한계(LLOQ), 측정가능범위(AMR), 직선성(Linearity), 재현성(Repeatability), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 캐리오버(Carryover) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상으로 확인하였다. 정밀성은 변동계수(CV) 15 % 이내였으며, 정확성은 각 농도에서 $\pm 15\%$ 로 확인하였다. 검출한계는 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Mercury, Lead에서 각 $0.555 \mu\text{g/L}$, $0.077 \mu\text{g/L}$, $0.056 \mu\text{g/L}$, $0.059 \mu\text{g/L}$, $0.033 \mu\text{g/L}$, $0.044 \mu\text{g/L}$ 이었으며, 최저정량한계는 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Mercury, Lead에서 각 $1 \mu\text{g/L}$, $0.04 \mu\text{g/L}$, $0.04 \mu\text{g/L}$, $0.04 \mu\text{g/L}$, $0.05 \mu\text{g/L}$, $0.1 \mu\text{g/L}$ 으로 확인되었다. 재현성은 변동계수(CV) 15 % 이내였으며, 바탕실험을 통해 잔류효과가 발생하지 않는 것을 확인하였다. 본 시험법에서는 표준물질을 질산과 염산 혼합용액에 조제하고 표준물질 함량 분석 시 내부표준물질과의 함량비를 이용하여 정량하고자 하였다.

참고문헌

1. Green Cross Laboratories, Determination of heavy metals as an indicator of hazard from smoking, 2017-2018.
2. Agilent Technologies, Clinical Sample Preparation Guide(v3)/Agilent 7900 Edition(2017년 접근)
3. ICP/MS를 이용한 혈액 및 요 중 중금속 분석방법 확립을 위한 연구(II), 2009, 국립환경과학원
4. 생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인, 2013, 식품의약품안전처
5. Clinical sample preparation guide v3, Agilent Technologies
6. Evaluation of mercury standard stability for analyzing human urine using inductively coupled plasma spectrometry, 2016, Shing Lau
7. ICP-MS를 이용한 Urine 중 Cu, Zn 분석, 2016, PerkinElmer.

③ ISO17025 내부정도관리(임상분야(02.029))

참가 개요

1. 목적 : 공인시험기관 시험결과와 품질보증 및 신뢰성 확보를 위한 인정 분야별 시험자 시험능력 평가*

* 관련근거: KS Q ISO/IEC 17025 7.7.2항 결과의 유효성 모니터링(시험자간 비교시험)

2. 일시: 2022.5.9.(월) ~ 5.24.(화)

3. 대상: ISO170258 인정범위 중 임상분야 시험자

3. 시험항목: (2종) 소변 내 Cotinine 및 NNAL

4. 시험방법

- (KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴 대사체 및 알칼로이드 분석 시험법
- (KDCA-M-06) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석 시험법

5. 결과 판정기준

- '20-'21년 G-EQUAS(독일 외부품질평가 기관) 숙련도시험 적합기준 내 측정여부
- 시험자 간 통계수준 유의적 차이 검증 (F-검정, T-검정 95%신뢰수준)

결 과

각 시험자 분석결과, 숙련도시험 주관기관에서 제시하는 허용범위 내 측정되어 시험자별 시험 능력에 대한 적합성이 확인되었다. 유의성 비교·검증을 위해 F-검정 결과 p-value가 0.05보다 크므로 등분산으로 확인하였으며, t-검정(등분산 가정) 결과에서 양측 검정 p-value가 0.05보다 크므로 '시험결과 간 유의적 차이 없음'으로 확인 되었다(표 1).

표 1. 시험자간 비교시험 결과

구분	Cotinine (ng/mL)	NNAL (pg/mL)
시험자1	415.4	1 262
시험자2	410.6	1 294
허용범위	296.9 ~ 454.7	935 ~ 1301
F-검정 (P-value)	0.104	0.090
t-검정 (P-value)	0.158	0.155
적합여부	적합	적합

참고자료

1. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV66 Final Report, 2020.
2. German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV68 Final Report, 2021.
3. Bioanalytical method validation guidance for industry(미국 FDA 가이드라인). 2018.

④ 흡연 바이오마커 국외숙련도 참가결과

㉠ '21년 소변 내 흡연 바이오마커 5종

참가 개요

- 목적** : WHO 담배실험실 네트워크(TobLabNet) 분석회원으로서 국제공인기관(ISO17025) 인정 자격 유지 및 시험결과에 대한 품질보증, 신뢰성 확보
* (관련근거) 한국인정기구 규정 中 KS Q ISO/IEC 17025: 시험 및 교정 기관의 적격성에 대한 일반 요구사항
- 주관기관** : 독일 외부품질 평가기관 (G-EQUAS*)
* German-External Quality Assessment Scheme
- 참가항목**
 - 소변 내 흡연 바이오마커 Cotinine, NNAL, SPMA, MHBMA, 3-HPMA(5종)
- 시험방법**
 - (KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴 대사체 및 알칼로이드 분석시험법
 - (KDCA-M-06) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석 시험법
 - (KDCA-M-08) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, 3-HPMA, MHBMA 분석 시험법
- 참가기간**: 2021년 10월~11월
- 결과 판정기준**: 주관기관에서 제시한 적합 허용범위 내 검출여부

결 과

숙련도기관으로부터 제공 받은 저농도, 고농도 검체를 이용한 흡연노출 바이오마커 별 정량분석 결과 평가하였다. 그 결과, 2021년 독일 외부품질 평가기관 숙련도 참가결과 통보 시 모든 항목에서 허용범위 내로 측정되어 '적합' 판정을 받았다(표 1).

표 1. 2021년 국제 숙련도시험참가 결과(5종)

평가항목		측정결과	참조값	허용범위	평가결과
Cotinine (ng/mL)	저농도	391.8	375.8	296.9 - 454.7	적합
	고농도	1162.7	1121.2	943.0 - 1299.4	적합
NNAL (pg/mL)	저농도	189	185	125 - 245	적합
	고농도	239	296	227 - 365	적합
3-HPMA (ng/mL)	저농도	254	255	183 - 327	적합
	고농도	2227	2337	1896 - 2778	적합
SPMA (ng/mL)	저농도	1.57	1.64	1.28 - 2.00	적합
	고농도	15.86	14.82	11.52 - 18.12	적합
MHBMA (ng/mL)	저농도	13.9	13.0	7.6 - 18.4	적합
	고농도	150.8	132.6	83.4 - 181.8	적합

참고자료

- German-External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) Proficiency Testing Round RV68 Final Report, 2021.

㉔ '22년 소변 내 흡연 바이오마커 3종

참가 개요

- 목적** : 국제공인기관(ISO17025) 인정 자격 유지 및 ‘흡연폐해 바이오모니터링’ 질관리를 위한 검사결과 신뢰성 확보, 품질관리
※ (관련근거) ① 한국인정기구 규정 中 KS Q ISO/IEC 17025: 시험 및 교정 기관의 적격성에 대한 일반 요구 사항, ② 통계법 제9조에 근거한 국민건강영양조사의 정기통계 품질진단을 위한 질관리
- 주관기관** : 미국병리학회*(CAP, College of American Pathologists)
* (CAP) KS Q ISO/IEC 17043(숙련도 시험 일반 요구 사항)에 따른 KOLAS 공인기관 또는 기타 KOLAS의 장이 허용하는 기관
- 참가항목** : 소변 내 Nicotine, Cotinine, Anabasine(3종)
- 시험방법** : LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴 대사체 및 알칼로이드 분석시험법 (KDCA-M-01)
- 참가기간** : 2022년 11월
- 결과 판정기준** : 미국 병리학회 참조값⁴⁾ 대비 흡연폐해실험실 측정값⁵⁾의 표준편차(SD) \pm 2배 이내

결 과

숙련도시험 주관기관에서 제공한 바이오마커 당 각 3개 시험시료 중 Cotinine 및 Anabasine은 전원 ‘적합’ 받았으며, 그 외 Nicotine 1개 시료에서 ‘주의’로 평가된 바 원인분석 및 시정조치가 필요하였다(표1). 이에, 무작위오차(Random error)와 체계적오차(Systematic error)로 구분하여 시험 결과 오차에 대한 원인분석을 실시하였다(표2).

원인분석 과정에서 검체, 장비 상태 및 실험과정에서 문제점이 확인되지 않았으며, 숙련도 시험과 동일한 방법으로 재측정을 실시한 결과, 일회성의

4) 숙련도시험 주관기관에서 제공한 시료 결과 값

5) 흡연폐해실험실에서 측정한 결과 값

측정치 간 차이인 ‘무작위 오차’로 확인 되었다. 이에, 동일한 시료로 재측한 결과 니코틴 측정결과 값이 국외숙련도 평가기관의 허용범위 내로 산출되어 ‘적합’ 함이 확인된 바, 시험법 지속유지 가능하도록 조치완료 되었다(표3).

표 1. 2022년 국제 숙련도시험참가 결과(3종)

평가항목	측정결과	참조값	허용범위 ($\pm 2SD$)	평가결과
Nicotine (ng/mL)	NTA-4	3080.4	2554.1 +2.2	주의
	NTA-5	127.2	101.2 +1.0	적합
	NTA-6	1419.6	1306.9 +1.1	적합
Cotinine (ng/mL)	NTA-4	6048.4	5296.6 +0.7	적합
	NTA-5	279.5	278.9 0.0	적합
	NTA-6	64.0	68.1 -0.3	적합
Anabasine (ng/mL)	NTA-4	47.5	54.5 -0.7	적합
	NTA-5	6.8	5.2 +2.0	적합
	NTA-6	15.0	16.2 -0.5	적합

표 2. 원인분석 방법

원인	분석방법
무작위오차 (Random error) 일회성으로 발생한 측정값간의 편차	분석검체 재주입 또는 재분석
체계적오차 (Systematic error) 구체적으로 원인이 명확하게 나타나 보정이 가능한 기술적 오차	측정방법, 표준용액 농도, 검체 및 장비오염 여부 등 점검

표 3. 시정조치 결과

평가항목	측정결과	허용범위 ($\pm 2SD$)	평가결과
Nicotine (ng/mL)	NTA-4	2358.8 2075.7 - 3032.5	적합

참고자료

- College of American Pathologists(CAP). Proficiency Testing Evaluation Report, 2022.

⑤ 흡연폐해 바이오모니터링 질관리

㉠ '19-'21년 흡연폐해 바이오모니터링 질관리

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. 질병관리청에서는 국가수준의 직·간접흡연 노출수준을 모니터링하기 위해 2005년 제3기 국민건강영양조사부터 소변시료 내 cotinine 함량을 측정하고 있다. 또한 국민건강조사에서는 결과공표를 위해 진단검사에 대한 질관리를 정책연구용역을 통해 진행해 오고 있다.

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

연구 방법

1. 검사실간 비교평가

가. 비교기관

흡연폐해실험실과 「흡연 생체지표 바이오모니터링」 과제 연구수행기관⁶⁾

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 비교 평가에 대해 흡연폐해실험실로 협조 요청 및 시험 의뢰를 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 비교 평가 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

6) 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 μ L의 시료(소변)와 내부표준물질 (480 ng/mL) 50 μ L, 100 μ L water, 0.85 mL의 acetone을 혼합한 후 충분히 섞어주었다. 시료 내 존재하는 염, 단백질, 그 외 효소들을 침전시키기 위해 10분 이상 4 $^{\circ}$ C에서 보관 후 13,000 r/min으로 30분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하였다. 1.5mL e-tube에 상층액 400 μ L을 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 1. LC/MS/MS 소변 내 cotinine 분석조건

▶ 액체크로마토그래프(Liquid Chromatograph, LC) 조건			
· 컬럼유형 : 150 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m, 역상 C18 컬럼(또는 동등 제품)			
· 흐름속도: 1 mL/min			
· 주입량: 5 μ L			
· 컬럼오븐 온도: 40 $^{\circ}$ C			
· 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($^{\circ}$ C)	300		

3. 질관리 평가방법

미국 FDA (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 제8기 (2019-2021) 결과 공표 시 소변 내 cotinine 항목의 질관리 자료로 함께 제공되었다.

참고자료

1. KOLAS-G-015 화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침, 2012.

㉔ '22년 흡연폐해 바이오모니터링 질관리

추진 배경

흡연폐해 생체지표는 직·간접 흡연, 현재 및 과거 흡연 등의 흡연상태, 금연유무, 중금속 축적 등 다양한 흡연 노출상태를 확인가능하므로 다양한 흡연폐해연구에 활용될 수 있도록 국민건강영양조사 제9기('22-'24) 사업부터 그간 Cotinine 1종을 분석해온 것을 Nicotine, Normicotine 등 Nicotine 대사체 및 알칼로이드 5종과 Pb 등 중금속 6종으로 총 11종으로 확대하는 것을 추진하였다.

< 분석항목 >

(기존) 1종 (Cotinine)

(확대) 11종 (Nicotine, Normicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Anabasine, Pb, Hg, Al, Cr, Ni, Cd)

또한, 청이 운영하고 있는 흡연폐해실험실이 국제공인시험기관(ISO17025) 기준의 생체지표 분석기술력을 확보하고 있어 국가실험실로서 바이오모니터링의 역할을 강화하기 위해 국민건강영양조사 제9기('22-'24) 사업부터 질병관리청 흡연폐해실험실도 분석기관으로서 참여하고 있다.

추진 내용

‘흡연폐해 바이오모니터링’ 사업의 시험결과에 대한 신뢰성 확보 및 품질관리를 위하여, 별도의 전문 용역기관*을 통해 질관리를 수행하고 있다.

* 흡연폐해 바이오모니터링 질관리('22-'24), 성균관대학교

<질관리 항목 및 점검내용>

- ① (검사지침서) 검체 채취, 운송, 검사 전 보관 조건, 검체 처리, 검사과정, 검사 후 보관 과정 등에 대한 절차
- ② (검사수행) 장비 및 시약의 분석능 평가, 측정소급성, 검정곡선 표준물질 측정주기, 절차 및 허용범위, 백업 장비 지정여부 등
- ③ (정도관리) 국외숙련도 프로그램 참가주기, 정도관리 물질(QC) 검사주기 및 허용범위, 내·외부 정도관리 절차

1. 검사수행 준비

가. 니코틴 대사체 및 알칼로이드(5종)

국가수준의 직·간접 흡연 노출정도 파악을 위해 운영중인 ‘흡연폐해 바이오모니터링’사업의 조사주기·분석기관 간 시험방법 호환성 확보 및 분석결과에 대한 편차 최소화를 위하여, 제8기('19-'21)의 수행기관(삼성서울병원)에서 확립한 시험법을 참고하여(1), 제9기('22-'24) 분석기관인 녹십자의료재단과 질병관리청 흡연폐해실험실에서 보유한 분석장비(LC/MS/MS) 사양에 적합한 조건으로 변경하였다.

나. 중금속(6종)

국가수준의 직·간접 흡연 노출정도 파악을 위해 운영중인 ‘흡연폐해 바이오모니터링’ 사업의 조사주기·분석기관 간 시험방법 호환성 확보 및 분석결과에 대한 편차 최소화를 위하여, ‘흡연폐해 바이오모니터링('17년)’ 사업에 참여한 녹십자의료재단의 중금속 분석 시험법을 참고하여, 질병관리청 흡연폐해실험실에서 보유한 분석장비(ICP/MS) 사양에 적합한 조건으로 변경하였다.

2. 내·외부 정도관리

가. 점검목적

「흡연 생체지표 바이오모니터링」사업의 바이오마커 검사결과 신뢰성 확보 등 품질관리

나. 일시·대상: 2022년 12월 23일, 질병관리청 흡연 폐해 실험실

다. 주요 점검사항

- 1) 검체관리 : 검체 채취, 운송, 검사 전 보관 조건, 검체 처리, 검사과정, 검사 후 보관 과정 등에 대한 절차
※ 관련문서: 검체관리 절차서(KDCA-P-21)
- 2) 검사수행 : 장비 및 시약의 분석능 평가, 측정 소급성, 검정곡선 표준물질 측정주기, 절차 및 허용범위, 백업장비 지정여부 등
- 3) 정도관리 : 국외숙련도 프로그램 참가주기, 정도관리물질(QC) 검사주기 및 허용범위, 내·외부 정도관리 절차
※ 관련문서: ①정도관리 절차서(KDCA-P-20),
②내·외부정도관리 결과보고서

주요 결과

1. 검사수행 준비

검체관리, 검사수행, 정도관리 절차를 확립하고 관련 내부분서를 마련하였다.

- LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 시험지침서(KDCA-M-01)
- ICP/MS를 이용한 소변 내 중금속(6종) 시험지침서(KDCA-M-09)
- 시험방법의 유효성검증 절차서(KDCA-P-20)

2. 내·외부 정도관리

현장심사를 통하여 흡연폐해실험실 바이오 모니터링 시험 관련 ①검사지침서, ②검사성능 평가, ③검사수행의 적절성, ④내·외부 정도관리 등 수행 적절성에 대하여 모두 ‘적합’을 확인받았다.

※ 질병관리청 흡연폐해실험실은 '23년 ISO17025 국제공인 시험기관 시험법으로 인정을 획득한 후, '22-'24 수집검체에 대하여 '23년 하반기부터 분석 실시 예정이다.

참고 문헌

1. Jongwon Oh et al., 2022. A Simple and High-Throughput LC-MS-MS method for Simultaneous Measurement of Nicotine, Cotinine, 3'-OH Cotinine, Nor nicotine and Anabasine in Urine and Its Application in the General Korean Population. Journal of Analytical Toxicology.

⑥ 흡연 노출평가를 위한 검체채취 및 관리지침 마련

추진 배경

설문조사 기반의 흡연 노출 평가는 정성적 평가에 특이성이 있고 활용도가 있으나 조사 참여자의 기억에 의존하는 정보에 의해 산출되므로 정량적 평가의 정확도에는 한계가 있다. 특히, 간접흡연 노출의 경우 설문조사된 노출 수준 대비 실제 노출에 차이를 가져올 수 있어 포괄적인 직·간접 흡연 노출 평가에 한계가 있을 수 있기 때문에, 설문조사와 더불어 체내 노출평가를 위한 바이오모니터링(Biomonitoring)이 수행되어야 한다. 그러나, 바이오모니터링 연구에서 측정되는 노출 생체지표⁸⁾는 체내에 흡수된 유해물질의 존재를 특이적으로 확인하는데 활용할 수 있지만, 과거 노출에 대한 정도와 시점에 대한 정보를 제공하지 못하므로 생체지표를 활용한 인체노출 평가를 해석함에 있어 제한적일 수 있다.

또한, 각 생체지표(Biomarker)별 체내 반감기⁹⁾는 상이하므로 바이오모니터링의 신뢰도를 높이기 위해 흡연자의 마지막 흡연시기 및 검체 채취시기 등을 고려하여 분석해야 하며, 생체지표에 따라 가장 잘 검출되는 검체를 우선 선택하여 검사할 필요성이 있다. 더불어, 인체 노출평가를 위해 채취된 검체의 질과 포장, 운송 등에 조건, 절차 등의 기준은 검사결과에 직접적인 영향을 미치므로, 분석물질의 안정성 확보 및 신뢰성 있는 결과도출을 위해 흡연으로 인한 체내 노출평가 과정에서 연계가 필요한 필수 흡연정보 및 채취시점을 고려한 검체 채취 및 관리지침이 필요하다.

7) 환경 유해물질의 노출 및 건강영향에 대한 노출평가 방법론
8) 생물처리 과정, 병원성을 일으키는 과정, 치료를 위한 개입의 반응단계인 약리학의 과정의 지표로서 평가되고 측정되는 것
9) 체내에 섭취된 물질이 배출되거나 대사에 의해 감소하여 그때의 감소 속도가 그 물질의 체내량에 비례할 때 처음에 있던 양이 반이 될 때까지의 시간

흡연노출 생체지표별 검사정보

본 지침에서는 분석물질의 안정성 확보 및 신뢰성 있는 결과도출을 위해, 우선순위 생체지표별 체내 반감기를 고려한 마지막 흡연 후 채취시기 및 적절한 검체와 검사방법을 선정하는 등의 기초 검사정보를 제시하였다(표 1).

〈 우선순위 성분 〉

1. 니코틴(Nicotine)
2. 노르니코틴(Nornicotine)
3. 코티닌(Cotinine)
4. 하이드록시코티닌(trans-3'-Hydroxy cotinine)
5. NNAL(4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol)
6. 아나바신(Anabasine)
7. 아나탈린(Anatalline)
8. 니코텔린(Nicotelline)
9. SPMA(S-phenyl mercapturic acid)
10. MHBMA(monohydroxybutenyl mercapturic acid)
11. 3-HPMA(3-hydroxypropyl mercapturic acid)
12. 납(Pb)
13. 카드뮴(Cd)

검체관리 일반지침

본 지침에서는 흡연 노출평가를 위해 주로 활용되는 혈액 및 소변 검체에 대한 특징, 주의사항, 채취, 전처리, 포장, 운송, 분주, 보관 등에 대한 지침을 제시하였다.

특히, 흡연 노출평가를 위한 검체채취 시 주의사항으로 검체채취 시기를 고려해야 한다. 흡연으로 인한 인체 노출평가 과정에서 활용되는 생체지표는 같은 시기에 노출되더라도 체내에서 배출 또는 대사되어 감소하는 속도가 상이하므로, 흡연자의 마지막 흡연시기 즉 흡연으로 인한 노출시기를 고려하고 분석하고자 하는 생체지표의 반감기 이전의 시점에 검체를 채취함으로써 인체

노출평가에 대한 신뢰도를 높일 수 있다. 따라서, 흡연 노출평가를 위한 검체채취 시에는 연구대상자의 마지막 흡연시기, 과거 및 현재 흡연력, 금연약물 또는 니코틴보조제 사용여부, 질환력, 직업에 따른 환경적 노출여부 등에 대한 정보를 함께 수집해야 한다.

또한, 흡연 노출평가를 위해 주로 활용되는 혈액 및 소변시료의 특성을 이해하고 검체채취 과정에서 주의하여야 한다. 혈액시료는 시료의 특성상 침전을 주의하고 균질화 시킨 상태에서 실험이 진행되어야 하며, 체내 포합체로 존재할 경우 가수분해 후 결과를 도출해야하는 번거로움이 있다. 하지만, 요 중 대사산물 특이도가 낮아 모니터링 수단으로 사용이 어려울 때 사용할 수 있다는 장점이 있으며, 시료 채취과정에서 검사자 및 검체 처리자에 의해 오염되지 않도록 주의해야한다. 소변시료는 친수성 물질 모니터링에 적합하며, 비침습적 채취가 가능하고 많은 양의 시료 확보가 가능하다는 장점이 있으며, 저농도 노출 및 장기간 안정적 노출 시 호기(날숨)나 혈액에 비해 노출-흡수량 상관관계가 높다는 장점이 있지만 변이요인으로 보정이 필요하며 시료 채취과정에서 검사자 및 검체 처리자에 의해 오염되지 않도록 주의해야한다.

적용범위

본 지침은 흡연으로 인한 체내 노출평가가 필요하여 외부로부터 검사의뢰가 접수된 경우나 관련 내용으로 학술·정책 연구용역에 적용을 목적으로 하는 내부지침으로 대규모 국가사업인 바이오모니터링 사업에는 적용하지 않는다.

참고문헌

1. Laboratory Clinical Specimen Collection and Storage Guidance For Lung Injury Related to e-Cigarette Related Exposures (CDC, 2019)

2. Improving the collection and management of human samples used for measuring environmental chemicals and nutrition indicators (CDC, 2018)
3. Human biomonitoring of environmental chemicals in Canada
4. Canadian Health Measures Survey (CHMS) Data user guide
5. MAYO clinic laboratories, metabolite test definition
6. 국민환경 기초조사 생체시료 관리 지침서 (국립환경과학원, 2019)
7. 생체시료 내 분석물질의 안정성 평가 연구 (국립환경과학원, 2011)
8. 국민건강영양조사 검진조사 지침 (질병관리청, 2020)
9. 도시기반코호트 임상검사 및 생체시료 수집 연구 (녹십자 의료재단, 2015)
10. 생물테러병원체 신속탐지를 위한 시료채취 표준매뉴얼 작성연구 (서울대학교 보건대학, 2017)
11. 감염병 확인진단을 위한 검체 채취 및 관리에 관한 표준지침 마련연구 (한림대학교 진단검사의학과, 2018)
12. Biomarkers & Human biomonitoring (WHO, 2011)
13. Biological sample collection, processing, storage and information management (IARC)
14. 메디컬시험기관의 품질 및 적격성에 대한 요구사항 (ISO15189)
15. Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks (WHO, 2000)
16. Canadian Health Measures Survey (CHMS) data user guide.
17. CDC Improving the collection and management of human samples used for measuring environmental chemicals and nutrition indicators
18. 국립중앙인체자원은행 업무 매뉴얼 (2021)
19. 국내외 바이오모니터링 프로그램 및 생체시료 활용 현황 (2021). 한국환경보건학회지, 제47권제3호

표 1. 흡연노출 생체지표별 검사정보

순번	성분명	성분특성	체내 반감기	권장 검체채취 시기	권장 검체종류
1	니코틴 (Nicotine)	· 담배의 주성분으로 중추와 말초신경을 흥분시키고 중독성이 강한 물질 · 간에서 20개 이상의 화합물로 대사되어 신장에서 소변으로 배설	약 1-4시간 내외	마지막 흡연 후 1시간 이내	소변, 혈액
2	노르니코틴 (Nor nicotine)	· 담배잎에 존재하는 알칼리성 성분으로 체내에서 니코틴(Nicotine)의 대사를 통해 생성 · 흡연 과정에서 1급 발암물질인 담배특이 니트로사아민류(TSNAs) NNN 생성	약 7-8시간 내외	7시간 이내	소변, 혈액
3	코티닌 (Cotinine)	· 체내에서 니코틴(Nicotine)의 약 70-80%가 대사되어 생성 · 니코틴에 비해 체내 반감기가 길어 직·간접 흡연 노출지표로 유용하게 활용	약 16-19시간 내외	16시간 이내	소변, 혈액
4	하이드록시 코티닌 (trans-3'-Hydroxy cotinine)	· 체내에서 코티닌(Cotinine)으로부터 대사되어 생성 · 코티닌 함량의 비율을 이용하여 니코틴대사율 (NMR)을 산출하는데 활용	약 5-6시간 내외	16시간 이내	소변, 혈액
5	NNAL (4-(Methylnitros amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol)	· 1급 발암물질인 담배특이니트로사아민류 (TSNAs) NNK의 대사산물 · 담배에서 특이적으로 검출되며, 체내 반감기가 길어 직·간접 흡연 장기노출 평가에 활용	약 2-4주 내외	2주 이내	소변
6	아나바신 (Anabesine)	· 담배잎에 존재하는 알칼로이드 성분 · 금연치료제인 니코틴대처제에 존재하지 않아 금연치료 중 흡연여부 확인지표로 활용	약 16시간 내외	16시간 이내	소변
7	아나탈린 (Anatalline)	· 담배잎에 존재하는 알칼로이드 성분 · 전자담배와 무연담배 흡연여부 확인지표로 활용	-	2시간 이내	소변
8	니코텔린 (Nicotelline)	· 담배잎에 존재하는 알칼로이드 성분으로 anatalline의 산화과정을 통해 생성 · 전자담배와 무연담배에서는 미량 검출되어 전자담배와 결련담배 이중사용 여부 및 최근 담배제품 사용전환 여부 확인지표로 활용	약 2-3시간 내외	2시간 이내	소변
9	SPMA (S-phenyl mercapturic acid)	· 담배가 불완전 연소되어 형성되며 국제암연구소 (IARC) 에서 1급 발암물질로 분류 · 휘발성 유기화합물(VOCs)인 벤젠(Benzene)의 대사산물	약 9-13시간 내외	9시간 이내	소변
10	MHBMA (monohydroxybutenyl mercapturic acid)	· 담배가 불완전 연소되어 형성되며 국제암연구소 (IARC) 에서 1급 발암물질로 분류 · 휘발성유기 화합물(VOCs)인 1,3-부타디엔 (1,3-butadiene)의 대사산물	약 12시간 내외	12시간 이내	소변
11	3-HPMA (3-hydroxypropyl mercapturic acid)	· 담배가 불완전 연소되어 형성되며 국제암연구소 (IARC) 에서 3급 발암물질로 분류 · 휘발성유기 화합물(VOCs)인 아크롤레인 (Acrolein)의 대사산물	약 5-9시간 내외	5시간 이내	소변
12	납 (Pb)	· 국제암연구소(IARC)에서 사람에게 암을 일으킬 가능성이 있는 2B 등급 발암물질로 분류 · 흡연과 가장 높은 관련성을 가진 중금속	약 1-2개월 내외	1개월 이내	소변, 혈액
13	카드뮴 (Cd)	· 국제암연구소(IARC)에서 1급 발암물질로 분류 · 흡연과 가장 높은 관련성을 가진 중금속	약 10-30년 내외	-	소변, 혈액

① 전자담배 액상 내 니코틴, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜 분석

연구 배경

세계보건기구(WHO)는 담배제품규제 연구그룹(TobReg)에서는 담배 제품의 독성 성분 및 배출 우선 순위 목록을 제안하며, 담배실험실 네트워크(TobLabNet)를 통해 담배관련 개발 또는 검증하기 위한 연구가 진행 중이다. 흡연 시 배출되는 니코틴 등 주요 성분에 대한 측정을 위해 공식 게재 및 검증된 TobLabNet 방법은 전자담배에 적용할 수 있다. WHO 흡연폐해실험실은 WHO TobLabNet 분석회원자격으로 전자식 니코틴 전달 시스템(ENDS)의 측정을 위한 국제표준개발기구의 방법구축에 따른 담배 성분 분석법 마련 및 표준화에 참여하고 있다. 2021년 3월에는 최근 사용이 늘어나고 있는 전자담배에 대해 액상 내 니코틴(Nicotine), 글리세롤(Glycerol, VG), 프로필렌 글리콜(Propylene glycol, PG) 분석법이 발간되었고, 질병관리청 흡연폐해 실험실에서 내부적으로 해당 시험방법 절차를 마련하였다. 지침서에 따라 국내에서 판매되는 전자담배 액상(e-liquid)에 적용하여 실험도 하였다. WHO TobLabNet의 분석회원으로써, 전자담배 성분측정의 인프라를 지속적으로 구축하고 이를 통해 생성된 다양한 연구결과들을 국제사회와 지속적으로 공유해 나갈 계획에 있다.

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

본 표준시험법은 전자담배 액상 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 함량 분석법으로 2021년 3월에 발표된 WHO Standard official procedure (SOP) 11를 근거로 마련하였으며, 이는 국제표준 ISO20714를 기반으로 만들어졌다.

기체 크로마토그래피를 이용한 분석으로 기체 상태의 혼합되어 있는 분석시료를 추출액으로부터 추출한 후, 분리관을 통해 각 칼럼에서의 단일 화합물을 분리하여, 검출기에서 각 성분을 정성·정량 분석한다. 이는 분석대상물질인 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜의 기체상태 시료를 정확하고 일정한 기체 흐름으로 분리하여 감도 높은 검출에 적용할 수 있다. 또한, 니코틴 포함 여부와 상관없이 에어로졸로 변환하고 흡입하기 위해 사용하는 전자식 니코틴 전달 장치(electronic nicotine delivery device)에 사용되는 모든 종류의 전자담배용 액상 분석에 적용 가능하다.

2. 시료 전처리

전자담배용 액상을 내부표준물질이 포함된 이소프로필 알코올 용액을 이용해 희석시킨다. 희석된 시료에 함유된 분석대상물질인 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜은 불꽃 이온화 검출기가 장착된 모세관 기체 크로마토그래피(이하 GC-FID)를 이용해 분석되며, 포함된 내부표준물질을 이용하여 정량분석을 할 수 있다. 분석하고자 하는 액상형 전자담배 시료는 개봉하기 전에 실온에서 전자 액체를 균질화하는 과정을 거치며, 만약 분석 전 전자담배 액상에 기포가 있는 경우, 모든 기포가 사라질 때까지 정적인 상태로 기다려야 한다. 또한, 전자담배 액상의 점도는 높기 때문에 피펫팅할 때에는 각별히 주의가 필요하다. 전자담배 액상 100 μ L를 2번씩 2회 반복하여 총 4회 분사하는 과정을 거치는 데, 이때 전자담배 액상 100 μ L를 피펫 팁의 바깥쪽을 샘플 용기 가장자리에 대고 기대어 여분의 액체를 제거한 후 외부에 액상이 남아있는지 확인해야 한다. 그 후, 20 mL 용기에

담고 추출용액 9.9 mL을 넣어 시료가 증발하거나 오염되지 않도록 빠르게 캡을 닫아 밀봉하여 볼텍스 믹서로 30초 이상 용기 내 액체를 균질화하여 충분히 섞는다. 균질화된 액체(시험용액)은 바이알에 옮겨 GC-FID로 분석하였다(그림 1).

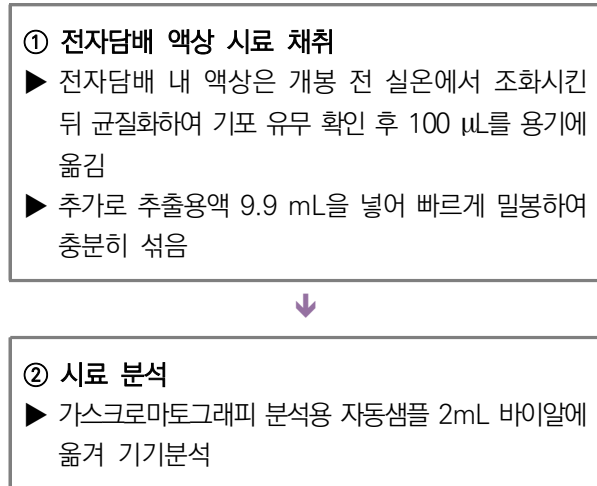


그림 1. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

추출용액은 적절한 양의 내부표준(0.5 mL/L n-heptadecane, 2 mL/L 1,3-Butanediol)을 포함하는 이소프로판올로 희석된 전자담배 액상을 분석하기 위한 GC-FID의 기기조건은 표 1과 같다. 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 분석을 위한 컬럼은 DB-ALC1 (30 m x 0.32 mm x 18 μ m)을 사용하였고, GC 오븐 프로그램은 초기온도 140°C (5분 유지), 온도상승은 40°C/min, 최종온도는 250°C, 최종 온도에서의 유지시간은 4분으로 설정하였으며 총 분석시간은 11분이었다. 검출순서는 각각 정량을 위한 프로필렌 글리콜, 1,3-Butanediol(프로필렌 글리콜, 글리세롤의 내부표준물질), 글리세롤, 니코틴, n-heptadecane(니코틴의 내부표준물질) 순으로 검출되었다(표1).

표 1. 전자담배 액상 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 분석을 위한 기기조건

GC-FID 기기조건			
- 자동주입기			
▷ 방법 : GC 동시 주입			
▷ 주입량 : 1 μ L			
- 가스크로마토그래피(GC)			
▷ 컬럼 : DB-ALC 1(30 m x 0.32 mm x 1.8 μ m)			
▷ 주입 온도(°C) : 225 °C			
▷ 운반기체 유속: He Contant pressure(1.5 mL/min)			
▷ 주입 모드(비율) : Split(1:50)			
- 검출기(FID)			
▷ 온도(°C) : 260 °C			
▷ H ₂ 유속 : 40 mL/min			
▷ Air 유속 : 450 mL/min			
▷ Makeup 가스 유속(He) : 45 mL/min			
▷ [GC 오븐 프로그램]			
총 분석시간 : 15.75 min			
초기온도 (°C)	온도상승 (°C/min)	최종온도 (°C)	유지시간 (min)
140	-	-	5
140	40	250	8

4. 유효화 실험 및 시료분석

시험방법 검증(verification)을 위해 특이성, 직선성, 검출·정량한계 등의 유효화 실험을 수행하였다.

1) 특이성(Specificity)

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

2) 직선성(Linearity)

일정한 농도범위 내에 있는 시험시료 중 분석대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 정량성 있는 측정 값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 이를 측정하기 위해서 표준용액을 농도별로 희석하여 각 농도에 대해 직선성이 있다는 것을 증명하였다. 분석대상 물질을 측정하여 나타난 피크를 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^2 값이 최소 0.99이상인 되도록 하였다.

3) 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.

5. 내부시험방법 절차서 작성

내부시험방법 절차서의 주요내용은 WHO Tob -LabNet Official Method SOP 11과 ISO 20714:2019 방법을 참고하여 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 표준물질 및 검정곡선 조제방법, GC 기기분석 조건 등 일부 사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다.

연구 결과

1. 유효화 실험결과

1) 특이성

니코틴 표준액과 내부표준물질인 n-heptadecane 첨가하여 추출용매인 Propan-2-ol를 분석하고 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 내부표준물질이 다른 매트릭스 성분들의 간섭을 받지 않고 각각 분리되는 것을 확인한다(그림 2).

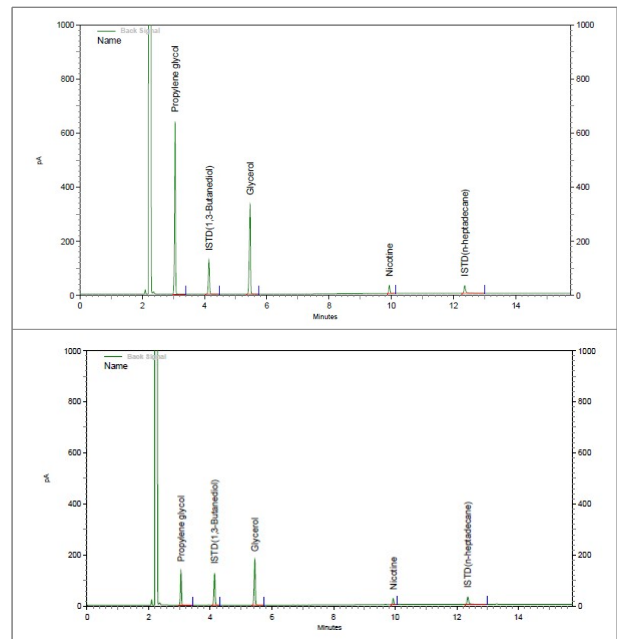
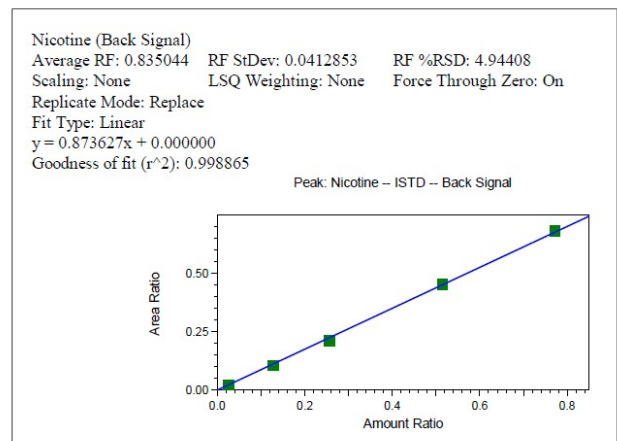


그림 2. Nicotine 표준물질(ISTD인 n-heptadecane포함, 위) 및 시험검체(아래)

2) 직선성

분석대상물질인 니코틴, 프로필렌 글리콜, 글리세롤의 R^2 가 0.99 이상임을 확인하였다(그림 3).



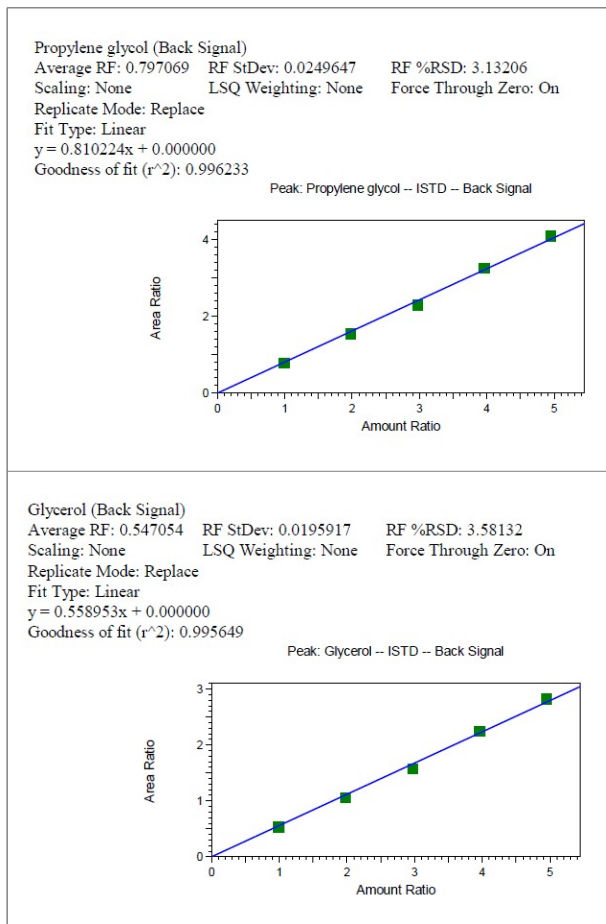


그림 3. 정량분석을 위한 검정곡선

3) 검출 · 정량한계

검출이 가능한 수준의 농도를 분석장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 각각의 검출한계와 정량한계를 산출하였다 (표 2).

표 2. 니코틴, 프로필렌 글리콜, 글리세롤의 검출·정량한계
(단위: mg/mL)

구분	분석성분	LOD	LOQ
니코틴	니코틴	0.08	0.16
용매제	프로필렌 글리콜	0.9	1.8
	글리세롤	0.4	0.8

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: GC를 이용한 전자담배 액상에서 니코틴, 프로필렌글리콜, 글리세롤 분석

나. 문서번호: KDCA-M-11

다. 제개정일: 2021.6.8.

라. 절차서 내용

1) 시약 및 초자, 보조장비

항목	주요특성
-(-)Nicotine	표준물질
Glycerol	표준물질
Propylene glycol	표준물질
Propan-2-ol	분석용액 조제
n-Heptadecane	내부표준물질
1,3-Butanediol	내부표준물질
distiled water	표준물질
초순수 제조장치 (MILLI-Q DIRECT 8)	시약 조제
볼텍서(Vortexer)	균질 혼합
Tip, 피펫	검정곡선, 시료조제
sample tube	시료 조제

2) 표준물질

성분명	Nicotine 농도 (mg/L)	Glycerol, Propylene glycol 농도 (mg/L)
Blank	0	0
STD 1	1	200
STD 2	5	400
STD 3	10	600
STD 4	20	800
STD 5	30	1,000

3) 분석장비

장비명: GC-FID (불꽃 이온화 검출기가 장착된 모세관 기체 크로마토그래피)

GC-FID 기기조건

- 자동주입기

- ▷ 방법 : GC 동시 주입
- ▷ 주입량 : 1 μ L

- 가스크로마토그래피(GC)

- ▷ 컬럼 : DB-ALC 1(30 m x 0.32 mm x 1.8 μ m)
- ▷ 주입 온도($^{\circ}$ C) : 225 $^{\circ}$ C
- ▷ 운반기체 유속: He Contant pressure(1.5 mL/min)
- ▷ 주입 모드(비율) : Split(1:50)

- 검출기(FID)

- ▷ 온도($^{\circ}$ C) : 260 $^{\circ}$ C
- ▷ H₂ 유속 : 40 mL/min
- ▷ Air 유속 : 450 mL/min
- ▷ Makeup 가스 유속(He) : 45 mL/min
- ▷ [GC 오븐 프로그램]
- 총 분석시간 : 15.75 min

초기온도 ($^{\circ}$ C)	온도상승 ($^{\circ}$ C/min)	최종온도 ($^{\circ}$ C)	유지시간 (min)
140	-	-	5
140	40	250	8

4) 시험절차

① 전자담배 액상 시료 채취

- ▶ 전자담배 내 액상은 개봉 전 실온에서 조화 시킨 뒤 균질화하여 기포 유무 확인 후 100 μ L를 용기에 옮김
- ▶ 추가로 추출용액 9.9 mL을 넣어 빠르게 밀봉 하여 충분히 섞음



② 시료 분석

- ▶ 가스크로마토그래피 분석용 자동샘플 2mL 바이알에 옮겨 기기분석

마. 시험방법 유효화 보고서

직선성(Linearity), 재현성(Repeatability), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상으로 확인하였다. 정밀성은 변동계수(CV) 15 % 이내였으며, 정확성은 각 농도에서 \pm 15%로 확인하였다.

참고문헌

1. WHO TobLabNet Official Method SOP 11 : Standard operating procedure for determination of nicotine, glycerol and propylene glycol in e-liquids.
2. ISO 20714 (en). E-liquid - Determination of nicotine, propylene glycol and glycerol in liquids used in electronic nicotine delivery devices- Gas chromatographic method, 2019.

② 무연담배 내 Nicotine 함량분석

연구 배경

무연담배란, 담배성분을 함유하고 있는 연기가 나지 않는 제품으로 스누스(건식 및 습식)를 포함하여 흡연, 빨기, 씹거나 코를 킁킁거림에 사용하도록 제조된 원료로 잎담배의 전체 또는 일부를 제조한 제품을 말한다. 또한, 씹는 담배나 담배 식물에서 추출한 물질의 혼합물을 말한다.

많은 무연담배 제품에는 암을 유발하는 유해물질이 포함되어 있다. 무연담배는 구강암, 식도 및 췌장암 등을 유발하며 심장병과 뇌졸중으로 인한 사망위험을 증가시킬 수 있다. 무연담배를 사용하는 젊은 사람들은 니코틴에 중독될 수 있기 때문에, 담배 흡연자가 될 가능성이 더 높으며 스누스와 같은 무연담배 제품의 장기적인 영향을 조사하기 위해서는 많은 연구가 필요하다.

WHO 담배규제기본협약(FCTC)의 권고하는 측정이 필요한 담배성분측정의 인프라를 구축하여 다양한 연구결과들을 국제사회와 지속적으로 공유해 나갈 계획으로 무연담배 내 니코틴 함량 시험방법 절차서를 마련하여 이를 표준무연담배에 적용하였다.

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

흡연폐해실험실의 Nicotine 시험검사법 표준 절차서는 WHO TobLabNet에서 사용 중인 'Standard operating procedure for determination of nicotine content in smokeless tobacco product'을 근거로 작성하였다. WHO TobLabNet는 국제흡연학회 내 기구로서, Nicotine측정에 대한 SOP를 제공하며 참값측정을 목적으로 하고 있다. WHO TobLabNet의 기관들이 참가하여 도출한 표준시험법을 적용하여 무연담배 제품에서 니코틴 함량을 측정하였다.

기체크로마토그래프는 Nicotine 항목에 대하여 정확성과 정밀성이 뛰어나고 민감도와 특이도 또한 뛰어나 참값을 측정해야 하는 표준검사법으로써 사용하기에 적합하다. 이에 따라 불꽃 이온화 검출기가 부착된 기체크로마토그래프(Agilent 7890B GC-FID, 이하 GC-FID)을 적용하여 무연담배 내 Nicotine을 정량적으로 분석하였다. 적용범위는 담배 또는 제품담배 시료 중의 Nicotine 함량을 n-hexane으로 추출한 후 내부표준물질을 사용하여 GC-FID로 분석하여 측정한다. 이 방법은 모든 종류의 담배 시료에 적용 가능하다.

2. 시료 전처리

Coresta technical guide N°11에 따라 표준무연담배 시료는 -20℃(장기간 보관 시 -70℃)로 보관하고 조화 전 4℃에서 충분히 해동시킨다. 시료는 조화를 위해 시험 실시 전 실온(22 ± 1)℃에서 최소 2시간 동안 보관하여 조화시킨다.

표준무연담배 4종^①머금은담배, 코담배^②습식, ^③건식, ^④씹는담배)을 이용하였다. 표준무연담배의 각 시료 당 최소 n번의 각 실험샘플에 대해 동일한 양의 제품을 취해 균일하게 혼합한다. 조화시킨 무연담배 시료를 0.5 ~ 2.0 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. 추출 용기를 마개로 닫은 후 교반기를 이용해 (60 ± 2) 분간 진탕한다. 평평한 곳에 20분간 상온에 방치하여 상층액만 따로 분리하여 0.45 um PTFE 필터를 통과시켜 적정량을 바이알에 옮겨 담아 GC-FID로 분석하였다(그림 1).

① 무연담배 준비

- ▶ 실험실 온도 (22 ± 1) °C, 상대습도 (60 ± 3) %로, 무연담배를 적어도 2시간 동안 실온 (22 ± 1)°C에서 조화 (~최대 12주)



② 샘플 추출

- ▶ 조화시킨 무연담배를 0.5 ± 2.0 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($4 \sim 8$)°C 보관[최대 24시간 방치]



③ 시료 분석

- ▶ 추출 용기로부터 적정량을 $0.45 \mu\text{m}$ PTFE로 필터 후 갈색 2 mL 바이알에 옮겨 기기분석

그림 1. 전처리방법 절차흐름도

3. 기기분석방법

무연담배 내 니코틴을 기기분석하기 위한 GC-FID 기기조건은 표 1과 같다. 컬럼은 CP-WAX 51(25 m, 0.25 mm, $0.20 \mu\text{m}$)을 사용하였고, GC 오븐프로그램은 온도 170 °C 설정하여 총 분석시간은 10분이었다. 정량을 위한 내부표준물질인 n-heptadecane이 먼저 검출되고 그다음으로 분석항목인 Nicotine이 검출 되었다(표 1).

표 1. 무연담배 내 Nicotine 분석을 위한 기기조건

GC 기기조건			
- 주입구			
▷ 컬럼 : CP-WAX 51(25 m, 0.25 mm, $0.20 \mu\text{m}$)			
▷ 주입 온도(°C) : 270 °C			
▷ 컬럼 온도(°C) : 170 °C			
▷ 운반기체 유속 : He 1.5 mL/min			
▷ 주입 모드(비율) : Split(10:1)			
▷ 주입 부피 : 1 μL			
- 검출기			
▷ 온도(°C) : 270 °C			
▷ H ₂ 유속 : 40 mL/min			
▷ Air 유속 : 450 mL/min			
▷ [GC 오븐 프로그램] 총 분석시간 : 10 min			
초기온도 (°C)	온도상승 (°C/min)	최종온도 (°C)	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 될만한 물질에 이미 알고있는 농도를 첨가하여 확인한다.

2) 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. 분석대상 물질을 측정하여 나타난 피크의 면적(area)을 내부 표준물질(n-heptadecane) 피크의 면적(area)으로 나눈 비(ratio)로 그린 검정곡선을 통해 직선성의 정도를 평가하였다. 시각적인 판정에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(Method of least squares)에 의한 회귀분석을 통해 측정결과를 계산 하였으며, 이 때 R²값이 최소 0.99이상이 되도록 하였다.

3) 정확성(Accuracy)·정밀성(Precision)

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 실험결과와 정밀성은 일내(interday)에 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 quantification, LOQ)는 실제 시험법을 적용하여 정량가능한 최소 농도를 말한다. 방법검출한계의 약 3배 정도가 정량한계라고 볼 수 있다. 검출가능한 농도 시료(50 mg/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 TabLabNet SOP 12 방법을 참고하여 시료 전처리 및 기기분석방법, 유효화 실험 및 시료분석 결과 등으로 구성하였다. 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/L)와 부피(volume) 및 사용한 담배무게(g)로 mg/g 단위로 산출하였다.

$$m_n = \frac{m_t \times V_e}{m_o \times 1000}$$

- m_n : Nicotine 농도(mg/g)
- 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

무연담배에서 filter 를 제거한 나머지 담배를 Nicotine 표준액 1000 mg/L 농도를 첨가하여 시료를 분석하여 확인하였다(그림2).

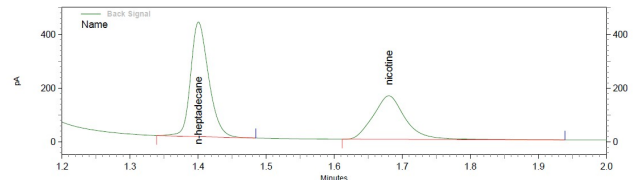


그림 2. Nicotine 표준물질 및 내부표준물질(ISTD)

2) 직선성

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

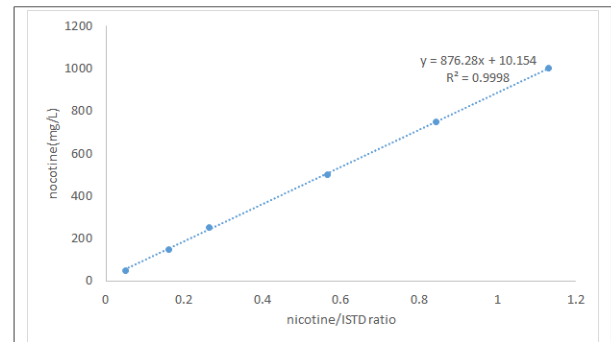


그림 3. 정량분석을 위한 검정곡선

3) 정밀 · 정확도

표준무연담배 4종을 검정곡선 농도범위 내 3회 반복 측정하여 회수율(%R)로 계산하여 정확성을 확인하였다. 또한 정밀성은 일내 1가지 농도에 대하여 3회 이상 측정하여 상대표준편차(RSD %)로 반복 측정하였다(표 2, 3).

표 2. 표준무연담배 4종의 농도 측정값

종류 \ 니코틴	표준물질 농도 (mg/g)	참조값 (mg/g)	측정값 (mg/g)
머금담배(CRP 1)	8.0	7.40	7.82
습윤코담배(CRP 2)	12.0	10.58	10.14
건조코담배(CRP 3)	17.0	16.54	16.21
씹는담배(CRP 4)	9.0	9.03	9.12

표 3. 일내 정확도 및 정밀도

종류	정확도 (%)	RSD (%)
머금담배(CRP 1)	98	1.5
습윤코담배(CRP 2)	85	0.4
건조코담배(CRP 3)	95	0.6
씹는담배(CRP 4)	101	0.4

정확성·정밀도는 표준무연담배 4종 중 머금담배의 정확도 98 %, RSD 1.5 %이었고, 습윤코담배는 정확도 85 %, RSD 0.4 %이었고, 건조코담배는 정확도 95 %, RSD 0.6 %이었고, 씹는담배는 정확도 101%, RSD 0.4% 이었다(표 3).

4) 검출·정량한계

검출이 가능한 수준의 농도인 50 mg/L를 분석 장비에 주입하여 7회 반복 측정을 통해 각 결과치의 표준편차를 구하여 Nicotine의 검출한계와 정량한계를 산출하였다. 검출한계 0.02 mg/g, 정량한계 0.07 mg/g이었다(표 4).

표 4. Nicotine의 검출·정량한계

분석 횟수	측정값 (mg/L)	평균 (mg/L)	표준편차 (mg/L)	검출한계 (mg/g)	정량한계 (mg/g)
1	54.5	54.2	0.2	0.02	0.07
2	54.4				
3	54.2				
4	54.1				
5	54.0				
6	54.3				
7	54.1				

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: 무연담배 내 Nicotine 함량 분석

나. 문서번호: KDCA-M-12

다. 제개정일: 2022.12.22.

라. 절차서 내용

1) 시약 및 초자, 보조장비

항목	주요특성
표준무연담배(CRP 1~4)	표준물질
-(-)Nicotine	표준물질
2N NaOH	분석용액 조제
n-Heptadecane	내부표준물질
n-Hexane	분석용액 조제
distiled water	표준물질
초순수 제조장치 (MILLI-Q DIRECT 8)	시약 조제
볼텍서(Vortexer)	균질 혼합
Tip, 피펫	검정곡선, 시료조제
sample tube	시료 조제
0.45 um PTFE 필터	시료 조제

2) 표준물질

성분명	Nicotine 농도 (mg/L)
Blank	0
STD 1	50
STD 2	150
STD 3	250
STD 4	500
STD 5	750
STD 6	1,000

3) 분석장비

장비명: GC (기체크로마토그래피)

GC 기기조건			
- 주입구			
▷ 컬럼 : CP-WAX 51(25 m, 0.25 mm, 0.20 μ m)			
▷ 주입 온도($^{\circ}$ C) : 270 $^{\circ}$ C			
▷ 컬럼 온도($^{\circ}$ C) : 170 $^{\circ}$ C			
▷ 운반기체 유속 : He 1.5 mL/min			
▷ 주입 모드(비율) : Split(10:1)			
▷ 주입 부피 : 1 μ L			
- 검출기			
▷ 온도($^{\circ}$ C) : 270 $^{\circ}$ C			
▷ H ₂ 유속 : 40 mL/min			
▷ Air 유속 : 450 mL/min			
▷ [GC 오븐 프로그램] 총 분석시간 : 10 min			
초기온도 ($^{\circ}$ C)	온도상승 ($^{\circ}$ C/min)	최종온도 ($^{\circ}$ C)	유지시간 (min)
170	등온	170	10

4) 시험절차

① 무연담배 준비

- ▶ 실험실 온도 (22 ± 1) $^{\circ}$ C, 상대습도 (60 ± 3) %로, 무연담배를 적어도 2시간 동안 실온 (22 ± 1) $^{\circ}$ C에서 조화(~최대 12주)



② 샘플 추출

- ▶ 조화시킨 무연담배를 0.5 ± 2.0 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 상층 액만 분리하여 차광 후 냉장($4 \sim 8$) $^{\circ}$ C 보관[최대 24 시간 방치]



③ 시료 분석

- ▶ 추출 용기로부터 적정량을 0.45 μ m PTFE로 필터 후 갈색 2 mL 바이알에 옮겨 기기분석

마. 시험방법 유효화 보고서

직선성(Linearity), 재현성(Repeatability), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 등으로 구성되었다.

직선성은 분석항목 검출농도 수준으로 고려하여 정한 농도범위에서 R^2 0.99 이상으로 확인하였다.

정밀성은 변동계수(CV) 15 % 이내였으며, 정확성은 각 농도에서 $\pm 15\%$ 로 확인하였다.

정확성 · 정밀도는 표준무연담배 4종 중 머금은 담배의 정확도 98 %, RSD 1.5 %이었고, 습윤 코담배는 정확도 85 %, RSD 0.4 %이었고, 건조 코담배는 정확도 95 %, RSD 0.6 %이었고, 씹는 담배는 정확도 101%, RSD 0.4% 이었다. 또한, Nicotine의 검출한계 0.02 mg/g이며, 정량한계 0.07 mg/g이었다. 본 시험법에서는 표준물질을 증류수에 조제하고 표준물질 함량 분석 시 내부표준물질과의 함량비를 이용하여 정량하고자 하였다.

참고문헌

1. Smokeless tobacco: Health effects, Center for disease control and prevention, https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/s_mokeless/health_effects/index.htm
2. Smokeless tobacco product: health information, mayo clinic, <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/quit-smoking/in-depth/chewing-tobacco/art-20047428>
3. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2007, volume 89.
4. Impact of Smokeless Tobacco Products on Cardiovascular Disease: Implications for Policy, Prevention, and Treatment, Piano MR et al, American Heart Association, 2010;122(15):1520-44
5. Nicotine and smokeless tobacco. N L Benowitz, A Cancer J Clin. 1988, 38(4):244-7.
6. Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: comparison with cigarettes and nicotine gum. Benowitz NL et al, Clin Pharmacol Ther., 1988, Jul;44(1):23-8.
7. The Reasons for Using Smokeless Tobacco: A Review, Solhi M et al, Iran J Public Health. 2021 Mar;50(3):492-501.

③ 무연담배 수분함량 분석

연구 배경

무연담배란, 담배성분을 함유하고 있는 연기가 나지 않는 제품으로 스누스(건식 및 습식)를 포함하여 흡연, 빨기, 씹거나 코를 킁킁거림에 사용하도록 제조된 원료로 잎담배의 전체 또는 일부를 제조한 제품을 말한다. 또한, 씹는 담배나 담배 식물에서 추출한 물질의 혼합물을 말한다. 담배 내 수분함량은 니코틴이 더 빨리 방출되고 흡수되도록 하는 데 영향을 줄 수 있다.

WHO TobLabNet의 무연담배성분측정 연구 결과를 적용하여 무연담배 내 수분함량 시험 방법 절차서를 마련하고자 한다.

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

흡연폐해실험실의 무연담배 수분함량 시험검사법 표준절차서는 World Health Organization Tobacco Laboratory Network에서 사용 중인 Standard operating procedure for determination of moisture content in smokeless tobacco products을 근거로 작성하였다.

2. 시료 전처리

Coresta technical guide N° 11에 따라 표준무연담배 시료는 -20 °C(장기간 보관시 -70°C)로 보관하고 조화 전 4 °C에서 충분히 해동시킨다. 시료는 조화를 위해 시험 실시 전 실온 (22 ± 1 °C)에서 최소 2시간 동안 보관하여 조화시킨다. 각 실험에 대해 조화된 무연담배 시료를 약 0.5 ~ 2.0 g 정도 되도록 균일하게 혼합하여 준비한다. 오븐온도는 (100 ± 1 °C)로 설정하여 시료를 넣기 전 최소 1시간 동안 평형을 유지하고 온도가 안정화되는지 확인한다.

수분 함량을 측정하기 위해 무연담배 시료의 전, 후 무게를 기록한다. 먼저, 분석 저울에서 깨끗하고 건조한 증발 접시의 무게를 측정하고 무게(W_T)를 기록한다. 저울에서 접시를 제거하고 크기에 따라 1 g의 무연담배 무게(W_1)를 기록한다(0.01 g의 정확도로 무게를 기록). 오븐 온도가 (100 ± 1 °C)인지 확인하고 샘플을 오븐에 넣는다. 오븐 문을 닫은 후 시작 시간을 기록하고 3시간 \pm 0.5분 동안 그대로 둔다. 각 샘플에 대해 위의 과정을 반복한다.

3시간 \pm 0.5분 후, 오븐에서 시료가 들어 있는 증발 접시를 제거하고 데시케이터에서 약 30분동안 실온으로 냉각시킨다. 저울에 증발 접시에 있는 샘플의 무게(W_2)를 잰다(0.01 g 정확도로 기록). 각 샘플에 대해 위의 과정을 반복한다.

① 무연담배 준비

- ▶ 실험실 온도 (22 ± 1 °C, 상대습도 (60 ± 3)%)로, 무연담배를 적어도 2시간 동안 실온 (22 ± 1 °C)에서 조화



② 시료 무게 측정

- ▶ 분석저울에서 깨끗하고 건조한 증발접시의 무게 (W_T)를 측정하고, 조화시킨 무연담배 시료의 1 g 무게를 측정하여 무게(W_1)를 기록한다.
- ▶ 100 °C 오븐에 무연담배 시료를 넣고 3시간 동안 그대로 둔다.
- ▶ 3시간 후, 오븐에서 샘플이 들어있는 증발 접시를 제거하고 데시케이터에서 30분 동안 실온에 냉각시킨다.
- ▶ 증발 접시에 있는 무연담배의 무게(W_2)를 잰다.

그림 1. 전처리방법 절차흐름도

연구 결과

1. 실험결과

내부시험방법 절차서의 주요내용은 WHO TabLabNet SOP 13방법을 참고하여 시료 전처리 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, 온도 설정에 따른 오븐 조건 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 그리고, 실험결과는 아래 식과 같이 건조 전, 후에 따른 무게 변화 차이를 이용해 수분 함량을 % 단위로 산출하였다.

$$M(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_T} \times 100$$

M 수분함량(%)

W₁ 무연담배샘플 및 증발접시의 초기 무게(g)

W₂ 건조된 무연담배 시료 및 증발 접시(g)

W_T 증발접시의 용기 무게(g)

표준무연담배 4종의 수분함량 분석 결과값은 53.2%, 50.0%, 8.0%, 24.4%를 나타내었으며 일내 정확도·정밀도는 94~106%, 1.6~2.5%를 나타내었다.

표 1. 표준무연담배 4종의 수분함량 측정값

종류	수분함량	참조값(%)	측정값(%)
머금는담배(CRP 1)		53.7	53.2
습윤코담배(CRP 2)		53.0	50.0
건조코담배(CRP 3)		8.1	8.0
씹는담배(CRP 4)		23.0	24.4

표 2. 일내 정확도 및 정밀도

종류	정확도(%)	RSD(%)
머금는담배(CRP 1)	99	2.5
습윤코담배(CRP 2)	94	2.0
건조코담배(CRP 3)	100	1.6
씹는담배(CRP 4)	106	1.8

2. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: 무연담배 수분함량 분석

나. 문서번호: KDCA-M-13

다. 제개정일: 2022.12.22.

라. 절차서 내용

1) 시약 및 초자, 보조장비

항목	주요특성
표준무연담배(CRP 1~4)	표준물질
pH meter	pH 측정
pH buffer	pH 보정
증발접시	시료 건조
오븐	시료 건조
데시케이터	시료 조화
향온향습조	시료 조화

2) 시험절차

① 무연담배 준비

- ▶ 실험실 온도 (22 ± 1)℃, 상대습도 (60 ± 3)%로, 무연담배를 적어도 2시간 동안 실온 (22 ± 1)℃에서 조화



② 시료 무게 측정

- ▶ 분석저울에서 깨끗하고 건조한 증발접시의 무게 (W_T)를 측정하고, 조화시킨 무연담배 시료의 1 g 무게를 측정하여 무게(W₁)를 기록한다.
- ▶ 100 °C 오븐에 무연담배 시료를 넣고 3시간 동안 그대로 둔다.
- ▶ 3시간 후, 오븐에서 샘플이 들어있는 증발 접시를 제거하고 데시케이터에서 30분 동안 실온에 냉각 시킨다.
- ▶ 증발 접시에 있는 무연담배의 무게(W₂)를 잰다.

마. 시험방법 유효화 보고서

표준무연담배 4종의 수분함량 측정값의 정밀성은 변동계수(CV) 15 % 이내였으며, 정확성은 각 농도에서 $\pm 15\%$ 로 확인하였다. 표준무연담배 4종 중 머금는담배의 정확도 99 %, RSD 2.5 %이었고, 습윤코담배는 정확도 94 %, RSD 2.0 %이었고, 건조코담배는 정확도 100 %, RSD 1.6 %이었고, 씹는 담배는 정확도 106%, RSD 1.8 % 이었다.

참고문헌

1. Determination of Nicotine, pH, and Moisture Content of Six U.S. Commercial Moist Snuff Products, MMWR, CDC, 1999.
2. Analysis of Moisture Content (Oven Volatiles) of Smokeless Tobacco Products, CORESTA, STS-CTR Moisture Content of Smokeless Tobacco Products, 2014.
3. Quantitative measurement of harmful and potentially harmful constituents, pH, and moisture content in 16 commercial smokeless tobacco products, Selvin H et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 133, August 2022.
4. Changing smokeless tobacco products: new tobacco-delivery systems, Dorothy K. Hatsukami et al., Am. J. Prev. Med., 33 (2007), S368-S378.
5. Estimation of available nicotine content of six smokeless tobacco products, Henningfield et al., Tobac. Control, 4 (1995), 57.

④ 무연담배 pH(수소이온농도) 분석

연구 배경

무연담배란, 담배성분을 함유하고 있는 연기가 나지 않는 제품으로 스누스(건식 및 습식)을 포함하여 흡연, 빨기, 씹거나 코를 킁킁거리며 사용하도록 제조된 원료로 잎담배의 전체 또는 일부를 제조한 제품을 말한다. 또한, 씹는 담배나 담배 식물에서 추출한 물질의 혼합물을 말한다. 무연담배제품의 pH에 따라 인체에 흡수되는 정도가 다르며, pH는 니코틴이 빠른 속도로 뇌에 전달될 수 있도록 하는 요인 중 하나이다.

WHO TobLabNet의 무연담배성분측정 연구 결과를 적용하여 무연담배 내 pH(수소이온농도) 분석 절차서를 마련하고자 한다.

연구 내용 및 방법

1. 표준시험법 적용

흡연폐해실험실의 무연담배 pH 시험검사법 표준절차서는 World Health Organization Tobacco Laboratory Network에서 사용 중인 Standard operating procedure for determination of the pH of smokeless tobacco products을 근거로 작성하였다.

2. 시료 전처리

Coresta technical guide N° 11에 따라 표준무연담배 시료는 -20 °C(장기간 보관시 -70°C)로 보관하고 조화 전 4°C에서 충분히 해동시킨다. 시료는 조화를 위해 시험 실시 전 실온 (22 ± 1)°C에서 최소 2시간 동안 보관하여 조화시킨다. 각 실험에 대해 조화된 무연담배 시료를 약 0.5 ~ 20 g 정도 되도록 균일하게 혼합하여 준비한다.

pH 측정을 위해 무연담배 시료의 1 g 무게를 달아 삼각플라스크에 넣는다. 플라스크에 (20 ± 0.5) mL 증류수를 넣고 약 30분간 충분히 흔들어준다. 무연담배 시료의 pH 측정 전 pH 전극 보정을 위해 최소 2개의 pH 완충용액으로 전극을 보정한다. 시료의 교정과 측정은 동일한 온도에서 시험해야 하므로 연속적으로 수행한다. 전극의 기울기는 전극이 샘플 측정에 사용되기 전 계산된 값의 95 ~ 105% 이내여야하며 보정 후 시료 측정 전후 전극을 증류수로 행군다. 각 시료에 대해 위의 과정을 반복한다.

혼합을 멈춘 뒤, 각 플라스크를 20분간 방치하여 침전시킨 후 무연담배 시료의 pH를 60분 이내에 측정한다. 침전물이 잘 가라앉지 않을 경우 Whatman paper No. 41을 통해 여과하거나 필요한 경우 10,000 rpm에서 중간 속도로 원심분리한다. 모든 pH 측정은 (20~25 ± 1) °C와 같이 실온에서 수행하여 온도를 기록하고 pH를 소수점 이하 두 자리까지 측정한다. 샘플의 pH는 15분 간격으로 반복적으로 측정해야 한다. 1시간 동안 4회 측정한 평균값을 사용하고, 측정값 사이의 pH에서 허용되는 최대 편차는 0.3이다. 측정 전 후 전극을 증류수로 행구며 각 시료에 대해 위의 과정을 반복한다.

① 무연담배 준비

- ▶ 실험실 온도 (22 ± 1)°C, 상대습도 (60 ± 3)%로, 무연담배를 적어도 2시간 동안 실온 (22 ± 1)°C에서 조화



② 시료 무게 측정

- ▶ 조화시킨 무연담배 시료의 1 g 무게를 측정하여 무게달아 100 mL 삼각플라스크에 넣는다.
- ▶ 플라스크에 (20 ± 0.5) mL d.w를 넣고 약 30분간 충분히 흔들여 준다.
- ▶ 각 시료의 pH 측정 전, 후 전극을 증류수로 행군다.
- ▶ 최소 2개의 pH 완충용액으로 pH 전극을 보정한 후 각 무연담배 시료의 pH를 측정한다.
- ▶ 각 시료에 대해 위의 과정을 반복한다.



③ 시료 분석

- ▶ 혼합 후 60분 이내에 무연담배 시료의 pH를 측정 한다.
- ▶ 샘플 플라스크는 20분 더 방치하여 용액이 침전 되도록 하고 Whatman paper No. 41을 통해 여과하거나 필요한 경우 10,000 rpm에서 중간 속도로 원심분리한다.
- ▶ 온도를 기록하고 pH를 소수점 이하 두 자리까지 측정 한다($20\sim 25$ °C).
- ▶ 각 시료의 pH는 15분 간격으로 반복적으로 측정 한다.
- ▶ 각 시료의 pH 측정 전, 후 전극을 증류수로 행군다.

그림 1. 전처리방법 절차흐름도

연구 결과

내부시험방법 절차서의 주요 내용은 WHO Tab-L abNet SOP 14방법을 참고하여 시료 전처리 및 시료분석 결과 등으로 구성하였고, pH 미터기 설정에 따른 조건 등 일부사항은 흡연폐해실험실 분석환경에 맞게 수정하여 반영하였다. 실험결과 pH 미터기를 이용해 pH를 측정하여 산출하였다. 표준무연담배 4종의 pH 측정값은 7.5, 8.1, 7.1, 5.9를 나타내었으며, 정확도와 정밀도의 범위는 각각 88.8~105.2%, 0.0~0.3%를 나타내었다.

표 1. 표준무연담배 4종의 pH 측정값

종류	수분함량	표준물질 인증값	참조값	측정값
머금담배(CRP 1)		8.4	7.9	7.5
습윤코담배(CRP 2)		7.7	8.1	8.1
건조코담배(CRP 3)		7.1	7.0	7.0
씹는담배(CRP 4)		6.2	6.0	5.9

표 2. 일내 정확도 및 정밀도

종류	정확도 (%)	RSD (%)
머금담배(CRP 1)	88.8	0.3
습윤코담배(CRP 2)	105.2	0.2
건조코담배(CRP 3)	99.0	0.3
씹는담배(CRP 4)	94.4	0.0

1. 흡연폐해실험실 내부시험방법 절차서 마련

가. 제목: 무연담배 pH(수소이온농도) 분석

나. 문서번호: KDCA-M-14

다. 제개정일: 2022.12.22.

라. 절차서 내용

1) 시약 및 초자, 보조장비

시약명	주요특성
표준무연담배(CRP1~4)	표준물질
pH meter	pH 측정
pH 전극용액	pH 보정
distiled water	시료 조제
초순수 제조장치(MILLI-Q DIRECT 8)	시료 조제
원심분리기	시료 조제
볼텍서(Vortexer)	균질 혼합
Tip, 피펫	시료 조제
sample tube	시료 조제
0.45 um PTFE 필터	시료 조제

2) 시험절차

① 무연담배 준비

- ▶ 실험실 온도 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 상대습도 (60 ± 3)%로, 무연담배를 적어도 2시간 동안 실온 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 에서 조화



② 시료 무게 측정

- ▶ 조화시킨 무연담배 시료의 1 g 무게를 측정하여 무게달아 100 mL 삼각플라스크에 넣는다.
- ▶ 플라스크에 (20 ± 0.5) mL d.w를 넣고 약 30분간 충분히 흔들어 준다.
- ▶ 각 시료의 pH 측정 전, 후 전극을 증류수로 행군다.
- ▶ 최소 2개의 pH 완충용액으로 pH 전극을 보정한 후 각 무연담배 시료의 pH를 측정한다.
- ▶ 각 시료에 대해 위의 과정을 반복한다.



③ 시료 분석

- ▶ 혼합 후 60분 이내에 무연담배 시료의 pH를 측정한다.
- ▶ 샘플 플라스크는 20분 더 방치하여 용액이 침전 되도록 하고 Whatman paper No. 41을 통해 여과하거나 필요한 경우 10,000 rpm에서 중간 속도로 원심분리한다.
- ▶ 온도를 기록하고 pH를 소수점 이하 두 자리까지 측정한다($20\sim 25^{\circ}\text{C}$).
- ▶ 각 시료의 pH는 15분 간격으로 반복적으로 측정한다.
- ▶ 각 시료의 pH 측정 전, 후 전극을 증류수로 행군다.

마. 시험방법 유효화 보고서

표준무연담배 4종의 pH 측정값의 정밀성은 변동계수(CV) 15 % 이내였으며, 정확성은 각 농도에서 $\pm 15\%$ 로 확인하였다. 표준무연담배 4종 중 머금은담배의 정확도 89 %, RSD 0.3 %이었고, 습윤코담배는 정확도 105 %, RSD 0.2 %이었고, 건조코담배는 정확도 99 %, RSD 0.3 %이었고, 씹는 담배는 정확도 94%, RSD 0.0% 이었다.

참고문헌

1. The Central Role of pH in the Clinical Pharmacology of Nicotine: Implications for Abuse Liability, Cigarette Harm Reduction and FDA Regulation, Benowitz NL., Clin Pharmacol Ther. 2022 May;111(5):1004-1006. doi: 10.1002/cpt.2555. Epub 2022 Feb 27.
2. The pH of Smokeless Tobacco Determines Nicotine Buccal Absorption: Results of a Randomized Crossover Trial, Jess Wilhelm et al., Clin Pharmacol Ther, 2022 May;111(5):1066-1074.
3. In vitro study of nicotine release from smokeless tobacco, Nasr MM et al., J AOAC Int. 1998 May-Jun;81(3):540-3.
4. Nicotine Absorption from Smokeless Tobacco Modified to Adjust pH, Pickworth WB, J Addict Res Ther. 2014 Apr;5(3):1000184.
5. Formulation of smokeless tobacco products with a wide range of pH to study nicotine pharmacokinetics and pharmacodynamics, Hoag SW, Pharm Dev Technol. 2022 Jul;27(6):646-653.

⑤ 국내 판매 액상형 전자담배 액상 내 성분분석

분석 개요

- 목적** : WHO 담배실험실네트워크 표준시험법 (WHO standard official procedure 11, 이하 SOP11)를 이용한 국내 시판 중인 전자담배 액상에서 니코틴, 프로필렌글리콜, 글리세롤 분석법을 정립함으로써 신뢰성 있는 흡연 폐해실험실 기술력 확보
- 일시** : '21.06.04. ~ '21.06.07.
- 분석대상**: 국내 시판 전자담배 액상(e-liquid) 11개 제품*
* 니코틴 종류: 줄기(5), 솔트(3), 합성(3)
- 분석성분**: 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜
※ 니코틴 내부표준물질: n-heptadecane, PG, 글리세롤 내부표준물질: 1,3-Butanediol
- 분석방법**: 가스크로마토그래피(GC)를 이용한 분석성분 동시 검출

연구 내용 및 방법

추출용액은 적절한 양의 내부표준(0.5 mL/L n-heptadecane, 2 mL/L 1,3-Butanediol)을 포함하는 이소프로판올로 희석된 전자담배 액상을 분석하기 위한 GC 기기조건은 표 1과 같다. 니코틴, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 분석을 위한 컬럼은 DB-ALC1 (30 m x 0.32 mm x 1.8 μ m)를 사용하였고, GC 오븐프로그램은 초기온도 140 $^{\circ}$ C (5분 유지), 온도 상승은 40 $^{\circ}$ C/min, 최종온도는 250 $^{\circ}$ C, 최종온도에서의 유지시간은 4분으로 설정하였으며 총 분석시간은 11분이었다.

표 1. 전자담배 액상 내 니코틴, 프로필렌글리콜, 글리세롤 분석을 위한 기기조건

GC 기기조건			
- 자동주입기			
▷ 방법 : GC 동시 주입			
▷ 주입량 : 1 μ L			
- Nicotine, PG, VG			
▷ 컬럼 : DB-ALC 1(30 m x 0.32 mm x 1.8 μ m)			
▷ 주입 온도($^{\circ}$ C) : 225 $^{\circ}$ C			
▷ 운반기체 유속: He Contant pressure(1.5 mL/min)			
▷ 주입 모드(비율) : Split(1:50)			
- 검출기(FID)			
▷ 온도($^{\circ}$ C) : 260 $^{\circ}$ C			
▷ H ₂ 유속 : 40 mL/min			
▷ Air 유속 : 450 mL/min			
▷ Makeup 가스 유속(He) : 45 mL/min			
▷ [GC 오븐 프로그램]			
총 분석시간 : 15.75 min			
초기온도 ($^{\circ}$ C)	온도상승 ($^{\circ}$ C/min)	최종온도 ($^{\circ}$ C)	유지시간 (min)
140	-	-	5
140	40	250	8

결 과

WHO SOP 11을 적용하여 국내에서 판매되고 있는 액상형 전자담배 제품 11종을 분석하였다. 액상형 전자담배 액상 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜 함량을 측정하였고 그 결과, 액상형 전자담배의 액상 내 니코틴의 검출값은 0-6.1 mg/mL, 프로필렌글리콜은 314-585 mg/mL, 글리세롤은 430-661 mg/mL로 나왔다.

표 2. 시판 전자담배 11개 제품 3종 성분 측정값

(단위: mg/mL)

분석 성분	저 니코틴	중 니코틴	고 니코틴
니코틴	0	5.4-6.1	5.4-6.1
프로필렌 글리콜	314-512	452-585	360-581
글리세롤	461-510	430-511	490-661

참고자료

- WHO TobLabNet Official Method SOP 11 : Standard operating procedure for determination of nicotine, glycerol and propylene glycol in e-liquids.

⑥ 국내 판매 무연담배 내 성분분석

분석 개요

1. 목적 : WHO 담배실험실네트워크 표준시험법 (WHO standard official procedure 12-14, 이하 SOP12-14)를 이용한 국내 시판 머금은 담배 스누스(SNUS) 성분 분석으로 내부시험법 정립을 통한 신뢰성 있는 흡연폐해실험실 기술력 확보
2. 일시: '22.8.22. ~ 8.30.
3. 분석대상: 국내 시판 머금은 담배 스누스(SNUS) 4종
4. 분석항목: 니코틴, 수분, pH
5. 분석방법: ①(SOP 12) 가스크로마토그래피 (GC)를 이용한 니코틴 정량분석, ②(SOP 13) 무연담배 증발 전후 무게측정, ③(SOP 14) pH 미터기를 이용한 pH측정

결 과

국내에서 수입되는 제품 중 판매되고 있는 머금은담배 스누스 4종의 니코틴, 수분, 수소이온농도(pH) 함량을 측정하였다. 표준무연담배와 동일한 SOP 12-14 표준절차서의 방법으로 진행하였으며 니코틴의 경우, 일정한 농도범위 내에 있는 분석대상 물질의 양에 대한 정량성을 직선성으로 확인하였고, 정확도·정밀도는 시료 검출수준 범위를 포함한 농도에 대하여 반복·측정하여 평가하였다(표1, 2).

표 1. 시판 스누스 4종 농도 측정값

종류 \ 니코틴	참조값 (mg/g)	측정값 (mg/g)
표준무연담배	7.4	8.0
시판제품 A	19.0	18.9
시판제품 B	19.0	20.6
시판제품 C	9.0	7.7
시판제품 D	12.0	10.9

표 2. 일내 정확도 및 정밀도

종류	정확도 (%)	RSD (%)
표준무연담배	98	1.5
시판제품 A	99	3.4
시판제품 B	108	3.7
시판제품 C	86	0.6
시판제품 D	91	5.0

수분함량의 정밀도는 시료 검출수준 범위를 포함한 수분함량 측정에 대하여 반복·측정하여 평가하였다. 수분함량값은 10.8~43.2%로 다양하게 측정되었다(표3).

표 3. 시판 스누스 4종 수분함량 및 정밀도

종류	수분함량(%)	정밀도(%)
표준무연담배	53.2	2.5
시판제품 A	12.0	4.9
시판제품 B	10.8	2.5
시판제품 C	29.0	0.8
시판제품 D	43.2	3.6

수소이온농도(pH)의 정밀도는 시료 검출수준 범위를 포함한 pH 측정에 대하여 반복측정하여 평가하였다. 그 결과값은 표준무연담배 대비 종류별로 9.0~10.4 범위에서 다양한 pH를 나타 내었다 (표4).

표 4. 시판 스누스 4종의 pH 및 정밀도

종류	pH	정밀도(%)
표준무연담배	7.5	0.3
시판제품 A	9.1	0.1
시판제품 B	9.0	0.1
시판제품 C	9.4	0.1
시판제품 D	10.4	0.1

⑦ ISO17025 기타재료 및 제품분야(02.008) 내부정도관리

참가 개요

1. 목적: 공인시험기관 시험결과의 품질보증 및 신뢰성 확보를 위한 인정 분야별 시험자 시험능력 평가*

* 관련근거: KS Q ISO/IEC 17025 7.7.2항 결과의 유효성 모니터링(시험자간 비교시험)

2. 일시: (1차) 2022.6.3.(금) ~ 6.29.(수),
(2차) 2022.9.23.(금) ~ 9.30.(금)

3. 대상: ISO170258 인정범위 중 기타재료 및 제품 분야(02.008) 실무자

3. 분석항목: 담배 필터 내 nicotine 함량 분석

4. 분석방법: [KDCA-M-03] GC를 이용한 담배 중 filler 내 Nicotine 분석*

* WHO TobLabNet Official Method SOP 04:2014
(Standard operating procedure for determination of nicotine in cigarette tobacco filler)

5. 결과 판정기준: 美켄터키 담배연구개발센터(KT RDC*) 참조값과 비교

* Kentucky Tobacco Research & Development Center: 담배 제품 연구에 대한 인증된 표준 담배를 제공함과 동시에 국제 숙련도 시험 운영 진행

결 과

각 시험자 분석결과가 표준담배(1R6F) 참조 증명서에서 제시하는 허용범위 내 측정되어 시험자별 시험능력에 대한 적합성이 확인되었다. 유의성 비교·검증을 위해 F-검정 결과 p-value가 0.05보다 크므로 등분산으로 확인하였으며, t-검정(등분산 가정) 결과에서 양측 검정 p-value가 0.05보다 크므로 '시험결과 간 유의적 차이 없음'으로 확인되었다. (표 1, 2).

그러므로 숙련도 적합기준*에 따라 특정값 범위 내 시험항목별 시험자간 분석결과는 '적합'으로 나왔다.

* 두 실무자간 통계수준 유의적 차이 없음(F-검정, T-검정 95% 신뢰수준)

표 1. 시험자간 비교시험 결과(1차)

구분	nicotine (ng/mL)
시험자1	18.318
시험자2	18.161
참조값	17.978(±1.047)
F-검정 (P-value)	0.267
t-검정 (P-value)	0.522
적합여부	적합

표 2. 시험자간 비교시험 결과(2차)

구분	nicotine (ng/mL)
시험자1	17.450
시험자2	17.576
참조값	17.978(±1.047)
F-검정(p-value)	0.273
t-검정(p-value)	0.016
적합여부	적합

참고자료

1. WHO TobLabNet Official Method SOP 04:2014
(Standard operating procedure for determination of nicotine in cigarette tobacco filler)
2. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation: guidance for industry. 2018.

흡연구성물질 농도별 침지 노출에 따른 세포생존율 및 활성산소 검증

연구 배경

신종담배의 등장 이후 지속적인 신제품 개발 및 사용량 증가에 따른 해당 제품의 배출물에 대한 세포독성 및 유전체 변이 파악이 필요하며, 특히, '19년 미국의 액상형 전자담배 사용과 관련한 폐손상 및 사망사례(EVALI¹⁰⁾) 발생하여 신종담배의 위해성 평가 필요성이 제기되고 있다.

액상형 전자담배의 주요구성물질은 니코틴, 프로필렌글리콜, 글리세롤이 있다. 먼저 니코틴은 담배연기의 주요 성분 중 하나이며, 니코틴과 염류 중 하나를 1%이상 함유된 혼합물을 유독물질로 분류하고 있으며, 전자담배에서 니코틴 함유량은 약 1.6~2%정도 함유되어 있다. 프로필렌글리콜은 무색의 투명의 액체로 쓴맛과 단맛이 있으며 유화제, 습윤제, 안전제 등으로 사용되고 있고 전자담배 137개 분석 결과 14.5~64.4 ppm 정도 함유하고 있다. 글리세롤 역시 무색 투명의 액체로 단맛이 있으며, 습윤제, 착색료의 용제 등으로 사용되며, 전자담배 137개 분석 결과 18~68.9 ppm 정도 함유하고 있다.

활성산소(Reactive Oxygen species, ROS)는 세포호흡을 통한 에너지대사에서 자연스레 발생한다. 이는 정상세포 내에서 일정수준 존재하고 있으며 신호전달과 외부로부터 침입한 병원균 및 비정상세포를 제거 등 항상성 유지를 위해 필요하다. 과다 생성된 활성산소는 항산화제에 의해 최종적으로 산소와 물로 분해되지만, 외부 자극으로 인한 활성산소의 과다 생성은 유전자 손상, 세포막(지질) 등의 손상으로 세포괴사, 세포사멸, 염증반응 등을 유도하며 이는 결국

노화, 치매, 불임, 암 발생등 인체 전반에 걸친 질병 발생과 관련이 있다고 알려져 있다.

이에, 전자담배의 유해성에 대한 체계적 시험 방법을 수립하고 액상형 전자담배 기반한 유해성 평가 자료 확보를 하고자 '19년에 '액상형 전자담배 노출 특성을 반영한 호흡기계 세포독성 시험법 확립' 연구를 진행하였다. 해당 연구에서 사용된, 전자담배 세포 노출법을 이용하여 새로 개설한 흡연폐해세포실험실에서 액상형 전자담배의 주요 성분인 3종 니코틴, 프로필렌 글리콜, 글리세롤에 대해 세포의 생존율과 활성산소도 (ROS: Reactive Oxygen Species) 생성도를 실험하여 유해성 평가를 하고자 하였다.

연구 내용 및 방법

1. 세포배양

폐포암세포주(A549)를 T 75 배양 바틀에 80 % 정도 되면 계대배양을한다. T75 바틀의 배양액을 제거하고, 생리식염수(DPBS)로 2번 씻어준다. Trypsin-EDTA를 5분 처리하여 배양바틀에 붙어있던 세포들을 떼어 단일세포로 만들어 준다. 배양액을 넣어 trypsin 성분을 중화하고, 50 ml 튜브에 넣어 실온에서 12000 rpm으로 5분 원심분리를 한다. 상층액만 제거하고 세포가 묻쳐있는 것을 배양액을 넣어 부드럽게 풀어준다. 12 well insert에 500 μ l 당 0.8×10^5 (단, 활성산소 측정은 1×10^5)로 세포를 넣고 2일 배양하여 세포가 안정적으로 부착하도록 한다. ALI를 모방한 Insert를 이용한 실험법으로 프로필렌 글리콜, 글리세롤은 최대 농도 100%부터 처리하여 실험을 하였고, 니코틴의 경우 5%를 최대 농도로 설정하였다.

10) E-cigarette or Vaping product use Associated Lung Injury

2. 흡연구성물질

1) 니코틴(Nicotine)

니코틴은 담배연기의 주요 성분으로 구강, 폐, 장 및 피부를 통해 흡수되지만, 주로 폐에서 흡수되며 이후 수초 내에 뇌에 도달한다. 이는 즉시 도파민계 신경 자극으로 인한 쾌감, 부신 수질 내 아드레날린 증가로 인한 혈압, 호흡 수 증가반응 등이 나타나며 이는 대부분 신경전달 물질 및 호르몬의 분비로 인해 발생하는 것이 특징이다. 니코틴은 혈액 내 48시간동안 잔류하지만 암 유발물질은 아니지만, 지속적으로 노출 되었을 때 암 발생을 유도한다고 알려져있다. 세포에 유해성 검증 시, 5%부터 2배 희석하여 확인하였다.

2) 프로필렌 글리콜(Propylene glycol, PG)

의약품, 화장품 및 다양한 종류의 식품을 비롯해 다양한 제품에서 사용되며 전자담배의 가향성분을 녹이기 위한 용매제로 사용된다. PG는 위장관에서 대부분 흡수되며 1시간 이내에 혈액내 최대농도로 존재하며, 1.4~3시간 반감기를 갖고 있다. PG에 의한 인체 유해성 연구는 많은 실정이며, 미FDA에서는 일반적으로 안전하다고 보고하였지만, 과도한 약물이 체내에 흡수되었을 때, 난치성 저혈압, 부정맥, 용혈, 신장 기능장애 등의 증상이 보일 수 있다고 보고 되었다. 세포에 유해성 검증 시, 100%부터 2배희석하여 확인하였다.

3) 글리세롤(Glycerol, VG)

글리세롤 혹은 글리세린이라고 불리며, 전자담배의 연무량을 증가 시키기 위해 사용되고 있다. 액체상의 VG는 점도가 높고 분무상태인 경우 공기 중 입자의 유해농도가 증가된다. 세포에 유해성 검증 시, 100% 부터 2배희석하여 확인하였다.

3. 세포생존율 측정

세포 노출 하루전 배양한 inset well의 배양액을 제거한다. 흡연 구성 물질을 농도별로 세포에 90분 침지노출 한다. 그 후, 노출시킨 물질들을 제거하고 생리식염수로 2번 씻어준다. 세포생존 측정 시약 200 μ l을 넣고 3시간 배양하여 상층액 100 μ l를 96 well plate에 넣고 460 nm에서 흡광도를 측정한다 (그림 1).

① 세포 준비

- ▶ A549를 12well insert well에 0.8×10^5 으로 넣고 2일간 배양한다.



② 침지노출

- ▶ Isert well의 배양액을 제거한다(세포 노출 하루 전)



③ 세포 처리

- ▶ 세포에 농도별 흡연 구성 물질(nicotine, PG, VG)을 90분 처리한다.
- ▶ 생리식염수(PBS)로 2번 씻는다.
- ▶ Cell Count kit-8을 10배 배양액에 희석하여 처리후 배양기에서 3시간 배양한다.



④ 흡광도 측정

- ▶ 마이크로플레이트 리더기로 흡광도(460nm) 측정

그림 1. 세포생존율 측정 흐름도

4. 활성산소 측정

세포 노출 하루전 배양한 inset well의 배양액을 제거한다. 흡연 구성 물질을 농도별로 세포에 90분 침지노출 한다. ROS 측정 시약을 세포에 40분 침지노출 한다(그림 2).

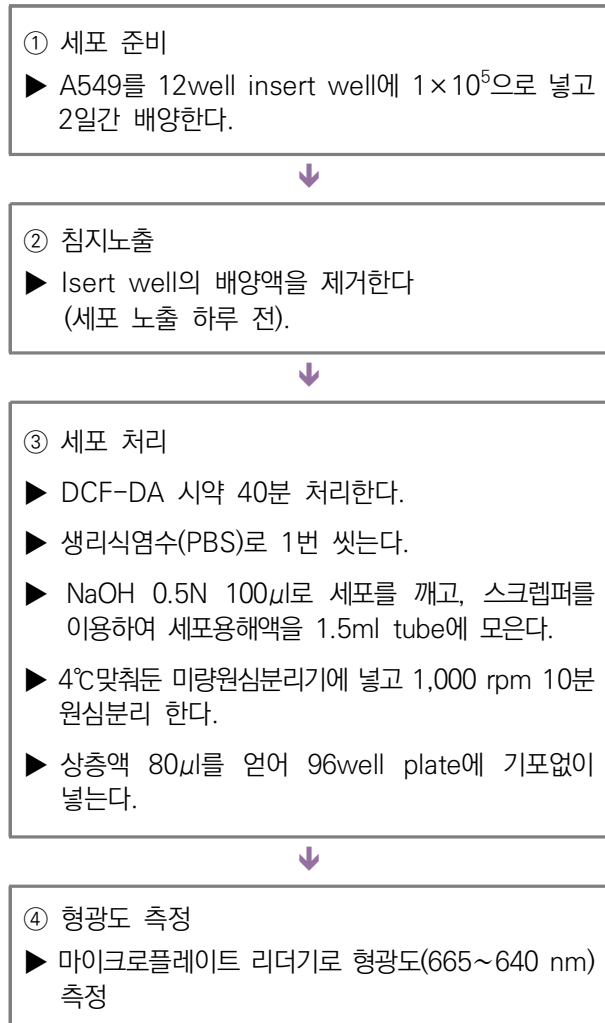


그림 2. 활성산소 측정 흐름도

5. 활성산소 이미지 촬영

Confocal Dish(공초점현미경 전용 디쉬)에 세포 1.5×10^4 으로 깔아준다. 2일 후, PG를 25%, 50%, 100%로 40분 처리한다. PBS로 2번 씻어준다. 활성산소 측정 시약을 처리하고 세포배양기에서 40분 배양한다. PBS로 씻어 준 후, 4℃ 4% PFA(Paraform Aldehyde)로 10분 세포 고정한다. PBS로 3번 씻어 주고, 세포 핵을 암흑에서 15분염색 하고 PBS로 3번 씻어주고 마지막에 증류수로 채우고 이미지 촬영한다(그림 3). 동일한 조건으로 1개의 샘플 당 5장 이상의 이미지를 촬영하였고, 이를 'image J' 프로그램을 이용하여 3회 분석하였다(그림 3).

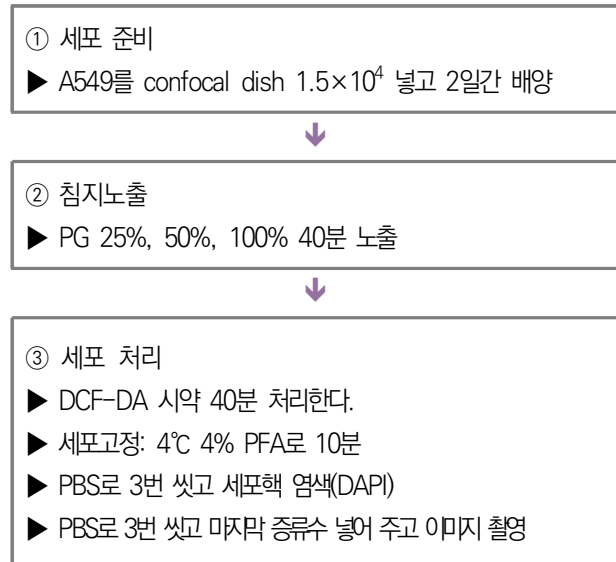
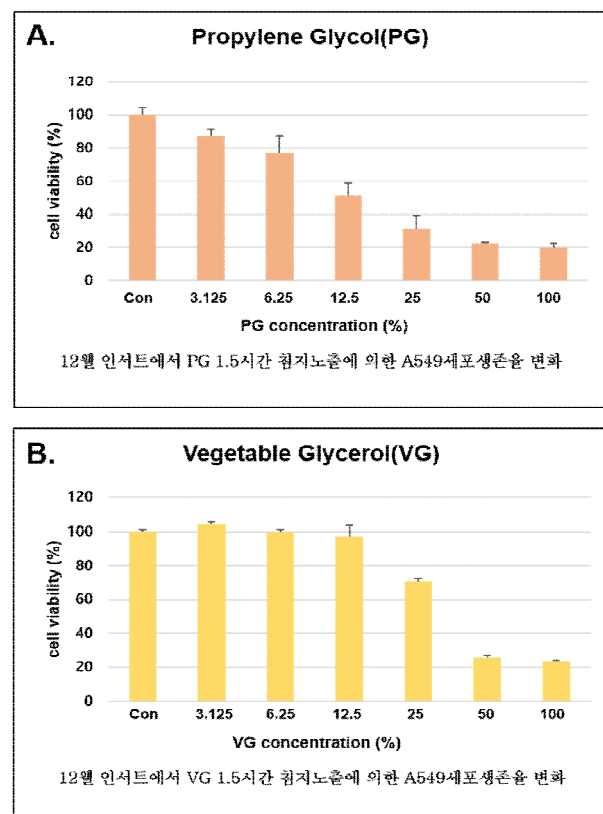


그림 3. 활성산소 이미지 측정 흐름도

연구 결과

1. 세포생존 실험결과

프로틸렌 글리콜, 글리세롤은 최고농도에서부터 25%까지 세포생존율이 유의하게 감소하였으며, 니코틴은 최고농도 5%에서부터 1.25%까지 세포 생존율이 감소하였다(그림 4).



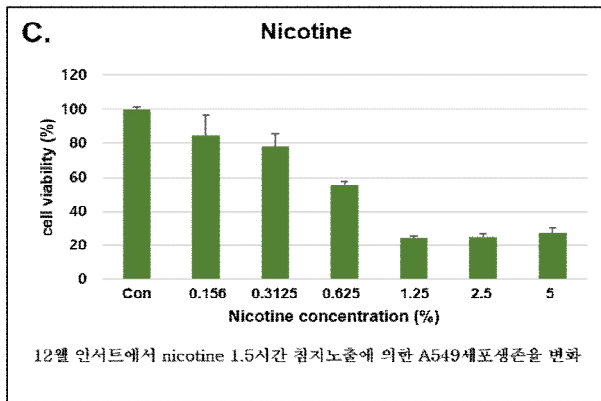


그림 4. 농도별 흡연구성물질에 대한 세포생존율

2. 활성산소 실험결과

세포생존율 확인 후, 세포생존율이 감소하는 농도에서 활성산소 생성도를 확인하였다. 프로필렌 글리콜, 글리세롤은 25%~100%, 니코틴은 1.25~5%로 노출 농도를 설정하였고, 그 결과 프로필렌 글리콜과 글리세롤은 25~100%까지 세포에 처리 시, 농도 의존적으로 활성산소생성이 유의하게 증가하였다(그림 5A). 다만 니코틴의 경우, 경향을 알 수 없었다. 그 중 프로필렌 글리콜의 활성산소 생성을 이미지로 확인한 결과 활성산소 생성 양상이 비슷하여 추후 이미지로 확인 가능함을 확인하였다(그림 5B).

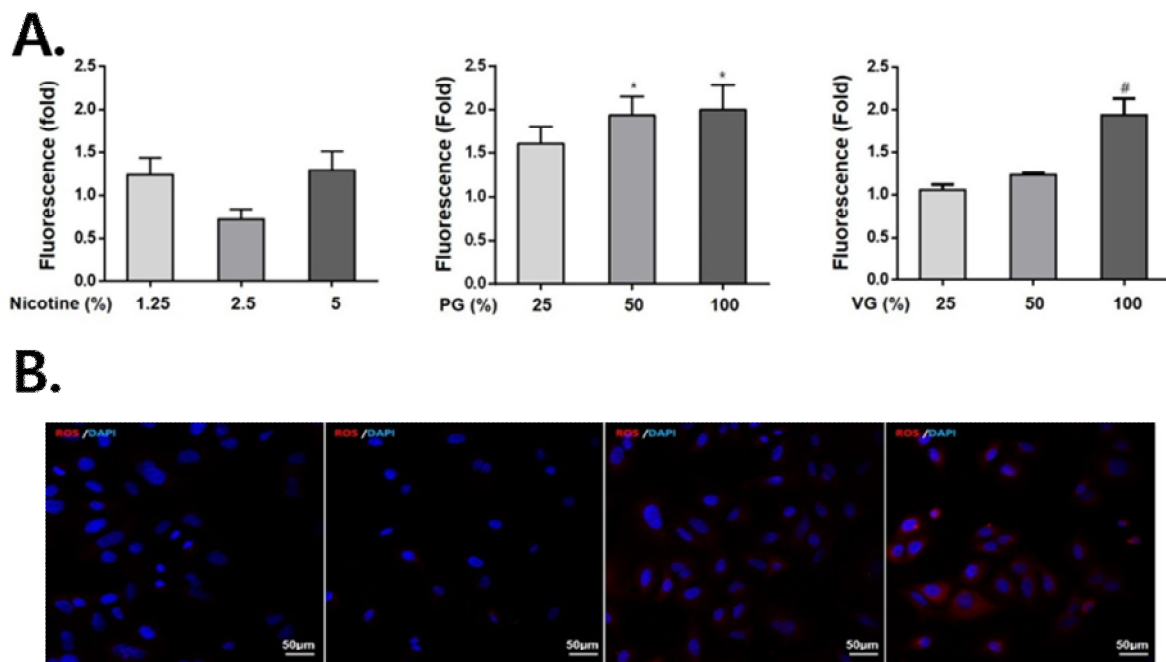


그림 5 농도별 흡연물질에 대한 활성산소 생성율

IV

부 록

2021 ~ 2022 흡연폐해실험실 운영 성과보고서



질병관리청
건강위해대응과

붙임 1

WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 운영 현황

■ 배경 및 필요성

- **WHO** 담배규제기본협약(FCTC) 비준, 담배실험실 네트워크*(TobLabNet) 구축에 따른 담배 성분 분석법 마련 및 표준화 진행('05~)
 - * 분석회원 등으로 미국, 캐나다, 한국 등 31개국 가입되어 있으며, 우리나라는 식약처('16.3월), 질병청('17.10월)이 참여 중
- 질병관리청은 **WHO**표준시험법을 흡연폐해실험실 시험법으로 정립(13종/총 14종) 및 신종담배 시험법 개발 관련 글로벌 공동연구(2건) 참여('17~)

■ 추진경과

- ('16.01.) 舊질병관리본부 흡연폐해실험실 WHO TobLabNet 가입신청서 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.) 흡연 폐해 실험실, 담배 성분 시험법 '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)

- ('21.08.21.) 흡연 폐해 실험실 국제공인시험기관(ISO17025) 인정 갱신

■ 주요실적

- 액상형 전자담배 성분분석 표준시험 절차서*를 적용한 국내 판매 전자담배 액상**(11종) 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜 분석('21.9월)

* WHO SOP11 : Determination of nicotine, glycerol and propylene glycol in e-liquid('21.3월)

** 니코틴(줄기, 솔트, 합성) 종류별 전자담배 액상(e-liquid) 제품

- 껀련형 전자담배 내 니코틴, 글리세롤, 프로필렌글리콜 분석법(SOP15) 마련을 위한 글로벌 공동연구* 참여('22.3월)

* 싱가포르보건청 주관 연구로 제공검체 3종(아이코스, 글로, 릴) 분석 완료

- WHO TobLabNet 주관 표준시험법 적용 여부 및 활용현황 등 공유

〈 참고 ① 〉 : WHO TobLabNet에 의한 표준시험법 현황 ('23.4월 기준)

SOP 번호	제목	정립 여부
1	담배연기 발생을 위한 흡연장비 조건	○
2	담배 제품 및 배출물 분석방법에 대한 유효성검증 절차	○
3	껀련담배 주류연 내 TSNAs*(NNN, NNK, NAT, NAB) 분석	○
4	껀련담배 filler 내 Nicotine 분석	○
5	껀련담배 주류연 내 Benzo[a]pyrene 분석	○
6	껀련담배 filler 내 Humectants 분석 (propylene glycol, glycerol, triethylene glycol)	○
7	껀련담배 filler 내 Ammonia 분석	○
8	껀련담배 주류연 내 Aldehydes 분석 (acetaldehyde, acrolein, formaldehyde)	○
9	껀련담배 주류연 내 VOCs**(benzene, 1,3-butadiene) 분석	○
10	껀련담배 주류연 내 CO(carbon monoxide) 분석	○
11	액상형전자담배 액상 내 Nicotine, Glycerol, Propylene glycol 분석	○
12	무연담배 내 Nicotine 분석	○
13	무연담배 내 수분함량 분석	○
14	무연담배 내 pH(수소이온농도) 분석	○

* 담배특이니트로사민(Tobacco Specific Nitrosamines, TSNAs) : ①NNN 3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine, ②NNK: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, ③NAT: N-nitrosoanatabine, ④NAB: N-nitrosoanabesine

** 휘발성 유기화합물(Volatile Organic Components, VOCs)

〈참고 ②〉 : WHO TobLabNet 회원 실험실현황 ('23.1월 기준)

연번	국가명(기관수)	기관명	성격
1	알바니아(1)	Institute of Public Health	국가기관
2	브라질(1)	ANVISA(Brazilian Health Surveillance Agency)	국가기관
3	불가리아(1)	Tobacco and Tobacco Products Institute	민간연구소
4	부르키나파소(1)	LNSP(Laboratoire National de Sante Publique)	국가기관
5	캐나다(2)	Health Canada	국가기관
		Labstat International ULC	민간연구소
6	중국(3)	China CDC, China National tobacco Quality Supervision and Test Center, Institute of Tobacco Safety and Control	국가기관
7	코스타리카(1)	INCIENSA(Institute of Research and Nutrition and Health	민간연구소
8	핀란드(1)	National Supervisory Authority for Welfare and Health	국가기관
9	프랑스(1)	LNE(Laboratoire National d'Essais)	국가기관
10	독일(1)	CVS(Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen)	민간연구소
11	그리스(1)	General Chemical State Laboratory of Greece	국가기관
12	인도(1)	Directorate General Health Service	국가기관
13	인도네시아(1)	National Agency of Drug and Food control	국가기관
14	아일랜드(1)	State Laboratory	국가기관
15	이탈리아(1)	European Commission Joint Research	국가기관
16	일본(1)	National Institute of Public Health	국가기관
17	레바논(1)	American University of Beirut	대학
18	리투아니아(1)	National Public Health Surveillance Laboratory	국가기관
19	말레이시아(1)	National Public Health Laboratory	국가기관
20	멕시코(1)	National Institute of Public Health	국가기관
21	네덜란드(1)	National Institute for Public Health and Environment	국가기관
22	싱가포르(1)	Health Science Authority	국가기관
23	스페인(1)	Laboratorio Agroalimentario de Sevilla	민간연구소
24	스위스(1)	Swiss Federal Office of Public Health	국가기관
25	터키(1)	Tobacco and Alcohol Market Regulatory Authority	국가기관
26	우크라이나(1)	L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety	국가기관
27	아랍에미리트(1)	National Laboratory and Research Center	국가기관
28	영국(1)	University of St Andrews	대학
29	미국(6)	FDA, CDC, NCI, Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau	국가기관
		Battelle, Pinney Associates	민간연구소
30	베트남(1)	National Institute of Occupational and Environmental Health	국가기관
31	대한민국(2)	Korea Disease Control and Prevention Agency('17) Ministry of Food and Drug Safety('16)	국가기관

구분	세부사항					
니코틴 (Nicotine)	모성분	Nicotine	Nicotine	Nicotine	Cotinine	Anabasinine
	대사체	Nicotine	Nornicotine	Cotinine	3'-OH Cotinine	Anabasinine
	정립 배경	<ul style="list-style-type: none">○ Nicotine은 美FDA(식품의약품)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있으며, 담배의 주성분으로써 중독성이 강한 물질로 알려져 있음○ Nicotine으로부터 대사되는 Nornicotine은 흡연 과정에서 1급 발암물질인 담배특이 니트로사아민류(TSNAs) NNN 생성한다고 알려져 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 활용되고 있음○ Cotinine으로부터 대사되는 3'-OH Cotinine을 측정함으로써, cotinine과 3'-OH Cotinine의 함량비를 이용하여 nicotine 대사율(NMR)을 산출하는데 활용되고 있음○ Anabasinine 금연치료제인 니코틴대체제에 존재하지 않아 금연치료 중 흡연여부 확인지표로 활용할 수 있음				
	정립 시험법	(KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 분석 지침서				
	활용 성과	<ul style="list-style-type: none">○ 흡연폐해실험실* 분석기반 역량강화* WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원○ 국가 '흡연폐해 바이오모니터링' 사업 분석기관으로서 참여○ 외부연구과제 정도관리 참여 및 협력연구				
담배특이 니트로스 아민류 (TSNAs)	모성분	NNK			NNN	
	대사체	NNAL			NNN	
	정립 배경	<ul style="list-style-type: none">○ NNK와 NNN은 담배로부터 발생하는 특이표성분으로써, 美FDA(식품의약품)이 지정한 담배 내 유해성분(HPHCs) 목록에 포함되어 있으며, 1급 발암물질로 지정 되었음○ 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				
	정립 시험법	(KDCA-M-06) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 NNAL 및 NNN 분석 지침서				
	활용 성과	<ul style="list-style-type: none">○ 흡연폐해실험실* 분석기반 역량강화* WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원○ 국제공인기관 시험법(화학시험/임상, 02.029) 인정* 국내 화학시험/임상(02.029) 분야 인정기관은 질병관리청이 유일함				

구분	세부사항							
휘발성 유기 화합물 (VOCs)	모성분	Acrolein		Benzene		1,3-Butadiene		
	대사체	3-HPMA		SPMA		MHBMA		
	정립 배경	○ 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						
	정립 시험법	(KDCA-M-08) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 SPMA, 3-HPMA, MHBMA 분석 지침서						
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실* 분석기반 역량강화 * WHO 담배실험실네트워크(TobLabNet) 분석회원						
중금속류 (Heavy metals)	혈액 (4종)	Nickel		Cadmium		Mercury		Lead
	소변 (6종)	Aluminium	Chromium	Nickel	Cadmium	Tin	Lead	
	정립 배경	(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 결련담배 대비 위험저감 효과를 홍보하며 흡연자의 건강을 위협하고 있음 ○ 금속형태의 장치를 활용하여 흡연하는 전자담배, 가열담배 등의 경우에도 중금속 노출이 우려됨 ○ 다양한 흡연유형(결련담배, 가열담배, 전자담배, 듀얼유저 등)별 흡연자의 소변 내 중금속 양 측정을 통해 노출정도 파악 필요						
	정립 시험법	ICP-MS를 이용한 혈액 내 Nickel, Cadmium, Mercury 및 Lead 시험검사법 ICP-MS를 이용한 소변 내 Aluminium, Chromium, Nickel, Cadmium, Tin 및 Lead 시험검사법						
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화 ○ 흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범 연구(소변 내 중금속 분석을 중심으로) 수행에 활용						
휘발성 유기 화합물 (VOCs)	성분 (13종)	Isoprene		1,3-Pentadiene		2-Methylfuran		2-Butanone
		Benzene		2-Pentanone		Toluene		1-Butanol
		Pyridine	1-Pentanol	Cyclopentanol	Cis-3-hexen-1-ol	Pyrrole		
	정립 배경	○ 흡연자의 담배연기(주류연, 부류연)로부터 발생하는 간접흡연 이외에도 흡연 후 실내에서 호흡하는 가운데 호기(날숨)에서 유래하는 간접흡연의 피해를 비흡연자 들은 겪고 있음 ○ 간접흡연 연구의 일환으로, 흡연자의 흡연 후 호기 내 성분분석을 통한 과학적 근거자료 마련						
	정립 시험법	GC-MS를 이용한 호기 내 VOCs(Isoprene 외 12종)시험검사법						
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화 ○ 흡연자의 호기 내 유해성분 분석 및 생체지표 탐색 시범 연구(호기 내 유해성분 분석을 중심으로) 수행에 활용, 논문 게재 예정 ○ 신종담배 배출물 성분 스크리닝 기초연구('20) 시험법으로 활용						

〈참 고〉 : 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	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험법별* 유효화보고서 마련 <ul style="list-style-type: none"> - 직선성, 정확성, 정밀성, 매질효과, 회수율 재현성 등 시험방법에 대한 유효성 확인 * (KDCA-M-01) LC/MS/MS를 이용한 소변 내 니코틴대사체 및 알칼로이드(5종) 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	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험항목별 측정불확도 산출보고서 마련 <ul style="list-style-type: none"> - 측정값에 영향을 줄 수 있는 주요 요인에 따른 불확실한 정도 반영 * 표준물질의 순도, 피펫 및 초자의 불확도, 시험자의 재현정밀도 등
결과의 유효성 보장	내부 정도 관리	결과의 변동성을 확인하고 안정된 방식으로 그 결과가 유지되는지 검증하기 위함	연1회	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험자간 비교시험 <ul style="list-style-type: none"> - 화학/임상(02.029) 시험자간 비교시험 결과 산출 * 결과의 적절성 여부는 t-검정, 분산분석 등의 통계적 기법을 활용
	외부 정도 관리		연1회	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국외숙련도 시험참가 <ul style="list-style-type: none"> - 운영기관: G-EQUAS (독일외부품질평가기관) - 참가시료: 소변 - 참가항목 <ul style="list-style-type: none"> · (2016, 1종) Cotinine · (2017, 2종) Cotinine, NNAL · (2018~2021, 5종) Cotinine, NNAL, SPMA, MHBMA, HPMA - 참가결과: 적합 ○ 국외숙련도 시험참가 <ul style="list-style-type: none"> - 운영기관: 미국병리학회(CAP) - 참가시료: 소변 - 참가항목 <ul style="list-style-type: none"> · (2022, 3종) Nicotine, Cotinine, Anabasine - 참가결과: 총 9개 시료 중, 1개 '주의' 그 외 전원 '적합' * 주의항목에 대한 시험오차 원인분석을 통해 무작위 오차임을 확인하여 시정조치 완료

구분	세 부 내 용				
	성분명	Nicotine	Water	Tar	CO
니코틴 (Nicotine)	정립 배경	○ 국가 금연정책이 필요로 하는 과학적 근거(Evidence)를 지속체계적으로 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 지속체계적으로 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			

구분	세 부 내 용						
	성분명	Formaldehyde	Acetaldehyde	Propanal	Butanal	Pentanal	Hexanal
		Heptanal	Octanal	Nonanal	Decanal	Acrolein	Benzaldehyde
		Crotonaldehyde	Furfural	Isobutyraldehyde	Piperonal	2-Methylbutyr aldehyde	3-Methyl-2-butenal
알데하이드류 (Aldehydes)	정립 배경	○ 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 신속 분석할 수 있는 시험법 개발					
	정립 시험법	GC-MS를 이용한 담배 주류연 내 Aldehydes 18종 시험검사법					
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화 ○ 신종담배 배출물 내 aldehydes 시험법 개선('20)에 활용					
휘발성 유기 화합물류 (VOCs)	성분명	1,3-Butadiene	Benzene	Isoprene	Toluene	Acrylonitrile	
	정립 배경	○ 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					
	정립 시험법	GC-MS를 이용한 담배 주류연 내 휘발성 유기화합물 5종 분석					
	활용 성과	○ 흡연폐해실험실 분석기반 역량강화					

〈참 고〉 : 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	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험법별* 유효화보고서 마련 <ul style="list-style-type: none"> - 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	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험항목별 측정불확도 산출보고서 마련 <ul style="list-style-type: none"> - 측정값에 영향을 줄 수 있는 주요 요인에 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	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험자간 비교시험 <ul style="list-style-type: none"> - 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)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국외 숙련도 시험참가 <ul style="list-style-type: none"> - 운영기관: CTRP(Center for Tobacco Reference Products)* * 메켄터키대학 내 담배참조제품센터 - 참가시료: 표준담배(1R6F) 주류연 - 참가항목 및 조건(ISO/HCI법) <ul style="list-style-type: none"> · (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

구분	내용	세부 분석대상	시험법 확립							KOLAS 인정						
			'16	'17	'18	'19	'20	'21	'22	'17	'18	'19	'20	'21	'22	
담배 성분	Nicotine	Nicotine								○				◎		
담배 필터	Humectants	Propylene glycol														
		Glycerol														
		Triethylene glycol														
	Ammonia	Ammonia														
담배 연기	Tar	Nicotine								○				◎		
		Water								○				◎		
		Tar								○				◎		
	TSNAs	NNN														
		NNK														
		NAB								○				◎		
		NAT														
	Aldehydes	Formaldehyde														
		Acetaldehyde								○				◎		
		Acrolein														
	CO	CO									○			◎		
	Benzo[a]pyrene	Benzo[a]pyrene														
	VOCs	Benzene														
		1,3-Butadiene														
생체 시료	Nicotine and metabolites	Cotinine									○			◎		
		3'-OH Cotinine									○			◎		
		Nicotine														
		Nornicotine														
	Alkaloids	Anabasine														
	NNK	NNAL									○			◎		
	NNN	NNN									○			◎		
	Heavy metals (Blood, Urine)	Lead														
		Mercury														
		Cadnium														
		Nickel														
		Aluminium														
		Chromium														
	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 TSNA 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)

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액(원)
1	가스크로마토그래피 GC	Agilent technologies, CN/7890B	Nicotine, Water(tar측정), Humectants (Triethylene glycol, Glycerol, Propylene glycol)	1	43,899,620	43,899,620
2	가스크로마토그래피 질량분석기 GC/MS	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	고성능액체 크로마토그래피 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 유기화합물질, 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) 향온향습을 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	Agilent technologies, SZ/PAL3 RTC 120	휘발성 및 준휘발성 유기화합물질 분석을 위해 GC-MS내 시료주입 (Headspace, Solid phase Microextraction [SPME] 방법 적용)	1	46,332,650	46,332,650
9	진공 또는 원심농축기	Eyela, JP/MGS-2200D	미량의 분석시료 농축(1.5ml, 소량)	1	3,195,000	3,195,000
10	액체크로마토 그래피(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	기체크로마토 그래프(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(원)
14	진공 또는 원심농축기	Biotage, GB/TurboVap LV ASE	분석시료 농축(1.5-30ml, 대량)	1	24,026,000	24,026,000
15	액체크로마토그래피 질량분석기 LC/MS/MS	Agilent technologies, US/6460, triple quadrupole LCMS	Cotinine, NNAL, TSNA's(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	실험실용 가스발생기	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	탁상형 냉장원심분리기 (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	자동습도조절시약장 (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
29	초저온냉동고 (Deep Freezer)	Nihon freezer, JP/CLN-51U	시약, 시료 보관	1	11,055,000	11,055,000

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액(원)
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	실험실용연구기후드 및 찬장	씨앤티씨랩, 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	생체시료 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	마이크로 웨이브오븐	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	무정전전원장치	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/RT25HAR4DW W, 255L	시료 및 시약 보관용	1	371,990	371,990
44	오토샘플러	오토샘플러, Agilent technologies, AU/SPS4, 300~3000 μ L	GC-MS 분석 보조장비	1	13,970,000	13,970,000
45	순환식수조	냉온식순환조, Polyscience, US/6100 series 1HP Chiller, 2.65L	ICP-MS 분석 보조장비	1	7,200,000	7,200,000

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액(원)
46	실험실용배기기	실험실용배기기, 유니온이엔지, UN-PPF150, 1500×800×2350 mm	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	도트매트릭스프린터	충격식프린터, Mettler toledo, CN/RS-P26	저울 무게 기록	1	990,000	990,000
49	실험실용 가스발생기	실험실용 가스발생기, Peak scientific, GB/Precision Hydrogen 1	GC 분석을 위한 수소발생기	1	13,200,000	13,200,000
50	실험실용 가스발생기	실험실용 가스발생기, 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(Sonicator), 분석용액 제조(LC 및 LC-MS/MS 분석시 mobile phase 제조, 유도체화 포집용액 제조 등)	1	3,514,000	3,514,000
52	건본기체추출장치 또는 수집장치	가스채집기, Sibata, JP/MP-Σ30KNⅡ, 0.05~0.5L/min	공기 중 가스 채취용	1	2,214,000	2,214,000
53	실험실용 가스발생기	실험실용 가스발생기, 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	회석 등 전처리용	2	291,500	583,000
55	향온항습조	향온항습조, Memmert, DE/HPP260, 256L, 0~70℃	결련담배 등 조화용	1	22,858,000	22,858,000
56	실험실용배기기	실험실용배기기, 제이오텍, EFS-75S-3160HC, 암후드	이동식 배기기	1	2,211,280	2,211,280
57	탁상형 원심분리기	탁상형원심분리기, 한일과학산업, Fleta 4, 4000rpm	시료 전처리용	1	1,900,000	1,900,000

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액(원)
58	흡연시뮬레이터	흡연시뮬레이터, Borgwaldt KC, US/CreSS Pocket, 35×68×70mm	흡연자의 흡연행태분석 및 흡연자별 흡연습관 기록	2	6,930,000	13,860,000
59	실험실용배기기	실험실용배기기, 광동산업, 1800×800×2400 mm	실험용 후드	2	2,563,000	5,126,000
60	향온항습조	향온항습조, 비전과학, VS-9111H-150, 150L	결련담배 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, 수소탱크실린더47L	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, 수소탱크실린더47L	GC 분석용 가스	1	100,000	100,000
66	진공청소기	삼성전자, VN/VS80N8061K W, 핸디/스틱형	흡연실 청소	1	532,860	532,860

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액(원)
1	전기영동장치	타카라 Mupid-exU	DNA 밴드 크기별 분류	1	517,000	517,000
2	향온항습조	memmert HPP260	담배조화	1	20,900,000	20,900,000
3	교반가열판	비전 VS-230HS-D	가열 및 교반을 통해 시료를 균질하게 섞는 장비	1	308,000	308,000
4	분석저울	mettler toledo ME403	시약정량시 사용	1	2,530,000	2,530,000
5	초저온냉동고	한국후리자 CLN-52U	시료 및 시약 보관	1	11,440,000	11,440,000
6	PCR	Biorad BR1851196	분석할 DNA 서열 증폭	1	15,400,000	15,400,000
7	액체질소 보관통	MVE LAB 30	세포동결보관	1	1,760,000	1,760,000
8	역상현미경	올림푸스 CKX53	세포모양 확인	1	8,800,000	8,800,000
9	체세포수 측정기	thermofisher Countess 3 FL Automated Cell Counter	세포수 측정	1	7,293,000	7,293,000
10	탁상형냉장 원심분리기	eppendorf 5425R	시료 내 섞여있는 세포 혹은 단백질 및 DNA 분리(1.5ml)	1	9,647,000	9,647,000
11	소용돌이식 진탕기	비전 KMC-1300V	Western blot의 항체 처리 및 반응	1	231,000	231,000
12	초순수제조기	Merck Milli-Q Direct 5	시약용 증류수 제조	1	13,200,000	13,200,000
13	콤보미량 원심분리기	Biosan FVL-2400N	시약, 시료 등을 균질하고, 튜브 벽면의 시료를 모음	1	640,200	640,200
14	미량원심분리기	Allsheng MINI-6KC	시료 내 물질 분리	1	275,000	275,000
15	아이스메이커	brema GB-902A	실험 수행 시, 시료의 저온유지	1	4,083,700	4,083,700
16	세포해동기	biocision AST-601	동결보관중인 세포 해동	1	6,187,500	6,187,500

연번	품명	실제 품명	용도	수량	단가	금액(원)
17	히팅블럭	대한과학 DH.WHB02100	시료의 열처리	1	524,700	524,700
18	궤도형진탕기	대한과학 DH.WSR00300	Western blot의 항체 처리 및 반응	1	960,300	960,300
19	드라이오븐	BNF코리아 BF-65DOF	멸균 후 건조	1	851,200	851,200
20	마이크로 플레이트 리더기	molecular devices spectra max i3x	세포생존율 및 활성산소 분석	1	59,400,000	59,400,000
21	공기청정기	LG전자 AS351NNFA	실험실 작업 환경 개선	1	2,074,000	2,074,000
22	생물안전 작업대	CHC lab PCHC-777A2-04	시료작업 환경과 실험자 안전확보	1	7,543,000	7,543,000
23	고압멸균기	비전 VS-1221-60	실험시 오염 방지	1	5,280,000	5,280,000
24	냉장고	비전 VS-1302L	시약 보관	1	4,950,000	4,950,000
25	항온수조	비전 VS-1205N-T	세포배양액 온도 유지	1	1,650,000	1,650,000
26	이산화탄소 배양기	비전 VS-9170CT	세포배양	1	6,600,000	6,600,000
27	원심분리기	비전 VS-550	시료 내 섞여있는 용액의 분리(1.5ml)	1	8,800,000	8,800,000
28	진공펌프	비전 VS-97SM,	세포배양 작업 시, 오염방지	1	1,100,000	1,100,000
29	겔도큐멘테이션 시스템	Bio-Rad Chemidoc XRS	단백질 및 DNA 밴드 확인 및 분석	1	41,525,000	41,525,000
30	냉동고	cooing BSF-175N	시약 보관	1	477,620	477,620
31	전기영동장치	Bio-Rad BR1658027FC	전압을 이용하여 단백질 크기별 분류	1	4,726,810	4,726,810
32	이동식공기 압축기	Thomas US/PAB 42T1-10	흡연노출장비에 공기 공급	1	-	-
33	연소분석기	Vitrocell systems DE/VC-10	흡연을 발생하여 세포에 노출	1	-	-

1	담배규제기본협약	담배소비와 흡연을 감소를 위한 보건분야 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 개발개선, 신설 실험실 지원, 담배제품 모니터링 결과에 대한 정보교환 등이 있음
4	ISO17025	국제표준화기구에 의해 제정된 시험소 또는 교정기관의 능력에 관한 일반요구 사항의 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 발암 물질인 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

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	담배특이니트로소아민류
NNN	3-(1-nitrosopyrrolidin-2-yl)pyridine	담배특이니트로소아민류
NAT	N-nitrosoanatabine	담배특이니트로소아민류
NAB	N-nitrosoanabasine	담배특이니트로소아민류
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-페닐머캡투릭산
MHBMA	monohydroxy-3-butenyl mercapturic acid	모노하이드록시 부테닐머캡투릭산
3-HPMA	3-hydroxypropyl mercapturic acid	하이드록시프로필 머캡투릭산
CSE	Cigarette Smoke Extract	담배연기추출물

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
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 잠재적인 유해성분
NMR	Nicotine metabolite ratio	니코틴대사율
CRM	Certified Reference Material	인증표준물질
TobLabNet	Tobacco Laboratory Network	담배실험실네트워크(WHO)
FID	Flame Ionization Detector	불꽃이온화검출기
TCD	Thermal Conductivity Detector	열전도도검출기
DAD	Diode Array Detector	다이오드어레이검출기
IARC	International Agency for Research on Cancer	국제암연구소

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.

2021 - 2022

흡연폐해실험실 운영 성과보고서

발 행 일	2023년 8월
발 행 처	질병관리청
발 행 인	지영미
편집위원장	정영훈
편 집 위 원	김주심, 나경인, 이은지, 이슬기, 정수연, 정용애, 강예지
문 의 처	충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 125 고려대학교의생명공학연구원 202호 건강위해대응과
전 화	담당 강예지 043) 219-2926
팩 스	043) 219-2929

2021 - 2022

흡연폐해실험실

운영 성과보고서



질병관리청
건강위해대응과

