



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2014年 8月
博士學位論文

HPLC-ICP-MS에 의한 국내산
해조류의 비소화학종 분석

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

柳 根 榮

2014年
8月

博士學位論文

H P L C
|
I C P
|
M S
에

의
한

국
내
산
다
소
비

해
조
류
의

비
소
화
학
종

분
석
柳

根

榮

HPLC-ICP-MS에 의한 국내산 해조류의 비소화학종 분석

2014年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

柳 根 榮

HPLC-ICP-MS에 의한 국내산 해조류의 비소화학종 분석

指導教授 金 敬 洙

이 論文을 博士學位 申請論文으로 提出함.






2014年 4月

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

柳 根 榮

柳根榮의 博士學位論文을 認准함

委員長	食品醫藥品安全處	김익혜	
委員	韓國科學技術研究院	백경우	
委員	世界김치研究所	서혜영	
委員	朝鮮大學校	이재준	
委員	朝鮮大學校	김경수	

2014年 6月

朝鮮大學校 大學院

목 차

Abstract	ix
제1장 서 론	1
제2장 연구배경	10
제1절 비소의 특성 및 위해성	10
제2절 국내·외 비소 및 비소 화학종 관리 동향	22
제3절 국내·외 식품 및 해조류 중 비소 및 비소화학종 연구 동향	28
제3장 재료 및 방법	33
제1절 실험재료 및 기기	33
1. 재료	33
2. 시약 및 표준물질	33
3. 기기	34
제2절 실험방법	38
1. 해조류 중 총비소 분석법 연구	38
가. 총비소 분석을 위한 시료 전처리	38
(1) 일반습식분해법	42
(2) Sonication을 이용한 습식분해법	42
(3) Microwave법	42
나. 표준용액 제조	47
다. 검량선 작성	47
라. ICP-MS, OES 기기조건에 의한 총비소 함량 분석	47

마. 분석법 검증	48
2. 해조류 중 무기 및 유기 비소화학종 분석법 연구	51
가. 비소화학종 분석을 위한 시료 전처리	51
(1) 용매에 따른 비소화학종 추출	51
(2) 시간 조건에 따른 비소화학종 추출	54
(3) SPE와 membrane filter의 정제	54
나. 표준용액 제조	55
다. 검량선 작성	55
라. HPLC-ICP-MS에 의한 비소화학종 분리·분석	57
(1) 비소화학종 분리·분석을 위한 이동상 용리시간 조건 비교	58
(2) 이동상 조건에 따른 비소화학종 분리·분석	58
마. 분석법 검증	59
제4장 결과 및 고찰	63
제1절 해조류 총비소 분석법 확립	63
1. 시료 전처리 조건 최적화	63
2. 총 비소 분석조건 최적화	67
3. 해조류의 총 비소 분석법 검증	74
가. Precision(정밀성)	74
나. Linearity(직선성)	74
다. Accuracy(정확성)	74
라. LOD(검출한계), LOQ(정량한계)	74
마. 정도관리 (QA/QC)	78
(1) 내부정도관리	78
(2) 외부정도관리	79
제2절 해조류 중 무기 및 유기비소화학종 분석법 확립	80
1. HPLC-ICP-MS에 의한 비소화학종 분석법	80
가. 시료 전처리 조건 최적화	80

(1) 추출 용매	80
(2) 추출 시간	82
(3) 여과 방법	83
나. HPLC-ICP-MS 기기조건 설정	86
(1) 비소화학종 분리·분석을 위한 이동상 용리시간 조건 설정	86
(2) 비소화학종 분리·분석을 위한 이동상 조건 설정	88
(3) DRC 조건 확립	94
다. 분석법 검증	95
(1) Precision(정밀성)	95
(2) Linearity(직선성)	95
(3) Accuracy(정확성)	95
(4) LOD(검출 한계), LOQ(정량 한계)	95
라. 측정불확도	98
(1) 측정 모델의 설정	98
(2) 측정불확도 요인 파악	98
(3) 측정불확도 결과	99
제3절 해조류 중 총 비소 및 비소화학종 함량	103
1. 해조류의 총 비소 함량	103
가. 김의 총 비소 함량	105
나. 다시마의 총 비소 함량	105
다. 미역의 총 비소 함량	105
라. 모자반의 총 비소 함량	106
마. 툇의 총 비소 함량	106
2. 해조류의 비소화학종 함량	112
제5장 요약	132
참고문헌	136

표 목 차

Table 1. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) substance priority list (Total 275 elements and compounds)	6
Table 2. Classification of International Agency for Research on Cancer (IARC) Group	7
Table 3. List of toxic heavy metals standards for food in various country and institute	8
Table 4. Maximum levels for arsenic in seafood for various countries	9
Table 5. Chemical names, chemical abstract service (CAS) numbers, synonyms, and molecular formulae of arsenic and arsenic compounds	11
Table 6. Acute and chronic health effects in people exposed to arsenic	21
Table 7. Heavy metal pollution of soil in Korea	23
Table 8. Arsenic standard of Korean food standards Codex	26
Table 9. General and specific limits for arsenic in food products of UK	27
Table 10. Dietary exposures to total arsenic (19~24 year young males)	29
Table 11. The number of seaweeds for total arsenic and arsenic speciation	36
Table 12. Sampling region for analysis	37
Table 13. Comparison of institutional microwave digestion conditions for the analysis of total arsenic	41
Table 14. Operating conditions of ICP-OES	49
Table 15. Operating conditions of ICP-MS	50
Table 16. Operating conditions of HPLC-ICP-MS	60
Table 17. Recovery test of the wet digestion method	65
Table 18. Total digestion time of sonication with the wet digestion method	66
Table 19. Some common plasma/matrix/solvent-related polyatomic spectral interferences seen in ICP-MS	70

Table 20. Wavelengths, estimated instrument detection limits, and recommended calibration	71
Table 21. On-line method interelement spectral interferences arising from interferants at the 100 mg/L level	72
Table 22. Potential interferences analyte concentration equivalents arising from interference at the 100 mg/L level	73
Table 23. Validation of analytical methods followed via linearity, LOD, LOQ, precision and accuracy measurements for total arsenic	75
Table 24. Validation of analytical methods followed via analysis of CRM	76
Table 25. Internal quality control data	78
Table 26. Result of laboratories participated in FAPAS	79
Table 27. Recovery test of arsenic species by sonication time	82
Table 28. Comparison of SPE and membrane filter	85
Table 29. Comparison for each elution time of mobile phase solvents	87
Table 30. Validation of analytical methods followed via linearity, LOD, LOQ, precision and accuracy measurements for arsenic species	97
Table 31. Measurement uncertainty factor for seaweeds	100
Table 32. Moisture content of seaweed species	103
Table 33. Average contamination level of arsenic in seaweeds	109
Table 34. Contamination value of arsenic in seaweeds for each level	110
Table 35. Summary of available data on total arsenic concentrations in food products	111
Table 36. Average value of arsenic species in seaweeds	115
Table 37. Summary of available data on inorganic arsenic concentrations in food products	116
Table 38. Concentration of arsenic species in laver	123
Table 39. Concentration of arsenic species in sea tangle	125
Table 40. Concentration of arsenic species in sea mustard	127

Table 41 Concentration of arsenic species in gulf weed 130
Table 42. Concentration of arsenic species in hijiki 131

그림 목 차

Fig. 1. World production of farmed aquatic plant (algae) by major species or species group	5
Fig. 2. Structures of the most common arsenic compounds in the marine environment ...	12
Fig. 3. Chemical structure of most common arsenosugars found in seaweeds ...	14
Fig. 4. Challenger's pathway	15
Fig. 5. Proposed biosynthetic pathway for arsenosugars from arsenate in algae ...	15
Fig. 6. Possible pathways for the biogenesis of arsenobetaine	17
Fig. 7. Structure of arsenobetaine and glycinebetaine	17
Fig. 8. Metabolic pathways of inorganic arsenic in mammals	20
Fig. 9. Analysis method for wet digestion	44
Fig. 10. Analysis method for wet digestion with sonication	45
Fig. 11. Analysis method for microwave digestion	46
Fig. 12. Analysis method of arsenic speciation in seaweeds by filtration	53
Fig. 13. Analysis method of arsenic speciation in seaweeds by SPE	56
Fig. 14. Formulas and pK_a of principal arsenic species	61
Fig. 15 HPLC-ICP-MS system	62
Fig. 16. DRC system in ICP-MS	62
Fig. 17. ICP-OES and ICP-MS detection limit	69
Fig. 18. Linearity of arsenic standards	77
Fig. 19. The result of arsenic (FAPAS)	79
Fig. 20. Extraction efficiency of arsenic compounds by solvent	81
Fig. 21. The chromatogram of comparison for each elution time of mobile phase solvents (by gradient)	87
Fig. 22. Chromatogram of six arsenic species using a 'Mobile I' by gradient	89
Fig. 23. Chromatogram of blank using a 'Mobile I' by gradient	89

Fig. 24. Accumulation of As(V) according to elution time	90
Fig. 25. Chromatogram of blank using a 'MobileII' by gradient	91
Fig. 26. Chromatogram of six arsenic species using a 'MobileII' by isocratic	91
Fig. 27. Calibration curve of six arsenic species	92
Fig. 28. Chromatogram of six arsenic species using a 'MobileIII' separating mixed standard solution	93
Fig. 29. Chromatogram of blank using a 'MobileIII' by gradient	93
Fig. 30. Overview of the uncertainty estimation procedure	100
Fig. 31. Uncertainty measurement of sea mustard for seaweeds	102
Fig. 32. Comparison of average contamination level of total arsenic in seaweeds ..	108
Fig. 33. Arsenic speciation of seaweeds	114
Fig. 34. Chromatogram of arsenic species in laver	120
Fig. 35. Chromatogram of arsenic species in sea tangle	120
Fig. 36. Chromatogram of arsenic species in sea mustard	121
Fig. 37. Chromatogram of arsenic species in gulf weed	121
Fig. 38. Chromatogram of arsenic species in hijiki	122

ABSTRACT

Application of HPLC-ICP-MS for Arsenic Speciation in Seaweeds from South Korea

Ryu Keun Young

Advisor : Prof. Kim, Kyong Su. Ph.D.

Department of Food and Nutrition

Graduate School of Chosun University

Toxic heavy metals are threatening human health and therefore have been the subject of critical control. Seaweeds are exposed to heavy metals pollution in the sea, and at times may be potentially hazardous to human health. Therefore proper monitoring the contents of toxic heavy metals in sea foods such as seaweeds are required on regular basis.

Arsenic has been ranked as significant risk substance by Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Also based on sufficient evidences, the International Agency for Research on Cancer (IARC) suggested that inorganic arsenic compounds are skin and lung carcinogens in humans (Group 1).. However, in spite of such risks from arsenic both national and international standards and tolerable limits for majorly consumed foods such as seaweeds products are not optimized. Arsenic toxicity depends on the chemical form and its solubility and varies among animal species and with route of administration. So, it is also difficult to determine the toxicity from total arsenic content for

seafoods like seaweeds without speciation. Therefore, development of analytical method for total arsenic and arsenic species in high arsenic concentrated foods like seaweeds is very much important.

To analyze total arsenic by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), different acid digestion methods of wet, wet-sonication and microwave were followed for sample preparation. For extraction methanol, ethanol and HNO₃ solvents, for purification membrane filter and SPE cartridge and for separation mobile phase and anion-exchange column were applied and compared before analysis by HPLC-ICP-MS to reach the optimal conditions for arsenic speciation. The percentage recoveries of all digestion method were 96.7 to 99.3%. showing that all methods were appropriate for decomposition of the sample. However, microwave digestion method was the more optimal method, since the amount of acid solution and time used were lower and the possibility of external contamination during the decomposition was minimal.

The ICP-MS technology has the advantages of selective removal of interfering substances at DRC mode and high sensitivity of MS for analysis of total arsenic contents. oxygen was chosen as the reaction gas with DRC mode because it reacts readily with As⁺ to form AsO⁺ (m/z=91). Samples should be extracted for analysis of the arsenic species without changing the form of the analytes. In order to compare the extraction efficiency, various solvents such as H₂O, 50% methanol and 30% ethanol; in 1% HNO₃ were applied to seaweeds. In each extraction solvent, the CRM (NRCC, DORM-2) was added to know the recovery of the certified values. The results from the analyses using HPLC-ICP-MS suggested that, 50% methanol (1% HNO₃) were the best solvents for sample extraction purposes.

The use of sample extracts for arsenic speciation through HPLC-ICP-MS, it cause problems like clogging of the column and the sample injection device and detector contamination. To prevent this phenomenon, the process of filtering is

required. In this study, the comparative experiment was performed for verification of the filtering efficiency using the filtered CRM (NMIJ 7503-a) extracts with membrane filter and Oasis MAX cartridge (6 cc). Recovery of samples with SPE method were As(99.4%), DMA(103.1%) and As(101.8%) and with membrane filter method the results were not substantially different i.e. As III(91.8%), DMA(103.0%) and AsV(104.5%). Therefore, both methods of membrane filter and SPE, could be used alternatively. Among the five arsenic species except for arsenobetaine (that is a zwitterion) has a range of different pH, depending on the form of the compound. Therefore in the alkaline mobile phase as anion, these has a range of dissociation constants suitable for anion-exchange column for separation. The gradient elution was controlled through mobile solution [A solution; ammonium bicarbonate (2 mM, pH 8.0), B solution; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)] to avoid duplication of detected peak on the chromatogram was used.

A total of 348 seaweed samples of 5 different species from around South Korea were collected and analyzed for total arsenic by ICP-MS. And among them, 200 samples were analyzed for determination of arsenic speciation by HPLC-ICP-MS. The total arsenic content was determined from seaweed samples by ICP-MS and the results for laver (*Porphyra tenera*), Sea tangle (*Laminaria japonica*), sea mustard (*Undaria pinnatifida*), hijiki (*Hizikia fusiforme*), and gulf weed (*Sargassum fulvellum*) in a raw sample basis were 2.07, 3.07, 1.84, 4.49, and 6.48 mg/kg, respectively. For arsenic speciation, AsB and DMA were detected in laver, sea tangle and sea mustard and AsB (more than 85%) were the dominant species. But the AsC (as organic arsenic), AsIII and AsV (as inorganic arsenic) were not identified. However, inorganic arsenics (AsV and AsIII) and organic arsenics (DMA) were confirmed in gulf weed and hijiki samples, and AsV is dominant arsenic species in sargassum plants as 92.5% and 82.2%, respectively.

제1장 서론

중금속은 인간의 건강을 위협하는 물질로 간주되면서 중요한 관리 대상이 되고 있다. 그러나 이러한 중금속들은 그 위험성 때문에 어떤 특정한 곳에 격리되어 있거나 인간과의 접촉이 차단된 채 존재하는 것이 아니라 지각의 운동, 지반의 침식 작용, 화산활동 등을 통해 우리가 살아가는 자연환경에서 공기, 물, 토양 그리고 식품 등에 자연발생적으로 일정 농도 존재하며, 인간은 항상 이러한 환경에 노출되어 있다(1, 2). 더욱이 산업혁명 이후 광산개발, 석유화학공장에서의 배출, 농약과 살충제의 사용, 산업폐기물 및 도시 쓰레기에서의 유출 등 인간의 인위적인 활동 영역이 늘어나면서 암석이나 지각 등 내부에 여러 화합물 형태로 존재하던 각종 중금속들이 다량 배출되어 대기 및 농업환경 등을 오염시키고 있으며, 이러한 활동들이 결국 인간을 포함한 모든 생태계에 중대한 위협요소가 되고 있다(3, 4).

중금속의 위험성은 생물농축이라는 과정을 통해 큰 문제로 작용한다. 앞에서 언급한 자연발생적 이거나 인위적인 중금속의 배출은 물이라는 매개체를 통해 생태계의 1·2차 소비자인 육상·해양 생물들에 축적되고 이를 상위 포식자(중간 소비자)와 인간(최종 소비자)이 순차적으로 섭취하게 된다. 이러한 먹이사슬과 연관된 일련의 과정을 통해 생물농축이 일어나 인간의 체내에 잔류, 축적됨으로써 인간의 생리활성을 저해시키고, 간, 신장 등에 여러 가지 질병이나 암을 일으키는 등 위대한 영향을 끼치게 됨으로써 환경오염물질 중 가장 중요한 관리의 대상이 되고 있다(5). 특히 미국의 독성물질질병등록국(Agency for toxic substances and disease registry; ATSDR)과 환경보호국(Environmental protection agency; EPA)은 슈퍼펀드(Superfund)라 불리는 포괄적환경대응책임보상법(Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act, CERCLA, 1980)에 위험물질우선순위 목록(Priority list of hazardous substances; Substance priority list; SPL)이라는 중금속 및 독성물질 등 인간에 위해한 물질들의 단순한 “독성의 세기”가 아닌 미국의 국가우선순위목록(National Priority List; NPL)의 인체 노출 가능성, 발생빈도, 독

성 등 여러 조건의 고려하여 우선순위를 정해놓고 중요하게 관리하고 있다(6).

1974년 FAO/WHO 합동회의에서는 감시대상이 되는 화학적 오염물질 중 특히 중금속 오염물질로서 비소(As), 납(Pb), 수은(Hg), 카드뮴(Cd) 등을 우선순위로 다루면서, 세계 각국에서는 중금속에 의한 식품오염 현황을 조사하고 방지대책을 수립하기 시작하였으며, 이러한 사안에 대하여 UNEP/FAO/WHO (United Nations Environment Programme/ United Nations Food and Agriculture Organization/ World Health Organization)는 식품 오염에 관한 Monitoring Program (GEMS/FOOD)을 시행하여 Codex Alimentarius Commission에서 제정한 기준안과 연계하여 변화하는 국제적인 식품 오염 경향을 제시하고 있으며, 각 나라마다 상이한 기준 및 규격으로 인한 통상마찰 해결과 관련된 국제식품무역(International Food Trade)에 도움을 주고 있다.

해조류(seaweed)는 전 세계적으로 바다가 있는 곳 어디에서나 서식하고 있는 수산물이다. 전 세계적으로 약 6,000종, 식용으로는 150여종이(7), 한국에서만 약 500종이 발견되고, 식용으로는 50여종이 이용될 만큼 많은 종과 막대한 자원량이 파악되고 있어, 향후 육상생물자원을 대체할 중요한 식량자원으로 주목받고 있다(8). 전 세계 해조류 생산량은 1990년대에 매년 평균 9.5%씩 증가하였고, 2000년대에는 7.4%씩 증가하여 1990년 380만 톤에서 2010년에 1,900만 톤으로 증가하였으며, 현재 연간 생산액으로는 약 57억 달러로 추정되고 있다. 생산되는 해조류 중 다시마, 유케마, 꼬시래기, 김, 미역과 같은 몇몇 종류의 특정 해조류가 전체 생산량의 약 83.7%를 차지하고 있다(Fig. 1). 또한, 단 31개국만이 해조류를 생산하고 있으며, 그 중 중국을 포함한 8개국에서 전체의 99.6%가 생산되고 있다. 나라별 생산량을 보면 중국이 1,109 만톤으로 전체의 58.4%를 차지하였으며, 그 뒤를 인도네시아 20.6% (391 만 톤), 필리핀 9.5% (180 만톤), 한국 4.7%(901,700 톤), 북한 2.3% (444,300 톤), 일본 2.3% (432,800 톤), 말레이시아 1.1% (207,900 톤) 그리고 탄자니아가 0.7%(132,000 톤)를 차지하였다(9).

해조류는 바다의 채소(sea vegetable)로서 전통적으로 동아시아 지역인 한국, 중국, 일본에서 여러 음식의 재료로 이용되어 왔으며, 말레이시아나 인도네시아와 같은 동남아시아의 열대지역에서도 샐러드의 재료로서 이용되어 왔다. 그러나 유럽과

같은 서양에서는 해조류를 'seaweed'라고 하여 단지 바다에 서식하는 식물로 인식하였으며, 일부 해안가 지역에서 음식이나 가축의 사료 용도로만 이용되어졌다. 전세계적으로 식품, 가공제품 등의 원료로 이용되는 주요 해조류는 김, 미역, 다시마, 툇, 큰실말, 모자반, 그리고 덜스(바닷말), 유케마코토니, 바다포도(*Caulerpa lentillifera*) 등 이다(10).

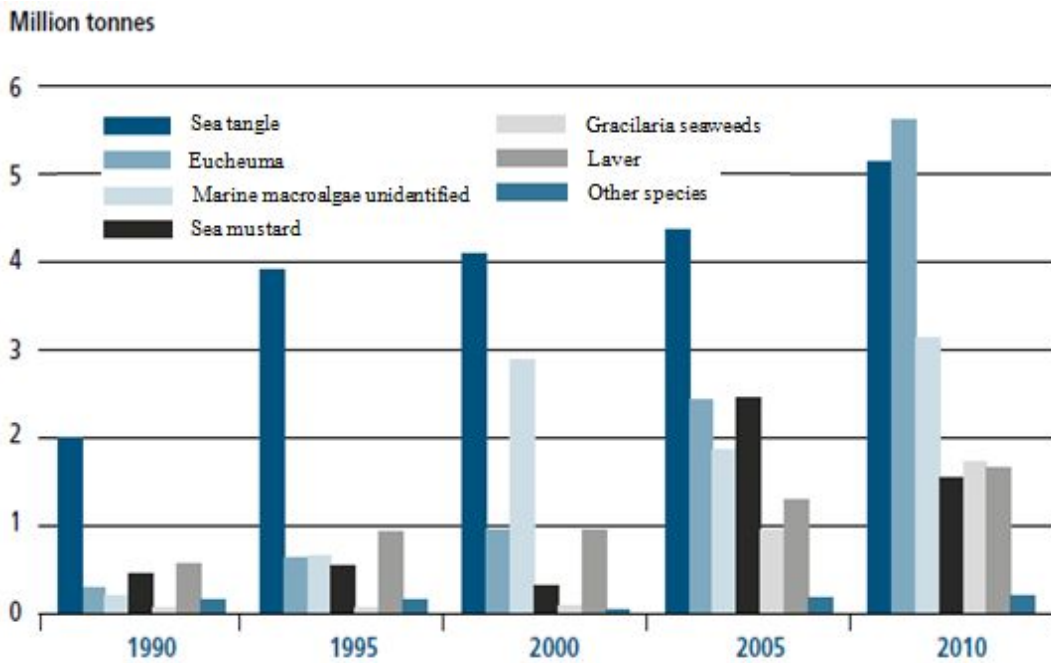
그러나 산업화가 진행되고 경제가 성장하면서 사람들은 건강과 장수에 대한 관심이 증가하였고, 특히 육식위주의 식사를 통해 성인병이 큰 문제로 대두되고 있는 서양인들에게 아시아 국가의 장수는 하나의 동경의 대상이 되면서 아시아의 식습관과 음식에 중요한 관심을 가지게 되었다. 해조류는 다른 식용식물 보다 풍부한 무기질을 함유하고 있어 우리 몸에 필요한 필수 무기질이나 미량 원소의 충족을 위해 식품 보조제로 추천된다(11). 또한 식품학적으로 해조류는 육상과 달리 염분의 과다, 높은 기압, 그리고 공기 중 보다는 희박한 산소 등의 열악한 환경에서 자라나는 특수성을 가지고 있어 새로운 물질의 존재 가능성이 기대되고 있으며(8), 실질적으로 항산화, 항균, 항암, 항응고, 항염증 등 여러 가지 활성이 연구되어지고 밝혀지면서 현재 많은 생리활성 물질들이 제품화되고 있다(12-16). 이러한 여러 가지 해조류 우수성과 이용 가능성을 인식하게 되면서 그 소비가 점차 증가하고 있다(10).

하지만 해조류가 사람들에게 건강식품으로 그리고 산업에서는 식품 및 의약품의 원료로써 이용이 증가하고 있는 상황에서, 해조류의 성장 특성상 자연발생적인 지각활동과 인위적인 인간의 생산활동에 의해 여러 형태의 화학종과 다양한 농도 범위의 중금속에 직·간접적으로 노출되는 바다라는 환경에 둘러싸여 있어 항상 잠재적 위해성을 가지고 있다. 특히 비소 함량의 경우 야채, 곡류, 육류 등의 육상 동·식물에서는 0.01~1.0 mg/kg의 범위로 존재하나, 해조류는 10~60 mg/kg의 비교적 높은 농도로 존재하고 있어 다른 중금속 보다 중요한 위해요인이 되고 있다(17-19). 특히 비소는 JECFA(72번째 회의)의 '식품 중 특정 오염물질의 평가' 보고서에서 그 위해성을 규정하고 있으며(20), 미국의 EPA와 ATSDR에서는 비소를 위험물질우선순위목록(SPL)에 가장 첫 번째로 올려놓을 만큼 중요한 관리 대상이 되고 있다(Table 1). 또한 국제암연구소(IARC)에서는 비소중 무기비소를 1급 발암물

질로 규정하고 있다(21, Table 2).

현재 우리나라 식품공전(22)의 식품원료기준에서 규제하고 있는 중금속은 비소, 카드뮴, 총수은, 메틸수은 및 납 등 5가지 항목이 있으며, 유럽이나 호주 등에도 비소를 포함한 여러 중금속들이 규제 대상이 되고 있다(Table 3). 그러나 현재 식품 중 비소에 대한 기준 규격은 캡슐류에서 1.5mg/kg 이하, 식염에서는 천일염 등 모든 제품에 대해 0.5 mg/kg 이하 그리고 가공식품에서는 식용유지류에서 0.1 mg/kg 이하로 설정되어 관리되고 있을 뿐(Table 4), 해조류 중의 비소함량에 대한 기준 및 규격은 아직까지 정해지지 않고 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는 수산물 중 국내에 유통되고 있는 다소비 해조류를 대상으로 총비소 및 비소화학종의 분리·분석을 위해 ICP-MS와 HPLC-ICP-MS의 최적 분석조건을 설정하고, 실질적인 함량을 조사 하여 우리가 섭취하는 해조류의 안전성 기준 및 섭취 허용량 설정에 기초 자료를 제공하고자 한다.



Source : FAO (2012)

Fig. 1. World production of farmed aquatic plant (algae) by major species or species group.

Table 1. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) substance priority list

2011 Rank	Substance Name	Total points	2007 Rank	CAS RN
1	Arsenic	1665.5	1	007440-38-2
2	Lead	1529.1	2	007439-92-1
3	Mercury	1460.9	3	007439-97-6
4	Vinyl chloride	1361.1	4	000075-01-4
5	Polychlorinated biphenyls	1344.1	5	001336-36-3
6	Benzene	1332.0	6	000071-43-2
7	Cadmium	1318.7	7	007440-43-9
8	Benzo(A)pyrene	1305.7	9	000050-32-8
9	Polycyclic aromatic hydrocarbons	1282.3	8	130498-29-2
10	Benzo(b)fluoranthene	1252.4	10	000205-99-2
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
274	Thallium	524.7	274	007440-28-0
275	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran	524.0	275	072918-21-9

Source : ATSDR

Table 2. Classification of IARC Group

Group 1	<p><i>Carcinogenic to humans</i> - sufficient evidence of carcinogenicity in humans (Arsenic and inorganic arsenic compounds and 112 more items in addition)</p>	113 agents
Group 2A	<p><i>Probably carcinogenic to humans</i> - limited evidence of carcinogenicity in humans and sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals (Acrylamide and 65 more items in addition)</p>	66
Group 2B	<p><i>Possibly carcinogenic to humans</i> - limited evidence of carcinogenicity in humans and less than sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals (Acetaldehyde and 284 more items in addition)</p>	285
Group 3	<p><i>Not classifiable as to its carcinogenicity to humans</i> - inadequate in humans and inadequate of limited in experimental animals (Acenaphthene and 504 more items in addition)</p>	505
Group 4	<p><i>Probably not carcinogenic to humans</i> (Caprolactam)</p>	1

Source : IARC

Table 3. List of toxic heavy metals standards for food in various country and institute

MRLs	Korean Food Standards Codex	WHO/FAO	US FDA	FSANZ	EFSA
Arsenic	○			○	○
Cadmium	○	○	○	○	○
Mercury	○		○	○	○
Methyl mercury	○	○	○		
Lead	○	○	○	○	○
Chromium					
Nickel					
Cooper					
Selenium					
Tin				○	
Reference	Tin are only caned food Aluminum cans are excluded	-		Tin are only caned food	EU standard

MRLs: Maximum Residue Limits

Source : MFDS 2012 (23)

Table 4. Maximum levels for arsenic in seafood for various countries
(Unit : mg/kg)

Food		China(24)	Japan(23)	FSANZ(25)	CODEX(26)
		Total Inorganic	Total	Inorganic	Total
Grains	Rice	0.15			
	Flour	0.1		1(total)	
	Course grains	0.2			
Vegetables	Potato		1.0		
	Cucumber		1.0		
	Tomato	0.05	1.0		
	Spinach		1.0		
Fruit	Peach		1.0		
	Summer orange		1.0		
	Strawberry	0.05	1.0		
	Grape		1.0		
Meat	0.05				
Egg	0.05				
Milk	Powder and Fresh	0.25			
Water	Natural mineral water				0.01
Pulses		0.1			
Liquor		0.05			
Seafoods	Fish	-		2	
	Crustacea	-		2	
	Molluscs	-		1	
	Algae (Seaweed)	1.5(dry)		1	
	shells, shrimps and crabs	0.5(fresh)		-	
	Shells, shrimps and crabs	1.0(dry)		-	
	Other aquatic foods	0.5(fresh)		-	
Edible fats	0.1	-			0.1
Fruit juice and pulp	0.2	-	0.05(refreshi ng drink)		0.2
Coco	Coco butter	0.5	-		0.5
	Chocolate	0.5	-		1.0
	Other coco products	1.0	-		0.5
Salt	Food grade				0.5
Sugar		0.5	-		

제2장 연구배경

제1절 비소의 특성 및 위해성

비소는 주기율표상의 질소와 인이 속해있는 5족 원소로 화학적으로는 금속으로 분리되어 있지만 금속과 비금속의 성질을 모두 가지고 있다. 또한 같은 족의 필수 원소들과 여러 면에서 유사한 화학적 특성을 가지고 있으며, 이러한 유사성이 다양한 해양생물에 높은 농도의 비소가 존재하는 이유로 보여 지고 있다(27).

비소 화합물들은 대부분 흰색 또는 무색으로 냄새나 맛을 가지고 있지 않으며, 파괴되지도 않고 가열에 의해 증발하지도 않는 성질을 가지고 있다. 비소 원소는 일반적으로 α -결정 금속성 형태로 존재하는 철회색의 부서지기 쉬운 고체이나, 비소는 환경에서 여러 가지 형태의 화합물로 존재하며(Table 5, Fig. 2), 결합된 물질에 따라 무기비소(산소, 염소 그리고 황과 같은 원소와 결합된 형태)와 유기비소(탄소 등과 결합된 형태)로 존재한다.

비소는 화합물상태에서 일반적으로 pH와 Eh에 따라 -3, 0, +3 그리고 +5와 같은 3가지 산화상태 중 한 가지 형태로 존재하며(28), 산화·환원 조건에 따라 환원조건에서는 산화상태가 -3과 +3인 원자가, 산화조건에서는 산화상태가 +5인 원자가 안정된 형태로 존재한다(29). 이러한 이유로 생물과 식품에서 발견되는 대부분의 비소화합물들(arsenate, dimethylarsinate, arsenobetaine, arsenosugars 등)은 산화상태가 +5인 비소를 포함하고 있다.

비소는 우리 주위 환경에서 대부분 무기형태로 존재한다. 공기 중에는 주로 무기미립자[As(III)와 As(V)가 혼합된, 5가 형태가 주도적] 형태로 존재하며, 음용수(지표수, 지하수)에서도 주로 무기비소 형태로 존재한다(30). 무기비소는 지각 활동에 의해서 토양과 바위 등 특히 납이나 구리와 결합된 광석이나 무기물질 등으로 부터 자연적으로 발생된다. 또한 인위적인 인간의 활동에 의해 이러한 광석들이 용광로에서 가열되어지면 미세먼지 형태인 삼산화비소(As_2O_3)가 생성된다.

Table 5. Chemical names, chemical abstract service (CAS) numbers, synonyms, and molecular formulae of arsenic and arsenic compounds

Chemical name	Synonyms	Formula
Arsenilic acid	Arsonic acid, (4-aminophenyl)-	$C_6H_8AsNO_3$
Arsenic	Metallicarsenic	As
Arsenic(V) pentoxide	Arsenic oxide [As_2O_5]	As_2O_5
Arsenic(III) sulfide	Arsenic sulfide [As_2S_3]	As_2S_3
Arsenic(III) trichloride	Arsenic chloride [$AsCl_3$]	$AsCl_3$
Arsenic(III) trioxide	Arsenic oxide [As_2O_3]	As_2O_3
Arsenobetaine	Arsonium, (carbosymethyl) trimethyl-, hydroxide, inner salt; 2-(trimethylarsonio)acetate	$C_5H_{11}AsO_2$
Arsine	Arsenic hydride	AsH_3
Calcium arsenate	Arsenic acid [H_3AsO_4] calcium salt (2:3)	$(AsO_4)_2 \cdot 3Ca$
Dimethylarsinic acid	Cacodylic acid	$C_2H_7AsO_2$
Lead arsenate	Arsenic acid [H_3AsO_4], lead (2+) salt (1:1)	$HAsO_4 \cdot Pb$
Methanearsonic acid, disodium salt	Arsonic acid, methyl-, disodium salt	$CH_3AsO_3 \cdot 2Na$
Methanesrsonic acid, monosodium salt	Arsonic acid, methyl-, monosodium salt	$CH_3AsO_3 \cdot Na$
Potassium arsenate	Arsenic acid [H_3AsO_4], monopotassium salt	$H_2AsO_4 \cdot K$
Potassium arsenite	Arsenous acid, potassium salt	$AsO_2 \cdot K$
Sodium arsenate	Arsenic acid, [H_3AsO_4], monosodium slat	$H_2AsO_4 \cdot Na$
Sodium arsenite	Arsenous acid, sodium salt	$AsO_2 \cdot Na$
Soduim cacodylate	Arsinic acid, dimethyl-, sodium salt	$C_2H_6AsO_2 \cdot Na$

Source : IARC Monographs

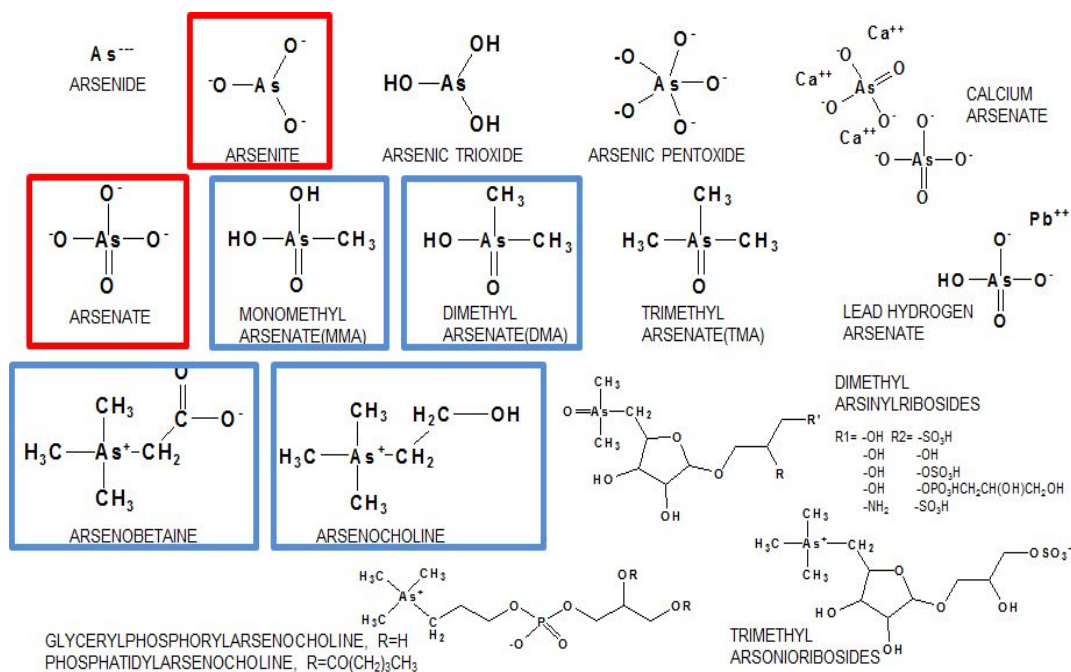
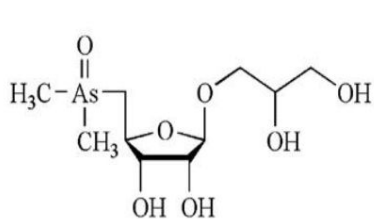


Fig. 2. Structures of the most common arsenic compounds in the marine environment.

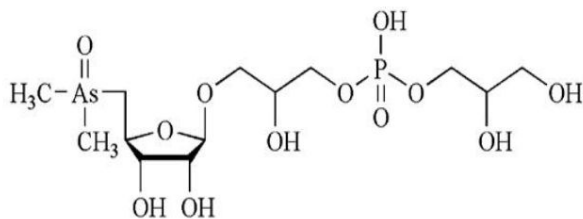
비소는 이런 자연발생적이거나 인위적인 다양한 활동에 의해 공, 물 등과 같은 자연환경 그리고 그 환경에 노출되어 있는 식품(음용수 포함) 등에 일정 농도로 존재한다. 결국 인간은 이러한 주위환경에 항상 노출되어 있으며, 특히 식품은 인체에 유입되는 비소의 가장 큰 공급원이다(2). 우리가 생활하는 일상적인 대기 환경에서의 비소 농도는 지역마다 차이가 있으며, 도시 외 지역의 경우 $0.02\sim 4\text{ ng/m}^3$, 도시지역에서는 $3\sim 200\text{ ng/m}^3$ 의 범위로 존재한다. 그리고 해수와 담수에는 평균적으로 $1\sim 2\text{ }\mu\text{g/L}$ 의 농도로 존재하며, 지각에는 지역에 따라 차이는 있지만 평균 5 mg/kg 의 농도로 존재한다(31). 무엇보다 식품은 우리의 생명유지에 가장 밀접한 관계가 있는데 이들이 비소의 가장 큰 공급원이 되고 있으며, 야채, 곡류, 육류 등에 $0.01\sim 1.0\text{ mg/kg}$ 의 농도로 존재하고, 해조류에는 $10\sim 60\text{ mg/kg}$ 의 범위로 상당히 고농도로 존재한다(17-19).

해조류에는 대부분 산소가 결합된 형태인 oxo-arsenosugar glycerol (oxo-OH), phosphat (oxo- PO_4), sulfonate (oxo- SO_3), sulfate (oxo- SO_4) 등의 dimethyl arsinylribosides와 미량의 trimethyl arsinylribosides 그리고 황이 결합된 thio-dimethylarsinoyl acetate가 arsenosugar로서 총비소의 대부분을 차지하는 주요 비소화학종으로 존재한다(32, 33, Fig. 3). 이 유기비소종은 비소의 생화학적 순환의 핵심 중간체이며, AsB의 전구체로 여겨진다.

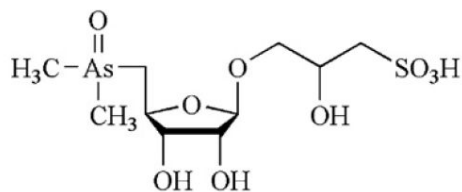
Arsenosugar의 생성에는 phosphate (인산염)와 arsenate (비산염)의 유사성이 작용한다. 해조류는 성장에 필요한 필수 인산염을 해수에서 얻기 위해 막수송 시스템(membrane transport system)을 가지고 있지만, 해수에 존재하는 영양성분인 phosphate와 주요 비소형태인 arsenate를 구별하지 못하고, 인산염 흡수 메커니즘(phosphate uptake mechanism)에 의해 arsenate가 흡수된다. 해조류는 이렇게 흡수된 비소의 독성을 제거하기 위해 탈공역 산화적 인산화반응(uncoupling oxidative phosphorylation; 산소흡수를 방해하지 않고 산화적 인산화만을 저해하는 과정)에 의해 세포가 손상되기 전 해독화를 위해 arsenosugar로 변환시켜 축적한다. 이러한 생합성 경로는 미생물에 의한 비소의 메틸화경로(methylation pathway)를 기반으로 제안되었으며(34, Fig. 4), 이 메틸화경로의 세번째 단계에서 methylation 대신 adenylation이 일어나며, 그 후 glycosidation을 거쳐 arsenosugar가 생성된다(35, Fig. 5).



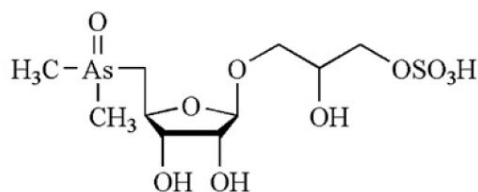
Oxo-arsenosugar glycerol
oxo-OH



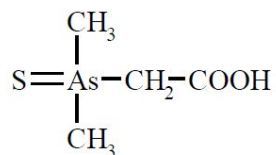
Oxo-arsenosugar phosphate
oxo-PO₄



Oxo-arsenosugar sulfonate
oxo-SO₃



Oxo-arsenosugar sulfate
oxo-SO₄



Thio - DMAA

Fig. 3. Chemical structure of most common arsenosugars found in seaweeds (36).

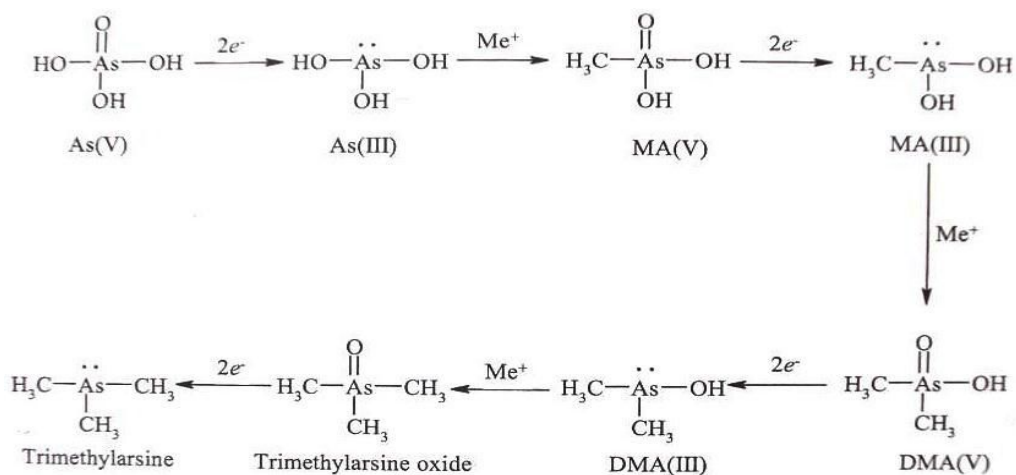


Fig. 4. Challenger's pathway (34).

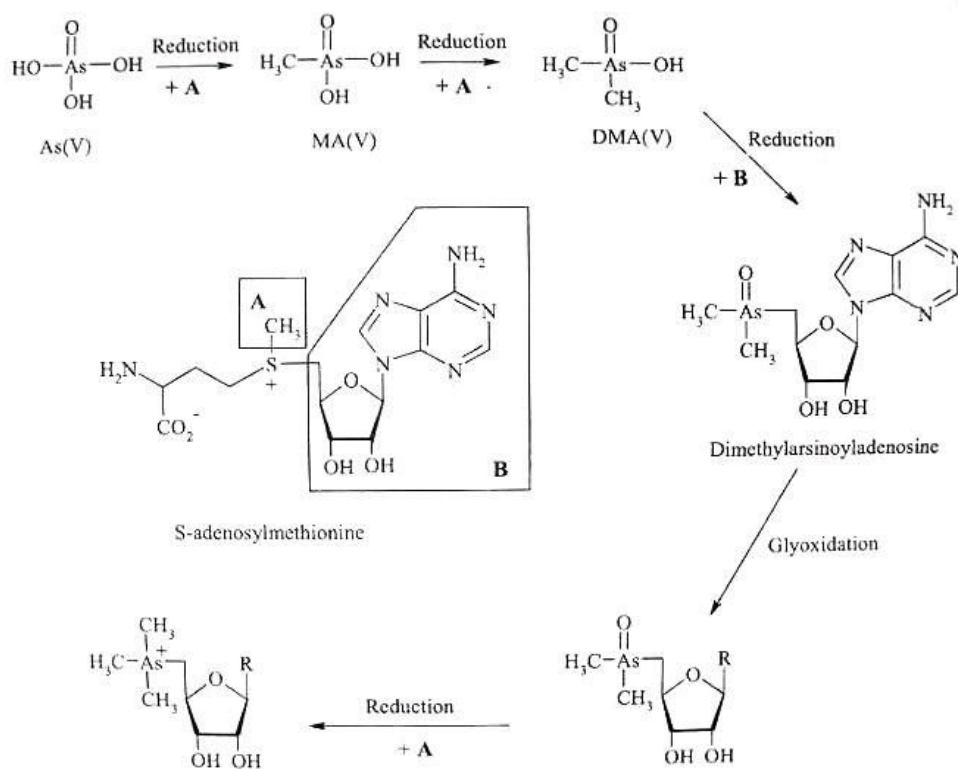


Fig. 5. Proposed biosynthetic pathway for arsenosugars from arsenate in algae (37).

해조류에는 주요 비소화합종인 arsenosugar 뿐만 아니라 다양한 형태의 유기비소 화합물들이 존재한다(Fig. 2).

Methylarsonic acid (MMA)와 dimethylarsinic acid (DMA)는 생체내 변화(biotransformation)에 의해 생성되는 비소 분해산물이며(38), arsenocholine (AsC)은 일반적으로 해양생물에서 미량성분으로 존재하는 유기비소로서, arsenosugar와 같이 해양생물에서 AsB의 대사 전구체로, 어류에 AsC을 급이 했을 때 즉시 AsB로 생물학적 변화가 일어난다는 것이 실험을 통해 확인되었다(39). Oxo-dimethylarsenoethanol (oxo-DMAE)은 2005년 해양시료에서 처음으로 분리되었으며(40), tetramethylarsonium ion (TETRA)은 연체류의 주요 비소종이지만 대부분의 해양생물에서 미량으로 발견된다(41).

Arsenobetaine은 1977년 닭새우 (*Panulirus Cygnus*)에서 최초로 분리된 유기비소종으로(42) 포유류의 체내에서 대사되지 않으며, 섭취 후 몇 시간 안에 소변으로 배설되기 때문에 인체 내에서 어떠한 위험도 일으키지 않는다(43). AsB은 해양생물에 존재하는 수용성 비소화합종의 80% 이상을 차지하는 주요 비소종이지만 바닷물에는 존재하지 않는 형태로(42) 해조류에서 발견되어지며, 어류에서는 해조류에 존재하는 arsenosugar의 섭취에 의해 생성된다고 여겨지고 있다.

AsB의 몇 가지 생성경로는 다음과 같이 제안되고 있다; (a) oxo-arsenosugar가 산화와 methylation을 거쳐 AsB로 변환, (b) 주요 대사 중간체인 AsC이 산화에 의해 AsB로 변환(Fig. 6 I), (c) 아미노산 합성에 기초를 두고 있으며, DMA(III)과 glyoxylic acid 사이의 arsenylation에 의해 변환(Fig. 6 II).

또한 AsB은 어류에 존재하는 비소화합종 중 대부분을 차지하는 유기비소 화합물로 어류가 체내의 삼투압 균형을 유지하기 위해 사용하는 삼투질 glycinebetaine $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-]$ 과의 구조적 유사성(Fig. 7)으로 어류에 상대적으로 높은 농도로 존재한다고 보고 있다(29, 44).

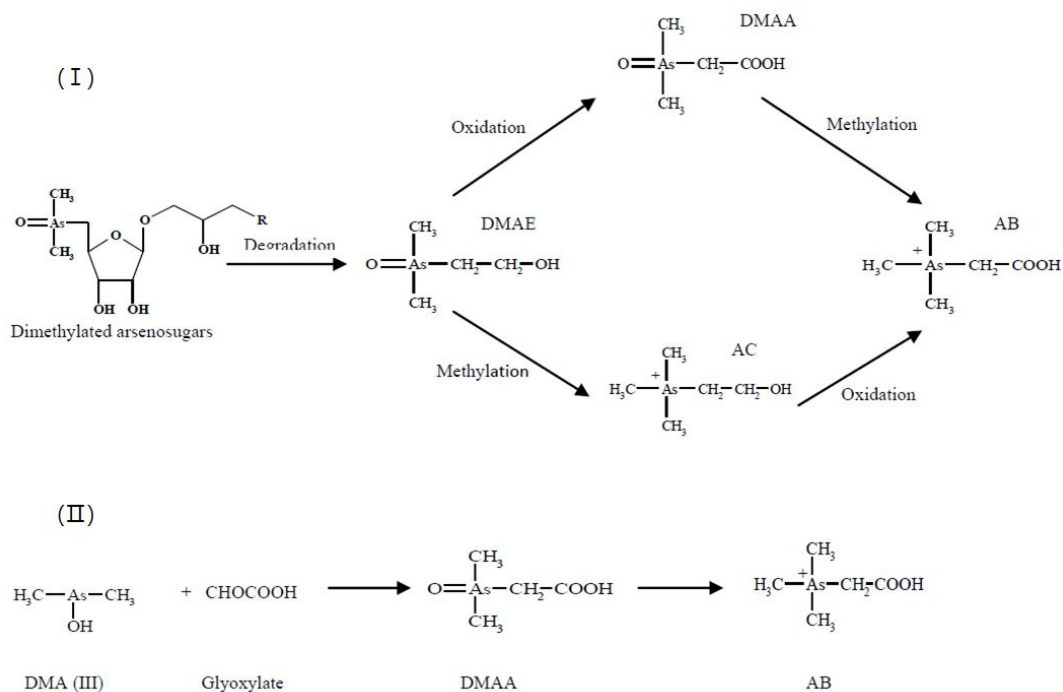


Fig. 6. Possible pathways for the biogenesis of arsenobetaine; (I) Biotransformation of arsenobetaine from arsenosugars (Edmonds, 1982), (II) Biotransformation of arsenobetaine by arsenylation of 2-oxo acid (45).

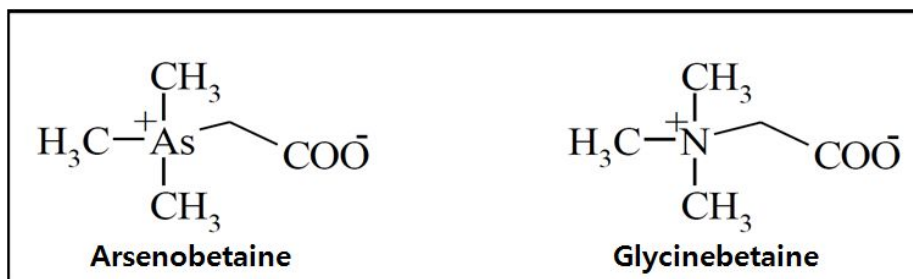


Fig. 7. Structure of arsenobetaine and glycinebetaine (44).

비소는 단일물질 보다는 여러 가지 화합물의 형태로 사용된다. 산업적으로 사용되는 비소화합물 중 삼화비소는 생산량의 대부분이 chromated copper arsenate ($\text{CrO}_3 \cdot \text{CuO} \cdot \text{As}_2\text{O}_5$, CCA)라는 화합물로 나무 방부제 용도로 사용되었으나 2003년 이후 미국과 캐나다에서 그 사용이 폐지되었으며, 우리나라에서도 2007년 10월 환경부가 비소가 포함된 CCA 방부목의 사용을 전면 금지하여 현재는 사용되지 않고 있다. 살충제의 목적으로 과거에는 주로 무기비소 화합물의 형태로 면 농장이나 과수원 등지에서 사용되어 왔으나 지금은 더 이상 사용되지 않고 있으며, 현재는 cacodylic acid, disodium methylarsenate (DSMA), monosodium methylarsenate (MSMA) 등의 유기비소 화합물이 제초제로 사용되고 있다. 뿐만 아니라 동물 및 가금류 사료에 항균 첨가제 등의 용도로도 사용되고 있다(46). 이 외에 비소는 자동차의 납축전지에 가장 많이 사용되고 있으며, 베어링에 사용된 금속의 윤활첨가제, 합금원소, 휴대폰이나 태양광 전지에 사용되는 gallium arsenide 반도체 그리고 발광다이오드 생산 등 다양한 산업에서 중요하게 사용되고 있다(2).

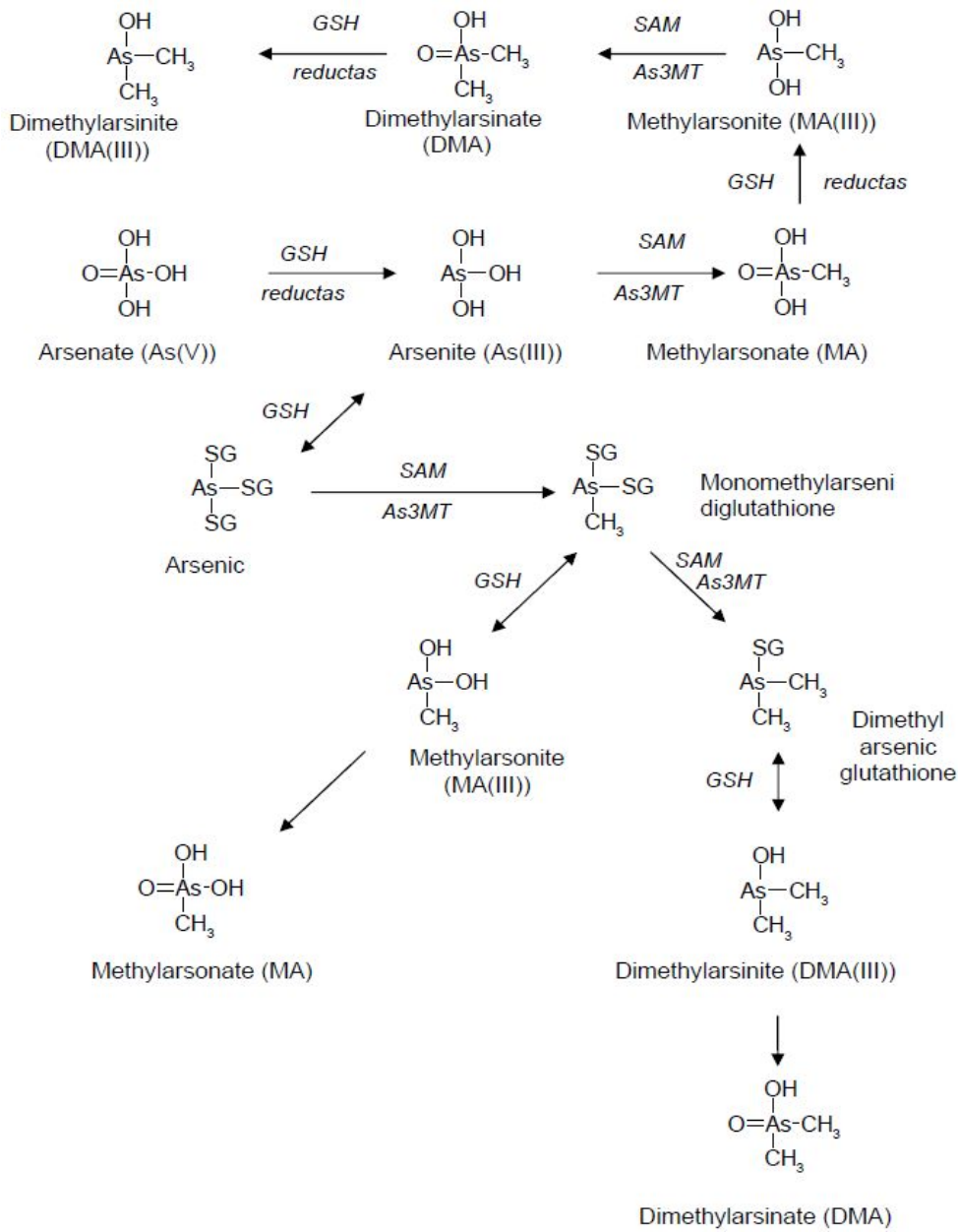
비소는 화학적 결합 형태에 따라 각기 다른 독성도를 가지고 있으며, 수은 및 주석과 같이 인체에 미치는 독성의 정도가 화합물의 형태에 의존한다. 따라서 특정 식품이나 물질에 오염되어 있는 비소 화합물의 종류 및 농도가 서로 다르기 때문에 대상물질의 인체에 대한 위해 정도를 단순히 총 비소의 함량만으로 판단하기는 어렵다. 비소는 비소원자와 여러 화학물질이 상호 결합 형태에 따라 arsenite [As(III)], arsenate [As(V)]와 같은 무기비소 화합물, monomethylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), arsenocholine (AsC), 그리고 arsenobetaine (AsB) 등과 같은 유기비소 화합물로 구분된다. 이들 6가지 비소 대표화학종들은 EPA의 LD₅₀값을 이용하여 상대적인 독성도를 비교할 경우 무기비소가 유기비소보다 독성이 강하게 나타났다. 각각의 비소화학종들의 수치적인 독성도(반수치사량; LD₅₀)를 비교하면 As(III)가 15~42 mg/kg로 가장 독성이 강하였으며, 그 다음으로는 As(V) (20~200 mg/kg), MMA (700~1,800 mg/kg), DMA (1,200~2,600 mg/kg), AsC (6,500 mg/kg) 그리고 AsB (10,000 mg/kg)의 순으로 확인되었다(47, 48). 단순한 수치상 비교로 보면 무기비소가 유기비소보다 수백배 높은 독성을 가지고 있다고 할 수 있다. 특히 유기비소화합물 중 AsC와 AsB는 LD₅₀값이 6,500

및 10,000 mg/kg으로 흰쥐를 이용한 독성실험에서 주류의 주성분인 ethyl alcohol의 LD₅₀값(7,060 mg/kg) 및 caffeine (150~200 mg/kg)과 비교해서 유사하거나 훨씬 더 낮은 값을 가지고 있어 이들 비소 화합물의 인간에 대한 위해성이 높지 않다고 생각되어진다(49).

대부분의 무기비소 화합물은 경구적 노출에 의해 가장 높게 흡수되며(주로 수용성 화합물의 형태, 80~90%), 흡입 및 피부노출(가장 낮음)에 의한 흡수는 낮다. 수용성 무기비소는 섭취된 후 신속하게(거의 대부분이) 인체에 흡수되며, 유기비소도 70% 이상 우리 몸에 흡수된다. 흡수된 비소는 거의 대부분의 장기에 분포되고 임산부의 경우 태반 장벽을 쉽게 통과한다. 식품에 의한 비소의 노출은 주로 먹는물에 의해 발생한다(50).

비소는 인체 내에서 여러 대사과정을 거치게 된다. 특히 무기비소 중 5가비소인 arsenate [As(V)]와 3가비소인 arsenite [As(III)]는 경구 및 흡입에 의해 체내에 쉽게 흡수되며, 일단 흡수된 As(V)는 As(III)로 부분적인 감소가 일어나고 혈액에서 As(III)과 As(V) 혼합물이 생성된다. As(III)는 간에서 우선적으로 메틸화(methylation)를 거쳐 monomethylarsonic acid (MMA)와 dimethylarsinic acid (DMA)로 변형된다(Fig. 8). 체내에 흡수된 대부분의 무기비소는 DMA 형태로 60~70%, MMA 형태로 10~20% 그리고 무기비소 형태로 10~30%가 혼합되어 대부분 소변으로 즉시 배출되거나 대변으로 소량 배출된다. 인간을 포함한 대부분의 종에서 제한된 대사를 거친 MMA나 DMA와 같은 유기비소 화합물들은 세포 내부로 쉽게 들어가지 못하고 특별한 형태변화 없이 대부분 소변으로 배출된다(2, 51, 52).

그러나 체내에 들어온 비소화합물이 100% 배출이 일어나는 것이 아니며, 이들 비소의 화학적 특성이 인체를 구성하는 필수 원소와 유사한 구조적 특성을 가지고 있어 3가와 5가의 비소들이 이들의 역할을 대체하는 치환반응을 일으키고 이들이 독성을 나타내게 된다. 5가의 무기비소는 인체 내에서 phosphate transporter의 과정을 거쳐 인삼염(phosphate)과 대체되는 것으로 여겨지며(53), 3가의 무기비소는 thiol과 결합할 수 있는 특징을 가지고 있어, 인체 내 수 많은 효소와 수용체에 존재하는 -SH 그룹과 결합하여 효소조직을 불활성화 시킨다(54, 55). 비소의 급성, 만성 중독에 의한 증상은 다음과 같다(Table 6).



SAM: S-adenosylmethionine; As₃MT: arsenic-methyltransferase; GSH: glutathione.

Source : ATSDR 2007

Fig. 8. Metabolic pathways of inorganic arsenic in mammals.

Table 6. Acute and chronic health effects in people exposed to arsenic

Toxic element	Acute	Chronic
Arsenic	<ul style="list-style-type: none"> - Abdominal pain - Vomiting - Diarrhea - Muscle cramping - Numbness and tingling of the extremities - Facial dropsy - Hepatosplenomegaly - Urinary frequency 	<ul style="list-style-type: none"> - Anorexia - Gastrointestinal symptoms - Skin pigmentation - Peripheral neuropathy - Bronchitis - Raynaud's disease - Hematopoietic organ, hepatic failure - Carcinogenic (liver, bile duct, lung, skin, prostate, kidney, urinary bladder)

Source : MFDS

제2절 국내·외 비소 및 비소화학종 관리 동향

비소는 인간의 인위적인 오염보다는 실제로 자연발생적인 오염문제가 심각하다.

1998년에 방글라데시를 비롯한 세계 여러 나라(중국, 미국, 내몽골, 타이완 등)에서는 비소에 의한 유사한 문제에 직면하고 있다. 특히 인도의 서벵갈(오염된 지하수 음용으로 약 20만 명 이상이 비소중독현상을 나타냄)과 방글라데시의 몇몇 지역(현재 70만 명 이상 비소에 의해 오염된 지하수를 음용하고 있음) 국가 기준인 0.05 mg/L보다 70배나 더 많은 비소로 오염되어 있다(56). 이렇게 여러 지역에서 필수 불가결하게 일상적으로 접하고 있는 음용수에 대한 비소의 오염문제를 계기로 국제협력기구인 Asia Arsenic Network (AAN)가 설립되어 동남아시아를 중심으로 비소 정화연구가 진행되고 있으며, 영국의 캠브리지대학에서는 지하수, 지표수, 토양에서 비소의 발생, 원인, 영향 그리고 저감화에 관한 연구를 수행하고 있고 미국의 하버드대학과 Massachusetts Institute of Technology (MIT)도 “Arsenic Project”를 설립하여 서로 독자적으로 수행해 오고 있던 비소 오염에 관한 문제들의 해결을 위해 문제 발생지역의 비소오염 현황자료 구축과 위해성 검증, 지구화학적 발생기작, 효과적 처리기술 등에 관한 연구를 공동으로 추진하고 있다.

미국 Environmental Protection Agency (EPA)에서는 비소의 높은 발암성을 고려하여 2001년부터 음용수내 비소 허용기준치를 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 강화하면서 비소처리기술의 개선 및 새로운 기술 개발 등에 지원함으로써 비소 저감을 위해 노력하고 있다.

우리나라의 경우 환경부의 2012년 토양측정망 및 토양오염 실태조사에서는 전국 1,521개소를 대상으로 하는 토양오염측정망 조사 결과 토양의 비소 함량은 5.05 mg/kg (0~48.881 mg/kg)으로 확인되어 기준치 초과 지역은 확인되지 않았다 (Table 7). 그러나 지자체별로 수행한 토양오염우려지역의 오염실태조사 결과에서는 일부 제련소, 광산 및 산업단지 등에서 비소 함량이 기준치(1지역 기준; 오염우려기준 25 mg/kg, 대책기준 75 mg/kg)를 초과하여 나타나고 있음을 보여주어 자연환경에서의 비소에 대한 오염 가능성을 보여주고 있다(57).

Table 7. Heavy metals pollution of soil in Korea

(Unit : mg/kg)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Cadmium	0.092	0.078	0.076	0.063	0.049	0.059	1.094	1.29	1.00
Cooper	4.382	3.768	3.587	3.799	3.521	2.994	19.934	23.80	21.00
Arsenic	0.05	0.167	0.481	1.064	0.241	0.338	4.821	5.64	5.05
Mercury	0.036	0.016	0.025	0.053	0.037	0.042	0.030	0.04	0.04
Lead	5.854	6.162	5.395	5.068	4.042	3.903	26.763	35.80	27.3

Source : 「A survey of soil monitoring network and soil pollution in 2012」 (2013)

비소는 식품이나 다른 여러 물질에 의해 인체에 흡수되면 대부분이 소변이나 대변을 통해 체외로 배출 되지만, 단기간에 과잉노출 되어 급성중독을 일으키거나 장기간에 걸쳐 이행되고 축적 되어 쉽게 분해되지 않고 만성중독을 일으켜 결국 피부나 간, 폐, 방광 등과 같은 인체의 여러 조직에 심각한 위해를 끼칠 수 있다(58).

국제암연구소(IARC)에서는 발암 가능성에 대해 비소를 무기비소와 유기비소로 구분하고 있으며, 비소와 무기비소화합물을 인체에 발암성이 있는 물질인 Group 1으로, arsenobetaine과 인간에게서 대사가 되지 않는 다른 유기비소 화합물들은 인체 발암물질로 보기 어려운 Group 3으로 분류하고 있다(21). EPA와 ATSDR에서는 CERCLA의 Priority list of hazardous substances (Substance priority list, SPL)에 단순히 '독성이 강한' 순위의 목록이 아닌 각 물질들의 노출빈도, 독성, 국가우선순위목록(National priorities list, NPL)의 인간에 대한 잠재적 노출 위험 등의 조합에 따른 우선순위에 비소를 첫 번째 순위에 올려놓고 있는 아주 중요한 오염물질이다(6, Table 1).

비소 및 비소화합물에 대한 인간에게 위해를 줄 수 있는 위험수준도 많은 연구를 바탕으로 여러 기구에서 설정하고 있다. ATSDR은 비소 화합물의 경구섭취에 대한 최소위험수준(Minimal Risk Levels; MRLs)을 무기비소의 경우 급성중독(14일 이하) 0.005 mg/kg b.w./day, 만성중독(1년 이상) 0.0003 mg/kg b.w./day로, 유기비소의 경우 MMA의 아급성중독(15~364일) 0.1 mg/kg b.w./day, 만성중독 0.01mg/kg b.w./day 그리고 DMA의 만성중독은 0.02 mg/kg b.w./day로 설정하고 있다. JECFA에서는 인간에 위해가 없는 정도의 양인 비소의 주간잠정섭취허용량(PTWI)을 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./week (2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day)로 설정하고 있다. 그러나 독성에 대한 여러 연구 결과 72차 JECFA위원회에서(2010)는 폐암의 역학조사에서 확인된 BMDL_{0.5}(3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day과 2~7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)의 범위 안에 기준치가 포함되어 더 이상 기준이 유용하지 않다는 결론을 내려 PTWI를 폐기하였으며, 아직 새로운 기준은 설정되지 않았다(20). 또한 European Food Safety Authority (EFSA)에서도 현재 JECFA의 가장 최근의 결과를 따르고 있다(29). 뿐만 아니라 호주, 뉴질랜드, 중국 그리고 영국 등 여러 국가들에서도 각국의 실정에 맞는 기준을 정하여 규제하고 있다. 그러나 대부분이 총 비소에 대한 기준을 정해놓거나 일부 국가

(호주와 뉴질랜드, 중국, 유럽연합 등)만이 비소화합종 중 독성이 높다고 알려진 무기비소에 대해서만 규제를 하고 있는 실정이다(Table 4, Table 8-9).

Table 8. Arsenic standard of Korean food standards codex

Food		Limit (mg/kg)
Other Foods	Capsule products	1.5
	Refined and processed salts	0.5
Edible oils and fats		0.1

Source : Korean Food Standards Codex (2013)

Table 9. General and specific limits for arsenic in food products of UK

Description of food	Arsenic limit (ppm) in weight
1. General limit	1.0
Specific limits, distinct from the general limit	
1. Non-alcoholic beverages, ready to drink, not otherwise specified	0.1
2. Alcoholic beverages, not otherwise specified	0.2
3. Black beer and mixtures of black beer and rum	0.5
4. Soft drinks intended for consumption after dilution and undiluted fruit juices (including concentrates intended for consumption after dilution to an extent not greater than ten parts to one, calculated by volume, for use by a manufacturer of soft drinks)	0.5
5. Ice cream (including frozen confections and any other similar commodity)	0.5
6. Onions (dehydrated)	2.0
7. Hops (dried) other than those intended for use for commercial brewing	2.0
8. Liquorice (dried extract)	2.0
9. Gelatine (edible)	2.0
10. Yeast and yeast products (other than brewer's yeast intended for use by manufacturers in manufacture of yeast products). Calculated on the dry matter.	2.0
11. Chemicals not otherwise specified	2.0
12. Chicory (dried and roasted)	4.0
13. Herbs (dried)	5.0
14. Finings and clearing agents	5.0
15. Hops concentrates other than those intended for use for commercial brewing	5.0
16. Spices (including mustard)	5.0
17. Chemicals for which an arsenic limit is specified in the British Pharmacopoeia Codex	2.0
18. Brewers yeast intended for use by manufacturers in the manufacture of yeast products	5.0
19. Iron powder intended for use in the preparation of flour	5.0

Soruce : Food Standars Agency in UK

제3절 국내·외 식품 및 해조류 중 비소 및 비소화합물 연구 동향

자연적으로 발생하는 비소로 인해 음용수가 오염이 되고 오염된 물을 사람들이 마심으로써 여러 가지 건강상의 문제가 야기 된다. 이는 단순히 음용수의 문제만 해당되는 것이 아니라 생태 순환에 의해서 육상에서는 농작물이나 가축으로 그리고 다시 바다로 흘러가 바다생물들이 오염되고 최종적으로는 이들을 식품으로써 섭취하는 인간에게 비소의 축적에 의한 피해가 발생하게 된다.

식품에 대한 섭취 기준은 1967년 WHO가 총 비소의 Maximum Allowable Daily Body Load (MADL)를 $50 \mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ 으로 설정하였고, 1988년 JECFA에서는 무기비소의 PTWI를 $15 \mu\text{g}/\text{kg b.w./week}$ ($2.1 \mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$)으로 설정하였으며, 최근에는 관련 연구자료를 토대로 폐암의 $\text{BMDL}_{0.5}$ 가 역학조사에 의해 $3.0 \mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ ($2\sim 7 \mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$)로 새로이 결정되어 기존의 PTWI를 폐지하는 등 지속적인 연구를 수행하고 있다(20).

뉴질랜드 식품안전국(New Zealand Food Safety Authority; NZFSA)에서는 총식이섭취량조사(Total Diet Study, TDS)를 1974/75, 1982, 1987/88, 1990/91, 1997/98, 2003/04년 및 2009년에 진행하여 식품 중 비소 섭취량을 평가하였으며, 특히, 2003/04년에는 농산물 중 중금속(비소, 카드뮴, 납 및 수은)의 잔류수준을 평가하였는데, 측정된 중금속의 수준이 모두 WHO의 PTWI 보다 낮았으며, 무기비소 역시 PTWI의 17%로 낮게 산출되었다고 보고하였다. 또한, 2009년에는 분석된 식품 중 대부분이 $0.01 \text{ mg}/\text{kg}$ 보다 적은 비소 함량을 보였다고 하였다. 그러나 비소 함량이 $0.01 \text{ mg}/\text{kg}$ 을 초과하는 식품의 약 90%가 어류와 어류관련 식품에 의한 것이라고 보고하여 이들 식품의 위해 가능성을 염두에 두고 있다(59). 뉴질랜드의 총비소식이노출량(19~24세 젊은 남성)은 Table 10과 같다.

Table 10. Dietary exposures to total arsenic (19~24 year young males)

Element	Estimated weekly dietary exposure ($\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./week)				
	1987/88 NZTDS	1990/91 NZTDS	1997/98 NZTDS	2003/04 NZTDS	2009 NZTDS
Arsenic (total)	6.7	15	8.7	9.1	10.4

Source : NZFSA (59)

국내에서도 2001년(60)에는 한국인의 대표 식단의 중금속 섭취량 및 위해도 평가를 진행하였으며, 물을 포함한 117가지의 식품 중 21개 식품에서 비소가 검출($nd \sim 7 \text{ mg/kg}$) 되었고 대부분이 김, 김구이, 미역국, 꽃게장, 새우젓 등 해조류나 어류가 포함된 식품이었다. 2002년 국가 관리체계 구축사업을 통해 장기적으로 인체에 독성을 나타내는 유해 중금속에 대한 한국인의 체내 오염도를 정량화하여 이를 근거로 환경오염과 관련하여 한국인의 체내 중금속 축적 수준을 파악하고 노출량을 산출하는데 활용하였다(61). 2005년에는 전국을 대상으로 각 지역별(산지, 유통지, 폐광지)로 나누어 쌀, 옥수수, 콩, 팥, 고구마, 감자 배추 시금치, 사과, 무 등 농산물의 중금속 실태조사를 진행하였다(62).

그리고 2006년부터 2013년 까지 다소비식품(어묵, 된장, 고추장), 채소류, 과일류, 가공식품, 강원도 연안 수산물, 식초류, 버섯류, 영·유아식 및 근채류 등에 대한 중금속 모니터링, 실태조사 및 안전성 평가 등이 연구되었다(63-71).

해조류는 바다라는 특징적인 환경에 둘러싸여 다양한 중금속 및 오염물질에 노출되어 있다. 이런 환경에서 성장한 해조류 비소 함량은 품종과 지역에 따라 함량에는 차이가 있지만 김, 미역, 다시마에서 총비소 함량이 8.5~39.7, 15.1~52.2, 16.3~73.2 mg/kg (19, 72) 그리고 톳은 약 60 mg/kg (17) 정도의 높은 비소 함량을 보이고 있다. 해양생물에는 다양한 무기비소와 유기비소가 존재하고, 그 중 해조류는 위의 비소 함량 범위와 같이 높은 함량에도 불구하고 대부분 AsB ($LD_{50} = 10,000 \text{ mg/kg}$)이라는 독성이 거의 없다고 알려진 유기비소 형태로 존재하기 때문에 안전하다고 여겨지고 있다(73).

그러나 해조류 중 모자반과에 속하는 톳은 WHO 산하 국제암연구소(IARC)에서 강한 독성으로 1급 발암물질로 규정한 무기비소가 2001년 캐나다식품검역소(CFIA)의 '수입해조류에 대한 중금속 함량조사' 결과 일일섭취 허용량을 초과하여 검출되면서 문제시되기 시작하였다. 캐나다 식품검역소 측은 "비록 톳의 섭취와 연관된 병은 알려지지 않았지만, 무기비소는 인간에게 암을 일으키는 물질로 의심되고 높은 수준의 무기비소에 장시간 노출될 경우 위장장해, 빈혈, 그리고 간 손상과 관련이 있다"고 주장하며 톳의 섭취를 자제하라고 권고하였다(74).

그 후 2004년 영국의 Food Standards Agency (FSA)는 수입해조류의 무기비소

함량 검사 결과 검사대상 중 툿에서 무기비소가 검출되었다고 발표하였으며, 이는 캐나다의 툿에 대한 높은 수준의 무기비소 검출 결과와 일치하였다. FSA에서 확인된 툿의 무기비소 함량은 평균 11mg/kg으로 약 18g의 툿이 198 μg (2.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.)의 무기비소를 함유하고 있고, 이는 70kg 성인이 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.를 섭취하는 것과 비슷하다. 이 수치는 JECFA의 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./week (현재의 기준은 BMDL_{0.5}의 범위인 2~7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day 임)의 1.5배에 해당하는 양으로(75) 영국정부는 자국민에게 툿의 섭취를 자제 할 것을 권고하고 있다(75, 76). 또한 이러한 결과를 바탕으로 영국의 The Committee on Toxicity (COT)도 툿 섭취의 위험성에 대해 FAS를 지지하고 있다(75).

그러나 이와 반대로 툿의 소비가 가장 많이 이루어지고 있는 일본에서는 JECFA의 PTWI와 비교했을 때 50kg의 체중을 가진 사람의 경우 107 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ 에 상당하고, 생 툿 중의 무기비소 최고 농도는 22.7 mg/kg으로 매일 4.7 g 이상을 섭취하지 않으면 비소의 PTWI는 넘지 않으며, 해조 중에 포함되는 비소에 의한 비소중독 관련 건강 피해가 일어났다는 보고는 없었다고 주장하고 있다(58, 77).

국내에서 1998년 5월 양식 김에서 비소의 함유량이 0.5~34.6 mg/kg 검출되면서 비소의 유해성에 대해 문제시 되어 사회적으로 물의를 일으킨 바 있다. 그러나 현재까지 김에 대해 총비소에 대한 기준·규격도 마련되지 않아(카드뮴 기준만 설정됨; 김과 조미김에 대해 생물기준으로 카드뮴 0.3 mg/kg 이하) 김에서 검출된 비소의 대부분이 독성이 거의 없다고 알려진 유기비소 화합물이므로 안전하다는 결론을 발표하였지만 국민적 신뢰가 형성되지 않아 비소화학종의 분석 연구의 필요성이 대두 되었다.

외국에서는 1970년대 초부터 총 비소 뿐만 아니라 As(III)과 As(V)와 같은 무기비소의 분리·분석 연구가 시작되었다. 그 이후 Hydride geration (HG)을 이용하여 수소화물을 생성시킨 후 원자흡광장치와 연결시켜 비소 화합물들을 분리·분석해 오는 방법들이 이용되어 왔으며(78-80), 시료를 Thioglycollic acid methylester (TGM)으로 유도화 시켜 GC로 분석하는 방법들도 사용되어 왔다(81). 최근에는 시료에 위의 방법들과 같이 화합물의 형태를 변화시켜 분석하는 방법 대신 추출 후

직접 장비에 주입하여 분석하는 방법들이 이용되고 있다. 주로 높은 분해능을 가지는 High performance liquid chromatograph (HPLC)와 높은 검출감도를 가지고 있는 Inductively coupled plasma (ICP)를 연결시킨 분석기술이 사용되어지고 있으며 (82-84), 정확한 형태가 구명되지 않고 있는 arsenosugar의 분석을 위해 Electrospray ionization (ESI)를 coupling시켜 분리·분석하는 연구도 수행되고 있다(85). 이들 기기를 이용한 방법은 주로 쌀, 수산물, 음용수, 조제분유 등 다양한 시료를 대상으로 비소화학종의 분리·분석을 목적으로 연구가 진행되고 있다.

국내에서도 2000년 이후 총 비소에 대한 분석뿐만 아니라 무기비소 및 유기비소종의 분리·분석에 대한 연구가 수행되기 시작하였다. 초기 주요 연구는 주로 폐광산이나 오염 우려지역의 토양, 자연수 등의 환경시료를 대상으로 하였으며, 주로 Hydride generation을 통해 수소화물을 발생(86, 87)시켜 ICP-AES나 AAS를 이용하여 무기비소종을 분석하였다. 그러나 점차 우리가 일상적으로 섭취하는 식품 등을 대상으로 위해성에 관한 연구와 평가가 이루어지고 있으며, 식품 중 미량성분을 분석하기 위해 분석물질을 복잡한 유도체화 과정 없이 분리하기 위해 SPE (88, 89, 90)나 HPLC를 이용하여 일차적인 과정을 거친 후 이를 ICP-MS를 이용하는 방법이 이용되고 있다.

하지만 이렇게 국내·외적으로 비소 및 비소화학종에 대한 여러 가지 분석 및 종 분리 방법들이 개발되어 사용되고 있지만 우리가 섭취하는 식품들의 종류는 셀 수 없이 많고 분석의 대상이 되는 식품들은 한정되어 있어 이들 비소화학종들의 안전성 특히 해조류 중의 비소 함량 및 안전성에 대한 연구와 섭취 허용량에 대한 연구는 아직 충분하지 않다.

제3장 재료 및 방법

제1절 실험재료 및 기기

1. 재료

해조류의 총 비소 및 비소화합물 분리·분석을 위해 2012년 4월부터 10월까지 전국에 있는 시장과 마트에서 김 70건, 다시마 121건, 미역 115건, 툇 27건, 모자반 15건 등 총 5종 348건을 구입하여 총 비소 분석 시료로 하였으며, 이중 김 53건, 다시마 45건, 미역 60건, 툇 27건, 모자반 15건 등 총 5종 200건을 비소화합물 분리를 위한 시료로 하여 연구를 수행하였다(Table 11-12).

2. 시약 및 표준물질

본 연구에서 총비소 및 비소화합물 분리·분석을 위해 모든 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였으며, 증류수는 Milli-Q ultrapure water purification system (Millipore Co., Bedford, MA, USA)에 의해 18.2 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

산분해 처리를 위해 사용한 질산(HNO_3)과 과산화수소(H_2O_2)는 모두 Dong woo fine-chem (Iksan, Korea)의 electronic grade를 구입하여 사용하였으며, 총 비소 분석에 사용된 표준물질인 arsenic은 Sigma-Aldrich의 sodium arsenate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99.9%)를 사용하였다.

비소화합물의 분리 분석을 위해 사용된 표준물질 중 무기비소종인 As(III) [sodium(meta) arsenite; NaAsO_2 , 99.0%]와 As(V) (sodium arsenate dibasic heptahydrate; $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99.9%)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, 유기비소종인 DMA [dimethylarsinic acid; $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$, 98%]는 Strem Chemicals (Newburyport, MA, USA)와 MMA

[monosodium acid methane arsonate sesquihydrate; $(\text{CH}_3)_3\text{AsO}(\text{OH})_2$, 99.0%]는 Chem Service (WestChester, PA, USA), AsB (arsenobetaine; $[(\text{CH}_3)_3\text{As}]^+\text{CH}_2\text{COO}^-$, 97%)는 Fluka (Buchs, Switzerland) 그리고 AsC (arsenocholine bromide; $[(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}, \text{Br}^-$, 95%])는 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

HPLC에 사용된 이동상은 ammonium bicarbonate (Merck, Germany), ammonium phosphate (Sigma, USA)와 ammonium nitrate (Sigma, USA)이며, ammonia solution (Merck, Germany)을 이용하여 이동상의 pH를 조절하였다. 비소 화학종의 추출 및 분리를 위해 사용된 methanol과 ethanol (Fisher, USA)은 HPLC 등급을 사용하였다.

내부 정도관리를 위해 표준물질인 NRCC (National Research Council Canada)의 CRM (Certified Reference Material)인 DORM-2 (Dogfish muscle; total 18.0 ± 1.1 mg/kg, arsenobetaine 16.4 ± 1.1 mg/kg as As)와 NMIJ (National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)의 CRM 7405-a (Hijiki Seaweed; total 35.8 ± 0.9 mg/kg, As(V) 10.1 ± 0.5 mg/kg as As), 7503-a (White rice flour; total 0.098 ± 0.007 mg/kg, As(III) 0.0711 ± 0.0029 mg/kg as As, As(V), 0.0130 ± 0.0009 mg/kg as As, DMA, 0.0133 ± 0.0009 mg/kg as As)를 사용하여 회수율 등을 확인하였다.

3. 기기

해조류의 총 비소 함량 분석 및 비소화학종의 분리·분석을 위해 시장에서 구입한 원재료를 초순수 (Milli-Q ultrapure water purification system, Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 세척하였다. 세척된 시료를 dry oven (HB-502M, Han Back, Korea)을 이용하여 건조하였으며, blender (MR 350CA, Braun, Spain)로 분쇄하여 총비소와 비소화학종 분리·분석을 위한 시료로 하였다.

해조류 중 총비소의 정량 분석을 위해 모든 시료는 microwave(Microwave system, Multi-wave 3000, Anton Paar, Graz, Austria)을 이용하여 전처리 작업을

수행하였다. 전처리가 완료된 시료는 ICP-OES (Varian Model 730-ES simultaneous CCD, Wyndmoor, PA, USA) 및 ICP-MS (Elan 6100 DRC II / Perkin-Elmer SCIEX, Norwalk, CT, USA)로 예비실험 하였으며, 높은 감도의 ICP-MS를 이용하여 최종분석 하였다.

해조류의 비소화학종[As(III), As(V), MMA, DMA, Arsenobetaine, Arsenocholine]의 분리·분석을 위해 분말화된 시료를 초음파추출기(Powersonic 420, Hwasin Technology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. 이렇게 추출된 시료는 고속원심분리기(Hanil Science Industrial, Inchon, Korea)를 이용하여 원심분리(5,980×g) 한 후 0.45 μ m nylon membrane filters (BDH, Leicester, UK) 및 Oasis MAX cartridge (Waters, Milford, MA USA)를 이용하여 그 상정액을 거른 후 추출효율을 비교하였으며, 이를 이용하여 비소화학종 분리·분석을 위한 시료로 하였다.

비소화학종의 분리 및 정량분석을 위해서는 고성능액체크로마토그래피(HPLC, LC-VP series, Shimadzu, Kyoto, Japan)의 분리능력과 ICP/MS의 높은 감도의 검출능력을 결합한 HPLC-ICP-MS를 이용하여 수행하였다.

Table 11. The number of seaweed species for total arsenic and arsenic speciation

Species	Number	
	Total arsenic	Arsenic speciation
Total	348	200
Laver (<i>Porphyra tenera</i>)	70	53
Sea tangle (<i>Laminaria japonica</i>)	121	45
Sea mustard (<i>Undaria pinnatifida</i>)	115	60
Hijiki (<i>Hizikia fusiforme</i>)	27	27
Gulf weed (<i>Sargassum fulvellum</i>)	15	15

Table 12. Sampling region for analysis

Species	Number of Samples	Capital area	Kang-won	Dae-jeon	Dae-gu	Gwang-ju	Busan
Laver	70	8	15	16	7	11	13
Sea tangle	121	15	24	24	16	21	21
Sea mustard	115	17	30	12	18	16	22
Hijiki	27	6	2	8	8	3	-
Gulf weed	15	-	-	-	-	15	-
Total	348	46	71	60	49	66	56

제2절 실험방법

1. 해조류 중 총 비소 분석법 연구

가. 총 비소 분석을 위한 시료 전처리

총 비소 분석을 위해 구입한 모든 생물 상태인 해조류 시료는 시료 표면에 묻어 있는 바닷물이나 흙 또는 여러 가지 이물질을 제거하기 위해 초순수 제조장치 (Milli-Q ultrapure water purification system, Millipore, Bedford, MA, USA)로 얻어진 3차 증류수로 수회 세척한 후 가식부를 취해 분석시료로 하였다. 미역이나 다시마와 같이 바다에서 채취된 후 세척과정 없이 바로 건조된 후 유통되는 제품은 분석 시료로 사용하기 위해 먼저 물에 불려 염분 및 이물질을 제거 하면서 시료 원래의 형태로 복원시킨 후 일반적으로 통용되고 있는 방법으로 세척하였다.

세척이 완료된 각각의 시료들은 분석의 편리성과 실험결과와 재현성, 정밀성을 위해 적당한 크기로 세절한 후 dry oven (HB-502M, Han Back, Korea)을 이용하여 건조하고 이를 blender (MR 350CA, Braun, Spain)로 분말화 하여 시료를 균질하게 하였다. 또한 시료 분석 후 원 시료에 대한 중금속 함량을 산출하기 위해 AOAC (91) 및 식품공전(22)의 방법을 적용하여 시료 3~5 g을 105℃의 온도로 건조하면서 항량이 될 때까지 측정하여 수분 함량을 구하였다. 일련의 과정을 거쳐 1차 전처리된 시료는 각각 polyethylene (PE) bag에 담아 -20℃ 이하로 냉동보관하며, 매 분석시마다 분해용 시료로 사용하였다.

식품의 원료가 되는 시료에는 다량의 유기물이 포함되어 있어 미량성분의 함량 분석을 위한 전처리 과정에서 총비소의 함량 확인을 위해서는 유기물의 완전 분해가 선행되어야 하며, 원자흡광광도법을 이용한 ICP와 같은 분석기기에 사용되기 위해서는 액체형태로의 변환이 필요하다. 이를 위한 시료 전처리 방법에는 식품공전(22)에 명시되어 있는 건식회화법과 습식분해법 그리고 가속용매추출법(87)이 있으며, 그 외에 sonicator를 이용한 초단파 추출법(34, 93, 94) 등 여러 방법들이 사용

되고 있다. 그러나 많은 연구에서 건식회화법(92, 95)보다 간편한 습식분해법(20, 93, 96-98)이 일반적으로 사용되어지고 있으며, 최근에는 밀폐에 의한 분석방법으로 분석물질의 손실 및 오염이 비교적 적으며, 높은 온도에서 빠른 시간에 시료의 분해가 가능한 마이크로웨이브법이 주로 이용되고 있다(99). 건식분해법은 산화제인 HNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 등을 시료와 함께 회화로에서 450~550°C의 온도로 분해하고 회화가 완료된 재를 다시 산용액을 이용하여 시험용액으로 사용하는 방법이다(22, 92, 95, 100). 그러나 주로 2000년대 이전에 사용했던 분해법으로 분해과정 중 사용되는 염산, 산화마그네슘, 탄산나트륨등의 산화보조제로 인한 오염, 고온의 회화 과정 중 Arsin (AsH_3)과 같은 휘발성 비소화합물의 손실 등의 측정 방해요인들이 작용할 가능성과 분해과정의 번거로움이 있어 여러 중금속을 동시에 분석하기 위한 시료의 전처리 방법으로는 한계를 가지고 있다.

습식분해법(20, 22, 29, 93, 96-98)는 강산용액을 이용해 시료를 분해하는 방법으로 hot plate를 이용한 일반적인 방법과 microwave를 이용한 방법이 대표적이다. 사용되는 산용액은 HNO_3 가 단독으로 사용하는 방법과 HClO_4 나 H_2SO_4 와 혼합하여 사용하는 방법이 있으며, 산화의 촉진을 위해 산화보조제인 H_2O_2 를 첨가하여 분해함으로써 여러 실험 결과에서 건식분해법보다 높은 회수율을 보였다는 보고가 있다(101-104). 그러나 식품공전(22)의 황산-질산법은 최종 분해 후 끓는점이 높은 황산(b.p. 337°C)의 제거의 어려움으로 H_2SO_4 을 이용하는 대신 HNO_3 과 H_2O_2 를 이용한 방법으로 변형되어 많이 사용되고 있다. 최근 분해용산으로 주로 사용되는 HNO_3 는 식품과 토양 등의 분석을 위한 분해방법인 EPA method 3051 (105)의 분해용산으로 무기성분과 중금속 함량시험에 가장 많이 사용되고 다른 혼합산을 사용할 때 보다 실험이 복잡하지 않고 산에 대한 실험자의 위험을 최소화 할 수 있다. 분석 결과 또한 비교적 정확하여 농산물의 중금속 함량, 토양중의 중금속 함량 뿐만 아니라 여러 실험 또는 검증에 사용된다.

습식분해법은 분해과정 중 항상 산성 용액이 존재하므로 건식분해법보다 훨씬 낮은 온도에서 회화가 일어나며, 건식분해법에 비해 전처리 절차가 간단하고, 분해용기에 대한 흡착이 적어 식품 및 유기물에 대한 전처리에 주로 사용된다. 그러나 일반적인 습식분해법인 hot plate를 이용한 전처리 방법은 식품과 같은 유기물이

많은 시료를 분해하는데 장시간(10~24 시간)이 필요하다. 또한 건식분해법보다는 낮은 온도에서 분해하지만 직접 가열판(hot plate)을 이용해 분해하기 때문에 분해 목적 성분의 휘발 위험성이 존재하며, 분해 시 시료가 넘쳐흐르거나 튀는 문제가 발생할 수 있어 분해자가 항상 관찰하고 있어야 하는 인력과 안전성의 문제가 있다. 이를 보완할 수 있는 방법으로 최근 microwave를 이용한 분해법(20, 29, 106)이 사용되어지고 있는데, 이 방법은 teflon재질의 용기에 시료와 분해용 산 그리고 산화 보조제를 넣고 밀폐시킨 후 마이크로파의 주사에 따른 온도와 압력의 상승으로 분해가 빠르며, 분석물질에 대한 손실도 최소화할 수 있는 방법으로 국제적으로 추천되고 있는 분해법이다(99). Microwave를 이용한 국제적인 산분해 방법은 Table 13과 같이 설정되어 있다. 본 연구에서는 시료의 분석시간 및 분석 방법 등의 예비 실험을 통해 microwave system (Multi-wave 3000, Anton Paar, Graz, Austria)을 이용한 시료분해방법을 정하였다.

Microwave법은 습식분해의 한 방법으로 hot plate를 이용한 습식분해법보다 분석 작업을 수행하기 위한 시료 전처리 소요시간이(가열 40~60분 + 냉각 20~30분) 짧고, 소모되는 분해용 산의 사용량 또한 10 mL 이하로 미량원소의 분석 시 이들 산에 의한 오염을 최소로 할 수 있다. 또한, 밀폐형 분해용기 사용으로 분해 중 시료의 손실이 거의 없고 내부의 압력 발생으로 완전분해가 가능하며, 시료간의 오염이 거의 발생하지 않는 장점이 있다.

본 연구에서는 총 비소 분석을 위한 시료의 최적 전처리 방법의 확인을 위해 일반 습식분해법과 초음파추출기를 활용한 습식분해법 그리고 microwave를 이용한 습식분해법 등의 시료 전처리 방법을 ICP-MS (Table 13)를 이용하여 비교 분석하였다.

Table 13. Comparison of institutional microwave digestion conditions for the analysis of total arsenic

	Korean Food Standards Codex explanation book	Korean Food Standards Codex (2013)	AOAC	ISO	EN
Sample	0.5 g (dried sea mustard 0.1 g)	0.1~0.5 g 1~2 g (High moisture)	0.2~0.5 g (dry) 2 g (wet)	1 g	0.2~0.5 g (dry) 2 g (wet)
Preparation	HNO ₃ (7 mL) +H ₂ O ₂ (1 mL)	-	HNO ₃ (5 mL) +H ₂ O ₂ (2 mL)	HNO ₃ 3 mL	HNO ₃ (5 mL) +H ₂ O ₂ (2 mL)
Final Volume	25 mL volumetric flask	-	25 mL volumetric flask	-	25 mL volumetric flask
Instrument	ICP/MS	ICP, AAS, ICP/MS	AAS	AAS	ICP, AAS, ICP/MS

(1) 일반습식분해법

총비소의 분석을 위해 가장 일반적으로 사용되는 분해방법은 HNO_3 , H_2SO_4 , HCl , HClO_4 등의 산용액을 사용하여 분해하거나, 산용액 이외에 산화 촉진을 위해 산화 보조제로 H_2O_2 를 첨가하여, hot plate나 hot block위에서 유리플라스크를 이용하여 고온에서 시료를 분해하는 습식분해법이다. 본 연구에서는 시료의 분해를 위해 분해용 플라스크에 시료 약 3 g과 HNO_3 25 mL와 H_2O_2 2mL를 넣고 잘 혼합한 후 hot block에서 150~160°C로 가열하였다. 혼합용액을 가열하기 전 약 12시간(하룻밤) 방치하여 산용액과 시료의 반응이 잘 일어날 수 있도록 하였으며, 10~12시간 동안 가열한 후 분해물이 5 mL의 미황색~무색의 용액이 되게 하였다. 이를 50 mL의 폴리에틸렌(PE) volumetric tube 에 담고 HNO_3 로 최종 7 mL까지 채운 후 25 g이 될 때까지 증류수로 채워 시험용액으로 사용하였다(Fig. 9).

(2) Sonication을 이용한 습식분해법

일반습식분해법을 보완한 방법으로 Fig. 10과 같이 시료 약 3 g과 HNO_3 25 mL와 H_2O_2 2mL를 분해용 플라스크에 넣고 혼합하여 하룻밤 방치하는 대신 1차적인 상호반응을 위해 인위적으로 sonicator에 넣고 60°C의 온도로 약 2시간 동안 초음파를 이용하여 반응시킨 후 hot block에서 150~160°C로 10시간 동안 가열한 후 5 mL의 미황색~무색의 용액이 되게 하였다. 이를 50 mL의 폴리에틸렌(PE) volumetric tube 에 담고 HNO_3 로 최종 7 mL까지 채운 후 25 g이 될 때까지 증류수로 채워 시험용액으로 사용하였다.

(3) Microwave법

시료 0.5 g을 PTFE (teflon) 분해용기에 직접 칭량하여 준비하고, 분해용액으로 HNO_3 7 mL와 산화제로 H_2O_2 2 mL를 첨가하여 microwave 분해장치를 이용하여 분해하였다. 분해를 위한 적정 시료량 결정은 microwave를 이용하여 사전 분해실험을 진행하여 분해용기에 물리적인 무리가 가지 않는 양을 확인하여 결정하였다. 우선 미리 준비된 시료 0.5 g을 PTFE 분해용기에 직접 칭량하여 준비하고, HNO_3 7 mL와 H_2O_2 2 mL를 분해제로 첨가한 후 microwave 분해장치를 이용하여 분해

하였다. Microwave 분해장치의 산분해 과정은 다음과 같다: ① 1000 W에서 80℃로 5분간, ② 1000 W에서 50℃로 5분간, ③ 1000 W에서 190℃로 15분간, ④ 1000 W에서 190℃로 20분간, 그리고 ⑤ 0 W에서 30분간 냉각시켰다. 냉각 후 PTFE 용기에 들어있는 분해액을 뚜껑달린 50 mL PE 튜브(Corning NY, Mexico)에 옮겨 담고, 7 mL가 될 때까지 HNO₃로 채우고 초순수로 25 g으로 채워 시험용액으로 사용하였다(Fig. 11).

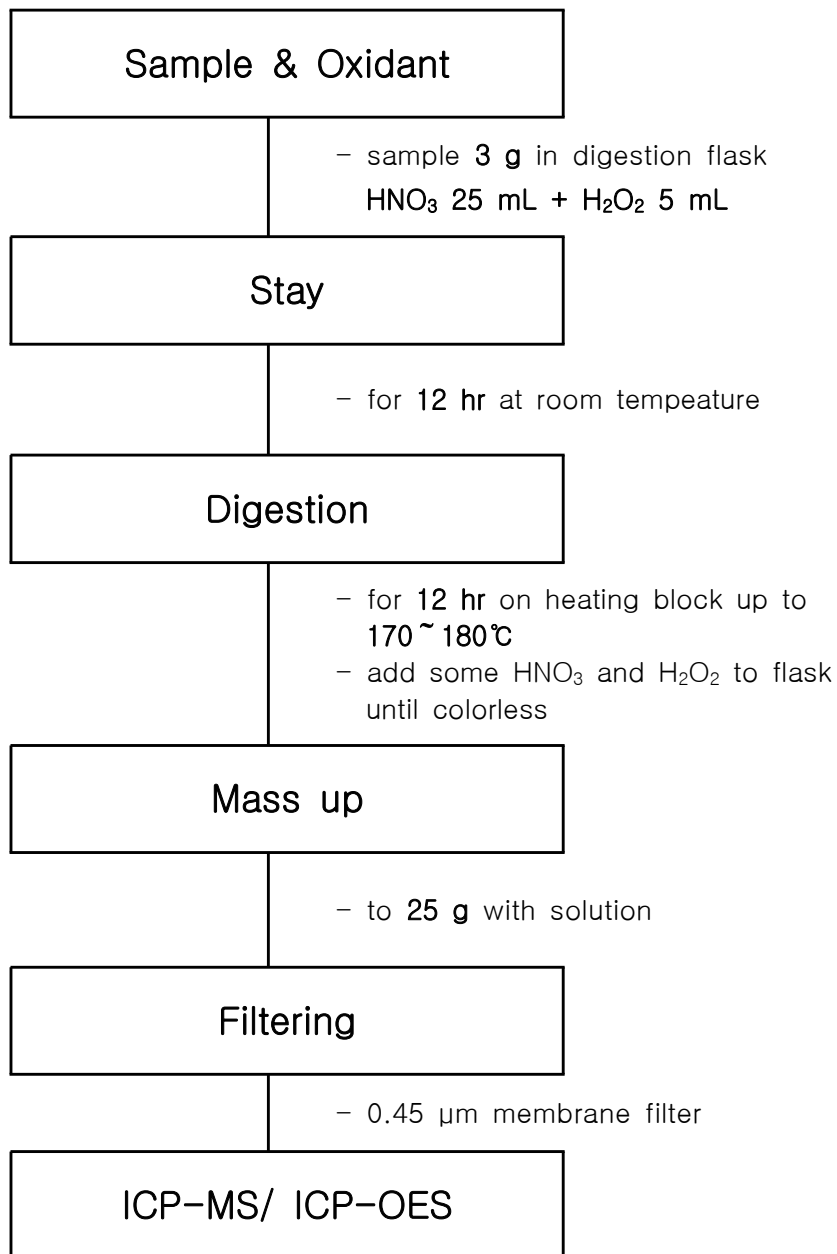


Fig. 9. Analysis method for wet digestion.

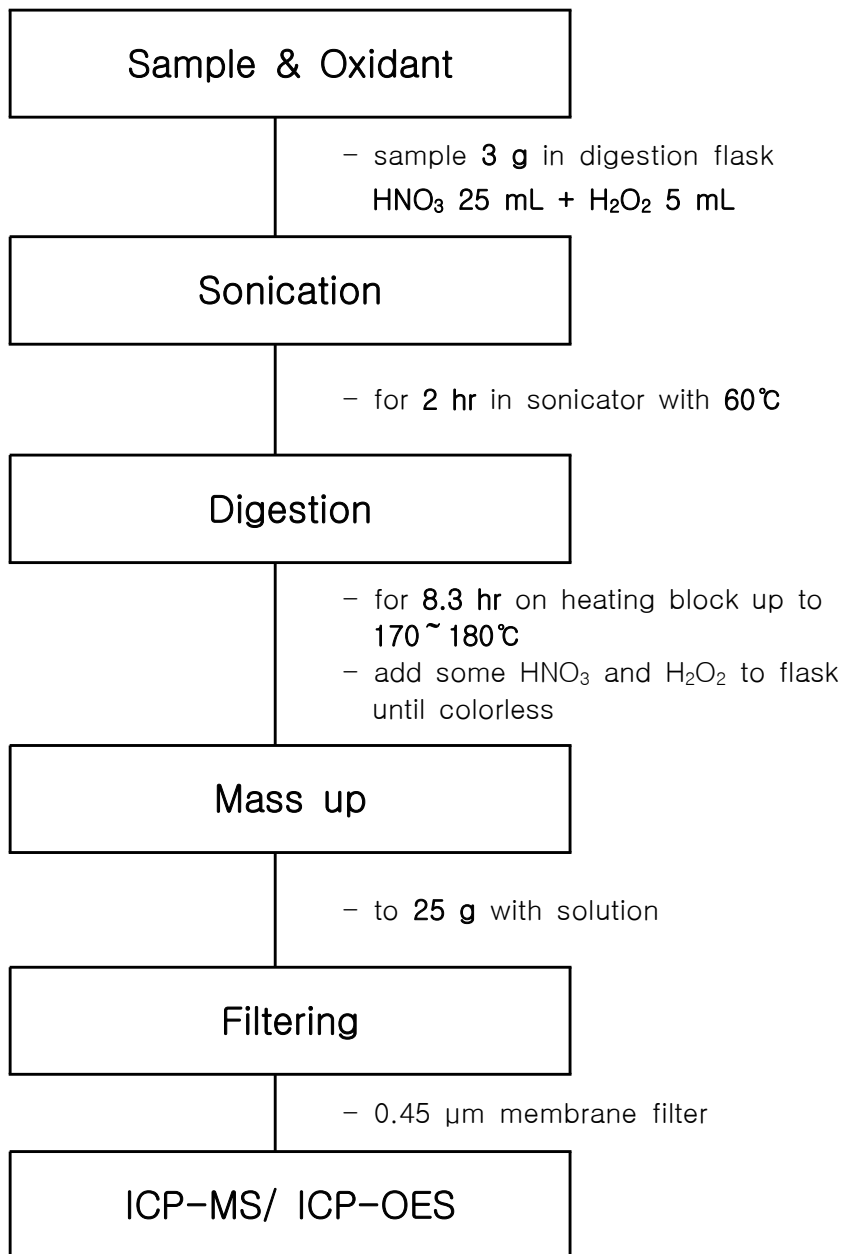


Fig. 10. Analysis method for wet digestion with sonication.

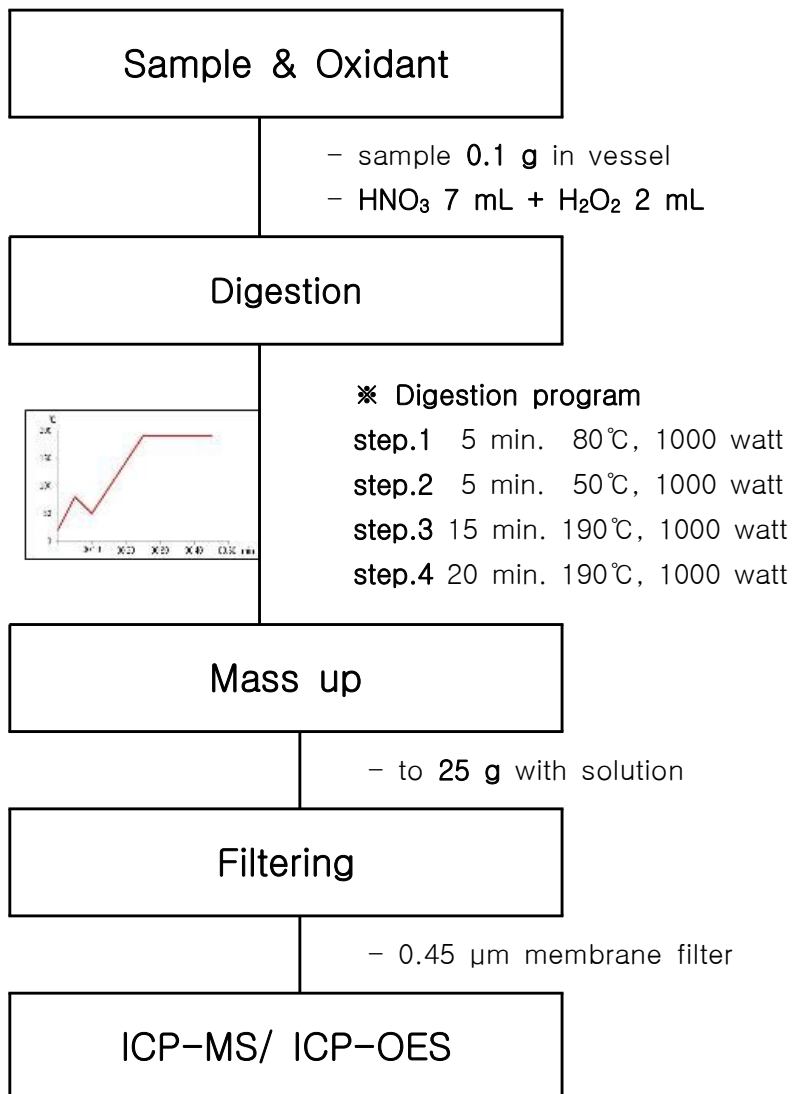


Fig. 11. Analysis method for microwave digestion.

나. 표준용액 제조

해조류에 포함되어있는 총비소 함량 분석을 위해 AnApure의 분석용 표준용액을 사용하여 stock solution을 제조하였다. 각 분해방법에 따른 시료 분해용액의 최종 용량을 고려하여 HNO₃ 농도를 19.6%로 산출하였으며, 분석용 표준용액도 19.6% HNO₃ 용액으로 채워 최종 농도가 10 ppm이 되도록 희석한 후 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 300, 500, 1000 µg/kg의 농도로 제조하여 매 분석 시 마다 사용하였다.

다. 검량선 작성

시료의 정량분석은 외부 검량선법을 사용하였다. 표준용액은 산분해 방법으로 전처리한 시료의 최종 HNO₃ 농도와 같은 조건을 유지하기 위해 19.6% HNO₃ solution (in H₂O)으로 희석하여 사용하였다. 검량선은 8개의 각각 다른 농도로 구하였고, 시료안의 모든 함량이 검량선내에 포함되게 설정하였다. 검량선 측정 시 다원자의 방해는 위해중금속의 몇몇 동위원소를 측정하면서 점검하였고, 시료 분해용액의 동위원소 비율도 점검 하였으며, 검량 표준용액은 장비와 시료를 모니터링 하기 위해 규칙적으로 분석하였다. 또한 blank (deionized water)는 전체 분석과정이 완료될 때까지 매 분석시마다 제조하여 시료의 손실이나 교차오염 여부의 확인을 위해 시료분석 중 일정한 주기로 분석하였다.

라. ICP-MS, OES 기기조건에 의한 총비소 함량 분석

각각의 분해방법에 따라 전처리된 시료용액은 식품공전(22)에 제시되어 있는 방법인 ICP-MS, ICP-OES 그리고 AAS-Graphite중 총 비소 함량 측정을 위해 ICP-OES와 ICP-MS를 이용하여 각각 Table 14와 Table 15의 조건으로 측정하였다. ICP (Inductively coupled plasma)는 1960년대 중반에 영국의 Albright & Wilson사의 Greenfield 등과 Iowa 대학의 Fassel 등에 의해서 OES (Optical emission spectrometry)에 사용하기 위해서 처음 개발되었으며(107), 현재에는 MS (mass specrometry)의 훌륭한 ion source 역할을 하고 있다.

ICP-OES는 일반적으로 분석 특성상 분석이외의 다른 물질의 화합물의 형태에

따른 간섭은 받지 않으나, 방출 스펙트럼에 영향을 받고 MS에 비해 높은 검출한계를 가지고 있다는 단점이 있다. ICP-MS는 높은 감도와 낮은 검출한계를 가지고 있어 미량원소의 분석에 용이하나, 질량분석의 특성상 화합물의 형태에 따른 간섭이 있다(20). 특히 As($m/z = 75$)의 검출에서 문제되는 ArCl^- ($m/z = 75$)와 같은 화합물은 분석에 사용되는 Ar gas와 시료에 함유되어 있는 NaCl과 반응으로 As와 같은 질량을 보여 ICP-MS를 이용한 분석에 방해인자로 작용할 수 있다.

그러나 ICP-MS의 DRC mode를 이용하면, ammonia (NH_3), oxygen (O_2), methane (CH_4), hydrogen (H_2), nitrogen oxide (NO) 및 carbon dioxide (CO_2)와 같은 특정 반응gas의 사용과, flow rate를 조절하여 방해인자를 제거 할 수 있다(88, 89, 94, 95, 108).

마. 분석법 검증

중금속 분석을 위한 분석법 검증을 위해 검출한계, 직선성, 정밀도, 정확도, 첨가 회수율 실험 등을 이용하여 유효성을 확인하였다. 또한 National Research Council Canada (NRCC)의 인증표준물질(Certified Reference Material)인 DORM-2 (Dogfish muscle; 18.0 ± 1.1 mg/kg, arsenobetaine 16.4 ± 1.1 mg/kg as As)와 NMIJ/AIST (National Metrology Institute of Japan / National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)의 Hijiki Seaweed (NMIJ CRM 7405-a)와 White rice flour (NMIJ CRM 7503-a)를 사용하여 회수율 실험을 실시하였다.

검출한계 (limits of detection; LOD)는 공실험의 표준편차를 검량선의 기울기로 나눈 값의 3배로, 정량한계 (limits of quantification; LOQ)는 10배로 하여 계산하였다(109).

Table 14. Operating conditions of ICP-OES

Instrumental parameters	
RF power (W)	1,150
Spray chamber	cyclonic type
Nebulizer	concentric type
Nebulizer gas flow (L/min)	0.7
Auxiliary gas flow (L/min)	0.5
Coolant gas flow (L/min)	12.00
Sample uptake flow (mL/min)	1.00
Torch	EMT Duo
Analytes and Measurement Mode	
Analyte	As
Wavelength (nm)	193.759

Table 15. Operating conditions of ICP-MS

Instrumental parameters	
RF power (W)	1,300~1,400
Spray chamber	cyclonic type
Nebulizer	concentric type
Nebulizer gas flow (L/min)	1.0~1.7
Auxiliary gas flow (L/min)	1~1.3
Coolant gas flow (L/min)	16.00
Sample uptake flow (mL/min)	1.00
Torch	Demountable
Interface cone	Platinum
Lens voltage (V)	5.5
Quadrupole chamber (torr)	1×10^{-6}
Reaction gas	Oxygen
Analytes and Measurement Mode	
Scanning condition	Dwell time 250 msec Sampling 3.9 pts/sec
Analysis mode	DRC mode, O ₂ 0.5 mL/min
Analytical mass (amu)	⁹¹ AsO ⁺ (as As)

2. 해조류 중 무기 및 유기비소화학종 분석법 연구

가. 비소화학종 분석을 위한 시료 전처리

비소화학종의 분리·분석을 위해 분말화된 건조시료 1g과 50% methanol 10 mL를 50 mL의 폴리에틸렌(PE) volumetric tube에 넣고, sonicator (Powersonic420, Hwasin Technology, Seoul, Korea)에서 최적화 된 60°C의 온도로 2시간 동안 초음파추출을 한 후 원심분리기(centrifuge MF 300, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)에 5980×g의 중력가속도로 10분간 원심분리를 실시하였다.

시료 중 비소화학종의 추출을 위해 사용되는 모든 추출용매는 표준물질의 조건과 유사성을 유지하기 위해 1% HNO₃용액으로 조제하여 사용하였다. 원심분리된 시료의 상등액을 0.45 μm nylon membrane filter (BDH, Leicester, UK)로 여과하여 50 mL의 폴리에틸렌(PE) volumetric tube에 취하였고, 이 추출과정은 2번 반복하였다. 이렇게 얻은 분리액을 혼합하여 추출용매와 함께 최종무게가 25 g이 되게 희석하였다. 비소화학종의 분리 및 정량분석을 위해서는 고성능액체크로마토그래피(HPLC, LC-VP series, Shimadzu, Kyoto, Japan)의 높은 분리능력과 ICP-MS의 높은 감도의 검출능력을 결합한 HPLC-ICP-MS를 이용하여 수행하였다(Fig. 12).

(1) 용매에 따른 비소화학종 추출

비소화학종의 분리·분석 실험을 위해 여러 연구에서 시료 추출용매로 초순수(110), 10% methanol(111), 50% methanol(112, 113) 그리고 90% methanol(114) 등이 주로 사용되었다. 위의 추출용매들은 주로 carbon을 포함하고 있는 유기비소종의 추출 효율을 높이기 위해 methanol이 사용되었다. 본 실험에서는 시료 중 비소화학종의 최적 추출조건을 확립하기 위해 초순수, 50% methanol 그리고 30% ethanol을 비교 용매로 선정하여 추출 효율실험을 진행하였다.

추출은 시료 약 1 g을 50 mL PE volumetric tube에 넣고 각각의 추출용매를 10 mL 주입하고 shaker를 이용하여 5분간 흔든 후 실온에서 sonicator를 이용하여 추출하여 HPLC-ICP-MS를 이용해 효율성을 비교·검토하여 최적 추출조건을 확립

하였다. 시료의 추출용액은 최종적으로 centrifuge를 이용하여 $5,980\times g$ 의 중력가속도로 원심분리 한 후 상정액은 $0.45\ \mu m$ filter로 여과한 후 비소화학종 분석을 위한 시험용액으로 하였다.

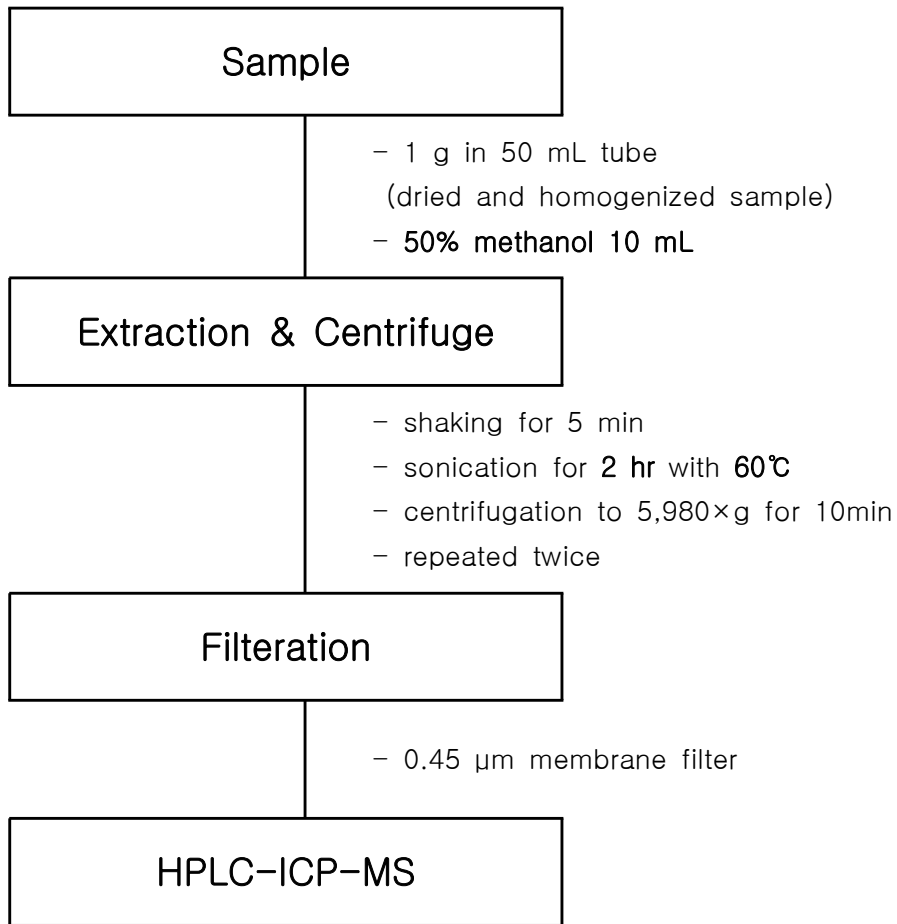


Fig. 12. Analysis method of arsenic speciation in seaweeds by filtration.

(2) 시간 조건에 따른 비소화학종 추출

해조류 시료 중 비소화학종 최적 추출조건을 확립하기 위해 온도 조건을 설정하고 시간에 따른 최적 추출조건을 확립하였다. 시료 1 g과 추출용매 10 mL를 50 mL PE volumetric tube에 넣고 shaker를 이용해 5분간 추출한 후 sonicator를 이용하여 초음파 추출을 하였다. 초음파 추출 시 추출시간은 30~240분의 범위 내에서 30분 단위로 설정하여 최적 추출조건을 확립하였다. 추출용매는 최종적으로 centrifuge를 이용하여 $5,980\times g$ 의 중력가속도로 원심분리 하였으며, 원심분리 한 후 상징액은 $0.45\ \mu\text{m}$ nylon membrane filter로 여과한 후 비소화학종 분석을 위한 시험용액으로 하였다.

(3) Solid phase extraction (SPE)와 membrane filter의 정제

비소 종분리를 위한 시료 전처리 과정은 총 비소 함량 측정을 위해 HNO_3 과 같은 산용액을 이용한 시료의 완전분해 과정을 거치지 않는다. 그렇기 때문에 생체시료 중 미량의 비소화학종들의 분리·분석을 위해서는 추출과정을 최소화해야 하나 최종 추출물질에 다량의 염이나 이물질들이 존재하여 nebulizer, torch, sampling, skimmer cone을 막아 분석하고자 하는 물질의 signal 강도를 비가역적으로 감소시킬 수 있다. 따라서 이들 이물질을 제거하면서 분석 값에 영향을 주지 않는 정제과정이 필요하다.

본 연구에서는 해조류 중 비소화학종 분석을 위한 전처리 과정에서 Oasis MAX cartridge (anion exchange)를 이용한 SPE 추출방법과 단순 $0.45\ \mu\text{m}$ membrane filter를 이용한 정제방법을 비교하였다.

SPE를 이용한 방법은 전처리된 시료를 Oasis MAX cartridge를 이용하여 비소화학종을 추출 및 여과하는 방법으로 시료 추출물을 원심분리 과정까지 마친 후 cartridge를 이용하여 분석하고자 하는 비소화학종을 선택 여과하는 방법이다. 우선 cartridge를 methanol 10 mL로 활성화시킨 후 50% methanol 10 mL를 넣은 후 cartridge가 마르기전에 전처리된 상징액 5 mL을 넣는다. 상징액 용리 후 5 mL 50% methanol을 추가로 흘려주어 추출된 용액을 회수하고 10 mL까지 50% methanol로 채워 최종량으로 한 다음 HPLC-ICP-MS 분석용 시료로 사용하였다(Fig. 13).

나. 표준용액 제조

해조류에 포함되어있는 비소화합종 및 함량을 분리·분석하기 위해 6가지 비소화합종 표준물질(As(III), As(V), AsB, AsC, MMA, DMA)은 동일한 조건을 유지하기 위해 1% HNO₃용액으로 희석하여 각각 1000 mg/kg stock solution을 제조한 후 이를 4℃ 이하에서 저장하였고(108), 매 분석 시마다 검량선 작성을 위한 표준용액으로 제조하여 사용하였다. 정량을 위한 표준용액은 각각의 화합물들을 혼합하여 10 mg/kg 농도로 희석한 후 10, 30, 50, 100, 300, 500 그리고 1000 µg/kg의 농도가 되도록 제조하였다.

다. 검량선 작성

각각의 비소화합종 분석을 위한 검량선 작성은 상기에서 제조한 표준용액을 사용하여 구하였다. 검량선은 7개의 다른 농도로 하였고, 시료안의 모든 물질이 검량선내에 위치하게 설정하였다. 측정은 정량분석 모드로 하였다. 다원자의 방해는 위해중금속의 몇몇 동위원소를 점검하면서 DRC mode를 이용하여 측정하였다. 검량 표준용액은 장비와 시료를 모니터하기 위해 규칙적으로 분석하였으며, 초순수(blank)를 시료의 손실이나 교차오염을 점검하기 위해 시료와 같이 자주 분석하였다. 측정용 blank는 시료 없이 상기에서 언급한 전체분석과정이 완료될 때까지 제조 및 분석되었다.

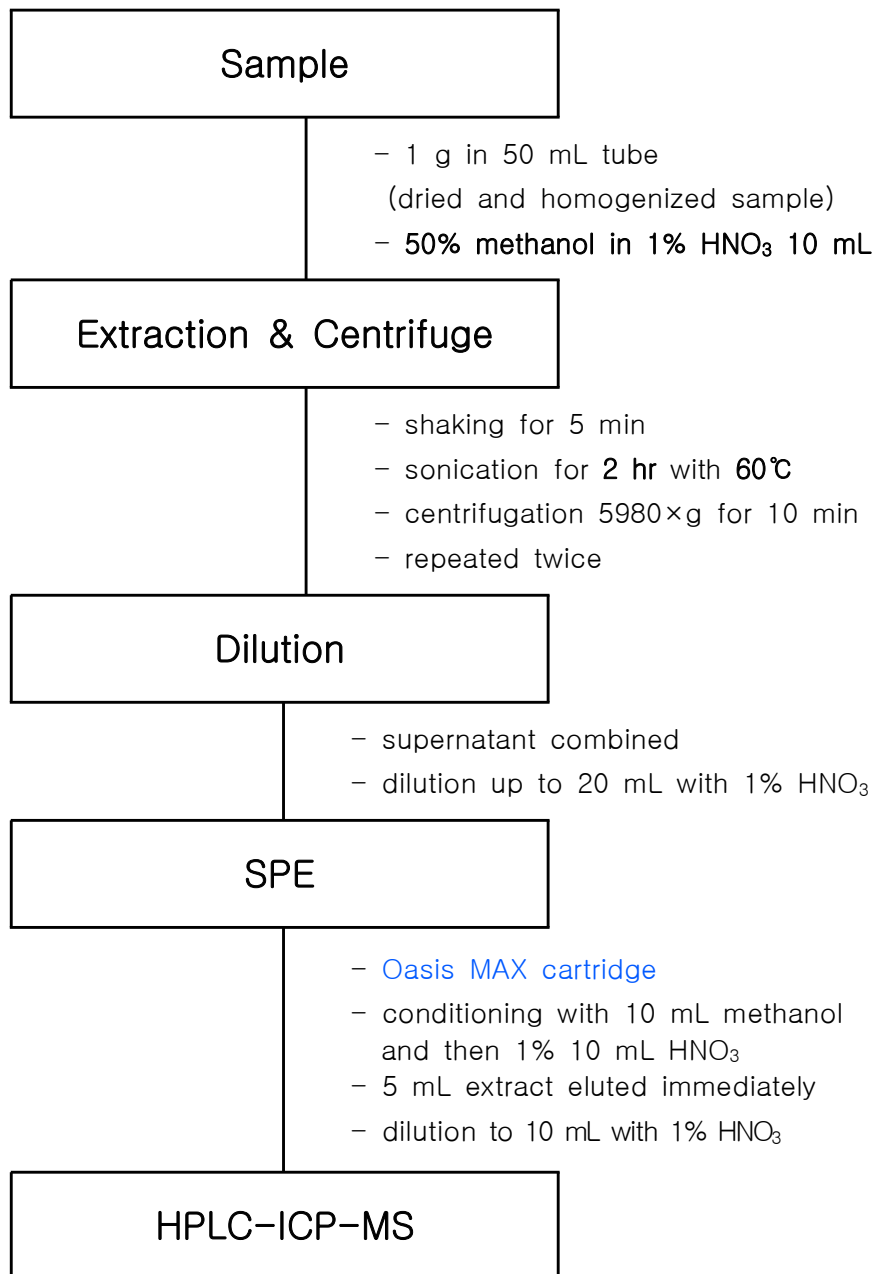


Fig. 13. Analysis method of arsenic speciation in seaweeds by SPE.

라. HPLC-ICP-MS에 의한 비소화합종 분리·분석

비소화합종은 화합물의 형태에 따라서 각각 다른 pH 범위를 가지고 있다(114, 115, Fig. 14). 본 연구에서 사용한 6가지 비소화합종 표준물질 중 zwitterion인 arsenobetaine을 제외한 나머지는 알칼리성 이동상 안에 음이온 형태로 존재할 경우 음이온 교환 column에 적합한 일정한 해리 범위를 가지고 있다(90, 115-117). 따라서 비소화합종의 분리를 위해 anion exchange column을 사용하였고, 측정을 위하여 HPLC의 분리 능력과 ICP-MS의 검출 능력을 이용하여 두 장비를 coupling 한 HPLC-ICP-MS를 Table 16의 조건으로 Fig. 15 시스템에 의해 분석하였다.

일반적으로 극성을 가지는 비소화합물의 분리·분석을 위해 ion-exchange chromatography의 이동상으로 sodium이나 potassium phosphate가 이동상으로 사용되나 이들 용매는 분석기기인 ICP (Inductive Coupled Plasma)의 skimmer나 sampler cone, 그리고 MS (Mass Spectrometry)의 dynode로 들어가는 auto-lens에 염화물형태의 이물질이 침착시켜 분석원소의 신호(signal)를 불안정하게 함으로써 검출기의 감도저하를 일으키는 문제점을 가지고 있다(116). 이러한 문제를 피하기 위해 위의 염기성 이동상을 사용하는 대신 acetate, phosphate, carbonate, bicarbonate, nitric acid, formic acid, phthalic acid 그리고 tertamethylammonium hydroxide가 이동상으로 사용되어졌다(115, 118). 그러나 그 중에서도 ammonium carbonate는 염화물과 같은 침착물질의 발생이 거의 없어 비소화합종의 분석을 위해 가장 많이 사용되고 있는 이동상이다(119).

따라서 본 연구에서는 비소화합종의 분리 분석을 위해 염의 침착과 같은 물리적인 방해요인의 배제로 검출감도의 저하를 방지하고 signal의 안정화를 위해 ammonium (NH_4^+)을 base로 한 이동상을 선택하여 비교하였다. 또한 시료 추출물은 표준물질과 유사 조건인 1% HNO_3 용액을 사용하여 시험용액으로 하였으며, 비소화합종 분리에 이동상으로 알칼리성인 ammonium을 이용하여 최적 분리 조건을 확립하였다. 시험용액은 HPLC-ICP-MS (ELAN 6100 DRC II, PerkinElmer, USA)를 사용하여 측정하였으며, 비소는 ArCl^+ (m/z 75)에 의한 간섭을 제거하기 위해 DRC mode (Dynamic reaction cell)에서 분석하였다(Fig. 16).

(1) 비소화합종 분리·분석을 위한 이동상 용리시간 조건 비교

비소화합종의 분리·분석을 위한 최적 용리시간 설정을 위해 이동상 A; ammonium bicarbonate (20 mM, pH 8.0)와 B; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)를 이용하여 gradient (서로 다른 용매를 이동상으로 하여 흘러주는 용매에 변화를 주어 분석하는 방법) 용리조건으로 하였으며, HPLC-ICP-MS를 이용하여 분석 결과를 확인하였다.

HPLC의 용리 조건은 본 연구에서 검출하고자 하는 6가지 비소화합종[As(III), As(V), AsB, AsC, MMA 그리고 DMA]이 모두 확인이 가능하고, 특히 분석 초기에 빠르게 분리되어 나오는 비소화합종인 AsC, AsB 그리고 As(III)의 peak를 구별할 수 있는 뾰족성(sharpness)이 있으며, 가장 늦게 용리되어 나오는 As(V)의 추출시간 단축할 수 있는 시간조건을 설정하기 위해 A용매와 B용매의 흘림 시간을 각각 Time I (6분, 10분), Time II (4분, 10분), Time III (3분, 10분) 그리고 Time IV (2분, 8분)으로 설정하여 비교 분석 하였다.

(2) 이동상 조건에 따른 비소화합종 분리·분석

비소화합종의 최적 분리·분석을 위한 이동상은 ① Mobile I [A용매; ammonium bicarbonate (20 mM, pH 8.0), B용매; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)], ② Mobile II [ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)] 그리고 ③ Mobile III [A용매; ammonium bicarbonate (2 mM, pH 8.0), B용매; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)] 등의 이동상을 6가지 비소화합종을 혼합하여 제조한 표준물질을 이용하여 비교 분석하였다.

이동상의 용리 조건은 ammonium bicarbonate [(NH₄)HCO₃; 2 mM, pH 8.0, in 1% methanol]를 A용매로, ammonium phosphate와 ammonium nitrate [(NH₄)₃PO₄, NH₄NO₃; 각 20 mM, pH 9.2, in 1% methanol]의 혼합 용매를 B용매로 하여 이동상의 기울기를 이용하는 gradient방법과 ammonium phosphate와 ammonium nitrate [(NH₄)₃PO₄, NH₄NO₃; 각 20 mM, pH 9.2, in 1% methanol]의 혼합 용매를

단일용액으로 사용한 isocratic (단일 용매를 이동상으로 일정하게 흘려주어 분석하는 방법) 용리조건으로 하여 비소화학종을 검출을 위한 최적조건을 설정하기 위해 비교 분석하였다.

마. 분석법 검증

비소화학종 분석을 위한 분석법 검증을 위해 검출한계, 정량한계, 직선성, 정밀도, 정확도 등을 확인하였으며, NMIJ/AIST (National Metrology Institute of Japan/National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)의 Hijiki Seaweed (NMIJ CRM 7405-a)를 이용하여 회수율 실험을 실시하였다.

검출한계(limits of detection; LOD)는 공실험의 표준편차를 검량선의 기울기로 나눈 값의 3배로, 정량한계(limits of quantification; LOQ)는 10배로 하여 계산하였다.

Table 16. Operating conditions of HPLC-ICP-MS

Descriptions	Conditions
As speciation	AsIII, AsV, DMA, MMA, AsC, AsB
Mobile phase A	2 mM Ammonium bicarbonate, pH 8.0
Mobile phase B	20 mM Ammonium nitrate 20 mM Ammonium phosphate, pH 9.2
Gradient profile	2 min at 100% A; step to 100% B for 8 mins
Flow rate	2 min at 1 mL/min A; step to 1.5 mL/min for 8 mL/min
Column	Anion exchange, Hamilton PRP X-100 (4.1 × 250 mm, 10 μm)
Column temp.	Ambient
Injection volume	100 μL
R.F. power	1400 W
Argon gas flow	
Nebulizer	1.0–1.07 L/min, Meinhard type a quartz
Auxillary	1.00~1.30 L/min
Plasma	17 L/min
Spray chamber	Cyclonic type
Torch	Demountable
Interface cones	Platinum
Quadrupole chamber	5×10^{-7} torr
Dynamic reaction cell gas flow	0.5 mL/min, O ₂
AsO/Mass	91

Compound	Formula	pK _a
Arsenious acid As(III)	$\begin{array}{c} \text{OH-As-OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	9.2
Arsenic acid As(V)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{OH-As=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	2.3 6.8 11.6
Monomethylarsonic acid (MMA)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}^3\text{-As=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	3.6 8.2
Dimethylarsinic acid (DMA)	$\begin{array}{c} \text{CH}^3 \\ \\ \text{O=As-OH} \\ \\ \text{CH}^3 \end{array}$	1.3 6.2
Arsenobetaine (Asbet)	$\begin{array}{c} \text{CH}^3 \\ \\ \text{CH}^3\text{-As}^+\text{-CH}_2\text{-C=O} \\ \quad \\ \text{CH}^3 \quad \text{OH} \end{array}$	2.2
Arsenocholine (Aschol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{-As}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	—

Source : Arsenic Speciation in Humans and Food Products (A Review)

Fig. 14. Formulas and pK_a of principal arsenic species.

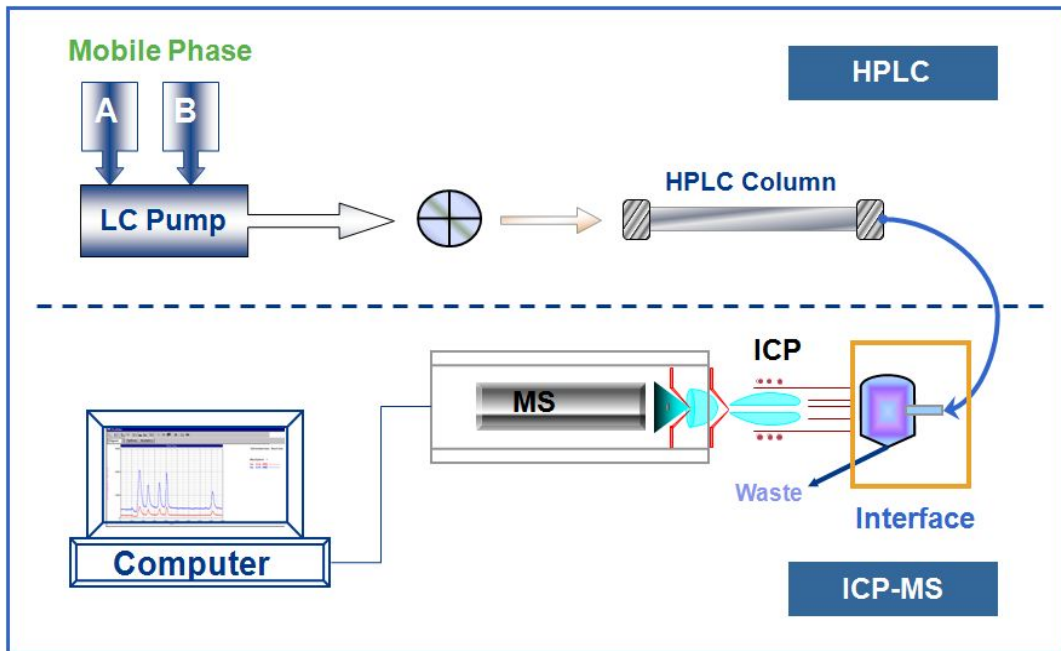


Fig. 15. HPLC-ICP-MS system.

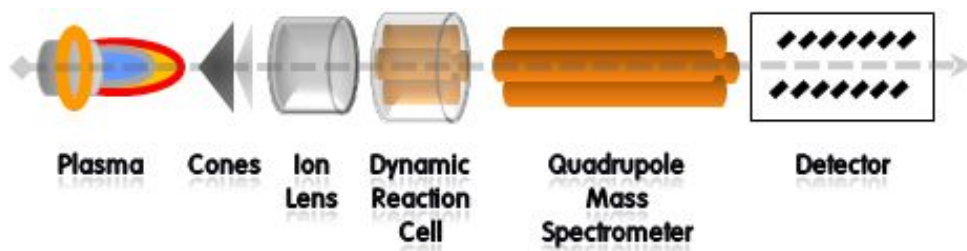


Fig. 16. DRC system in ICP-MS.

제4장 결과 및 고찰

제1절 해조류 중 총비소 분석법 확립

1. 시료 전처리 조건 최적화

본 연구에서는 일반적으로 사용되는 hot plate를 이용한 방법, 일반습식분해 시 초음파 추출기(sonicator)를 이용하여(48, 93, 94) 예비적으로 산과 분해반응을 연계한 방법 그리고 마이크로웨이브(microwave)를 이용한 분해방법을 각각 비교하였다.

초음파를 이용한 습식분해법은 분해용산을 이용하여 어떤 추가적인 조건 없이 단순한 가열을 통해 분해하는 일반습식분해 방법과 달리 초음파 추출장치(sonicator)를 이용하여 약 60°C 정도에서 분해 flask내에 시료와 산을 일정시간 동안(약 2시간) sonication 한 후 hot block을 이용하여 분해하는 것으로 Table 17의 회수율 실험결과와 같이 일반습식분해법보다 분해에 소요되는 전체 시간을 34시간에서 10시간으로 단축시킬 수 있었으며(Table 18), NMIJ의 CRM (Hijiki, 7405-a)를 이용한 회수율 결과 또한 99.3%로 3가지의 전처리 방법 중 가장 인증표준물질의 값에 근사한 결과를 보였다. 그러나 일반습식분해법과 초음파를 이용한 습식분해법은 분해과정 중 hot plate의 가열에 의한 분해용 산의 휘발로 산용액의 추가적 사용 및 개방형태의 분해방법으로 인한 외부 오염원으로부터 오염 가능성이 산재해 있다.

위 2가지 방법과 달리 microwave를 이용한 습식분해법은 밀폐시스템 내에서 분해가 진행되기 때문에 시료 및 teflon 튜브를 제외한 외부 환경에 대한 분석결과의 영향이 거의 없어 데이터의 정확성을 요할 수 있으며, 실험분야의 인력과 위험성 측면에서는 다른 습식분해법들과 비교 시 분석과정이 간단하고 안전성을 확보할 수 있는 장점이 있다. 또한 microwave는 시료가 밀폐된 환경에서 마이크로파의 조사로 튜브 내부 압력의 증가와 온도의 상승으로 분해반응이 활발히 진행되어

hotplate를 사용하는 다른 습식분해법보다 분해에 소요되는 시간을 1/5~1/12 정도로 단축시켜 효율적인 분해방법이라 할 수 있다.

이상에서 확인한 3가지 시료 분해방법의 적정성 및 유효성 검증을 위해 CRM (Hijiki, 7405-a)을 각각의 방법으로 분해하여 회수율을 확인한 결과 microwave를 이용한 분해방법은 96.7%로 확인되었고, 일반습식분해법과 sonication을 이용한 습식분해법의 회수율 결과가 각각 97.8%와 99.3%로 나타나 모든 결과가 $\geq 95\%$ 으로 미국 FDA(120)가 권고한 중금속 분석법 기준인 $100 \pm 20\%$ 범위를 만족시켰다.

따라서 본 연구에서는 해조류 중 총비소 함량 분석을 위한 시료전처리(분해)방법으로 3가지 습식분해법을 비교하였으며, 각각의 분해법들에서 회수율이 우수하여 모두 적절한 방법이라고 생각한다. 특히 microwave를 이용한 분해방법은 시료분해의 간편성, 실험과정의 안전성, 신속성, 비오염성 등의 측면에서 본 연구에서 시료 분석을 위해 사용하였다.

Table 17. Recovery test of the wet digestion method

Digestion methods	Wet-digestion	Wet-digestion with sonication	Microwave
Time (hr)	24	10	2
Dilution	3 g → 25 g	3 g → 25 g	0.5 g → 25 g
Oxydant	HNO ₃ 200 mL + H ₂ O ₂ 5 mL	HNO ₃ 80 mL + H ₂ O ₂ 5 mL	HNO ₃ 7 mL + H ₂ O ₂ 2 mL
Temperature	170~180°C	170~180°C	190°C
Recovery (%)	97.8±2.3 ^a	99.3±1.9	96.7±2.1

^aMean±SEM (n=3)

Table 18. Total digestion time of sonication with the wet digestion method

Sonication time at 60°C (hr)	Digestion time (hr)		Total digestion time (hr:min)	HNO ₃ (mL, each sample)
	First (dark brown fume)	Second (clear)		
0	4	20	24:00	200
0.3	2	12	14:30	120
1	1	9	11:00	100
2	0.3	8	10:30	80
3	0.3	8	11:30	80
4	0.3	8	12:30	80

2. 총 비소 분석조건 최적화

해조류의 예비실험 결과 arsenic (As)는 7 mg/kg 이하 수준의 농도를 보였다. 따라서 본 연구에서는 검출한계가 높아 고농도의 분석에 적합한 ICP-OES 보다는 검출한계가 낮고 저농도의 분석에 적합한 ICP-MS를 분석장비로 선택하였다(Fig. 17).

ICP-MS (Inductively coupled plasma-mass spectrometry; Elan 6100 DRC II / Perkin-Elmer SCIEX, Norwalk, CT, USA)를 이용한 중금속의 측정 시 가장 문제 시 되는 것은 간섭물질에 의한 측정값의 불확실성이다. ICP-MS는 다른 원자흡광 광도분석장치들과 달리 원소가 가지고 있는 질량을 측정함으로써 시료 중에 들어 있는 농도를 알 수 있다. 그러나 이런 분석적 특성으로 인해 Table 19과 같은 동위 원소들에 대한 방해받기가 쉬운 단점을 가지고 있다. 특히 해조류와 같은 바다 유래 시료들의 분석에 있어서 Na은 분석 성분의 감도를 저하시키고(89), 분석 시 사용되는 argon ($m/z = 40$) gas는 calcium ($m/z = 40$)과 같은 동위원소를 가지고 있어 이들의 정확한 측정을 방해한다. 분석용 시료에서는 시료를 포함하고 있는 매질이나 용매에 따라 영향을 받는데 액체시료에서는 oxygen과 반응하여 $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ 을 생성하여 iron의 검출을 방해하고, HCl용매의 존재 하에서는 $^{40}\text{Ar}^+$ 와 ^{35}Cl 이 결합하여 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ($m/z = 75$)와 같은 arsenic의 간섭물질을 생성하며, 유기용매 존재 시 $^{40}\text{Ar}^+$ 와 ^{12}C 가 결합하여 $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ ($m/z = 52$)과 같은 chromium을 생성한다. ICP-MS는 이들 간섭물질의 제거하기 위해 전처리 시 선택적으로 매트릭스를 제거하기 보다는 DRC mode (Dynamic reaction gas cell)에서 NH_3 (89, 115)를 주입하여 그 flow rate를 조절하면서 이들 방해물질을 제거해준다(88).

본 연구에서는 DRC mode를 이용하여 반응 gas로 O_2 를 주입하여 HCl에 의한 Pb, Cd, Al 등의 방해인자를 제거하였고, 특히 동위원소가 존재하지 않는 $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$ ($m/z = 91$)를 생성시켜 이를 As값으로 측정하였다(94).

ICP-OES (Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry; Varian Model 730-ES simultaneous CCD, Wyndmoor, PA, USA)는 ICP-MS와 달리 원자

가 가지고 있는 질량을 측정하는 방식이 아니라 nebulizer에 의해 분무된 시료가 고온의 plasma에 의해 증발되고 이때 이 에너지가 원자에 전해지게 되면서 원자나 이온이 들뜬상태가 되고, 이들이 다시 광자를 방출하면서 바닥상태로 내려오는 과정을 거치게 된다. 이때 이 방출된 광자들은 원자마다 특징적인 에너지를 가지고 있고, 농도에 비례하는 이 에너지를 측정하여 정량하는 방식이다(107).

ICP-OES에서의 가장 큰 방해인자는 spectrum 간섭이다. 이것은 plasma의 다원자 특성에 의해 발생하는데, ICP는 plasma로 들어가는 거의 대부분의 원소를 들뜨게 하는 능력을 가지고 있고 특히 매우 복잡적이고 고농도인 시료에서 spectra는 많아지게 되어 중복이 될 가능성이 크다. 이러한 문제점은 Table 20에서 최적의 파장을 선택하고 Table 21에서와 같이 파장의 중복을 피함으로써 선택적으로 분석할 수 있다. 다른 방법으로는 Table 22에서 분석원소의 측정에 영향을 미치는 간섭원소의 측정값에 대한 보정계수를 산출하여 측정신호를 보정함으로써 해결할 수 있다(107, 121). 이는 10 mg/kg의 Al이 포함된 시료의 As를 파장 193.696 nm에서 분석하는 경우 Al은 분석 시 간섭물질로 작용하고, 100 mg/kg의 Al은 위의 파장에서 As 1.3 mg/kg의 함량으로 거짓 측정된다. 따라서 As의 측정값보다 0.13 mg/kg이 더 높게 측정되므로 이를 측정값에서 보정해 줌으로써 값을 구할 수 있었다.

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	IA	IIA	IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	VIIIA	IB	IIB	IIIB	IIIB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	VIIIA
1	1 H																		2 He
2	3 Li 0.005 2.5 0.01	4 Be 0.0005 0.5 0.001											5 B 10 0.05 5 0.1	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
3	11 Na 0.01 25 0.02	12 Mg 0.001 0.25 0.002											13 Al 27 0.001 10 0.002	14 Si 28 5 10 10	15 P 31 1 25 2	16 S 32 5 25 0.002	17 Cl 35 1 25 0.004	18 Ar	
4	19 K 39 0.05 50 0.1	20 Ca 40 0.5 0.005 0.005 0.25 0.01	21 Sc	22 Ti 48 5 0.001 0.0005	23 V 51 5 0.0005 0.001	24 Cr 52 5 0.0005 0.001	25 Mn 55 1 0.0005 0.001	26 Fe 56 5 0.0005 0.002	27 Co 59 5 0.0005 0.002	28 Ni 59 5 0.0005 0.002	29 Cu 64 5 0.0005 0.001	30 Zn 65 5 0.0005 0.001	31 Ga 70 5 0.0005 0.001	32 Ge 73 5 0.0005 0.001	33 As 75 5 0.0005 0.001	34 Se 79 5 0.0005 0.001	35 Br	36 Kr	
5	37 Rb 85 0.001 5 0.002	38 Sr 88 0.5 0.001 0.25 0.001	39 Y	40 Zr 91 5 0.0005 0.001	41 Nb 93 5 0.0005 0.001	42 Mo 96 5 0.0005 0.001	43 Tc	44 Ru 101 5 0.0005 0.001	45 Rh 103 5 0.0005 0.001	46 Pd 106 5 0.0005 0.001	47 Ag 108 5 0.0005 0.001	48 Cd 112 5 0.0005 0.001	49 In 115 5 0.0005 0.001	50 Sn 119 5 0.001 0.001	51 Sb 122 5 0.0005 0.001	52 Te 128 5 0.0005 0.001	53 I	54 Xe	
6	55 Cs 133 0.0005 2000 0.001	56 Ba 137 0.5 0.0005 0.001	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu		
7	87 Fr	88 Ra	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr		

0.1 g ICP-OES sample mass
50 ml ICP-OES prep volume
1 Solution dilution to run on ICP-OES
500 Typical ICP-OES dilution factor

0.05 g ICP-MS sample mass
100 ml ICP-MS prep volume
1 Solution dilution to run on ICP-MS
2,000 Typical ICP-MS dilution factor

The detection limits are theoretical best case scenarios assuming there are no spectral interferences affecting the best isotopes or wavelengths for a given element. For any given determination, the actual method detection limit can be an order of magnitude higher or more. Use this as a guide, not absolute information.

To convert µg/L to ppm wt, use the following calculation:
[sol conc (µg/L) * prep vol (L)] / sample mass (g) = sample concentration in ppm wt (mg/kg)

Legend:
ICP-OES Solution DL (µg/L) — 5
ICP-MS Solution DL (µg/L) — 0.005
ICP-OES Solid DL (ppm wt) — 2.5
ICP-MS Solid DL (ppm wt) — 0.01

Source : Evans analytical group

Fig. 17. ICP-OES and ICP-MS detection limit.

Table 19. Some common plasma/matrix/solvent-related polyatomic spectral interferences seen in ICP-MS

Element/isotope	Matrix/solvent	Interference
$^{39}\text{K}^+$	H_2O	$^{38}\text{ArH}^+$
$^{40}\text{Ca}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^+$
$^{56}\text{Fe}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
$^{51}\text{V}^+$	HCl	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
$^{75}\text{As}^+$	HCl	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
$^{28}\text{Si}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$
$^{44}\text{Ca}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$
$^{55}\text{Mn}^+$	HNO_3	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$
$^{48}\text{Ti}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	H_2SO_4	$^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	H_3PO_4	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{24}\text{Mg}^+$	Organics	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	Organics	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
$^{65}\text{Cu}^+$	Minerals	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	Minerals	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	Seawater	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$

Source : Practical Guide to ICP-MS, 2013 (83)

Table 20. Wavelengths, estimated instrument detection limits, and recommended calibration

Analyte	Wavelength (nm)	Estimated Detection Limit ($\mu\text{g/L}$)	Calibrate to (mg/L)
Aluminum	308.215	45	10
Antimony	206.833	32	5
Arsenic	193.759	53	10
Barium	493.409	2.3	1
Beryllium	313.042	0.27	1
Boron	249.678	5.7	1
Cadmium	226.502	3.4	2
Calcium	315.887	30	10
Cerium	413.765	48	2
Chromium	205.552	6.1	5
Cobalt	228.616	7.0	2
Copper	324.754	5.4	2
Iron	259.940	6.2	10
Lead	220.353	42	10
Lithium	670.784	3.7	5
Magnesium	279.079	30	10
Manganese	257.610	1.4	2
Mercury	194.227	2.5	2
Molybdenum	203.844	12	10
Nickel	231.604	15	2
Phosphorus	214.914	76	10
Potassium	766.491	700	20
Selenium	196.090	75	5
Silica (SiO_2)	251.611	26 (SiO)	10
Silver	328.068	7.0	0.5
Sodium	588.995	29	10
Strontium	421.552	0.77	1
Thallium	190.864	40	5
Tin	189.980	25	4
Titanium	334.941	3.8	10
Vanadium	292.402	7.5	2
Zinc	213.856	1.8	5

Source : F. Lagarde et al. (108)

Table 21. On-line method interelement spectral interferences arising from interferants at the 100 mg/L level

Analyte	Wavelength (nm)	Interferant
Ag	328.068	Ce, Ti, Mn
Al	308.215	V, Mo, Ce, Mn
As	193.759	V, Al, Co, Fe, Ni
B	249.678	None
Ba	493.409	None
Be	313.042	V, Ce
Ca	315.887	Co, Mo, Ce
Cd	226.502	Ni, Ti, Fe, Ce
Ce	413.765	None
Co	228.616	Ti, Ba, Cd, Ni, Cr, Mo, Ce
Cr	205.552	Be, Mo, Ni
Cu	324.754	Mo, Ti
Fe	259.940	None
Hg	194.227	V, Mo
K	766.491	None
Li	670.784	None
Mg	279.079	Ce
Mn	257.610	Ce
Mo	203.844	Ce
Na	588.995	None
Ni	231.604	Co, Ti
P	214.914	Cu, Mo
Pb	220.353	Co, Al, Ce, Cu, Ni, Ti, Fe
Sb	206.833	Cr, Mo, Sn, Ti, Ce, Fe
Se	196.099	Fe
SiO ₂	251.611	None
Sn	189.980	Mo, Ti, Fe, Mn, Si
Sr	421.552	None
Tl	190.864	Ti, Mo, Co, Ce, Al, V, Mn
Ti	334.941	None
V	292.402	Mo, Ti, Cr, Fe, Ce
Zn	213.856	Ni, Cu, Fe

Source : F. Lagarde et al. (108)

Table 22. Potential interferences analyte concentration equivalents arising from interference at the 100 mg/L level

Analyte	Wavelength (nm)	Interferant									
		Al	Ca	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Ti	V
Aluminum	308.215	-	-	-	-	-	-	0.21	-	-	1.4
Antimony	206.833	0.47	-	2.9	-	0.08	-	-	-	0.25	0.45
Arsenic	193.696	1.3	-	0.44	-	-	-	-	-	-	1.1
Barium	455.403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berllium	313.042	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.05
Cadmium	226.502	-	-	-	-	0.03	-	-	0.02	-	-
Calcium	317.933	-	-	0.08	-	0.01	0.01	0.04	-	0.03	0.03
Chromium	267.716	-	-	-	-	0.003	-	0.04	-	-	0.04
Cobalt	228.616	-	-	0.03	-	0.005	-	-	0.03	0.15	-
Cooper	324.754	-	-	-	-	0.003	-	-	-	0.05	0.02
Iron	259.940	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-
Lead	220.353	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Magnesium	279.079	-	0.02	0.11	-	0.13	-	0.25	-	0.07	0.12
Manganese	257.610	0.005	-	0.01	-	0.002	0.002	-	-	-	-
Molybdenum	202.030	0.05	-	-	-	0.03	-	-	-	-	-
Nickel	231.604	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Selenium	196.026	0.23	-	-	-	0.09	-	-	-	-	-
Sodium	588.995	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-
Thallium	190.864	0.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vanadium	292.406	-	-	0.05	-	0.005	-	-	-	0.02	-
Zinc	213.856	-	-	-	0.14	-	-	-	-	-	-

Source : EPA method 6010B (122)

3. 해조류의 총 비소 분석법 검증

본 연구에서 사용되는 시료 전처리 및 분석방법의 유효성 검증을 위한 구성요건은 Precision, Linearity, Range, Calibration, Accuracy, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ) 등이 있다(123).

가. Precision(정밀성)

반복실험을 통한 일치도를 확인하는 시험으로 일정 기간을 두고 5회 측정하여 동일한 값이 나오는지 확인하였다. 정밀성의 정도는 변동계수(CV; coefficient of variation)%로 나타냈으며, As의 변동계수는 각각 0.91%로 확인되었다(Table 23).

나. Linearity(직선성)

측정 원소별로 5 point를 측정하여 직선성을 확인하였으며, As는 $R^2=0.999$ 이상의 우수한 직선성을 보였다. 또한, 분석하고자 하는 시료의 농도에 해당되는 검량선의 범위가 적당한지 확인하였다(Fig. 18).

다. Accuracy(정확성)

참값(true value)과 측정값(measured value)과의 일치도를 확인하는 시험을 진행하였다. 분석 표준물질인 NMIJ 7405-a (Hijiki seaweed)을 분석하여 회수율을 확인한 결과 As가 96.7%였다(Table 24).

라. LOD(검출한계), LOQ(정량한계)

Limits of detection (LOD)는 시료 중의 분석원소를 검출할 수 있는 최저 농도이고, Limits of quantification (LOQ)는 LOD에 희석배수를 고려한 시료에 대한 농도 한계로, 각각 10회 반복측정된 blank의 표준편차를 검량선의 기울기로 나눈 값의 3배와 10배 값으로 구했다. 본 연구에서 As의 LOD는 $0.028 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으며, LOQ는 $0.095 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 확인되었다(Table 23).

Table 23. Validation of analytical methods followed via linearity, LOD, LOQ, precision and spike recovery measurements for total arsenic

Analyte	Linearity (R ²)	LOD ^a (μg/kg)	LOQ ^b (μg/kg)	Precision (CV%)
As	0.9997	0.028	0.095	0.91

^aLOD: limit of detection ($3 \times \sigma / \text{slop}$ of calibration curve; n=10)

^bLOQ: limit of quantification ($10 \times \sigma / \text{slop}$ of calibration curve; n=10)

Table 24. Validation of analytical methods followed via analysis of CRM (NMIJ 7405-a; Hijiki seaweed)

Analyte	Certified value (mg/kg)	Observed value (mg/kg)	Recovery (%)
As	35.8±0.9	34.6±0.7	96.7±2.1 ^a

^aMean±SEM (Mean: average, SEM: standard error of the mean, n=3)

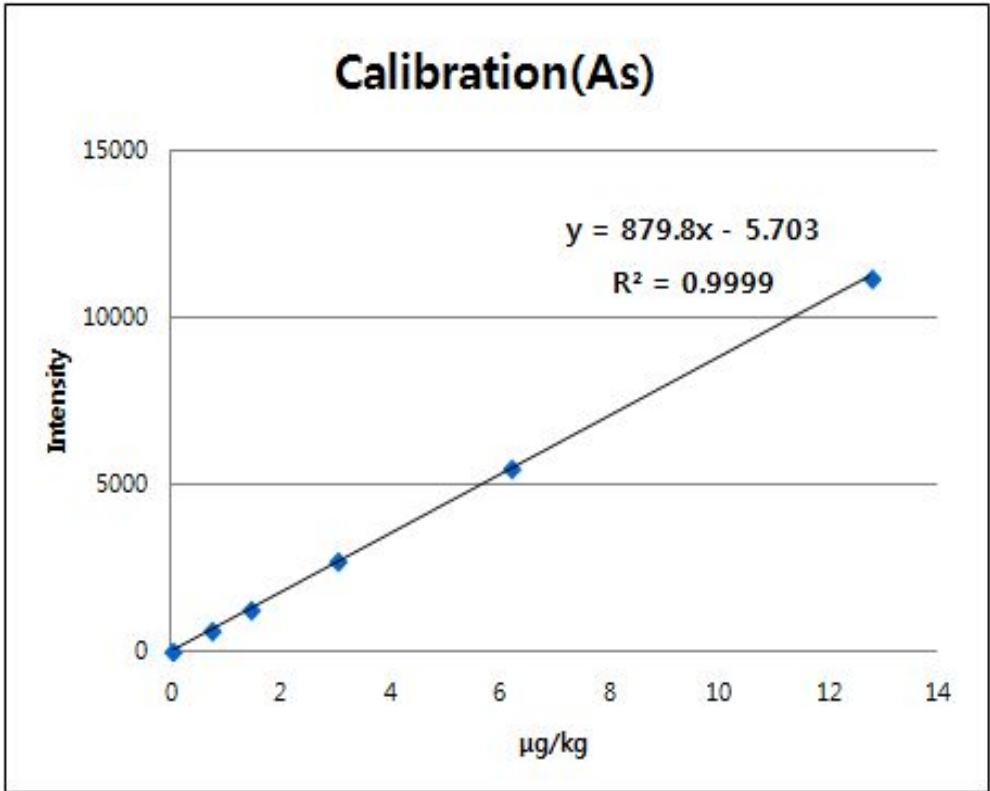


Fig. 18. Linearity of arsenic standards.

마. 정도관리(QA/QC)

(1) 내부정도관리

인증표준물질(CRM)인 NIST의 Oyster tissue를 통한 시료의 매질을 고려하여 이미 농도를 알고 있는 분석대상 시료를 포함한 표준물질을 활용하여 분석결과에 대한 신뢰도를 확보하여 유효성을 검증하였다. 인증표준물질의 5회 측정 결과 값은 Table 25와 같다.

Table 25. Internal quality control data

Item	As (mg/kg)
Certified	7.65
1	7.92
2	7.70
3	7.89
4	7.81
5	7.65
Mean ^a	7.79
SEM ^b	0.12
RSD (%)	1.50

^aMean: average, ^bSEM: standard deviation/ \sqrt{n}

(2) 외부정도관리

외부정도관리를 통한 국제적인 분석의 정확성을 검증하기 위해 FAPAS (UK, food)의 정도관리 프로그램에 참가하여 중금속 분석결과에 대한 신뢰도를 확보하였으며(Table 26), 분석결과에 대한 z-score를 Fig. 19에 나타내었다. 인증물질에 대한 As의 정도관리 분석결과는 +0.3의 z-score를 보여 통과 기준인 $|ZI| < 2$ 를 만족하였다.

Table 26. Result of laboratories participated in FAPAS (UK)

Programs	Chilli Powder
Analytes	Pb, As
Result	$ ZI < 2$ (z-score : Pb -0.2, As +0.3)

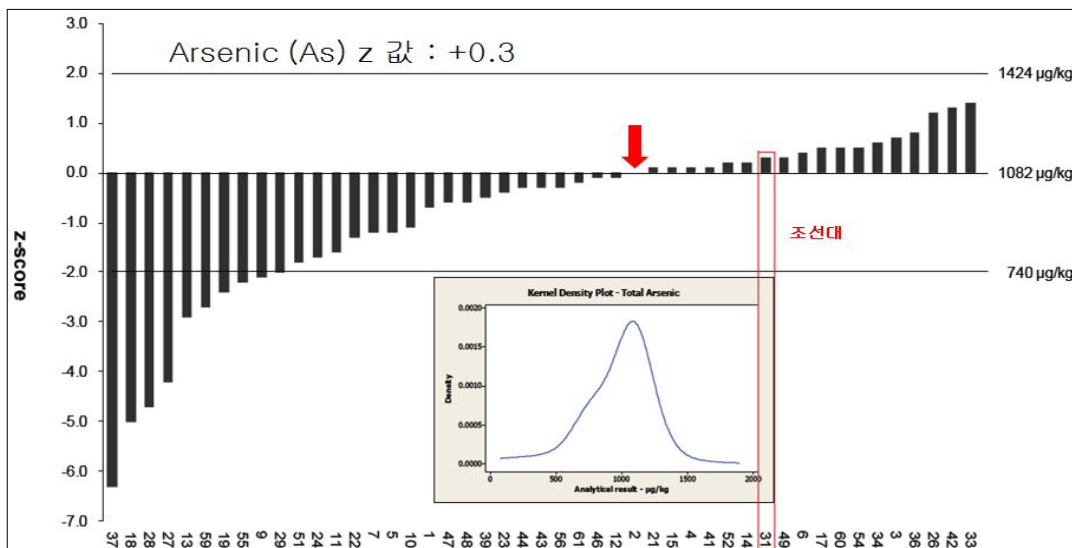


Fig. 19. The result of arsenic (FAPAS)

제2절 해조류 중 무기 및 유기비소화학종 분석법 확립

1. HPLC-ICP-MS에 의한 비소화학종 분석법

가. 시료 전처리 조건 최적화

(1) 추출 용매

시료 중 비소화학종의 최적 추출조건을 설정하기 위하여 첫 번째로 용매에 따른 추출 효율을 비교하였다. 추출 효율비교는 DORM-2 (CRM, NIST)를 이용하여 인증값의 정확도 보다는 ICP-MS의 검출 감도를 직접 비교하여 평가하였다. 추출 용매는 H₂O와 50% methanol 그리고 30% ethanol로 하였고, 이상의 모든 추출용매는 1% HNO₃에 희석하여 제조한 후 비교실험을 하였다.

검출 감도의 비교 결과 50% methanol의 검출 감도가 6.64×10^6 으로 다른 비교대상 용매보다 컸다(Fig. 20). 따라서 본 연구에서는 해조류 시료중의 비소화학종 추출을 위한 최적 추출용매로 50% methanol (in 1% HNO₃)을 사용하였다.

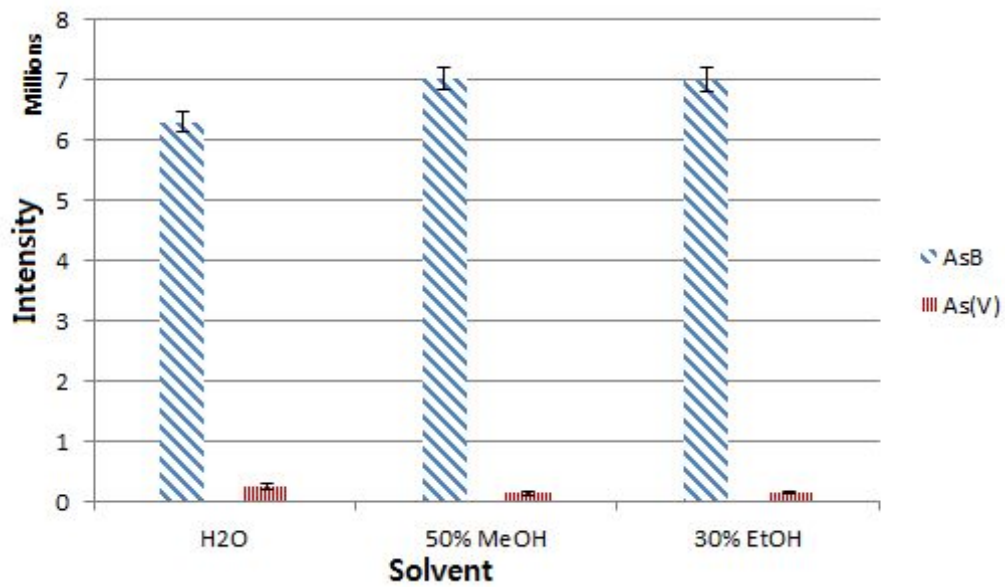


Fig. 20. Extraction efficiency of arsenic compounds by solvent. Recovery was calculated from the DORM-2 (n=3).

(2) 추출 시간

위의 용매추출 조건에 따른 50% methanol (in 1% HNO₃) 용액을 이용하여 60℃로 온도 조건을 설정하였고, 추출 시간에 따른 최적 추출조건을 NMIJ CRM인 7503-a (White rice flour; total 0.098±0.007 mg/kg, As(III) 0.0711±0.0029 mg/kg as As, As(V), 0.0130±0.0009 mg/kg as As, DMA, 0.0133±0.0009 mg/kg as As)를 사용하여 확립하였다. 시간에 따른 회수율 결과는 Table 27과 같았으며, 최적 추출 시간은 120분(2시간)으로 CRM을 이용한 회수율이 90~105%로 시료 중 비소화학종 추출을 위한 가장 적합하였다.

본 연구에서는 60℃의 온도 조건에서 1 g의 분말화된 건조시료를 50% methanol 용액으로 5분간 흔들여 준 후 2시간 동안 초음파 추출을 하였고, 이를 0.45 μm membrane filter를 이용하여 여과한 후 비소 중분리를 위한 분석 시료로 사용하였다.

Table 27. Recovery test of arsenic species by sonication time

Time (min)	As(III) (71.1 μg/kg)		DMA (13.3 μg/kg)		As(V) (13.0 μg/kg)	
	Measure (μg/kg)	Recovery (%)	Measure (μg/kg)	Recovery (%)	Measure (μg/kg)	Recovery (%)
30	45.9	64.5	12.9	96.6	1.1	8.6
60	54.2	76.1	13.7	103.2	7.9	63.1
90	59.3	83.4	13.4	100.4	14.6	60.5
120	73.2	103.0	13.9	104.5	11.9	91.8
150	75.3	105.9	12.4	93.0	12.4	83.9
180	78.1	109.9	12.2	91.4	11.2	86.5
240	78.5	110.4	11.3	84.6	11.8	90.8

*n=3

(3) 여과 방법

NMIJ CRM인 7503-a (White rice flour; total 0.098 ± 0.007 mg/kg, As(III) 0.0711 ± 0.0029 mg/kg as As, As(V), 0.0130 ± 0.0009 mg/kg as As, DMA, 0.0133 ± 0.0009 mg/kg as As)를 Oasis MAX cartridge (6 cc)로 여과 및 추출하는 Solid phase extraction (SPE)방법과 $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter를 이용하여 단순여과 하는 방법을 비교하였다.

SPE방법은 용매를 이용한 시료 추출 시 간단한 cartridge를 이용하여 비소화학종 이외의 불순물을 최대한 제거하는 방법으로 비소화학종이 가지고 있는 이온적 특성을 이용한 여과이다. Ion exchange cartridge는 일반적으로 strong cation exchange (SCX) cartridge와 strong anion exchange (SAX) cartridge가 사용된다. 그러나 As(III), As(V), MMA 및 DMA 4종의 비소는 SCX cartridge로 용리 할 경우 추출 효율 저하 문제가 있다. DMA는 산성 환경에서 양이온으로 존재하여 용리되지 않고 남아있지만 As(V)와 MMA는 거의 모든 pH에서 음이온으로 존재한다. 또한 As(III)는 $\text{pK}_a > 9$ 이기 때문에 중성 pH에서는 분리되지 않고, 만약 SCX cartridge에 남아있다 하더라도 용출되기 어렵다. 따라서 SCX cartridge는 비소화학종의 분리에 적합하지 않다. 그러나 이와 반대로 SAX cartridge는 이들 4종류의 비소에 대한 선택적 분리가 가능해 비소화학종 분리를 위해 적합하다(90, 115). 따라서 본 연구에서는 anion exchange cartridge인 Oasis MAX cartridge를 이용하여 추출효율을 비교하였다.

비소화학종의 분리·추출을 비교하기 위해 Oasis MAX cartridge와 $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter 방법으로 전처리한 시료를 각각 HPLC-ICP-MS로 측정된 결과 SPE 방법에서는 As(III)가 $73.3 \mu\text{g/kg}$ 으로 103.1%의 회수율을 보였으며, DMA와 As(V)가 각각 $13.5 \mu\text{g/kg}$, $12.3 \mu\text{g/kg}$ 으로 확인되었으며, 회수율도 각각 101.8%와 94.4%로 확인되었다(Table 28). 일반적으로 사용되고 있는 여과 방법인 $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter를 이용한 방법에서는 As(III), DMA 그리고 As(V)의 회수율이 각각 103.0%, 104.5% 그리고 91.8%로 확인되었다.

두 방법에 따른 회수율 비교 결과 SPE방법이 membrane filter를 이용한 방법보다 약간 좋은 결과가 확인되었으나, 실험의 간편성과 정확성 측면에서 실질적인 결과 값의

차이는 크지 않았다. 따라서 본 연구에서는 추출용매를 0.45 μm membrane filter를 이용하여 여과 한 후 HPLC-ICP-MS로 측정하였다.

Table 28. Comparison of SPE and membrane filter

Method	As(III) ^a (71.1 µg/kg)		DMA ^b (13.3 µg/kg)		As(V) ^c (13.0 µg/kg)	
	Measure ^d (µg/kg)	Recovery (%)	Measure (µg/kg)	Recovery (%)	Measure (µg/kg)	Recovery (%)
SPE	73.3±0.5	103.1±0.7	13.5±0.2	101.8±1.2	12.3±0.1	94.4±0.9
Membrane filter	73.2±0.2	103.0±0.2	13.9±0.1	104.5±1.0	11.9±0.1	91.8±0.6

^aAs(III): arsenite, ^bDMA: dimethylarsenate, ^cAs(V): arsenate, ^dMean±SEM (n=3)

나. HPLC-ICP-MS 기기조건 설정

(1) 비소화학종 분리·분석을 위한 이동상 용리시간 조건 설정

4가지 조건의 이동상 용리시간을 비교하였다. 각각의 용리시간 조건은 A용매 및 B용매가 각각 'Time I' (6분, 10분), 'Time II' (4분, 10분), 'Time III' (3분, 10분) 그리고 'Time IV' (2분, 8분)으로 하였다. 각 시간조건 분석 결과 'Time IV' (2분, 8분) 조건의 경우 검출하고자 하는 6가지 비소화학종[As(III), As(V), AsB, AsC, MMA 그리고 DMA]이 모두 확인되었으며, 초기에 분석되는 AsC, AsB 그리고 As(III)의 3가지 비소화학종이 모두 잘 분리되었다(Fig. 21).

또한 A용매의 용리시간이 6분에서 2분으로 짧아지면서 B용매에 의해 용리되어 나오는 DMA, MMA 그리고 As(V)의 분석 시간이 단축 되어 총 분석시간을 10분 이내로 단축시킬 수 있었다(Table 29). 또한 가장 빨리 용리되어 나오는 AsC의 경우 최소 40초가 소요되고 초기 3가지 비소화학종이 모두 2분 이내에 검출 되므로 A용매의 용리 시간을 2분 이내로 설정하는 것에는 큰 의미가 없었다.

결과적으로 본 비교실험을 통해 각각의 용리시간 조건이 6가지 비소화학종의 분리능력에 대한 적합성을 판단하는 기준으로는 적합하다고 할 수 없으나, 다량의 시료를 분석해야 할 경우 총 분석시간의 단축을 위해 용리시간 조건을 'Time IV' (2분, 8분)으로 설정할 경우 보다 효율적일 것이라 생각한다.

Table 29. Comparison for each elution time of mobile phase solvents

Method Species	Time I (sec)	Time II (sec)	Time III (sec)	Time IV (sec)
AsC	43	43	42	42
AsB	56	55	52	50
As(III)	94	89	90	87
DMA	183	160	175	157
MMA	527	419	456	405
As(V)	759	630	560	495

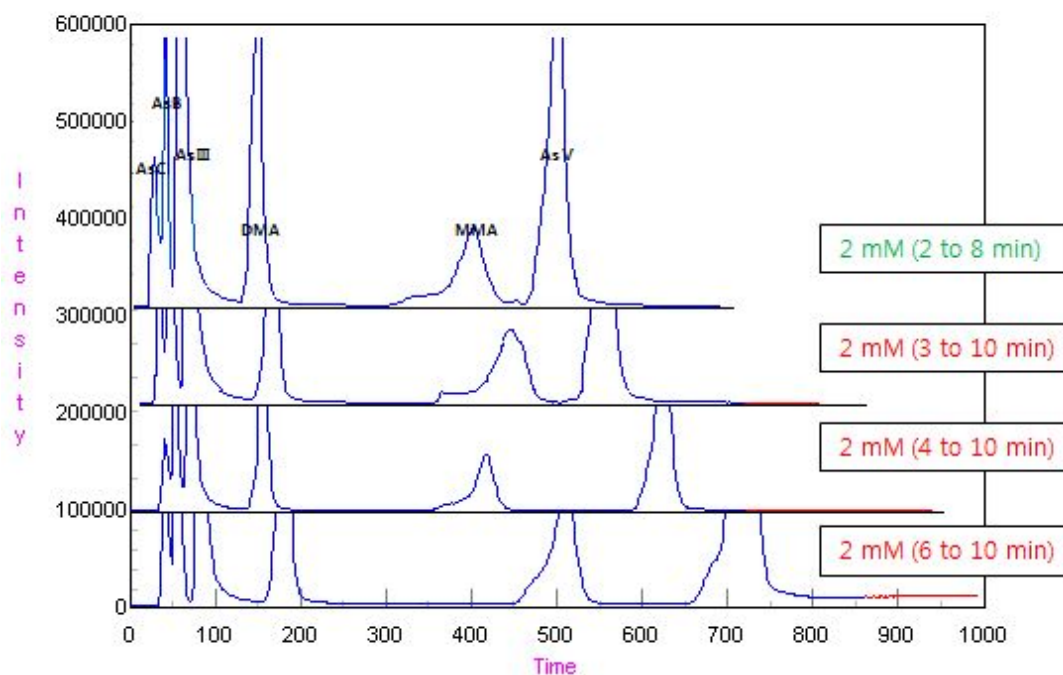


Fig. 21. The chromatogram of comparison for each elution time of mobile phase solvents (by gradient).

(2) 비소화합종 분리·분석을 위한 이동상 조건 설정

'Mobile I' [A용매; ammonium bicarbonate (20 mM, pH 8.0), B용매; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)]를 이동상으로 하여 6가지 비소 표준물질을 분석할 경우 Fig. 22와 같이 chromatogram상 peak의 분리가 잘 되어 각각의 화합물에 대한 정성 및 정량이 가능하였다.

그러나 Fig. 23과 같이 시료 분석 사이 column의 세척을 위해 A용매로 일정시간 흘려준 뒤 공시료(blank)로 오염 유무를 확인하는 과정 중 As(V) peak 위치에서 알수 없는 유령피크(ghost peak)가 확인되었으며, Fig. 24와 같이 A용매의 흘려주는 시간이 증가할수록 ghost peak의 크기도 증가하였다.

이렇게 확인된 ghost peak이 이동상 용매에 의한 오염인지를 확인하기 위해 'Mobile II' [ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)]를 이동상으로 하는 isocratic 용리조건으로 As(V)의 존재 여부를 비교 실험한 결과, ammonium bicarbonate의 주입이 없는 상황에서는 As(V)는 검출되지 않았다(Fig. 25). 이러한 ghost peak의 검출은 Falk 등(124)과 Sloth 등(125)의 연구에서도 농도를 달리한 ammonium bicarbonate를 gradient 조건으로 분석 시 ammonium bicarbonate의 column내 농축에 의한 결과라는 보고가 있다. 본 연구에서도 ammonium bicarbonate가 이동상으로 사용되는 gradient 조건에서 As(V)가 검출되었으나, 이를 사용하지 않는 isocratic 조건에서는 검출되지 않아 As(V)의 검출은 ammonium bicarbonate의 농축에 의한 결과라는 주장과 일치하였다.

그러나 ghost peak의 방해를 제거하기 위해 isocratic 용리조건을 사용할 경우 Fig. 26와 같이 arsenocholine (AsC)과 arsenobetaine (AsB)의 peak 겹침에 의해 상대적으로 낮은 검출감도를 가지는 AsC가 검출되지 않고, 최종 분석완료 시 까지 gradient 용리조건보다 상대적으로 많은 시간이 소요되는 단점을 보였다. Hymer와 Caruso (119)도 isocratic 용리조건은 많은 연구자들이 분석에 이용하는 방법이나 분석시간(retention time)이 많이 소요되는 단점이 있다고 하여 본 연구 결과와 유사하였다.

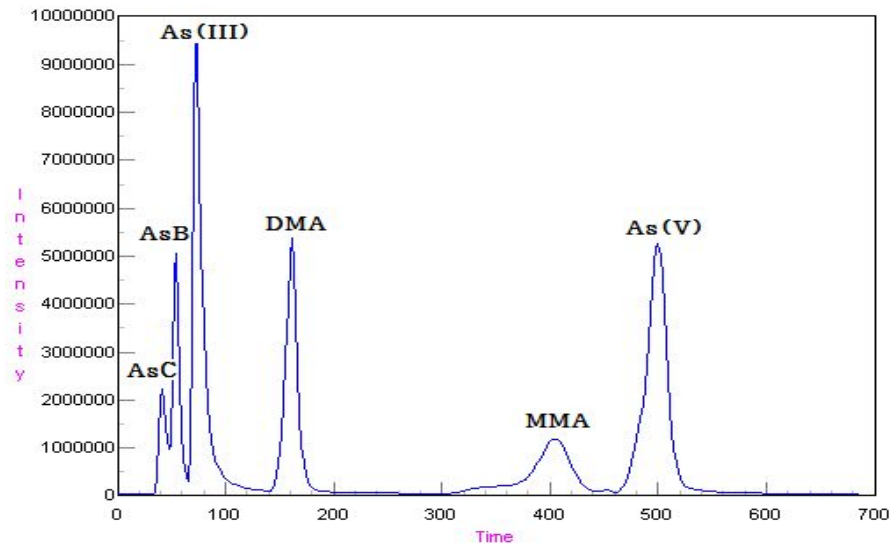


Fig. 22. Chromatogram of six arsenic species using a 'Mobile I' by gradient (5 mg/kg).

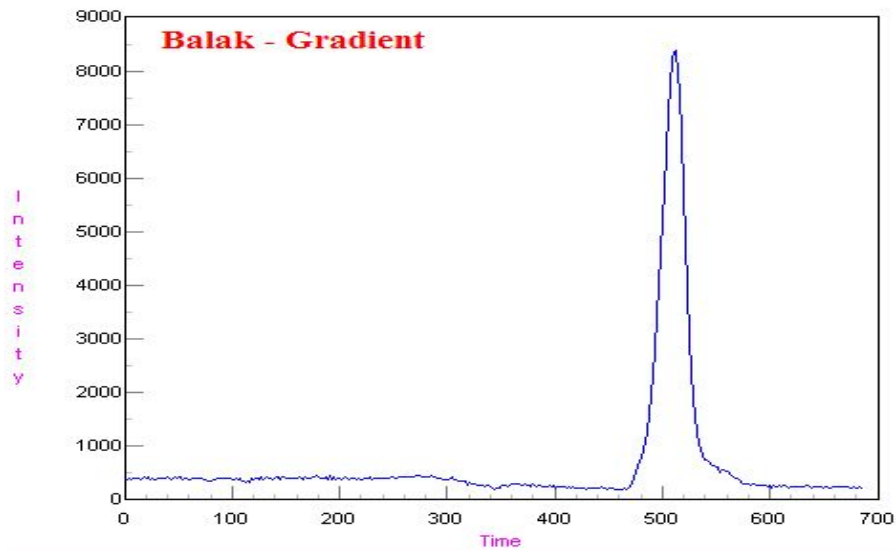


Fig. 23. Chromatogram of blank using a 'Mobile I' by gradient.

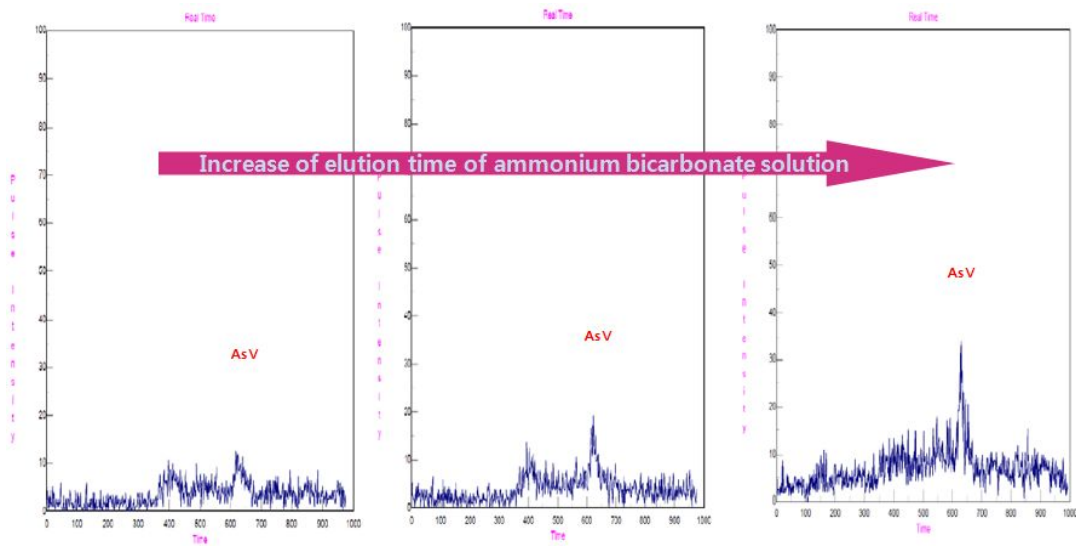


Fig. 24. Accumulation of As(V) according to elution time.

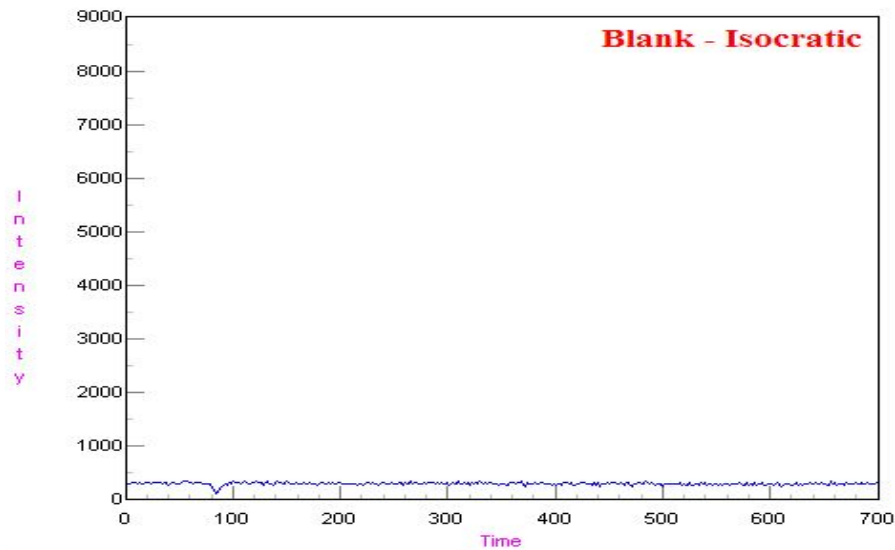


Fig. 25. Chromatogram of blank using a 'Mobile II' by gradient.

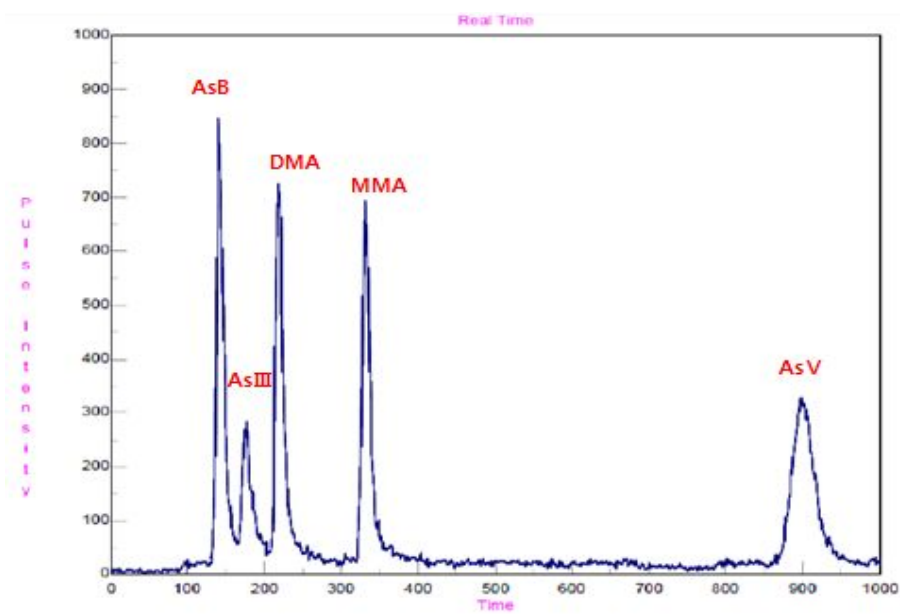


Fig. 26. Chromatogram of six arsenic species using a 'Mobile II' by isocratic ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$).

따라서 비소화학종을 분리·분석하기 위해 gradient 용리조건을 이용하면서 ammonium bicarbonate의 축적에 따른 ghost peak의 방해요인을 제거하기 위해 최등(91)과 같이 ammonium bicarbonate의 농도를 낮춘 'Mobile III' [A용매; ammonium bicarbonate (2 mM, pH 8.0), B용매; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)]를 이동상으로 하였다. 'Mobile III'를 이용한 분석 검량선의 상관계수는 Fig. 27과 같이 최소 0.99이상으로 직선성을 보여주었고, Fig. 28과 같이 총 6가지 비소 표준물질의 peak이 잘 분리 되었으며, Fig. 29과 같이 ghost peak도 검출 되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 해조류 시료중의 비소화학종을 분리·분석하기 위한 이동상으로 'Mobile III' [A용매; ammonium bicarbonate (2 mM, pH 8.0), B용매; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)]를 사용하였다.

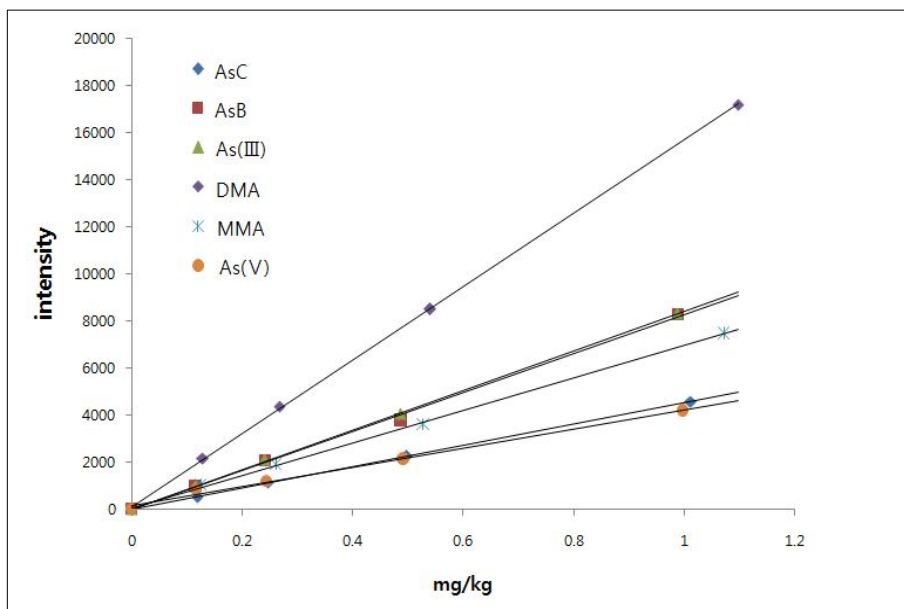


Fig. 27. Calibration curve of six arsenic species.

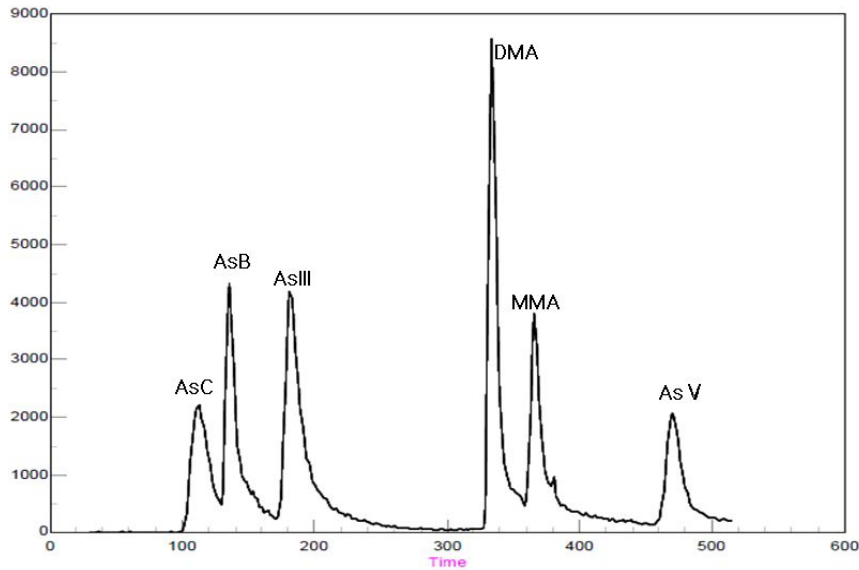


Fig. 28. Chromatogram of six arsenic species using a 'Mobile III' separating mixed standard solution ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$).

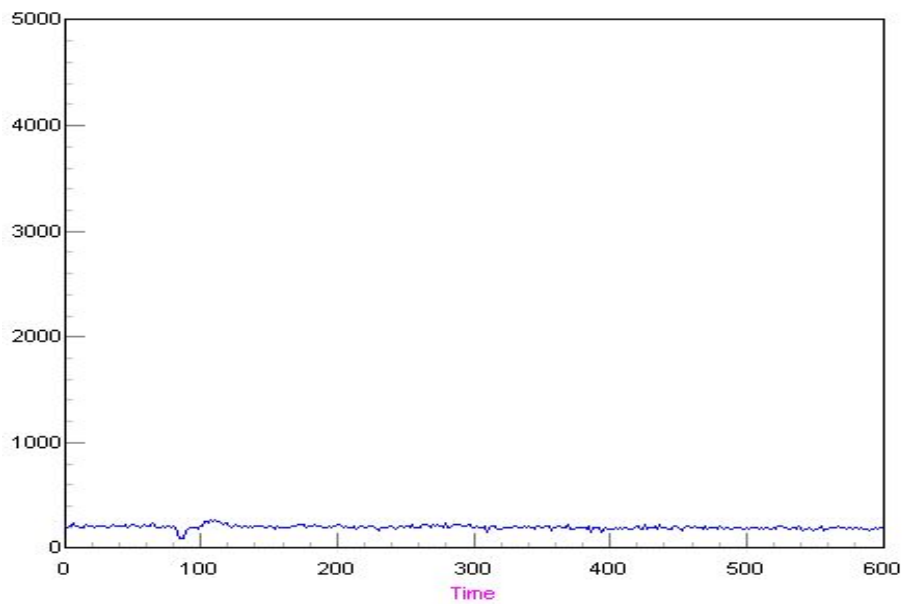


Fig. 29. Chromatogram of blank using a 'Mobile III' by gradient.

(3) DRC 조건 확립

해조류와 같은 바다 유래 시료를 ICP-MS로 분석하여 미량원소의 함량을 측정하는 과정에서 실질적으로 가장 큰 문제는 시료 자체에 존재하는 염분의 침착으로 sampling interface 부분의 물리적인 오염 현상이 발생한다. 또한 Cl과 Ar의 결합으로 인한 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ($m/z = 75$) 등과 같은 분석하고자 하는 원소와 유사질량을 가진 동위원소들의 방해 등의 화학적인 간섭 현상이다. 윤 등(115)은 ICP-MS를 이용하여 비소화학종을 분석할 경우 Cl이온으로 인해 비소의 질량 $75(m/z)$ 와 $\text{Ar}^{40}\text{Cl}^{35}$ 의 중복 가능성을 완전히 배제할 수 없는 문제점이 있다고 하였다. ICP-MS에서의 이런 간섭물질의 생성을 해결할 수 있는 기술적인 방법으로 DRC (Dynamic Reaction Cell) mode가 이용되며, 반응 기체로는 NH_3 (89)와 O_2 (94) 등이 사용된다.

본 연구에서는 중금속 원소의 함량 측정을 위한 분석 시 유사질량 화학종의 As^+ ($m/z = 75$)에 대한 Ar이나 Cl의 간섭을 최소화하기 위해 DRC mode에서 반응 기체로 O_2 를 사용하여 0.5 mL/min의 flow rate로 설정하여 AsO^+ ($m/z = 91$)를 측정하여 As값으로 하였다.

다. 분석법 검증

본 연구에서 사용되는 시료전처리 및 분석방법의 유효성 검증을 위한 구성요건은 Precision, Linearity, Range, Calibration, Accuracy, Detection Limit, Quantitation Limit 등이 있다(122).

(1) Precision(정밀성)

반복실험을 통한 일치도를 확인하는 시험으로 시료를 일정 기간을 두고 5회 측정하여 동일한 값이 나오는지 확인하였다. 정밀성의 정도는 변동계수(CV; coefficient of variation)%로 나타냈으며, As(III), As(V), AsB, AsC, MMA, DMA의 CV%는 각각 2.81, 3.37, 2.64, 2.99, 2.76, 2.11%로 확인되었다(Table 30).

(2) Linearity(직선성)

비소화학종 표준용액을 농도별 제조하여 5 point로 직선성을 확인하였으며, As(III), As(V), AsB, AsC, MMA, DMA 모두 $R^2=0.999$ 이상의 우수한 직선성을 보였다. 또한, 분석하고자 하는 시료의 농도에 해당되는 검량선의 범위가 적당한지 확인하였다(Fig. 26).

(3) Accuracy(정확성)

참값(true value)과 측정값(measured value)과의 일치도를 확인하는 시험을 진행하였다. 회수율을 측정하기 위해서 As(III), As(V), AsB, AsC, MMA, DMA를 시료에 표준용액을 첨가(spiking)하여 회수율을 측정하였다. 측정된 농도는 시료에서 검출된 농도를 고려하여 계산하였으며, 각각 99.4, 94.5, 102, 94.8, 107, 97.7%로 확인되었다(Table 30).

(4) LOD(검출한계), LOQ(정량한계)

Limits of detection ($LOD=3 \times \text{standard deviation} / \text{slope of calibration curve}$; 검출한계)는 시료 중의 분석원소를 검출할 수 있는 최저 농도이고, Limits of

quantification ($LOQ=10 \times \text{standard deviation} / \text{slop of calibration curve}$; 정량한계)는 LOD에 희석배수를 고려한 시료에 대한 농도한계로, 각각 10회 반복 측정된 blank의 표준편차를 검량선의 기울기로 나눈 값의 3배와 10배 값으로 구했다(80). 본 연구 6가지 비소화합종 As(III), As(V), AsB, AsC, MMA 그리고 DMA의 LOD는 $0.061 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.025 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.024 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.060 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.018 \mu\text{g}/\text{kg}$, 그리고 $0.028 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으며, LOQ는 $0.205 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.083 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.081 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.199 \mu\text{g}/\text{kg}$, $0.061 \mu\text{g}/\text{kg}$, 그리고 $0.093 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 확인되었다(Table 30).

Table 30. Validation of analytical methods followed via linearity, LOD, LOQ, precision and accuracy measurements for arsenic species

As species	Linearity (R ²)	LOD ^a (µg/kg)	LOQ ^b (µg/kg)	Precision (CV%)	Accuracy (%)
AsIII ^c	0.9995	0.061	0.205	2.81	99.4
AsV ^d	0.9991	0.025	0.083	3.37	94.5
AsB ^e	0.9993	0.024	0.081	2.64	102
AsC ^f	0.9991	0.060	0.199	2.99	94.8
MMA ^g	0.9994	0.018	0.061	2.76	107
DMA ^h	0.9996	0.028	0.093	2.11	97.7

^aLOD: limit of detection ($3 \times \sigma / \text{slop}$ of calibration curve; n=10), ^bLOQ: limit of quantification ($10 \times \sigma / \text{slop}$ of calibration curve; n=10), ^cAs(III): arsenite, ^dAs(V): arsenate, ^eAsB: arsenobetaine, ^fAsC: arsenocholine, ^gMMA: monomethylarsonate, ^hDMA: dimethylarsinate

라. 측정불확도

(1) 측정 모델의 설정

(가) 다음 식에 따라 입력량 X_i 에 대한 측정대상(출력량) Y 의 종속관계를 수학적 항으로 표시한다.

$$- Y = f (X_1, X_2, \dots, X_N)$$

- 두 측정값의 직접 비교의 경우 $Y = X_1 + X_2$ 로 한다.

(나) 각각의 입력 추정치 X_i 로부터 산출되는 출력 추정치에 관련되는 불확도 기여량 $u_i(y)$ 를 계산하기 위해서는 입력 추정치 X_i 의 변화에 의해 출력 추정치 y 가 받는 영향의 정도를 나타내는 감도계수를 알아야 하며, 측정 모델의 설정은 감도계수의 산출을 용이하게 한다. 그러나 수학적 항으로 측정 모델을 설정하기 불가능한 경우 출력 추정치에 대한 불확도 기여량을 별도의 방법으로 산출할 수 있다면 측정 모델의 수식적 표현을 생략할 수 있다.

(다) 보정실시

모든 유효한 보정을 식별하고 적용한다.

(2) 측정불확도 요인 파악

(가) 측정결과의 불확도 성분에 기여하는 모든 요인을 시험방법을 검토하여 파악한다.

(나) 시험의 불확도 인자를 검토할 때 다음의 사항은 우선적으로 파악한다.

- ① 시험방법의 적용
- ② 사용된 장비
- ③ 표준물질

- ④ 실무자의 숙련도
- ⑤ 시료의 상태
- ⑥ 시험 환경 조건
- ⑦ 기타, 시험방법 상에서의 여러 가지 가정의 영향량

시험의 불확도 인자를 검토할 때 각각의 성분이 출력값의 불확도에 미치는 정도를 종합적으로 파악하기 위해 Fig. 30 및 Table 31에 도식된 불확도 추정 절차 개요와 불확도 추정 데이터 정리 개요를 미리 전반적으로 이해하여 실시하여야 한다.

(3) 측정불확도 결과

분석 시료의 측정불확도 확인 결과는 Fig 31와 같았다. 측정불확도 확인을 위해 미역시료를 대상으로 측정하였고, 확장불확도는 0.307 mg/kg으로 추정되었다. 이 추정결과를 측정 대상 시료 모두에 적용하여 결과값을 산출하였다.

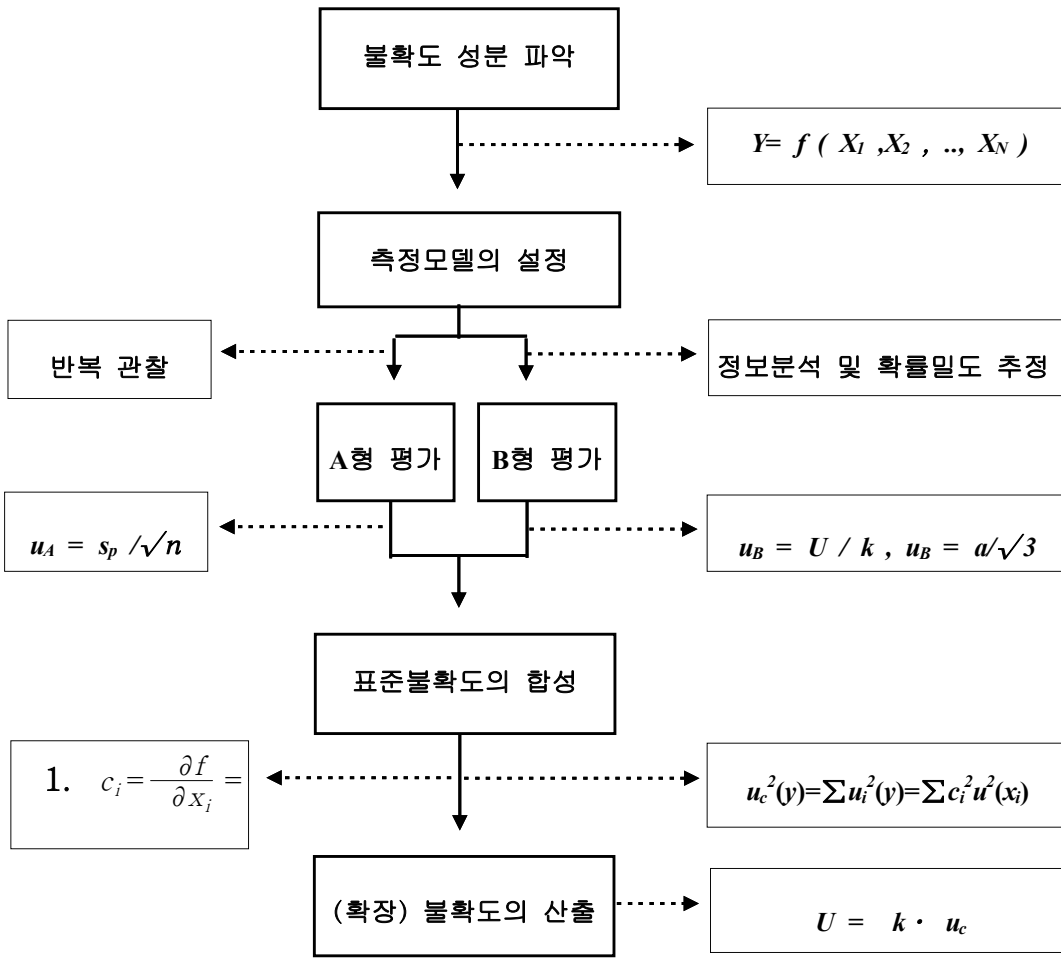


Fig. 30. Overview of the uncertainty estimation procedure.

Table 31. Measurement uncertainty factor for seaweeds

인자	인자내용	구성성분	성분내용	산출방법	TYPE	
표준용액	표준용액 희석	Volumetric flask ($U_{V.F.}$)	저울 ($U_{bal.}$)	교정 (Calibration)	제조회사자료 또는 교정기관 교정값	B
			교정 (Calibration)	제조회사자료 또는 교정기관 교정값	B	
		반복성 (Repeatability)	저울을 이용하여 10회 반복측정한 자료	A		
		온도	온도에 따른 부피변화 자료	B		
표준용액	표준용액 희석	Pipet (U_{pipet})	교정 (Calibration)	제조회사자료 또는 교정기관 교정값	B	
			반복성 (Repeatability)	저울을 이용하여 10회 반복측정한 자료	A	
			온도	온도에 따른 부피변화 자료	B	
		Volumetric flask ($U_{V.F.}$)	교정 (Calibration)	제조회사자료 또는 교정기관 교정값	B	
			반복성 (Repeatability)	저울을 이용하여 10회 반복측정한 자료	A	
			온도	온도에 따른 부피변화 자료	B	
시료	전처리	Volumetric flask ($U_{V.F.}$)	저울 ($U_{bal.}$)	교정 (Calibration)	제조회사자료 또는 교정기관 교정값	B
			교정 (Calibration)	제조회사자료 또는 교정기관 교정값	B	
		반복성 (Repeatability)	저울을 이용하여 10회 반복측정한 자료	A		
		온도	온도에 따른 부피변화 자료	B		
기기분석	검량선의 불확도	($U_{cal.}$)	직선성	Least square fitting 자료	A	
	분석 반복성	($U_{rep.}$)	반복성	동일시료를 3회 반복 측정 한 자료	A	

시료	미역-16
비소화합종	Arsenobetaine (AsB)

〈검량선〉

농도(X)($\mu\text{g/L}$)	1차 측정	2차 측정	3차 측정
100	543.142	541.421	539.945
500	2675.361	2665.507	2655.653
1000	5730.623	5709.516	5688.409

〈시료측정〉

시료	농도($\mu\text{g/L}$)	시료무게(g)
1	697	1.0835
2	693	
3	695	
평균	695	
SD	2	

〈결과〉

최종농도 (mg/kg)	5.608
확장불확도	0.307
유효자유도	15.8

Fig. 31. Uncertainty measurement of sea mustard for seaweeds.

제3절 해조류 중 총 비소 및 비소화학종 함량

1. 해조류의 총 비소 함량

해조류 분석 시 모든 시료는 건조의 과정을 거친 후 분말화 하여 사용하였다. 원물(생물)시료의 경우 건조과정에서 수분 함량을 구하였으며(Table 32; 건조시료의 경우 생물시료에 동일 품종이 존재하면 수분 함량 측정 결과의 평균 수분 함량을, 동일 품종이 없으면 농촌진흥청에서 발간한 식품성분분석표상의 수분 함량을 사용), 분석 결과 값은 측정값에 수분 함량을 적용하여 모두 생물 기준으로 환산하여 표현하였다.

분석결과 값 중 검출한계 이하인 경우가 전체 348건의 시료 중 다시마 시료에서 1건 확인이 되어 ND (not detected)로 표시하였으며, 그 값은 middle bound (LOD/2)로 처리하였다(126, 127).

Table 32. Moisture content of seaweed species

Species	Moisture(%)
Laver	90.9
Sea tangle	91.3
Sea mustard	93.9
Hijiki	90.8
Gulf weed	87.6

해조류 중 김 70건, 다시마 121건, 미역 115건, 툇 27건 그리고 모자반 15건 등 총 5종에서 348건의 시료를 대상으로 분석한 비소(As) 오염도는 평균(Mean) 2.72 mg/kg이었으며, 표준오차(standard error of mean; SEM)는 0.08 mg/kg 이었다.

각 시료별 비소의 평균 오염도는 미역(1.84 ± 0.08 mg/kg), 김(2.07 ± 0.06 mg/kg), 다시마(3.07 ± 0.13 mg/kg), 툇(4.49 ± 0.13 mg/kg), 그리고 모자반(6.48 ± 0.15 mg/kg) 순이었다. 평균 총 비소 함량은 5종의 조사대상 해조류 중 미역이 가장 낮은 수준 이었고, 모자반이 가장 높은 평균 오염도를 보였다. 또한 모자반과에 속하는 툇에 서도 4.49 ± 0.13 mg/kg의 오염도를 보여 다른 해조류에 비해 높은 값으로 확인되었 다. 해조류의 평균 오염도와 구간별 오염도는 각각 Table 33-34, Fig. 32와 같다.

WHO는 2011년 technical report series 959에서 회의 참가국인 Australia, Brazil, France, Japan, New Zealand 그리고 Singapore에서 제출된 자료와 문헌적 고찰을 통해 식품 중 총 비소 농도를 Table 35와 같이 확인하였다. 건조해조류 총 953건을 대상으로 분석한 총 비소 분포 범위는 0.114~236 mg/kg로 분석 대상 식품 중 가 장 높고 넓은 분포 범위를 보였으며, 특히 어류, 패류 등을 포함한 해산물에서의 비소 함량이 다른 식품들보다 높게 확인되었다(20). 본 연구에서 확인된 해조류의 총 비소 함량은 건조 시료를 기준으로 6.57~85.26 mg/kg로 WHO의 보고 결과 내 에 포함되는 수치로 나타났으며, 해조류의 비소 농도가 10~60 mg/kg 이라는 일반 적인 연구결과와 비슷하였다(17, 93).

WHO (20)의 보고에 나타나듯이 대부분의 식품 중 총 비소 함량이 1 mg/kg의 범위를 넘지 않으나, 해조류에만 대단히 높은 비소가 검출되고 있다. 하지만 대부 분이 독성이 낮은 유기비소의 형태를 띠고 있으며, 독성이 강한 무기비소는 전체 함량의 15%보다 낮고, 2 mg/kg을 넘지 않는다. 따라서 단순한 총 비소 함량의 많 고 적음으로 위해성을 판단하기에는 무리가 따르며, 비소화학종의 분리·분석을 통 해서 평가되어야 할 것이다.

가. 김의 총 비소 함량

시중에 유통되고 있는 대부분의 김은 건조된 형태 이므로 본 연구를 위해 구입한 시료 전체가 건 시료 상태였다. ICP-MS로 분석한 김의 비소 평균 오염도는 2.07 ± 0.06 (평균 \pm 표준오차) mg/kg, 중간 오염도는 2.05 mg/kg 이었다. 또한 검출된 최소 및 최대 오염도는 각각 0.61 mg/kg과 3.30 mg/kg 이었으며, 정량한계 이하 값은 0건(0.0%)으로 김의 비소 검출률은 100%이었다. 구간별 오염도는 $2.00 \leq \sim < 5.00$ mg/kg 구간에서 36건(51.4%)으로 가장 많은 부분을 차지하였다.

2007년 식약청의 전국 10여 곳의 다소비 수산물을 대상으로 한 연구 결과에서 건조 김(건조 상태로)의 평균 비소 함량이 19.232 ± 5.639 (8.520~28.097) mg/kg이라고 보고하여 본 실험의 수분보정 전인 평균 22.19 mg/kg과 유사한 결과를 보였다 (19).

나. 다시마의 총 비소 함량

다시마의 총 비소 오염도는 3.07 ± 0.13 mg/kg이었으며, 중간 오염도는 2.90 mg/kg 이었다. 검출된 최소 및 최대 오염도는 각각 ND (0.014 μ g/kg; LOD/2)와 8.55 mg/kg 이었으며, 정량한계 이하 값은 1건(0.8%)으로 다시마의 총 비소 검출률은 99.2%로 확인되었다. 구간별 오염도는 $2.00 \leq \sim < 5.00$ mg/kg 구간에서 90건(73.8%)으로 높은 비율을 차지하였다.

본 실험의 수분 보정 전인 다시마의 평균 총 비소 함량이 35.91 ± 1.38 mg/kg으로 2007년도 식약청의 연구결과인 평균 21.87 ± 3.66 (16.35~30.15) mg/kg 보다 높은 함량을 보였다.

다. 미역의 총 비소 함량

미역의 총 비소 평균 오염도는 1.84 ± 0.08 mg/kg 이었으며, 중간 오염도는 1.70 mg/kg으로 확인되었다. 검출된 총 비소의 최소 오염도는 0.31 mg/kg, 그리고 최대 오염도는 5.20 mg/kg 이었으며, 정량한계 이하 값은 0건(0.0%)으로 미역의 총 비소 검출률은 100%로 확인되었다. 구간별 오염도는 $1.00 \leq \sim < 2.00$ mg/kg 구간에서 66

건(57.4%)으로 높은 비율을 차지하였다.

2007년 식약청의 연구결과는 평균 23.21 ± 7.67 (15.08~38.55) mg/kg으로 본 실험의 수분보정 평균값이 33.25 ± 1.71 mg/kg으로 더 높은 함량이 확인되었다.

라. 모자반의 총 비소 함량

모자반의 총 비소 평균 오염도는 6.48 ± 0.15 mg/kg으로 확인되었으며, 중간 오염도는 6.50 mg/kg 이었다. 검출된 최소 오염도는 5.45 mg/kg, 최대 오염도는 7.54 mg/kg 이었으며, 구간별 오염도는 $5.00 \leq < 10.0$ mg/kg에서 15건(100%)으로 확인되었다. 정량한계 이하 값은 0건(0.00%)으로 모자반의 총 비소 검출률은 100%이었다.

마. 톳의 총 비소 함량

톳의 비소 평균 오염도는 4.49 ± 0.65 mg/kg 이었으며, 중간 오염도는 4.33 mg/kg 이었다. 검출된 비소의 최소 오염도는 3.20 mg/kg 이었으며, 최대 오염도는 5.75 mg/kg이었다. 정량한계 이하 값은 0건(0.00%)으로 톳(생)의 비소 검출률은 100%로 확인 되었다. 구간별 오염도는 $2.00 \leq < 5.00$ mg/kg구간에서 21건(77.8%)으로 가장 높은 비율을 차지하였다.

2007년도 식약청의 연구결과에서는 평균 3.84 ± 1.74 (1.72~8.76) mg/kg의 함량을 보였으며, 본 실험의 결과와 유사하였다. 그러나 여러 연구 결과에서는 대부분 건조 시료를 기준으로 결과 값을 구하였으며, 일본의 YoKoi 등(82)은 분말화한 톳의 총 비소 분석결과 108.6 ± 1.6 mg/kg, Wondimu 등(128)은 99.6 ± 0.16 mg/kg으로 확인되었다. 또한, 유럽에서는 Salgado 등(48)이 2006년과 2008년에 스페인에서 판매되고 있는 톳의 비소 함량을 측정하였고 그 결과 각각 61 ± 3 과 72 ± 4 mg/kg으로 확인되었으며, Rose 등(58)은 영국과 인근 지역에서 판매되고 있는 톳의 비소 함량 측정결과 95~124 mg/kg의 함량 범위를 보이고 있다고 보고하였다. 여러 연구결과 대부분 총 비소 분석 시 시료 균질화를 위해 건조한 후 분말화 하여 분석에 사용되었으며, 결과 값도 건조시료를 기준으로 하였다. 본 실험의 톳의 건조 시료 기준

총 비소 함량도 평균 47.8 mg/kg으로 다른 지역의 결과 보다는 낮았으나, 다른 해 조류에 비해 상대적으로 많은 함량을 나타내었다.

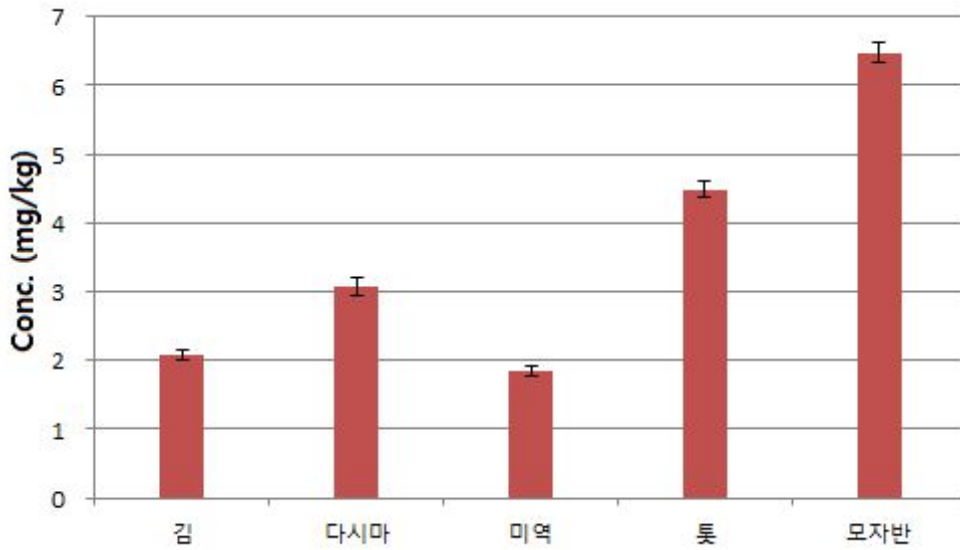


Fig. 32. Comparison of average contamination level of total arsenic in seaweeds. Mean±SEM.

Table 33. Average contamination level of total arsenic in seaweeds

Samples	Mean±SE ^a (mg/kg)	Median (mg/kg)	Min ^b (mg/kg)	Max ^c (mg/kg)	MN ^d	DN ^e	Detection rate (%)
Laver	2.07±0.06	2.05	0.61	3.30	70	70	100
Sea tangle	3.07±0.13	2.99	ND	8.55	121	120	99.2
Sea mustard	1.84±0.08	1.59	0.31	5.20	115	115	100
Hijiki	4.49±0.13	4.33	3.20	5.75	27	27	100
Gulf weed	6.48±0.15	6.50	5.45	7.54	15	15	100

^aMean±SEM, ^bMIN: minimum value, ^cMAX: maximum value, ^dMN: number of measurement, ^eDN: number of detection

Table 34. Contamination value of arsenic in seaweeds for each level

Samples	ND ^a		~0.99 (mg/kg)		1.00~1.99 (mg/kg)		2.00~4.99 (mg/kg)		5.00~9.99 (mg/kg)		10.0~19.9 (mg/kg)		≥20.0 (mg/kg)	
	DN ^b	%	DN	%	DN	%	DN	%	DN	%	DN	%	DN	%
Laver	0	0.0	1	1.4	33	47.1	36	51.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sea tangle	1	0.8	4	3.3	15	12.4	90	74.4	11	9.1	0	0.0	0	0.0
Sea mustard	0	0.0	7	7.0	66	57.4	41	35.7	1	0.9	0	0.0	0	0.0
Gulf weed	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	15	100	0	0.0	0	0.0
Hijiki	0	0.0	0	0.0	0	0.0	21	77.8	6	22.2	0	0.0	0	0.0

^aND: not detected, ^bDN: number of detected samples

Table 35. Summary of available data on total arsenic concentrations in food products

Food categories	N	N<LOR ^a	Range (mg/kg)
Diary products and analogues			
Milk and milk powder	284	65	0.001–0.15
Milk products	92	61	0.010–0.35
Fats and oils	39	0	0.003–0.18
Meat and meat products			
Meat	4977	4124	0.004–0.78
Offal	2074	1096	0.009–0.45
Meat products	50	20	0.003–3.25
Eggs and egg products	171	111	0.003–0.04
Confectionery products	186	61	0.002–1.13
Sweeteners	138	21	0.003–0.26
Bakery wares	71	49	0.002–0.25
Beverages			
Alcoholic beverages (except rice distilled spirits)	462	64	0.001–0.05 ^b
Rice distilled spirits	8	2	0.050–1.64 ^b
Non-alcoholic beverages	120	16	0.001–0.26 ^b
Vegetables/fruits/nuts/sweaweed			
Fruits	966	800	0.005–2.20
Vegetables (except mushrooms and fungi)	2503	2164	0.001–1.27
Mushrooms and fungi	302	60	0.011–5.79
Nuts and oilseeds	70	15	0.005–0.88
Dried seaweeds	953	3	0.114–236
Cereals and cereal products			
Cereals (except rice)	410	325	0.007–0.43
Rice	1693	0	0.002–1.83
Breakfast cereals	17	10	0.017–0.27
Pasta	19	9	0.003–0.18
Fish and fish products			
Marine fish	1409	0	0.10–62
Shellfish	171	0	0.090–66
Freshwater fish	238	0	0.060–4.72
Baby food products	75	5	0.001–4.66

LOR, limit of reporting (detection or quantification limit)

^a Results presented for detected values only (not detected [ND]=0)

^b Data expressed as mg/l

Source : WHO, 2011 (20)

2. 해조류의 비소화학종 함량

해조류 중 김 53건, 다시마 45건, 미역 60건, 모자반 15건, 그리고 톳 27건 등 총 5종 200건을 대상으로 비소화학종(유기비소, 무기비소)의 종 분리·분석하였다(Fig. 33, Table 36). 각 분석시료 중 검출한계 이하인 값에 대해서는 ND (not detected)로 표시하였다. 분석결과 값의 처리는 전 시료 중에서 전혀 검출되지 않은 비소화학종의 경우 ND 값을 모두 “0”으로 처리하였으며, 미역 및 톳 시료의 DMA와 As(III)의 경우 그 값은 middle bound (LOD/2)로 처리하였다(126, 127).

본 실험에서 분석한 해조류의 총 비소 함량은 0.15~7.54 mg/kg의 범위로 확인되었으며, arsenocholine (AsC), arsenobetaine (AsB), monomethylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), arsenite [As(III)], arsenate [As(V)] 등 6가지 화합물에 대한 비소화학종 분리 실험의 결과, 비소의 대부분이 독성도가 낮은 유기비소화학종으로 확인되었다. 뿐만 아니라 해조류에는 trimethyl arsonioriboside나 dimethyl arsonylriboside에서 유래한 arsenosugar 화합물들이 대부분이라는 것과 유사하게 미확인 유기비소종들이 확인되었다(129, 130). 이상의 결과는 해조류의 총 비소 함량은 대부분이 20 mg/kg 이상이며(131, 132), 수산물의 비소 함량 중 arsenobetaine이 거의 대부분을 차지하고 이외의 비소화학종들은 미량으로 존재한다는 Hunter 등(133)의 보고와 유사하였다. 또한 해조류의 대부분을 차지하는 주요 비소화학종인 arsenosugar 뿐만 아니라 DMA, arsenolipid와 thioarsonic compounds들이 주로 존재한다(20).

그러나 모자반, 톳과 같은 모자반과 해조류에서는 유기비소는 거의 확인되지 않고 대부분이 무기비소인 As(V)가 주요비소화학종으로 확인되었다. 이러한 결과는 YoKoi 등(82), Wondimu 등(128), Salgado 등(48) 및 Rose 등(58)의 분석결과와 유사하였다.

WHO (20)에서는 Table 37의 결과에서처럼 총 543건의 건조 해조류의 무기비소 함량 측정 결과 검출한계 이하의 시료 4건을 제외한 539건이 0.1~130 mg/kg의 농도범위 내에 포함되어있다고 보고하였다. 그러나 해조류에 농축되어있는 비소 중

대부분이 유기비소 형태이며, 무기비소는 전체 비소 함량의 15% 이하로 존재한다고 일반적으로 2 mg/kg 보다 낮은 함량을 보인다고 보고 하였다. 그러나 이런 일반적인 해조류의 비소화학종의 존재 형태와 달리 툃과 모자반과 같은 모자반과 해조류들은 예외적으로 전체 비소 함량의 50% 이상이 무기비소 이며, 그 분포 범위가 30~130 mg/kg이라고 보고하였다.

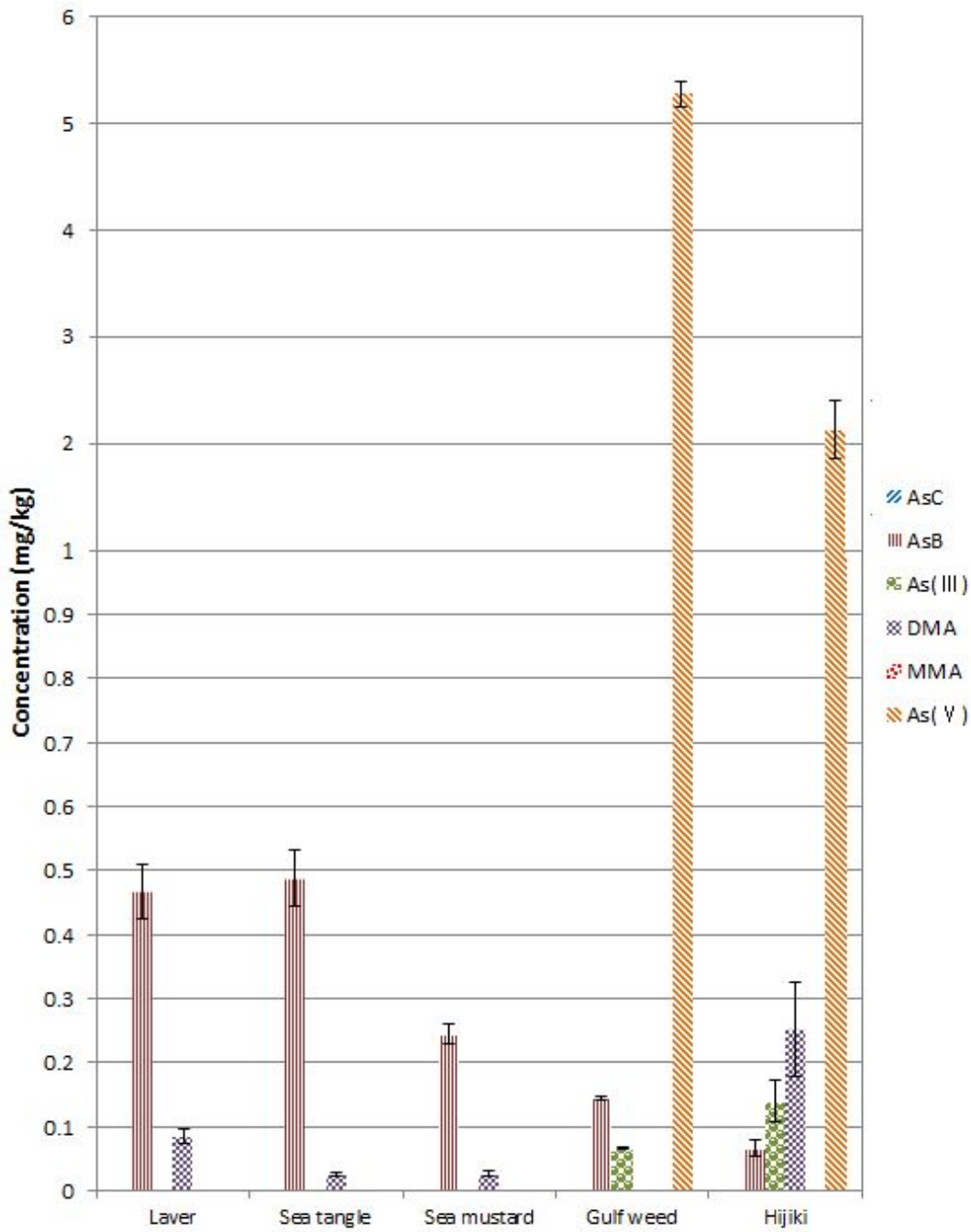


Fig. 33. Arsenic speciation of seaweeds.

Table 36. Average value of arsenic species in seaweeds

Unit : mg/kg

Sample	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							N ^a	oAs ^h	iAs ⁱ
Laver	ND ^j	0.47±0.04 ^k	ND	0.08±0.01	ND	ND	0.55±0.05	ND	0.55±0.05
53 ^l		(0.08 ~ 1.14) ^m		(0.01 ~ 0.40)			(0.16 ~ 1.35)		(0.16 ~ 1.35)
Sea tangle	ND	0.49±0.04	ND	0.03±0.003	ND	ND	0.51±0.05	ND	0.51±0.05
45		(0.05 ~ 1.45)		(0.001 ~ 0.07)			(0.07 ~ 1.52)		(0.07 ~ 1.52)
Sea mustard	ND	0.24±0.02	ND	0.03±0.004	ND	ND	0.27±0.02	ND	0.27±0.02
60		(0.06 ~ 0.69)		(ND ~ 0.15)			(0.07 ~ 0.82)		(0.07 ~ 0.82)
Gulf weed	ND	0.14±0.03	0.07±0.001	ND	ND	5.28±0.12	0.14±0.003	5.35±0.12	5.49±0.12
15		(0.13 ~ 0.16)	(0.06 ~ 0.08)			(4.54 ~ 5.94)	(0.13 ~ 0.16)	(4.61 ~ 6.01)	(4.77 ~ 6.17)
Hijiki	ND	0.07±0.01	0.14±0.03	0.25±0.07	ND	2.13±0.27	0.32±0.08	2.27 ±0.28	2.59±0.28
27		(0.01 ~ 0.34)	(ND ~ 0.53)	(ND ~ 1.43)		(0.22 ~ 6.21)	(0.023 ~ 1.78)	(0.26 ~ 6.54)	(0.70 ~ 6.58)

^aN: number of each sample, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected, ^k(mean±standard error of mean (SEM)), ^lnumber of sample, ^m(minimum ~ maximum)

Table 37. Summary of available data on inorganic arsenic concentrations in food products

Food products	N	N < LOD	Concentration range (mg/kg)
Dried seaweed	539	4	0.1 ~ 130
Rice	837	0	0.01 ~ 0.05
Fish and fish products	325	1	0.001 ~ 1.2
Vegetables	36	0	0.008 ~ 0.61

N: number of samples, LOD: limit of detection

WHO, 2011 (20)

최 등(94)은 해조류 중 미역, 다시마, 김 등을 시료로 하여 6가지 비소화학종의 함량을 분석하였고 확인된 비소화학종 중 AsB가 주요 존재 형태이며, AsC은 확인되지 않았다고 보고하였다. 분석 시료별 비소화학종 함량은 미역에서 AsB 1.411 mg/kg, As(III) 0.025 mg/kg, DMA 0.242 mg/kg, MMA 0.015 mg/kg, As(V) 0.030 mg/kg가 확인되었고, 다시마는 AsB 30.14 mg/kg, MMA 0.016 mg/kg, As(V) 0.215 mg/kg 이었으며, 김은 AsB 8.927 mg/kg, DMA 0.492 mg/kg, As(V) 0.019 mg/kg으로 보고하였다. 우리나라의 다소비 수산물에 대한 비소화학종 분리·분석 결과에서도 AsB가 주요 비소화학종으로 확인되었다(19).

본 연구에서는 김에서 arsenosugar로 추정되어지는 미확인 비소화학종이 전체 함량의 대부분을 차지하였으며, 확인된 비소화학종들은 AsB와 DMA 두 종류로 AsB가 0.47 ± 0.04 (평균 \pm 표준오차) (0.08~1.14; 최저~최고) mg/kg, DMA가 0.08 ± 0.01 (0.01~0.40) mg/kg 검출되어 대부분 AsB의 형태로 확인되었다. 최 등(94)의 연구결과에서도 유사한 결과를 보였으나, 본 연구에서는 As(V)와 같은 무기비소는 검출되지 않았다(Fig. 34, Table 38).

다시마에서도 비소중 주요 화학종은 유기비소 형태인 AsB와 DMA로 확인되었으며, 무기비소는 확인되지 않았다. 다시마(Fig. 35, Table 39)의 경우 AsB가 0.49 ± 0.04 (0.05~1.45) mg/kg, DMA가 0.03 ± 0.003 (0.001~0.07) mg/kg의 함량이 확인되었다. 그러나 주요 비소화학종이 AsB이라는 최 등(94)의 연구결과와 비슷하였으나, AsB의 함량은 상대적으로 낮게 검출되었다. 본 실험에서 다시마는 MMA가 검출되지 않았으며, 이는 시료의 생육환경 등의 bio-factor의 영향에 의한 것으로 사료된다. 2007년 식약청 연구결과(19)에서는 다시마에서 확인된 주요 비소화학종은 AsB와 AsC로 확인되었다. Hsieh 등(85)의 연구에서는 Taiwan 지역의 다시마 분석 결과 총비소 32.6 mg/kg중 OH-arsenoribose가 23.7 mg/kg, DMA 0.571 mg/kg, PO^4 -arsenoribose가 7.06 mg/kg의 함량을 보였으며, 무기비소인 As(III), As(V) 뿐만 아니라 MMA, AsB 및 AsC은 확인되지 않았다고 보고하였다. 이상에서와 같이 품종이 같더라도 생산지역, 조사 시기 및 분석방법에 따라 분석결과에 차이가 있는 것으로 사료된다.

미역은 총 60건의 시료를 분석하였으나, AsB과 DMA만 확인 되었을 뿐 대부분

이 미확인 비소화합종들이었다. 최 등(94)의 연구에서는 6종의 비소화합종 중 AsC를 제외한 나머지 5종의 비소화합종들이 모두 확인되었으며, AsB의 함량이 가장 많았고, 미량의 무기비소들이 검출되었다고 하였으나 본 연구에서는 AsB와 DMA를 제외한 다른 비소화합종들은 확인되지 않았다. 미역에서는 AsB가 0.24 ± 0.02 (0.06~0.69) mg/kg, DMA는 0.03 ± 0.004 (ND~0.15) mg/kg로 검출되었다(Fig. 36, Table 40).

김, 다시마, 미역 등의 시료와는 달리 모자반과 툫에서 검출된 비소화합종들은 대부분이 무기비소 형태인 As(V)가 확인되었다. 모자반의 비소화합종은 As(V)가 5.28 ± 0.12 (4.54~5.94) mg/kg으로 대부분을 차지하였으며, 그 다음으로 AsB가 0.14 ± 0.003 (0.13~0.16) mg/kg, As(III)가 0.07 ± 0.001 (0.06~0.08) mg/kg의 함량을 보였다(Fig. 37, Table 41).

Yokoi 등(82)은 모자반과의 식물인 툫의 식이 독성을 확인하는 실험에서 다른 모자반과 식물들의 중금속 함량에 대한 문헌적 고찰을 통해 모자반의 비소 함량을 조사하였는데 As(III)은 0.91~6.4 mg/kg, As(V)는 4.3~67.7 mg/kg의 함량을 보였으며, 총 비소 함량의 44.7~100%로 큰 비중을 차지하는 것으로 보고하였다. 또한 Almela 등(134)은 모자반속의 해조류에서 무기비소가 총 비소 함량의 72% 까지 차지한다고 보고하였다.

툫은 모자반과에 속하는 해조류로 모자반과 유사한 비소화합종의 분포를 보인다. 툫의 비소 분석결과 As(V) 2.13 ± 1.39 (0.22~6.21) mg/kg과 As(III) 0.14 ± 0.17 (0.0~0.53) mg/kg으로 무기비소종이 총 비소 함량의 87.8% (2.59 ± 1.46 mg/kg)를 차지하며, 특히 As(V)가 주요 비소화합종으로 확인되었다(Fig. 38, Table 42). 김 등(19)의 연구에서는 툫의 총 비소 함량 3.84 mg/kg 중 As(V)가 3.36 mg/kg으로 전체비소 함량의 약 86%를 차지한다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 또한 일본 근해에 서식하는 툫(*Hizikia fusiforme*)의 총 비소 함유량이 134 mg/kg에 이르며, 무기비소의 함유 비율도 약 60%에 이른다. M. M. Bonilla simon 등(48)은 툫에서는 As(V)만이 검출 되었고 그 함량은 총 비소 77 mg/kg중 62 mg/kg으로 전체 약 81%라고 보고하여 본 실험과 유사하였다. 또한, Yokoi 등(82)은 문헌적으로

조사한 한국, 중국, 일본에서 서식하는 톳의 비소 함량 분석결과 평균 총 비소 함량이 53.3 (36~79.8; 최저~최고) mg/kg 중 무기비소 함량이 44.5 (30.7~69) mg/kg으로 전체의 약 83%를 차지하였고 As(III)은 5.06 mg/kg, As(V)는 44.56 mg/kg으로 개별화학종으로는 As(V)가 대부분을 차지하였다고 보고하였다.

이와 같이 해조류 중 주요 비소화학종이 차이를 보이는 이유는 일부 해조류들 내부에 무기비소가 유기비소로 변환되는 대사적 변환과정이 일어나지 않으며, 이는 유전적 능력의 부족, 대사적 변환과정에 필요한 에너지의 과다, 그리고 외부 포식자로부터 자신을 보호하기 위한 방어기작 등의 여러 가지 이유로 세포내부에 무기비소를 축적하는 것으로 추측된다(58).

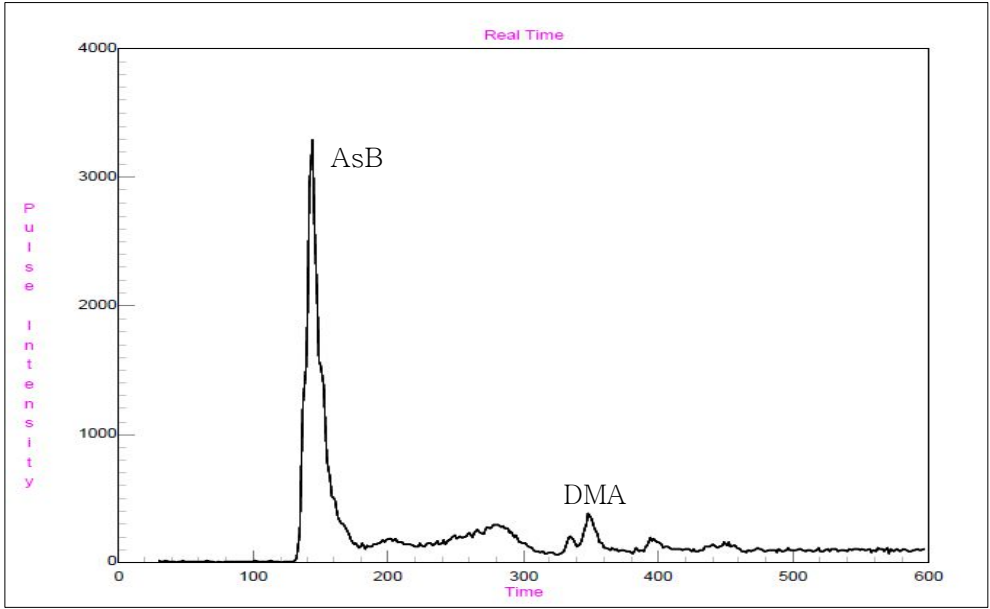


Fig. 34. Chromatogram of arsenic species in laver.

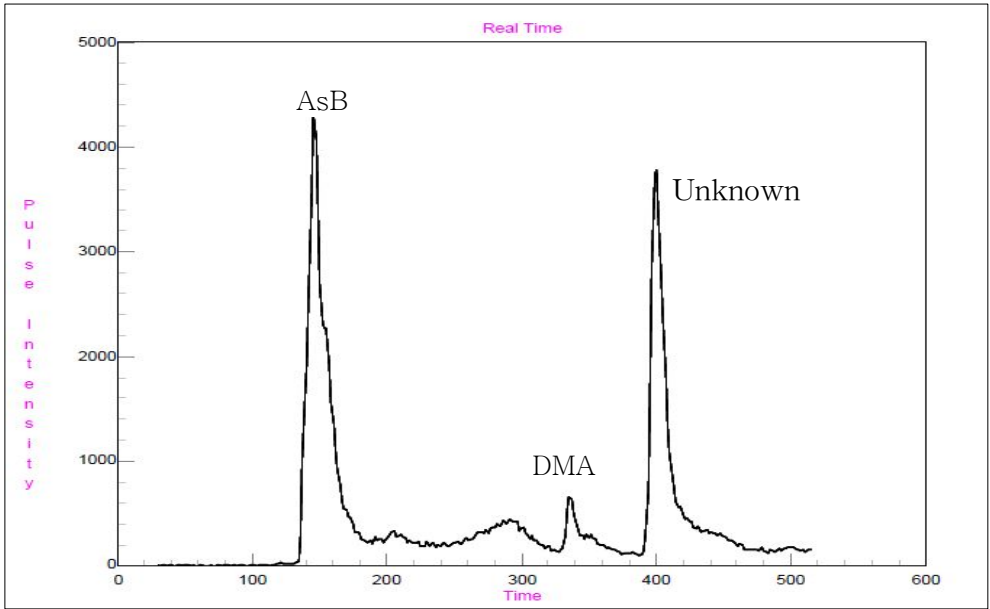


Fig. 35. Chromatogram of arsenic species in sea tangle.

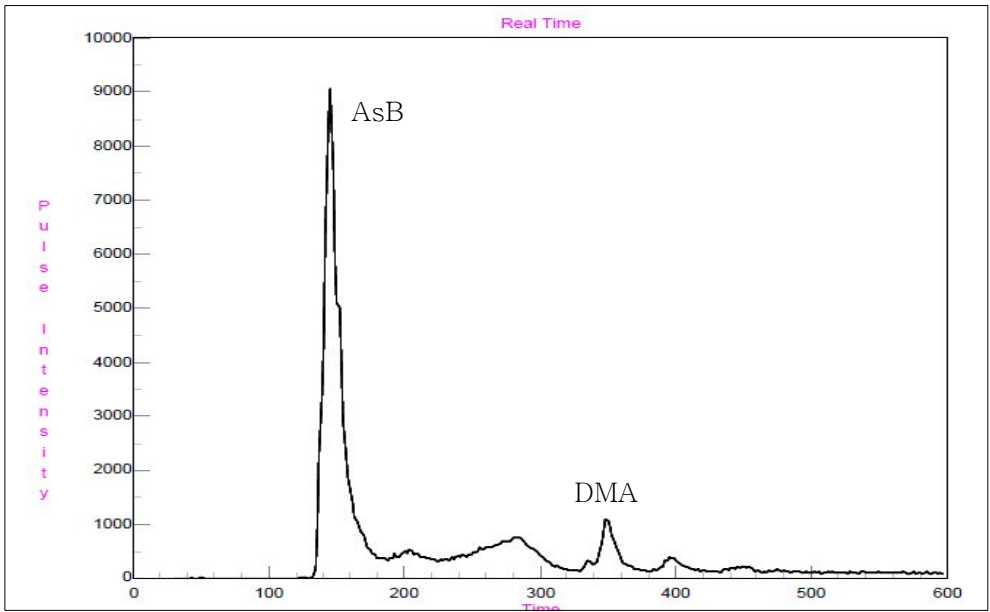


Fig. 36. Chromatogram of arsenic species in sea mustard.

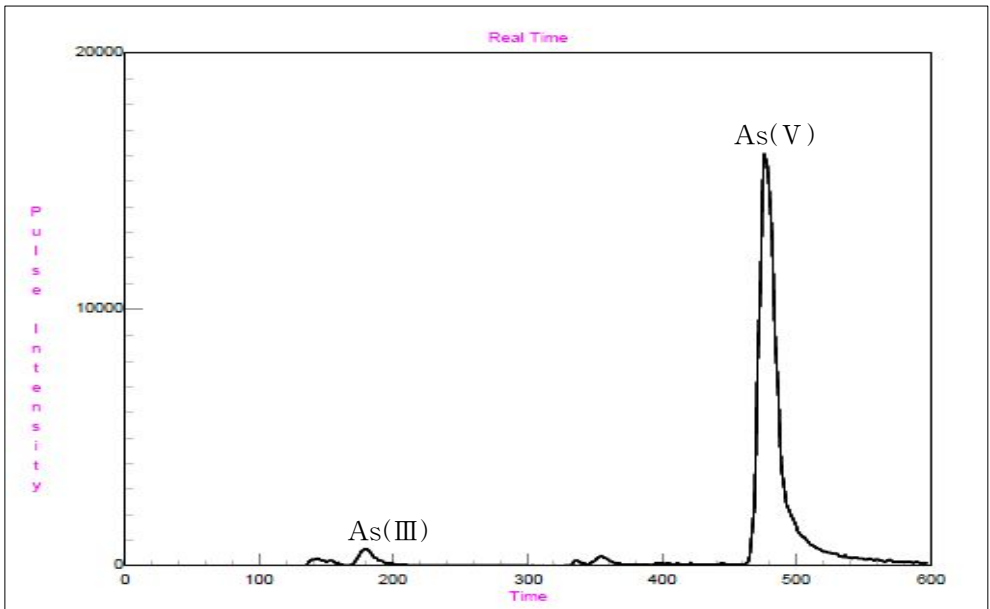


Fig. 37. Chromatogram of arsenic species in gulf weed.

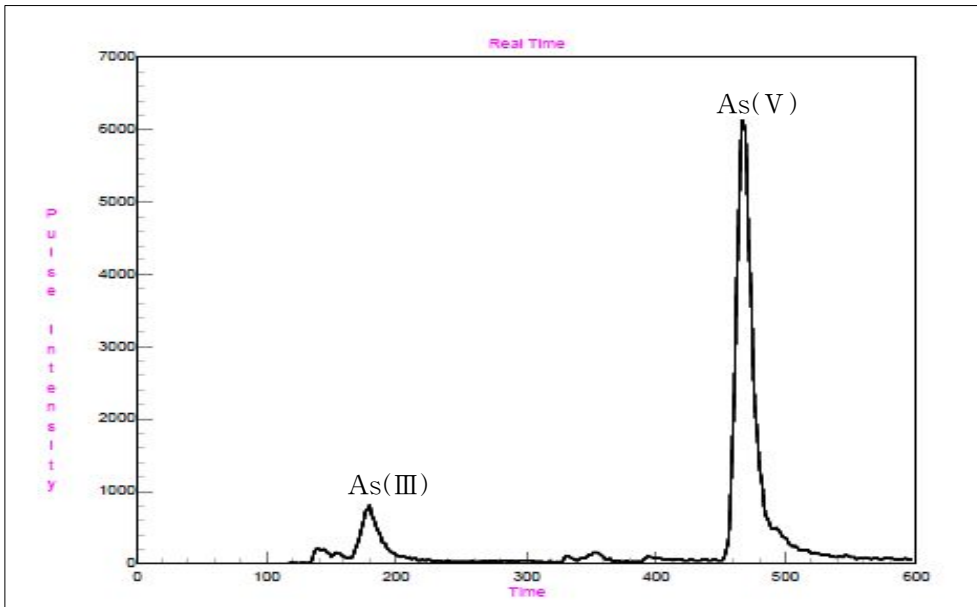


Fig. 38. Chromatogram of arsenic species in hijiki.

Table 38. Concentration of arsenic species in laver

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
1	ND ^j	0.08	ND	0.14	ND	ND	0.22	ND	0.22
2	ND	0.48	ND	0.03	ND	ND	0.51	ND	0.51
3	ND	0.73	ND	0.12	ND	ND	0.85	ND	0.85
4	ND	0.57	ND	0.03	ND	ND	0.60	ND	0.60
5	ND	0.11	ND	0.20	ND	ND	0.31	ND	0.31
6	ND	1.08	ND	0.19	ND	ND	1.27	ND	1.27
7	ND	1.07	ND	0.19	ND	ND	1.26	ND	1.26
8	ND	1.04	ND	0.18	ND	ND	1.22	ND	1.22
9	ND	0.24	ND	0.07	ND	ND	0.31	ND	0.31
10	ND	0.35	ND	0.02	ND	ND	0.36	ND	0.36
11	ND	0.40	ND	0.02	ND	ND	0.41	ND	0.41
12	ND	0.15	ND	0.04	ND	ND	0.19	ND	0.19
13	ND	0.66	ND	0.14	ND	ND	0.81	ND	0.81
14	ND	0.77	ND	0.19	ND	ND	0.96	ND	0.96
15	ND	0.14	ND	0.05	ND	ND	0.19	ND	0.19
16	ND	0.37	ND	0.02	ND	ND	0.38	ND	0.38
17	ND	0.23	ND	0.04	ND	ND	0.27	ND	0.27
18	ND	0.74	ND	0.15	ND	ND	0.89	ND	0.89
19	ND	0.23	ND	0.07	ND	ND	0.30	ND	0.30
20	ND	0.67	ND	0.12	ND	ND	0.79	ND	0.79
21	ND	1.14	ND	0.22	ND	ND	1.36	ND	1.36
22	ND	0.36	ND	0.02	ND	ND	0.38	ND	0.38
23	ND	0.35	ND	0.04	ND	ND	0.39	ND	0.39
24	ND	0.17	ND	0.03	ND	ND	0.19	ND	0.19
25	ND	0.15	ND	0.01	ND	ND	0.16	ND	0.16
26	ND	0.98	ND	0.19	ND	ND	1.17	ND	1.17
27	ND	0.18	ND	0.05	ND	ND	0.23	ND	0.23
28	ND	0.56	ND	0.09	ND	ND	0.66	ND	0.66
29	ND	0.19	ND	0.04	ND	ND	0.24	ND	0.24
30	ND	1.08	ND	0.19	ND	ND	1.27	ND	1.27

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected

Table 38. Coneinued

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
31	ND ^j	0.56	ND	0.03	ND	ND	0.59	ND	0.59
32	ND	0.26	ND	0.08	ND	ND	0.34	ND	0.34
33	ND	0.33	ND	0.0	ND	ND	0.34	ND	0.34
34	ND	0.40	ND	0.03	ND	ND	0.44	ND	0.44
35	ND	0.53	ND	0.01	ND	ND	0.54	ND	0.54
36	ND	0.44	ND	0.01	ND	ND	0.45	ND	0.45
37	ND	0.95	ND	0.40	ND	ND	1.35	ND	1.35
38	ND	0.33	ND	0.03	ND	ND	0.36	ND	0.36
39	ND	0.26	ND	0.05	ND	ND	0.30	ND	0.30
40	ND	0.26	ND	0.02	ND	ND	0.28	ND	0.28
41	ND	0.66	ND	0.12	ND	ND	0.77	ND	0.77
42	ND	0.33	ND	0.01	ND	ND	0.34	ND	0.34
43	ND	0.32	ND	0.02	ND	ND	0.34	ND	0.34
44	ND	0.24	ND	0.06	ND	ND	0.30	ND	0.30
45	ND	0.26	ND	0.05	ND	ND	0.30	ND	0.30
46	ND	0.26	ND	0.06	ND	ND	0.32	ND	0.32
47	ND	0.29	ND	0.02	ND	ND	0.31	ND	0.31
48	ND	0.19	ND	0.02	ND	ND	0.21	ND	0.21
49	ND	0.95	ND	0.19	ND	ND	1.14	ND	1.14
50	ND	0.26	ND	0.10	ND	ND	0.36	ND	0.36
51	ND	1.05	ND	0.20	ND	ND	1.25	ND	1.25
52	ND	0.16	ND	0.04	ND	ND	0.21	ND	0.21
53	ND	0.25	ND	0.06	ND	ND	0.30	ND	0.30
Mean	-	0.47	-	0.08	-	-	0.55	-	0.55
SEM^k	-	0.04	-	0.01	-	-	0.05	-	0.05

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected, ^kSEM: standars error of mean

Table 39. Concentration of arsenic species in sea tangle

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
1	ND ^j	1.01	ND	0.058	ND	ND	1.07	ND	1.07
2	ND	0.05	ND	0.014	ND	ND	0.07	ND	0.07
3	ND	0.18	ND	0.016	ND	ND	0.19	ND	0.19
4	ND	0.69	ND	0.021	ND	ND	0.71	ND	0.71
5	ND	0.40	ND	0.029	ND	ND	0.43	ND	0.43
6	ND	1.17	ND	0.071	ND	ND	1.24	ND	1.24
7	ND	0.16	ND	0.017	ND	ND	0.17	ND	0.17
8	ND	0.25	ND	0.019	ND	ND	0.27	ND	0.27
9	ND	0.24	ND	0.010	ND	ND	0.25	ND	0.25
10	ND	0.49	ND	0.036	ND	ND	0.52	ND	0.52
11	ND	0.63	ND	0.041	ND	ND	0.67	ND	0.67
12	ND	0.37	ND	0.065	ND	ND	0.43	ND	0.43
13	ND	0.27	ND	0.018	ND	ND	0.29	ND	0.29
14	ND	0.15	ND	0.024	ND	ND	0.18	ND	0.18
15	ND	0.20	ND	0.012	ND	ND	0.21	ND	0.21
16	ND	0.25	ND	0.010	ND	ND	0.26	ND	0.26
17	ND	0.40	ND	0.046	ND	ND	0.45	ND	0.45
18	ND	0.30	ND	0.012	ND	ND	0.31	ND	0.31
19	ND	0.74	ND	0.071	ND	ND	0.81	ND	0.81
20	ND	0.92	ND	0.057	ND	ND	0.98	ND	0.98
21	ND	0.75	ND	0.050	ND	ND	0.80	ND	0.80
22	ND	0.56	ND	0.033	ND	ND	0.59	ND	0.59
23	ND	1.45	ND	0.069	ND	ND	1.52	ND	1.52
24	ND	0.38	ND	0.017	ND	ND	0.40	ND	0.40
25	ND	0.69	ND	0.014	ND	ND	0.70	ND	0.70

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected

Table 39. Continued

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
26	ND ^j	0.87	ND	0.054	ND	ND	0.92	ND	0.92
27	ND	0.11	ND	0.011	ND	ND	0.13	ND	0.13
28	ND	0.53	ND	0.017	ND	ND	0.55	ND	0.55
29	ND	0.45	ND	0.040	ND	ND	0.49	ND	0.49
30	ND	0.64	ND	0.030	ND	ND	0.67	ND	0.67
31	ND	0.25	ND	0.017	ND	ND	0.27	ND	0.27
32	ND	0.47	ND	0.008	ND	ND	0.48	ND	0.48
33	ND	0.57	ND	0.026	ND	ND	0.60	ND	0.60
34	ND	0.36	ND	0.001	ND	ND	0.37	ND	0.37
35	ND	0.35	ND	0.024	ND	ND	0.38	ND	0.38
36	ND	0.43	ND	0.005	ND	ND	0.43	ND	0.43
37	ND	0.61	ND	0.004	ND	ND	0.62	ND	0.62
38	ND	0.70	ND	0.018	ND	ND	0.72	ND	0.72
39	ND	0.73	ND	0.016	ND	ND	0.75	ND	0.75
40	ND	0.14	ND	0.027	ND	ND	0.17	ND	0.17
41	ND	0.18	ND	0.010	ND	ND	0.19	ND	0.19
42	ND	0.70	ND	0.012	ND	ND	0.71	ND	0.71
43	ND	0.13	ND	0.002	ND	ND	0.13	ND	0.13
44	ND	0.44	ND	0.012	ND	ND	0.45	ND	0.45
45	ND	0.61	ND	0.008	ND	ND	0.62	ND	0.62
Mean	-	0.49	-	0.03	-	-	0.51	-	0.51
SEM^k	-	0.04	-	0.003	-	-	0.05	-	0.05

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected, ^kSEM: standars error of mean

Table 40. Concentration of arsenic species in sea mustard

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
1	ND ^j	0.11	ND	ND	ND	ND	0.11	ND	0.11
2	ND	0.20	ND	0.009	ND	ND	0.21	ND	0.21
3	ND	0.33	ND	0.011	ND	ND	0.34	ND	0.34
4	ND	0.37	ND	0.012	ND	ND	0.38	ND	0.38
5	ND	0.13	ND	ND	ND	ND	0.13	ND	0.13
6	ND	0.41	ND	0.013	ND	ND	0.42	ND	0.42
7	ND	0.06	ND	0.003	ND	ND	0.07	ND	0.07
8	ND	0.32	ND	0.012	ND	ND	0.33	ND	0.33
9	ND	0.26	ND	0.016	ND	ND	0.27	ND	0.27
10	ND	0.38	ND	0.015	ND	ND	0.39	ND	0.39
11	ND	0.10	ND	ND	ND	ND	0.10	ND	0.10
12	ND	0.31	ND	0.005	ND	ND	0.31	ND	0.31
13	ND	0.08	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	0.08
14	ND	0.19	ND	0.009	ND	ND	0.20	ND	0.20
15	ND	0.26	ND	0.009	ND	ND	0.27	ND	0.27
16	ND	0.17	ND	0.007	ND	ND	0.18	ND	0.18
17	ND	0.28	ND	0.008	ND	ND	0.28	ND	0.28
18	ND	0.21	ND	0.001	ND	ND	0.21	ND	0.21
19	ND	0.38	ND	0.022	ND	ND	0.40	ND	0.40
20	ND	0.28	ND	0.028	ND	ND	0.31	ND	0.31
21	ND	0.48	ND	0.013	ND	ND	0.50	ND	0.50
22	ND	0.41	ND	0.008	ND	ND	0.41	ND	0.41
23	ND	0.34	ND	0.011	ND	ND	0.35	ND	0.35
24	ND	0.12	ND	0.008	ND	ND	0.13	ND	0.13
25	ND	0.29	ND	0.018	ND	ND	0.31	ND	0.31

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected

Table 40. Continued

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
26	ND ^j	0.31	ND	0.011	ND	ND	0.32	ND	0.32
27	ND	0.35	ND	0.024	ND	ND	0.38	ND	0.38
28	ND	0.18	ND	0.004	ND	ND	0.18	ND	0.18
29	ND	0.18	ND	0.016	ND	ND	0.20	ND	0.20
30	ND	0.15	ND	0.014	ND	ND	0.17	ND	0.17
31	ND	0.37	ND	0.070	ND	ND	0.44	ND	0.44
32	ND	0.17	ND	ND	ND	ND	0.17	ND	0.17
33	ND	0.12	ND	0.005	ND	ND	0.13	ND	0.13
34	ND	0.29	ND	0.001	ND	ND	0.29	ND	0.29
35	ND	0.16	ND	0.040	ND	ND	0.20	ND	0.20
36	ND	0.16	ND	0.039	ND	ND	0.20	ND	0.20
37	ND	0.31	ND	0.075	ND	ND	0.39	ND	0.39
38	ND	0.21	ND	0.039	ND	ND	0.25	ND	0.25
39	ND	0.21	ND	0.039	ND	ND	0.25	ND	0.25
40	ND	0.08	ND	0.002	ND	ND	0.08	ND	0.08
41	ND	0.17	ND	ND	ND	ND	0.17	ND	0.17
42	ND	0.31	ND	0.082	ND	ND	0.39	ND	0.39
43	ND	0.14	ND	0.046	ND	ND	0.19	ND	0.19
44	ND	0.14	ND	0.045	ND	ND	0.19	ND	0.19
45	ND	0.69	ND	0.13	ND	ND	0.82	ND	0.82
46	ND	0.19	ND	0.058	ND	ND	0.24	ND	0.24
47	ND	0.28	ND	0.006	ND	ND	0.28	ND	0.28
48	ND	0.07	ND	0.045	ND	ND	0.12	ND	0.12
49	ND	0.40	ND	0.15	ND	ND	0.55	ND	0.55
50	ND	0.37	ND	0.097	ND	ND	0.47	ND	0.47

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected

Table 40. Continued

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
51	ND ^j	0.22	ND	0.004	ND	ND	0.22	ND	0.22
52	ND	0.17	ND	0.039	ND	ND	0.21	ND	0.21
53	ND	0.19	ND	0.056	ND	ND	0.24	ND	0.24
54	ND	0.09	ND	0.007	ND	ND	0.09	ND	0.09
55	ND	0.23	ND	0.065	ND	ND	0.29	ND	0.29
56	ND	0.5	ND	0.040	ND	ND	0.63	ND	0.63
57	ND	0.20	ND	0.004	ND	ND	0.20	ND	0.20
58	ND	0.25	ND	0.004	ND	ND	0.26	ND	0.26
59	ND	0.15	ND	0.039	ND	ND	0.19	ND	0.19
60	ND	0.12	ND	0.002	ND	ND	0.13	ND	0.13
Mean	-	0.24	-	0.03	-	-	0.27	-	0.27
SEM^k	-	0.02	-	0.004	-	-	0.02	-	0.02

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected, ^kSEM: standars error of mean

Table 41. Concentration of arsenic species in gulf weed

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
1	ND ^j	0.13	0.066	ND	ND	5.21	0.13	5.27	5.40
2	ND	0.13	0.063	ND	ND	5.92	0.13	5.98	6.11
3	ND	0.14	0.069	ND	ND	4.83	0.14	4.90	5.04
4	ND	0.13	0.065	ND	ND	5.00	0.13	5.06	5.19
5	ND	0.16	0.066	ND	ND	5.94	0.16	6.01	6.17
6	ND	0.14	0.066	ND	ND	4.88	0.14	4.95	5.09
7	ND	0.15	0.075	ND	ND	5.55	0.15	5.63	5.78
8	ND	0.13	0.065	ND	ND	5.93	0.13	5.99	6.13
9	ND	0.15	0.079	ND	ND	4.84	0.15	4.92	5.07
10	ND	0.15	0.063	ND	ND	5.68	0.15	5.74	5.90
11	ND	0.16	0.065	ND	ND	4.92	0.16	4.98	5.14
12	ND	0.13	0.065	ND	ND	5.38	0.13	5.44	5.58
13	ND	0.14	0.063	ND	ND	5.24	0.14	5.30	5.44
14	ND	0.16	0.064	ND	ND	5.35	0.16	5.41	5.58
15	ND	0.16	0.070	ND	ND	4.54	0.16	4.61	4.77
Mean	-	0.14	0.07	-	-	5.28	0.14	5.35	5.50
SEM^k	-	0.003	0.001	-	-	0.12	0.003	0.12	0.12

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected, ^kSEM: standars error of mean

Table 42. Concentration of arsenic species in hijiki

unit : mg/kg

No. ^a	AsC ^b	AsB ^c	As(III) ^d	DMA ^e	MMA ^f	As(V) ^g	Total		
							oAs ^h	iAs ⁱ	Sum
1	ND ^j	0.06	0.41	0.70	ND	0.86	0.76	1.27	2.03
2	ND	0.04	0.35	0.46	ND	2.86	0.50	3.22	3.71
3	ND	0.34	0.18	1.43	ND	2.96	1.78	3.14	4.92
4	ND	0.05	0.12	0.50	ND	0.27	0.54	0.39	0.94
5	ND	0.03	0.10	0.63	ND	2.83	0.66	2.93	3.59
6	ND	0.02	0.04	0.52	ND	1.38	0.54	1.42	1.95
7	ND	0.01	0.15	0.54	ND	0.63	0.55	0.78	1.32
8	ND	0.01	0.04	0.43	ND	0.22	0.44	0.26	0.70
9	ND	0.08	0.04	0.48	ND	1.30	0.56	1.34	1.90
10	ND	0.01	0.11	1.12	ND	1.18	1.13	1.29	2.42
11	ND	0.05	0.44	ND	ND	4.27	0.05	4.71	4.76
12	ND	0.07	0.07	ND	ND	1.48	0.07	1.55	1.62
13	ND	0.16	0.18	ND	ND	2.56	0.16	2.74	2.90
14	ND	0.04	0.44	ND	ND	4.38	0.04	4.83	4.86
15	ND	0.12	ND	ND	ND	1.16	0.12	1.16	1.28
16	ND	0.12	ND	ND	ND	1.51	0.12	1.51	1.63
17	ND	0.02	ND	ND	ND	1.48	0.02	1.48	1.50
18	ND	0.03	0.28	ND	ND	1.64	0.03	1.92	1.95
19	ND	0.04	0.33	ND	ND	6.21	0.04	6.54	6.58
20	ND	0.06	ND	ND	ND	1.05	0.06	1.05	1.12
21	ND	0.04	ND	ND	ND	3.23	0.04	3.23	3.27
22	ND	0.05	0.53	ND	ND	2.58	0.05	3.11	3.16
23	ND	0.06	ND	ND	ND	0.86	0.06	0.86	0.92
24	ND	0.08	ND	ND	ND	2.83	0.08	2.83	2.91
25	ND	0.06	ND	ND	ND	3.59	0.06	3.59	3.65
26	ND	0.09	ND	ND	ND	2.04	0.09	2.04	2.12
27	ND	0.05	ND	ND	ND	2.20	0.05	2.20	2.24
Mean	-	0.07	0.14	0.25	-	2.13	0.32	2.27	2.59
SEM^k	-	0.01	0.03	0.07	-	0.27	0.08	0.28	0.28

^aNo.: number, ^bAsC: arsenocholine, ^cAsB: arsenobetaine, ^dAs(III): arsenite, ^eDMA: dimethylarsinate, ^fMMA: monomethylarsonate, ^gAs(V): arsenate, ^hoAs: Organic arsenic, ⁱiAs: Inorganic arsenic, ^jND: not detected, ^kSEM: standard error of mean

제5장 요약

중금속은 인간의 건강을 위협하는 물질로 간주되면서 중요한 관리 대상이 되고 있지만 주위 환경에 일정 농도 존재하며, 인간은 항상 이러한 환경에 노출되어 있다.

우리가 섭취하는 해조류는 다른 식용식물 보다 풍부한 무기질을 함유하고 있으며, 항산화, 항균, 항암, 항응고, 항염증 등 여러 가지 활성이 연구되어지고 밝혀지고 있다. 그러나 해조류는 바다라는 특수한 환경에 둘러싸여 있어 중금속 노출에 대한 잠재적 위해성을 가지고 있다. 특히 비소의 경우 육상 동·식물의 존재 범위보다 고농도로 존재하고 있어 중요한 위해요인이 되고 있다.

JECFA, EPA, ATSDR 등과 같은 식품, 환경, 질병 등 광범위한 분야의 관련 기구에서는 비소의 위해성을 규정하고 중요한 위험물질로 등록·관리하고 있다. 특히, 국제암연구소(IARC)에서는 무기비소를 1급 발암물질로 규정하고 있다. 하지만 이러한 위험성에도 불구하고 현재 우리나라에서는 식품 중 캡슐류(1.5 mg/kg 이하), 식염류(0.5 mg/kg 이하), 식용유지류(0.1 mg/kg 이하) 등에서만 비소의 허용기준이 설정되어 있을 뿐 농산물이나 수산물 등 주요 다소비 식품에 대한 기준 및 규격은 정해지지 않고 있다.

비소는 산화상태 및 결합하고 있는 화합물의 형태에 따라 독성도가 달라 이들이 인체에 미치는 영향 또한 다르므로 유기비소의 함량이 많은 수산물에 대해 단순한 비소의 총량적 개념으로는 인체에 대한 위해성을 판단하기는 어렵다. 따라서 고농도 비소 함유 식품으로 알려진 해조류를 대상으로 비소의 총량 및 각각의 화학종에 대한 분석법 마련을 위해 모니터링을 실시하였다.

해조류의 총비소 분석을 위한 전처리 방법(wet, wet-sonication, microwave digestion) 및 분석방법(ICP-OES, ICP-MS), 6가지 비소화학종 분리·분석을 위한 시료 추출(methanol, ethanol, HNO₃), 정제(membrane filter, SPE cartridge), 분리(mobile phase, Ion-exchange column), 분석(HPLC-ICP-MS) 등의 최적 분석조건을 수립하고자 하였다. 위와 같은 분석과정의 검증을 통해 실험결과를 도출하고 다

음과 같은 결론을 얻었다.

1. 해조류의 총비소 함량을 확인하기 위한 전처리 방법으로 일반습식분해법, sonication을 적용한 습식분해법 그리고 microwave분해법을 비교하였으며, 모두 96.7~99.3%의 회수율을 보여 시료분해를 위한 적합한 분해방법들로 확인되었다.
2. 총 비소 함량 분석은 질량분석기(MS)를 이용한 높은 감도와 DRC mode를 이용한 간섭물질($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ 등)의 선택적 제거 등의 장점을 가지고 있는 ICP-MS를 이용하였으며, 조사대상 시료에 대한 평균 총 비소 함량은 김, 다시마, 미역, 툇 그리고 모자반이 각각 2.07, 3.07, 1.84, 4.49 그리고 6.48 mg/kg으로 확인되었다.
3. 비소종분리 분석을 위해서는 시료에서 비소화합물의 형태 변화 없이 추출하여야 한다. 시료 분석을 위해 분말화 하였고, 이를 H_2O , 50% methanol 그리고 30% ethanol (모든 용매는 1% HNO_3 에 희석함)를 이용하여 추출효율을 비교하였다. 측정의 정확도를 측정하기 위해 CRM (DORM-2)을 각 용매별로 추출하였고, HPLC-ICP-MS를 이용한 확인 결과 30% ethanol과 50% methanol (1% HNO_3) 등의 유기용매에 의한 추출이 검출감도가 좋았으며, 그중 50% methanol을 이용한 추출법이 가장 검출감도가 좋았다.
4. 비소화학종의 분리·분석에는 총비소 분석과 달리 산용액을 사용하지 않기 때문에 많은 불순물이 존재하고, 이 추출물을 HPLC나 ICP-MS에 직접 주입할 경우 column이나 시료주입장치의 막힘, 검출기의 오염 등이 발생하여 분석결 및 장비의 유지에 나쁜 영향을 준다. 이를 방지하기 위해 여과(정제)의 과정이 필요하며, 여과의 효율성과 결과의 정확성을 확인하기 위해 인증표준물질 NMIJ 7503-a를 50% methanol (1% HNO_3)로 추출하고 원심분리 한 후 상정액을 $0.45\ \mu\text{m}$ membrane filter와 Oasis MAX cartridge로 여과하여 비교실

험을 하였다. 분석 결과 SPE 방법에서는 As(III), DMA 그리고 As(V)의 회수율이 각각 103.1%, 101.8%와 94.4% 였으며, membrane filter의 방법은 103.0%, 104.5% 그리고 91.8%로 두 방법 모두 높은 정확성을 보였다. 그러나 실험의 신속성과 간편성을 고려할 경우 membrane filter를 이용한 방법이 cartridge를 이용한 여과 방법보다 효과적이라고 생각한다.

- 비소화합물은 화합물의 형태에 따라서 각각 다른 pH 범위를 가지고 있고 zwitterion인 arsenobetaine을 제외한 나머지 5가지 비소화합물은 알칼리성 이동상 안에 음이온 형태로 존재할 경우 음이온 교환 column에 적합한 일정한 해리 범위를 가지고 있어 이의 분리를 위해 anion exchange column을 사용하였다. 용매의 용리조건은 단일용매를 사용하는 isocratic 방법이 편리하나 분석하고자 하는 비소화합물의 분리가 되지 않는 단점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 chromatogram상의 각 비소화합물의 검출 peak이 중복되지 않도록 용매를 조절할 수 있는 gradient 방법으로 이동상 조건[A용매; ammonium bicarbonate (2 mM, pH 8.0), B용매; ammonium nitrate + ammonium phosphate (20 mM, pH 9.2)]을 설정하여 분석하였다.
- 앞서 확립된 최적 분석조건으로 국내에서 유통 중인 해조류 시료 200건을 HPLC-ICP-MS를 이용하여 비소화합물을 분리·분석하였다. 김, 다시마, 미역 시료에서 확인된 비소화합물은 arsenobetaine (AsB)과 dimethylarsenic acid (DMA)로 AsB의 함량(약 85~98%)이 가장 높게 확인되었으며, arsenocholine (AsC)과 무기비소인 arsenite [As(III)], Arsenate [As(V)]는 확인되지 않았다. 이와 달리 모자반과에 속하는 모자반과 툫에서는 무기비소형태인 As(V), As(III)과 유기비소형태인 AsB와 DMA가 확인되었으며, 주요 비소화합물로는 무기비소인 As(V)가 각각 93%와 82%로 가장 높은 함량을 보였다.

이상의 실험 결과 해조류의 총 비소 함량과 비소화합물들의 분리·분석 결과를 얻기 위해 수립된 시료 전처리 조건(습식분해, 비소화합물 추출 및 분석 조건) 및

ICP-MS와 HPLC-ICP-MS의 분석 조건은 여러 연구의 결과들과 유사한 경향을 보였으며, 인증표준물질들에 대한 높은 정확성과 정밀성을 보였다. 수립된 분석 조건을 활용한다면 해조류뿐만 아니라 다른 식품들에 대한 신속하고 정확한 모니터링에도 유용할 것으로 판단된다. 하지만 본 논문에서 아쉬웠던 점은 대부분의 해조류가 대사과정을 거치며 유기비소 형태를 보이는 것과는 달리, 모자반과 식물인 톳과 모자반의 경우에는 특이적으로 무기비소 형태가 주요 비소종으로 확인되었으나, 이들 해조류의 생물학적 흡착능력과 내부 생화학적 변화를 구명하지 못한 것이다. 앞으로 더 많은 연구를 통해 이들 특성이 구명된다면, 건강에 대한 관심증가로 섭취량이 늘어나고 있으며, 건강기능식품, 향균·항생물질, 바이오 연료 개발 등의 목적으로 산업적인 이용이 증가하고 있는 해조류의 활용에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. R. Khelifi and A. Hamza-Chaffai, Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 248, 71 - 88 (2010)
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Arsenic. Atlanta, GA: U.S. DepartmentSDR of Health and Human Services, Public Health Services (2007)
3. Ming-Ho, Y. Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants, Chap. 12, CRC Press LLC, ISBN 1-56670-670-2, 2nd Edition, BocaRaton, USA (2005)
4. Environmental protection agency (EPA), Water-Human health (2011)
5. I. G. Jeoung, K. S. Ha and J. D. Choi, Heavy metals in fish and shellfish at the coastal area of Tongyeong, *Korea, J. Ins. Marine Industry*, 17, 39-46 (2004)
6. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Priority for toxic substances and disease registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>
7. G. K. Devi, K. Manivannan, G. Thirumaran, F. A. A. Rajathi and P. Anantharaman, In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 4, 205-211 (2011)
8. D. Kim, J. Park and T. Lee, Analysis of biochemical compositions and nutritive values of six species of seaweeds. *J. Life Sci.*, 23(8) 1004-1009 (2013)
9. Food and Agriculture Organization (FAO), The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department (2012)
10. Food and Agriculture Organization (FAO), A guide to the seaweed industry(Seaweeds used as human food). FAO Fisheries technical paper No.

441 (2003)

11. P. Rupérez, Mineral content of edible marine seaweeds, *Food Chem.*, 79, 23-26 (2002)
12. S. Kim, S. Woo, H. Yun, S. Yum, E. Choi, J. R. Do, J. H. Jo, D. Kim, S. Lee and T. K. Lee, Total phenolic contents and biological activities of Korean seaweed extracts, *Food Sci. Biotechnol.*, 14, 798-802 (2005)
13. K. H. Wong and P. C. K. Cheung, Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I-proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties, *Food Chem.*, 71, 475-482 (2000)
14. Y. V. Yuan and N. A. Walsh, Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds, *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1144-1150 (2006)
15. J. E. F. Cassolato, M. D. Nosedá, C. A. Pujol, F. M. Pellizzari, E. B. Damonte and M. E. R. Duarte, Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*, *Carbohydr. Res.*, 343, 3085-3095 (2008)
16. A. M. S. Mayer, A. D. Rodríguez, R. Berlinck and M. T. Hamann, Marine pharmacology in 2005 - 6: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiprotozoal, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action, *BBA. General Subjects*, 1790, 283-308 (2009)
17. R. D. Johnson, D. D. Manske, D. H. New and D. S. Podrebarac, Pesticide and other chemical residues in infant and toddler total diet samples(II), August 1975-July 1976, *Pestic. Monit. J.*, 15, 39-43 (1981)
18. K. S. Kim, Heavy metal survey of agricultural products in Jeollanam-buk province, Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2005)

19. K. S. Kim, Development of analysis method on arsenic chemicals in sea food, Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2007)
20. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Seventy-second report, Evaluation of certain contaminants in food. WHO Technical report series 959. World Health Organization (2011)
21. International Agency for Research on Cancer (IARC), Agents classified by the IARC Monographs, Vol 1-109. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (2014)
22. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korean food standards codex (2013)
23. G. J. Woo, Food safety management system and standards research of foreign, Ministry of Food and Durg Savety (MFDS) (2012)
24. China Food Standard Agency, Maximum levels of contaminants in food, GB 2762 (2005)
25. FSANZ, Contaminants and natural toxicants, Standard 1.4.1, Food standards Australia New Zealand (2013)
26. CODEX, CODEX general standard for contaminants and toxins in food and feed, CODEX alimentarius international food standards, (1995)
27. K. A. Francesconi, J. S. Edmonds, Arsenic and marine organisms, *Adv. Inorg. Chem.*, 44, 147-189 (1997)
28. S. C. Carapella, Arsenic and arsenic alloys. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, eds. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 3, 624-633 (1992)
29. European Food Safet Authority (EFSA), Scientific opinion on arsenic in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.*, 7(10):1351:1 - 1351:199 (2009)
30. World Health Organization (WHO), Air Quality Guidelines for Europe, 2nd ed. Copenhagen: WHO Regional Publications, European Series, 91, pp. 288

(2000)

31. World Health Organization (WHO), Arsenic and Arsenic Compounds (Environmental Health Criteria 224), 2nd ed. Geneva, International Programme on Chemical Safety (2001)
32. J. Navratilova, Methods for elemental speciation of arsenic compounds. Faculty of chemistry institute of food science and biotechnology. *Brno Univ. of Tech.* (2011)
33. K. A. Francesconi, R. Tanggaar, C. J. McKenzie, and W. Goessler, Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin. Chem.*, 48, 92-101 (2002)
34. F. Challenger, Biological methylation. *Chem. Rev.*, 36, 315-361 (1945)
35. J. S. Edmonds, M. Morita and Y. Shibata, Isolation and identification of arsenic containing ribofranosides and inorganic arsenic from Japanese edible seaweed *Hijikia Fusiforme*. *J. Chem. Soc. Perk. Trans.*, 1, 577-580 (1987)
36. J. Navrátilová, Methods for elemental speciation of arsenic compounds. Brno University of Technology. Brno, Czech (2011)
37. J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, Arsenic in seafoods, human health aspects and regulations, *Mar. Pollut. Bull.*, 26, 665-674 (2003)
38. K. A. Francesconi and J. S. Edmonds, Arsenic and marine organisms. *Adv. Inorg. Chem.*, 44, 147-189 (1997)
39. K. A. Francesconi, J. S. Edmonds and R. V. Stick, Accumulation of arsenic in yelloweye mullet (*Aldrichetta forsteri*) following oral administration of organoarsenic compounds and arsenate. *Sci. Total Environ.*, 79, 59-67 (1989)
40. J. J. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, Report on three aliphatic dimethylarsinoyl compounds as common minor constituents in marine samples. An investigation using high-performance liquid

chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spec.*, 19, 227 (2005)

41. W. R. Cullen and K. J. Reimer, Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.*, 89, 713-764 (1989)
42. J. S. Edmonds, K. A. Francesconi, J. R. Cannon, C. L. Raston, B. W. Skelton and A. H. White, Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster, *Panulirus longipes* Cygnus. *George. Tetrahedron Let.*, 18, 1543-1546 (1977)
43. J. R. Cannon, J. S. Edmonds, K. A. Francesconi, C. L. Raston, J. B. Saunders, B. W. Skelton and A. H. White, Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, a constituent of the Western rock lobster, *Panulirus* Cygnus, the dusky shark, *Carcharhinus obscurus*, and some samples of human urine. *Aust. J. Chem.*, 34, 787-798 (1981)
44. L. A. Clowes and K. A. Francesconi, Uptake and elimination of arsenobetaine by the mussel *Mytilus edulis* is related to salinity. *Comp. Biochem. Phys.*, 137, 35-42 (2004)
45. J. S. Edmonds, Diastereoisomers of an Arsenomethionine - Based structure from *Sargassum Lacerifolium*: The formation of the arsenic-carbon bond in arsenic containing natural products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 1105-1108 (2000)
46. International Agency for Research on Cancer (IARC), Arsenic and arsenic compounds, IARC Monographs - 100c
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-6.pdf>
47. S. T. Kim, Research of inorganic arsenic in food(II). National Institute of Toxicological Research, Seoul, Korea (2003)
48. S. G. Salgado, M. A. Q. Nieto and M. M. B. Simón, Optimisation of sample treatment for arsenic speciation in alga samples by focussed

- sonication and ultrafiltration. *Talanta* 68: 1522–1527 (2006)
49. The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory Oxford University. The safety data for ethyl alcohol. Available from MSDS of http://www.pcl.ox.ac.uk/MSDS/ET/ethyl_alcohol.html origin by <http://msds.chem.xo.ac.uk>. Accessed May 9 (2008)
 50. NRC, Arsenic in drinking water, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C. Available from: <http://www.nap.edu/openbook/030906332-4> (1999)
 51. I. Csanaky and Z. Gregus, Species variations in the biliary and urinary excretion of arsenate, arsenite and their metabolites, *Comp. Biochem. Physiol.*, 131: Part C355 - 365. PMID:11912060 (2002)
 52. M. Vahter, Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicol Lett.*, 112 - 113, 209 - 217 (2000)
 53. I. Csanaky and Z. Gregus, Effect of phosphate transporter and methylation inhibitor drugs on the disposition of arsenate and arsenite in rats. *Toxicol. Sci.*, 63, 29 - 36 (2001)
 54. K. M. No, Speciation analysis of organic and inorganic arsenic compounds in shellfish by HPLC-ICP/MS. PhD thesis, Chosun Univ. (2010)
 55. E. A. Woolson, Arsenical pesticides, *ACS Ser.*, 7, 1-6 (1975)
 56. W. Lepkowski, Arsenic crisis spurs scientists, *Chem. Eng. News*, 77(20), 45-49 (1999)
 57. Ministry of Environment, A survey of soil monitoring network and soil pollution in 2012 (2013)
 58. M. Rose, J. Lewis, N. Langford, M. Baxter, S. Origgi, M. Barber, H. MacBain and K. Thomas, Arsenic in seaweed-forms, concentration, and dietary exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1263-1267 (2007)
 59. Ministry of Agriculture and Forestry (New Zealand). 2009 New Zealand Total Diet Study: Agricultural compound residues, selected contaminant and

nutrient elements (2011)

60. J. S. Moon, Dietary intake and risk assessment of heavy metals in Korean foods. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2001)
61. S. K. Lee, Y. C. Yoo, T. J. Kwon, Y. C. Ko, J. Y. Yang, S. Y. Lee, K. W. Kim and S. H. Kim, Distribution of arsenic in Korean human tissues, The Annual Report of KNTP, 1, 467-478 (2002)
62. A. S. Om, Methodology for the exposure risk and legal standards of heavy metals in agriculture products. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2005)
63. D. W. Choi, Survey for heavy metal contents in food - Frequently consumed food, Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2006)
64. T. Y. Cho, Monitoring of heavy metals in vegetables. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2009)
65. J. H. Lee, Monitoring of heavy metals in fruits. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2009)
66. T. Y. Cho, Monitoring on the heavy metal contents in processed foods. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2010)
67. Y. J. Kim, Heavy metal monitoring on aquatic products from the east-coast in Gangwon province. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2010)
68. H. S. Kim, Monitoring of heavy metals in vinegars. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2011)
69. M. H. Kim, Survey and risk assessment of heavy metals in mushroom. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2011)
70. S. H. Park, Risk assessment of heavy metals in infant & young children foods. Natinoal Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2012)
71. H. J. Yoon, Monitoring of Heavy metals in root vegetables and processed foods. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (2013)

72. S. T. Kim, Research of inorganic arsenic in food(II). National Institute of Toxicological Research, Seoul, Korea (2003)
73. C. O. Abernathy, Bioaccumulation of arsenic (As) in fish & toxicity of as species. U. S. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA (2003)
74. Canadian Food Inspection Agency. Inorganic Arsenic and Hijiki Seaweed Consumption, <http://www.inspection.gc.ca/food/information-for-consumers/fact-sheets/specific-products-and-risks/chemical-hazards/inorganic-arsenic/eng/1332268146718/1332268231124>
75. Food Standards Agency. Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment. <http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotsection.pdf>
76. Food Standards Agency. Food Survey Information Sheet 61/04: Arsenic in seaweed. Available from: <http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis2004branch/fsis6104>. Accessed July 28 (2004)
77. Japan Ministry of Health, labour and Welfare. Available from <http://www.mhlw.go.jp/topics/2004/07/tp0730-1.html>. Accessed July 30 (2004)
78. D. L. Johnson and M. E. Q. Pilson, Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate and phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.*, 58, 289 - 299 (1972)
79. P. Michel, Arsenic in marine medium, Biochemistry and Ecotoxicology. Repères. Océan N°4. Ed. IFREMER Paris (1993)
80. J. H. Farmer and L. R. Johnson. Assessment of occupational exposure to inorganic arsenic based on urinary concentrations and speciation of arsenic. *Brit. J. Ind. Med.*, 47, 342 - 48 (1990)
81. B. W. Wenclawiak, M. Krah, Reactive supercritical fluid extraction and chromatography of arsenic species, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351, 134-138

(1995)

82. K. Yokoi and A. Konomi, Toxicity of so-called edible hijiki seaweed (*Sargassum fusiforme*) containing inorganic arsenic. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 63, 291-297 (2012)
83. R. Thomas, Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners, Third Edition, CRC Press, (2013)
84. J. K. Suh, Y. H. Yim, E. J. Hwang and S. H. Lee, Determination of arsenic in seawater by dynamic reaction cell - inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Korean Soc. Environ. Anal.*, 5, 137-144 (2002)
85. Y. J. Hsieh and S. J. Jiang, Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds. *J. Agric. Food chem.*, 60, 2083-2089 (2012)
86. C. H. Yoon, K. H. Chung and J. K. Hong. Speciation of arsenic and selenium compounds in the environmental field using HPLC coupled to specific detectors. *J. Korean Soc. Environ. Anal.*, 5, 1-11 (2002)
87. R. Wahlen and T. Catterick. Simultaneous co-extraction of organometallic species of different elements by accelerated solvent extraction and analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 211-217 (2004)
88. M. J. Kim, K. H. Ahn and Y. J. Jung, Arsenic speciation and the characteristics of heavy metals in mine tailings of abandoned mines. *J. KSEE.*, 23, 1711-1719 (2001)
89. M. J. Kim, K. H. Ahn and Y. J. Jung, Vertical distribution and mobility of arsenic and heavy metals in mine tailings and nearby paddy fields, *J. KSEE.*, 25, 544-553 (2003)
90. S. Yalcin and X. Chris Le. Speciation of arsenic using solid phase extraction cartridges. *J. Environ. Monit.*, 3, 81-85 (2001)
91. AOAC, Official Methods of Analysis, 15th ed., Association of Official

Analytical Chemists; Washington, D.C. (1990)

92. W. G. Brumbaugh and M. J. Walther, Determination of arsenic and selenium in whole fish by continuous-flow hydride generation atomic absorption spectrophotometry, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 484-486 (1989)
93. K. Y. Ryu, S. L. Shim, I. M. Hwang, M. S. Jung, S. N. Jun, H. Y. Seo, J. S. Park, H. Y. Kim, A. S. Om, K. S. Park, and K. S. Kim, Arsenic Speciation and Risk Assessment of Hijiki (*Hizikia fusiforme*) by HPLC-ICP-MS. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 41, 1~6 (2009)
94. H. Choi, S. K. Park, D. S. Kim and M. Kim, Determination of 6 arsenic species present in seaweed by solvent extraction, clean-up, and LC-ICP/MS. *Food Sci. Biotechnol.*, 20, 39-44 (2011)
95. N. Ybanez, M. L. Cervera and R. Montoro, Determination of arsenic in dry ashed seafood products by hydride generation atomic absorption spectrometry and a critical comparative study with platform furnace Zeeman-effect atomic absorption spectrometry and inductively coupled atomic emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta.*, 258, 61-71 (1992)
96. H. Choi, S. K. Park, D. S. Kim and M. Kim, Risk assessment of arsenic in agricultural products, *Korean J. Environ. Agric.*, 29, 266-272 (2010)
97. N. Furuta and T. Shinfuji. Determination of different oxidation states of arsenic and selenium by inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry with ion chromatography. *Fres. J. Anal. Chem.*, 355, 457-60 (1996)
98. J. H. Farmer and L. R. Johnson. Assessment of occupational exposure to inorganic arsenic based on urinary concentrations and speciation of arsenic. *Brit. J. Ind. Med.*, 47, 342 - 348 (1990)
99. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), EPA method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.

100. P. Thomas and K. Sniatecki. Determination of trace amounts of arsenic species in natural waters by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 10, 615–618 (1995)
101. K. Jin, H. Ogawa and M. Taga, Study on wet digestion method for determination of total arsenic in marine organisms by continuous flow arsine generation and atomic absorption spectrometry using some model compounds. *Bunseki Kagaku*. 32, 171–176 (1983)
102. W. A. Maher, A decomposition procedure for the determination of arsenic in marine samples. *Talanta*. 30, 534–536 (1983)
103. A. Yasui and C. Tsutsumi, Adaptability of wet decomposition method to food samples for the determination of arsenic by arsine generation–atomic absorption spectrophotometry. *Bunseki Kagaku*. 26, 809–814 (1977)
104. P. J. Levblanc and A. L. Jackson, Dry ashing technique for the determination of arsenic in marine fish. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 56(2), 383–386 (1973)
105. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), EPA method 3051A, Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils.
106. J. Patrick, R. G. William and J. C. Mindak, FDA elemental analysis manual for food and related products analytical methods. U.S. Food and Drug Administration (2013)
107. X. Hou and B.T. Jones. Inductively coupled plasma/optical emission spectrometry. Wake Forest University, Winston–Salem, USA
108. F. Lagarde, M. B. Amran, M. J. F. Leroy, C. Demesmay, M. Olle, A. Lamotte, H. Muntau, P. Michel, P. Thomas, S. Caroli, E. Larsen, P. Bonner, G. Rauret, M. Foulkes, A. Howard, B. Griekink and E. A. Maier, Improvement scheme for the determination of arsenic species in mussel and fish tissues. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 36, 5–11 (1999)

109. L. H. Pacquette, A. Szabo, J. J. Thompson and S. Baugh. Application of inductively coupled plasma/mass spectrometry for the measurement of chromium, selenium, and molybdenum in infant formula and adult nutritional products: First Action 2011.19. *J. AOAC Int.*, 95 (2012)
110. R. Wahlen, S. McSheehy, C. Scriver and Z. Mester, Arsenic speciation in marine certified reference materials; Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 876-882 (2004)
111. W. Maher, W. Goessler, J. Kirby and G. Raber, Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from Lake Macquarie NSW, Australia. *Mar. Chem.*, 68, 169-182. (1999)
112. C. H. Yoon, Y. C. Park and J. K. Hong. A comparison of sonication and microwave-assisted extraction method for speciation of arsenic in fish tissue, DORM-2. *Anal. Sci. and Technol.* 16, 134-142 (2003)
113. J. L. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, Determination of organoarsenic species in marine samples using gradient elution cation exchange HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18, 452-459 (2003)
114. K. Falk and H. Emons, Speciation of arsenic compounds by ion-exchange HPLC-ICP-MS with different nebulizers, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, 643-649 (2000)
115. C. Yoon, H. Yoon, Y. Park, C. Park and J. Hong, Determination of inorganic arsenic species in natural water using solid phase extraction cartridge and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Korean Soc. Environ. Anal.*, 6, 205-212 (2003)
116. P. Terasahde, M. Pansar-Kallio and P. K. G. Manninen, Simultaneous determination of arsenic species by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, 750, 83-88 (1996)

117. R. R. Rasmussen, R. V. Hedegaard, E. H. Karsen and J. J. Sloth. Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 2825-2834 (2012)
118. S. Londesborough, J. Mattusch and R. Wennrich, Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363, 577-581 (1999)
119. C. B. Hymer and J. A. Caruso, Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1045, 1-13 (2004)
120. S. G. Capar, W. R. Mindak and W. C. Cunningham. Elemental analysis manual: Section 4.0.2 method performance checks. U.S. Food and Drug administration, Washington DC, USA (2008)
121. G. D. Martinie and A. A. Schilt. Investigation of wet oxidation efficiencies of perchloric acid mixtures for various organic substances and the identities of residual matter. *J. Anal. Chem.*, 48, 70 - 74 (1976)
122. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), EPA method 6010B. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry.
123. AOAC. Association of Official Analytical Chemist, Standard Method Performance Requirements (AOAC SMPR 211.009), for Cr, Mo and Se in infant formula and adult/pediatric nutritional formula. *J. AOAC Int.*, 95, 1 (2012)
124. K. Falk and H. Emons, Speciation of arsenic compounds by ion-exchange HPLC-ICP-MS with different nebulizers. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, 643-649 (2000)
125. J. J. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, Selective arsenic speciation analysis of human urine reference materials using gradient elution ion-exchange HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 973-978 (2004)

126. R. L. Smith, Technical guidance manual, EPA region 3 guidance on handling chemical concentration data near the detection limit in risk assessments, EPA (1991)
127. GEMS/Food-EURO, Report on a workshop in the frame of GEMS/Food-EURO, second workshop on reliable evaluation of low-level contamination of Food, Kulmbach, Germany (1995)
128. T. Wondimu, A Ueno, I Kanamary, Y Yamaguchi, R. McCrindle and K. I. Hanaoka, Temperature-dependent extraction of trace elements in edible brown alga hijiki, *Hizikia fusiforme*. *Food Chem.*, 104, 542-550 (2007)
129. S. Karthikeyan and S. Hirata. Ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry determination of arsenic species in marine samples. *Appl. Organometal. Chem.*, 18, 323-330 (2004)
130. S. Hirata, H. Toshimitsu and M. Aihara, Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Anal. Sci.*, 22, 39-43 (2006)
131. A. J. Kim, S. Y. Kim, W. C. Lee and M. J. Park, Contents of arsenic in some fisheries caught in western coast, *J. Fd Hyg. Safety.*, 13(3), 201-205 (1998)
132. Risk assesment of inorganic arsenic in food, KFDA (2004)
133. D. A. Hunter, W. Goessler and K. A. Francesconi, Uptake of arsenate, trimethylarsine oxide, and arsenobetaine by the shrimp *Carngon crangon*. *Mar. Biol.*, 131, 543-552 (1998)
134. C. Almela, S. Algora, V. Benito, M. J. Clemente, V. Devesa, M. A. Suner, D. Velez and R. Montoro, Heavy metal, total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products. *J. Agri. Food Chem.*, 50, 918 - 923 (2002)

감사의 글

철없이 가방만 메고 오가던 의미 없는 대학생활을 보내던 순간 갈 곳이 있다는 사실 하나가 마냥 좋아서 발을 붙이게 된 실험실 생활, 어느덧 인생의 중요한 밑거름이 되어버리고, 이제는 새로운 세상에서 살아가기 위해 떠나야 할 만큼 그렇게 시간이 흘러버렸습니다. 제 개인적으로는 인생의 우여곡절을 많이 겪은 곳이라 실험실 밖은 더 한 곳이란 것을 알지만 어린 나이에 그 작은 공간은 지금 생각해 봐도 정말 어려운 세상이었습니다. 그 곳에서 즐거웠고, 힘들었고, 미워하고, 사랑하고, 참아보고, 떠나보고, 참 수년간을 몇 평 안 되는 작은 공간 속에서 인생을 많이 배웠던 것 같습니다. 그런 곳을 잠시 떠나있어 보니 젊음을 함께 했던 선·후배들에 대한 그리움이 너무 커 힘들었던 것 같습니다.

학위 과정 중 많은 사건과 어려움 중에서도 모든 것을 너그러이 용서해 주시고, 졸업을 앞둔 지금까지 인생의 좋은 추억과 그보다 더 값진 학업을 성취할 수 있도록 지도와 격려를 아끼지 않으신 김경수 지도교수님께 진심어린 감사를 드립니다.

미흡한 연구지만 바쁘신 와중에도 지도와 조언을 아끼지 않으시며, 먼 길 마다않고 심사를 해 주신 식품의약품안전처 김미혜 박사님, 저에게는 항상 존경하는 연구자이시며, 이 논문의 가장 큰 지도자이신 한국과학기술연구원 박경수 박사님, 인생의 방황기에 올바른 선택을 할 수 있도록 인도 해주신 이재준 교수님, 그리고 실험실 생활 동안 힘이 되어주고, 학업의 마지막까지 이끌어준 친누나 같은 서혜영 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

대학이라는 곳에서 폭넓은 지식과 높은 학식으로 제자들을 열정적으로 지도해 주시고, 학교생활 동안 든든한 지원자가 되어주신 부모님 같으신 서화중 교수님, 이명렬 교수님, 노희경 교수님, 장해춘 교수님, 김복희 교수님 그리고 새로 임용되신 이주민 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

힘든 실험실생활 동안 항상 서로에게 의지가 되며, 지금은 즐거웠던 기억밖에 남아있지 않게 만들어준 인생의 가장 소중한 시간을 같이 나눈 식품분석실 식구들에게도 고마운 마음을 전하고자 합니다. 언제나 든든한 선배님들인 박은령 박사님, 이혜정 박사님 그리고 송현파 박사님, 나보다 어리지만 누나 같은 김준형 박사님, 언제 봐도 편한 친구 같은 노기미 박사님, 내 잘못으로 너무 힘들었을, 그래서 항상 미안하고 고마운 심성례 박사님, 언제나 즐거움을 주고 묵묵히 열심히 하는 양수형 선생님, 모든 일에 최선을 다하는 인민이, 멀리서 열심히 일하는 재성이, 성화, 학위를 받으셨 으면서도 중요한 자리에 항상 참석하셔서 챙겨주시고 힘이 되어 주시는

전동복 박사님, 직장일과 학업을 병행하시느라 고생이 많으신 슈퍼우먼 홍영신 선생님, 실험실에 큰 힘이 되어주시는 홍준호 선생님, 그리고 방장으로 그 많은 일을 도맡아 하면서도 밝은 표정을 잃지 않는 지연이, 두말할 것 없이 열심히 하는 은영이, 실험실의 손발이 되고 있는 든든한 막내 상열이, 태구, 윤미, 타국에 와서 고생이 많은 Mr. Khan, Mr. Girum (Thank you!) 그리고 한 식구 같은 김두배 선생님, 소세영 선생님과 식품영양학과 모든 선·후배님들께도 감사의 마음을 전합니다.

또한, 대학생활 동안 든든하게 큰아버지 같이 격려해주신 정양모 박사님, 김관수 박사님, 그리고 삼촌은 마음으로 늘 걱정해 주시고, 조언해 주신 한규재 박사님, 정찬희 교수님, 홍철희 교수님, 마지막으로 정말 친 이모님 같이 챙겨주시고 격려해주신 전삼녀 박사님께 진심어린 감사 인사를 드립니다.

언제나 큰 힘이 되는 만형 원이형, 믿음직한 민석이, 젊은 엄마 다운이 그리고 동생 잘 챙겨주는 준은이형, 정은 박사님께도 진심으로 감사드립니다.

전라남도 수산업 발전을 위해 불철주야 노력하시는 해양수산과학원 이인곤 원장님, 학업을 무사히 마칠 수 있도록 배려해주신 최정배 센터장님, 맡은 업무에 항상 최선을 다하고 적극적으로 임하시는 전영호, 주우형 계장님, 김은희, 이정호 주무관님, 명승우 선장님, 송창호 기관장님, 선우미화 주무관님, 이진희 연구사님, 그리고 박순호 사무관님, 조주현 계장님께 고마움을 전합니다.

힘들고 방황하던 시기 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 조남철 교수님, 어머님 같이 챙겨주신 박세현 선생님, 누나 같은 정은애 선생님, 그리고 지금도 잊지 않고 챙겨주시는 동강대 식구들에게 감사의 마음을 전합니다.

항상 든든하게 인생의 힘든 순간 언제, 어디에서나 기운을 주어 이겨낼 수 있게 힘을 주는 너무 소중한 친구들 인진, 광중, 지훈, 민준, 상훈, 희석 그리고 현미에게 고마운 마음을 전합니다.

그리고 언제나 뒤에서 든든한 버팀목이 되어주는 우리가족 근철이형, 근석이형 그리고 항상 손자 걱정이신 할머니께 오늘의 기쁨을 전하고자 합니다.

마지막으로 항상 자식걱정 때문에 눈을 감으실 날까지 근심을 지고가실 류순기님과 윤옥순님께 잠시나마 짐을 내려놓고, 기쁨이라는 풍선을 어깨에 달아드려 가슴을 펴고 크게 웃을 수 있는 시간이 되었으면 하는 바람으로 이 논문을 바칩니다.

2014년 7월

류근영