

HG-AAS법에 의한 요중 비소의 최적 분석법에 관한 연구

이종화 · 이의선 · 홍성철 · 장봉기[†]

순천향대학교 환경보건학과

(2009. 8. 25. 접수/2009. 9. 25. 수정/2009. 10. 22. 채택)

A Study on the Optimal Analytical Method for the Determination of Urinary Arsenic by Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry

Jong-Wha Lee · Ui-Seon Lee · Sung-Chul Hong · Bong-Ki Jang[†]

Department of Environmental Health Science, Soonchunhyang University, Asan, Choongnam 336-745, Korea

(Received August 25, 2009/Revised September 25, 2009/Accepted October 22, 2009)

ABSTRACT

This study was carried out to examine the optimal analytical method for determination of urinary toxic arsenic (inorganic arsenic and its metabolites) by HG-AAS (hydride generation-atomic absorption spectrometry). In the analysis of SRMs (standard reference materials), method E (addition of 0.4% L-cysteine to pre-reductant and use 0.04M HCl as carrier acid) showed the most accurate results compared with the reference values. In the analysis of 30 urinary samples, analytical results were significantly different depend on the component of pre-reductant and the concentration of carrier acid. When the concentration of carrier acid was higher, the analytical result was lower. The recovery rates of MMA (monomethylarsonic acid) and DMA (dimethylarsenic acid) were varied by the concentration of pre-treatment acid and carrier acid and hydride generation reagents. When the concentration of carrier acid was 1.62 M (5% HCl), the recovery rates of DMA was 1%. The recovery rates of MMA and DMA in method E (=V) were 102% and 100%, respectively. The results of this study suggest that the component and concentration of pre-reductant and carrier acid must be carefully adjusted in the analysis of urinary arsenic, and method E is recommendable as the most precise analytical method for determination of urinary toxic arsenic.

Keywords: urinary arsenic, optimal analytical method, MMA, DMA, HG-AAS

I. 서 론

비소(As; Arsenic)는 다양한 형태의 화합물로 환경 중에 널리 분포하는 금속물질로 지각 중 자연부존 함량이 20번째로 많이 존재하는 물질로서 지역에 따라 차이는 있지만 자연적으로 지표면에 1.5~2 ppm 정도 존재한다.¹⁾ 공기 중의 비소는 화산폭발, 산불 등의 자연적인 오염원과 화석연료 연소, 자동차 배출가스, 흡연 등의 오염원에 기인한다. 또한 비소는 합금제조, 축전기, 베어링 제조, 유리의 착색제 및 탈색제, 피혁 및 목재 방부제, 비산염 농약, 전자산업에 광범하게 사용

되고 있어 직업적 노출이 유발되고 있다.²⁾

비소의 급성독성은 피부, 점막 및 결막에 대한 국소 자극작용이다. 심하면 괴사도 유발될 수 있으며 고농도를 섭취할 경우에는 위장관 염증과 출혈을 동반한 자극, 복통, 구토, 설사, 저혈압 증상이 나타난다. 섭취 후에 지연형 말초신경장애가 유발되어 운동장애 및 감각장애를 일으킨다. Arsine에 급성 노출되면 혈관 내 용혈이 유발되며, 복통, 황달 및 과노증이 초래된다. 비소의 만성노출은 피부, 호흡기계, 신경계, 간, 심순환계 및 조혈계에 부작용을 초래하며, 피부와 호흡기계에 암을 유발할 수 있다. 비소에 의한 말초신경병증은 원부위로부터 지각이상 및 지각마비가 생기며, 중증인 경우에는 운동장애로 근무력증이 생기고, 건반사가 없어진다. 대만에서는 비소의 환경노출로 말초혈관의 경련과 괴저를 일으키는 '흑족병(black foot disease)'이 유발되었다.²⁾

[†]Corresponding author : Department of Environmental Health Science, Soonchunhyang University
Tel: 82-41-530-1268, Fax: 82-41-530-1272
E-mail : jangbk@sch.ac.kr

또한 비소는 sulfhydryl(-SH)에 대한 친화력이 있어 단백질의 구조를 변화시켜 대사과정을 교란시킨다. 이 과정을 통하여 세포내 당 흡수, 당합성, 지방산 산화, glutathione 합성 등의 대사반응에 영향을 준다. 비소는 DNA와 직접적으로 반응하지 않지만 DNA 메틸화 교란, DNA 복구 억제, 산화적 스트레스, 신호전달 경로 변경 등을 통하여 간접적으로 유전자 발현에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다.^{3,4)}

비소의 독성은 비소의 화학적 형태에 따라 차이가 있어 무기비소(iAs; inorganic arsenic)가 유기비소에 비해 독성이 강하며, 3가 비소가 5가 비소에 비해 독성이 강한 것으로 알려져 있다.⁴⁾ EPA의 인체 노출평가에 따르면 약 20% 정도가 독성학적으로 중요한 무기비소의 형태였으며, 무기비소의 대부분은 음용수를 통하여 섭취되는 것으로 나타났다.

비소의 주요 인체 노출원인 해산물 중의 비소는 대부분 유기비소(arsenobetaine, arsenocholine, arsenosugars, arsenolipids)로서 인체에 무독한 것으로 알려져 왔으나 최근에 일부 유기비소(arsenosugars 및 arsenolipids)는 DMA(dimethylarsenic acid)로 변환되어 인간에게 잠재적인 독성을 나타낸다고 보고되고 있다.⁵⁻⁷⁾ Brima 등⁷⁾도 식품에서 유래된 유기비소 중에서 arsenobetaine은 대사되지 않은 상태로 요로 배설되고, arsenosugars 및 arsenolipids는 일부 DMA로 전환되어 요로 배설되는 것으로 보고하고 있다.

소화기로 섭취된 수용성 비소는 60~90% 흡수된다. 흡입을 통한 흡수는 소화기와 비슷한 것으로 추정되며, 피부를 통한 흡수는 경미하다고 보고되고 있다.³⁾ 인체에 흡수된 5가 비소는 3가 비소로 전환되며 대부분의 무기비소는 MMA(monomethylarsonic acid)와 DMA로 대사되어 대부분 신장으로 48시간 내에 배설된다.³⁾ 생체내 흡수된 무기비소는 대부분 요를 통하여 배설되며, 비소에 노출된 후 3일 이내에 50~80% 정도가 체외로 배설된다고 알려져 있다. 요중으로 배설되는 비소화합물의 농도는 인종 및 식습관에 따라 다소 차이는 있으나 무기비소와 그 대사체 중에서 DMA가 약 70%, MMA가 15%, 무기비소가 15%를 차지하는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ Hata 등⁸⁾은 식이를 조절하지 않은 일반인 210명을 대상으로 요중 비소화합물의 함량을 조사한 결과에서 총비소의 중앙값이 141.3 µg/l이며, 이 중 arsenobetaine이 61.3 µg/l로 가장 많았으며, 무기비소와 그 대사체(MMA와 DMA)의 합은 54.0 µg/l이며, DMA가 45.7 µg/l로 약 80%를 차지하는 것으로 보고하였다.

유해물질의 인체 독성정도와 인체 노출량 등을 고려

하여 오염원별 유해 환경오염물질 관리 우선순위를 선정한 자료에서 비소는 1997년 이후로 수년째 관리대상 상위에 랭크되어 있다.⁹⁾ 이러한 비소에 대한 인체 노출 평가는 인도, 중국, 대만, 멕시코 등 고농도의 비소에 오염된 지하수를 사용하는 주민들을 대상으로 많은 연구가 진행되었다. 요중 비소의 분석법으로는 HG-AAS (atomic absorption spectrometry coupled to hydride generation), HPLC-ICP/MS (high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry), HPLC-HG-atomic fluorescence spectrometry (AFS) 등이 주로 이용되고 있다.¹⁰⁾ 국내에서는 대부분 측정이 간편하고 경비가 저렴한 수소화물 증기발생기가 부착된 원자흡수분광광도계(이하 HG-AAS)를 이용하여 요중 비소를 분석하고 있다.

우리나라에서는 최근 국가산업단지 및 폐광산 지역 주민을 대상으로 요중 비소를 측정 한 결과 적게는 2.0 µg/gcreatinine에서 많게는 15.48 µg/gcreatinine으로 보고되고 있다. A산업단지 주민을 대상으로 조사한 결과 요중 비소(iAs, MMA 및 DMA)는 조사군 8.79 µg/gcreatinine, 대조군 8.93 µg/g creatinine; B산업단지의 경우 조사군 2.3 µg/gcreatinine, 대조군 2.0 µg/gcreatinine; C산업단지의 경우 조사군 15.48 µg/gcreatinine; D산업단지의 경우 조사군 4.46 µg/gcreatinine,¹¹⁾ 충남과 충북의 폐광지역 주민의 경우 조사군 각각 10.95 및 7.96 µg/g creatinine, 대조군 9.82 및 7.49 µg/g creatinine으로 보고되었다.¹²⁾ 각 보고서 간의 요중 비소 측정치에 차이가 매우 크고, 인근 동아시아인을 대상으로 한 연구와 비교시 매우 낮은 수준이었으며, 서양인을 대상으로 한 연구에서의 농도와 비슷한 경향인 것으로 나타났다. 이러한 많은 차이에도 불구하고 그 원인에 대한 연구는 부족한 실정이다.

HG-AAS를 이용한 요중 비소분석에서 요 시료의 전처리와 수소화물을 발생시키기 위하여 사용하는 산의 농도가 요중 비소 분석 결과에 많은 영향을 미친다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.¹³⁻¹⁶⁾ 국내에서는 요중 비소의 분석시 전처리에 대부분 진한염산을 사용하고 있고, 수소화물발생에 사용하는 산의 농도는 5%, 3%, 1%, 0.1% 등 다양하기 때문에 각 기관 마다 서로 다른 결과가 도출되는 것으로 생각된다. 또한 해산물 섭취가 상대적으로 많은 동양인의 경우에는 서양인에 비해 요중 DMA가 높은 농도로 존재하기 때문에 이동산의 농도가 높을 경우에는 DMA가 과소평가됨으로써 요중 비소농도가 현저히 낮게 나타날 가능성이 있다. 그러나 한국인을 대상으로 한 요중 무기비소, MMA,

DMA 등 비소 종류에 대한 정확한 참고치가 없으며, HG-AAS를 사용하여 요중 비소 분석시 시료의 전처리 과정에서 사용되는 산과 이동산의 농도 및 환원제가 결과치에 미치는 영향에 대한 연구가 부족하며, 또한 국내에서 요중 비소를 분석하는 대부분의 기관에서 예비 환원제로 KI(potassium iodide)-AA(ascorbic acid)를 사용하고 있기 때문에 예비 환원제에 대한 비교 연구도 필요하다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 요중 비소 분석에 널리 이용되고 있는 수소화물발생법-원자흡수분광법(HG-AAS)에서 시료의 전처리 방법과 수소화물증기발생에 이용되는 산의 농도가 분석의 정확도에 미치는 영향을 표준인증물질(standard reference material, 이하 SRM)과 요 시료를 사용하여 비교분석함으로써 요중 비소(무기비소와 그 대사체인 MMA와 DMA) 최적분석법을 제시하자 한다.

II. 연구방법

1. 실험재료

1) 시약 및 표준물질

예비환원제 및 환원제로 사용한 potassium iodide (KI), ascorbic acid (AA), sodium borohydride (NaBH_4) 및 sodium hydroxide (NaOH)는 Sigma-Aldrich사 (USA) 시약을 사용하였으며, L-cysteine ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$)은 Dae Jung chemical (Japan), 염산(HCl)은 동우화인켐 (Korea)로부터 구입하였다.

요중 비소를 분석하기 위한 검정곡선용 표준용액은 비소(III) 표준용액($1000 \mu\text{g/ml}$, Kanto chemical company, Japan)을 $1 \mu\text{g/ml}$ 으로 희석하여 초순수로 5~ $120 \mu\text{g/l}$ 의 농도로 분석시마다 단계별로 희석하여 제조하였다. 사용한 모든 시약은 초순수(탈이온수, $18.2\text{M}\Omega$ 이상)로 조제하였다.

SRM (standard reference material, 표준인증물질)은 ClinChek-Urine control for trace elements (Recipe chemicals, Order No.8847-8848, Germany) Level I과 Level II를 구입하여 사용하였다.

2) 분석기기 및 장치

분석기기는 자동시료 주입장치(autosampler, ASC-6100, Shimadzu, Japan)가 장착된 원자흡수분광광도계(AA-6800, Shimadzu, Japan)에 hydride vapor generation 장치(HVG-1, Shimadzu, Japan)를 부착하여 사용하였다.

기기의 분석조건은 Table 1과 같다. Atomic muffle

Table 1. Instrumental operating conditions for the determination of arsenic in urine by HG-AAS

Items	Conditions
Measurement signal mode	Peak height
Background correction mode	BGC - D_2
Wavelength	193.7 nm
Slit width	1.0 nm
Lamp current	12 mA
Carrier gas	Argon
Cell temperature	900°C

furnace를 이용하여 900°C에서 원자화시켰으며, 속빈음극램프는 비소 전용램프를 사용하였고, 운반기체는 부피백분율 99.999% 이상의 아르곤 가스를 사용하였다. 분석시 수소화물 발생장치에 사용하는 환원제는 NaBH_4 와 NaOH의 혼합액에 소포제(다우코닝® DB-110A)를 미량 넣어주어 수소화물 발생장치의 기-액 분리기에서 거품이 발생하지 않도록 하였다.

3) 생체 요 시료

충남지역의 일부 대학생의 요 시료를 사용하였다. 요 시료는 멸균처리된 50 ml 스페시멘 컵에 요 30 ml 이상을 개인이 직접 받아 오는 것으로 하였고, 분석직전까지 냉동보관하였다. 시료는 분석하기 전에 roll-mixer로 최대한 균질화시킨 후 분취하였다.

2. 시료 전처리 및 분석방법

HG-AAS를 이용한 요중 비소분석에서 요 시료의 전처리와 수소화물을 발생시키기 위하여 사용하는 산의 농도가 요중 비소 분석 결과에 많은 영향을 미친다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 그러나 현재 국내에서 요 중 비소분석에서 서로 다른 이동산을 사용하고 있고, 그에 따라 서로 상이한 결과가 도출되고 있는 것으로 판단되기 때문에 본 연구에서는 국내 요중 비소의 분석에 이용되고 있는 방법들, 국립환경과학원에서 발행한 생체시료 중 환경유해물질 분석 매뉴얼에 기재된 방법 및 전처리에서 저농도 산 및 L-cysteine을 사용한 방법을 이용하여 요 중 비소 (무기비소와 그 대사체)를 비교분석하였으며, 전처리 및 수소화물 발생시약의 농도 및 조성은 Table 2와 같다.

1) 시료 전처리 및 표준용액 조제

SRM 및 요 시료의 전처리는 1 ml의 시료에 5가지의 방법별로 전처리용 산 및 예비환원제(KI/AA)를 각각 1 ml씩 넣고 roll-mixer를 사용하여 60분간 반응시켰다.

Table 2. Various analytical methods for determination of arsenic in urine by HG-AAS

Method	Pre-treatment reagents		Hydride generation reagents	
	Acid	Pre-reductant	Carrier acid (HCl)	NaBH ₄ /NaOH
A	c-HCl	5%KI/5%AA	0.04M	0.5%/0.05%
B	c-HCl	5%KI/5%AA	0.97M	0.5%/0.05%
C	c-HCl	5%KI/5%AA	1.62M	0.5%/0.05%
D	c-HCl	5%KI/5%AA	3.24M	0.5%/0.05%
E	0.4M-HCl	5%KI/5%AA+0.4% L-cysteine	0.04M	0.6%/ 0.5%

c-HCl: Concentrated hydrochloric acid, AA: Ascorbic acid, KI: Potassium iodide

이 반응액에 초순수 7 ml를 가하여 최종 분석시료가 10 ml가 되도록 조제하였다. 검정곡선용 표준용액도 시료와 동일하게 처리하며, 바탕시료는 생체시료 대신 초순수를 사용하여 동일하게 처리하였다.

비소 분석을 위한 검정곡선용 표준용액은 비소(III) 표준용액(1000 µg/ml, Kanto chemical company, Japan)을 1 µg/ml로 희석하여 초순수로 5~120 µg/l의 농도로 분석시마다 단계별로 희석하여 제조하였다. 표준용액 4개 이상의 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였으며, calibration curve의 상관계수(r)가 0.999 이상일 때 요중 비소 분석을 실시하였다.

2) 요중 비소 분석

상기의 방법에 따라 전처리한 검액의 흡광도를 hydride vapor generation법(원자화 온도: 900°C)으로 측정하고, 미리 작성한 검량선으로부터 시료중의 비소 농도의 양을 구하여 농도를 산출하였다. 실험실 바탕시료에 대해 동일한 조작을 하여 측정된 흡광도로 보정하였다.

3) 분석방법에 따른 MMA와 DMA 회수율 검정

요중 비소 분석방법에 따른 MMA와 DMA의 회수율을 검정하기 위해 Supelco사(USA)로부터 dimethyl arsenic acid와 disodium methyl arsenate를 구입하여 사용하였다. 농도범위가 각각 10, 20, 40, 80 µg/l가 되

도록 초순수로 희석하여 조제하였다. 분석방법에 따른 MMA와 DMA의 회수율을 비교하기 위하여 사용한 전처리 및 분석방법은 Table 3과 같다. 시료 전처리 및 분석방법은 상기의 분석법 비교에서 사용된 절차와 동일하게 시행되었다.

한편 해산물 중의 유기비소가 인체에서 DMA로 대사되어 해산물 섭취가 상대적으로 많은 동아시아인의 요에 DMA가 고농도로 존재하며, 분석방법에 따라 가장 많이 영향을 받는 비소 화합물이기 때문에 초순수에 DMA를 첨가하여 가장 양호한 회수율을 보인 분석방법 V를 이용하여 요 시료에 DMA를 첨가한 후에 회수율을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분석방법에 따른 SRM 및 요 시료 분석결과 비교

HG-AAS에 의한 요중 비소 분석방법을 달리하여 SRM(standard reference material, 인증표준물질)을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 분석방법 A~D는 국내 요중 비소 분석기관에서 주로 사용하고 있는 방법으로서 전처리에는 대부분 농염산을 사용하고 이동산으로는 0.1, 1, 3, 5 또는 10% 염산을 사용하고 있다. 분석방법 E는 요중 비소 분석에 있어 산의 농도가 많은 영향을 미친다는 사실과 전환원제로 L-cysteine를 사용하면 비소 화합물의 수소화물 발생이 증가한다는 것을 고려

Table 3. Various analytical methods for recovery rates of MMA and DMA by HG-AAS

Method	Pretreatment reagents		Hydride generation reagents	
	Acid	Pre-reductant	Carrier acid	NaBH ₄ /NaOH
I	c-HCl	5% KI/5%AA	0.04M HCl	0.5%/0.05%
II	c-HCl	5% KI/5%AA	1.62M HCl	0.5%/0.05%
III	0.4M-HCl	5%KI/5%AA	0.04M HCl	0.5%/0.05%
IV	c-HCl	5%KI/5%AA	0.04M HCl	0.6%/0.5%
V	0.4M-HCl	5%KI/5%AA+0.4% L-cysteine	0.04M HCl	0.6%/0.5%

c-HCl: Concentrated hydrochloric acid, AA: Ascorbic acid, KI: Potassium iodide

Table 4. Comparison of arsenic concentration in standard reference materials by HG-AAS with various methods

Method	Standard reference materials ^{a)}	Target value ($\mu\text{g/l}$)	Acceptable range ($\mu\text{g/l}$)		Found values ($\mu\text{g/l}$)		
			Lower	Upper	No.	Mean \pm S.D.	Accuracy ^{b)} (%)
A	Level I	41	31	51	4	33.22 \pm 0.49	81.0
	Level II	82	66	98	4	57.24 \pm 0.97	69.8
B	Level I	41	31	51	6	32.17 \pm 1.79	78.5
	Level II	82	66	98	6	58.32 \pm 0.59	71.1
C	Level I	41	31	51	4	36.59 \pm 0.29	89.2
	Level II	82	66	98	4	61.44 \pm 0.03	74.9
D	Level I	41	31	51	4	33.46 \pm 3.86	81.6
	Level II	82	66	98	4	61.24 \pm 2.54	74.7
E	Level I	41	31	51	6	43.25 \pm 1.15	105.5
	Level II	82	66	98	6	78.82 \pm 0.15	96.1

^{a)}Clinchek Urine Control: RECIPE CHEMICALS(<http://www.recipe.de>)

^{b)}Accuracy (%) = (Found value/Target value) \times 100

하여 선택한 방법이다.^{13,14,17)}

분석방법 E를 사용하였을 때에 Level I과 Level II의 측정값이 각각 43.25 $\mu\text{g/l}$ 와 78.82 $\mu\text{g/l}$ 로 SRM target value인 41 $\mu\text{g/l}$ 와 82 $\mu\text{g/l}$ 에 가장 근접한 것으로 나타났다. 방법 E를 제외한 나머지 방법은 전처리시 사용되는 산과 예비환원제 및 수소화물 발생시약의 환원제 농도를 일치시키고 이동산의 농도에 변화를 주어 SRM 분석결과 Level I의 경우 정확도(accuracy)는 방법 A가 81.0%, 방법 B는 78.5%, 방법 C는 89.2%, 방법 D는 81.6%로 SRM target value보다 낮은 값을 보였으나 허용범위 내로 나타났다. 그러나 SRM Level II의 경우에는 방법 E를 제외한 나머지 분석방법들은 모두 정확도가 69.8~74.9%로서 25% 이상 낮게 분석되었고, 허용범위를 벗어난 것으로 조사되었다. 이상의 결과에서 분석방법 E(낮은 산 농도 및 L-cysteine 첨가)가 요중 비소 분석에서 정확도가 가장 양호한 것으로 나타났다.

각 분석방법별로 30개의 생체 요 시료(충남권에 소재하는 모대학의 학생들)를 분석한 결과는 Table 5와 같다. 방법 A~D는 요 시료의 전처리시 사용하는 산과 환원제를 동일하게 적용하고, 이동산의 농도만 0.04 M부터 3.24 M까지 증가시켰다. 요중 비소 분석결과 방법 A의 경우 GM (geometric mean)이 7.57 $\mu\text{g/l}$, 방법 B의 경우 5.39 $\mu\text{g/l}$, 방법 C의 경우 4.73 $\mu\text{g/l}$, 방법 D의 경우 2.83 $\mu\text{g/l}$ 로 산의 농도가 증가할수록 측정값이 낮아지는 경향이 있었다. 방법 E의 경우에 측정값이 30.67 $\mu\text{g/l}$ 로 다른 방법과 비교하여 매우 높은 것으로 조사되었다.

Table 5. Concentration of arsenic in 30 urine samples by HG-AAS with various methods (unit : $\mu\text{g/l}$)

Method	No.	Mean \pm S.D.	G.M	Min.	Max.
A	30	9.59 \pm 6.20	7.57	1.09	22.90
B	30	6.35 \pm 4.17	5.39	1.48	21.75
C	30	5.34 \pm 2.95	4.73	1.30	15.46
D	30	3.77 \pm 2.79	2.83	0.42	13.95
E	30	34.32 \pm 17.29	30.67	12.50	87.68

G.M : Geometric mean

우리나라에서는 최근 수년간 국가산업단지 및 폐광산 지역 주민을 대상으로 비소에 대한 노출평가를 한 결과 요중 비소 농도가 적게는 2.0 $\mu\text{g/gcreatinine}$ 에서 많게는 15.48 $\mu\text{g/gcreatinine}$ 으로 보고되고 있어 분석기관마다 많은 편차를 보이고 있으며, 대학생을 대상으로 한 본조사의 측정값과 상당한 차이를 보이고 있다. 이와 같이 요중 비소 측정값에 많은 편차를 보이는 것은 수소화물 발생법으로 비소 분석시에 전처리 및 이동산으로 사용되는 산 농도의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. HG-AAS를 사용한 요중 비소 분석시 요 시료의 전처리와 수소화물을 발생시키기 위하여 사용하는 산의 농도가 분석 결과에 많은 영향을 미친다는 것은 많은 논문에서 보고된 바가 있다.¹³⁻¹⁶⁾ Shraim 등¹⁴⁾은 HG-AAS에서 이동산으로 사용되는 염산의 농도가 0.1 M 이상에서는 DMA의 흡광도가, 1.0 M 이상에서는 MMA의 흡광도와 회수율이 급격히 감소한다고 보고하고 있어 국내에서는 요중 비소를 분석시에 전처리에는 대부분 농염산을 사용하고 있고, 수소화물발생에 사용

하는 산의 농도는 5%, 3%, 1%, 0.1% 등 다양하기 때문에 각 기관 마다 서로 다른 결과가 도출되는 것으로 생각되며, 또한 그 결과치가 낮은 것으로 판단된다.

Table 4와 5의 결과에서 SRM의 경우에는 분석방법 간 정확도가 +5.5%에서 -30.2%로 편차가 크지 않으나 실제 요에서는 같은 시료들의 평균값이 최소 3.8 µg/l부터 최대 34.3 µg/l까지 방법간의 편차가 매우 큰 것으로 나타났다. 이는 SRM과 생체 요 시료의 조성이 다름에 기인하는 것으로 여겨진다. 산농도에 의해 가장 영향을 받는 DMA가 서양인 요를 기초하여 조제된 SRM 보다 상대적으로 해산물 섭취가 많은 한국인의 요시료에 많이 함유되어 있음으로 인해 실제 요시료에서 방법간 큰 편차를 보인 것으로 판단되나 보다 정확한 원인은 비소 화합물을 분리·정량하여야 밝혀질 수 있다.

2. 분석방법에 따른 DMA 및 MMA 회수율 검정결과

생체내로 흡수된 비소는 대부분 요를 통하여 배설되고, 요중 비소의 대부분이 DMA로 약 60~80%를 차지하며, MMA가 약 10~15%, 무기비소가 약 10~15%인 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ 한편, 미국 ACGIH¹⁸⁾는 유럽 및 미국의 직업적인 비 노출군의 요중 비소 참고치는 약 10 µg/l이나, 일본인의 경우에는 약 50 µg/l라고 보고하면서 일본인의 요중 비소농도가 높은 것은 해산물의 섭취가 그 원인인 것으로 추정하였다. 다른 연구에서도 수산식품의 섭취는 요중 DMA 배출을 증가시키는 작용을 한다고 보고되었다.^{19,24)} Hata 등⁸⁾은 기타큐슈 지역 주민 210명을 대상으로 요중 비소를 분석한 결과 49.3 µg/l이며, 비소화합물(iAs 및 대사물) 중 DMA가 상당히 높은 것으로 보고하였다. 국내에서도 Park²⁵⁾은 다량의 수산식품 섭취가 요중 비소와 대사물에 미치는 영향에 대한 연구에서 비소 고함유 식이를 섭취하기 이전의 요중 비소량은 2.0±0.48µg/l이었는데 비소 고함유 수산식품 섭취 후 1일째에서 51.3±7.11 µg/l로 매우 높은 수준으로 증가하였다고 보고하였다. Park²⁵⁾은 한국인들의 비소 섭취에 기여하는 식품군의 사계절 평균을 비교한 결과 해조류가 전체 비소 섭취량의 74.44%로 가장 많이 기여하는 식품군으로 나타났다. 그 중 미역과 김을 통해 많은 양의 비소를 섭취하는 것으로 보고하였다.

우리나라 국민의 생선 및 젓갈, 미역, 김, 다시마 등 해조류를 즐겨먹는 식습관을 고려해 볼 때 요중 비소의 농도(특히 DMA)가 높을 것으로 예상되나 지금까지 국내에서 보고된 요중 비소농도는 대부분 10 µg/l 내외로 보고되었다. 따라서 지금까지 국내의 비소 분석기관

Table 6. Recovery rates of MMA and DMA by HG-AAS with various methods (unit : %)

	Level (µg/l)	Method				
		I	II	III	IV	E
MMA	10	116	46	109	105	109
	20	116	56	104	108	101
	40	123	66	113	110	96
	80	125	71	118	110	100
	Total	120	60	111	108	102
DMA	10	55	0	216	59	98
	20	55	0	207	61	100
	40	62	0	207	75	100
	80	65	5	193	72	100
	Total	59	1	206	67	100

MMA: Monomethylarsonic acid, DMA: Dimethylarsenic acid

에서 사용한 분석방법들과 분석방법 비교에서 적합한 것으로 판단되는 분석방법 E로 요중에 많이 함유되어 있으며 산의 농도에 영향을 많이 받는 DMA와 MMA의 회수율을 비교함으로써 분석의 정확성과 최적 분석방법을 규명하고자 하였다. MMA와 DMA의 회수율 비교를 위한 분석방법 선정에서는 이동산의 농도가 회수율에 큰 영향을 미친다는 것을 이미 잘 알려져 있기 때문에 전처리 산과 수소화제의 농도변화를 조합하였다.

HG-AAS에 의한 요중 비소 분석방법을 달리하여 MMA와 DMA의 회수율을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 분석방법 V에서 MMA와 DMA 회수율이 각각 평균 102%와 100%로 다른 분석방법에 비해 회수율이 가장 정확했다. 분석방법 I, III, IV 경우 MMA의 회수율은 120%, 111% 및 108%로 회수율이 비교적 양호하였으나 DMA의 경우에는 방법 I과 IV는 70% 미만의 회수율을 보였으며, 방법 III의 경우 평균 206%로 초과 회수되었다. 방법 I과 III의 경우 전처리 조건 및 수소화물 발생시약인 NaBH₄와 NaOH는 동일하고 이동산 농도만 다를 뿐인데도 MMA의 회수율은 각각 120%와 60%이며, DMA의 회수율은 59%와 1%로 나타나 이동산의 농도가 MMA 및 DMA 검출율에 크게 영향을 주는 것으로 나타났다. 방법 I과 III의 경우 다른 조건은 일치시키고 전처리 산의 농도만 변화를 주어 분석한 결과 DMA 회수율에 큰 차이가 있었다. 전처리 조건 및 이동산의 농도가 동일하고 NaBH₄와 NaOH 농도가 다른 방법 I과 IV의 경우에 MMA와 DMA의 회수율이 비슷한 수준으로 조사되어 NaBH₄와 NaOH의 농도에 따른 회수율의 변화는 미비한 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 요중 MMA와 DMA의 회수율은 전처리 산화 이동산의 농도에 큰 영향을 받으며, 본 연구에서 사용된 NaBH_4 와 NaOH 농도 변화에는 영향을 받지 않는 것으로 조사되었다. 또한 SRM 분석에서 정확도가 가장 양호한 것으로 조사된 분석방법 V에서 MMA 및 DMA의 회수율이 가장 좋은 것으로 나타나 요중 비소 분석에 최적의 방법으로 판단된다. 이는 HG-AAS를 이용한 요중 비소분석에서 As(III)와 As(V)의 arsine 증기화를 최적화시키기 위해서 L-cysteine 및 acid(HCl), NaBH_4 의 적절한 농도의 사용이 중요하며, 0.01M~0.05M 범위의 이동산 농도에서 MMA, DMA, As(III) 및 As(V)의 회수율이 90%이상을 유지하여 감도가 좋고, 특히 저농도의 산과 고농도의 환원제를 사용할 때 최대의 효과를 보인다고 보고한 다른 연구자들의 결과와도 일치한다.^{26,28)}

해산물 중의 유기비소가 DMA로 대사될 수 있기 때문에 해산물 섭취가 상대적으로 많은 동아시아인의 요에 DMA가 고농도로 존재하며, 전처리 및 이동산의 산 농도에 가장 영향을 많이 받는 비소 화합물인 DMA를 실제 요 시료에 첨가한 후 분석방법 V로 회수율을 측정한 결과는 Table 7과 같다. DMA를 5 $\mu\text{g/l}$ 에서 80 $\mu\text{g/l}$ 까지 첨가한 요 시료에서 회수율은 92.0에서 99.2로 비교적 양호한 것으로 나타났다.

비소는 유해물질의 인체 독성 정도와 인체 노출량 등을 고려하여 오염원별 유해 환경오염물질 관리 우선순위를 선정한 자료에서 1997년 이후로 수년째 관리대상 상위에 랭크되어 있어 있는 물질로서 미국 ACGIH는 비소를 사용하는 사업장 근로자의 생물학적 노출지표(BEI)로 35 $\mu\text{g/l}$ 를 권장하고 있다. 그러나 동아시아인을 대상으로 한 연구에서 요중 비소의 농도가 50 $\mu\text{g/l}$ 이내인 것으로 보고되고 있다. 대만에서 흑족병 이환율이 높은 주민을 대상으로 한 조사²⁹⁾에서 요중 비소 (iAs, MMA 및 DMA)는 남성은 88.1 $\mu\text{g/l}$, 여성은 65.3 $\mu\text{g/l}$ 로 나타났으며, 대학생을 대상으로 한 조사³⁰⁾에서 요중 비소는 남성은 57.0 $\mu\text{g/l}$ 여성은 62.9 $\mu\text{g/l}$ 로 조사되었다. 중국에서 석탄연소로 대기중 비소에 노출되는 주민

을 대상으로 한 조사³¹⁾에서 노출군의 요중 비소는 71.4 $\mu\text{g/g creatinine}$, 대조군은 41.6 $\mu\text{g/g creatinine}$ 로 조사되었으며, 다른 연구³²⁾에서 비소중독 환자의 경우에 요중 비소는 184 $\mu\text{g/g creatinine}$, 대조군은 87 $\mu\text{g/g creatinine}$ 으로 나타났다. 일본에서 대학생을 대상으로 한 조사³³⁾에서 요중 비소(iAs, MMA 및 DMA)는 50.7 $\mu\text{g/l}$ 이며, 기타큐슈 지역 주민 210명을 대상으로 한 조사³⁴⁾에서 요중 비소(iAs, MMA 및 DMA)가 49.3 $\mu\text{g/l}$ 인 것으로 보고되었다. 따라서 비소 함유량이 높은 식품 해산물의 섭취가 많으며, 식이습관이 인근 동아시아인과 비슷한 우리나라 국민들의 요중 비소의 농도가 미국 ACGIH의 참고치인 35 $\mu\text{g/l}$ 를 초과할 가능성이 있다.

그러나 지금까지 우리나라 국민들을 대상으로 한 조사에서 분석기관마다 측정치에 많은 편차를 보이고 있으며, 요중 비소 분석치가 대부분 유럽 및 미국의 직업적인 비 노출군의 참고치인 10 $\mu\text{g/l}$ 이내인 것으로 보고되었다. 이는 HG-AAS로 요중 비소를 분석함에 있어 전처리 및 이동산으로 사용하는 산의 농도가 높아 DMA 및 MMA의 회수율이 낮은 것에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 향후 우리나라 국민을 대상으로 한 비소 노출평가에서 HG-AAS로 요중 비소를 분석할 경우에 최적 분석방법의 선택이 절실하며, 또한 최근 무기비소보다 독성이 상대적으로 낮은 것으로 알려진 MMA와 DMA가 유전독성 및 변이원성이 있는 것으로 알려지고 있기 때문에 비소 화합물(As³⁺, As⁵⁺, MMA 및 DMA)의 분리정량 및 비교독성 연구도 필요한 것으로 판단된다.

IV. 결 론

HG-AAS (hydride generation-atomic absorption spectrometry)법에 의한 요중 비소 {iAs (inorganic arsenic), MMA (monomethylarsonic acid) 및 DMA (dimethylarsonic acid)} 분석의 최적 방법을 제시하고자 수행한 결과는 다음과 같다.

1. 국내에서 주로 이용되고 있는 여러 가지 방법으로 SRM (standard reference material)을 분석한 결과 전처리 시약(5% KI/5%AA)에 0.4% L-cysteine을 첨가하고, 수소화물 발생을 위해 0.6% NaBH_4 /0.5% NaOH 및 이동산 농도 0.04 M HCl를 사용한 방법에서 참고치에 가장 근접한 측정값이 얻어졌다.

2. 국내에서 주로 이용되고 있는 여러 가지 방법으로 대학생 요 시료 30개를 분석한 결과 이동산의 농도가 증가할수록 측정값이 낮아졌으며, L-cysteine과 이동산

Table 7. Recovery rates of DMA added to urine samples by method V

Concentration of the added DMA	N	Recovery rate (%)
5 $\mu\text{g/l}$	3	92.0 ± 10.6
20 $\mu\text{g/l}$	4	96.6 ± 6.8
40 $\mu\text{g/l}$	4	99.2 ± 4.3
80 $\mu\text{g/l}$	3	95.5 ± 0.7

0.04 M HCl이 조합된 방법 (방법 E)에서 다른 방법과 비교하여 현저히 높은 측정값이 얻어졌다.

3. MMA와 DMA의 회수율을 검정하기 위한 실험에서 전처리 산 및 이동산의 농도가 높을수록 회수율이 감소하였으며, L-cysteine과 이동산 0.04 M HCl이 조합된 방법 (방법 E)에서 MMA와 DMA의 회수율 각각 102% 및 100%로 가장 적합한 회수율을 나타내었다.

이상의 결과에서 HG-AAS를 이용한 요중 비소 (iAs, MMA 및 DMA) 분석에서 전환원제 및 수소화물 발생 시약의 조성과 농도가 측정값에 큰 영향을 미치는 것으로 조사되었으며, 전환원제에 L-cysteine을 첨가하고 이동산의 농도가 0.04 M인 분석법에서 DMA 및 MMA의 회수율이 양호하였으며 SRM 측정값이 가장 정확한 것으로 나타나 요중 비소 측정에 적합한 방법으로 권장할 만한 것으로 조사되었다.

참고문헌

- Murphy, E. A., Aucott, M. : An assessment of the amounts of arsenical pesticides used historically in a geographical area. *Science of the Total Environment*, **218**, 89-101, 1998.
- Jeong, K. C. : Occupational diseases. Seoul, Korea Medicine Press, 435, 1999.
- Jones, F. T. : A broad view of arsenic. *Poultry Science*, **86**, 2-14, 2007.
- Kee, H. S., Sohn, E. H., Park, Y. C., Yu, I. J., Maeng, S. H., Chung, H. W. : An anti-clastogenic role of selenium in arsenic- and chromium-induced oxidative stress causing chromosomal damages. *Korean Journal of Environmental Health*, **23**(4), 9-15, 1997
- Mandal, B. K., Suzuki, K. T. : Arsenic round the world: a review. *Talanta*, **58**, 201-235, 2002.
- McSheehy, S., Szpunar, J. : Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1**, 79-87, 2000.
- Brima, E. I., Jenkins, R. O., Haris, P. I. : Understanding arsenic metabolism through spectroscopic determination of arsenic in human urine. *Spectroscopy*, **20**, 125-151, 2006.
- Hata, A., Endo, Y., Nakajima, Y., Ikebe, M., Ogawa, M., Fujitani, N., Endo, G. : HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. *Journal of Occupational Health*, **49**, 217-223, 2007.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Available from : <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>. Accessed October 25, 2008.
- Lindberg, A. L., Goessler, W., Grandér, M., Nermell, B., Vahter, M. : Evaluation of the three most commonly used analytical methods for determination of inorganic arsenic and its metabolites in urine. *Toxicology Letters*, **168**(3), 310-318, 2006.
- The National Institute of Environmental Research : Evaluation of exposure levels to environmental pollutants and biomonitoring of biological samples in Sihwa·Banwol and Ulsan area. Annual Report, 2007, 2008.
- Ministry of Environment of the Republic of Korea : Survey on health status of residents in the closed mine in Choongnam and Choongpook area. Final report, Ministry of Environment, 2008.
- Le, X. C., Cullen, W. R., Reimer, K. J. : Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **285**, 277-285, 1994.
- Shraim, A., Chiswell, B., Olszowy, H. : Speciation of arsenic by hydride generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS) in hydrochloric acid medium. *Talanta*, **50**, 1109-1127, 1999.
- Carrero, P., Malave, A., Burguera, J. L., Burguera, M., Rondon, C. : Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry; Investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Analytica Chimica Acta*, **438**, 195-204, 2001.
- Song, M. J., Park, K. S., Kim, Y. M., Lee, W. : Effects and optimum conditions of pre-reductant in the analysis of inorganic arsenic by hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Analytical Science & Technology*, **18**(5), 396-402, 2005.
- Feng, Y. L., Chen, H. Y., Tian, L. C., Narasaki, H. : Off-line separation and determination of inorganic arsenic species in natural water by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry with hydride generation combined with reaction of arsenic(V) and L-cysteine. *Analytica Chimica Acta*, **375**, 167-175, 1998.
- ACGIH : TLVs and BEIs; Arsenic and soluble inorganic compounds. 2001.
- Arbouine, M. W., Wilson, H. K. : The effect of seafood consumption on the assessment of occupational exposure to arsenic by urinary arsenic speciation measurements. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, **6**, 153-160, 1992.
- Larsen, E. H., Pritzl, G., Hansen, S. H. : Speciation of eight arsenic compounds in human urine by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection using antimonate for internal chromatographic standardization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **8**, 557-563, 1993.
- Larsen, E. H., Pritzl, G., Hansen, S. H. : Arsenic speciation in seafood samples with emphasis on minor constituents; An investigation using high-performance liquid chromatography with detection by

- inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **8**, 1075-1084, 1993.
22. Buchet, J. P., Pauwels, J., Lauwerys, R. : Assessment of exposure to inorganic arsenic following ingestion of marine organisms by volunteers. *Environmental Research*, **66**, 44-51, 1994.
 23. Branch, N., Ebdon, L., O'Neill, P. : Determination of arsenic species in fish by directly coupled high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **9**, 33-37, 1994.
 24. Park, J. D. : Safety evaluation of arsenic. Final report, Korea Food & Drug Administration, GOVP1200508249, 2002.
 25. Park, S. O. : Evaluation of the uptake dose of pollutants from major foods in Korea and risk assessment. Annual report of Korea Food & Drug Administration, 2006.
 26. Guo, T., Baasner, J., Tsalev, D. L. : Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **349**, 313-318, 1997.
 27. Tsalev, D. L., Sperling, M., Welz, B. : Flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometric study of the automated on-line pre-reduction of arsenate, methylarsonate and dimethylarsinate and high-performance liquid chromatographic separation of their l-cysteine complexes. *Talanta*, **51**(6), 1059-1068, 2000.
 28. Lim, H. S., Lee, S. G. : Effects of acid and pre-reductant in the analysis of arsenic by hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Analytical Science & Technology*, **13**(2), 151-157, 2000.
 29. Tseng, C. H., Huang, Y. K., Huang, Y. L., Chung, C. J., Yang, M. H., Chen, C. J., Hsueh, Y. M. : Arsenic exposure, urinary arsenic speciation, and peripheral vascular disease in blackfoot disease-hyperendemic villages in Taiwan. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**, 299-308, 2005.
 30. Hsueh, Y. M., Hsu, M. K., Chiou, H. Y., Yang, M. H., Huang, C. C., Chen, C. J. : Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. *Toxicology Letters*, **133**, 83-91, 2002.
 31. Shraim, A., Cui, X., Li, S., Ng, J. C., Wang, J., Jin, Y., Liu, Y., Guo, L., Li, D., Wang, S., Zhang, R., Hirano, S. : Arsenic speciation in the urine and hair of individuals exposed to airborne arsenic through coal-burning in Guizhou, PR China. *Toxicology Letters*, **137**, 35-48, 2003.
 32. Xie, Y. X., Miyamoto, H., Kondo, M., Koga, H., Zhang, A., Ohmichi, M., Inaba, Y., Chiba, M. : Element concentrations in urine of patients suffering from chronic arsenic poisoning. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **193**, 229-235, 2001.
 33. Yamato, N. : Concentration and chemical species of arsenic in human urine and hair. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **40**, 633-640, 1998.