

TECHNICAL NOTE

환경 오염물질 분석용 생물 표준물질 균질성 시험평가 연구

이장호* · 정다위 · 최정희 · 이수용 · 이종천

국립환경과학원 자연환경연구과

Homogeneity Test on Bio-Matrix Reference Material for Chemical Analysis of Environmental Pollutants

Jangho Lee*, David Chung, Jeong-Heui Choi, Jongchun Lee, Soo Yong Lee

Natural Environment Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea

Abstract

The National Environmental Specimen Bank (NESB) has been sampling and cryogenically preserving various wildlife specimens to monitor bio-accumulations of chemical pollutants since 2010. Recently, the NESB set up a plan to develop reference materials at their facility to assure the analytical quality of and validate the analytical methods for their monitoring samples. One of the crucial characteristics of reference materials is intra- and inter-bottle homogeneity. In this study, we used ANOVA for total mercury concentrations in some samples to validate their homogeneities after milling and homogenization. We examined the intra- and inter-bottle homogeneities of two cryogenically-milled samples (Korean mussel (*Mytilus coruscus*) and black-tailed gull's egg (*Larus crassirostris*). The variations in the total mercury concentrations were not significantly different intra- and inter-bottle (mussel: $F=0.74, p=0.67$; gull egg: $F=1.96, p=0.10$). Additionally, the relative standard deviations of the total mercury concentrations showed low values (mussel: 2.02%, gull egg: 1.78%). Therefore, the cryogenic-milling process statistically proves the homogeneity of the materials of mussels and sea gull eggs for chemical analysis for total mercury.

Key words : Bio-matrix reference material, Homogeneity test, Mercury

1. 서론

표준물질(reference material)은 측정기기의 교정이나 측정방법의 평가 등에 사용하기 위하여 하나 이상의 특성값이 충분히 균일하고 적절하게 확정되어 있는 물질을 말한다(ISC, 2017). 단일성분 표준물질(순수표준물질; pure reference material)과 매트릭스 표준물질(matrix

reference material)로 나눌 수 있는데, 매트릭스 표준물질은 동식물, 토양 등과 같이 실제 시료의 특성을 갖는 표준물질을 말한다(KRISS, 2008; ISC, 2017). 매트릭스 표준물질은 측정결과의 정확성을 확인하는데 사용되며, 실제시료와 병행하여 동일한 방법 및 절차에 따라 측정함으로써 측정절차(방법) 및 과정의 유효성을 확인하는 도구로 이용된다(KRISS, 2008).

Received 14 September, 2018; Revised 29 October, 2018;

Accepted 6 December, 2018

*Corresponding author: Jangho Lee, Natural Environment Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea

Phone : +82-32-560-7590

E-mail : ficedula01@korea.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

환경부 국립환경과학원 국가환경시료은행은 환경 중 오염물질의 생물축적 영향을 모니터링하는 기관으로서 다양한 생태계에 서식하는 생물(괭이갈매기 알, 잉어, 홍합 등)을 채취하고 분석하고 있다. 시료은행도 오염물질 분석을 진행할 때, 표준물질을 사용하는데 예를 들면, 미국 국립표준기술연구소에서 생산하는 이매패류(bivalve mussel) 표준물질을 구매하여 홍합 시료 분석의 정확성을 확인하고 있다.

국내에서는 매질 표준물질의 대부분을 한국표준과학연구원에서 생산·판매하고 있다(KRISS, 2018). 이 중 동식물 매질 표준물질은 한국표준과학연구원의 인증물질 분류범위 상 「식품 및 농업 관련물질」에 국한하여 생산하고 있다. 굴 분말, 참치 분말 등과 같이 환경 중 서식하는 생물로 제작된 매질 표준물질 중 중금속, 농약류 등 환경오염물질(항생제는 제외) 분석에 이용 가능한 제품 수는 약 9종류밖에 없다. 분석항목도 중금속과 농약류 등 약 17개 항목 밖에 없는 실정이다. 이에 비해 국외에서 생산·판매되는 동식물 매질 표준물질 수는 약 52종류이며, 100 여개의 분석항목을 포함하는 것으로 파악되고 있다(Lee et al., 2017). 이러한 차이로 환경측정용 생물 표준물질의 많은 부분을 국외 제품에 의존하고 있는 실정이다.

시료은행도 분석 시에 국외 매질 표준물질 구매 의존도가 높은 편인데, 구매단가가 비싼 것도 문제지만, 국외 표준물질이라 하더라도 시료은행에서 다루는 다양한 시료종(수목, 어류, 조류 알, 이매패류 등)과 유사한 표준물질을 구하기 어렵고, 더구나 원하는 분석항목을 포함하는 표준물질을 구해야 하는 애로사항이 있어 왔다.

이에 시료은행에서는 모니터링 대상 시료종을 매질 표준물질로 자체 제작하는 방안을 수립하여 추진하게 되었다. 시료은행이 운영하고 있는 분쇄·균질화 설비와 절차는 일반적인 표준물질 제작 설비 및 공정과 유사하기 때문에 표준물질을 제작하기에 최적의 조건을 갖췄다고 할 수 있다. 또한 시료은행은 분쇄, 균질화한 시료를 초저온(-150℃ 이하)으로 저장하기 때문에 이화학적 성분변화 없이 장기적으로 안정적인 보관이 가능한 장점도 있다.

우선 본 논문에서는 괭이갈매기 알과 홍합 시료를 대상으로 총수소에 대한 후보 표준물질로서의 균질성 시험평가를 수행한 결과를 제시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험평가 재료

시료은행에서 다루는 9종의 환경 시료 중 본 연구에서는 홍합(Korean mussel, *Mytilus coruscus*)과 괭이갈매기(Black-tailed gull, *Larus crassirostris*) 알을 시험평가 대상으로 하였다. 홍합은 식약처의 식품규격 중금속 기준에서 총수는 농도가 규제항목으로 포함되어 있는 시료로서 수산물 수는 분석 시에 많이 사용될 수 있는 시료이다(MFDS, 2018). 괭이갈매기 알은 식품규격 등에 규제되는 시료는 아니지만, 세계적으로 연안환경 내 수은 및 잔류성 유기오염물질 모니터링의 중요한 시료로서 활용되고 있다.

홍합은 2017년 4월 29일에 남해안 추자도에서 채취하였고, 괭이갈매기 알은 2017년 4월 25일에 남해안 통영 홍도에서 채취하였다. 채취한 홍합(50개체)은 표면을 1차 증류수로 씻은 후, 세라믹 칼을 이용하여 주의해서 껍데기를 열어 연체를 분리하였다. 이후 체에 밭쳐 30분 정도 내장수를 제거하고 스테인레스 용기에 담아 액체질소 냉동고에 초저온(-150℃ 이하)으로 보관하였다. 괭이갈매기 알(40개)도 1차 증류수로 표면을 씻은 후 스테인레스 메스를 사용하여 껍데기를 연 후, 알 내용물만 스테인레스 용기에 담아 초저온 보관하였다. 시료은행에서는 기본적으로 채취시료에 대한 분쇄 및 균질화 작업을 액체질소를 이용한 초저온 상태에서 실시하고 있다. 이에 본 연구의 후보 표준물질 균질성 시험평가용 시료의 제작도 같은 절차를 이용하여 분쇄·균질화하였다. 우선 막자사발을 이용하여 수작업으로 덩어리를 잘게 부순 후 초저온 액체질소로 얼린 사발에 넣고, 볼 밀(Planetary Mill, Fritsch, DE/pulverisette 23 Mini Mill, Germany)을 이용하여 회당 350 rpm으로 2분씩 총 3~4회 정도 분쇄 및 균질화하였다(Fig. 1). 분쇄된 분말의 입도는 레이저 회절 입도분석기(Particle Size Analyzer, Malvern Instruments, Masterizer 2000, Germany)를 사용하여 습식분산 방식으로 분석하였다. 습식분산 방식은 입도분 석용 수용액에 시료(본 연구에서는 약 0.5 g ~ 1 g 투입)를 넣고, 분산시켜 측정하는 방식으로 초저온으로 분쇄된 얼어 있는 생시료(wet sample)에 적합하다. 분쇄 입도 달성기준은 독일환경시료은행 기준인 200 μm 이하(입도분석 투입 시료의 90% 이상)로 하였다(Rüdel et al.,

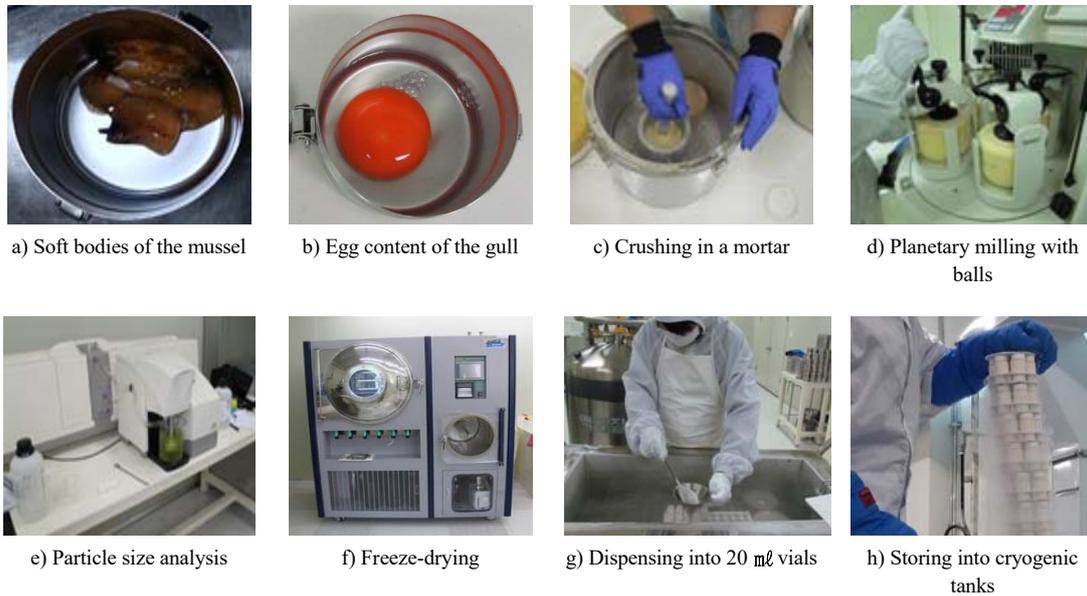


Fig. 1. Milling, homogenization and preservation processes.

2008). 분쇄를 거친 시료는 동결건조기(동결건조기, 일신랩, PVTFD20R, 대한민국)로 건조한 후, 시험평가용으로 병입(瓶入, bottling)하여 제조하였다. 제조 바이얼 수는 표준물질 제조와 관련한 균질성 시험평가 규정인 「표준물질의 인증-일반적 및 통계적 원칙」에서 제시한 기준을 따라 홍합, 팽이갈매기 알 각각 20 mL 바이얼 병에 약 1 g씩 분취하여 10개씩 제작하였다(ISC, 2005).

2.2. 총수은 분석

본 연구에서는 균질성 시험평가 분석항목으로 총수은을 선택하였다. 이는 총수은이 홍합 등의 주요 어패류 식품규격의 규제항목으로 포함되어 있기 때문이다. 총수은 분석은 골드아말감법을 이용한 자동 수은분석기(Mercury Analyzer, Nippon Instruments, MA 3000, Japan)를 사용하였다. 건조된 홍합 시료 약 0.05 g을 수은분석기 분석용 보트에 담아 기기에 주입하였고, 시료

의 연소를 위하여 고순도 산소를 사용하였으며, 그 외 분석조건은 Table 1과 같다. 기기 검출한계는 0.29 ng/g이었고, 정량한계는 0.93 ng/g이었다. 인증표준물질(Standard Reference Material 2976)을 사용하여 확인한 회수율은 95.3~104.4% 범위(n=9)에서 평균 100.1%였다.

2.3. 균질성 시험평가

균질성은 병내 균질도와 병간 균질도를 동시에 평가하는데, 각 병에서 3번씩 분취하여 병내 균질도를 평가하고, 10개 병 간의 균질도도 평가하였다. 균질성의 판단은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)의 통계적인 차이 유무로 판단하였다(ISC, 2005). 또한 병간 농도값의 변동정도를 판단하기 위해 변동계수(coefficient of variation)인 상대표준편차(표준편차/평균 × 100, %)를 구하여 검토하였다.

Table 1. The operating conditions of mercury analyzer (MA 3000)

Conditions	Heating temperature (°C)	Heating time (s)	Flow (L/min)	Slope time (s)
1st Decomposition	180	120	0.4	120
2nd Decomposition	850	120	0.4	30

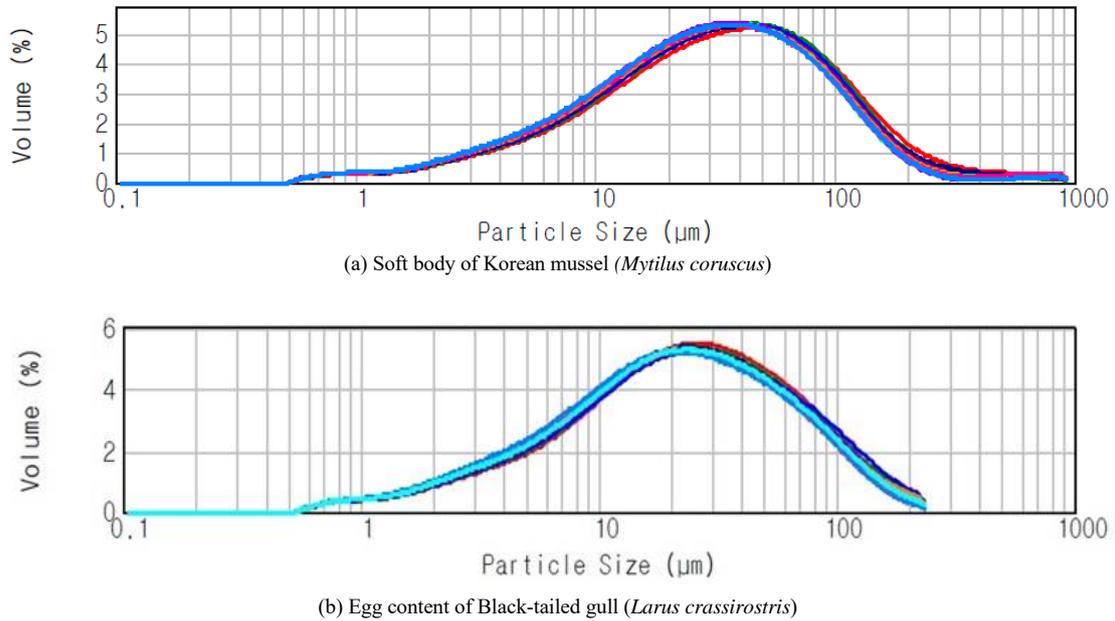


Fig. 2. The particle size distributions of cryo-milled samples.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분쇄 입도

시료의 균질성 정도를 나타내는 첫 번째 특성은 시료가 얼마나 곱게 분쇄되었느냐는 점이다. 본 연구의 분쇄 분말입도는 홍합(*Mytilus coruscus*)의 경우, 입도분석에 투입된 시료의 93.4%가 분쇄입도 달성기준(입도분석 투입 시료의 90% 이상이 200 μm 이하)을 만족하였다(Fig. 2(a)). 갯지렁이(*Larus crassirostris*) 알도 99.8%를 나타내 분쇄입도 기준을 만족하였다(Fig. 2(b)). 한국표준과학연구원에서는 건조 인삼분말 시료를 체거름하여 입도크기 50~250 μm 사이의 시료만 취하여 균질한 입도로 제작한 바 있다(KRISS, 2010). 이와 같이 건조된 덩어리 시료를 분쇄하는 경우, 분말을 체거름하는 공정

이 가능하지만, 시료은행처럼 생시료(wet sample)를 초저온에서 분쇄하여 제작된 저온 분말은 체에 달라붙기 때문에 체거름 공정을 적용하기는 어렵다. 다만, 균질성의 최종적인 평가는 측정대상 화학물질 농도의 병간, 병내 균질성 시험결과로 판단되기 때문에 본 연구에서 적용한 분쇄·균질화 방법이 후보 표준시료의 균질성을 달성했는지의 여부는 아래의 균질성 시험평가 결과로 판단하였다.

3.2. 병간, 병내 균질성

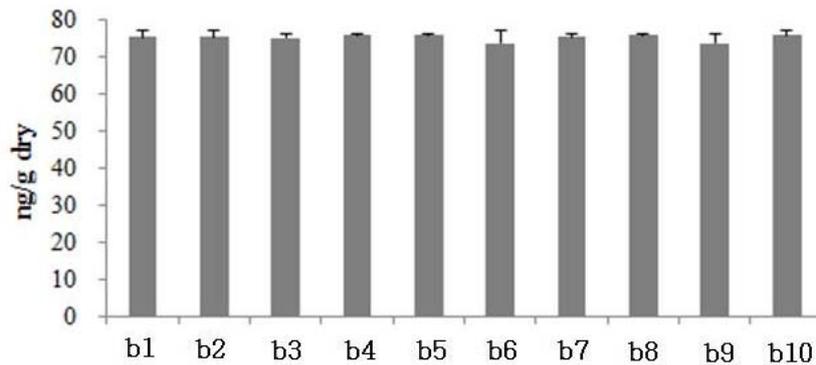
총수는 분석결과를 ISO Guide 35 (ISC, 2005)를 참조하여 일원배치 분산분석으로 균질성을 평가한 결과, 홍합 시료는 신뢰수준 95% 기준으로 F비(병간 분산과 병내 분산의 비율)가 0.74로 F기각치(2.39) 보다 작았고,

Table 2. The one-way analysis of variance (ANOVA) for within- and among-bottles homogeneities of Korean mussel's soft body

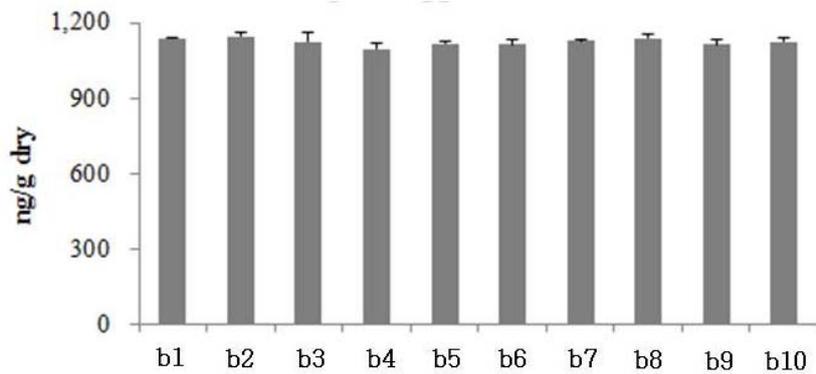
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F ratio	p value	Critical F value
Among-bottles	16.7	9	1.9	0.74	0.67	2.39
Within-bottles	50	20	2.5			
Total	66.7	29				

Table 3. The one-way analysis of variance (ANOVA) for within- and among-bottles homogeneities of Black-tailed gull's eggs

Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F ratio	p value	Critical F value
Among-bottles	5,433	9	604	1.96	0.10	2.39
Within-bottles	6,161	20	308			
Total	11,594	29				



(a) Soft body of Korean mussel (*Mytilus coruscus*)



(b) Egg content of Black-tailed gull (*Larus crassirostris*)

Fig. 3. Mean and standard deviation of total mercury concentrations among bottles.

유의수준 p 값은 0.67로 병간, 병내의 농도차이가 통계적으로 없는 것으로 나타나 초저온 분쇄공정에 의한 균질화가 달성된 것으로 판단되었다(Table 3). 팽이갈매기 알 시료 또한 신뢰수준 95% 기준으로 F 비가 1.96으로 F 기각치(2.39) 보다 작았고, 유의수준 p 값은 0.1로 병간, 병내의 농도차이가 통계적으로 없는 것으로 나타나 균질성이 있는 것으로 판단되었다(Table 4). 다음으로 수은의 평균 농도에 대한 표준편차의 변동비를 나타낸 상대

표준편차를 살펴보았다. 홍합은 2.02%, 팽이갈매기 알은 1.78%로 나타났다(Fig. 3(a), (b)). 일반적으로 5% 미만의 상대표준편차는 정밀도가 양호하다고 알려져 있다(Jin et al., 2017). 한국표준과학연구원 인삼분말의 납과 카드뮴 측정용 표준시료 제작 시 병간 상대표준편차를 각각 0.31%와 0.22%로 제시한 바 있으며(KRIS, 2010), Kim et al.(2010)은 PCBs 분석용 폐절연유 표준물질 제작에서 상대표준편차 2.71~5.01% 범위를 제시한

바 있다. 가물치 살의 PCB 분석용 표준물질 제작 연구에서는 PCB 세부 분석항목에 따라 2.9~26.6%의 상대표준편차를 나타냈다고 보고한 바도 있다(Interface Engineering Co. Ltd, 2007). 이처럼 매질의 종류와 분석항목 그리고 분석기관의 측정능력 등에 따라 제작시료의 상대표준편차가 다양하게 나타날 수 있다. 하지만 후보표준시료의 균질성 시험평가에서 상대표준편차를 일정수준 이하로 유지하는 것이 필요한 이유는 분산분석에서 병간, 병내의 차이가 통계적으로 유의하지 않아 제작시료의 균질성이 양호하다고 판단되더라도 그러한 통계적 결과는 병간, 병내의 농도변동이 너무 큰 경우에도 나타날 수 있기 때문이다. 따라서 상대표준편차를 함께 검토하여 각 제작 시료 간에 농도변동의 차이가 적은 상태에서 균질성이 보장되는 지를 평가하는 것이 필요하다.

본 연구에서는 초저온으로 분쇄·균질화하여 동결 건조하는 방법으로 제작된 후보 표준물질이 균질성을 가지는 지를 평가하는데 초점을 맞추어 수행하였으며, 그 결과 초저온 분쇄·동결건조 제조방법이 혼합과 팽이갈매기 알로 제작한 수은분석용 후보 표준물질의 균질성을 보장할 수 있는 방식임을 확인하였다.

3.3. 향후 평가절차

균질성 시험평가 이후에는 후보 표준물질이 시간에 따른 안정성이 어떤지를 시험하는 평가과정을 거치게 된다(ISC, 2005). 크게 단기안정성과 장기안정성으로 구분되는데, 단기안정성은 운송 시 보관되는 조건에 따른 안정성을 시험하는 것이고, 장기안정성은 장기간 보관할 때의 안정성 즉, 유효기간과 연관되어 있는 시험평가이다. 단기안정성은 1~2개월 동안 진행되며, 장기안정성은 길면 1년 이상 진행될 수 있다. 향후에는 보관조건에 따른 안정성 시험을 추가로 진행하여 표준물질로서의 필수요건을 갖출 수 있도록 하는 것이 필요하다.

4. 결론

본 연구에서는 국내 개발이 부족한 환경오염물질 분석용 생물 매질 표준물질 개발과 관련한 기초시험단계로서 시료의 균질성을 시험평가하였다. 혼합 연체와 팽이갈매기 알을 대상으로 초저온 분쇄·균질화하였고, 동결 건조로 제작하였다. 수은 농도에 대한 병간, 병내 차이를 평가하였으며, 통계적으로 균질성이 보장됨을 확인하였

다. 향후에는 시료의 보관과 관련한 안정성 시험평가를 단기와 장기로 나눠 진행할 계획이다. 이를 통해 균질성과 안정성이 보장된 생물 표준물질을 개발하여 환경분야 모니터링 분석기관 등에 보급, 활용될 수 있도록 추진할 계획이다.

감사의 글

본 논문은 환경부의 재원으로 국립환경과학원의 지원을 받아 수행하였습니다(NIER 2017-01-01-055).

REFERENCES

- Interface Engineering Co. Ltd, 2007, Development of certified reference for the environmental analysis, Korea Environmental Industry & Technology Institute, Seoul.
- ISC (Industrial Standard Council), 2005, Certification of reference materials - general and statistical principles, KS A ISO Guide 35:2005, Korean Agency for Technology and Standards, Chungcheongbuk-do.
- ISC (Industrial Standard Council), 2017, Reference materials - selected terms and definitions, KS A ISO Guide 30:2015, Korean Agency for Technology and Standards, Chungcheongbuk-do.
- Jin, M. E., Sun, G. M., Park, S. G., Jwa, Y. J., 2017, A Preliminary study of Korean Geostandards using mesozoic granites, J. Korean Earth Sci. Soc., 38(6), 421-426.
- Kim, W. I., Kwon, M. H., Jeon, T. W., Kim, D. H., Chun, J. W., Sim, K. T., Yeon, J. M., 2010, Estimation on the application of reference materials for PCBs proficiency testing from the transformer oil, Anal. Sci. Technol., 23(3), 247-254.
- KRISS (Korea Research Institute of Standards and Science), 2008, Establishment of preparation methods of reference materials for environmental analysis - Reference materials of heavy metals for soil analysis, NIER (National Institute of Environmental Research) -Report, Daejeon.
- KRISS (Korea Research Institute of Standards and Science), 2010, Preparation of standard samples and assignment of reference values for the proficiency testing of pharmaceutical analysis, MFDS (Ministry of

- Food Drug Safety)-Report, Daejeon.
- KRISS (Korea Research Institute of Standards and Science), 2018, (2018, Aug 30) <http://eshop.kriss.re.kr/crmSvc.do>
- Lee, J. H., Lee, J. C., Choi, J. H., Shin, S. K., Lee, S. Y., Shim, K. Y., Jang, H. Y., Kim, Y. M., Ju, K. K., Sa, K. H., 2017, Development of reference material for establishing homogeneity and stability of cryogenic environmental samples (I), NIER-RP2017-140,
- National Institute of Environmental Research, Incheon.
- MFDS (Ministry of Food Drug Safety), 2018, (2018, Aug 30) https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=12
- Rüdel, H., Uhlig, S., Weingärtner, M., 2008, Pulverisation and homogenisation of environmental samples by cryomilling, December 2008, V 2.0.0, Fraunhofer Institute, Schmallenberg, Germany.