



수산물 중 총수은 모니터링 및 메틸수은 분석법 고찰

곽신혜* · 김기철 · 김경아 · 강석호 · 권혜정 · 조운식 · 강경자 · 이필석 · 조옥현 · 모아라 · 박용배 · 윤미혜
경기도보건환경연구원 안산농수산물검사소

A Study on the Total Mercury (Hg) Monitoring and Methylmercury (MeHg) Analysis method and Exposure Assessment of Methylmercury (MeHg) in Marine Products

Shin-Hye Kwak*, Ki-Cheol Kim, Kyung-A Kim, Suk-Ho Kang, Hye-Jung Kwon, Yun-Sik Cho, Kyung-Ja Kang, Pil-Suk Lee, Wook-Hyun Cho, Ara Moh, Yong-Bae Park, and Mi-Hye Yoon

GyeongGi-Do Institute of Public Health and Environment Ansan Agro-fishery Products Inspection Center, Ansan, Korea
(Received March 22, 2018/Revised April 14, 2018/Accepted June 1, 2018)

ABSTRACT - The use of microwave-assisted extraction and an acid-base clean-up process to determine the amount of methylmercury (MeHg) in marine products was suggested in order to improve the complicated sample preparation process. The optimal conditions for microwave-assisted extraction was developed by using a 10% NaCl solution as an extraction solution, setting the extraction temperature at 50°C, and holding for 15 minutes to extract the MeHg in marine products. A NaOH solution was selected as a clean-up substitute instead of L-cysteine solution. Overall, 670 samples of marine products were analyzed for total mercury (Hg). Detection levels were in the range of 0.0006~0.3801 µg/kg. MeHg was analyzed and compared using the current food code and the proposed method for 49 samples which contained above 0.1 mg/kg of Hg. Detection ranges of methylmercury followed by the Korea Food Code and the proposed method were 75.25 (ND~516.93) µg/kg and 142.07 (100.14~244.55) µg/kg, respectively. The total analytical time of proposed method was reduced by more than 25% compared with the current food code method.

Key words : Methylmercury (MeHg), Mercury (Hg), Microwave-assisted extraction, PTWI, Marine products

우리나라 국민의 평균 혈중 수은농도는 미국, 캐나다에 비하여 4~5배 높은 수치이며, 우리나라와 식습관이 비슷한 일본, 홍콩에 비해서는 낮은 농도로 조사되었다¹⁾. 그러나 우리나라 국민들의 수산물 섭취량은 2012년 이후부터 지속적으로 증가하고 있으며, 2017년 6월 자료에 의하면 한국인의 1인당 연간 수산물 섭취량(58.4 kg)은 세계 1위로 일본(50.2 kg)보다 더 많은 것으로 조사되었다²⁾.

수은은 화학적 형태에 따라 크게 원소성 수은(HgCl₂, HgS, Hg²⁺ 등)과 무기성 수은(RHgX)으로 분류되며, 해양환경 중 존재하는 대부분의 수은 화합물은 원소성 수은으로 존재한다. 이 원소성 수은은 혐기성 미생물과 어류 내 생체 반응에 의해 유기수은의 일종인 메틸수은(Methylmercury, MeHg)으로 전환되는 것으로 알려져 있다³⁾.

메틸수은은 어류 섭취를 통해 쉽게 몸에 섭취되며 주로 심해성 어류와 다랑어 및 새치류에 많이 포함되어 있다. 메틸수은은 무기성수은에 비해 세포막을 쉽게 통과하는 특성으로 독성이 더욱 강하며, 중추신경계에 영향을 주어 암을 유발할 수 있는 발암물질이다⁴⁾. 이에 식품의약품안전처는 2006년 12월부터 식품의 기준 및 규격에 메틸수은 분석법을 신설하여 관리하고 있다⁵⁾. 특히, 임산부, 가임여성, 수유부, 유아 등 민감계층에게 더 큰 영향을 미치기 때문에 FAO/WHO의 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, Codex), 일본, 미국, 유럽연합 그리고 우리나라에서 메틸수은 함량이 높은 어류에 대해 섭취를 제한한다는 권고안을 발표하여 관리하고 있다⁶⁾.

국내 식품공전 상에 메틸수은의 분석법은 염산과 톨루엔으로 추출하여 L-cystein 용액으로 정제한 후, ULBON HR-Thermon-Hg 칼럼을 이용하여 GC-ECD (Gas Chromatography Electron Capture Detector)로 분석하게 되어 있다⁷⁾.

그러나 식품공전에서 제시하는 메틸수은 분석법은 전처리에 많은 시간이 소요되고 매 실험마다 L-cystein 용액을

*Correspondence to: Shin-Hye Kwak, Ansan Agro-fishery Products Inspection Center, GyeongGi-Do Institute of Health and Environment, Ansan 15507, Korea
Tel: 82-31-290-6675, Fax: 82-31-438-5871
E-mail: shinhye9108@gg.go.kr

제조해야 하는 등 번거로운 단점이 있다.

본 연구에서는 경기도내 유통되는 수산물 42개 품목 670건에 대한 총 수은 분석결과로부터 노출량 평가와 주간 추정섭취량을 산출하였으며, 잠정 주간섭취한계량(Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI)과 비교하여 위해정도를 평가하였다. 또한, 수산물 중에 잔류하는 메틸수은을 신속하게 분석하기 위하여 시료 전처리과정 중 추출 및 정제단계를 개선하고자 하였으며, 총수은 분석 결과 값이 0.1 mg/kg 이상인 시료를 대상으로 기존 식품공전방법과 본 연구에서 개발된 방법에 의한 메틸수은 결과 값을 비교하였다.

Materials and Methods

실험재료

시료는 식품공전 제8. 검체의 채취 및 취급방법에 따라 수거하였으며 2017년 1월부터 10월까지 경기도내에서 유통, 판매되고 있는 참치 등 42개 품목 총 670건을 대상으로 분석하였다.

시약 및 표준용액

메틸수은은 염화메틸수은(methylmercury (II) chloride, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) 0.1164 g을 톨루엔(toluene, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) 100 mL에 용해하여 단계 희석하여 검량선용 표준용액으로 사용하였다. 산분해용 시약으로 염산(hydrochloric acid, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)과 질산(super-pure grade, Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, L-cystein 용액은 L-cystein (L-cystein hydrochloride monohydrate) 1.0 g, 아세트산 나트륨(sodium acetate trihydrate) 0.8 g, 무수황산나트륨(sodium sulfate, anhydrous) 12.5 g을 물 100 mL에 교반하며 녹여 제조하며, 사용 시 마다 제조하여 사용하였다. 염산용액은 염산 3, 증류수 1의 비율로 제조하여 만들었으며, 실험에 사용한 모든 시약과 용매는 분석용 HPLC급 및 GC분석용으로 사용하였다. 증류수는 저항값($18.2 \text{ M}\Omega \pm 0.2$)을 확인하여 내부점검기준에 의해 이상이 없음을 확인한 후 사용했다.

총수은 분석 및 기기조건

균질화한 시료 약 0.1 g을 칭량하여 총수은 분석기 전용 니켈 boat에 담아 수은 분석기(MA-3000, Nippon Instruments Corporation, Tokyo, Japan)로 측정하였으며 기기조건은 Table 1과 같다. 수은 표준용액을 제조하여 외부검량선과 LOD, LOQ를 확인하였다.

수산물 섭취를 통한 총수은 안전성 평가

수산물 중 수은 함량에 대한 안전성 평가를 위한 노출량 산출을 위하여 2013년 국민건강영양조사⁸⁾ 원시자료

Table 1. Operating conditions of Hg analyzer for total mercury

Parameters	Conditions
Instrument	MA-3000
Drying	150°C, 60 s
	180°C, 120 s
Decomposition Amalgamation heating	80°C, 120 s

통계패키지로 분석하여 국민평균체중을 산출하였으며, 수산물의 일일평균섭취량은 2017년도 식품안전관리지침을 따랐다⁹⁾. 본 연구 결과와 위에서 산출된 분석대상 어류의 주간추정섭취량으로부터 FAO/WHO의 합동 식품 첨가물 전문가위원회(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 에서 설정한 PTWI 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bw}/\text{week}$ 에 대한 주간추정섭취량의 %비율(% of PTWI)을 산출하여 위해 정도를 평가하였다.

메틸수은 분석법 고찰

식품공전법에 의한 시료전처리

메틸수은 분석을 위한 시료 전처리는 균질화한 시료 2 g을 100 mL 원심분리관에 넣고 25% 염화나트륨용액 10 mL를 첨가하여 진탕한 후 진한 염산 4 mL, 톨루엔 15 mL 첨가하여 2분간 강하게 흔들어서 추출하였다. 3,000 rpm에서 20분간 원심분리기(1236 MGR, GYROZEN Co., Daejeon, Korea)로 원심 분리한 후 톨루엔층을 125 mL 분액깔대기에 옮겼다(단, 거품이 발생할 경우에는 1 mL의 이소프로판올을 첨가하여 진탕한 후 다시 원심분리 하였다). 여기에 25% 염화나트륨 10 mL을 첨가하여 수세한 후 L-cystein 용액 5 mL를 첨가하여 진탕기(MMV-1000W, EYELA, Tokyo, Japan)로 10분간 강하게 진탕하였다. 10분간 방치한 후 L-cystein 층을 15 mL 원심분리관에 분취하고 여기에 염산용액 4 mL, 톨루엔 5 mL를 첨가하여 1분간 강하게 흔들어서 추출하였다. 추출액을 원심분리(2,500 rpm, 5min)하고 톨루엔층을 분취하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 시험용액으로 하였다.

Microwave-assisted 시료전처리

Microwave를 이용한 수산물 중 메틸수은에 대한 시료 전처리는 크게 추출과정과 정제과정으로 나뉜다. 먼저 추출효율을 증가시키기 위하여 중금속 분해장치인 Microwave (START-D, Milestone Co., Sorisole, Italy)를 이용한 저온 추출방법을 도입하였다. Microwave를 이용한 추출조건을 최적화하기 위하여 추출시간, 추출온도, 추출용매 등의 인자에 대하여 실험을 수행하였다. 추출온도는 40, 45, 50, 55, 60°C로 추출하였으며, 추출용매는 10% NaCl용액, 5 N HCl용액, 11 N HCl용액 및 0.1 N NaOH용액을 선택하였다. 추출시간은 10, 13, 15, 20분으로 저온 추출하여

Table 2. Operating conditions of GC/ECD for MeHg

Parameters	Conditions
Analytical Column	ULBON HR-Thermon-Hg (0.53 mm × 15 m)
Detector	Electron Capture Detector (GC-ECD)
Inlet temp.	160°C
Oven temp.	150°C
Detector temp.	170°C
Carrier gas	N ₂ (6 mL/min)
Injection volume	1 µL (splitless)

최적의 분석조건을 구하고자 하였다. 시료전처리 시간단축 및 추출 후 정제과정의 연속성을 위하여 Microwave 추출 시 사용한 용기는 50 mL conical tube를 사용하였으며, 모든 추출과정에서 추출액은 10 mL로 하였다.

메틸수는 추출액에 대한 정제과정은 기존 시험법의 L-cystein 용액 대신 NaOH용액을 사용하였으며, 0.05~5 N NaOH용액으로 정제하여 최적의 농도를 구하고자 하였다.

메틸수는 분석장비는 GC-ECD (Agilent 7890-B, Agilent Co., Foster City, CA, USA)로 분석하였으며, 기기분석 조건은 Table 2와 같다.

GC 컬럼 비교분석

메틸수는 분석 전용 컬럼인 ULBON HR-Thermon-Hg (15 m × 0.53 mm I. d., Shimazu Co. Kyoto, Japan)를 대체할 수 있는 컬럼을 검토하기 위하여 DB-5 (30 m × 0.25 mm I.D., J & W Scientific, Folsom, CA, USA), DB-1701 (30 m × 0.25 mm I.D., J & W Scientific, Folsom, CA, USA), DB-35 (30 m × 0.25 mm I.D., J & W Scientific, Folsom, CA, USA) 등 극성이 다른 컬럼으로 분석하여 크로마토그램을 비교, 검토하였다.

메틸수는 분석법 비교

국내 수산물 42개 품목 670건에 대한 총수는 분석결과 총수는 검출량이 0.1 mg/kg 이상인 시료를 대상으로 식품공전법과 제안된 분석법을 적용하여 메틸수는 분석 후 그 결과 값을 비교하였다.

Results and Discussion

수산물 중 총수는 모니터링 및 안전성 평가

수산물 중 총수는 함량

도내 유통수산물 670건에 대한 총수는 분석결과는 Table 3과 같다. 수산물 중 총수는의 검출범위는 0.0006~0.3801 mg/kg이며 평균은 0.0369 mg/kg인 것으로 조사되었다. 총수는 함량이 많은 것으로 알려진 심해성 어류(고래, 상어, 냉동참치 등)의 경우 총수는 검출범위는 0.1083~0.3801 mg/

Table 3. Levels of Total Hg in marine products

Species	No. of sample	Total Hg (mg/kg) (range)
Fish	Marine Fish	447 (0.0020-0.2910)
	Deep Sea Fish	6 (0.1083-0.3801)
Mollusc	Shell Fish	124 (0.0012-0.3201)
	Cephalopod	90 (0.0024-0.1149)
Invertebrate	Tunicata	3 (0.0006-0.0037)
	Total	670 (0.0006-0.3801)

kg, 평균 0.2385 mg/kg으로 다른 수산물들에 비해 총수는 검출량이 가장 많은 것으로 조사되었으며, 이는 국내외 연구보고 자료와 유사한 것으로 나타났다¹⁰⁻¹¹⁾. 일반 해양어류 중에서는 우럭의 총 수는 검출량(평균 0.09602 mg/kg)이 다른 해양어류들에 비해 상대적으로 높은 수치로 조사되었다. 연체류의 경우는 어패류(평균 0.0158 mg/kg)에 비해 오징어, 낙지 등 두족류(평균 0.0268 mg/kg)에서 총수는 검출량이 높았으며, 이는 내장부위에 기인한 것으로 판단된다. 모든 시료에서 식품공전의 총 수는 기준(0.5 mg/kg 이하)을 초과한 시료는 없는 것으로 조사되었다.

수산물 섭취를 통한 총수는 안전성 평가 결과

유통 수산물 중 총수는 검출량에 대한 잠재적인 안전성 평가를 위해 수는 주간추정섭취량을 JECFA에서 설정한 무기수는 PTWI와 비교하였다. 안전성 평가를 위한 수산물의 총수는 함량에 대한 주간추정섭취량(Estimated weekly intake)은 국민건강영양조사에 근거한 2014년 국민영양통계 자료를 통해 산출하였다⁸⁾. Table 4에서 보여주듯이 수산물 중 총수에 대한 주간추정섭취량은 0.0742 µg/kg/bw/week로 주간잠정섭취한계량(PTWI, 4 µg/kg body weight) 대비 1.9% 미만으로 평가되었다.

참치 등 심해성 어류의 주간섭취량은 6.65 g/man/week으로 다른 수산물에 비해 상대적으로 섭취량은 적었으나, 총 수은의 주간잠정섭취한계량은 0.0280 µg/kg/bw/week로 심해성어류, 다량어류 및 새치류의 섭취로 인한 수은의 인체 위해성에 가장 많은 영향을 미치는 것으로 평가되었다.

전처리 방법 개선에 따른 메틸수는 분석법 고찰

Microwave-assisted 시료전처리 최적화

Microwave 추출용액

수산물 시료에 대하여 마이크로웨이브 저온추출 시 추

Table 4. The estimated intake of Total Hg compared with standards by JECFA

Species		Weekly food intake (g/man/week)	Estimated Weekly intake ¹⁾ of Total Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bw}^2/\text{week}$)	% of PTWI ³⁾ in Total Hg
Fish	Marine Fish	28.98	0.0234	0.5862
	Deep Sea Fish	6.65	0.0280	0.6989
Mollusc	Shell Fish	8.96	0.0025	0.0624
	Cephalopod	42.28	0.0200	0.4993
Invertebrate	Tunicata	0.49	0.0003	0.0081
Total		87.36	0.0742	1.8549

¹⁾[Mean content in each food × weekly food intake]/56.73 (bw)

²⁾bw : body weight (56.73 kg)

³⁾PTWI : Provisional Tolerable Weekly Intake set by JECFA (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/week)

추출액 종류에 따른 회수율을 알아보기 위하여 10% NaCl, 5 N HCl 용액, 11 N HCl 용액 및 0.1 N NaOH 용액을 추출액으로 선정하여 메틸수은의 회수율을 비교하였다.

HCl 용액을 이용하여 추출할 경우 MeHg^+ 이온이 수용액에 용해되기 어려운 염화메틸수은(CH_3HgCl) 형태로 추출용기 내벽에 흡착되거나 휘발되어 HCl용액의 농도에 관계없이 회수율이 가장 낮은 것으로 조사되었다. 0.1 N NaOH 용액을 추출액으로 사용 시 회수율은 82.7%로 비교적 높았으나, 추출 후 유화현상이 발생하여 정제과정 중 층 분리가 안 되는 현상이 발생하였다. 반면에 10% NaCl 용액을 추출용액으로 microwave 추출 시 유화현상이 없을 뿐 만 아니라, 회수율도 89.8%로 가장 높아 microwave 추출 시 10% NaCl용액을 추출용액으로 선택하였다(Table 5).

Microwave 추출시간

추출시간별 회수율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10~20분 동안 microwave 추출 후 회수율을 비교하였다.

Table 5. Effect of extraction parameters on MeHg recovery (%)

Parameters		Recovery (%) ± S.D. n = 3
Extraction Solvent	10% NaCl	89.79 ± 6.95
	5 N HCl	43.90 ± 6.63
	11 N HCl	47.87 ± 5.51
	0.1 N NaOH	82.73 ± 2.06
Extraction time (min)	10	112.96 ± 8.54
	13	100.87 ± 8.75
	15	109.80 ± 6.18
	20	115.30 ± 8.92
Extraction temperature (°C)	40	91.57 ± 6.18
	45	92.97 ± 9.95
	50	103.65 ± 6.32
	55	91.65 ± 5.27
	60	62.55 ± 5.03

Table 5에서 보여주듯이 10분 이상 추출 시 회수율은 100% 이상으로 나타났으며, 15분 이상에서는 추출 후 정제 시 유기용매와 층분리가 어려워 매 실험마다 centrifuge (4000 rpm)를 사용해야 하는 번거로움이 있어 최적 추출시간을 15분으로 설정하였다.

Microwave 추출온도

추출시간을 15분으로 설정한 후 추출온도에 따른 회수율을 알아보기 위해 40~60°C에서 추출시킨 후 회수율을 비교하였다.

추출온도가 증가함에 따라 회수율이 증가하였으나 50°C 이상의 온도에서는 회수율이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 일정온도 이상이 되면 메틸수은의 메틸기가 분해되어 회수율이 떨어진다는 연구보고와 유사한 것으로 나타났다¹²⁾. 따라서 microwave 추출온도는 50°C로 최적화하였다.

L-cystein 대체 물질

현행 식품공전에서 추출액에 대한 정제과정에 사용되는 L-cystein ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$)은 황을 함유한 아미노산의 일종이다. 수은은 황(sulfur)에 대한 강한 친화력을 가지고 있어 L-cystein과 수은은 선택적 결합을 하게 되고, 유기층의 메틸수은을 수층으로 도입하여 수층에서 메틸수은의 안전성을 높여주는 역할을 한다¹³⁾. 그러나 L-cystein은 상당히 고가이며, 시액을 장기보관 시 분해되어 실험할 때 마다 제조해야만 한다는 단점이 있다. 이를 개선하기 위하여, L-cystein 대체 물질로 상온에서 장기적으로 사용 가능하고, 상시 제조 가능한 NaOH 용액을 검토대상으로 하였다.

Microwave 추출과정을 거친 10% NaCl 추출액에 대하여 11 N HCl 용액으로 산성화시킨 후, toluene 10 mL를 가하고 5분간 진탕시키면 메틸수은(MeHg)은 염화메틸수은(MeHgCl) 형태로 toluene 층에 잔류하게 된다. 이 유기층에 NaOH 용액 10 mL를 가하고 5분간 진탕시키면 염화

Table 6. Effect of NaOH concentration on MeHg recovery (%)

Parameters	Concentration (N)	Recovery ± S.D. (%), n = 3
Concentration of clean-up solution (NaOH)	0.05	14.49 ± 4.46
	0.25	39.36 ± 5.62
	1.0	47.74 ± 5.86
	2.0	90.90 ± 3.51
	5.0	92.21 ± 5.22

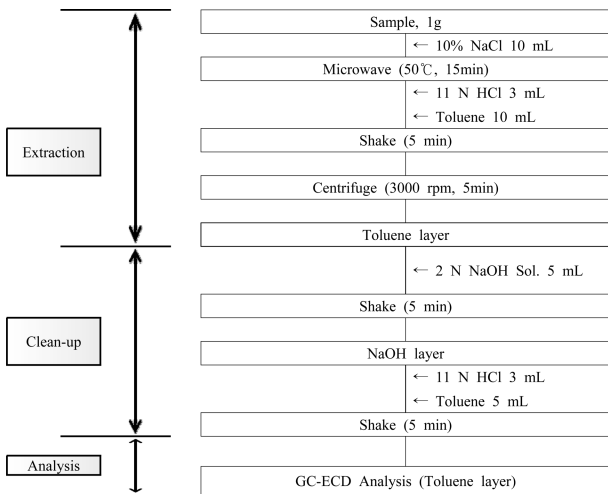


Fig. 1. Flowchart of extraction and clean-up procedure of samples.

메틸수은은 메틸수은이온(MeHg^+) 형태로 수층으로 이동한다. 최종적으로 이 수층에 11 N HCl 3 mL를 가하여 산성화 시키고 toluene 5 mL를 정확히 가하고 진탕시킨 후 상층액(toluene)을 GC분석 하였다. 상기의 방법은 산-염기의 조건하에서 메틸수은이 유기층과 수층으로 분배되는 성질을 정제과정에 이용한 것이다. 0.05~5.0 N NaOH 용액으로 정제한 결과, NaOH용액 농도가 높아질수록 회수율이 높아지는 경향을 나타냈다. 그러나 2.0 N NaOH 이상의 농도에서는 재현성이 떨어지고 거품 발생량이 크게

증가하여 2.0 N NaOH 용액을 정제용액으로 선택하였으며, NaOH 용액의 농도별 회수율 측정값은 Table 6와 같다.

GC 컬럼 고찰

메틸수은 분석 시 GC 전용 컬럼으로 사용되는 ULBON 컬럼은 오븐온도 170°C 이상에서 컬럼 내부 충전물질이 분해 또는 휘발되기 때문에 오븐 온도를 160°C 이하로 운용해야 하는 제약이 따른다. 이로 인하여 시료 주입액 중 불순물이 컬럼 내부에 흡착하여 컬럼 내부가 오염될 수 있으며, 장기간 사용 시 memory effect에 의한 ghost peak가 발생할 수 있다. 이러한 문제점에 대한 대안으로 280°C 이상의 오븐온도에서도 운용이 가능한 컬럼 3종(DB-5, DB-1701, DB-35)으로 메틸수은 분석가능여부를 검토하였다 (Fig. 2). 그러나 비극성인 DB-5 컬럼의 경우 메틸수은의 분리가 명확하지 않았고, DB-1701 컬럼은 tailing 현상이 발생하여 메틸수은 정량분석용으로는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 중간 극성의 DB-35 컬럼은 DB-5, DB-1701 컬럼에 비해 메틸수은의 피크 분리가 명확하고 ULBON 컬럼에 비해 감도가 좋은 것으로 나타났지만, 반복 시험 시 피크면적의 편차가 큰 것으로 나타나 정량분석에 적용하기는 어려운 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구에서는 식품공전에 수록된 메틸수은 전용 컬럼인 ULBON 컬럼을 사용하여 실험을 진행하였다.

유효성 검토

검량선의 직선성

총수은과 메틸수은의 표준용액을 제조하여 5회 반복 측정하였다. 저농도와 고농도 두 범위로 나누어 검량선을 작성하였으며 상관계수(R^2)를 구하여 Table 7에 나타내었다. 메틸수은 16.5-98.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 상관계수 0.9991, 98.7-263.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 상관계수는 0.9995이었다. 총수은의 경우 1-10 ng 상관계수 0.9993, 10-40 ng 범위에서는 상관계수 0.9998로 1과 거의 유사한 값이 나와 우수한 직선성이 나타났다.

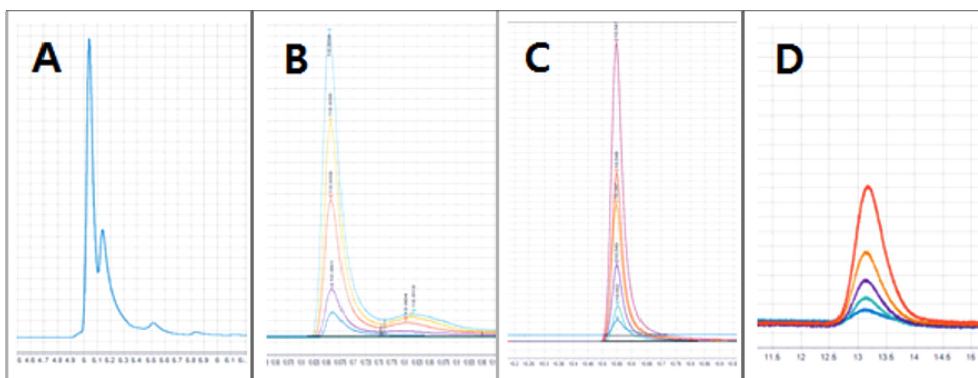


Fig. 2. GC-ECD chromatograms of MeHg standard (range 15.7~251 $\mu\text{g}/\text{kg}$). (A : DB-5, B : DB-1701, C: DB-35, D: Ulbon HR-Thermon-Hg).

Table 7. LOD and LOQ of MeHg and Total Hg

Compound	Calibration Range	Linearity (R ²)	LOD ¹⁾	LOQ ²⁾
MeHg	16.5-98.7 µg/kg	0.9991	5.6104 µg/kg	17.0013 µg/kg
	98.7-263.0 µg/kg	0.9995		
Total Hg	1-10 ng	0.9993	0.0005 µg	0.0016 µg
	10-40 ng	0.9998		

¹⁾Limit of detection = 3.3δ/S

²⁾Limit of quantification = 10δ/S

δ = the standard deviation of the response, S = the slope of the calibration curve

Table 8. Comparison of Food code and suggested method on MeHg

Species	No. of sample	Food code method	Development Method	Food code method /Total Hg (%)	Development Method/Total Hg (%)	
		Mean ± S.D. (min-max) (µg/kg)	Mean ± S.D. (min-max) (µg/kg)			
Marine Fish	Rockfish	11	76.44 ± 5.76 (ND-84.27)	133.70 ± 9.00 (124.94-190.73)	43.11	101.83
	Halibut	7	52.69 ± 2.00 (ND-72.27)	128.11 ± 10.05 (104.75-132.12)	44.15	77.67
Deep Sea Fish	Tuna	6	148.72 ± 5.97 (50.03-516.93)	164.56 ± 8.30 (120.79-244.55)	66.38	86.39
Marine Fish	Cod	3	55.02 ± 3.08 (58.49-84.56)	131.94 ± .58 (124.28-177.47)	37.45	66.22
	Croaker	3	49.90 ± 1.24 (46.58-58.77)	130.35 ± 10.25 (120.30-147.55)	44.51	89.17
etc.*		19	64.55 ± 2.45 (46.58-84.56)	132.75 ± 8.39 (100.14-157.93)	42.43	77.32
total		49	75.25 ± 3.30 (ND-516.93)	142.07 ± 9.63 (100.14-244.55)	45.84	84.21

*ect.: Hairtail (2), Mackerel (2), Flatfish (2), Bass (2), Snapper (2), Clam (2), Gizzard (1), Blackthroat seaperch (1), Horse mackerel (1), Red seabream (1), Scorpion fish (1), Blackmouth angler (1), Squid (1)

검출한계 및 정량한계

검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 직선성 시험에서 구한 1차 회귀방정식으로 검량선의 기울기(S)를 구하고 반응의 표준편차(σ)를 이용하여 아래와 같이 ICH Quality Guidelines¹⁴⁾에 따라 구하였다

$$LOD = 3.3 \times (\sigma/S)$$

$$LOQ = 10 \times (\sigma/S)$$

σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

결과 값은 Table 7에 제시하였으며, 정량한계는 메틸수은 5.6104 µg/kg, 총수은 0.0005 µg이었고, 정량한계는 메틸수은 17.0013 µg/kg, 총수은 0.0016 µg이었다.

정밀도 및 정확성

AOAC (Association of official analytical chemists) guide-

line에 따르면 회수율은 0.1~10 mg/kg 농도범위에서 80~110%, 상대표준편차는 0.1ppm에서 15% 이하로 규정하고 있다¹⁵⁾.

회수율을 측정하기 위해 메틸수은이 검출되지 않은 시료에 표준용액 0.1 mg/kg 수준으로 첨가한 후 시료 분석 방법과 동일하게 3회 처리하여 측정하였다. 회수율은 89.79~109.80%로 AOAC guideline에 적합하였다. Microwave-assisted 시료 전처리 최적화 조건인 추출용매 10% NaCl, 추출시간 15분, 추출온도 50°C에서 3반복 한 결과 상대표준편차 6.32%로 정밀도가 AOAC guideline 기준에 적합한 것으로 나타났다.

수산물 중 메틸수은 함량

수산물 670건 중 총수은 검출량이 0.1 mg/kg 이상인 시료는 3품목 총 49건으로 우럭 11건, 가자미 7건, 참치 6건 순으로 나타났다.

총수은이 0.1 mg/kg 이상 검출된 49건에 대해 기존의 메

틸수는 전처리방법과 제안된 전처리방법을 적용하여 실험한 결과는 Table 8과 같다. 기존방법에서는 11건이 검출한계 이하로 분석되었으나, 제안된 시험법 적용 시에는 모든 시료에서 메틸수은이 검출되었다. 또한, 메틸수은 평균함량은 기존시험법의 경우 75.25 µg/kg(검출범위 ND~516.93 µg/kg)인 반면, 제안된 시험법은 142.07 µg/kg(검출범위 100.14~244.55 µg/kg)으로 메틸수은 검출효율이 더 좋은 것으로 나타났다. 이는 microwave를 이용하여 추출 시, 기존 액-액 추출, 단순 진탕 추출에 비해 추출효율이 증가한다는 연구결과와 같은 이유로 생각된다¹⁶⁾. 또한, 총 수은 대비 메틸수은 함량을 비교한 결과 평균 84.2%로 국내의 연구보고에 의한 결과와 유사한 값을 나타냈다¹⁷⁻¹⁸⁾.

그러나 수산물 중 메틸수은 분석 시 기존 실험법에 비해 본 연구에서 제안한 시험법 적용 시 표준편차가 더 큰 것으로 나타나 재현성은 다소 미흡한 것으로 조사되었다.

국문요약

본 연구에서는 경기도내 유통되는 수산물 42품목 670건에 대한 총수은 노출량평가를 수행하고, 총수은이 0.1 mg/kg 이상 검출된 시료를 대상으로 기존의 식품공전법과 개발시험방법을 적용하여 비교하였다. 유통 수산물에 대한 총수은 모니터링 결과 총수은에 대한 주간추정섭취량(Estimated weekly intake)은 0.0742 µg/kg bw/week인 것으로 조사되었으며, 이는 JECFA에서 제시한 PTWI 4 µg/kg bw/week 대비 1.9% 미만으로 수산물 섭취로 인한 수은 위해성은 안전한 수준으로 평가되었다.

전처리 방법 개선에 따른 메틸수은 분석법 개발을 위해 추출, 정제 부분을 기존 식품공전법과 다르게 진행하였다. Microwave 추출조건은 용액, 시간, 온도 3가지 조건을 고려하였다. Microwave 추출용액은 10% NaCl, 5 N HCl 용액, 11 N HCl 및 0.1 N NaOH를 선정하여 비교한 결과 회수율이 89.8%로 가장 높고 유화현상도 발생하지 않은 10% NaCl 용액으로 선정하였다. Microwave 추출시간은 10~20분 동안 추출시간을 달리하여 회수율을 비교하였으며, 10분 이상 추출 시 회수율은 100% 이상을 나타냈으나 15분 이상 추출 시에는 유기용매와의 층분리가 어려워 추출시간을 15분으로 선정하였다. Microwave 추출온도에 따른 회수율을 알아보기 위해 40~60°C에서 추출 후 회수율을 비교하였다. 추출온도가 증가함에 따라 회수율이 증가하였으나 50°C 이상의 온도에서는 회수율이 감소하여 50°C로 최적화 하였다. 식품공전에서 정제과정에 사용되는 L-cystein은 매 실험마다 제조해야하는 번거로움이 있어 이를 대체하기 위해 0.05~5 N NaOH를 이용하였다. NaOH용액의 농도가 높아질수록 회수율이 증가하는 경향을 보였지만 2 N NaOH 이상의 농도에서는 재현성이 떨어지고 거품발생량이 증가하여 2 N NaOH용액을 정제용

액으로 선정하였다. 이 실험들을 바탕으로 수산물 중 메틸수은 시료 전처리 방법을 제안하였다. 제안된 시료전처리 방법은 기존 시험방법에 비해 검출효율이 높고 전처리 시간을 절약할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 수산물 전반에 대한 모니터링 수행 시 스크리닝 분석법으로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 우리나라의 수산물 섭취량이 세계에서 가장 많은 것으로 알려진 만큼 비의도적 유해물질인 메틸수은에 대한 종합적이고 체계적인 관리가 이루어져야 될 것으로 판단된다.

References

1. National Institute of Environmental Research. Survey on the status of harmful substances in human body 2nd. Available from: http://www.nier.go.kr/NIER/cop/bbs/selectNoLoginBoard-Article.do?menuNo=16003&bbsId=BBSMSTR_000000000-022&nttId=13571&Command=READ. Accessed Mar. 02, (2018).
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016 The State of World Fisheries and Aquaculture. Available from: <https://www.openchannels.org/literature/14012>. Accessed Mar. 02, (2018).
3. Ministry of Food and Drug Safety. Methylmercury. (2010).
4. Kim J.A., Yuk D.H., Park Y.A., Choi H.J., Kim Y.C., Kim M.S.: A study on total mercury and methylmercury in commercial tuna, billfish, and deep-sea fish in Seoul metropolitan city. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**, 376-381 (2013).
5. Ministry of Food and Drug Safety: Korean Food Code Index 2006-55. Korea, 29 (2015).
6. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Fish and Fishery Products Hazard and Controls Guidance. (2011).
7. Ministry of Food and Drug Safety: Korean Food Code Index 2017-57. Korea (2017).
8. Korea Centers for Disease Control and Prevention: The sixth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). (2013).
9. Ministry of Food and Drug Safety. Available from: <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=695&pageNo=1&seq=25549&cmd=v>. Accessed May. 28, (2018).
10. Kim S.C., Jang J.W., Lee S.H., Jung Y.J., Kim J.Y., Ahn J.H., Park E.H., Ko Y.S., Kim D.S., Kim S.Y., Jang Y.M., Kang C.S.: Monitoring methylmercury in abyssal fish. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**, 383-389 (2010).
11. Kim J.A., Yuk D.H., Park Y.A., Choi H.J., Kim Y.C., Kim M.S.: A study on total mercury and methylmercury in commercial tuna, billfish, and deep-sea fish in Seoul metropolitan city. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **45**, 376-381 (2013).
12. Hinijosa Reyes, L., Mizanur Rahman, G.M., Skip Kingston, H.M.: Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Anal Chim Acta.*, **631**, 121-128 (2009).
13. Mishra, S., Tripathi R.M., Bhalke, S., Shukla, V.K., Puranik, V.D.: Determination of methylmercury and mercury (II) in a

- marine ecosystem using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta.*, **551**, 192-198 (2005).
14. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Accessed May. 15, (2018).
 15. Association of official analytical chemists (AOAC). 2016 The State of World Fisheries and Aquaculture. Available from: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. Accessed May. 15, (2018).
 16. Vazquez M.J., Carro A. M., Lorenzo R.A., Cela R.: Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Anal. Chem.*, **69**, 221-225 (1997).
 17. Carbonell, G., Bravo, J.C., Fernandez, C., Tarazona, J.V.: A new method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish. *Bull Environ Contam Toxicol.*, **83**, 210-213 (2009).
 18. Yoo K.Y., Bahn K.N., Kim E.J., Kim Y.S., Myung J.E., Yoon H.S., Kim M.H.: Establishment of analytical method for methylmercury in fish by using HPLC-ICP/MS. *Korean J. Environ Agric.*, **30**, 288-294 (2011).