

TECHNICAL NOTE

카드뮴 분석용 홍합(*Mytilus coruscus*) 표준물질의 균질성 및 안정성 시험평가

이하은 · 이장호* · 정다위 · 이수용 · 박기완 · 심규영

국립환경과학원 자연환경연구과

Evaluation of Homogeneity and Stability of Korean Mussel (*Mytilus coruscus*) Standards for Cadmium Analysis

Ha-Eun Lee, Jangho Lee*, David Chung, Soo Yong Lee, Ki-Wan Park, Kyu-Young Shim

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

Abstract

In this study, the KS A ISO Guide 35 was applied to develop analytical standards for heavy metal cadmium using the Korean mussel (*Mytilus coruscus*) and to evaluate the homogeneity and stability of the sample. Some of the crucial characteristics that reference materials must consist include homogeneity and stability of both intra- and inter-bottles. We tested homogeneity using ANOVA analysis and short-term stability using regression analysis. The variations of cadmium concentrations did not significantly differ between intra- and inter-bottles ($F=0.41$, $p=0.90$). For short-term stability verification, cadmium analysis results were not statistically significant as a result of the regression analysis (significance $F=0.51$, $p=0.53$). This suggests that we can not dismiss the null hypothesis that there is no significant variation in concentrations of cadmium over time. These results indicated that the cryogenic-milling process has statistically proven the short-term stability for materials from mussels in the chemical analysis of cadmium. Therefore, we propose that the Korean mussel's reference material developed for the proficiency test could be used as a tool to evaluate reliability and consistency in laboratories.

Key words : Korean mussel, Homogeneity test, Short-term stability test

1. 서론

카드뮴 같은 유해 중금속은 미량이라도 지속적으로 흡수하게 되면 인체에 축적되어 신경마비 등의 치명적인 영향을 야기할 수 있다(Godt et al., 2006). 담수나 해양 등의 수생태계에는 각종 공장폐수나 광업폐수 등 다양한

오염원으로부터 중금속이 유입되고 있으며, 수생태계로 유입된 중금속은 물리, 화학적인 변화 과정을 거쳐 퇴적물에 축적되거나 수중으로 재용해되어 해양 생물에 축적된다. 그리고 해양생물에서는 먹이연쇄와 생물농축을 통해 먹이 사슬의 최상위단계인 인간에게 농축되어 독성을 일으킬 수 있다(Bosch et al., 2016).

Received 23 August, 2019; Revised 20 September, 2019;

Accepted 15 October, 2019

*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 인간 활동에 의한 환경오염이 해양생태계에 미치는 영향을 모니터링하기 위해 생물시료에 대한 채취, 저장 및 분석을 수행하고 있다. 대상 중 중 하나인 홍합은 이매패류로서 해양 환경 중 유해 중금속을 모니터링하는데 널리 이용되고 있으며, 다양한 물질을 축적하기 때문에 연안 해수의 미량 독성오염물질을 감시하기에 적합한 생물학적 지표로서 사용되고 있다(Goldberg, 1986).

홍합과 같은 생물체 내의 유해 중금속 분석 시, 분석의 신뢰성을 확인하기 위해서는 물질별 농도값이 제시되어 있는 표준물질(Reference material)을 사용하게 된다. 분석에 사용되는 생물 매질 표준물질의 개발은 국외에서 활발하게 이루어지고 있으며, 개발된 표준물질은 실험실 간의 비교가 가능한 숙련도 시험용으로 활용되거나, 실험 절차상의 문제점을 확인하여 분석결과의 신뢰성을 평가하는데 효과적으로 사용되고 있다. 이에 비해 국내에서는 분석의 신뢰성 확인과 숙련도 평가용으로 활용 가능한 동식물 매질 표준물질의 개발이 저조한 실정이다(Kim et al., 2018). 한국표준과학원에서 일부 「식품 및 농업 관련물질」 분야에 국한하여 생산하고 있지만, 시료 은행에서 다루는 다양한 시료종과 유사한 표준물질을 구하기 어려운 실정이다(Lee et al., 2018).

이에 본 연구에서는 시료은행에서 분석 및 모니터링 하는 홍합 시료를 대상으로 자체 정도관리용 표준물질을 개발하여 활용하고자 시험평가를 진행하였다. 유해중금속인 카드뮴을 대상으로 하였으며, 제작 표준물질의 병간, 병내 균질성과 안정성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 채취 및 조제

표준물질 제조에 사용한 홍합은 완도 등 5개 지점을 선정하여 산란하기 전 3~4월에 채취하였으며, 서남해안의 경우 수심 10 m 내외, 동해안에서는 수심 15~20 m 깊이에서 채취하였다. 홍합의 서식 환경에 따라 어선을 이용하여 암벽에 접안해 갈과 호미 등으로 채취하거나 스쿠버 다이빙으로 잠수하여 채취하였으며, 채취한 시료는 냉장상태(5°C 이하)를 유지하여 실험실로 이송하였다. 홍합은 표면을 1차 클류수로 씻은 후, 세라믹 칼을 이용하여 주의해서 껍데기를 열어 연체를 분리하였다. 이

후 체에 밍쳐 30~60분 동안 내장수를 제거하고, 스테인레스 용기에 담아 초저온(-150°C 이하) 냉동고에 보관하였다.

시료의 분쇄는 독일환경시료은행의 표준운영절차(Rüdel et al., 2008)와 이를 바탕으로 작성된 국가환경시료은행의 표준운영절차(Lee et al., 2012)를 기준으로 진행되었다. 분쇄의 전 과정은 청정실(ISO Class 7, 먼지입자 352,000개/m³ 이하)에서 진행되었고, 액체질소 공급설비를 사용하여 분쇄 과정을 초저온으로 유지하였다. 냉동시료를 액체질소로 냉각한 텅스텐 카바이드 사발과 막자를 이용하여 잘게 부순 후, 파쇄된 시료를 액체질소로 냉각한 지르코늄 사발에 옮기고, 분쇄기(DE/pulverisette 23 Mini Mill, FRITSCH, Germany)를 이용하여 회당 350 rpm으로 2분씩 총 3~4회 정도 분쇄 및 균질화하였다. 분쇄 입도는 독일환경시료은행의 기준을 따랐으며, 시료의 90% 이상이 200 µm 이하가 되도록 하였다. 분쇄된 시료는 동결건조기(PVTFD20R, 일신랩, Korea)로 -70°C, 30 mTorr 이하로 건조한 후, 「표준물질의 인증·일반적 및 통계적 원칙」(ISC, 2005)의 기준을 적용하여 시료 약 2g씩을 분취하여 20 mL 바이알에 옮겨 초저온 탱크에 저장하였다.

2.2. 시약 및 분석기기

표준용액용 시약은 카드뮴 표준원액(Multi-Element Calibration Standard 3, Perkin Elmer, USA) 10 mg/L를 희석하여 사용하였으며, 분해용 시약으로는 질산(Guaranteed reagent, Junsei Chemical, Japan) 및 과산화수소(Guaranteed reagent, Wako Pure Chemical, Japan)를 사용하였다. 실험에 사용된 정제수는 초수순 여과장치(Ultra pure device, Milipore, France)를 이용하여 전기 저항값 18 MΩ·cm 수준으로 사용하였다. 극초단파 시료분해 장치(Microwave digestion system, CEM MARS 6, USA)를 사용하여 분해하였으며, 카드뮴을 정량하기 위해 유도결합 플라즈마 질량분석기(Inductively coupled plasma mass spectrometer, Elan DRC-e, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한 실험의 정확도를 확인하기 위해 인증표준물질(NIST SRM 2976, mussel tissue, Maryland, USA)을 사용하여 회수율을 구하였다.

Table 1. Instrumental operating conditions of ICP/MS

| Parameter | Operational conditions |
|--------------------|--------------------------|
| RF power | 1500 W |
| Plasma gas flow | 18 L/min |
| Auxiliary gas flow | 1.2 L/min |
| Nebulizer gas flow | 1.15 L/min |
| Replicate | 3 cycles |
| Spray chamber | Double pass (Scott type) |
| Nebulizer | Cross flow |

2.3. 시료 전처리 및 분석방법

홍합 시료 0.5 g을 PTFE 용기에 넣고 질산 5 mL와 과산화수소 2 mL를 각각 첨가한 후, 용기 뚜껑을 닫아 밀폐시킨 뒤 20분간 210°C까지 상승시킨 후 20분 동안 온도를 유지하여 완전히 분해하였다. 분해 후 방냉한 용기에 초순수를 가하여 50 mL에 여과한 후 정용(定容)하였다. 홍합의 카드뮴을 분석하기 위한 ICP/MS 조건은 Table 1과 같으며, 이를 정량하기 위해 표준원액(10 mg/L)을 0, 5, 10, 25, 50, 100 µg/L 표준용액으로 만들어 검정곡선을 구한 후 ICP/MS로 측정하였다.

2.4. 균질성 시험평가

제조된 표준물질의 병내와 병간의 균질성을 평가하기 위해 무작위로 10개 바이알(1개 병내 2회 분취)을 선정하여 각각 0.5 g씩 분취한 후, 회수율 시험과 동일하게 전처리하여 ICP/MS로 측정하였다. 측정된 결과의 통계분석은 KS Q ISO Guide 35 (ISC, 2005)에 제시하는 일원배치분산분석법(ANOVA test)을 적용하였으며, 병간 표준편차(between-bottle variance, S_{bb})와 병내 표준편차(within-bottle variation, S_{wb})를 5% 유의수준에서 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

$$S_{bb} = \sqrt{S_a^2} = \sqrt{\frac{M_{among} - M_{within}}{n_o}}$$

$$S_{wb} = \sqrt{M_{within}}$$

S_a : 병간의 분산

M_{among} : 병간의 평균제공

M_{within} : 병내의 평균제공

n_o : 각 bottle의 분석결과 수

또한 KS Q ISO Guide 35에서 제시하는 병간 불균질성으로 인한 표준불확도(U_{bb})는 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

$$U_{bb} = \sqrt{\frac{M_{within}}{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{v M_{within}}}$$

M_{among} : 병간의 평균제공

M_{within} : 병내의 평균제공

$v M_{within}$: M_{within} 의 자유도 수

n : 시료의 개수

2.5. 단기안정성 시험평가

안정성 시험평가는 균질성이 확인된 분석표준물질을 항온항습 조건(20°C, 30% 내외)에서 암소 보관하고, KS Q ISO Guide 35에서 제시하는 회귀분석을 적용하여 단기안정성(0, 1, 2, 4, 8주) 농도 변화를 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분석방법 검증

홍합 내 카드뮴(Cd) 농도 분석과 관련하여 정도관리를 수행하였다. 직선성 결정계수(r^2), 검출한계, 정량한계, 상대표준편차 및 회수율은 각각 0.9998, 0.22 µg/L, 0.71 µg/L, 3.3% 및 83.9%로 나타났다(Table 2).

3.2. 균질성 시험평가

분석 표준물질에 대한 균질성을 평가하기 위해 무작위로 10명의 홍합시료를 선정하고 KS Q ISO Guide 35에 따라 일원배치분산분석을 실시한 결과, 홍합 시료에서 카드뮴은 신뢰수준 95% 기준으로 F비(병간분산과 병내분산의 비율)가 0.41로 F 기각치 3.02보다 작았고,

Table 2. Results of method validation for cadmium by ICP/MS

| Heavy metal | Linearity (r^2) | MDL ($\mu\text{g/L}$) ¹⁾ | LOQ ($\mu\text{g/L}$) ²⁾ | RSD (%) ³⁾ | Recovery (%) ⁴⁾ |
|-------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Cd | 0.9998 | 0.22 | 0.71 | 3.3 | 83.9 |

¹⁾ Method detection Limit, ²⁾ Limit of quantification, ³⁾ Relative standard deviation, ⁴⁾ Coefficient of variation

Table 3. Results of homogeneity test for cadmium in analytical reference material of Korean mussel (*Mytilus coruscus*)

| Source of variation | Sum of squares | Degree of freedom | Mean square | F ratio | p value | Critical F value |
|---------------------|----------------|-------------------|-------------|---------|-----------|------------------|
| Among-bottles | 0.15 | 9 | 0.02 | 0.41 | 0.90 | 3.02 |
| Within-bottles | 0.40 | 10 | 0.04 | | | |
| Total | 0.55 | 19 | | | | |

Table 4. Within-bottle (S_{wb}), between-bottle variation (S_{bb}) and uncertainty (U_{bb}) estimation from homogeneity test for cadmium (unit: mg/kg)

| Heavy metal | S_{wb} | S_{bb} | U_{bb} |
|-------------|----------|----------|----------|
| Cd | 0.034 | 0.129 | 0.031 |

Table 5. Regression analysis of cadmium concentrations for short-term stability of Korean mussel samples

a) Regression statistics

| | | | |
|-------------------|-------|----------------|------|
| Multiple R | 0.38 | Standard Error | 0.37 |
| R Square | 0.15 | Observations | 5 |
| Adjusted R Square | -0.14 | | |

b) ANOVA statistics

| | df ¹⁾ | SS ²⁾ | MS ³⁾ | F ratio | Significance F |
|------------|------------------|------------------|------------------|---------|----------------|
| Regression | 1 | 0.07 | 0.07 | 0.51 | 0.53 |
| Residual | 3 | 0.40 | 0.13 | | |
| Total | 4 | 0.47 | | | |

| | Coefficients | Standard Error | t Statistics | p values | Lower 95% | Upper 95% |
|-----------|--------------|----------------|--------------|------------|-----------|-----------|
| Intercept | 4.86 | 0.24 | 20.47 | 0.00 | 4.11 | 5.62 |
| X1 | 0.04 | 0.06 | 0.71 | 0.53 | -0.14 | 0.23 |

¹⁾Degree of freedom, ²⁾Sum of squares, ³⁾Root mean square

유의수준 p 값은 0.90으로 병간, 병내의 농도차이가 통계적으로 없는 것으로 나타났다(Table 3). 또한 병간 표준편차(S_{wb})는 0.034 mg/kg, 병내 표준편차(S_{bb})는 0.129 mg/kg, 표준불확도(U_{bb})는 0.031 mg/kg으로 나

타났다(Table 4). Table 2에 나타낸 바와 같이 홍합에서 카드뮴의 상대표준편차(RSD)는 3.3%로 나타났으며, 일반적으로 표준물질의 상대표준편차는 5% 미만이 양호하다고 알려져 있다(Jin et al., 2017).

3.3. 단기안정성 시험평가

표준물질에 대한 단기안정성을 평가하기 위해 균질성이 확인된 홍합시료를 0주차부터 1, 2, 4, 8주간 4차례 간격으로 분석한 카드뮴 농도를 KS Q ISO Guide 35에 따라 회귀분석을 실시한 결과, 카드뮴은 신뢰수준 95% 기준으로 p 값이 0.53으로 유의수준($p=0.05$) 보다 크기 때문에 귀무가설(시간에 따른 증감경향이 없음)을 기각할 수 없으므로 시간에 따른 시료의 농도변화가 없다는 가설이 유의한 것으로 나타났다(Table 5). 따라서 균질성이 확인된 시료는 보관기간 8주 동안은 안정성이 유지되고 있음을 확인할 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서는 홍합을 이용한 카드뮴 분석 표준물질 개발과 관련한 시료의 균질성 및 안정성을 평가하기 위해 KS A ISO Guide 35를 적용하여 검토하였다. 홍합을 초저온 분쇄균질화하여 동결건조한 후, 카드뮴 농도 분포에 대한 통계분석을 실시한 결과, 병내와 병간 모두 균질하게 분포되어 있음을 확인하였다. 또한 저장 기간에 따른 시료의 카드뮴 농도변동이 통계적으로 유의하지 않게 나타나 단기적으로는 안정한 상태를 확인할 수 있었다. 따라서 제작된 홍합 표준물질은 향후 숙련도 평가용으로 활용이 가능할 것으로 보이며, 장기적인 안정성 평가를 추가로 진행하고, 측정불확도를 산출하여 분석기관 등에 보급하여 활용될 수 있도록 추진할 계획이다.

감사의 글

본 논문은 환경부의 재원으로 국립환경과학원의 지원을 받아 수행하였습니다(NIER 2018-01-01-051).

REFERENCES

Bosch, A. C., O'Neill, B., Sigge, G. O., Kerwath, S. E., Hoffman, L. C., 2016, Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 96, 32-48.

Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D. A., 2006, The toxicity of cadmium and resulting hazards for

human health, *J. Occup. Med. Toxicol.*, 1(22), 1-6.

Goldberg, E. D., 1986, The mussel watch concept, *Environ. Monit. Assess.*, 7, 91-103.

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, the Republic of Korea.

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, J. H., Ahn, J. Y., Choi, S. G., Kwon, Y. S., Shin, M. C., Hong, S. M., Seo, J. S., 2018, Development of cherry tomato-analytical reference material for proficiency test of pesticide multi-residue analysis, *Korean J. Pestic. Sci.*, 22(3), 159-165.

Lee, J. H., Lee, J. C., Kim, M. J., Han, A. R., Lee, E. G., Bade, R., Kim, M. S., 2012, Sampling and cryogenic pulverization and storage of environmental samples and improvement of operating procedures in National Environmental Specimen Bank, *J. Environ. Impact Assess.*, 21(6), 823-839.

Lee, J. H., Chung, D., Choi, J. H., Lee, J. C., Lee, S. Y., 2018, Homogeneity test on bio-matrix reference material for chemical analysis of environmental pollutants, *J. Environ. Sci. Int.*, 27(12), 1271-1277.

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.

- 이하은, 국립환경과학원 자연환경연구과 전문위원 gkdms12@korea.kr
- 이장호, 국립환경과학원 자연환경연구과 연구관 ficedula01@korea.kr
- 정다위, 국립환경과학원 자연환경연구과 연구관 david426@daum.net
- 이수용, 국립환경과학원 자연환경연구과 전문위원 randol84@korea.kr
- 박기완, 국립환경과학원 자연환경연구과 전문위원 nick876@naver.com
- 심규영, 국립환경과학원 자연환경연구과 전문위원 sarcan@naver.com