



## HPLC-AFS를 이용한 해산물 중 비소 화학종 분리정량

정승우<sup>1\*</sup>, 이채혁<sup>2</sup>, 이종화<sup>2</sup>, 장봉기<sup>2</sup>

<sup>1</sup>순천향대학교 ICT환경보건시스템학과, <sup>2</sup>순천향대학교 환경보건학과

## Quantification of Arsenic Species in Some Seafood by HPLC-AFS

Seung-Woo Jeong<sup>1\*</sup>, Chae-Hyeok Lee<sup>2</sup>, Jong-Wha Lee<sup>2</sup>, and Bong-Ki Jang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of ICT Environmental Health System, Soonchunhyang University, <sup>2</sup>Department of Environmental Health Science, Soonchunhyang University

### ABSTRACT

**Background:** Considering the expenses of and difficulties in arsenic speciation by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS), alternative measurement methods should be useful, especially for large-scale research and projects.

**Objectives:** A measurement method was developed for arsenic speciation using HPLC-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-AFS) as an alternative to HPLC-ICP-MS.

**Methods:** Total arsenic and toxic arsenic species in some seafoods were determined by atomic absorption spectrometry coupled with hydride vapor generation (AAS-HVG) and HPLC-AFS, respectively. Recovery rate of arsenic species in seafood was evaluated by ultra sonication, microwave and enzyme (pepsin) for the optimal extraction method.

**Results:** Limits of detection of HPLC-AFS for As<sup>3+</sup>, dimethylarsinate (DMA), monomethylarsonate (MMA) and As<sup>5+</sup> were 0.39, 0.53, 0.60 and 0.64 µg/L, respectively. The average accuracy ranged from 97.5 to 108.7%, and the coefficient of variation was in the range of 1.2~16.7%. As<sup>3+</sup>, DMA, MMA and As<sup>5+</sup> were detected in kelp, the sum of toxic arsenic in kelp was 40.4 mg/kg. As<sup>3+</sup>, DMA, MMA and As<sup>5+</sup> were not detected in shrimp and squid, but total arsenic (iAS and oAS) content in shrimp and squid analyzed by AAS-HVG were 18.1 and 24.7 mg/kg, respectively.

**Conclusions:** HPLC-AFS was recommendable for the quantitative analysis method of arsenic species. As toxic arsenic species are detected in seaweeds, further researches are needed for the contribution degree of seafood in arsenic exposure.

**Key words:** Arsenic speciation, enzyme, HPLC-AFS, microwave, ultra sonication, seafood

**Received** August 26, 2021

**Revised** October 19, 2021

**Accepted** October 20, 2021

### Highlights:

- Seafood is a major source of dietary exposure to arsenic.
- Urinary arsenic concentration in East Asians is higher than that of Westerners.
- Arsenic speciation in seafood is important in arsenic exposure evaluation.
- HPLC-AFS method is a recommendable analytical method for arsenic speciation in seafood.

### \*Corresponding author:

Department of ICT Environmental Health System, Soonchunhyang University, 22-26, Soonchunhyang-ro, Sinchang-myeon, Asan 31538, Republic of Korea

Tel: +82-41-530-1230

Fax: +82-41-542-4615

E-mail: tmddn5389@gmail.com

## I. 서 론

비소(Arsenic)는 지각 중 자연 부존 함량이 20번째로 많이 존재하는 금속과 비금속의 중간적 성질을 보이는 준금속으로써 다양한 화학적 형태로 환경 및 식품 중에 널리 분포하며 국가에서 관리하는 유해 중금속이며,<sup>1-3)</sup> 국제 암 연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는

Group 1로 분류할 만큼 유해성이 큰 금속으로 분류하고 있다.<sup>4)</sup>

비소에 대한 인체 노출평가는 인도, 중국, 대만, 멕시코 등 고농도의 비소에 오염된 지하수를 사용하는 사람들과 해산물 섭취가 많은 동아시아(대만, 일본, 중국 및 한국) 국민들을 대상으로 많은 연구를 진행하였다. 고농도 비소로 오염된 음용수를 사용하는 인도 서벵갈지역 주민의 요중 비소[iAs,



Dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA)]는 176 µg/L이며, 대만에서 흑족병 이환율이 높은 주민을 대상으로 한 조사에서 요중 비소(iAs, MMA, DMA)는 남성은 88.1 µg/L, 여성은 65.3 µg/L로 나타났다.<sup>5-6)</sup> 대만의 일반 성인을 대상으로 한 조사에서 요중 비소는 남성은 57.0 µg/L 여성은 62.9 µg/L로 조사되었으며, 일본에서 대학생을 대상으로 수행한 조사(Yamato, 1988)<sup>7)</sup>에서 요중 비소(iAs, MMA, DMA)는 50.7 µg/L이었다. 그리고 기타큐슈 지역 주민 210명을 대상으로 수행한 조사(Hata 등, 2007)<sup>8)</sup>에서 요중 비소(iAs, MMA, DMA)의 농도는 49.3 µg/L이었다.<sup>6-8)</sup> 우리나라 일반 성인 5,000여 명을 대상으로 수행한 조사에서 요중 비소 농도가 53.4 µg/L로, 충청남도 내 산업단지 주변에 거주하는 주민들의 요중 비소 농도는 50.39 µg/g cr.로 보고하였고, 이는 일본, 중국, 그리고 대만 사람들의 농도와 비슷하였다.<sup>9-10)</sup>

Caldwell 등(2009)<sup>12)</sup>은 20세 이상 1,542명의 미국인을 대상으로 수행한 조사에서 요중 비소 농도를 8.41 µg/L로 보고하였으며, 미국 ACGIH (2001)<sup>11)</sup>는 유럽 및 미국의 직업적인 비노출군의 요중 비소(iAs, MMA, DMA) 농도가 약 10 µg/L이며, 일본인의 경우에는 약 50 µg/L라고 보고하면서 일본인에서 높은 것은 해산물 섭취빈도가 많기 때문으로 추정하였다.<sup>11,12)</sup>

해산물은 식이를 통한 비소의 주요한 노출원으로 알려져 있으며, 해산물의 종류에 따라 노출 기여도가 큰 차이를 보인다.<sup>2)</sup> 주로 해조류의 비소 함량이 높다고 알려져 있으며,<sup>13-15)</sup> 해산물 중의 비소는 대부분 독성이 낮은 유기비소(arsenobetaine, AsB; arsenocholine, AsC; arsenosugars 및 arsenolipids)으로써 어류, 패류, 갑각류 등에는 AsB이 주를 이루고 있고, 해조류에는 arsenosugars가 대부분을 차지하고 있기 때문에 인체에 무독하다고 알려져 왔다. 그러나 일부 유기비소(arsenosugars와 arsenolipids)는 무독화 과정 중 메틸화가 되어 DMA나 MMA와 같은 메틸화 비소 화학종으로 변환되어 인간에게 잠재적인 독성을 나타낸다.<sup>15,16)</sup>

비소는 화학적 구조에 따라 독성이 다르기 때문에 환경 및 생체시료 중 비소 화학종 분리정량은 건강 위해성 평가에 무엇보다도 중요하다. 그 동안 환경 및 생체시료 중 비소 화학종 분리정량에 HPLC-ICP-MS를 주로 이용하였다.<sup>17-19)</sup> 그러나 HPLC-ICP-MS를 이용한 방법은 장비가 고가이며, clean room이 필요하고, 분석 단가가 높기 때문에 많은 시료를 분석하기에 어려움이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 보다 저렴한 장비인 HPLC-AFS를 이용한 비소 화학종 분리정량법이 개발되어 이용하고 있다.<sup>2,14)</sup>

우리나라 일반인 요중 비소 평균농도 53.4 µg/L는 미국 ACGIH (2001)<sup>11)</sup>가 비소 화합물을 취급하는 근로자를 대상으로 한 생물학적 노출지표(Biological Exposure Index)로 권장하고 있는 35 µg/L와 비교하여 매우 높은 수치이기 때문에 주된 노출원으로 파악되고 있는 해산물 중 비소 화학종의 종류와

농도에 대한 연구가 절실한 실정이다.<sup>11)</sup> 따라서 본 연구는 비소 화학종 분리정량을 위한 HPLC-AFS의 유효성을 검증하고, 해산물 중 비소 화학종 최적 추출법을 평가하였으며, HPLC-AFS를 이용하여 국내에 시판되고 있는 일부 해산물 중 비소의 함량을 측정함으로써 비소 노출로 인한 건강 위해성 평가에 활용할 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 해산물 시료 채취

해산물은 시중에서 각각 다른 상품명과 생산지의 건조된 상태로 판매되고 있는 김, 미역, 다시마, 멸치, 새우 및 오징어를 무작위로 각각 종류별로 5개씩 2015년 아산시에 소재한 마트에서 구입하여 총 30개 시료를 연구대상으로 하였다. 시료를 막자사발을 이용하여 분쇄하고, 표준체(체눈 크기: 250 µm)로 걸러 분석용 시료로 사용하였다.

### 2. 해산물 중 비소 화합물 추출

#### 2.1. 초음파 추출법

시료 0.1 g에 methanol/water (3:1) 혼합액 10 mL를 넣은 후 24시간 동안 roller mixer로 교반 후 2시간 동안 20~30°C에서 초음파처리하였다. 초음파처리 중 30분 간격으로 vortex mixer를 이용하여 충분히 교반하였으며, 0.45 µm nylon membrane syringe filter (SN25P045N, HYUNDAI Micro Co.)로 여과하여 15 mL 분석용 시료를 제조하였다.

#### 2.2. 마이크로파 추출법

시료 0.1 g에 methanol/water (1:1) 혼합액 10 mL를 넣은 후 24시간 동안 roller mixer로 교반한 후에 마이크로파 용기에 옮겨 마이크로파를 이용하여 가열하였다. 가열 프로그램은 1,200 W의 전력에 10분 동안 60°C로 온도를 올린 후 5분간 유지하도록 설정하였다. 마이크로파 처리 후 0.45 µm nylon membrane syringe filter로 여과하여 15 mL 분석용 시료를 제조하였다.

#### 2.3. 효소(pepsin) 추출법

시료 0.1 g에 pepsin (powder, ≥250 unit/mg solid, Sigma-Aldrich) 0.03 g을 넣고 pH 3.0인 methanol/water (3:1) 혼합액 10 mL를 첨가한 후 24시간 동안 roller mixer로 교반한 후에 5분 동안 40°C에서 초음파처리하였다. 0.45 µm nylon membrane syringe filter로 여과하여 15 mL 분석용 시료를 제조하였다.

### 3. 시료 분석 방법

#### 3.1. 시약 및 표준물질

증류수는 18.2 MΩ (Millipore, USA) 이상의 탈이온수를 사용하였다. 해산물 중 비소 화학종의 추출에 사용된 methanol, pepsin, 비소 화학종 표준물질인  $As^{3+}$ , DMA, MMA 및  $As^{5+}$ 는 Sigma-Aldrich (USA) 사에서 구입하였다. 분석방법의 정확도 및 정밀도를 평가하기 위해 사용한 SRM (Standard Reference Material)은 NIST (National Institute of Standards and Technology, USA) 2669 (Arsenic Species in Frozen Human Urine) level I과 level II를 사용하였다. level I과 level II는 NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey, USA)의 data를 기반으로 각각 중농도와 고농도에 해당한다.<sup>20)</sup>

#### 3.2. 검량선 및 정도관리

$As^{3+}$ , DMA, MMA 및  $As^{5+}$ 의 표준용액 농도 범위는 2.5~80 µg/L로 제조하였다(Fig. 1). 표준용액 4개 이상으로 검량선의 상관계수( $R^2$ )가 0.999 이상일 때 비소를 분석하였다.

HPLC-AFS를 이용한 비소 화학종 분리정량방법의 유효성 검증은 US-FDA의 Bioanalytical Method Validation에 준하여 실시하였다.<sup>21)</sup> 검출한계를 위해 탈이온수에 정량하한값과 비슷한 농도의 표준물질을 첨가한 시료 7개를 조제하여 분석한 측정값들의 표준편차에 3.14를 곱하여 산출하였다. 정확도 및 정밀도 평가는 NIST SRM 2669 level I과 level II를 각각 3회 이상 분석하여 산출하였으며, 정밀도는 측정값의 상대표준편차(% RSD)로 계산하였다. 회수율 검증용 시료는 각각 3개의 해산물에 저농도(5 µg/L) 및 고농도(40 µg/L) 표준용액을 첨가하여 제조하였으며, 3가지 추출법 초음파처리, 마이크로파 처리

및 효소를 이용한 추출방법으로 각각 회수율 검증용 시료 10 mL를 조제하여 비소 화학종을 HPLC-AFS로 분리정량하여 회수율을 평가하였다.

#### 3.3. 해산물 중 총비소 및 비소 화학종 정량

총비소 분석용 시료는 해산물 1 g에 70.0% 질산 15 mL 첨가하여 1시간 방치한 후 가열판에서 암갈색 연기가 완전히 사라질 때까지 습식회화하고, 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석용 시료를 제조하였다.

해산물 중 총비소는 원자흡수분광계(Shimadzu AA-6800, Japan)를 이용하여 수소화물 증기 발생법(hydride vapor generation, HVG)으로 분석하였으며, 비소 화학종 분리정량은 세 가지 추출방법으로 조제한 분석용 시료를 HPLC-AFS (HPLC-atomic fluorescence spectrophotometer)를 이용하였다. 비소 화학종 분리정량에 이용한 HPLC-AFS의 분석조건은 Table 1과 같다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. HPLC-AFS를 이용한 비소 화학종 분리정량법 검증

#### 1.1. 검출한계(LOD)

HPLC-AFS를 이용한 분석방법의 비소 화학종 검출한계는  $As^{3+}$ , DMA, MMA 및  $As^{5+}$ 에 대한 각각 0.059, 0.080, 0.090 및 0.096 mg/kg로 나타났다. 해양시료 중 비소화합물을 HPLC-ICP-MS로 분석한 결과에서  $As^{3+}$ , DMA, MMA 및  $As^{5+}$ 의 검출한계는 각각 0.019, 0.012, 0.010, 0.010 mg/kg로 보고되어 HPLC-AFS 방법 보다 검출한계가 낮은 것으로 나타났다.<sup>22)</sup>

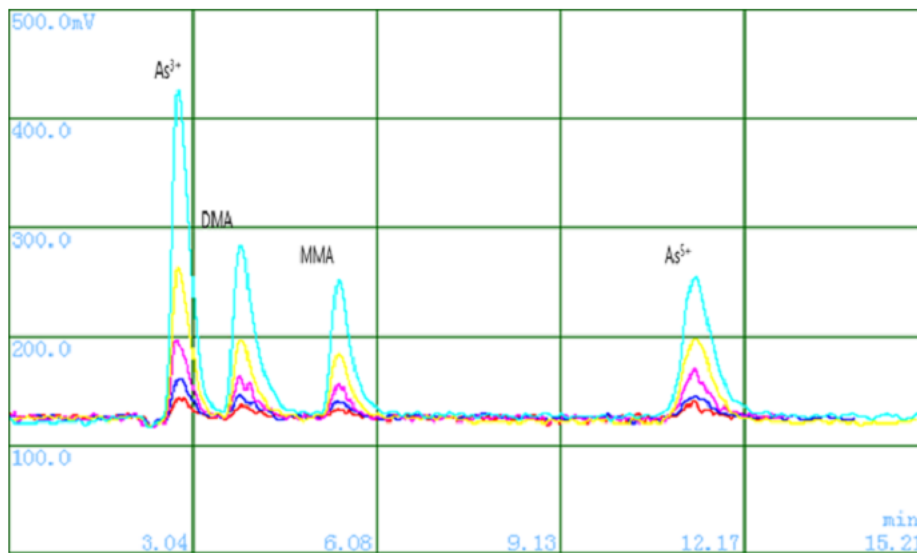


Fig. 1. Chromatogram of arsenic speciation by HPLC-AFS (DMA: dimethylarsinic acid, MMA: monomethylarsonic acid)

**Table 1.** Instrumental operating conditions for arsenic speciation in seafood by HPLC-AFS

Items	Conditions	
Analysis instrument	HPLC-AFS, SAP-20 (HPLC), SA-20 (AFS) (Titan instruments, China)	
Chromatographic parameter	Anion exchange column	Hamilton PRP-X100 (250 mm×4.1 mm I.d., 10 μm)
	Mobile phase	15 mmol/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH was adjusted to 6.0 by 10.0% CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
	Flow rate	1.0 mL/min
Hydride generation parameter	Injection volume	100 μL
	Reductant	0.35% NaOH/1.0% NaBH <sub>4</sub>
	Carrier solution	3.5% HCl (v/v)
AFS parameter	Element lamp	As (80 mA/40 mA)
	Photomultiplier voltage	285 V
	Carrier gas	Argon (99.999%) 400 mL/min
	Shield gas	600 mL/min

**Table 2.** Evaluation of accuracy and precision of arsenic speciation in SRM by HPLC-AFS

SRM	Certified values (μg/L, Mean±SD)	Results (μg/L, Mean±SD)	Accuracy (%)	CV (%)	
Level I	As <sup>3+</sup>	1.47±0.10	1.43±0.09	97.3	6.3
	DMA	3.47±0.41	3.63±0.57	104.6	15.7
	MMA	1.87±0.39	2.03±0.12	108.6	5.9
	As <sup>5+</sup>	2.41±0.30	2.70±0.22	112.0	8.2
Level II	As <sup>3+</sup>	5.03±0.31	4.93±0.33	98.0	6.7
	DMA	25.3±0.70	25.5±0.33	100.8	1.3
	MMA	7.18±0.56	7.60±0.22	105.8	2.9
	As <sup>5+</sup>	6.16±0.95	6.40±0.36	103.9	5.6

DMA: dimethylarsinic acid, MMA: monomethylarsonic acid.

### 1.2. 정확도 및 정밀도 평가

HPLC-AFS를 이용한 비소 화학종 분리정량방법의 정확도 및 정밀도 평가는 NIST SRM 2669를 이용하여 수행한 결과 정확도는 level I의 경우에 As<sup>3+</sup>, DMA, MMA 및 As<sup>5+</sup> 각각 97.3, 104.6, 108.6 및 112.0%로 나타났고, level II는 각각 98.0, 100.8, 105.8 및 103.9%로 나타났으며, 평균 정확도는 97.3~112.0%로 나타났다(Table 2). 분석방법의 정밀도(변이계수)는 1.3~15.7%로 나타났다. 본 연구에서 사용한 SRM은 소변시료이기 때문에 SRM으로 해산물 시료를 사용할 경우에 다른 결과가 도출될 가능성이 있을 것으로 판단된다. 본 연구와 동일한 분석기기 HPLC-HG-AFS를 사용한 Cao 등(2014)<sup>23)</sup>는 정확도 88.1~113.2%와 정밀도 4.8~12.5%로 보고하고 있어 본 연구 결과와 유사하게 나타났다.

HPLC-AFS를 이용한 비소 분석법의 검출한계는 기존의 HPLC-ICP-MS 분석법과 비교하여 약간 낮은 수준이었으며, SRM을 이용한 정확도 및 정밀도 평가에서 정확도는 Level I의 As<sup>5+</sup>를 제외한 7개 항목에서 AOAC Standard Method

**Table 3.** Recovery test of arsenic species in seafood by extraction methods

Samples	Arsenic species	Recovery test (%), Mean±SD		
		Ultrasonic	Microwave	Enzyme
Laver	As <sup>3+</sup>	98.5±11.4	93.2±5.3	109.8±11.4
	DMA	96.9±12.4	102.3±6.8	115.5±3.5
	MMA	103.1±7.3	101.4±32.1	97.0±4.9
	As <sup>5+</sup>	106.2±11.0	98.1±1.4	107.6±5.9
Sea mustard	As <sup>3+</sup>	94.7±1.9	99.1±5.5	100.8±15.0
	DMA	106.0±8.6	103.5±3.9	103.7±12.3
	MMA	102.7±2.5	94.3±9.6	98.0±6.4
	As <sup>5+</sup>	117.0±3.3	102.4±12.3	100.2±3.9
Kelp	As <sup>3+</sup>	102.9±2.9	105.0±15.8	102.3±11.3
	DMA	112.3±5.3	93.2±6.0	99.6±21.0
	MMA	89.6±26.8	90.3±13.3	86.6±6.7
	As <sup>5+</sup>	83.2±18.8	92.7±11.3	87.2±4.0
Anchovy	As <sup>3+</sup>	102.0±5.9	104.6±4.8	105.5±7.3
	DMA	98.6±8.2	107.3±10.9	97.8±9.5
	MMA	94.0±8.7	99.0±4.1	100.7±5.6
	As <sup>5+</sup>	103.1±3.4	96.3±5.0	103.1±3.4
Shrimp	As <sup>3+</sup>	110.3±15.7	92.5±2.5	103.6±11.1
	DMA	108.7±9.0	117.6±4.4	100.9±8.1
	MMA	111.2±10.1	99.4±8.0	99.5±6.1
	As <sup>5+</sup>	89.3±6.2	94.7±2.6	95.2±7.3
Squid	As <sup>3+</sup>	108.0±1.6	99.2±19.3	108.1±2.7
	DMA	97.8±13.4	95.0±8.6	97.8±13.4
	MMA	117.3±3.8	98.0±6.8	111.9±6.4
	As <sup>5+</sup>	119.0±5.1	98.7±4.6	111.6±8.6
Total range		83.2~119.0	90.3~117.6	86.6~115.5

DMA: dimethylarsinic acid, MMA: monomethylarsonic acid.

Performance Requirements (SMPR<sup>®</sup>) 2015.006에서 제시하는 90~110% 내이고, 정밀도는 1.3~15.7%로 AOAC SMPR

2015.006의 ≤20%를 만족시키고 있다.<sup>24)</sup> 또한 HPLC-AFS 분석법은 HPLC-ICP-MS 분석법과 비교하여 장비가 저렴하며, 조작이 간단하여 숙련도 향상을 위해 비교적 짧은 교육 시간이 소요되며, 별도의 clean room이 필요 없다는 장점을 가지고 있기 때문에 많은 수의 환경 및 생체시료 중 비소 화학종의 분리 정량에 권장할만한 방법으로 판단된다.

## 2. 추출방법에 따른 소량 첨가 회수율

해산물에 소량의 표준물질을 첨가하고 비소 화학종을 초음파처리, 마이크로파 처리 및 효소 처리법으로 추출한 후에 HPLC-AFS를 이용하여 분리정량함으로써 최적 추출방법을 평가한 결과를 Table 3에 나타냈다.

각종 해산물 중 비소 화학종 추출방법별 회수율은 초음파 처리, 마이크로파 처리 및 효소 처리에서 각각 83.2~119.0%, 90.3~117.6% 및 86.6~115.5%로 나타나 방법별로 큰 차이는 없었으며, 비교적 양호한 회수율을 보였다. 초음파 처리법을 사용한 Yang 등(2009)<sup>25)</sup>의 연구에서 회수율은 96.0~105.0%였으며, 효소(pepsin) 추출방법을 사용한 Moreda-Piñeiro 등(2011)<sup>26)</sup>은 95.0~105.0%로 보고하고 있어 본 연구보다 양호한 회수율을 보였다. 또한 동일한 분석기기 HPLC-HG-AFS를 사용한 Cao 등(2014)<sup>23)</sup>의 연구에서 회수율은 85.1~109.3%로 나타나 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

## 3. 해산물 중 비소 화학종 및 총비소 정량

세 가지의 비소 화학종 추출법을 비교한 결과 회수율은 비슷하여 해산물 중 비소 화학종 분리정량을 위해 비교적 조작이 간편한 효소 처리법을 이용하여 추출한 후에 HPLC-AFS로 분석한 결과를 Table 4에 나타냈다. 상품명과 생산지가 다른 김에서 MMA만 5.7±1.0 mg/kg로 검출되었으며, 미역에서는 As<sup>3+</sup>, DMA 및 As<sup>5+</sup>가 각각 0.7±0.2, 0.4±0.2 및 0.6±0.6 mg/kg로 나타났다. 다시마에서 As<sup>3+</sup>, DMA, MMA 및 As<sup>5+</sup>가 모두 검출되었고, 각각 1.4±0.3, 0.6±0.1, 8.0±1.1 및 30.4±3.4 mg/kg로 특히 독성이 강한 것으로 알려진 As<sup>5+</sup>가 가장 농도가 높

은 것으로 조사되었다. 멸치에서는 As<sup>3+</sup>만 0.2±0.1 mg/kg로 미량 검출되었으며, 새우와 오징어에서 모든 비소 화학종 검출되지 않았다.

해산물 중 비소 화학종의 분리정량 결과는 연구자에 따라 상당히 다른 양상을 보이고 있다. 본 연구에서 김의 경우 MMA만 5.7±1.0 mg/kg 검출되었으나 김민혁 등(2020)<sup>27)</sup>의 결과에서 모든 비소종이 검출되었으며, DMA가 0.30±0.13 mg/kg로 가장 함유량이 높았다. 류근영(2014)<sup>28)</sup>의 결과에서는 DMA가 0.08±0.01 mg/kg로 나타났다. 미역에서 본 연구에서는 As<sup>3+</sup>, DMA 및 As<sup>5+</sup>가 검출된 반면에 류근영(2014)<sup>28)</sup>의 결과 DMA만 검출됐으며, Choi 등(2011)<sup>29)</sup>의 결과에서는 As<sup>3+</sup>, DMA, MMA 및 As<sup>5+</sup>가 미량으로 검출되는 것으로 조사되었다. 다시마의 경우에 본 연구에서 As<sup>3+</sup>, DMA, MMA 및 As<sup>5+</sup>가 모두 검출되었고, As<sup>5+</sup>가 30.4±3.4 mg/kg로 상당히 고농도로 나타났다. 김민혁 등(2020)<sup>27)</sup>의 결과에서 모든 비소종이 검출되었으며, DMA가 0.64±0.29 mg/kg로 가장 함유량이 높은 것으로 나타나 본 연구의 결과와 상이하게 나타났다.

해산물 중에는 다양한 비소 화학종이 존재하며, 무기비소(As<sup>3+</sup> 및 As<sup>5+</sup>)가 가장 독성이 강하고, 메틸화 비소인 MMA와 DMA는 무기비소보다는 약하지만 독성이 있는 것으로 보고되고 있으며, 유기비소인 arsenobetaine (AsB), arsenosugars, arsenocholine 및 arsenolipids는 무독성 비소로 분류되고 있다. 따라서 해산물을 통한 비소 노출평가와 건강 위해성 평가를 위해 해산물에 존재하는 비소화합물의 특성을 파악하는 것은 중요하다.

연구대상 해산물 중 비소 중분리에서 분석되지 않은 유기비소 화학종의 함량을 측정하기 위하여 해산물을 강산으로 회화한 후에 AAS-HVG로 분석한 총비소(무기비소 및 유기비소)함량은 김 31.9±1.9 (29.1~34.2), 미역 38.3±5.3 (31.1~47.2), 다시마 70.7±6.1 (63.4~79.0), 멸치 24.5±3.8 (20.3~29.8), 새우 18.1±2.2 (14.0~20.2) 및 오징어 24.7±2.0 (20.9~26.4) mg/kg로 나타났다(Table 5).

유해비소 합과 총비소의 결과에서 다시마를 제외한 해산물

**Table 4.** Contents of arsenic species in seafood by enzyme treatment

Samples	n	Arsenic species (mg/kg, Mean±SD)				Total
		As <sup>3+</sup>	DMA*	MMA*	As <sup>5+</sup>	
Laver	5	<LOD	<LOD	5.7±1.0	<LOD	5.7
Sea mustard	5	0.7±0.2	0.4±0.2	<LOD	0.6±0.6	1.7
Kelp	5	1.4±0.3	0.6±0.1	8.0±1.1	30.4±3.4	40.4
Anchovy	5	0.2±0.1	<LOD	<LOD	<LOD	0.2
Shrimp	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Squid	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

\*DMA: dimethylarsinic acid, MMA: monomethylarsonic acid.

**Table 5.** Contents of total arsenic in seafood by AAS-HGV

Samples	n	Total arsenic (mg/kg, Mean±SD)
Laver	5	31.9±1.9
Sea mustard	5	38.3±5.3
Kelp	5	70.7±6.1
Anchovy	5	24.5±3.8
Shrimp	5	18.1±2.2
Squid	5	24.7±2.0

에서 독성이 없는 것으로 알려진 유기비소가 유해비소 보다 다량 함유된 것으로 나타났으며, 특히 멸치, 새우 및 오징어에는 유해비소는 거의 없으나 유기비소는 다량 함유된 것으로 나타났다.

김의 경우에 김민혁 등(2020)<sup>27)</sup>의 26.9±5.3 mg/kg, 류근영(2014)<sup>28)</sup>의 22.19 mg/kg와 비교하여 약간 높게 나타났으며, 미역은 김민혁 등(2020)<sup>27)</sup>의 51.0±15.8 mg/kg 보다 낮았으나 류근영(2014)<sup>28)</sup>의 33.25±1.71 mg/kg 및 박은수(2016)<sup>30)</sup>의 32.0±0.2 mg/kg과 비슷하였다. 다시마의 경우에 김민혁 등(2020)<sup>27)</sup>의 53.6±14.6 mg/kg, 국립독성연구원(2003)<sup>31)</sup>의 48.4 mg/kg, 류근영(2014)<sup>28)</sup>의 35.91±1.38 mg/kg에 비교하여 높은 것으로 조사되었다. 멸치에서는 식품의약품안전처(2007)<sup>32)</sup>의 10.49±8.68 mg/kg와 비교하여 높았으며, 새우는 국립독성연구원(2003)<sup>31)</sup>의 25.2 mg/kg과 광선순(2010)<sup>33)</sup>의 결과 27.5 mg/kg보다 낮았고, 오징어에서는 광선순(2010)<sup>33)</sup>의 결과 17.1 mg/kg에 비해 약간 높게 조사되었다. 해산물 중 비소 화학종 및 총비소의 농도가 다른 이유는 각 연구에 사용된 해산물의 생산지가 다르며, 비소 화학종 분리방법 및 분석방법이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

해산물 중 총비소의 함량은 다시마>미역>김>오징어>멸치>새우 순이었으며, 유해비소로 분류되는 4종의 비소종 합은 다시마>김>미역>멸치>순으로 해조류에서 총비소 및 유해비소의 농도가 높은 것으로 나타났다. 해산물 중에는 독성이 거의 없는 AsB, arsenosugars, arsenocholine, arsenolipids 등의 유기비소가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 새우, 게, 오징어 등의 갑각류에는 AsB가 주된 비소 화학종이며, 해조류에는 arsenosugars와 arsenolipids가 다량 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 총비소 농도와 유해비소 합의 농도간에 차이가 있는 것은 HPLC-AFS로 검출되지 않는 유기비소가 해산물에 다량 함유되어 있기 때문이다.

박정덕 등(2013)은 19세 이상 전 국민을 모집단으로 하여 인구의 제공근 구성비 가중치를 적용하고 성별과 연령을 층화하여 무작위 확률추출법에 의해 102개의 조사구로부터 선정된 2,117명을 대상으로 한 조사에서 요중 총비소 농도가 산술 평균 155.1±229.5 µg/L로 보고하였다.<sup>34)</sup> 이 농도는 ATSDR

(Agency for Toxic Substances and Disease Registry)에서 보편적으로 허용될 수 있는 정상범위인 <100 µg/L를 크게 상회하는 것이다. 본 연구의 결과에서 해산물 중에 유기비소가 다량 함유되어 있는 것으로 나타났으며, 요시료를 채취하기 전에 해산물을 섭취한 경우에 요중 총비소를 측정하면 ATSDR에서 제시하는 정상 범위를 초과할 가능성이 큰 것으로 예상된다. 그러나 요중에 무해한 다량의 유기비소가 존재하기 때문에 건강위해성이 있다고 판단하는 것은 합리적이 않다. 따라서 비소 노출 기여도가 큰 해산물 중 총비소 및 비소 화학종 분리정량은 우리나라 국민의 비소 노출평가와 건강 위해성 평가에서 매우 중요한 요소이다.<sup>35)</sup>

국민 인체 내 유해물질 실태조사(2001~2008)에서 우리나라 일반 성인 5,000여 명을 대상으로 한 조사에서 요중 비소 농도가 53.4 µg/L로 보고되었고, 생체시료 채취 3일 이내에 해산물을 섭취군에서 비섭취군 보다 요중 비소 농도가 유의하게 높은 것으로 나타났다.<sup>36)</sup> 광선순(2010)<sup>33)</sup>은 김, 미역 등 해조류 섭취군에서 새우 섭취군 보다 현저히 요중 비소 농도가 높았으며, 해조류 섭취군에서 DMA가 주된 비소 화학종으로 보고하였다.<sup>31)</sup> 본 연구에서 해조류는 DMA가 비교적 낮은 농도로 존재하나 해조류를 섭취한 군에서 다량의 DMA가 검출되는 것은 해조류 중의 arsenosugars와 arsenolipids가 인체 내에서 대사되는 과정에 DMA가 생성되기 때문이다. 반면에 갑각류에는 생체에서 대사되지 않고 소변으로 배설되는 AsB이 대부분이기 때문에 갑각류 섭취군에서 요중 비소 농도가 해조류에 비교하여 매우 낮은 것으로 판단된다.

우리나라 국민의 해산물 섭취 빈도는 서양인에 비교하여 매우 높으며, 해산물이 각종 음식의 재료로 사용되기 때문에 요중 비소 농도가 서양인과 비교하여 상당히 높은 것으로 조사되고 있다. 특히, 미국 OSHA에서 비소를 사용하는 사업장 근로자에 적용되는 생물학적 노출 지표인 35 µg/L보다 높게 조사되었으나 비소 노출원과 건강 위해성 평가에 대한 국내 연구가 부족한 실정이었다. 그 원인 중 하나는 환경, 농수산물, 생체시료 중 비소 화학종을 분리정량하는데 이용되고 있는 HPLC-ICP-MS 분석법에는 고가 장비, 숙련된 분석자, clean room 등이 필요하며, 분석비용이 비싸다는 것이다.

본 연구에서는 기존에 이용된 HPLC-ICP-MS 분석법을 대체할 수 있는 HPLC-AFS 분석법의 검출한계, 정확도, 정밀도 등을 평가하여 유효성을 검증한 결과 각종 시료 중 비소 화학종 분리정량에 권장할만한 방법으로 제안하였으며, 해산물 중 최적 비소 화학종 추출방법에 대하여 검토하였다. 또한 AAS-HVVG와 HPLC-AFS를 이용하여 국내에 시판되고 있는 6종의 해산물 중 총비소 및 유해비소를 정량함으로써 일부 해산물 중에 함유된 비소 화학종을 파악하였다.

## IV. 결 론

환경, 농수산물 및 생체 시료 중 비소 화학종 분리정량에 이용되고 있는 HPLC-ICP-MS 분석법에는 고가 장비, 숙련된 분석자, clean room 등이 필요하며, 분석비용이 비싸다는 단점으로 인해 다수의 시료를 분석하는데 어려움이 있다. 본 연구에서는 최근까지 비소종 분리정량에 사용된 HPLC-ICP-MS 대체 방법으로 제안되고 있는 HPLC-AFS 분석법의 검출한계, 정확도, 정밀도 등을 평가하여 유효성을 검증하였으며 그 결과 각종 시료 중 비소 화학종 분리정량에 권장할만한 방법으로 평가된다. 해산물 중 비소 화학종 최적 추출법을 평가하기 위해 ultra sonication, microwave 및 enzyme (pepsin) 처리법을 비교평가한 결과 세 가지 방법 모두 양호한 회수율을 보였다. HPLC-AFS를 이용한 해산물 중 비소종 분리정량에서 해조류인 김, 미역 및 다시마에서 독성비소( $As^{3+}$ ,  $As^{5+}$ , MMA 및 DMA)가 검출되었으며, 다시마에서 독성비소의 합이 40.4 mg/kg로 가장 농도가 높은 것으로 조사되었다. 멸치에서는  $As^{3+}$ 만 0.2±0.1 mg/kg로 미량 검출되었으며, 새우와 오징어에서 모든 비소 화학종 검출되지 않았다. AAS-HVG를 이용한 해산물 중 총비소를 분석한 결과 비교적 고농도의 비소가 함유된 것으로 나타났고, 다시마에서 70.7 mg/kg으로 가장 높은 것으로 조사되었다. 따라서 향후 비소의 주된 노출원과 비소노출로 인한 건강 위해성 평가에 대한 폭넓은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 연구는 2009년 순천향대학교 교수연구년제에 의하여 수행되었습니다.

## Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## References

1. AMurphy E, Aucott M. An assessment of the amounts of arsenical pesticides used historically in a geographical area. *Sci Total Environ*. 1998; 218(2-3): 89-101.
2. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA J*. 2009; 7(10): 1351.
3. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Food Code. Cheongju: MFDS; 2015.
4. IARC. IARC Carcinogen List. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021.
5. Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 2002; 58(1): 201-235.
6. Hsueh YM, Hsu MK, Chiou HY, Yang MH, Huang CC, Chen CJ. Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. *Toxicol Lett*. 2002; 133(1): 83-91.
7. Yamato N. Concentrations and chemical species of arsenic in human urine and hair. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1988; 40(5): 633-640.
8. Hata A, Endo Y, Nakajima Y, Ikebe M, Ogawa M, Fujitani N, et al. HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. *J Occup Health*. 2007; 49(3): 217-223.
9. Kim HC, Roh S. Urinary arsenic concentrations among residents in the vicinity of a Chungcheongnam-do province industrial complex area. *J Environ Health Sci*. 2016; 42(3): 224-233.
10. Lee JW, Lee CK, Moon CS, Choi IJ, Lee KJ, Yi SM, et al. Korea National Survey for Environmental Pollutants in the Human Body 2008: heavy metals in the blood or urine of the Korean population. *Int J Hyg Environ Health*. 2012; 215(4): 449-457.
11. ACGIH. Arsenic and Soluble Inorganic Compounds. Cincinnati: ACGIH; 2001.
12. Caldwell KL, Jones RL, Verdon CP, Jarrett JM, Caudill SP, Osterloh JD. Levels of urinary total and speciated arsenic in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2009; 19(1): 59-68.
13. Lee BW, Lee BC, Kim PJ, Yoon HJ. Ecological risk assessment of lead and arsenic by environmental media. *J Environ Health Sci*. 2020; 46(1): 1-10.
14. Muñoz O, Vélez D, Montoro R. Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + (As(V))] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*. 1999; 124(4): 601-607.
15. FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). Survey of Inorganic Arsenic in Seaweed and Seaweed-Containing Products Available in Australia. Canberra: Food Standards Australia New Zealand; 2013.
16. Sloth JJ, Larsen EH, Julshamn K. Survey of inorganic arsenic in marine animals and marine certified reference materials by anion exchange high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(15): 6011-6018.
17. Seo JW, Choi JW, Oh YJ, Hong YS. Biological monitoring of arsenic concentrations according to exposure to arsenic-contaminated ground water. *J Environ Health Sci*. 2020; 46(5): 513-524.
18. Matsumoto-Tanibuchi E, Sugimoto T, Kawaguchi T, Sakakibara N, Yamashita M. Determination of inorganic arsenic in seaweed and seafood by LC-ICP-MS: method validation. *J AOAC Int*. 2019; 102(2): 612-618.
19. Surenbaatar U, Seo JW, Kim BG, Lim HJ, Chang JY, Lee CW, et al. Urinary arsenic species concentrations and related factors among residents living near abandoned metal mines. *J Environ Health Sci*. 2020; 46(6): 655-666.
20. NIST. SRM 2669 - Arsenic Species in Frozen Human Urine. Gaithersburg: NIST; 2016.
21. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug

- Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2018.
22. Hirata S, Toshimitsu H. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 383(3): 454-460.
  23. Cao Y, Duan J, Guo J, Li W, Tao W. Pharmacokinetic properties of arsenic species after oral administration of *Sargassum pallidum* extract in rats using an HPLC-HG-AFS method. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 96: 213-219.
  24. AOAC SMPR. Standard Method Performance Requirements<sup>SM</sup> (SMPRs) for Quantitation of Arsenic Species in Selected Foods and Beverages. Rockville: AOAC SMPR; 2015.
  25. Yang GAO, Xuan CAO, Jing-Jing YU, Lee FSC, Wang XR. Determination of arsenic and its species in dry seafood by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chin J Anal Chem.* 2009; 37(12): 1738-1742.
  26. Moreda-Piñero A, Moreda-Piñero J, Herbelo-Hermelo P, Bermejo-Barrera P, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, et al. Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials. *J Chromatogr A.* 2011; 1218(39): 6970-6980.
  27. Kim MH, Kim J, Noh CH, Choi S, Joo YS, Lee KW. Monitoring arsenic species content in seaweeds produced off the Southern Coast of Korea and its risk assessment. *Environments.* 2020; 7(9): 68.
  28. Ryu KY. Application of HPLC-ICP-MS for arsenic speciation in seaweeds from South Korea [dissertation]. [Gwangju]: Chosun University; 2014
  29. Choi H, Park SK, Kim DS, Kim MH. Determination of 6 arsenic species present in seaweed by solvent extraction, clean-up, and LC-ICP/MS. *Food Sci Biotechnol.* 2011; 20(1): 39-44.
  30. Park ES. An analytical method for the determination of inorganic arsenic by ion-pair reversed-phase chromatography coupled with atomic spectrometry [dissertation]. [Muan]: Mokpo National University; 2016
  31. Korea Institute of Science and Technology. Research of Inorganic Arsenic in Food(II). Seoul: Korea Institute of Science and Technology; 2003.
  32. Chosun University. Development of Analysis Method on Arsenic Chemicals in Sea Food. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety; 2006.
  33. Kwak SS. Analysis of affecting factors and the effects of seafoods ingestion on urinary arsenic concentration [dissertation]. [Asan]: Soonchunhyang University; 2010
  34. Chung Ang University. Exposure Assessment to Arsenic by Total Arsenic and Speciation Analyses in Urine. Cheongju: National Institute of Food and Drug Safety Evaluation; 2013.
  35. ATSDR. Toxicological Profile for Arsenic. Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiledocs/index.html> [accessed 20 August 2021].
  36. Lee JH. The Third National Survey of Hazardous Substances in Biological Samples. Incheon: National Institute of Environmental; 2008.

#### 〈저자정보〉

정승우(대학원생), 이채혁(대학원생), 이종화(교수), 장봉기(교수)