Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(2):119-128. Korean
Published online 2017 June 30. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.2.20

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

HPLC-ICP-MS를 활용한 잡곡의 비소 화학종 및 위해 분석

안재민, 홍경숙, 김성연, 김대중, 이호진, 신희창*

국립농산물품질관리원 시험연구소 안전성분석과

Arsenic Speciation and Risk Assessment of Miscellaneous Cereals by HPLC-ICP-MS

Jae-Min An, Kyong-Suk Hong, Sung-Youn Kim, Dae-Jung Kim, Ho-Jin Lee and Hee-Chang Shin* (Division of Safety Analysis, Experiment & Research Institute, National Agriculture Products Quality Management Service, Gimcheon 39660, Korea)

Received: 16 June 2017 / Revised: 20 June 2017 / Accepted: 23 June 2017

ORCID
JAE MIN AN
http://orcid.org/0000-0002-9964-2438

Hee-Chang Shin
http://orcid.org/0000-0002-0600-4972

Abstract

BACKGROUND: Miscellaneous cereal have been largely consumed in Korea as due to their physiological functions beneficial to human health. The cereals are currently a social concern because they have been found to contain heavy metals. Thus, monitoring heavy metals in the cereals is an important requirement for food safety analysis. In this study, we determined arsenic concentration in the cereals randomly harvested from different markets.

METHODS AND RESULTS: Inorganic arsenic was determined by ICP-MS coupled with HPLC system. The HPLC-ICP-MS analysis was optimized based on the limit of detection and recover test to reach 0.13-1.24 μg/kg and 94.3-102.1%, respectively.

The concentrations of inorganic arsenic equivalent to daily exposure were levels of 19.91 μg/day in mixed grain, 1.07 μg/day in glutinous rice, 0.77 μg/day in black brown rice, 0.13 μg/day in barley and 0.11 μg/day in soybeans.

CONCLUSION: The levels of arsenic in miscellaneous cereals were found lower than the recommended The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) levels, suggesting that the cereals marketed in Korea are not potential concern in risk assessment.

Key words: Arsenic species, Miscellaneous cereals, PTWI, Risk assessment

*Corresponding author: Hee-Chang Shin
Phone: +82-54-429-7770; Fax: +82-54-429-7779;
E-mail: cafestol@korea.kr

서 론

납, 수은, 카드뮴, 비소와 같이 비중이 4 이상인 중금속은 극미량이라도 체내에 일단 축적이 되면 배출이 쉽게 되질 않아 장기간에 걸쳐 부작용을 나타내기 때문에 매우 위험하며, 정부에서도 이러한 중금속들을 규제하기 위하여 별도의 기준을 마련하여 관리하고 있는 실정이다. 비소(arsenic, As)는 주기율표 15족의 질소족 원소의 하나인 준금속(metalloid)으로 원자번호 33, 원자량 74.9 이며 자연계에 분포하는 주요 환경오염물질로서 지각에는 2 mg/kg, 담수 중에는 0.01 mg/L 이하, 해수에는 0.001-0.008 mg/L 정도 존재하는 것으로 보고되고 있다(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1988).

비소는 다양한 화학적 형태를 가지며 여러 금속 비소와 금속 비소화물, 비소 황화물 형태로 존재한다. 자연계에 존재하는 비소 화학종은 크게 2가지로 구분을 하고 있는데 무기비소(inorganic arsenic)로서 산화상태가 다른 arsenite (As(Ⅲ)), arsenate (As(Ⅴ))가 있으며, 유기비소(organic arsenic)로는 DMA(dimethylarsinic acid), MMA (monomethylarsonic acid), AsB (arsenobetaine), AsC (arsenocholine) 등이 있다(Devesa, 2001). Kim 등(2000)에 의하면 비소는 화학종

(arsenic species)의 형태에 따라 As(Ⅲ)>As(Ⅴ)>MMA>DMA>AsC>AsB의 순으로 독성의 차이를 보이고 있으므로 식품 중에 존재하는 비소의 독성과 관련된 영향을 정확히 파악하기 위해서는 비소 화학종별 조사가 반드시 수반되어야 한다. 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 비소 및 비소 화합물은 인체에 발암성 증거가 충분하고 여러 역학조사를 통해 무기비소에 오염된 식수를 장기간 섭취하면 주로 피부암이 유발되며 폐암, 방광암, 신장암 등이 발생했다는 연구결과에 따라 식수 중 무기비소는 Group 1 (carcinogenic to humans)의 발암물질로 규정하여 관리하고 있다(IARC, 2004). JECFA에서는 인체 위해성 여부를 판단하는 독성 수치로, 무기비소를 기준으로 잠정 주간 최대 섭취 허용량(PTWI, Provisional Tolerable Weekly Intake)을 0.015 mg/kg b.w./week로 1988년에 비소 독성 영향평가를 통해 설정하였다(JECFA, 1988). 하지만 2010년 JECFA에서는 무기비소의 다양한 역학 조사를 통한 재평가로 기존의 PTWI값 유지는 적절하지 않다는 판단하에 PTWI를 철회하였고, 현재까지 무기비소의 새로운 PTWI 값을 제시하지 않고 있다(JECFA, 2010; JECFA/72/SC, 2010). 비소의 위험평가에서 인체 노출 주요 경로는 식품의 섭취와 음용수에서 기인한다고 볼 수 있는데, 주로 농산물에 존재하는 비소 함량은 농산물을 생산하기 위해 필요한 토양, 농업용수, 자재(비료) 등에 존재하는 비소의 함량에 의해 결정된다. 이와 관련한 재배환경 중의 비소 농도가 높아지면 농산물의 비소 함량이 함께 증가되는 다양한 연구결과가 보고되고 있다(Munoz *et al.*, 2002). 최근 비소와 관련된 언론보도 및 연구결과 등에 따르면 쌀, 해조류, 사과 음료 등에서 독성이 높은 무기비소가 검출되었다는 사실뿐만 아니라 아시아 지역의 주식인 쌀에 대한 무기비소 최대기준설정이 지난 몇 년간 CODEX에서 화두로 떠올랐다(CODEX, 2012). 이에 우리나라 국민들은 다소비 식품의 안전성에 대한 불안감이 확산되었고, 국제적으로도 식품의 무기비소 오염도 조사 및 저감화를 위한 연구가 활발히 수행되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 최근 식생활 개선과 더불어 건강식의 원료로 수요가 크게 증가하고 있는 잡곡류에 대한 비소의 농도 수준을 확인하고, 비소를 구성하고 있는 화학종들을 분리 및 정량하여 섭취량에 따른 위해 수준을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구의 실험재료는 2015-2016년 국내에서 생산된 잡곡 188점을 주생산지별로 현지 수거하여 실험재료로 사용하였다. 지역별 품목수는 각 지역의 생산, 유통 특성 및 구매 여건 등을 고려하여 수거하였으며, 시료 수거시 생산지 추적이 가능한 농산물 위주로 선택하였다. 시료 수거는 '농산물 등의 안전성조사처리요령(식약처 고시 제2015-52호)'을 참고하여 분석 시료의 대표성 확보를 위해 최소 1-3 kg 이상 수거하여 신속히 운반, 처리 및 보관하였고 품목별 수거한 시료 점수는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Sampling items of miscellaneous cereals in Korean markets

Sample	Total
black rice	14
oat	14
millet	14
mung bean	13
barley	16
sorghum	18
adlay	14
foxtail millet	16
glutinous rice	12
soy bean	16
adzuki bean	16
mixed grain	25
Total	188

시약 및 초자

본 연구를 위해 사용된 모든 시약은 특급에 준하는 시약을 구입하여 사용하였고, 시료의 산 분해를 위해 전자급 70% 질산(Dong woo Fine-Chem, Korea)과 30% 과산화수소(Dong woo Fine-Chem, Korea)를 사용하였다. 실험에 사용된 증류수는 Milli-Q ultrapure water purification system (Millipore Co., Massachusetts, USA)에 의해 18.2 MΩ 수준으로 정제된 3차 증류수를 사용하였다. 실험에 사용된 모든 초자는 폴리에틸렌(P.E.) 재질을 사용하였는데, 5% 질산에 24시간 이상 침지한 후 3차 증류수로 깨끗하게 세척 및 건조한 후 사용하였다. 총비소 정량을 위해 비소 표준원액 1,000 mg/L (Merck, Germany)을 5% 질산을 이용하여 희석한 후 필요한 농도로 조제하여 사용하였으며, 회수율 및 정확도 등의 확인을 위한 인증표준물질(CRM, Certified Reference Materials)로 National Institute of Standards and Technology (NIST) 1568b (Rice Flour, USA)와 NMIJ 7503-a (Rice Flour, Japan)를 사용하였다. 비소 화학종 분리에 사용된 표준물질은 arsenobetaine (Fluka, Switzerland), dimethylarsinic acid (Chem Service, USA), disodium methyl arsenate (Chem Service, USA), arsenite (High-Purity Standards, USA), arsenate (High-Purity Standards, USA)를 각각 사용하였다. 비소 화학종에 대하여 1,000 mg/L stock solution, 검량선 작성을 위한 혼합품 10 mg/L는 1% 질산을 매질로 working solution으로 조제하여 사용하였고, 매 분석시마다 standard solution을 조제하여 분석에 사용하였다. 비소 화학종 분리를 위하여 HPLC에 사용된 이동상은 ammonium carbonate(Fluka, Switzerland), ammonium phosphate(Fluka, Switzerland)를 필요한 농도로 조제하여 사용하였다. 비소 화학종 추출을 위한 추출용매로 추출과정에

Table 2. Operating condition of microwave instrument

Step	Power (Watt)	Time[a] (min)	Temp[b] (℃)	Hold[c] (min)
1	1600	5:00	90	10:00
2	1600	5:00	150	10:00
3	1600	5:00	190	30:00

[a]Ramping time, [b]Target temperature, [c]Stay time in target temperature

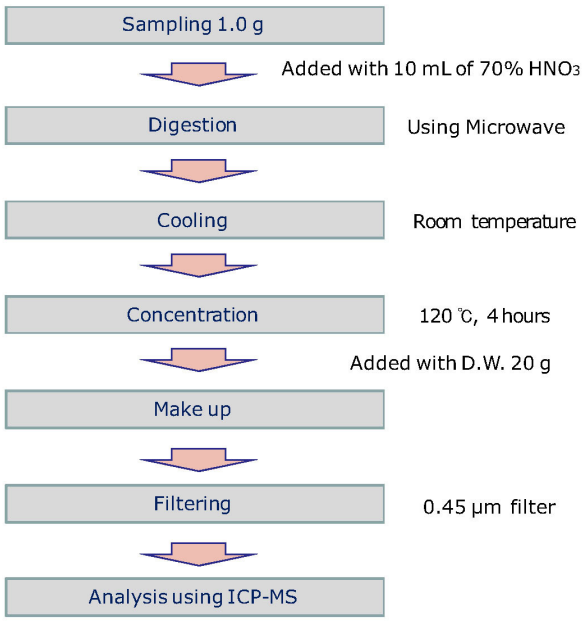

Fig. 1. Flow chart for total arsenic analysis.

서 비소 화학종 사이에 이동이 서로 없고 효율이 가장 좋은 1% 질산을 사용하였다.

시료의 전처리

수거한 시료의 준비는 「식품공전 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1. 중금속 시험 7.1.1. 시료 채취 원칙」에 준하여 가식부를 시험부위로 하였으며, 「농산물 중 중금속 검사를 위한 검체 손질 실무해설서(식품의약품안전처, 2014)」를 참고하여 검체를 손질하여 사용하였다. 시료는 균질기(Hadde VCM-41, Sweden)로 200 g 이상 균질화하여 분석을 위한 시료로 사용하였고, 사용 후 남은 시료는 폴리에틸렌 용기에 담아 식별표시를 한 다음 1개월간 냉동 보관 후 폐기 하였다.

ICP-MS를 이용한 총비소 분석

시료 1.0 g을 정확히 취하여 microwave 분해용기(vessel)에 넣고 70% 질산 10 mL를 첨가한 후 분해용기를 heating block 장비(ED 16, LabTech, USA)에 넣고 85℃에서 30분간 예비분해를 시켰다. 예비분해 된 시료에 과산화수소 1 mL를 첨가한 후 microwave digestion system으로 5분간 90℃까지 상승 시킨 후 10분간 유지하였고, 다시 5분간 150℃까지 상승 후 10분간 유지한 다음, 마지막으로 5분간 190℃까지 상승 시킨 후 30분간 유지하여 유기물을 완전히 분해하였다(Table 2). 기기 작동이 끝난 다음 상온까지 충분히 냉각 시킨 후 다시 heating block 장비를 이용하여 120℃에서 4시간 동안 분해액이 1-2 mL가 될 때까지 농축시킨 후 잔류물을 희석배수가 20배가 되도록 3차 증류수로 정용한 다음 0.45 μm 필터로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1). 원자분광분석용 비소 표준원액(Merck, Germany) 1,000 mg/L를 5% 질산으로 희석하여 1.0 mg/kg working solution을 조제한 후 추가로 희석하여 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 μg/kg이 되도록 검량곡선 작성용 표준용액을 조제하였다. 과거 무기분석에는 주로 원자흡광광도계를 이용하여 분석을 하였으나 각 원소마다 개별 광원을 사용하기 때문에 매번 분석시 필요한 램프로 교체하여야 하는 불편함과 기기의 높은 검출한계로 인한 극미량 분석에 다소 어려움이 있었다(Wang *et al*, 1991). 최근에는 이를 보완한 낮은 기기검출한계와 동시에 다성분 분석이 가능하여 분석 시간을 단축시킨 유도결합플라즈마질량분석기(Inductiely Coupled Plasma-Mass Spectrometer, ICP/MS)를 주로 사용하고 있는데, 본 연구에서도 ICP-MS(ELAN DRC, PerkinElemer, USA) DRC mode(Dynamic reaction gas cell)로 총비소를 정량하였으며, 기기분석 조건은 Table 3과 같다.

Table 3. ICP-MS Condition for total arsenic analysis

Parameter	Operating conditions
RF Power	1,300 W
Plasma gas flow	15.0 L/min
Nebulizer gas flow	0.91 L/min
Auxillary gas flow	1.45 L/min
Lens voltage	6.50 V
Ion monitored	As m/z 75, DRC mode

HPLC-ICP-MS를 이용한 비소 화학종 분석

비소 화학종 분리 및 정량을 위하여 HPLC로 화학종을 선택적으로 분리하고 검출기역할을 하는 ICP-MS를 결합한 형태인 HPLC-ICP-MS를 이용하여 비소 화학종을 분리 분석하였다. 비소 화학종의 추출을 위한 용매 선정은 추출 과정 중 서로 화학종간의 변환이 일어나지 않아야 하므로 주로 사용되는 증류수, 5 mM 말론산, 1% 질산을 사용하여 추출효율을 서로 비교하여 보았다(Choi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Rintala *et al.*, 2014). Ronkart 등(2007)의 연구결과

Table 4. HPLC-ICP-MS condition for arsenic species analysis

Instrument parameters	
HPLC	
As speciation	AsB[a], As(Ⅲ), DMA, MMA, As(Ⅴ)
Column	Anion exchange, Hamilton PRP X-100(4.1×250 mm, 10 μm)
Mobile phase A	12 mM ammonium carbonate
Mobile phase B	20 mM ammonium phosphate
Gradient profile	Run 1: 1 min / A 100%, Run 2: 7 min / B 100%
Flow rate	2.0 mL/min
Injection volume	50 μL
ICP/MS	
RF Power	1,300 W
Nebulizer gas flow	0.95 L/min
Auxillary gas flow	1.14 L/min
Plasma gas flow	16.0 L/min
Lens voltage	7.2 V
DRC mode	AsO 91, gas flow 0.5 mL/min

[a]AsB: Arsenobetaine, As(Ⅲ): Arsenite, DMA: Dimethylarsonic acid, MMA: Monomethylarsinic acid, As(Ⅴ): Arsenate

에 따르면 비소 화학종은 pH 8 이상인 알칼리 상태에서 음이온 형태로 존재하는 특성이 있어 분리용 컬럼으로 anion exchange column을 사용하였으며, 이동상으로는 12 mM ammonium carbonate, 20 mM ammonium phosphate를 gradient 조건으로 분석에 사용하였고 Table 4의 조건으로 분석하였다. 시료 1.0 g을 정확히 칭량하여 centrifuge tube 용기에 넣고 1% 질산 10 mL를 첨가한 후 5분 동안 충분히 교반시킨 다음 85℃ 수욕상에서 90분간 추출하였다. 추출이 끝난 후 상온까지 충분히 냉각시킨 다음 원심분리기(TOMY MV-307, Hanil, Korea)로 10분간 5,000 G에서 원심분리 후 상등액을 취하여 0.45 μm 필터로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 2). 비소 5종 표준원액 1,000 mg/L를 1% 질산을 이용하여 혼합품 10.0 mg/kg stock solution으로 조제 후 추가로 희석하여 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg/kg이 되도록 검량곡선 작성용 표준용액을 조제하였다.

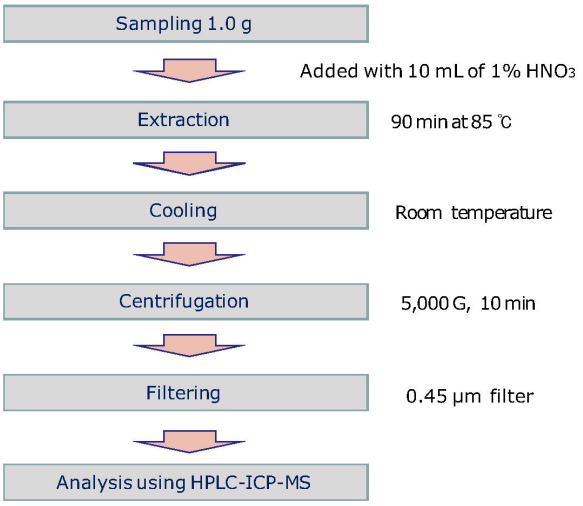

Fig. 2. Flow chart for arsenic species analysis.

시험법 검증

검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 반응의 표준편차와 검량곡선의 기울기에 근거하여 산출하였는데, LOQ 수준의 농도와 2 LOQ 수준의 표준용액을 7회 반복 측정하여 평균값으로 검량 y를 작성하여 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$LOD = 3.14\ \sigma/S$$
$$LOQ = 10\ \sigma/S$$

(σ : 반응의 표준편차, S : 검량선의 기울기)

직선성 확인을 위해 총비소 및 비소 화학종 5종에 대한 각각의 원소들에 대해 검량곡선 작성용 표준용액을 조제하여 분석기기의 상관계수로 확인하였다. 회수율 시험은 미국 표준기술연구소(NIST)의 인증표준물질(Certified Reference Materials)을 이용하여 분석시료와 동일한 조건으로 3회 반복하여 측정하였고, 정밀성 확인을 위하여 분석결과의 C.V. (Coefficient of Variation, %)를 확인하였다.

위해도 평가

잡곡류 12품목 188점에 대한 위해도 평가는 품목별 무기비소의 평균 농도를 산출한 후 식품 섭취량 및 평균 체중은 질병관리본부에서 발간한 '국민건강영양조사 5기' 자료를 활

Table 5. Extraction efficiency by extract solution

Extract \ Species	AsB (%)	As (Ⅲ)(%)	DMA (%)	MMA (%)	As (Ⅴ)(%)
Distilled water	39.6±3.7	43.8±6.5	68.2±7.1	63.8±8.8	52.7±8.3
5 mM malonic acid	77.1±8.0	76.6±8.2	82.5±4.9	79.6±6.8	93.4±10.1
1% nitric acid	97.8±8.2	106.4±6.9	95.6±10.1	97.1±8.4	102.9±6.5

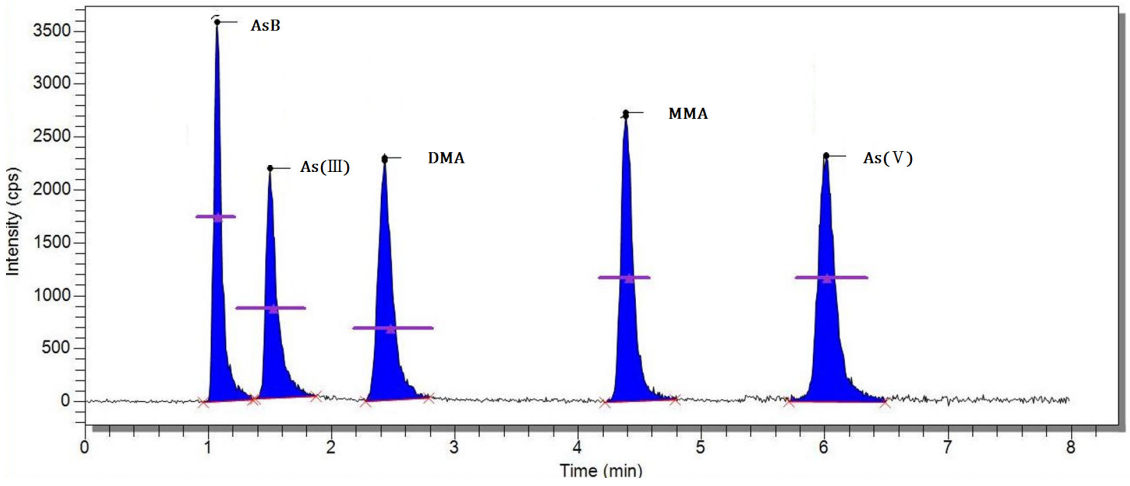

Fig. 3. HPLC-ICP-MS chromatogram for a standard mixture of 5 arsenic species. [AsB: Arsenobetaine, As(Ⅲ): Arsenite, DMA: Dimethylarsonic acid, MMA: Monomethylarsinic acid, As(Ⅴ): Arsenate]

용(Korea Centers for Disease Control & Prevention, 2012)하여 평가하였다. 원시자료로부터 식품별 섭취량을 얻기 위해 통계프로그램인 SPSS(ver 14.0, SPSS Inc., USA)를 사용하여 3차 식품코드에 따라 식품섭취량을 산출하였으며, 평균 체중은 55 kg을 사용하였다. 품목별 섭취를 통한 무기비소 노출량을 산출한 후 JECFA에서 설정한 잠정 주간 섭취허용량(Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI) 대비 위해도를 평가하였다. 현재 무기비소의 PTWI는 2010년에 15 μg/kg b.w./week가 철회된 뒤로 현재까지 재설정되지 않아 본 연구에서는 기존 PTWI값을 사용하여 위해평가를 수행하였다. 또한, 무기비소의 노출량 평가는 결정론적 접근방식(determination approach)에 따라 수행하였으며 품목별로 무기비소 평균 농도만을 적용하였다.

$$\text{위해도(\%)} = \frac{\text{대상 식품 섭취로 인한 무기비소 노출량 (mg/kg b.w./week)}}{\text{JECFA의 무기비소 인체 노출허용량 (mg/kg b.w./week)}} \times 100$$

결과 및 고찰

비소 화학종 분리 시험법 확립

본 연구에서는 무기비소 2종과 유기비소 3종에 대한 비소 화학종 분리 분석법 확립을 시도하였다. Huang 등(2010)에 의하면 추출용매로 염산, 질산 등을 사용하였을 때 추출효율이 90% 이상으로 양호하였다고 보고되었으나, 염산은 ICP-MS 분석시 방해물질인 ArCl을 형성하고 tetramethyl ammonium hydroxide나 phosphoric acid를 이용한 추출시 swelling을 형성하여 여과가 잘 되질 않아 0.28 M 질산을 가장 적절한 추출 용매로 선정하였다. 본 연구에서도 다양한 문헌에서 소개되고 있는 추출용매인 증류수, 5 mM 말론산, 1% 질산을 사용하여 추출효율을 비교해 본 결과 1% 질산에서 비소 화학종 모두 95% 이상의 좋은 회수율을 보여 최종 추출 용매로 선택하였다(Table 5).

비소 화학종이 적절한 pH에서 전하를 띄는 특성을 고려하여 화학종 분리를 위해 HPLC를 활용하였으며, 비소 화학종이 주로 음이온 형태로 존재하므로 Hamilton PRP-X100 음이온 교환 컬럼(anion exchange column)을 선택하였다. Raber 등(2012)의 연구 결과에 의하면 HPLC 이동상으로 sodium 계열을 사용하면 컬럼에 sodium염이 침착되어 분석의 재현성 및 정확도를 저하시키는 원인으로 작용하기 때문에 본 연구에서 제외하였고, 추출용매로 사용되는 malonic acid와 ammonium 계열의 이동상을 이용하여 분리조건을 설정하였다. 실험결과 5 mM 말론산을 이용하여 isocratic 조건으로 비소 화학종을 분석한 결과 arsenobetaine (AsB) peak와 arsenite (As(Ⅲ)) peak의 분리가 용이하지 않아 유기비소(AsB) 함량이 높은 시료의 경우에는 정량 분석이 불가하다고 판단되어, 비소 화학종이 모두 분리되는 이동상 조건인 12 mM ammonium carbonate, 20 mM ammonium

Table 6. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)

Item \ Species	Total As (μg/kg)	AsB (μg/kg)	As (Ⅲ) (μg/kg)	DMA (μg/kg)	MMA (μg/kg)	As (Ⅴ) (μg/kg)
LOD	0.13	0.87	0.73	0.76	0.98	1.24
LOQ	0.43	2.87	2.41	2.51	3.23	4.09
R^2	1.0000	0.9984	0.9994	0.9991	0.9999	0.9986

Table 7. Recovery and Coefficient of varidation

Item \ Species	Total As	AsB	As (Ⅲ)	DMA	MMA	As (Ⅴ)
Recovery (%)	98.6±0.7	94.5±1.3	102.1±1.8	98.4±2.3	94.3±2.0	96.2±2.4
C.V. (%)	1.35	2.11	1.86	1.47	0.98	3.44

Table 8. Total arsenic and inorganic arsenic concentration of each agricultural products

Sample	N[a)]	Concentration (mg/kg)	
		Total Arsenic	Inorganic Arsenic
black rice	14	0.241±0.137[b)] (0.029-0.449)[c)]	0.136±0.075 (0.017-0.278)
oat	14	0.031±0.019 (0.009-0.078)	0.017±0.011 (0.004-0.044)
millet	14	0.022±0.011 (0.008-0.044)	0.009±0.009 (N.D.-0.024)
mung bean	13	0.037±0.023 (0.011-0.084)	0.018±0.014 (N.D.-0.041)
barley	16	0.037±0.014 (0.007-0.063)	0.021±0.011 (N.D.-0.042)
sorghum	18	0.038±0.025 (0.007-0.104)	0.021±0.017 (N.D.-0.058)
adlay	14	0.033±0.013 (0.008-0.064)	0.019±0.009 (N.D.-0.041)
foxtail millet	16	0.045±0.019 (0.017-0.080)	0.026±0.014 (N.D.-0.051)
glutinous rice	12	0.267±0.090 (0.126-0.442)	0.149±0.056 (0.054-0.254)
soy bean	16	0.044±0.025 (0.014-0.109)	0.024±0.015 (N.D.-0.053)
adzuki bean	16	0.028±0.011 (0.014-0.053)	0.014±0.008 (N.D.-0.028)
mixed grain	25	0.183±0.045 (0.086-0.262)	0.110±0.035 (0.041-0.162)
Total	188	0.085±0.098 (0.007-0.449)	0.048±0.057 (N.D.-0.278)

N.D. : not detected
[a)]N, Number of sample
[b)]Mean value±SD (standard of deviation)
[c)]Concentration range (minimum–maximium)

phosphate를 이용하여 gradient 조건을 설정하였다(Fig. 3).

시험법 검증

총비소 및 비소 화학종에 대한 검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 LOQ 수준의 농도와 LOQ 2배 수준의 표준용액을 7회 반복 측정한 평균값으로 표준편차와 기울기를 이용하여 산출하였다. 총비소의 직선성은 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 μg/kg의 농도에서 비소 화학종의 직선성은 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg/kg의 농도에서 확인하였는데, R^2의 값은 각 원소 모두 0.998 이상을 만족하여 우수한 직선성을 확인하였다(Table 6). 정량한계는 총비소가 0.43 μg/kg, 비소 화학종에서는 2.41-4.09 μg/kg로 낮은 정량한계를 보여 저농도의 시료도 검출 가능함을 확인하였으며, 무기비소의 농도는 arsenite(As(Ⅲ))와 arsenate(As(Ⅴ))의 합으로 계산하였다.

총비소 및 비소 화학종에 대한 정밀성 및 회수율 확인을 위하여 인증표준물질(NIST 1568b, USA ; NMIJ 7503-a, Japan)을 사용하였는데, AsB와 MMA는 별도의 인증값이 없어 50.0 μg/L를 첨가하여 3반복 측정하였다. 각 비소 화학종에 대한 평균 회수율은 94.3-102.1%, C.V.% (Coefficient of Varidation)는 모두 5% 미만으로 양호하게 나타나 AOAC (AOAC International, 2002)와 U.S. FDA의 중금속 시험법 기준(Patrick *et al.*, 2015)을 만족하였다(Table 7).

잡곡 중의 총비소 농도 분석

잡곡 중의 총비소 농도는 ICP-MS를 이용하여 분석하였으며, 검정현미 등 12품목 188점에 대한 총비소 평균 농도는 0.085±0.098 mg/kg의 농도를 보였으며, 품목별로는 찹쌀 0.267±0.090 mg/kg, 검정현미 0.241±0.137 mg/kg, 혼합곡 0.183±0.045 mg/kg의 순으로 높은 농도를 보였으며, 기장쌀이 0.022±0.011 mg/kg으로 가장 낮은 총비소 농도를 보였다(Table 8, Fig. 4). Choi 등(2010)의 식품 중 비소 함량 수준과 비교해 보았을 때 대체적으로 비슷하거나 상대적으로 조금 높은 농도 수준으로 확인되었다. 품목별로 0.01 mg/kg보다 낮은 농도로 검출된 시료는 기장쌀 등 8품목 8

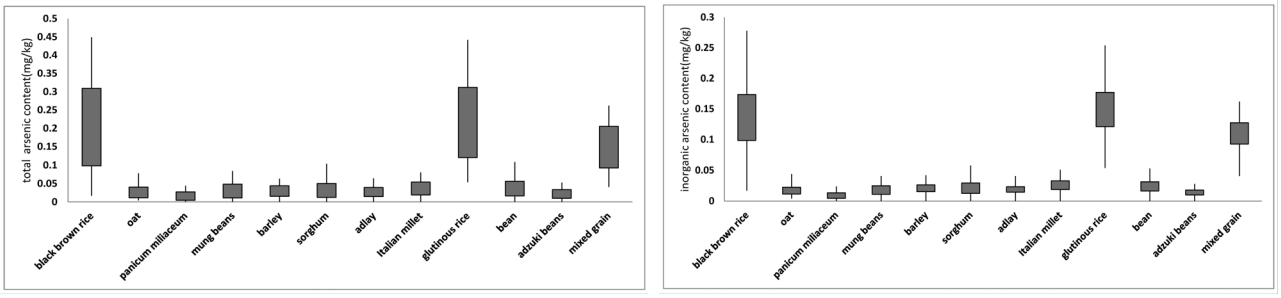

Fig. 4. Histogram of total arsenic and inorganic arsenic.

Table 9. Daily mean dietary exposure and risk of inorganic arsenic

Sample	Inorganic As content (mg/kg)	Food intake (g/day)	Inorganic As exposure		% PTWI
			μg/day	μg/kg b.w./day	
black rice	0.136	5.63	7.66×10^{-1}	1.39×10^{-2}	0.65
oat	0.017	0.01	2.00×10^{-4}	3.09×10^{-6}	-
millet	0.009	0.27	2.40×10^{-3}	4.42×10^{-5}	-
mung bean	0.018	0.10	1.80×10^{-3}	3.27×10^{-5}	-
barley	0.021	6.20	1.30×10^{-1}	2.37×10^{-3}	0.11
sorghum	0.021	0.42	8.80×10^{-3}	1.60×10^{-4}	0.01
adlay	0.019	0.15	2.90×10^{-3}	5.18×10^{-5}	-
foxtail millet	0.026	1.00	2.60×10^{-2}	4.73×10^{-1}	0.02
glutinous rice	0.149	7.17	1.07×10^{0}	1.94×10^{-2}	0.91
soy bean	0.024	4.61	1.11×10^{-1}	2.01×10^{-3}	0.09
adzuki bean	0.014	0.47	6.60×10^{-3}	1.19×10^{-4}	0.01
mixed grain	0.110	181.0[a)]	19.90×10^{0}	3.62×10^{-1}	16.89

[a)]Food intake of mixed grain was based on polished rice

점이었고, 시료의 전반적인 농도 범위는 0.01-0.05 mg/kg 수준이었으며, 0.3 mg/kg 이상 검출된 품목은 2품목 10점으로 검정현미와 찹쌀로 확인되었다.

잡곡 중의 무기비소 농도 분석

잡곡 중의 무기비소는 HPLC-ICP/MS를 이용하여 분석하였으며, 검정현미 등 12품목 188점에 대한 무기비소 평균 농도는 0.048±0.057 mg/kg의 농도를 보였으며, 총비소 대비 무기비소가 차지하고 있는 비율은 56.5%로 확인되었다. 품목별로는 찹쌀 0.149±0.056 mg/kg, 검정현미 0.136±0.075 mg/kg, 혼합곡 0.110±0.035 mg/kg의 순으로 총비소와 동일한 순서로 나타났으며, 기장쌀에서 0.009±0.009 mg/kg으로 가장 낮은 무기비소 농도를 확인하였다(Table 8, Fig. 4). Kim 등(2013)의 백미 중 무기비소 평균 농도인 0.06-0.08 mg/kg과 비교해 보았을 때 대체적으로 유사한 농도 수준을 보였으며, 총비소 대비 무기비소가 차지하는 비율 또한 53-88% 범주에 있음을 확인하였다.

총비소 농도와 무기비소 농도와의 상관분석

총비소 농도 대비 무기비소 농도가 차지하는 비율은 비소 농도 조사 결과를 활용하여 산출하였는데, 무기비소의 농도 비율은 총비소 농도의 56.5%로 나타났다. 품목별로는 혼합곡이 60.1%로 가장 높은 비율을 보였고 기장쌀이 40.9%로 가장 낮은 비율을 보였다. 본 연구에서 분석된 잡곡 12품목 모두에서 총비소 농도와 무기비소 농도 사이에서 강한 양의 상관성(r>0.57)을 나타내었고, 기술적인 통계처리 방법으로 총비소 함량으로 무기비소 함량의 추정이 가능함을 확인하였다(Fig. 5).

잡곡류 섭취로 인한 무기비소 위해도 평가

본 연구에서 사용된 잡곡 12품목 188점의 시료에 대하여 국민건강영양조사 자료(2012)를 근거로 국민들이 일상적인 수준에서 잡곡을 섭취할 경우 무기비소에 노출되는 수준을 확인하였다. 무기비소 위해 정도는 품목별 무기비소 평균 검출농도에 식품 섭취량을 고려하여 국민 평균 체중(55 kg)으로 산출하였는데, 품목별 무기비소 노출량은 혼합곡에서

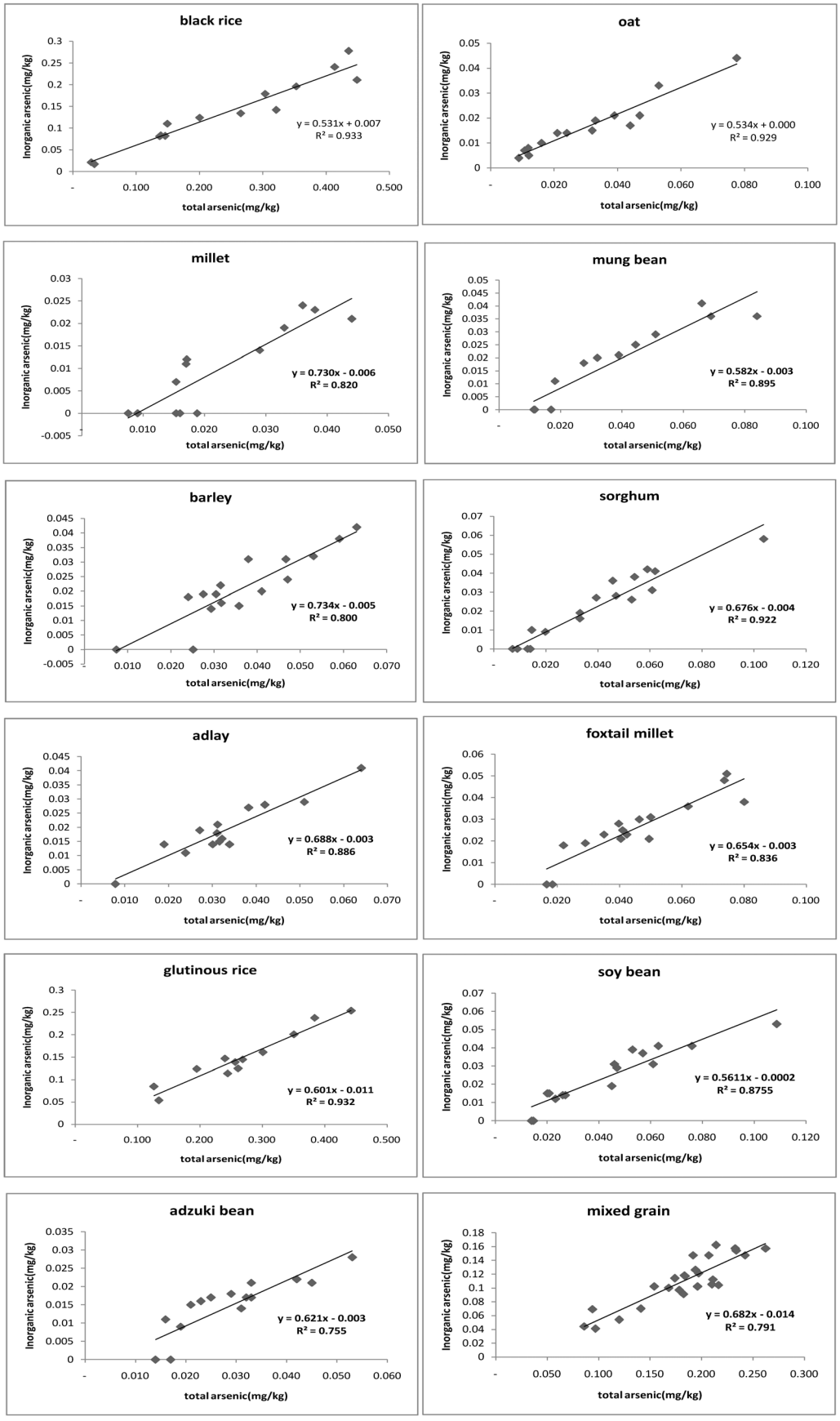

Fig. 5. Histogram of total arsenic and inorganic arsenic.

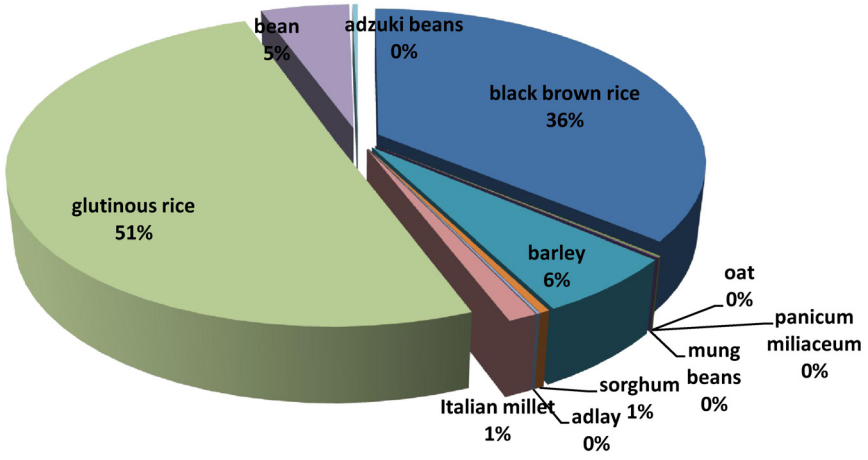

Fig. 6. Contribution rate of inorganic arsenic by agricultural products.

19.91 μg/day로 가장 높은 노출수준을 보였고, 찹쌀 1.07 μg/day, 검정현미 0.77 μg/day, 보리 0.13 μg/day, 콩 0.11 μg/day 순이었다. 품목별로 혼합곡이 PTWI 대비 16.89%로 가장 높은 수준이었고, 찹쌀 0.91%, 검정현미 0.65%, 보리 0.11%, 콩 0.09%의 순으로 위해 정도가 높은 것으로 나타났다(Table 9). 품목별 무기비소 노출 기여율은 국민건강영양조사 섭취량 자료가 없는 혼합곡은 제외하여 평가하였는데, 찹쌀 51%, 검정현미 36%, 보리 6%, 콩 5%의 순으로 노출에 기여하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 또한, 잡곡 12품목을 모두 일시에 섭취하였다고 가정하였을 경우 PTWI 대비 18.69% 수준으로 잡곡류에 대한 무기비소의 인체 위해정도는 안전한 수준인 것으로 평가되었다.

요 약

본 연구는 최근 식생활 개선과 더불어 건강식의 원료로 수요가 크게 증가하고 있는 국내 유통 잡곡류에 대한 비소의 농도 수준을 확인하고, 비소를 구성하고 있는 화학종들을 분리 및 정량하여 섭취량에 따른 위해 수준을 확인하고자 하였다.

잡곡 12품목 188점을 현지 수거 후 분석에 활용하였는데, 총비소 분석은 일정량의 시료에 질산과 microwave를 이용하여 전처리한 후 ICP-MS를 이용하여 분석을 하였다. 비소 화학종 분리 및 정량을 위하여 HPLC로 화학종을 선택적으로 분리하고 검출기 역할을 하는 ICP-MS를 결합한 형태인 HPLC-ICP-MS를 이용하여 비소 화학종을 분리 분석하였다. 추출 용매로는 증류수, 말론산, 질산을 이용하여 추출 효율을 비교한 결과 1% 질산이 비소 화학종 모두에서 양호한 추출효율을 보여 최종적으로 1% 질산을 추출용매로 선택하였고, 비소 화학종이 적절한 pH에서 전하를 띄는 특성을 고려하여 이동상으로는 ammonium carbonate, ammonium phosphate를 gradient 조건으로 분석하였다.

분석법 검증을 위하여 검출한계, 정량한계, 직선성 및 회수율 모두 AOAC에서 권장하는 기준을 만족하여 총비소 및 비소 화학종 분리 분석 결과에 대한 신뢰성을 확인하였다. 품목별 총비소 평균 농도는 찹쌀 0.267±0.090 mg/kg, 검정현미 0.241±0.137 mg/kg, 혼합곡 0.183±0.045 mg/kg의 순으로 나타났고, 무기비소 평균 농도는 찹쌀 0.149±0.056 mg/kg, 검정현미 0.136±0.075 mg/kg, 혼합곡 0.110±0.035 mg/kg의 순으로 총비소 결과값과 동일한 순서를 보였다. 총비소와 무기비소 농도의 상관 분석결과 총비소 농도가 높으면 무기비소 농도 또한 높은 농도를 보여 강한 양의 상관관계가 있음을 확인하였다. 위해 평가는 국민건강영양조사 자료(2012)를 근거로 잡곡에 대한 무기비소 위해 정도를 평가하였는데 품목별 무기비소 노출량은 혼합곡에서 19.91 μg/day로 가장 높은 노출량을 보였고, 찹쌀 1.07 μg/day, 검정현미 0.77 μg/day, 보리 0.13 μg/day, 콩 0.11 μg/day 순으로 나타났다. 품목별로는 혼합곡이 PTWI 대비 16.89%로 가장 높은 수준을 보였고, 찹쌀 0.91%, 검정현미 0.65%, 보리 0.11%, 콩 0.09%의 순으로 나타났다. 노출량에 따른 위해 수준은 잡곡 12품목 모두 일시에 섭취한다고 가정할 경우 PTWI 대비 18.69% 수준으로, 잡곡류에 대한 무기비소의 인체 노출 및 위해수준은 안전한 것으로 평가되었다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of "Research & Technology Development (Project year, 2016)", National Agricultural Products Quality Management Service, Republic of Korea.

References

AOAC. (2002). AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, AOAC, 1-38.

Horwitz, W. (2002). AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. AOAC International,

Gaithersburg, MD, USA, 1219.

Chen, H. L., Lee, C. C., Huang, W. J., Huang, H. T., Wu, Y. C., Hsu, Y. C., & Kao, Y. T. (2016). Arsenic speciation in rice and risk assessment of inorganic arsenic in Taiwan population. Environmental Science and Pollution Research International, 23(5), 4481-4488.

Choi, H., Park, S. K., Kim, D. S., & Kim, M. H. (2010). Risk assessment of arsenic in agricultural products. Korean Journal of Environmental Agriculture, 29(3), 266-272.

Choi, J. Y., Khan, N., Nho, E. Y., Choi, H., Park, K. S., Cho, M. J., Youn, H. J., & Kim, K. S. (2016). Speciation of arsenic in rice by high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. Analytical Letters, 49(12), 1926-1937.

Devesa, V., Martinez, A., Suner, M. A., Benito, V., Vélez, D., & Montoro, R. (2001). Kinetic study of transformations of arsenic species during heat treatment .Journal of agricultural and food chemistry, 49(5), 2267-2271.

Huang, J. H., Ilgen, G., & Fecher, P. (2010). Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 25(6), 800-802.

International Agency for Research on Cancer (IARC), (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic,(Vol. 84), International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Kim, S. T., Lim, Y. R., Park, K. S., & Chung, J. H. (2000). Simultaneuous determination of As (III) and As (V) in disused mine tailing samples by hydride generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Analytical Science and Technology, 13(2), 189-193.

Kim, J. Y., Kim, W. I., Kunhikrishnan, A., Kang, D. W., Kim, D, H., Lee, Y. J., Kim, Y. J., Kim, C. T. (2013). Determination of arsenic species in rice grains using HPLC-ICP-MS. Food Science and Biotechnology, 22(6), 1509-1513.

Munoz, O., Diaz, O. P., Leyton, I., Nunez, N., Devesa, V., Suner, M. A., Velez, D., & Montoro, R. (2002). Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(3), 642-647.

Patrick, J. G., William, R. M., &John, C. (2015). FDA elemental analysis manual: section 4.7 Inductively coupled plasma-mass spectrometric determination of arsenic, cadmium, chromium, lead, mercury, and other elements in food using microwave assisted digestion. US Food and Drug Administration, Washington DC, USA, Available from: http://www. fda. gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM377005. pdf, 14.

Raber, G., Stock, N., Hanel, P., Murko, M., Navratilova, J., & Francesconi, K. A. (2012). An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: application to rice, wheat and tuna fish. Food chemistry, 134(1), 524-532.

Ronkart, S. N., Laurent, V., Carbonnelle, P., Mabon, N., Copin, A., & Barthélemy, J. P. (2007). Speciation of five arsenic species (arsenite, arsenate, MMAA V, DMAA V and AsBet) in different kind of water by HPLC-ICP-MS. Chemosphere, 66(4), 738-745.

Rintala, E. M., Ekholm, P., Koivisto, P., Peltonen, K., & Venalainen, E. R. (2014). The intake of inorganic arsenic from long grain rice and rice-based baby food in Finland–Low safety margin warrants follow up. Food chemistry, 150, 199-205.

Wang, Y., Lu, C., Xiao, Z., Wang, G., Kuan, S. S., & Rigsby, E. J. (1991). Determination of aluminum in foods by stabilized temperature platform graphite furnace atomic absorption spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(4), 724-726.