

Research Article



CrossMark

Open Access

HPLC-ICP-MS를 이용한 쌀의 비소 위해도 평가

안재민*, 박대한, 황향란, 장순영, 권미정, 김인숙, 김익로, 이해민, 임현지, 박재옥, 이광희

국립농산물품질관리원 경북지원 품질관리과

Risk Analysis of Arsenic in Rice Using by HPLC-ICP-MS

Jae-Min An*, Dae-Han Park, Hyang-Ran Hwang, Soon-Young Chang, Mi-Jung Kwon, In-Sook Kim, Ik-Ro Kim, Hye-Min Lee, Hyun-Ji Lim, Jae-Ok Park and Gwang-Hee Lee (Gyeongbuk Provincial Office, National Agriculture Products Quality Management Service, Daegu 41423, Korea)

Received: 19 September 2018/ Revised: 5 November 2018/ Accepted: 8 November 2018

Copyright © 2018 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

ORCID

Jae-Min An

<http://orcid.org/0000-0002-9964-2438>

Abstract

BACKGROUND: Rice is one of the main sources for inorganic arsenic among the consumed crops in the world population's diet. Arsenic is classified into Group 1 as it is carcinogenic for humans, according to the IARC. This study was carried out to assess dietary exposure risk of inorganic arsenic in husked rice and polished rice to the Korean population health.

METHODS AND RESULTS: Total arsenic was determined using microwave device and ICP-MS. Inorganic arsenic was determined by ICP-MS coupled with HPLC system. The HPLC-ICP-MS analysis was optimized based on the limit of detection, limit of quantitation, and recovery ratio to be 0.73-1.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2.41-4.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and 96.5-98.9%, respectively. The inorganic arsenic concentrations of daily exposure (included in body weight) were 4.97×10^{-3} (≥ 20 years old) - 1.36×10^{-2} (≤ 2 years old) $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day (PTWI 0.23-0.63%) by the husked rice, and 1.39×10^{-1} (≥ 20 years old) - 3.21×10^{-1} (≤ 2 years old) $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day (PTWI 6.47-15.00%) by the polished rice.

CONCLUSION: The levels of overall exposure to total and inorganic arsenic by the husked and polished rice were far

lower than the recommended levels of The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), indicating of little possibility of risk.

Key words: HPLC-ICP-MS, Inorganic arsenic, Rice, Risk assessment

서론

중금속은 비중이 4.0 이상인 금속원소로서 납, 수은, 카드뮴, 비소 등과 같이 주기율표상의 아래쪽에 위치하며 식품이나 음용수 등을 통해 체내에 한 번 축적이 되면 배출이 잘 되지 않아 각종 질병을 유발시키므로 정부에서 제도적으로 별도의 기준을 마련하여 관리하고 있다. 이중에 비소(arsenic, As)는 금속과 비금속의 중간적인 성질을 보이는 준금속(metalloid)으로 다른 금속류와 마찬가지로 다양한 화학적 형태를 가지고 있으며 여러 금속 비소와 금속 비소화물, 비소 황화물 형태로 자연계에 존재한다(An *et al.*, 2017). 비소 화학종(chemical species)은 크게 무기비소(inorganic arsenic)와 유기비소(organic arsenic)로 구분을 하는데, 무기비소는 산화형태가 다른 3가 비소(arsenic trioxide, As(III))와 5가 비소(arsenic pentoxide, As(V))가 있으며, 유기비소로는 arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC), monomethylarsinic acid (MMA), diethylarsinic acid(DMA) 등이 있다. Kim 등(2000)에 의하면 비소를 구성하고 있는 화학종의 형태에 따라 As(III) > As(V) > MMA > DMA > AsC > AsB의 순으로 독성의 차이가 있어 식품 중에 존재하는 비소의 독성을 정확히 파악하기 위해서는 비소 화학종별 조사가 이

*Corresponding author: Jae-Min An

Phone: +82-53-320-5391; Fax: +82-53-327-0588;

E-mail: ahjm@korea.kr

루어져야 한다고 밝혔다. 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 비소 및 비소 화합물은 인체에 발암성 증거가 충분하고 다양한 역학조사를 통해 비소에 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). 국제식량농업기구/세계보건기구 합동식품첨가물전문가위원회(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)에서는 인체 위해성 여부를 판단하는 독성 수치로, 무기비소를 기준으로 잠정 주간 최대 섭취 허용량(PTWI, Provisional Tolerable Weekly Intake)을 15 $\mu\text{g}/\text{kg b.w./week}$ 로 1988년에 비소 독성 영향평가를 통해 설정하였다(JECFA, 2010). 그러나, 2010년 JECFA에서는 무기비소의 다양한 역학 조사를 통해 산출된 무기비소의 BMDL_{0.5} (Benchmark dose lower confidence limit, 폐암 발생가능성 0.5% 증가)이 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ 이고 기존 PTWI 15 $\mu\text{g}/\text{kg b.w./week}$ 가 BMDL_{0.5} 범위내에 존재하기 때문에 기존 PTWI는 더 이상 적절하지 않다고 판단하여 철회하였고, 현재까지 JECFA에서도 새로운 무기비소의 PTWI값을 제시하지 않고 있다(JECFA, 2010). 유기비소에 비해 상대적으로 독성이 높은 무기비소의 위험평가에 있어 노출 경로는 주로 식품의 섭취와 음용수로부터 기인하는데, 쌀에 존재하는 비소 함량은 농지, 농업용수, 비료(자재) 등 재배환경에서 존재하는 비소의 함량에 의해 결정된다고 볼 수 있다. 또한, 벼와 같은 작물은 상당기간 담수상태로 재배되기 때문에 농업용수의 비소 함량과 농산물의 비소 함량과의 상관관계에서 상당한 유의성이 있다는 연구결과가 보고되고 있다(Munoz et al., 2002). 최근 비소와 관련된 언론보도 및 연구결과 등에 의하면 쌀, 해조류, 사과 음료 등에서 독성이 높은 무기비소가 검출되었다는 사실뿐만 아니라 아시아 지역의 주식인 쌀에 대한 무기비소 최대기준설정과 관련하여 지난 몇 년간 국제식품규격위원회(CODEX, Codex Alimentarius International Food Standards)에서 뜨거운 논쟁이 되었다(CODEX, 2012). 이러한 이유 등으로 인하여 우리 국민의 주식인 쌀의 안전성에 대한 불안감이 확산되었고 대외적으로 쌀의 무기비소 오염도 조사 및 저감화 연구가 활발히 수행되고 있는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 확립된 무기비소 시험법으로 국내에서 생산된 쌀(현미 및 백미)의 비소 오염도를 통하여 우리나라 국민의 일상적인 쌀 섭취량을 고려한 무기비소 위해수준을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구의 실험재료는 지역별 대표성을 고려하여 경상북도 시·군 단위 전 지역에 걸쳐 2014년부터 2017년까지 4년 동안 생산된 벼 137점(제현 현미 137점, 백미 가공 137점)을 생산농가에서 직접 수거한 후 검체로 이용하였다. 시료의 수

거는 '농산물 등의 안전성조사처리요령(식약처 고시 제2015-52호)'을 참고하여 분석 시료의 대표성 확보를 위해 손질된 검체가 최소 1-3 kg 이상 되도록 수거하여 신속히 운반, 처리 및 보관하였다.

시약 및 초자

본 연구를 위해 사용된 모든 시약은 특급에 준하는 시약을 구입하여 사용하였고, 시료의 산 분해를 위해 반도체급 70% 질산(Dong woo Fine-Chem, Korea)과 분해 보조제로 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 M $\Omega\cdot\text{cm}$ 수준으로 정제된 3차 증류수를 사용하였다. 실험에 사용된 모든 초자는 폴리에틸렌(P.E.) 재질을 사용하였는데, 5% 질산에 24시간 이상 침지한 후 3차 증류수로 세척한 다음 자연 건조 후 사용하였다. 총비소 정량을 위해 원자분광분석용 비소 표준원액(Merck, Germany) 1,000 mg/L를 5% 질산 용액으로 희석하여 1.0 mg/kg working solution을 조제한 후 추가로 희석하여 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이 되도록 검량곡선 작성용 표준용액을 조제하였고, 무기비소(arsenite와 arsenate의 합) 정량을 위해 사용된 표준물질은 arsenite 표준원액 1,000 mg/L (High-Purity Standards, USA), arsenate 표준원액 1,000 mg/L (High-Purity Standards, USA)를 각각 사용하였다. 총비소의 회수율 및 정확도 등의 확인을 위한 인증표준물질(CRM, Certified Reference Materials)로 National Institute of Standards and Technology(NIST) 1568b(Rice Flour, USA)를 사용하였고, 무기비소는 NMII 7503-a(Rice Flour, Japan)를 사용하였다. 비소 화학종에 대하여 1,000 mg/L stock solution, 검량선 작성을 위한 혼합품 10 mg/L는 pH 5.6으로 조제된 5 mM malonic acid (Sigma Aldrich, USA, 99.0%)를 매질로 working solution으로 조제하여 사용하였고, 매 분석시마다 standard solution을 조제하여 분석에 사용하였다. 안정적인 비소 화학종 분리를 위하여 HPLC에 사용된 이동상과 비소 화학종 추출을 위한 용매로 추출과정에서 비소 화학종간의 이동이 없고 효율이 가장 좋은 5 mM malonic acid를 사용하였다.

시료의 전처리

수거한 시료의 준비는 「식품공전 제7. 일반시험법, 9. 식품 중 유해물질, 9.1.1 중금속 시험재료」에 준하여 가식부를 시험부위로 하였으며, 「농산물 중 중금속 검사를 위한 검체 손질 실무해설서(MFDS, 2014)」를 참고하여 검체를 손질하여 사용하였다. 준비한 시료는 제현기(FC-2K, Tokyo, Japan)를 이용하여 벼에서 왕겨를 제거하여 현미 상태로 조제하여 실험에 사용하였고, 현미 시료를 다시 시료별 500 g 이상 취하여 시험·연구용으로 많이 사용되고 있는 정미기(MC-90A, Tokyo, Japan)를 이용하여 백미(12분도, 현백률 90.4%) 상태로 가공하여 본 실험재료로 사용하였는데, 본 연구에 있어서 도정도의 판단 근거를 현미에서 강층이 벗겨진 정도보다 미

Table 1. Operating condition of microwave instrument

Step	Power (Watt)	Time ^{a)} (min)	Temp ^{b)} (°C)	Hold ^{c)} (min)
1	1,600	5:00	90	10:00
2	1,600	5:00	150	10:00
3	1,600	5:00	190	30:00

^{a)} Ramping time, ^{b)} Target temperature, ^{c)} Stay time in target temperature

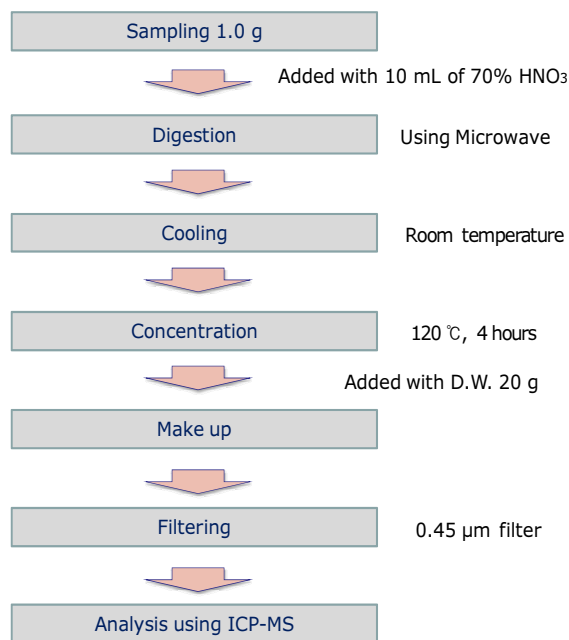


Fig. 1. Flow chart for total arsenic analysis.

강 발생량을 무게 기준으로 계산하여 사용하였다. 실험에 사용된 현미 및 백미는 시료균질기(Hadde VCM-41, Sweden)로 200 g 이상 균질화하여 분석을 위한 시료로 사용하였다.

총비소 시험법 및 분석

ICP (Inductively Coupled Plasma Spectrometer) 등과 같은 장비를 이용한 무기분석에 있어서 총비소 함량을 측정하기 위해서는 기기분석 이전에 질산과 같은 강산을 이용하여 유기물을 완전히 분해하는 전처리 과정이 반드시 선행되어야 한다. 최근에는 회화(dry ash) 과정에서 발생할 수 있는 교차오염이나 원소의 휘발로 인한 손실 등의 문제점을 보완하여 밀폐용기(vessel)를 사용하여 신속하게 시료 분해가 가능한 microwave system이 주로 활용되고 있어, 본 연구에서도 미국 환경보호청(US Environment Protection Agency)의 EPA method 3052를 참고하여 microwave 시료분해장치(MARS 5 ver 194, CEM, USA)로 시료를 분해하였다(U.S. EPA, 1996). 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°C에서 30분간 예비분해를 시켰다. 예비 분해된 시료에 과산화수소 1 mL를 첨가한 후 microwave digestion system

Table 2. 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
He gas flow	3.0 mL/min
Ion monitored	As m/z 75

으로 5분간 90°C까지 상승 시킨 후 10분간 유지하였고, 다시 5분간 150°C까지 상승 후 10분간 유지한 다음, 마지막으로 5분간 190°C까지 상승 시킨 후 30분간 유지하여 유기물을 완전히 분해하였다(Table 1). 분해가 완전히 끝난 다음 상온으로 냉각시킨 후에 다시 heating block 장비를 이용하여 120°C에서 4시간 동안 분해액이 1 mL가 될 때까지 농축시킨 후, 잔류물의 회석배수가 20배가 되도록 3차 증류수로 무게를 이용하여 정용한 다음 0.45 μm 필터로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1). 과거 무기분석은 주로 원자흡광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS)를 이용하여 분석을 하였는데, 원소별로 개별 광원을 사용하기 때문에 분석시마다 필요한 광원 램프로 교체하는 불편함과 높은 검출한계로 극미량 분석에 다소 어려움이 있었다(Wang et al., 1991). An 등(2017)의 문헌에도 소개되고 있듯이 최근에는 이를 보완하여 낮은 기기검출한계와 동시에 다성분 분석이 가능하여 분석 시간을 획기적으로 단축시킨 유도결합플라즈마질량분석기(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer, ICP/MS)를 주로 사용하고 있는데, 본 연구에서도 ICP-MS (Agilent 7700, USA)를 활용하여 총비소를 정량하였으며, 기기분석 조건은 Table 2와 같다.

무기비소 시험법 확립 및 분석

최근 크롬, 수은, 비소, 셀레늄 등과 같은 무기원소의 종분리 분석(determination of species)에서 가장 많이 활용되고 있는 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)로 화학종을 선택적으로 분리하고 검출기 역할을 하는 ICP-MS를 결합한 형태인 HPLC-ICP-MS (High Performance Liquid Chromatography coupled with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer)를 이용하여 비소 화학종을 분리 분석하였다(Nearing et al., 2014). 비소 화학종의 추출을

Table 3. Extraction efficiency by various extract solution

Extract	Species	As(III)(%)	As(V)(%)
0.28 M nitric acid		110.4±8.6	102.4±6.3
5 mM malonic acid		96.5±5.7	98.5±6.1
1% nitric acid		137.4±6.9	105.5±8.8

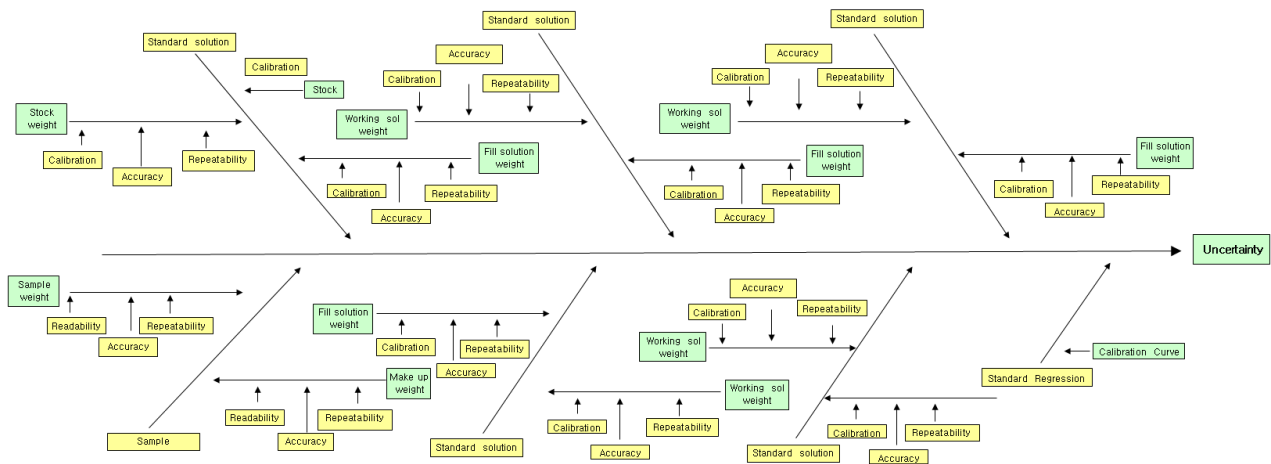


Fig. 2. Fish bone diagram of uncertainty sources in inorganic arsenic analysis.

위한 용매 선정은 추출 과정 중 서로 화학중간의 변화가 일어나지 않아야 하므로 미국 FDA의 분석방법인 0.28 M nitric acid를 추출용매로 heating block에서 가열 추출하여(Huang et al., 2010) 이동상 10 mM ammonium phosphate, pH 8.25의 조건에서 분석하는 방법(US FDA Elemental Analysis Manual:Section 4.11, 2012), 국내 식품의약품안전처 식품공전에 고시되어 있는 방법인 5 mM malonic acid의 추출용매로 추출하여 water bath와 sonication을 이용하여 가열 초음파 병행 추출 후 추출용매와 같은 이동상인 5 mM malonic acid, pH 5.6의 조건으로 분석하는 방법(Choi et al., 2016; MFDS, 2017)과 Kirby 등(2004)의 연구 결과를 참고하여 비소 화학종 분석에 많이 사용되는 분석법인 1% nitric acid를 추출용매로 microwave를 이용하여 추출 후 12 mM ammonium carbonate, 20 mM ammonium phosphate를 이동상 조건으로 분석하였다(Kim et al., 2013; Rintala et al., 2014; Chen et al., 2016). 앞에서 열거한 3가지 시험법으로 추출용매와 분석 시 이동상을 달리하여 분리·분석함으로써 쌀의 비소 화학종 시험법에 가장 적합한 추출용매 선정 및 기기분석 조건을 확립하고자 하였다(Table 3).

시험법 검증

검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 반응의 표준편차와 검량곡선의 기울기에 근거하여 계산하였는데, 10 µg/kg 표준용액을 7회 반복 측정하여 평균값으로 검량 y를 작성하여 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$LOD = 3.14 \times \sigma/S$$

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

(σ : 반응의 표준편차, S : 검량선의 기울기)

직선성 확인은 총비소 및 무기비소 화학종에 대한 각각의 원소들에 대해 검량곡선 작성용 표준용액을 조제하여 검량곡선의 상관계수(R²)로 확인하였다. 회수율 시험은 미국표준기술연구소(NIST)의 인증표준물질(Certified Reference Materials)을 이용하여 분석시료와 동일한 조건으로 3회 반복하여 측정하였고, 정밀성은 분석결과의 C.V. (Coefficient of Variation, %)를 이용하여 확인하였다.

측정불확도

분석과정에서 발생할 수 있는 다양한 오차 요인이 되는 측정불확도는 GUM (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)(ISO, 1995)과 EURACHEM/CITAC Guide (EURACHEM, 2012)에 근거하여 비소에 대한 측정불확도 모델 관계식을 아래와 같이 설정하고, 각각의 요인들로부터 불확도를 추정하였으며 전체적인 불확도 요인과 세부내용은 Fig. 2에 나타내었다. 불확도에 대한 요인 및 산출방법은 우선 불확도 인자를 검토한 후 요인별 표준불확도 및 자유도 계산을 통해 합성불확도를 산출하였다. 자유도는 'KOLAS-G-002 측정결과의 불확도추정 및 표현을 위한 지침'에 따라 반복 측정에 대한 자유도는 n-1로 계산하였고, 최소 제공방법에 의하여 직선의 절편과 기울기를 결정하기 위해 n개의 독립

Table 4. Food daily intake of each ages

Ages	Husked rice intake (g/day)	Polished rice intake (g/day)
≤2	2.2	85.5
3-6	3.2	117.9
7-19	3.8	170.5
≥20	4.1	187.3
Total	4.0	179.8

Table 5. Average body weight of each ages

Ages	Range				Total
	≤2	3-6	7-19	≥20	
Body weight (kg)	12.5	19.5	49.5	63.5	58.5

적인 관측값이 사용된 경우에는 절편 또는 기울기에 대한 표준불확도의 자유도를 n-2로 계산하였다(KOLAS, 2016). 합성 표준불확도는 각각의 측정결과에 대한 표준불확도이며, 합성은 불확도 전파의 법칙(law of propagation of uncertainty)에 따라 산출하였다. 확장불확도는 포함인자 k 와 각각의 요인들로부터 계산된 합성표준불확도를 곱하여 최종적으로 불확도를 산출하였다.

$$C_s = C_c \times \frac{W_f}{W_s}$$

C_s : Concentration of sample (mg/kg)

C_c : Calculation of concentration in sample (mg/kg)

W_s : Weight of sample (g)

W_f : Final weight of sample (g)

상관분석 및 가공계수 산출

본 연구에서는 현미 무기비소 함량과 백미 무기비소 함량과의 상호 유의성을 확인하기 위하여 상관계수를 산출하여 상관분석을 하였고, 현미가 백미로 가공되는 과정에서 무기비소 함량이 일정 비율로 감소되는 정도를 이용하여 가공계수(Processing factor)를 산출하였다.

$$P.F. = \frac{C_{pr}}{C_{hr}}$$

P.F. : Processing factor

C_{pr} : Concentration of polished rice

C_{hr} : Concentration of husked rice

위해도 평가

쌀의 섭취에 따른 무기비소 위해평가는 무기비소의 평균 함량에 질병관리본부에서 발간한 '국민건강영양조사' 자료를 활용(Korea Centers for Disease Control & Prevention, 2016)하여 식품 섭취량과 평균 체중 등을 활용하여 평가하였

다. 원시자료로부터 식품별 섭취량을 얻기 위해 통계프로그램인 SPSS (ver 14.0, SPSS Inc., USA)를 사용하여 3차 식품 코드에 따라 식품섭취량을 산출하였으며(Table 4), 연령은 그룹으로 설정하여 평균 체중을 사용하였다(Table 5). 식이 섭취를 통한 무기비소 노출량을 산출한 후 JECFA에서 설정한 잠정 주간 섭취허용량(Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI)에 대비하여 위해도를 평가하였다. 현재 무기비소의 PTWI는 2010년에 15 $\mu\text{g}/\text{kg b.w.}/\text{week}$ 가 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 함량만을 적용하였다.

위해도(%) =

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

결과 및 고찰

무기비소 시험법 확립

본 연구에서는 무기비소 2종에 대해 서로 화학종간의 전환없이 분리하여 정량할 수 있는 시험법 확립을 시도하였다. 비소 화학종이 적절한 pH에서 전하를 띠는 특성을 고려하여 화학종 분리를 위해 HPLC를 활용하였으며, HPLC에 사용할 컬럼은 비소 화학종이 주로 음이온 형태로 존재하므로 음이온 교환 컬럼(anion exchange column)인 Hamilton PRP-X100을 선택하였다. Huang 등(2010)에 의하면 추출용매의 선택에 있어서 염산, 질산 등을 사용하였을 때 추출효율이 90% 이상으로 양호하였다고 보고되었으나, 염산은 ICP/MS 분석시 방해물질인 ArCl 을 형성하고 tetramethyl ammonium hydroxide나 phosphoric acid를 이용한 추출 시 swelling을 형성하여 여과가 잘 되지 않아 추출용매로서 부적합하여 본 연구에서는 제외하였다. Raber 등(2012)의 연구 결과에 의하면 무기비소 분리 분석을 위한 HPLC 이동상 용매의 선택에 있어서 sodium 계열을 사용하면 컬럼에 sodium염이 집적되

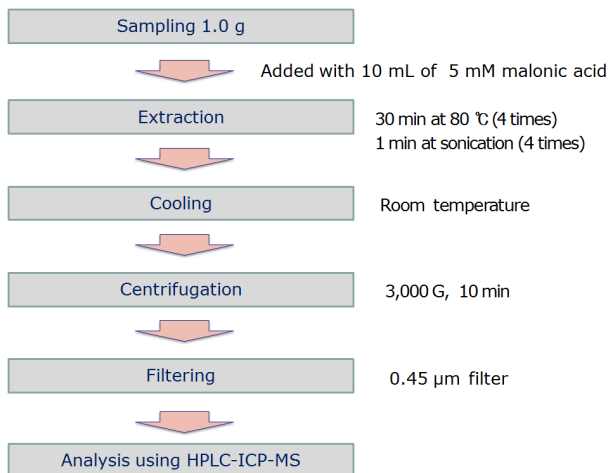


Fig. 3. Flow chart for arsenic species analysis.

어 분석의 재현성 및 정확도를 저하시키는 원인으로 작용하기 때문에 사용을 제외하였고, 추출용매로 사용되는 malonic acid와 ammonium 계열의 이동상을 이용하여 분리조건을 설정하였다. 최적의 무기비소 시험법 확립을 위하여 본 실험에서 설정한 3가지 방법 모두 인증표준물질에 대한 회수율 시험을 진행한 결과, 5 mM malonic acid을 이용한 가열 초음파 병용추출법으로 진행한 후 추출용매와 동일한 5 mM malonic acid, pH 5.6의 이동상을 이용한 시험법이 가장 안정적인 시험법임을 확인(회수율 96.5-98.5%)하였다(Table 3, Fig. 3). 본 연구에서 확립된 무기비소의 기기분석 조건(Table 6)과 무기비소의 크로마토그램은 Fig. 4와 같다.

시험법 검증

총비소 및 무기비소 화학종에 대한 검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는

Table 6. HPLC-ICP-MS condition for arsenic species analysis

Instrument parameters	
HPLC	HPLC 1200
As speciation	As(III), As(V)
Column	Anion exchange, Hamilton PRP X-100(4.1 X 250 mm, 10 µm)
Mobile phase	5 mM malonic acid
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	50 µL
ICP/MS	Agilent 7700
RF Power	1,300 W
Nebulizer gas flow	0.91 L/min
Auxillary gas flow	1.45 L/min
Plasma gas flow	15.0 L/min
He gas flow	3.0 mL/min
Lens voltage	6.50 V
Ion monitored	As m/z 75

As(III): Arsenite, As(V) : Arsenate

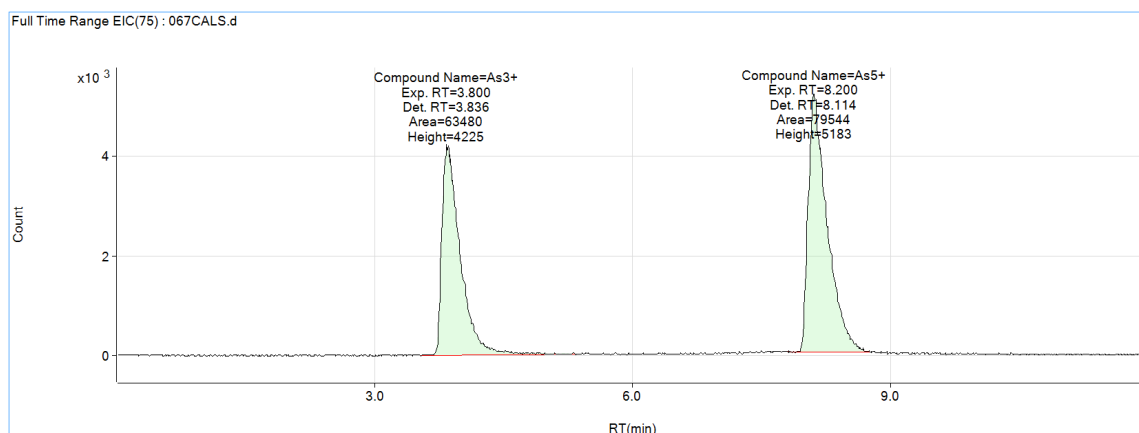


Fig. 4. HPLC-ICP-MS chromatogram for standard (10.0 ug/kg) of inorganic arsenic [As(III): Arsenite, As(V): Arsenate].

Table 7. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)

Item	Species	(ug/kg)		
	Total As	As(III)	As(V)	
LOD		0.13	0.73	1.24
LOQ		0.43	2.41	4.09
R ²		1.0000	1.0000	0.9993

Table 8. Recovery and coefficient validation of arsenic species

Species Item	(mg/kg)		
	Total As	As(III)	As(V)
Result/CRM	0.281/0.285 ^{a)}	0.0685/0.071 ^{b)}	0.0128/0.013 ^{b)}
Recovery (%)	98.6±0.7	96.5±5.7	98.5±6.1
C.V. (%)	1.35	2.84	4.25

^{a)} SRM(NIST 1568b), ^{b)} CRM(NMIJ 7503-a)

10 µg/kg 표준용액을 7회 반복 측정된 평균값으로 표준편차와 기을기를 이용하여 산출하였다. 총비소의 직선성은 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 µg/kg의 농도에서 비소 화합종의 직선성은 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 µg/kg의 농도에서 확인하였는데, R²의 값은 각 원소 모두 0.999 이상을 만족하여 양호한 직선성을 확인하였다(Table 7). 분석 장비의 정량한계는 총비소가 0.43 µg/kg, 무기비소 화합종에서는 Arsenite[(As(III)) 2.41 µg/kg], Arsenate[(As(V)) 4.09 µg/kg]로 매우 낮은 정량한계를 보여 저농도 시료에서도 검출 가능함을 확인하였으며, 무기비소의 함량은 arsenite (As(III))와 arsenate (As(V))의 합으로 계산하였다. 총비소 및 비소 화합종에 대한 회수율 및 정밀성 확인을 위하여 인증표준물질(NIST 1568b, USA ; NMIJ 7503-a, Japan)을 사용하였다. 각 비소 화합종에 대한 평균 회수율은 96.5-98.6%, C.V.% (Coefficient of Variation)는 모두 5% 미만으로 양호하게 나타나 AOAC (AOAC Guidelines, 2002)와 U.S. FDA의 중금속 시험법 기준(Patrick *et al.*, 2015)을 만족하여 비소 분석에 적합한 시험법임을 확인하였다(Table 8).

측정불확도

비소 분석에 있어서 발생할 수 있는 다양한 분석오차 요인들을 시료 전처리부터 기기분석까지 일련의 과정을 추적하여 측정불확도를 산출해 보았다. 우선, 시료 전처리(저울 교정성적서, 저울 안정성), 표준용액 제조(저울 교정성적서, 표준물질 인증값), 검량곡선 작성으로 나누어 각각 상대불확도와 자유도를 구하였다. 이렇게 산출된 상대불확도와 포함인자 *k*를 이용하여 확장불확도를 계산하여 최종적으로 측정값에 대한 불확도를 산출하였다. 시료 전처리 과정에 대한 불확도는 저울 교정성적서의 불확도와 저울 안정성이 불확도 요인으로 고려되었다. 저울 교정성적서의 불확도는 95% 신뢰수준에서

0.000 4 g의 불확도를 가지고 있으므로 표준불확도는 0.000 2가 된다. 저울 안정성은 크게 시료 칭량과 정용으로 나누어 실시하였는데, 분동 1 g (시료 칭량 무게)을 15회 반복 측정된 값과 분동 20 g (정용 무게)을 15회 반복 측정된 값을 이용하여 표준불확도를 각각 구하였으며, 저울의 분해능은 0.000 1 g으로 분해능에 대한 표준불확도는 0.000 029이었다. 시료 칭량과 정용에 대한 합성표준불확도는 각각 0.000 202, 0.000 202이고, 시료전처리에 대한 상대표준불확도는 0.000 018이었다. 표준용액 제조 과정의 불확도는 각각의 조제 단계에서 사용된 저울의 안정성과 교정성적서상에 대한 불확도를 요인으로 stock solution과 working solution의 불확도를 이용하여 상대표준불확도를 산출하였으며, 각 농도별 상대표준불확도는 50.0 µg/kg은 0.001 530, 25.0 µg/kg은 0.000 794, 10.0 µg/kg은 0.000 487, 5.0 µg/kg은 0.000 455, 1.0 µg/kg은 0.000 841이었다. 기기분석을 위한 검량곡선의 직선성이 유지되지 않을 때에는 측정결과 값의 주요한 불확도 요인이 된다. 검량곡선의 불확도 측정을 위해 보관 표준용액으로부터 희석된 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 µg/kg을 3회씩 반복 측정하였다. 결정계수는 0.999 994, 검량곡선은 선형 최소제곱법을 이용하여 산출하였고, 직선성표준불확도 0.006 569, 자유도 10, 상대표준불확도는 0.006 57이었다. 성된 상대표준 불확도는 0.006 82로 산정되었고, 확장불확도는 합성표준불확도에서 계산된 값에 포함인자 *k*를 곱하여 산출하였는데(포함인자 *k*는 Welch-Satterthwaite 공식을 이용하여 추정), 유효자유도가 10 이상이므로 약 95% 신뢰수준에서 포함인자는 2이었다. 따라서 산출된 확장불확도는 비소 1.000±0.014 mg/kg이었다. 이렇게 산출된 결과로 각 불확도 요인이 전체 불확도에서 차지하는 비율은 검량곡선의 직선성 유지가 88.67%로 가장 높았고, 표준용액 제조 과정에서 11.09%, 시료

Table 9. Concentration range of arsenic in husked rice and polished rice

Sample	N ^{a)}	Concentration range (mg/kg)	
		Total Arsenic	Inorganic Arsenic
Husked rice	137	0.142±0.061 ^{b)} (0.038-0.318) ^{c)}	0.077±0.038 (N.D.-0.209)
Polished rice	137	0.083±0.037 (0.016-0.210)	0.047±0.020 (N.D.-0.107)

N.D.: not detected, ^{a)} N, Number of sample, ^{b)} Mean value±SD (standard of deviation), ^{c)} Concentration range (minimum-maximum)

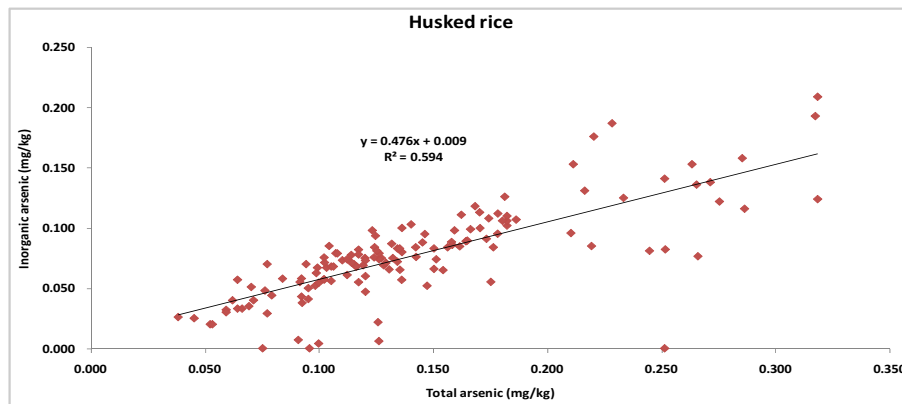


Fig. 5. Regression and correlation analysis of total arsenic and inorganic arsenic in husked rice.

전처리 과정에서 0.24%로 가장 낮은 비율을 보였는데, 비소 정량 시험에 있어서 발생할 수 있는 불확도는 검량곡선의 직선성 유지가 가장 큰 요인으로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

총비소 함량

쌀의 총비소 함량은 ICP-MS를 이용하여 분석하였는데, 현미의 총비소 함량은 평균 0.142±0.061 mg/kg, 중간값은 0.126 mg/kg, 극단값은 0.267 mg/kg, 최대값은 0.318 mg/kg, 최소값은 0.038 mg/kg으로 확인되었다. 또한, 백미의 총비소 함량은 평균 0.083±0.037 mg/kg, 중간값은 0.077 mg/kg, 극단값은 0.161 mg/kg, 최대값은 0.210 mg/kg, 최소값은 0.016 mg/kg으로 확인되었으며(Table 9), 본 연구에서 쌀의 총비소 함량은 현미가 백미보다 대체적으로 1.5-2배 높은 오염도를 보였다. Choi 등(2010)의 식품 중 비소 함량 수준(쌀 0.05-0.15 mg/kg)과 비교해 보았을 때 대체적으로 비슷하거나 다소 높은 수준임을 확인하였고, 비소의 오염도는 다양한 문헌에서 소개되고 있는 다소비 식품 중 납, 카드뮴에 비하여 다소 높은 비율의 오염도를 보여주고 있음을 확인하였다(Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2003).

무기비소 함량

쌀의 무기비소 함량은 HPLC-ICP-MS를 이용하여 분석하였는데, 현미의 무기비소 함량은 평균 0.077±0.038 mg/kg [As(III) 0.074±0.033 mg/kg, As(V) 0.012±0.012 mg/kg], 중

간값은 0.075 mg/kg, 극단값은 0.143 mg/kg, 최대값은 0.209 mg/kg, 최소값은 불검출(N.D.)로 확인되었다. 또한, 백미의 무기비소 함량은 평균 0.047±0.020 mg/kg [As(III) 0.049±0.028 mg/kg, As(V) 0.007±0.010 mg/kg], 중간값은 0.047 mg/kg, 극단값은 0.076 mg/kg, 최대값은 0.107 mg/kg, 최소값은 불검출(N.D.)로 확인되었으며(Table 9), 현미 및 백미의 무기비소 함량 비율 또한 총비소의 함량비율과 유사한 형태를 보였다. 다양한 문헌에서 소개되고 있는 쌀의 무기비소 함량은 국내에서 생산 및 유통된 쌀의 무기비소 함량이 As(III) 0.071 mg/kg (0.038-0.112 mg/kg), As(V) 0.006 mg/kg (0.002-0.018 mg/kg)인 것과 비교해 볼 때 대체적으로 유사한 수준임을 확인하였고(Choi *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013), 총비소 함량 대비 무기비소 함량 비율 또한 53-88%의 범주에 있음을 확인하였다.

총비소 및 무기비소 함량과의 상관분석

총비소 함량 대비 무기비소 함량 비율은 비소 분석결과를 이용하여 산출하였는데, 현미는 무기비소의 함량 비율이 총비소의 54.2%로 확인되었고, 백미는 무기비소의 함량 비율이 총비소의 56.6%로 확인되었다. 본 연구에서 분석된 쌀의 총비소 함량과 무기비소 함량 사이에는 높은 유의적 상관성[현미 상관계수($r>0.77$), 백미 상관계수($r>0.67$)]이 있음을 확인하였고, 간단한 통계처리 방법만으로도 총비소 함량을 이용하여 무기비소 함량에 대한 추정이 가능함을 확인하였다(Fig. 5, 6).

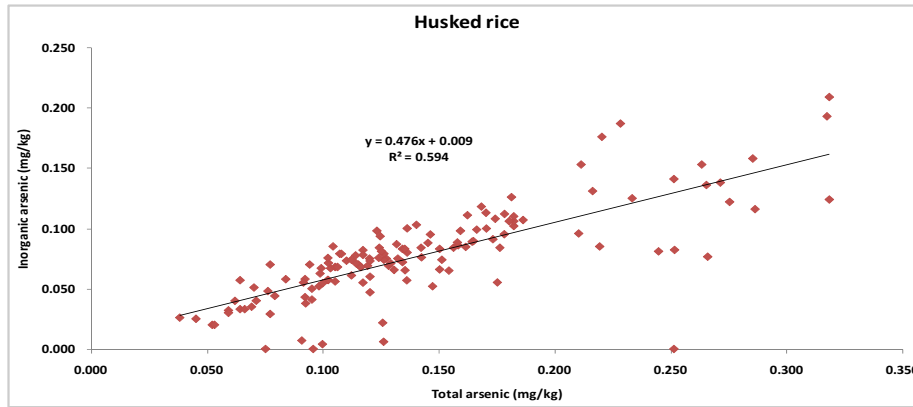


Fig. 6. Regression and correlation analysis of total arsenic and inorganic arsenic in polished rice.

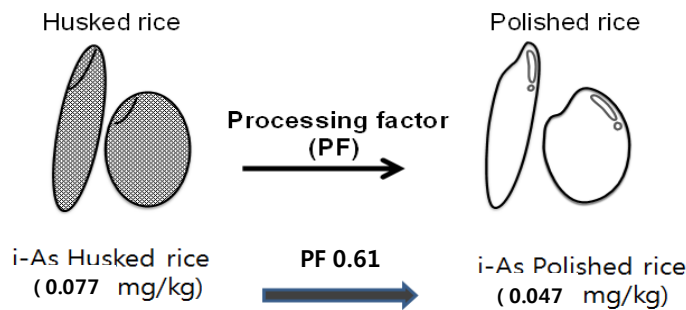


Fig. 7. Processing factor of husked rice and polished rice in inorganic arsenic.

쌀의 무기비소 함량은 품종, 재배지역 및 방법, 수확시기 등에 따라 다소 차이가 발생할 수 있지만, 현미의 무기비소 함량이 백미에 비해 상대적으로 높은 수준을 보였으며 이는 무기비소가 배유의 중심보다는 외피(강층) 부분에 많이 분포하고 있기 때문인 것으로 추정된다(Choi *et al.*, 2014).

가공계수 산출

본 연구를 통하여 쌀이 현미에서 백미로 가공되어지는 과정, 즉 외피(강층)가 벗겨져 나가는 정도에 따라 일정한 비율로 무기비소의 농도가 비례하여 감소되는 특성을 발견하였다. 이러한 특성을 이용하여 쌀의 가공도에 따른 무기비소 가공계수(Processing factor)의 산출을 시도하였는데, 현미 무기비소 함량을 100으로 보았을 때 가공되어진 백미 무기비소 함량이 61로 계산되어 가공계수를 0.61로 산출하였다(Fig. 7). 이 가공계수를 활용하면 손쉽게 현미의 무기비소 함량만으로도 백미의 무기비소 함량을 추정할 수 있을 것으로 판단된다.

쌀 섭취로 인한 무기비소 위해도 평가

본 연구에서 조사된 쌀 274점(현미 137, 백미 137)의 시료에 대하여 국민건강영양조사 자료(2016)를 기초로 우리나라 국민들이 일상적인 식이섭취 조건에서 쌀을 섭취할 경우 무기비소에 노출되는 정도를 확인하였다. 무기비소 위해도 평가는 현미 및 백미 무기비소 평균 함량에 연령별 식이 섭취량과 연령별 평균 체중으로 산출하였다. 연령별 현미 섭취로 인

한 1일 단위체중당 평균 노출량은 2세 이하 영유아 그룹에서 1.36×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ (PTWI 대비 0.63%)로 가장 높은 노출 수준을 보였고, 3-6세 그룹 1.26×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$, 7-19세 그룹 5.91×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$, 20세 이상 그룹이 4.97×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ (PTWI 대비 0.23%)의 순으로 낮게 나타났다. 이와 같이 2세 이하 영유아 그룹에서 무기비소 노출량이 가장 높게 나타난 이유는 평균 체중에 비하여 식이 섭취량이 높기 때문인 것으로 판단된다. 또한, 연령별 백미 섭취로 인한 1일 단위체중당 평균 노출량은 2세 이하 영유아 그룹에서 3.21×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ (PTWI 대비 15%), 3-6세 그룹 2.84×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$, 7-19세 그룹 1.62×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$, 20세 이상 그룹 1.39×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$ (PTWI 대비 6.47%) 순으로 평가되어, 우리나라 국민들의 일상적인 식습관에서 백미 섭취로 인한 무기비소의 인체 노출수준 및 위해 정도는 우려할 수준이 아닌 것으로 확인되었다(Table 10).

요 약

본 연구에서는 최근 국제적으로 논란이 되고 있는 쌀의 안전성과 관련하여, 무기비소 오염도 파악을 위한 분석법 확립과 국내에서 생산되는 쌀(현미, 백미)의 섭취량을 고려한 무기비소 위해수준을 확인하고자 하였다. 실험재료는 지역별 대표성을 고려하여 경상북도 전 지역에 걸쳐 생산된 벼 137점

Table 10. Daily mean dietary exposure and risk of inorganic arsenic

Sample	Inorganic As content (mg/kg)	Ages	Inorganic As exposure		% PTWI ^{a)}
			µg/day	µg/kg b.w./day	
Husked rice	0.077	≤2	1.69×10 ⁻¹	1.36×10 ⁻²	0.63
		3-6	2.46×10 ⁻¹	1.26×10 ⁻²	0.59
		7-19	2.93×10 ⁻¹	5.91×10 ⁻³	0.28
		≥20	3.16×10 ⁻¹	4.97×10 ⁻³	0.23
		Total	3.08×10 ⁻¹	5.26×10 ⁻³	0.25
Polished rice	0.047	≤2	4.02×100	3.21×10 ⁻¹	15.00
		3-6	5.54×100	2.84×10 ⁻¹	13.26
		7-19	8.01×100	1.62×10 ⁻¹	7.55
		≥20	8.80×100	1.39×10 ⁻¹	6.47
		Total	8.45×100	1.44×10 ⁻¹	6.74

^{a)} PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake): 15 µg/kg b.w./week

(현미 상태 137, 백미 가공 137)을 생산농가에서 직접 수거한 시료를 활용하였다. 총비소 분석은 일정량의 시료에 질산을 추가한 다음 microwave digestion system을 활용하여 전처리한 후 ICP-MS를 이용하여 정량 분석하였다. 무기비소 화학종의 분리 및 정량을 위하여 국제적으로 많이 활용되고 있는 HPLC를 이용하여 비소 중을 선택적으로 분리하고, 검출기 역할을 하는 ICP-MS를 결합한 형태인 HPLC-ICP-MS를 이용하여 비소 화학종을 분리하고 정량하였다. 추출 용매 선정 및 분석법 확립을 위하여 0.28 M nitric acid, 5 mM malonic acid, 그리고 1% nitric acid를 이용한 3가지 추출 방법 중 추출 효율 및 안전성 등이 가장 양호한 5 mM malonic acid를 이용한 추출법(동일한 조건으로 조제한 이 동상)을 최종 시험법으로 선택하였다. 시험법 검증을 위하여 기기검출한계, 정량한계, 직선성 및 회수율 등 모두 AOAC에서 권장하는 기준을 만족하여 총비소 및 무기비소 시험법과 결과에 대한 신뢰성을 확인하였다. 비소 분석에 있어서 시료 전처리부터 기기분석까지 발생할 수 있는 다양한 분석오차 요인들을 일련의 과정을 통하여 추적한 결과, 각 불확도 요인이 전체 불확도에서 차지하는 비율은 검량곡선의 직선성 유지가 88.67%로 가장 높았고, 표준용액 제조 과정에서 11.09%, 시료 전처리 과정에서 0.24%로 가장 낮은 비율을 보였다. 현미의 총비소 함량은 평균 0.142±0.061 mg/kg, 무기비소 함량은 평균 0.077±0.038 mg/kg, 백미의 총비소 함량은 평균 0.083±0.037 mg/kg, 무기비소 함량은 평균 0.047±0.020 mg/kg으로 조사되었고, 총비소 함량 대비 무기비소 함량 비율은 53-88%(현미 평균 54.2%, 백미 평균 56.6%) 범위 내에 있음을 확인하였다. 우리나라 국민들의 일상적인 식이 섭취량에서 무기비소 위해 정도를 평가하였는데, 연령별 현미 섭취로 인한 1일 단위체중당 평균 노출량은 4.97×10⁻³(≥20세) -1.36×10⁻²(≤2세) µg/kg b.w./day로 위해도는 0.23-0.63% 수준으로 상당히 낮은 것으로 평가되었고, 연령별 백미 섭취로 인한 1일 단위체중당 평균 노출량은 1.39×10⁻¹(≥20세) -3.21×10⁻¹(≤2세) µg/kg b.w./day로 위해도는 6.47-

15.00% 수준으로 백미 섭취로 인한 무기비소의 인체 노출수준 및 위해 정도는 우려할 수준이 아닌 것으로 확인되었다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

References

- An, J. M., Hong K. S., Kim, S. Y., Kim, D. J., Lee, H. J., Shin, H. C. (2017). Arsenic speciation and risk assessment of miscellaneous cereals by HPLC-ICP-MS. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 36(2), 119-128.
- 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*, 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.
- Choi, S. H., Kim, J. S., Lee, J. Y., Jeon, J. S., Kim, J. W., Russo, R. E., Gonzalez, J., Yoo, J. H., Kim, K. S., Yang, J. S., & Park, K. S. (2014). Analysis of arsenic in rice grains using ICP-MS and fs LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29, 1233-1237.

- 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.
- Kim, H. Y., Kim, J. I., Kim, J. C., Park, J. E., Lee, K. J., Kim, S. I., Oh, J. H., & Jang, Y. M. (2009). Survey of heavy metal contents of circulating agricultural products in Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 41(3), 238-244.
- 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.
- Kim, M. H., Kim, J. S., Sho, Y. S., Chung, S. Y., & Lee, J. O. (2003). The study on heavy metal contents in various foods. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 35(4), 561-567.
- Kim, S. T., Lim, Y. R., Park, K. S., & Chung, J. H. (2000). Simultaneous 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.
- Kirby, J., Maher, W., Ellwood, M., & Krikowa, F. (2004). Arsenic species determination in biological tissues by HPLC-ICP-MS and HPLC-HG-ICP-MS. *Australian Journal of Chemistry*, 57(10), 957-966.
- 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.
- Nearing, M. M., Koch, I., & Reimer, K. J. (2014). Complementary arsenic speciation methods: a review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 99, 150-162.
- 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, pp. 14, U.S. FDA, 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-ICP/MS method for determining inorganic arsenic in food: application to rice, wheat and tuna fish. *Food chemistry*, 134(1), 524-532.
- Rintala, E. M., Ekholm, P., Koivisto, P., Peltonen, K. & Venalainen, E. R. (2014). The intake on 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.