

초고압초음파분해법을 이용한 축산물내 미량금속 잔류분석을 위한 시료전처리 방법

이명현, 이희수, 손성완, 정갑수, 박종명, 김상근^{1,*}

국립수의과학검역원, ¹충남대학교 수의과대학

(게재승인: 2003년 8월 23일)

A Study on Sample Preparation for the Analysis of Trace Elements in Foods of Animal Origin by Ultra High Pressure Microwave Digestion

Myoung-heon Lee, Hee-su Lee, Seong-wan Son, Gab-soo Jung,
Jong-myung Park and Sang-keun Kim*

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: August 23, 2003)

Abstract: Simple and rapid sample preparation method for trace elements in foods of animal origin using ultra high pressure microwave digestion system (UHP/MDS) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP/AES) were developed.

1. For the digestion of sample using UHP-MDS, 20% nitric acid (v/v) was the most suitable solvent for the determination of trace elements in foods of animal origin.

2. The optimal digestion conditions for UHP-MDS were as follows: final temperature 180°C, final pressure 400 PSI, and magnetic power 900 W in the solid sample. For the liquid sample final temperature 170°C, final pressure 300 PSI and magnetic power 700 W were optimal conditions.

3. As result of interlaboratory test, the average recovery rate of the for solid sample were 88.3~99.1% for As, 82.4~93.3% for Cd, 89.2~101.2% for Hg and 86.5~93.8% for Pb, respectively. In liquid sample, it were 87.0~96.8% for As, 80.9~96.6% for Cd, 87.5~91.2% for Hg and 91.4~95.5% for Pb, respectively.

4. The average coefficient variation rate were 3.3~15.9% for solid sample and 2.9~10.8% for liquid sample.

Key words: microwave digestion, foods of animal origin, trace elements

서 론

최근 기기분석의 눈부신 발전에 따라 축산물을 포함한 식품 중 미량금속 분석에도 원자흡광 광도계(Atomic Absorption Spectrometer: AAS), 유도결합 플라즈마 원자

방출 분광기(Inductively Coupled Plasma/Atomic Emission Spectrometer: ICP/AES), 유도결합 플라즈마 질량분석기(Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometer: ICP/MS) 등 첨단 분석장비를 이용한 기기분석법이 널리 응용되고 있는 추세이다 [4, 20]. 이러한 방법들은 분석원리상

* Corresponding author: Sang-keun Kim

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-6754, E-mail: kskkim@cnu.ac.kr

원자나 이온의 최외각 전자가 전이함에 따라 흡수, 방출되는 특정파장의 복사선세기를 측정하여 관심물질의 존재를 정성적으로 확인하고 그 양을 측정하는 원자분광법(Atomic Spectrometry)에 기초를 두고 있다 [7]. 원자분광법을 적용하여 정확도가 높은 양질의 분석결과를 얻기 위해서는 시료중에 존재하는 유기물이나 간섭물질 등을 제거하여 기기분석에 적합한 형태로 제조하는 전처리과정이 필수적이다. 현재 국내에서는 축산물중 미량금속의 잔류분석을 위한 전처리 방법으로 습식분해법(Wet Digestion Method)과 건식분해법(Drying Digestion Method)을 공정법으로 사용하고 있다 [1, 5].

일반적으로 습식분해법은 황산, 질산, 과염소산 등 분해산을 가하여 처리함으로써 유기물을 분해시키며, 건식분해법은 시료를 고온(450°C~550°C)에서 장시간 태워 얻어지는 잔류물을 무기산에 녹여 기기분석에 이용하는 방법이다. 그러나 습식법이나 건식법은 시료 전처리에 소요되는 시간과 비용이 많고 전처리과정 중 유독한 분해산이나 가스 등이 다량 방출되어 실험자의 건강을 크게 위협할 수 있다. 또한 비소, 수은 등 일부 미량금속은 분해과정 중에 상당한 양이 손실되므로 회수율이 매우 저조한 것으로 알려져 있다 [6, 14, 17]. 근래에 이르러 구미선진국에서 연구중인 초고압초음파분해법은 전자기장을 에너지원으로 이용하여 비교적 낮은 온도에서도 시료를 신속하고 안전하게 분해할 수 있는 새로운 첨단기술로 각광 받고 있다 [4, 6]. 특히 초고압초음파분해법은 현행 우리나라를 비롯한 외국의 공정법에 비하여 조작이 간편하고 안전하며 처리과정중에 발생할 수 있는 휘산성금속의 손실을 효과적으로 차단할 수 있는 첨단기법으로 평가되고 있다 [4, 9, 20]. 반면에 분석대상 시료별로 다양한 물리화학적 특성을 감안하여 축산물의 시료전처리 조건 설정 및 표준화에 관하여 시도한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 액상, 고체상 등 시료조성이 상이한 축산물에 초고압초음파분해법을 적용하여 시료 전처리 조건을 확립하였고, 아울러 실험실간 비교실험을 통하여 확립된 분석방법의 정확도, 정밀도 등을 조사하여 신뢰성을 검증하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료

질산 등 분해용매는 특급시약(Merck)을 사용하였으며 표준액 및 검액조제, 분해용기와 초자기구 세척 등 실험 전반에 걸쳐 소비되는 증류수는 모두 Deionized DW (Mili-Q-System)를 활용하였다. 한편 공시시료는 고

체상 축산물로 식육을, 외형이 액체이면서 직접 음용하는 축산물인 액상 식품은 우유를 각각 선정하였다.

표준용액 제조

비소, 카드뮴, 수은 및 납 등 미량금속 4종의 표준품(Merck)을 정밀히 측정하여 1000ppm 되도록 만들어 표준원액으로 하였으며, 필요에 따라 질산용액(20%, v/v)을 이용하여 적절한 농도로 희석한 후 표준용액으로 사용하였다.

기기 및 장치

공시된 축산물은 초고압초음파분해장치(Ultra High Pressure/Microwave Digestion System, Questron Co: UHP/MDS)를 이용하여 최적분해조건을 설정하였고 미량금속의 분석은 유도결합 플라즈마 원자방출 분광기(Inductively Coupled Plasma/ Atomic Emission Spectrometer, GBC Co: ICP/AES)를 사용하여 측정하였으며 기기분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. ICP/AES conditions for analysis of trace elements in foods of animal origin

Instrument conditions	Trace element			
	As	Cd	Hg	Pb
Foward power (W)	1000	1000	1000	1000
Reflected power (W)	20	20	20	20
Sample gas flow (ℓ/min)	0.6	0.6	0.6	0.6
Plasma gas flow (ℓ/min)	10	10	10	10
Wave length (nm)	228.812	214.438	194.223	220.353

시료전처리

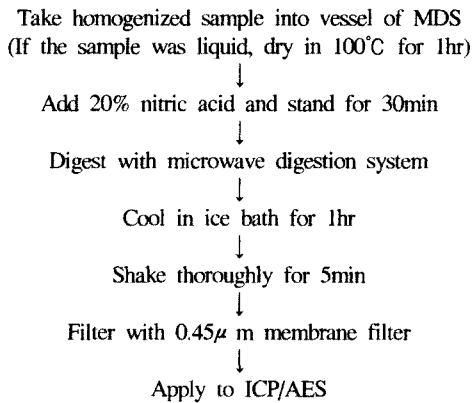
고체상 축산물은 세절하여 1g을 정밀히 칭량한 후 분해용기에 담고 액상 축산물은 충분히 교반하여 균질화한 다음 일정량을 분해용기에 달아 건조기에서 수분을 증발시켰다. 분해용매인 질산용액을 가하여 약 30분간 정치하고 초고압초음파분해 장치로 분해하였다. 분해가 완료되면 병육상에서 약 1시간 냉각하고 충분히 진탕하여 분해액을 균질화 한 다음 여과하여 검액으로 사용하였다(Fig. 1).

실험실간 비교실험

본 연구에서 확립된 분석법의 신뢰성을 검증하기 위하여 총 3개 기관이 실험실간 비교실험에 참여하였다(Table 2). 실험실간 비교실험에 필요한 비소 등 미량금속

Table 2. Profile of the interlaboratory study

Laboratory	Digestion apparatus	Analysis apparatus
National Veterinary Research & Quarantine Service(NVRQS)	Ultra High Pressure Microwave Digestion System (QMAX-4000, Questron Co.)	ICP-AES (Integra XL, GBC Co.)
Chungnam Livestock Research Institute(CLRI)	Microwave Accelerated Reaction System (MARS 5, CEM Co.)	ICP-AES (Integra XL, GBC Co.)
National Veterinary Research & Quarantine Service Pusan Reginal Office(NVRQS-PRO)	Microwave Accelerated Reaction System (STAR 6, CEM Co.)	ICP-AES (Optima 3300, Perkin Elmer Co.)

**Fig. 1.** Sample preparation for analysis of trace elements in foods of animal origin.

표준품 4종 및 질산 등 분해용액은 일괄구매하여 분배하였으며 무잔류시료, 표준품 첨가시료는 국립수의과학검역원에서 조제하여 각각 실험참여기관에 공급하였다.

회수율 및 변이계수 측정

예비실험을 통하여 미량금속이 잔류하지 않은 것으로 판단된 축산물에 비소, 카드뮴, 수은 및 납 표준용액을 농도별로 첨가한 다음 선발된 최적 분해조건에 따라 전처리한 후 미량금속 수준을 분석하여 회수율과 변이계수를 산정하였다.

결 과

초고압초음파분해기 최적조건 선정

초고압초음파분해기를 이용하여 축산물중 미량금속 잔류분석을 위한 최적조건을 조사한 결과 분해용액은

질산용액(20%, v/v)이 가장 적당하였으며, 대상시료의 물리화학적 특성에 따라 고체상 축산물과 액상 축산물로 구분하여 분해조건을 달리하였다(Table 3 및 4). 특히 분해과정은 초벌분해와 심분해의 2단계로 구분하여 시료중 유기물질을 효과적으로 제거함으로써 분석효율을 향상시켰다.

Table 3. UHP-MDS conditions for the digestion of solid sample

Instrument condition	Digestion stage	
	Stage I	Stage II
Running time (min)	30	30
Magnetic power (W)	900	900
Initial pressure (PSI)	0	250
Finish pressure (PSI)	250	400
Initial temperature (°C)	22	170
Finish temperature (°C)	170	180

Table 4. UHP-MDS conditions the digestion of liquid sample

Instrument condition	Digestion stage	
	Stage I	Stage II
Running time (min)	10	10
Magnetic power (W)	700	700
Initial pressure (PSI)	0	150
Finish pressure (PSI)	150	300
Initial temperature (°C)	22	165
Finish temperature (°C)	150	170

실험실간 비교실험 및 회수율

본 연구에서 확립된 시료전처리방법의 신뢰성을 확인하기 위하여 국립수의과학검역원 등 3개 기관이 참여하여 실험실간 비교실험을 실시하였다. 고체상 및 액상 축산물에 비소, 카드뮴, 수은 및 납 표준용액을 각각 0.1, 0.25, 0.5, 및 1 ppm 첨가한 후 초고압초음파 분해조건을 적용하여 회수율과 변이계수를 조사한 결과는 Table 5 및 6과 같다. 고체상 축산물의 경우 평균회수율은 비소 88.3~99.1%, 카드뮴 82.4~93.3%, 수은 89.2~101.2%, 납 86.5~93.8%이었으며, 액상 축산물은 각각 87.0~96.8%, 80.9~96.6%, 87.5~91.2%, 91.4~94.0%로 개별금속에 따라 다소간의 차이는 있었으나 비교적 양호한 수준이었다. 한편 정밀도의 척도인 평균 변이계수는 고체상 축산물의 경우 3.3~15.9%, 액상 축산물은 2.9~10.8%로 나타났다.

고찰

최근 일부 미량금속에서 내분비교란효과가 밝혀지면 서[8, 13] 사회적인 관심이 집중되고 있으며 특히 위해성 평가, 체내동태 및 식품중 잔류실태 조사 등 미량금속의 독성과 공중보건상 위해성을 구명하려는 다양한 시도가 이루어지고 있다 [11, 12, 16, 18]. 그러나 미량금속의 대사기전이나 작용양식을 밝히기 위해서는 무엇보다 신뢰성 있고 간편한 분석방법이 필수적임은 재론의 여지가 없다. 미량금속 분석은 개별금속에 따라 특이 발색단을 이용한 비색법, 킬레이트화합물의 생성을 응용한 킬레이트 적정법 등이 있으나 [3] 분석방법이 까다롭고, 분석효율이 저조하여 점차 정밀분석장비를 활용하는 기기분석법으로 전환되는 경향이다. 미량금속 분석에 활용되는 분석기기는 대부분이 원자분광법의 원리를 응용한 장비로 금속별 고유한 분석파장에서 분광학적 간섭현상을 일으킬 수 있는 방해물질을 완벽하게 제거하는 것이 정확한 분석결과를 얻을 수 있는 요체로 생각된다 [7, 9, 19, 20]. 국내외에서 공정법으로 이용되는 건식회화법은 분해산을 사용하지 않고 실험공정이 비교적 단순한 반면 도가니의 재질, 표면상태 및 회화온도에 따라 분석대상원소의 손실이 문제점으로 지적되고 있으며 습식회화법의 경우 전처리과정이 까다롭고 고온 및 강산을 사용하므로 실험자의 안전성 확보에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다 [6, 9, 20].

본 연구에서 이용한 초고압초음파분해법은 가압조건에서 초음파발생기로부터 생성된 강력한 마그네트론이 시료중에 존재하는 물분자의 분자운동을 유발시키고 이때 발생한 열에 의하여 시료를 분해하는 방법이다.

특히 시료전처리과정이 밀폐된 용기내에서 이루어지므로 습식법이나 건식법에 비하여 분석물질의 손실을 근본적으로 차단할 수 있으며 분석에 소요되는 시간이 짧다는 이점이 있어 매우 유용한 전처리방법으로 평가되고 있다 [9, 20]. 일반적으로 축산물은 탄소를 기본골격으로 유기물이 다량 존재하는 대표적인 생체시료이며 시료전처리조건은 대상물질의 물성이나 화학적 성질에 전적으로 의존하므로 고체상 축산물과 액상 축산물로 구분하여 분해조건을 달리하였고 분해과정은 유기물질을 제거하는 초별분해단계와 분해효율을 높이기 위한 심분해 단계로 구분하였다. 아울러 시료중에 존재하는 간섭물질을 효과적으로 제거하기 위해서는 분해산의 선정이 매우 중요한 것으로 판단되는 바 질산, 염산, 과염소산 및 이들의 혼합산을 이용하여 분해효율을 조사한 결과 질산(20%, v/v)이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 이는 질산이 유기물의 구성요소인 지방, 탄수화물, 단백질 등을 초고압, 고온상태에서 완전 분해시키는데 가장 적합한 분해용매임을 시사하는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 계란과 건조돼지고기중 셀렌 분석을 위한 분해용매를 선발한 결과 질산에서 가장 우수한 회수율을 얻었다는 박과 김 [2]의 연구보고와 일치하는 결과였다.

본 연구에서 확립된 분석법을 유관기관에 기술전수 후 비교실험을 실시한 결과 정밀도와 정확도의 판단기준인 회수율과 변이계수가 82.4~99.1%, 2.9~15.9%로 나타났으며 이는 CODEX에서 권장하는 기준인 회수율 80~110% 및 변이계수 <23% [10, 15]를 충족하는 수준으로 일선 시험분석기관에서 기존의 관행법인 건식법이나 습식법과 병용하여 활용할 수 있는 효과적인 시료전처리법으로 보여진다.

결론

축산물중 비소, 카드뮴, 수은, 및 납 등 미량금속의 잔류분석을 위하여 초고압초음파 분해장치를 이용한 신속·정확하고 효율적인 시료전처리방법을 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 축산물을 초고압초음파분해기로 전처리하기 위하여 분해용매를 선발한 결과 질산(20%, v/v)의 분해효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.
2. 미량금속 잔류분석을 위한 초고압초음파분해 최적조건은 고체상 축산물의 경우 분해온도 180°C, 압력 400PSI, 자기장 900W를 유지하였고, 액상 축산물은 각각 170°C, 300PSI 및 700W였다.
3. 개발된 분석법을 이용하여 실험실간 비교실험을

Table 5. The recovery and coefficient variation for solid sample from 3 laboratories

Trace element	Spiked level (ppm)	Recovery rate(%)				Coefficient variation(%)			
		Lab 1	Lab 2	Lab 3	Mean	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Mean
Arsenic	0.1	104.2	77.6	83.1	88.3	11.2	15.7	10.8	12.6
	0.25	96.5	80.3	89.4	88.7	8.7	10.2	10.3	9.7
	0.5	98.1	92.4	88.6	93.0	2.3	9.3	8.6	6.7
	1	97.9	98.1	101.3	99.1	2.5	5.4	7.4	5.1
Cadmium	0.1	89.7	78.3	79.1	82.4	5.7	10.6	8.2	8.2
	0.25	101.4	82.1	88.3	90.6	7.4	10.8	6.7	8.3
	0.5	91.5	92.3	96.2	93.3	3.8	9.8	4.7	6.1
	1	93.6	94.7	90.5	92.9	1.1	5.4	3.3	3.3
Mercury	0.1	102.9	108.5	92.3	101.2	14.5	19.3	13.8	15.9
	0.25	93.2	84.3	90.1	89.2	10.7	17.7	12.6	13.7
	0.5	97.8	89.2	91.1	92.7	6.6	15.4	10.9	11.0
	1	94.1	89.7	93.3	92.4	2.8	12.6	5.5	7.0
Lead	0.1	94.3	77.3	87.8	86.5	10.1	11.5	12.5	11.4
	0.25	97.5	80.9	86.4	88.3	7.3	10.9	8.3	8.8
	0.5	96.7	91.5	90.7	93.0	5.8	9.8	8.6	8.1
	1	94.6	94.4	92.5	93.8	2.1	9.1	5.3	5.5

Table 6. The recovery and coefficient variation for liquid sample from 3 laboratories

Trace element	Spiked level (ppm)	Recovery rate(%)				Coefficient variation(%)			
		Lab 1	Lab 2	Lab 3	Mean	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Mean
Arsenic	0.1	105.2	72.4	83.5	87.0	5.0	10.3	8.5	7.9
	0.25	100.7	81.7	88.8	90.4	6.2	9.8	7.2	7.7
	0.5	95.7	89.2	90.1	91.7	4.4	9.9	5.3	6.5
	1	101.5	93.5	95.3	96.8	3.2	7.1	4.2	4.8
Cadmium	0.1	85.4	77.6	79.6	80.9	7.3	11.4	7.9	8.9
	0.25	90.8	85.7	89.4	88.6	4.2	7.8	6.8	6.3
	0.5	95.1	94.8	92.7	94.2	4.3	7.9	6.4	6.2
	1	97.0	93.9	99.0	96.6	2.6	3.3	2.9	2.9
Mercury	0.1	94.3	81.2	87.1	87.5	8.2	15.1	7.3	10.2
	0.25	95.5	87.8	90.3	91.2	5.3	11.2	5.8	7.4
	0.5	92.2	85.6	89.6	89.1	2.8	10.9	5.1	6.3
	1	98.5	86.4	88.5	91.1	2.6	10.1	3.3	5.3
Lead	0.1	92.7	90.9	90.7	91.4	8.5	14.3	9.7	10.8
	0.25	95.4	92.1	94.4	94.0	8.1	10.2	9.9	9.4
	0.5	93.5	93.6	92.6	93.2	4.7	12.1	8.0	8.3
	1	98.2	95.2	93.1	95.5	4.8	9.1	6.5	6.8

실시한 결과 고체상 축산물중 비소, 카드뮴, 수은 및 납의 평균회수율은 각각 88.3~99.1, 82.4~93.3, 89.2~101.2 및 86.5~93.8%이었고 액상 축산물의 경우에는 87.0~96.8, 80.9~96.6, 87.5~91.2 및 91.4~95.5%이었다.

4. 정밀성의 척도인 평균 변이계수는 고체상 축산물의 경우 3.3~15.9%, 액상 축산물은 2.9~10.8%로 나타나 CODEX에서 권장하는 기준을 만족하는 양호한 수준이었다.

참고문헌

- 농림부. 축산물의 가공기준 및 성분규격, 144-155. 농림부. 과전. 1998.
- 박경수, 김선태. ICP/MS를 이용한 계란 및 건조돼지고기중 셀렌 분석을 위한 전처리 방법 연구. 분석과학기술학회지. 2001, **14(6)**, 465-470.
- 박승조, 팽성관, 장철현. 분석화학실험, 197-216. 동화기술, 서울, 1995.
- 정병곤. 해외연수보고서, 110-124. 국립동물검역소 서울, 1993.
- 조태행, 인영민, 박종명, 손성완, 남궁선, 박근식. 축산물중 미량원소의 잔류량조사. 농시논문집(가축위생편). 1990, **32**, 37-44.
- 최우성, 윤충순, 박대훈, 강충용, 신호철, 김진석. 카드뮴과 구리의 불꽃원자흡광분석을 위한 전처리 방법으로써 습식 및 건식회화의 비교. 한국수의공중보건학회지. 1997, **21**, 1-8.
- 최재성. 기기분석개론, 7-165. 신광문화사, 서울, 1998, 15.
- Bahri, L. E. and Romda, S. B. Arsenic poisoning in livestock. Vet. Human. Tox. 1991, **33**, 259-263.
- Binstock, D. A., Grohse P. M. and Gaskill, J. A. Development and validation of a method for determining elements in solid waste using microwave digestion. J. AOAC. 1991, **74**, 360-368.
- Codex Alimentarius. Resiues of veterinary drugs in foods: Validation guidelines. pp. 5-9. Codex Alimentarius, Rome, 1995.
- Craig, D. C., Salisbury, E. and Wayne, C. Multielement concentration in liver, kidney & tissue from five species of canandian slaughter animals. J. AOAC. 1991, **74**, 587-591.
- Doyle, J. J. and Spaulding, J. E. Toxic and essential trace elements in meat a review. J. Anim. Sci. 1978, **47**, 398-419.
- Ernest, H. and Patricia, E. L. Introduction to the Biochemical Toxicology. pp. 476-478, 2nd ed. Appleton & Lange Press, London, 1993.
- Ihnat, M. and Miller, H. J. Analysis of feed for arsenic and selenium by acid digestion, hydride evolution atomic absorption spectrophotometry. J. AOAC. 1977, **60**, 813-825.
- IUPAC. Harmonised Protocols for the Adoption of Standardised Analytical Methods and for the Presentation of Their Characteristics, pp. 1491-62, Pure & Appl. Chem, London, 1990.
- Korsrud, G. O., Meldrum, J. B. and Salisbury, C. D. Trace element levels in liver and kidney from cattles, swine and poultry slaughtered in Canada. Can. J. Comp. Med. 1985, **49**, 159-163.
- Malaiyandi, M. and Barrette, J. P. Wet oxidation method for the determination of submicrogram quantities of mercury in cereal grains. J. AOAC. 1972, **55**, 951-959.
- Margaret, E., Robert, S. and Parthaprtim, B. Trace minerals in edible tissues of livestock and poultry. J. AOAC. 1988, **75**, 615-625.
- Ullery, D. E. Analytical problems in evaluating mineral concentrations in animal tissues. J. Anim. Sci. 1977, **44**, 475-484.
- White, J. R. and Douthit, G. E. Use of microwave oven and nitric acid-hydrogen peroxide digestion to prepare botanical materials for elemental analysis by inductively coupled argon plasma emission spectroscopy. J. AOAC. 1985, **68**, 766-775.