

환경연구현장에서 인(P)영양성분의 신속측정을 위한 현장측정 kit의 활용연구 (Ⅱ)

이재성 · 김영승

한국과학기술연구원, 환경 · 공정연구부

A Study for the Rapid On-Site Detection Kit on the Measurement of Nutrient Phosphorus at Environmental Process Area (Ⅱ)

Jae Seong Rhee and Young Seung Kim

Division of Environment or Engineering Process, KIST
Sungbuk-gu Hawulgok-dong, Seoul, 136 791, Korea

The on-site detection kit by means of colorimetry was prepared as PO43--P(1), PO43--P(2) and PO43--P(3) for environmental process in the field. The feasible wavelength range of present system in conjunction with real sample from stream, river or play a lake has been shown 600~750 nm under the examination of standard spectra. The correlation coefficient(R) between analyte concentration and absorbance was satisfactory for accurate on-site detection kit showing over 0.989 during whole experimental cases. The comparison with ion chromatograph for labmade on-site detection kit has shown very promising results as 0.85 to 1.18 on the ratio of final analysis.

Key words : On-site detection kit, Orthophosphate, Environmental detection, Environmental monitoring

1. 서 론

환경에서 인성분(P)은 질소성분(N)과 더불어 수역의 부영양화의 원인이 되어 수원지에서 조류나 방선균의 발육으로 냄새가 나고 흐려진다. pH 8.5 이상의 수중이나 토양에서는 Na_3PO_4 으로 용존하고 갈슘이 많은 pH 8.5 이하에서는 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 로 되어 침전되고 pH 6 이하로 되면 용해도가 낮은 AlPO_4 , FePO_4 를 생성한다. 인은 정인산염(orthophosphates), 축합인산염(condensed phosphates), 유기결합인산염(organically bound phosphates)과 총 인산염(total phosphates)으로 구분되며, 용액상태, 입자상태 그리고 생체조직으로 존재한다.¹⁾

인(P)은 자연수와 폐수 내에 대부분 인산염(PO_4^{3-})의 형태로 존재하며 살아있는 생명체에서 발견된다. 인산염은 RNA와 DNA의 중요 부분이며 세포

막에서 phospholipid(인지질) 형태로 존재한다. 나트륨염($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 같은 축합삼인산염은 세척세제의 주요 인형태이다. 세제로서 인은 조류생활을 지속하게 하면서 인산염을 포함하는 폐수가 강, 호수의 하구에 유입되면 수생생물(조류는 제외)과 결국은 인간에게 해로운 영향을 미치게 된다. 인은 생명체의 성장에 필수적인 생명체의 1차 생산력을 제한하는 영양소이므로 대부분의 물에서 가장 중요한 성장인자로 작용하여 폐수유출, 농업관개배수, 또는 산업폐수는 광합성을 하는 수생 미생물의 성장을 촉진시킨다. 침전물은 여러 수생 지역에서 인의 이용성에 중요역할을 한다. 인은 탄소순환(광합성과 호흡)과 질소순환과 같이 자연계에서 순환을 한다. 인산염은 강우로 인하여 암석으로부터 서서히 용해되어 하천 및 수로로 운반된다. 용해된 인산염은 식물과 연관되고 먹이사슬에 의해 동물체내로 들

어오고 동물배설물과 사체로서 직접 환경으로 재 유입 된다. 매년 상당량의 인산염이 해양으로 유출 되어 많은 양의 인산염이 바다에 침전되고 해양저 질을 형성하고 있다. 침전물은 수중미생물에 의해 약간의 인산염으로 방출되며 나머지는 문히게 되어 자연상태에서 순환하게 된다.

인의 분석은 두 가지 단계를 거치게 되는데, 첫 번째 단계는 인의 모든 형태를 용해성 정인산염(dissolved orthophosphates)으로 변환시키는 분해 단계(oxidative digestion or hydrolysis)이며, 두 번째 단계는 용해성 정인산염을 색도로 정량하는 단계(colorimetric determination)이다. 인을 유형별로 측정할 때는 채수 즉시 시료를 0.45 μm membrane filter를 사용하여 여과시킨다. 시료를 장시간 보존할 때는 시료에 HgCl_2 를 40 mg/L 비율로 첨가하며, 인산염 분석을 위해서는 CHCl_3 나 acid 등의 보존제를 첨가하지 않도록 한다. 수중에 존재하는 인산염을 반응성 인(reactive phosphorus)이라고도 하는데, 분석시 가수분해 또는 산화분해를 필요로 하지 않는다. 주로 정인산염을 결정하며, 용해상태나 부유상태로 존재하는데 용해성 인과 부유상태의 인은 0.45 μm 의 membrane filter로 여과시켜 구분한다. 본 단계는 정인산염과 반응하여 발색하는 단계로서 정인산염 사용을 위한 비색법은 분해방법에 비해 간섭물질과 검출한계농도 물질에 의해 영향을 받는다.¹⁾

Vanadomolybdophosphoric acid법¹⁻⁴⁾은 ammonium molybdate가 산성 조건 하에서 정인산염과 반응하여 heteropoly acid와 molybdophosphoric acid를 형성한다. 여기에 vanadium이 존재하면 노란색의 vanadomolybdophosphoric acid를 형성하며, 노란색의 색도는 인산염의 농도에 비례한다. 측정에 크게 방해할 일으키는 물질로는 SiO_2 와 AsO_4^{3-} 이며, 약간의 방해를 주는 물질은 AsO_4^{3-} , F^- , Th , Bi , S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, CNS^- 와 과량의 MoO_4^{2-} 에 의한다. 푸른색은 Fe^{2+} 에 기인하는데 Fe^{2+} 의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하이면 결과에 영향을 미치지 않는다. S^{2-} 에 의한 방해는 Br water에 의한 산화로 제거할 수 있다. 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서도 방해를 하지 않는 이온은 Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} ,

Hg^+ , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , U^{4+} , Zr^{4+} , AsO_3^- , Br^- , CO_3^{2-} , ClO_4^- , CN^- , IO_3^- , SiO_4^{4-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (피로인산염), MoO_4^{2-} , $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, SeO_4^{2-} , $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$ (tartrate)등이 있다. 실험에 HNO_3 가 사용되면 Cl^- 은 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 방해작용을 한다. Vanadomolybdophosphoric acid 방법은 1~20 μg P/mL 농도범위에서 가장 유용한 분석방법으로 하수 또는 오염이 높은 폐수에 적합하다.

Stannous chloride 환원법^{1,5)}은 인산염 이온이 ammonium molybdate과 반응하여 생성된 molybdophosphoric acid를 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (염화제일주석)으로 환원하여 생성된 질은 청색의 molybdenum blue의 흡광도를 690 nm에서 측정하여 인산염 인을 정량하는 방법이다. 본 방법은 vanadomolybdophosphoric acid법보다 민감하여 흡수셀의 증장을 증가시키면 0.007 μg P/mL(7 ppb) 이하까지 측정이 가능하다. 0.1 μg P/mL 이하 측정을 위해서는 추출단계가 필요하며, stannous chloride 환원법은 0.01~6 μg P/mL 농도범위에서 유용한 분석방법이다.

Ascorbic acid 환원법^{1,6-20)}은 ammonium molybdate와 potassium antimonyl tartrate가 산성용액 속에서 정인산염과 반응하여 여러 종류의 heteropoly acid-phosphomolybdic acid를 형성시킨다. Phosphomolybdic acid는 ascorbic acid에 의해 환원되어 진한 청색의 molybdenum blue를 생성하며, 이를 880 nm에서 흡광도를 측정하여 인산염 인을 정량한다. 본 방법은 염화물, 황산염 등 다량의 염류를 포함하고 있는 시료에 적용할 수 있으며, 0.01~6 μg P/mL 범위에 있는 상수와 하천수에 적합한 분석방법이다. 그러나 AsO_4^{3-} (arsenate)는 molybdate용액과 반응을 하여 인산염의 경우처럼 푸른색을 형성한다. AsO_4^{3-} 의 농도가 0.1 μg As/mL 정도로 낮을 때 인산염 결정에 방해작용을 한다. Cr^{6+} , NO_2^- 는 방해작용을 통해 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 3% 낮게, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 10~15% 낮은 결과 값을 보인다. sulfide(Na_2S)와 silicate(SiO_4^{4-})는 1.0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도범위에서 간섭을 일으키지 않는다.

본 실험에서는 상기 방법을 응용하여 현장에서 신속히 편리하게 측정할 수 있는 현장발색시약을 ascorbic acid 환원제 및 molybdenum blue 방법을

이용하여 조제하고 성능평가 및 환경시료측정의 정확도를 실험하였다.

2. 실험방법

2.1. 인 성분의 측정방법

인산성 인($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)은 정인산 이온(PO_4^{3-})이 산성 용액 하에서 ammonium molybdate와 potassium antimonyl tartrate와 반응하여 heteropoly acid (phosphomolybdic acid)가 형성된다. phosphomolybdic acid는 ascorbic acid에 의해 환원되어 청색의 molybdenum blue를 생성하여 이를 UV/VIS로 측정하였다.

2.2. 인 성분의 측정을 위한 시약제조 및 test kit 사용방법

인산성 인 표준용액(0.01~10.0 ppm)과 3.5% NaCl 중의 표준용액(0.01~10.0 ppm), 그리고 방해이온(암모늄염, 아질산염, 질산염) 중의 표준용액(0.156~10.0 ppm)을 각각 제조하였으며, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (1), $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (2), $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (3) 측정시약의 최적조건의 농도를 결정하였다.

다음, 표준용액 5 mL를 시험용기에 각각 취하고 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (1) 5방울(0.25 mL), $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (2) 5방울(0.25 mL), $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (3) 5방울(0.25 mL)의 순으로 가하여 발색시킨 후, 약 10분간 상온(10~30°C)에서 방치한 다음, UV/VIS의 350~800 nm 파장범위에서 각각 흡광도를 측정하여 측정 가능한 파장을 정하였다.

3. 실험결과

3.1. 각 농도별 표준농도 발색사진 제작

인산성 인의 표준용액과 3.5% NaCl 중의 표준용액은 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ppm, 방해이온 중의 표준용액은 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10

ppm의 농도를 발색시켰다. Fig 1에 나타낸 반응메카니즘에 의한 인산성 인 성분의 반응된 표준용액의 사진을 Fig 2에 나타내었다.

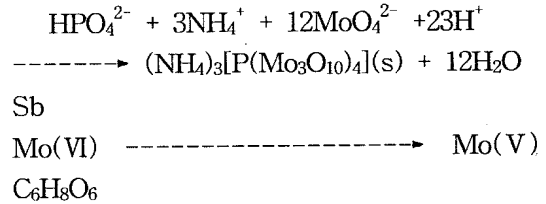


Fig. 1. The reaction mechanism of orthophosphate with molybdenum blue under the help of reduction process with ascorbic acid.

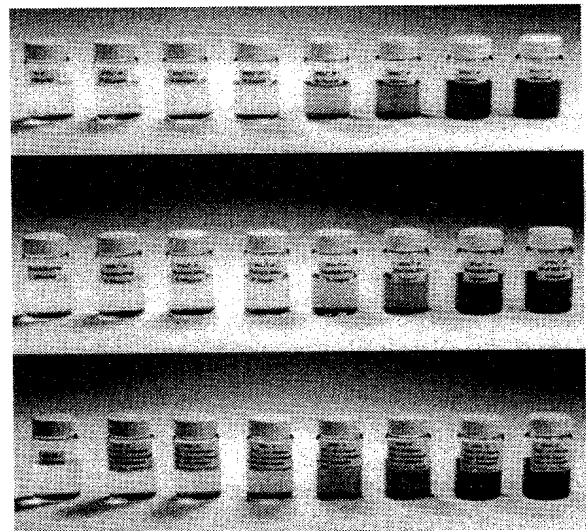


Fig. 2. The photographic result on various concentration of orthophosphate by means of lab-made on-site detection kit. Top photo represents for standard solution between 0.01ppm and 10.0 ppm orthophosphate include blank solution. Middle or bottom photograph include same range of orthophosphate in 3.5 % NaCl or interfering ions including ammonium, nitrite and nitrate respectively.

3.2. 표준용액의 농도에 따른 UV/VIS spectrum

각 성분들의 발색된 표준용액을 UV/VIS로 측정하여 스펙트럼을 확인하여 최대 발색파장(λ_{max}) 및 측정농도와 안정성 등을 고려한 측정 가능한 파장

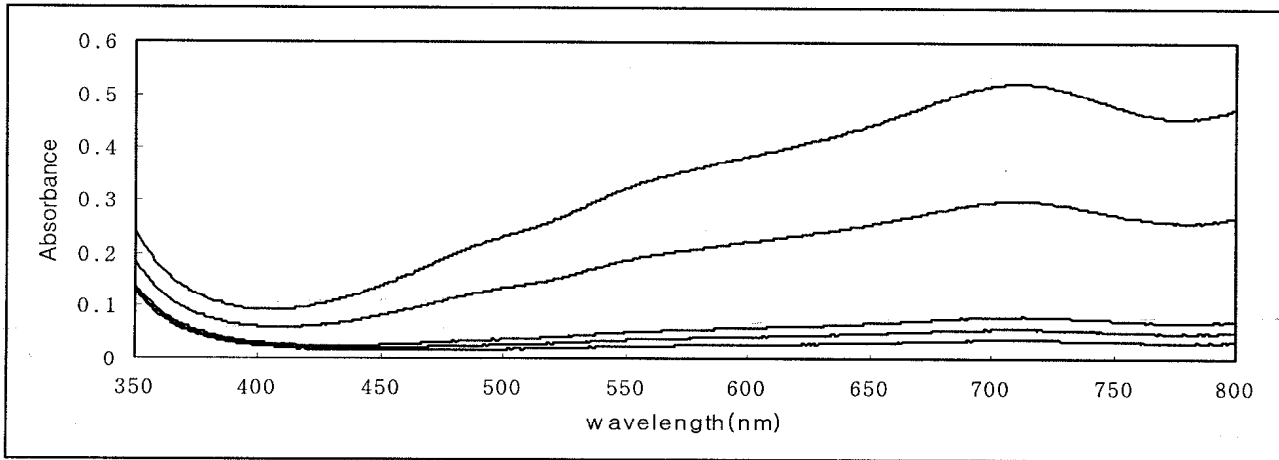


Fig. 3. The UV/VIS spectra of orthophosphate at 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 ppm as phosphorus with labmade detection kit after 10 min. reaction. The scan rate was 120 nm/min. with slit width 0.8 nm by Perkin Elmer Lambda 19.

600~750 nm(350~800 nm 파장범위, $\lambda_{max} = 710$ nm)의 파장범위가 적합하였다. 인산성 인의 표준 농도에 대한 반응 발색결과의 UV/VIS 스펙트럼을 Fig 3에 나타내었다.

3.3. 표준용액의 농도에 따른 각 이온들의 발색 검정곡선

각 성분의 표준용액과 3.5% NaCl 중의 표준용액, 그리고 방해이온 중의 표준용액에 대한 UV/VIS 스

펙트럼의 흡광도 값을 바탕으로 검정곡선을 작성한 결과, 인산성 인(3.5% NaCl 중의 표준용액)[660 nm]에 대한 R(상관계수)값이 각각 0.999(0.996), 0.997(0.998), 0.998(0.995), 0.989(0.986)의 값으로 상호 직선관계가 잘 성립됨을 알 수 있었다.

또한, 방해이온 중의 표준용액에 대한 R(상관계수)값이 0.995의 값으로 상호 직선관계가 잘 성립 되었으며 상호 방해이온에 의한 영향이 거의 없음을 알 수 있었다. 인산성 인의 표준용액에 대한 상 기 검정곡선을 Fig 4에 나타내었다.

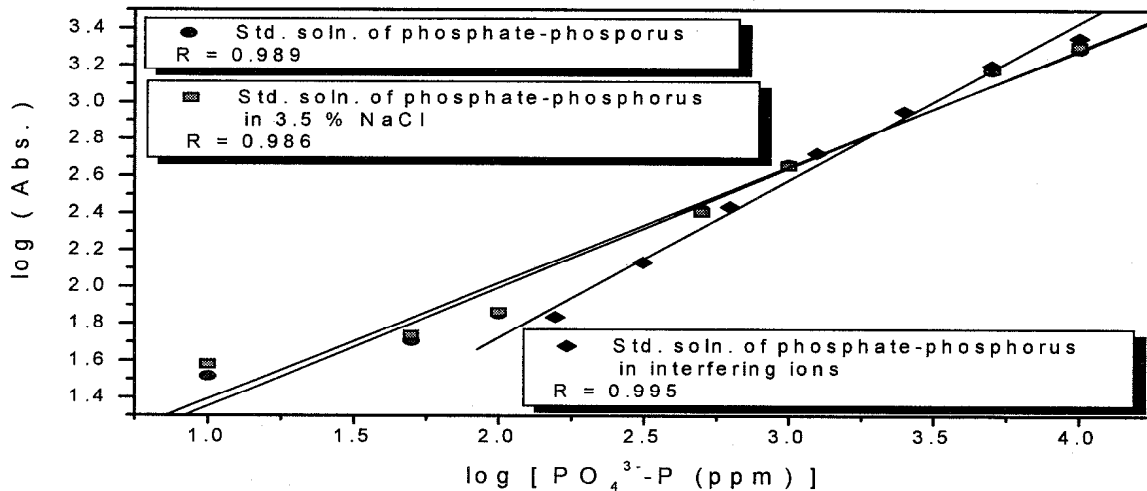


Fig. 4. The standard calibration curve of orthophosphate with lab-made on-site detection kit at 660 nm. Circle indicates the result from pure standard solution. Square and rhombus represent for the results with 3.5 % sodium chloride or interfering ions repectively.

3.4. 환경시료에 대한 test kit 측정값과 IC와의 비교

제조된 수질측정 키트의 UV/VIS spectra와 검정곡선의 결과를 바탕으로 현장에서 실용화할 수 있는 방법을 확인하기 위하여 실제 현장에서 채취한 축산폐수에 대해 정량 분석한 IC 측정값과 측정 키트에 의한 결과를 비교하였다. 축산폐수에 대한 비교 결과를 Table 1에 나타내었으며, 비교한 결과로부터 보면 수질측정 키트의 분석값과 IC를 이용한 농도측정값과의 비율이 0.855~1.176로써 상호 측정값이 근접하였다.

Table 1. The comparison of results between lab-made on-site detection kit and ion chromatograph for the determination of orthophosphate from waste drainage at stock farming. (unit: $\mu\text{g/mL}$)

Method	Lab-made detection kit (A)	Ion chromatograph (B)	Ratio (A)/(B)
Sample (stock waster water)			
1	100	108	0.926
2	75	85	0.882
3	100	85	1.176
4	75	64	1.172
5	100	117	0.855

* The high concentration of analyte has been measured by taking advantage of reaction kinetics.

* In the analytical process with lab-made detection kit, the color between two standard solution has compromised as middle concentration.

4. 결 론

비색법(colorimetry)을 활용한 환경공정현장에서 인산성 인($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)성분을 측정할 수 있는 신속 검지 kit를 phosphoantimonymolybdic acid 반응($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)을 이용하여 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}(1)$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}(2)$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}(3)$ 를 조제하였다. 조제된 시약을 이용한 인 성분의 발색 스펙트럼을 관찰하여 본 결과, 측

정 가능한 파장은 600~750nm 이었다. 인산성 인 성분의 표준용액에 대한 스펙트럼을 바탕으로 작성한 검정곡선에서 상관계수(R)는 0.989(660 nm)이 상으로 현장측정 kit로서의 정확성이 검증되었다. 조제된 현장측정 kit와 이온 크로마토그래프(IC)의 상호측정결과를 비교한 결과, 측정값의 비율이 0.85~1.18의 좋은 일치성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- 1) American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 1992, *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater*, 18th ed., pp. 4(108-117), A. E. Greengberg, L. S. Clesceri and A. D. Eaton, American Public Health Association, Washington, D. C., USA.
- 2) W. D. Basson, J. F. van Staden and P. M. Cattin, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1981, 307, 373-377.
- 3) R. B. Lew and F. Jakob, *Talanta*, 1963, 10, 322.
- 4) C. W. Gehrke, Ussary J. P. and Baumgartner J. H., *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, 1966, 49, 1213.
- 5) R. L. Benson, I. D. McKelvie, B. T. Hart, Y. B. Truong and I. C. Hamilton, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 326, 29-39.
- 6) A. Sjösten and S. Blomqvist, *Wat. Res.*, 1997, 31(7), 1818-1823.
- 7) J. D. Burton, *Wat. Res.*, 1973, 7, 291-307.
- 8) L. Drummond and Maher, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 302, 69-74.
- 9) J. E. Going and S. J. Eisenreich, *Anal. Chim. Acta*, 1974, 70, 95-106.
- 10) J. E. Harwood, R. A. van Steenderen and A. L. Kühn, *Wat. Res.*, 1969, 3, 417-423.
- 11) M. K. John, *Soil Sci.*, 1970, 109, 214-220.
- 12) D. L. Johnson and M. E. Q. Pilon, *Anal. Chim. Acta*, 1972, 58, 289-299.

- 13) S. C. Pai, C. C. Yang and J. P. Riley, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 229, 115-120.
- 14) T. G. Towns, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 223-229.
- 15) L. J. Lennox, *Wat. Res.*, **1979**, 13, 1329-1333.
- 16) David J. Malcolm-Lawes and Koon Hung Wong, *Analyst*, **1990**, 115, 65-67.
- 17) J. D. H. Strickland and T. R. Parsons, **1972**, *Practical Handbook of Seawater Analysis*, pp.49-52, Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- 18) T. R. Parsons, M. Yoshiaki and C. M. Lalli, **1984**, *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*, pp.22-25, Pergamon, Oxford.
- 19) T. A. H. M. Janse, P. F. A. van der Wiel and G. Kateman, *Anal. Chim. Acta*, **1983**, 155, 89.
- 20) Claudio Ciavatta, Livia Vittori Antisari and Paolo Sequi, *J. Environ. Qual.*, **1990**, 19, 761-764.