한국환경분석학회지 제10권 (제1호) 8~12, 2007
J. of the Korean Society for Environmental Analysis

퍼지-트랩 GC-MS를 이용한 어류 중 메틸수은 분석방법 연구

이정섭 · 류윤정 · 박재성 · 홍은진 · 강학구 · 전성환 · 김삼권* · 김영희†
국립환경과학원 무기물질분석연구과, *농업과학기술원 농업환경부

A Study of Analytical Method for Methylmercury in Fish Using Purge and Trap Gas Chromatograph-Mass Spectrometer

Jung-Sub Lee, Yoon-Jung Ryu, Jae-Sung Park, Eun-Jin Hong, Hak-Ku Kang, Sung-Hwan Jeon, Kim Sam-Cwan*, and Young-Hee Kim†

Inorganics Analysis Research Division, National Institute of Environmental Research, Kyungseo-dong, Seo-gu, Incheon 404-708, Korea
**Department of Agricultural Environment, National Institute of Agricultural Science and Technology, 249 Seodundong Kweonseonku, Suwon 441-857, Korea*

The determination of total mercury is frequently not sufficient for the assessment of toxicological impact because the toxicities, bioaccumulation properties and environmental mobilities of mercury are highly dependent on its chemical forms. Methylmercury is the form of mercury that presents the greatest risks to human health. The major pathway for human exposure to methylmercury is consumption of contaminated fish. In this study, the methylmercury analysis method, using dithizone extraction and P&T GC-MS, was validated by analyses of CRMs such as BCR 463 and IAEA 407. The determined MDL is 0.9 μg/Kg for biological samples. The freshwater fish were sampled from four main Korean rivers, including 13 kinds of 58 species and analyzed using P&T GC-MS and GC-ECD to validate the method. Methylmercury concentrations of predatory (high trophic level) fish such as Mandarin fish and Korean piscivorous chub were higher of 188.2~330.8 μg/Kg than polyphagia (low trophic level) fish such as common carp of 24.8~47.2 μg/Kg. The average ratio of methylmercury/total mercury concentrations was 82.5%.

Key words: Methylmercury, Dithizone extraction, Purge & Trap GC-MS, Sodium tetraethylborate

1. 서 론

수은의 주요 배출경로는 대기 중 원소상태 수은으로서, 환경 중에 방출되면 물, 토양 및 퇴적물에 침적되어 생물체에 가장 유해한 메틸수은으로 전환된다. 수질 및 토양의 전체 수은 농도 중 10~15%가 메틸수은의 형태로 존재하나, 저서식성 담수어류의 경우, 총수은의 80~90% 이상이 메틸수은이며, 사람의 경우, 메틸수은 총 노출량의 99% 이상이 어류에 의한 섭취인 것으로 알려져 있다[1]. 메틸수은의 위해성은 신경계통의 발달이 이루어지는 태아나 유아들에서 더 심각한 영향을 미치는 것으로 연구되었으며, 이러한 이유로 미국, 캐나다, 일본 등 선진외국에서는 임산부, 유아 등 민감 계층에 대해 메틸수은의 어류에 대한 섭취권고기준 및 물에 대한 환경기준 등을 설정하여 관리하고 있다.

미국 환경청에서는 수질기준으로 어류 중의 메틸수은 농도 (0.3 mg/Kg)로서 기준을 설정하고 있다. 어류 중의 메틸수은 농도가 수질오염의 지표로 사용되는 것은 우선 메틸수은의 위해성이 어류 섭취에 기인하는 바가 매우 크며, 어류의 경우 수은의 체내배출 반감기가 평균 100~200일 정도로 느리게 배출이 이루어지므로 환경변화 또는 계절적 변화에 따른 농도변화의 영향이 크지 않기 때문이다. 또한 물 중의 메틸수은 또는 수은의 농도가 너무 낮아 측정값의 불확도가 크고, 어류 농

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: heek89@me.go.ke

도와 물 속의 수은농도와의 뚜렷한 상관관계를 밝히기가 어려운 점 등을 그 이유로 들 수 있다[2]. 일반적으로 어류시료가 채취된 하천 및 호소의 수질 및 퇴적물 중의 수은 또는 메틸수은의 농도는 어류 중의 메틸수은 농도에 영향을 미칠 수 있으나, 정확한 상관관계는 밝혀진 바 없다. 어류 중의 메틸수은 농도에 영향을 미치는 것은 watershed의 분포형태, 수온, pH, sulfide의 농도 등이 복합적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 이에 대한 연구가 계속 진행 중에 있다[3]. 특히 어패류의 섭취가 많은 우리나라의 경우, 과학적 근거를 기초로 한, 어패류 섭취에 따른 메틸수은의 정확한 위해성 평가와 어류섭취 권고기준 설정 등, 신중하고 신속한 대응이 요구되며 이와 함께 수은의 효과적이고 종합적인 관리를 위해서는 총 수은뿐만 아니라 메틸수은의 정확한 분석기술이 요구되고 있다.

본 연구에서는 퍼지&트랩 기체크로마토그래프-질량분석기를 이용한 어류 중 메틸수은 분석방법을 개발하고 방법검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도를 구하였으며 인증표준물질 (CRM, certified reference materials) BCR 463 및 IAEA 407 분석을 통해 시험방법을 검증하였다. 또한 국내 주요 수계에서 채취한 담수어류 중의 총수은 및 메틸수은을 분석하고, 일본 국립미나마타병 연구소에서 개발한 기체크로마토그래프-전자포착검출기 (GC-ECD)를 이용한 시험방법[4]에 의한 분석결과와 비교하였다.

2. 시약 및 실험방법

2.1. 시약

본 연구에서 사용한 methylmercury chloride는 Aldrich사, dithizone은 Merck사로부터 구입하였으며 dithizone은 빛에 의해 쉽게 산화되어 불순물 피크를 생성시키므로 0.1N NaOH로 세정 후 사용하였다. 메틸수은 표준용액은 아세톤 (GC-MS용) 또는 톨루엔 (GC-ECD용)을 사용하여 10 ng/mL의 농도로 제조하고 빛을 차단해 냉장 보관하였다. 메틸수은-시스테인 용액 (1 ng/mL)은 0.1% L-시스테인 용액 5 mL와 메틸수은 표준용액 (10 ng/mL) 0.5 mL를 취하여 3분간 추출 후, 톨루엔 층을 제거하고 밀폐하여 보관하였다. Na_2S 용액은 Na_2S 0.15 g을 증류수 10 mL에 녹인 원액 (0.1 mL)을 사용 시마다 0.1 N NaOH 50 mL 및 에탄올 50 mL로 희석하여 사용하였다. Ethylation 시약으로 사용한 Sodium tetraethylborate $[NaB(C_2H_5)_4]$는 인화성이 강한 시약으로 공기 중의 수분에 의해 쉽게 발화하고 변질되기 쉽다. 따라서 이 시약은 분석 시마다 조제하여 사용하였다. 실험에서 사용된 모든 증류수는 수은오염을 최소화하기 위하여 Barnsted US/A56220-8을 이용하여 2번 증류한 3차 증류수를 사용하였다.

2.2. 메틸수은 분석기기 및 장치

본 연구에서 사용한 GC-MS 분석기기는 Agilent사의 6890N, 5973N GC-MS Model을 사용하였으며, 퍼지 트랩 장치는 Tekmar사의 Tekmar-Dohrmann velocity purge-trap을 사용하였으며, 트랩물질은 Tenax A (Suppelco), 퍼지 조건은 40°C에서 헬륨을 40 mL/mim의 속도로 15 min간 퍼지 하였으며 탈착 조건은 200°C/3 min, 300 mL/min이었다. GC 조건은 주입구 온도는 250°C이었으며, DB-5 MS (5% Phenylmethyl silicon gum, 0.5 mm × 30 m × 0.25 μm)을 이용하여 40°C부터 250°C로 15 °C/min의 속도로 가온하였다. 운반기체는 헬륨, 1 mL/min의 속도를 유지하였다. MS는 SIM Mode로 MeHgEt은 분자량(*m/z*) 202, 217, 246 이온들을, $HgEt_2$에 대해서는 분자량(*m/z*) 202, 231, 260이온들을 선택이온으로 정량하였다. 메틸수은의 잔류오염 유무를 확인하기 위하여, 1회 세척 후 증류수로 재분석하여 메틸수은 피크가 없음을 확인하였다.

GC-ECD 장비는 Shimadzu사의 GC-2010으로 GC 조건은 주입구 온도는 180°C, 오븐온도는 155°C에서 20 min.을, ECD 검출기는 200°C로 유지하였다. 운반기체는 질소, 40 mL/min를 유지하였다. GC column은 packed column으로 GL-Science사의 Hg-20A로 충전한 glass column (1 m × 3.0 mm 또는 2 m × 3.0 mm)를 사용하였다. Packed column 충전 시, 메틸수은-디티존화합물의 chloride화를 촉진하기 위해 충전제 상부 (주입구측)에, 500°C로 2~3시간 구운 NaCl을 2~3 cm 높이로 충전하였다.

2.3. 어류 시료채취

채취된 담수어종은 13어종, 58개 시료로 각각 한강 (10), 금강 (11), 낙동강 (23), 영산강 (14) 본류 및 호소에서 각각 6월과 9월에 채취되었다. 채취된 어류는 일시, 장소, 길이 및 무게를 기록하고, 가식부위만을 유리바이알에 옮겨 담은 후 총수은 분석 및 메틸수은 분석을 위하여 냉동 보관하였다.

2.4. 퍼지 & 트랩 GC-MS를 이용한 메틸수은 분석방법

가식부위를 해부용 가위로 잘게 썰어 균질화한 어류시료 1 g에 1N KOH-EtOH 용액 (10 mL)을 가하여 100 로 1시간 동안 가열하였다. 1 N HCl 용액 (10 mL)으로 중화하고 n-Hexane (5 mL)을 가하여 지방성분을 제거하였다. 20% EDTA 용액 (5 mL)을 가한 후, 0.01% 디티존-톨루엔 용액 (5~10 mL)으로 메틸수은을 추출하고, 남아있는 과잉의 디티존을 0.1 N NaOH 용액 3 mL를 넣어 제거하고, Na_2S 용액 (2 mL)으로 디티존-톨루엔 용액 속의 메틸수은을 물층으로 역추출하여 톨루엔층에 있는 불순물을 제거하였다. 이 용액 일정량 (20~500 μL)에 0.2M acetate buffer (0.5 mL)과 2% Sodium tetraethylborate (200 μL)을 가하여 ethylation 시킨 후 퍼지&트랩에 주입하고 GC-MS SIM Mode로 분석하였다.

2.5. GC-ECD를 이용한 메틸수은 분석방법

퍼지 & 트랩 GC-MS 분석방법과 전처리 및 정제과정은 동일하며, 역추출한 Na_2S 용액을 소량의 0.01% 디티존 (0.2~0.5 mL)으로 재추출 후, 0.1 N NaOH로 과량의 디티존을 제거하고, 1~2 방울의 1N HCl로 용액을 중성으로 처리한 후 GC-ECD로 정량하였다.

2.6. 총수은 분석

어류시료는 가식부위를 해부용 가위로 잘게 썰어 균질화한 후 약 0.5 g 씩 무게를 달아 수은자동분석기에 주입하여 어류 중 총수은의 농도를 분석하였다. 분석기기는 아말감 가열기화 방식의 수은자동분석기 (model SP-3D, Nioppon Inc. CO.)를 사용하였으며 운반기체는 purified dry air, 0.5 L/min를 유지하였다. Combustion tube는 250 → 850°C, 10~11 min, Gold amalgam 흡착조건은 120°C에서 10~12 min 및 850°C에서 1~2 min간 유지하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 퍼지 & 트랩 GC-MS 분석방법 확립

본 연구에서는 어류시료를 포함한 생체시료에 대해 효과적인 전처리방법을 도입하기 위하여 다양한 전처리방법을 시도하였다. 알칼리분해법으로는 25% KOH-methanol 또는 45% NaOH를 가하고 분해시킨 후 60 °C의 ultrasonic bath에 1시간 동안 가열하였으며, 산분해법은 4 M H_2SO_4 또는 1 N HCl을 가한 후 60°C의 ultrasonic bath에 1시간 동안 가열하여 전처리하였다[5]. 전처리한 생체시료 (혈액시료의 경우)를 분석한 결과, 45% NaOH를 사용한 알칼리분해법은 시료에 함유된 methylmercury를 거의 leaching 시키지 못해 생체시료 중의 methylmercury가 거의 검출되지 않았으며, 그 외의 전처리방법 또한 동일시료에 대한 methylmercury의 회수율이 60% 이하였으며, 회수율의 편차가 크게 나타나, 생체시료에 대한 효과적인 전처리 방법이 아닌 것으로 판단되었다. 그러므로 본 연구에서는 시료 중의 단백질을 1 N KOH-에탄올 용액으로 100°C로 1시간 동안 가열하여 분해하는 방법을 사용하였다[6].

일본 국립미나마타병 연구소에서 제시한 ECD 시험방법의 경우 단지 머무름시간 (retention time, RT)에 의해서만 물질을 확인하기 때문에 불순물에 의한 방해피크 존재 시 메틸수은의 정확한 정량이 불가능하다는 단점이 있으므로 본 연구에서는 기체크로마토그래피의 검출기로서 질량분석기 선택이온검출 (SIM) 방법을 사용한 분석방법을 개발하였다. GC-MS로 메틸수은을 분석할 때 가장 제약은 검출기로 MS를 사용하기 때문에 내경이 넓은 column을 사용할 수 없으므로 내경이 좁은 capillary column을 사용하여야 하는 것이다. 그러나 메틸수은은 상대적으로 높은 끓는점과 안정성이 낮은 극성 형태로 존재하므로 capillary column을 사용한 분리시 흡착에 의한 tailing, decomposition 등의 문제점을 야기한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 Sodium tetraethylborate ($NaBEt_4$)을 이용한 ethylation 반응을 통해 메틸수은을 열에 안정적이며, 휘발성을 갖는 비극성 화합물인 $CH_3HgC_2H_5$로 전환시켰다[7].

$$CH_3Hg^+ + Hg^{2+} + 3NaB(C_2H_5)_4 \rightarrow$$
$$CH_3HgC_2H_5 + Hg(C_2H_5)_2 + 3Na^+ + 3B(C_2H_5)_3$$

Ethylation 반응식에서 볼 수 있는 것과 같이 용액 중의 CH_3Hg는 $CH_3HgC_2H_5$로 전환되고 Hg^{2+} 또한 diethylation에 의해 휘발성 화합물인 $Hg(C_2H_5)_2$으로 전환된다. 일반적인 자연 환경 중에는 diethylmercury가 거의 존재하지 않기 때문에 검출된 $Hg(C_2H_5)_2$는 모두 Hg^{2+}로부터 기인하는 것으로 판단할 수 있어 이를 통해 Hg^{2+}의 정량분석에 응용할 수 있으나 본 연구에서는 검토하지 않았다. 그러나 Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 시료 중에 존재하는 Hg^{2+}에 기인한 피크를 크로마토그램 상에서 확인할 수 있었다.

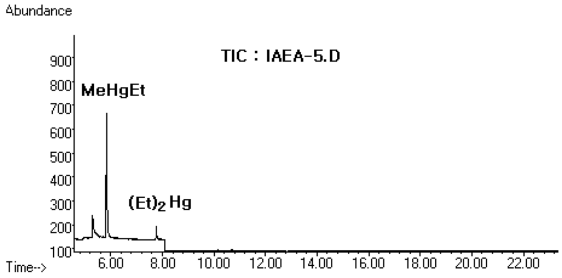

Fig. 1. Chromatogram of CRM IAEA 407.

3.2. 검정곡선 작성 및 방법검출한계 도출

GC-MS 및 GC-ECD시험방법의 검정곡선은 단계별로 표지한 메틸수은-시스테인 용액을 이용하여 시험방법의 절차를 따라 분석하여 얻은 값을 통해 작성하였다. GC-MS의 검정곡선의 r^2값은 0.995 이상으로, 교정계수의 RSD는 10% 이내였으며 GC-ECD의 경우, 검정곡선의 r^2값은 0.993 이상으로, 교정계수의 RSD는 8% 이내로 두 시험방법 모두 좋은 직선성을 나타내었다. 방법검출한계 및 정량한계는 5 μg/Kg의 메틸수은을 표지한 7개의 증류수 첨가시료를 시험과정과 동일하게 전처리 후 얻은 결과값의 표준편차에 student't 값인 3.14 및 10을 곱한값으로 GC-MS 시험방법의 방법검출한계 및 정량한계는 0.9 μg/Kg 및 2.9 μg/Kg이었으며GC-ECD 시험방법은 0.8 μg/Kg 및 2.3 μg/Kg 이었다. 정확도와 정밀도는 동일한 증류수 첨가시료의 회수율 및 상대표준편차로서 제시하였으며 GC-MS 시험방법의 경우, 각각 92.2% 및 4% 이었으며 GC-ECD의 경우, 94.4% 및 4% 이었다.

3.3. 인증표준물질 분석

시험방법의 검증을 위하여 인증표준물질 IAEA 407 (CRM for Hg and CH_3Hg determination in fish samples) 및 BCR 463 (CRM for CH_3Hg determination in tuna fish samples)을 분석하였으며 결과값은 Table 1에서와 같이 인증값 및 제시된 불확도 범위 내에서 잘 일치하였다.

3.4. 실제시료 분석

4대강 유역에서 채취한 강준치, 배스 등 13개 담수어종에 대한 총수은 및 메틸수은 분석결과를 Table 2에 제시하였다. 어류 중 총수은 농도는 끄리, 쏘가리, 강준치 등의 포식성 어류에서 216.1~413.1 μg/Kg으로 나타났으며, 잉어, 붕어, 향어 등의 잡식성 어류에서는 35.1~59.9 μg/Kg의 값을 보였다. 어류시료 중 메틸수은 농도는 퍼지 & 트랩 GC-MS 및 GC-ECD시험방법을 이용하여 각각 분석하였으며, 강준치, 끄리, 메기, 쏘가리 등의 포식성 어류에서 162.1~330.8 μg/Kg이었으며, 잉어, 붕어, 황어 등의 잡식성 어류의 메틸수은 함량은 24.8~47.2 μg/Kg의 값을 나타내었다. 두 시험방법 간의 메틸수은 결과값의 비는 0.69~1.23 (평균 1.00)으로 두 시험방법간의 분석결과의 편차는 거의 없는 것으로 나타났으며, 대부분의 시료에서 GC-MS 및 GC-ECD간 분석결과는 상대표준편차 15% 이내의 높은 정밀도를 보였다. 총수은에 대한 메틸수은의 평균 함량비는 GC-MS 및 GC-ECD에서 각각 82.5% 및 82.8%이었다. 지금까지 알려진 연구결과에 의하면 포식성 담수어류의 경우, 총수은의 80% 이상이 메틸수은으로 존재하는 것으로 나타난 바 있으며, 본 연구의 총수은에 대한 메틸수은 함량 결과는 이와 잘 일치되는 것으로 판단된다[8].

일반적으로 같은 어종 중의 메틸수은 농도는 어류의 크기, 즉 길이 또는 무게에 비례하여 증가하며, 수은이 축적되는 기간이 길수록 또한 증가한다. 이러한 어류 크기에 대한 메틸수은 농도변화의 영향을 알아보기 위하여, 본 연구에서 조사된 가물치, 끄리, 잉어 등의 주요 어종에 대해 무게별 메틸수은의 함량을 살펴보았다. Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 동일한 어종 내에서 어류 무게가 증가할수록 메틸수은의 농도가 증가하며 이에 대한 상관계수 (correlation coefficient) r 값은 배스의 경우를 제외하고는, 0.57~0.87로서 비교적 큰 상관관계가 있음이 나타났다.

Table 1. Determination of Methylmercury concentrations in CRMs by Dithizone extraction/P&T GC-MS method (mg/Kg, n = 7)

CRMs	Certified Value	Determined Value±SD	RSD (%)	Recovery (%)
IAEA 407	0.2 ±0.012	0.19±0.008	3.9	85~95
BCR 463	2.83±0.16	2.89±0.13	4.3	98~108

Table 2. Comparison of total mercury and methylmercury concentrations in freshwater fish

Species	No of samples	T-Hg (μg/Kg)	CH_3Hg (μg/Kg) [GC-MS]	CH_3Hg (μg/Kg) [GC-ECD[	MS/ECD (ratio)
Northern snake head	6	136.5± 62.4	102.3± 71.7	101 ± 73.5	1.01
Skygager	6	178.6± 75.7	175.7±118.7	162.1± 97.2	1.02
Korean piscivorous chub	5	357.9± 75.7	254.2± 68.2	269.3± 73.9	0.95
Skin carp	4	220.4± 90.3	226.1±159.9	215.1± 95.4	0.99
Carssius cuvieri	2	102.4± 69.9	125.1	128.6	0.97
Catfich	7	216.1±106.2	140.8± 82.3	188.2±139.4	0.77
Bass	9	116.6± 58.8	89.8± 53.3	90.7± 45.5	1.12
Crusian carp	2	59.9± 3.0	42.4	39.0± 6.3	1.23
Sharpbelly	1	153.4	77.0	83.7	0.91
Mandarin fish	2	413.1± 57.8	219.0± 45.7	330.3±137.1	0.69
Common carp	11	49.2± 34.4	50.3± 41.1	47.2± 37.9	1.13
Leather carp	2	35.1± 16.7	24.2± 10.2	24.8± 13.2	1.02
Japanese dace	1	183.16	141.4	139.8	0.99

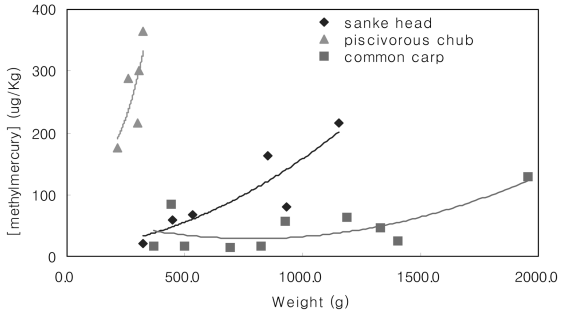

Fig. 2. Comparison between methylmercury concentrations and freshwater fish weights.

4. 결 론

본 연구에서는 퍼지&트랩 GC-MS를 이용한 어류 중의 메틸수은 분석방법을 제시하였으며, 국내 담수어류에 대한 총수은 및 메틸수은 농도를 조사하고 기존의 GC-ECD 분석방법과 비교한 결과, 두 시험방법간의 편차는 거의 없는 것으로 나타났다. 본 연구결과에서 제시된 어종별 총수은 및 메틸수은 농도는 채취한 어류 시료의 표본수가 크지 않으므로, 국내 담수어류에 대한 메틸수은 농도분포에 대한 대표성을 지니는 것으로는 볼 수 없으며, 분석된 모든 어류시료의 메틸수은 농도는 미국 식품의약국 (FDA, Food and Drug Administration)의 어류의 메틸수은 기준, 1 mg/Kg을 훨씬 미달하는 수준으로 본 연구에서 제시된 시험방법의 현장 시료에 대한 적용가능성을 확인하고자 하는 목적으로 분석되었다. 향후 미국, 일본 등 선진외국에서와 같이, 국내에서도 수은의 종합적이고 효과적인 관리 및 국민건강 보호 등을 위하여 본 연구결과로 도출된 시험방법을 활용한 물 및 어류 중 메틸수은의 지속적인 모니터링이 필요하다고 판단된다.

참고문헌

1. USEPA, **1997**. *Mercury Study Report to Congress*
2. USEPA, **2001**. *Water Quality Criterion for the Protection of Human Health : Methylmercury*, EPA-823-R-01-001
3. E. H. Kim, R. P. Mason, E, T. Porter and H. L. Soulen, *Marine Chemistry*, **2006**, *102*, 300-315
4. T. Suzuki and H. Akagi, **2004**, *"Mercury Analysis Manual"*, Ministry of Environment, Japan
5. A. M. Caricchia, G. Minervini, P. Soldati, S, Chiavarini, C, Ubaldi and R. Morabito, *Microchemical Journal* **1997**, *55*, 44-55
6. M. Logar, M. Horvat, H. Akagi and B. Pihlar, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, *374*, 1015-1021
7. Y. Cai and M. B. Josep, *Jr. of chromatography A*. **1995**, 113-122
8. USEPA, **2006**. *Draft Guidance for Implementing the January 2001 Methylmercury Water Quality Criterion*, Appendix E, EPA-823-B-04-001