

## Benzo[a]pyrene 분석용 토양 숙련도 표준시료 개발에 관한 연구 - 후보 표준물질의 인증을 위한 균질성, 안정성 평가를 중심으로 -

이민호<sup>1\*</sup> · 이군택<sup>1</sup> · 주창규<sup>1</sup> · 김용훈<sup>1</sup> · 이법열<sup>1</sup> · 최성현<sup>2</sup> · 김명옥<sup>2</sup> · 홍석영<sup>2</sup> · 김금희<sup>2</sup> · 이원석<sup>2</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 농생명과학공동기기원

<sup>2</sup>국립환경과학원

## A Study on the Development of Soil-based PTMs for Analysis of Benzo[a]pyrene - Focusing on the Evaluation of Homogeneity and Stability for the Certification of Benzo[a]pyrenecandidate Reference Materials -

Minhyo Lee<sup>1\*</sup> · Guntaek Lee<sup>1</sup> · Changkyu Joo<sup>1</sup> · Yonghun Kim<sup>1</sup> · Bupyoel Lee<sup>1</sup> · Sunghun Choe<sup>2</sup>  
Myeongock Kim<sup>2</sup> · Sukyoung Hong<sup>2</sup> · Gumhee Kim<sup>2</sup> · Wonseok Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Instrumentation Center for Environmental Management, Seoul National University

<sup>2</sup>National Institute of Environmental Research

### ABSTRACT

This study was implemented as a part of the experiment to develop two kinds of soil-based Benzo[a]pyrene (BaP) proficiency testing materials (PTMs) for soil analysis. A test was carried out for the check of solubility of the reference material (high purity reagent) using several solvents. Another test was also conducted for the evaluation of homogeneity and stability of two kinds of candidate soil reference materials. The test analysis of BaP in terms of the candidate materials was conducted according to the Standard Soil Analytical Methods by Ministry of Environment. Dissolution of the reference material was shown to vary depending on solvent type and was higher in the order of Dichloromethane > Acetone > Acetone/MeOH (9 : 1) > N-hexane. In addition, the slope on calibration curve for BaP standard solutions was largest on BaP standard solutions prepared with dichloromethane of the tested solvents. Such tendency appeared equally in the commercial BaP standard solution. Therefore, it is thought to be reasonable to use dichloromethane as the solvent in case of the standard stock solution that is used for the measurement of BaP concentration in soil. ISO 13528 and IUPAC protocol were used for verification of homogeneity on the two kinds of soil candidate materials, Both candidate materials were sufficiently homogeneous. Stability assessment of the two candidate materials was made according to ISO Guide 35 and the result showed that both batches did not have any long-term and short term stability issues that might occur during shipping. However, monitoring results of BaP concentration in soil showed that BaP concentration of the two batches measured at 15 days after the sample preparation was reduced by about 24~37% compared with that of the samples measured on 0 day of the sample preparation. Identification was done with several treatments such as irradiation and sterilization etc. The major cause was shown to be irradiation to the samples.

**Key words :** Proficiency testing materials (PTMs), Homogeneity, Stability, Candidate material, ISO 13528

### 1. 서 론

벤조에이피렌(Benzo(a)pyrene, BaP)은 5개의 벤젠이 고리로 이루어진 고분자 방향족탄화수소화합물로, 석탄타르 속에 다량 함유하고 있고 이 밖에도 자동차의 배기가스,

담배연기, 훈제식품 등에도 미량 함유하고 있어 환경 중에 광범위하게 분포하고 있는 유기오염물질 중의 하나이다. 또한, BaP는 환경 중에서 안정하며 발암성도 이들 탄화수소화합물중 가장 높은 것으로 알려져 있어, 미국 연방환경청에서는 우선관리 유기오염물질로 분류하고 있다

\*Corresponding author : leeminhyo3@snu.ac.kr

Received : 2014. 8. 1 Reviewed : 2014. 9. 4 Accepted : 2014. 9. 5

Discussion until : 2015. 2. 28

(Juhasz and Naidu, 2000). 국내에서도 토양오염으로 인한 국민의 건강과 환경의 위해를 방지하기 위해 토양오염 물질로 지정·관리하고 있다(MOE, 2012).

BaP는 토양에서는 8일 경과 시 53%~82% 정도가 분해되며, BaP의 미생물 분해는 강어귀 퇴적물에서는 3시간에 71%가 분해되는 것으로 알려져 있다. 또한, PAHs 물질의 독성은 햇빛 특히 UV-A에 노출되었을 때 더 크게 촉진된다(ChemYQ, 2014).

국내에서의 BaP에 의한 토양오염은 철도용 침목을 사용하고 있는 철도용지나 폐침목을 이용하고 있는 공원 및 공장용지 등에서 주로 나타나고 있으며, BaP에 대한 토양오염도 조사는 유독물의 제조 및 저장시설과 폐침목을 사용하는 지역에 한정하여 실시하고 있다(MOE, 2009a).

환경 측정분석의 경우 환경매체에 따라 전처리방법 및 존재하는 방해물질이 상이하여 단순히 표준용액에 의한 검정곡선의 정량만으로는 매체에 의한 분석결과의 변동을 정확히 확인할 수 없는 것이 사실이다. 특히, 토양은 암석의 풍화산물과 동식물의 유체(遺體)가 분해되어 생성된 유기물의 혼합체로, 그 자체가 매우 불 균질한 특성을 지니고 있다. 이에 따라 토양오염물질의 측정분석 시 매질을 반영한 표준시료의 비교평가는 반드시 필요하며, 특히, 시험시간 숙련도 평가 시 국제적인 적합성 차원에서도 환경매질을 반영한 숙련도 표준시료의 이용이 요구된다 하겠다.

환경부는 시험·검사 등의 운영체계를 확립하고 이의 유지·발전을 위하여 환경오염 측정기술의 정밀도 및 정확도 향상과 측정기기에 대한 국가측정표준에 대한 소급성 유지에 관한 사업을 하도록 규정하고 있다(MOE, 2009a). 이에 따라 국립환경과학원은 측정분석 정도관리 대상기관에 대한 분석능력향상과 숙련도평가방법의 국제적 적합성확보를 위해 환경매질을 반영한 표준물질 제조 방법의 개발 사업이 지속적으로 추진되고 있다.

국내에서의 토양분야에 대한 정도관리평가는 1980년대 후반부터 시행되고 있으며, 토양매질을 반영한 표준시료에 의한 숙련도 평가는 2010년 이전에는 중금속에 한정되었으나, 그 이후 BTEX 및 Bap 분석용 숙련도표준시료가 이 사업을 통하여 개발되고 있다.

본고에서는 Bap 표준시료 개발을 위한 연구의 일환으로 토양중 BaP의 정량성 평가의 일환으로 표준물질을 이용한 표준원액 제조 시 용매 선택의 적정성 및 용매 종류에 따른 검정곡선의 변동 등 BaP의 정량성에 영향을 주는 요인에 대한 실험과, 제조된 후보표준물질에 대한 균질성 및 안정성 평가를 실시하여 얻은 결과를 보고하고자 한다.

## 2. 연구내용 및 실험방법

### 2.1. 토양 BaP의 정량성에 미치는 영향 요인조사

#### 2.1.1. 벤조(a)피렌 표준원액 제조를 위한 적정 용매의 조사

본 실험에 앞서 표준물질을 사용한 BaP 표준원액을 제조하고자 토양오염공정시험 기준(MOE, 2009b)에 따라 노말 헥산을 사용하여 고순도 시약인 표준물질을 용해하기 위해 수회에 걸쳐 실험을 실시하였으나 노말 헥산에 표준물질이 완전 용해되지 않음을 확인하였다.

따라서, 표준물질을 사용한 BaP 표준원액 제조 시 적정 용매를 선별하고자 디클로로메탄과 아세톤, 그리고 본 실험실에서 조제한 아세톤/에틸알콜(9:1) 혼합용액과 대조의 개념으로 노말 헥산을 포함하여 총 4종의 용매를 대상으로 표준물질에 대한 용해 정도를 3단계에 걸쳐 조사하였다. 이때 본 시험에 사용한 디클로로메탄과 아세톤은 토양 BaP 시험기준(MOE, 2009b)의 전처리 과정에서 사용되는 용매이다.

1 단계는 공정시험기준에서 제시된 20 mL 부피 플라스크에 표준물질을 정밀히 취하여 넣고 여기에 4종의 용매를 각각 사용하여 처리 별로 이들 용매를 일정량 씩 넣고 10분 이상 충분히 흔들어 주면서 해당 용매로 표시까지 채운 후 용해정도를 육안으로 확인하였다.

2 단계에서는 1단계에서 완전 용해되지 않은 처리에 대해 용기를 수욕상(실온)에 놓고 5분간 44 Khz/s로 초음파 처리한 후 육안으로 확인하였다. 또한, 3 단계에서는 1, 2 단계에서 완전 용해되지 않은 처리에 대해 50°C 수욕 상에서 10분 간 열을 가한 후 육안으로 용해정도를 확인하였다. 3단계의 가온 처리는 PAHs 물질은 가온상태에서 용해도가 증가한다는 자료(Whitehouse, 1984)에 근거하였다. 본 실험에 사용된 표준물질은 Supelco 사의 제품(순도 99.9%)을 사용하였다.

#### 2.1.2. 용매 조성이 다른 BaP 표준원액별 검정곡선의 비교

2.1.1의 1, 2 단계 처리를 통해 표준물질이 완전 용해된 디클로로메탄, 아세톤 및 아세톤/MeOH(9:1) 등 3종의 용매를 사용하여 BaP 표준원액을 제조하고, 이와 함께 용매에 따른 표준물질과 상업용 표준물질(원액)과의 차이 여부를 확인하기 위하여 미국 AccuStandard사에서 판매하는 디클로로메탄과 아세톤을 용매로 한 2종의 BaP 표준원액도 함께 포함하였다.

이들 원액으로부터 검정곡선 작성용 표준용액(0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L 및 1.0 mg/L)을 제조하여 GC/MS

(Agilent Technologies, 5795 C)에서 표준용액 농도별 각 1점씩을 측정하여 기율기를 조사하였다. 이때 검정곡선은 상대검정곡선법에 의해 작성되었으며 가로축에 BaP 농도와 내부표준물질(pyrene-d<sub>10</sub>) 농도의 비를 취하고 세로축에는 BaP 성분의 지시 값과 내부표준물질 지시 값의 비를 취하여 작성하였다(MOE, 2009b).

## 2.2. 토양 숙련도 후보물질의 제조

### 2.2.1. 후보 물질 제조

BaP의 오염이 없는 것으로 판단되는 밭토양(수원시 서둔동 소재 서울대 농장)을 소재로 정하고, 표토층(깊이 0~30 cm)를 일정량 채취하여 음건상태에서 풍건한 후 2 mm체로 체거름 하고 이를 80°C 건조기에서 수분 함량이 1% 이내가 되도록 건조하였다. Air zet mill(Pulverisette 14, 04-626C-WC)을 이용하여 토양의 입자 크기가 100 μm 이하로 미 분쇄 하고, 이중 20 kg을 취하여 배치당 10 kg씩 후보 표준물질(BaP-I, BaP-II) 제조용 시료로 사용하였다.

후보소재에 대한 BaP 첨가는 고순도 BaP 시약(SUPELCO사, 순도 99.9%)을 구입하여 사용하였고, 이때 배치별 토양내 BaP의 농도는 토양에 대한 중량비로 BaP-I 배치는 3~4 mg/kg, BaP-II 배치는 5~6 mg/kg가 되도록 BaP 첨가물질을 Dichloromethane에 각각 용해한 후 후보소재에 첨가하였다. BaP 물질의 균질한 흡착을 위해 충분히 교반하고 하룻밤 숙성한 후 용매를 hume hood에서 날려 보냈다. 용매를 날려 보낸 건조 시료는 V-Mixer(대가시스템, DGVM-60)에 넣고 회전속도 15 rpm에서 10시간 혼합 하였다. 균질화한 시료는 125 ml 갈색 병에 50 g 씩 소분 병입하고, <sup>60</sup>Co 선원으로 20 kGy의 감마선을 조사하여 멸균하였다. 방사선 조사가 끝난 후보물질은 종이 박스에 담아 -20°C로 유지되는 시료 보관용 대형 냉동고에 보관하였다.

### 2.2.2. 후보물질의 화학적 특성 및 입도분석

토양의 화학적 특성 분석을 위해 pH, 수분함량(MOE, 2009b)과 총 유기탄소(NAAS, 2010) 및 강열감량 분석(MOE, 2014)을 실시하였다. 이들 성분을 분석결과 pH는 활 산성이 7.1, 잠재 산성이 6.1 정도로 비교적 중성에 가까운 성질을 나타내었다. 총 유기탄소함량은 0.9%, 강열감량이 4.4%을 나타냈으며, 수분함량은 0.9% 정도였다.

한편, 이들 후보물질에 대한 입자의 크기 분포와 입자 크기 분석에는 입도분석기(Partica LA-950V2, Horiba, 일본)를 이용하여 습식법(KS L 1614, 2001)으로 측정하였

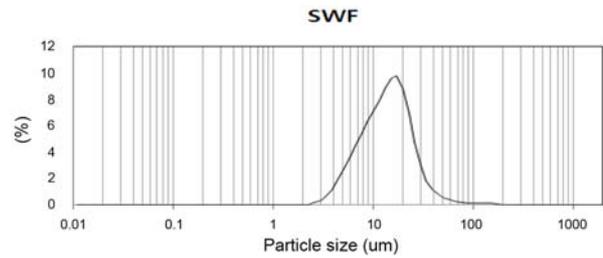


Fig. 1. Particle size distribution of soil candidate PTMs.

고, 비표면적 분석에는 기공분포측정기(Micromeritics ASAP 2420)를 이용하여 기체 흡착 BET 법에 의한 세라믹 분말의 비표면적 측정방법(KS L ISO 18757, 2012)에 따라 측정하였다.

후보물질의 입도분포를 측정한 결과는 Fig. 1과 같으며, 평균입자 크기는 13.1 μm(5.7~150 μm)였고, 입자의 비표면적은 7.05(m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)로 2:1 광물중 비표면적이 제일 적은 kaolinite 토양의 비표면적인 7~30(m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)의 범주에 포함되는 수준이었다(Kim et al., 2006).

### 2.2.3. 후보물질의 BaP 분석

후보물질의 균질성 및 안정성 평가를 위한 시료중 BaP의 함량 분석은 토양오염공정시험기준(MOE, 2009b)에 따라 실시하였다. 측정값에 대한 소급성 확보를 위한 PRM은 미국 AccuStandard 사의 BaP CRM(APP-9-020-D-20X, Solvent : Dichloromethane)을 사용하였으며, 이때 검량선은 내부표준물질로 pyrene-d<sub>10</sub>을 이용하여 상대검정곡선 방법으로 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선의 직선성은 결정계수 r<sup>2</sup> 값이 0.998 이상으로 양호한 상관관계를 나타내었다.

## 2.3. 균질성 및 안정성 실험

### 2.3.1. 균질성 실험

본 연구에서 제조된 토양표준물질의 균질도 조사는 KS Q ISO 13528(2009) 및 KS A ISO Guide 35(2005)에 규정된 절차에 따라 실시하였고, 두 배치(BaP-I, BaP-II) 시료에 대한 균질성 평가는 KS Q ISO 13528(2009) 및 IUPAC protocol(Thompson et al., 2006)의 방법으로 실시하였다.

먼저 선정된 11병의 시료로부터 두 개의 시험용 시료를 취한 다음 전체 시험용 시료(Test portion)를 반복성 조건 하에서 측정하여 각각에 대한 측정결과를 얻었다. 이들 결과를 이용하여 KS Q ISO 13528(2009)에서는 아래 수식 (1)~(6)을 이용하여 그 결과로부터 병내 균질도(within-

bottle homogeneity,  $s_w$ ) 및 병간 균질도(between-bottle homogeneity,  $s_b$ )를 산출한다.

균질도 조사로 부터 얻어진 데이터를  $x_{t,k}$ 라 할 때[여기서,  $t$ 는 시료를 의미하며( $t=1, 2, \dots, n_s$ ),  $k$ 는 시험용 시료를 의미( $k=1, 2$ )], 각 시료들의 평균( $\bar{x}_{t..}$ ), 시험용 시료간 범위( $w_t$ )전체평균  $\bar{x}_{...}$ 를 각각 식 (1)~식(3)과 같이 정의하면, 시료평균들의 표준편차( $s_x$ ), 병내 균질도( $s_w$ ) 및 병간 균질도( $s_b$ )는 각각 식(4)~식(6)과 같이 산출된다.

$$x_{t..} = (x_{t,1} + x_{t,2})/2 \quad (1)$$

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (2)$$

$$\bar{x}_{...} = \sum x_{...} / n_s \quad (3)$$

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t..} - \bar{x}_{...})^2 / (n_s - 1)} \quad (4)$$

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / 2n_s} \quad (5)$$

$$s_b = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)} \quad (6)$$

이때 숙련도 시료로 사용되는 시료 간 균질도 평가는 병간 균질도( $s_b$ )가 해당 숙련도평가에 사용될 표준편차( $\sigma_{pa}$ )와 비교하여  $s_b \leq 0.3 \sigma_{pa}$  조건을 만족하면 해당 시료가 적절한 균질성을 가지는 것으로 판단하고 있다.

한편 IUPAC protocol(Thompson et al., 2006)에서의 균질성 평가는 병내 균질도( $s_w$ ) 및 병간 균질도( $s_b$ )의 분산의 값을 이용하며, 균질성의 평가 기준은 균질성 평가에 사용되는  $F_1$ 과  $F_2$ 의 값을 표에서 찾아 수식 (10)에서의 임계치( $c$  값)를 산출하여 병간 균질도( $s_b$ )값이  $c$  값보다 적으면 균질성은 충분한 것으로 판정하고 있다.

$$s_w^2 = \sum W_t^2 / 2n_s \quad (7)$$

$$s_b^2 = (s_x^2 - s_w^2) / 2 \quad (8)$$

$$\sigma_{all}^2 = (0.3 \times \sigma_p)^2 \quad (9)$$

$$c = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 s_{an}^2 \quad (10)$$

### 2.3.2. 안정성 실험

시료의 안정성은 현장실험실에서 이용과정에 따른 장기 안정성과 운송과정에서 예상될 수 있는 온도변화에 따른 단기안정성으로 구분하여 실시하였다. 장기안정성은 제조된 토양 숙련도 후보물질을 초저온(-20°C)에 보관하고 1개월, 2개월, 4개월, 6개월이 경과한 시점에서 시료를 3개씩 꺼내어 각 시료마다 5회 반복 측정하였으며, 단기 안

정성은 4°C에서 0.5개월 보관하는 경우를 가정하여 0.25개월과 0.5개월이 경과한 시점에서 기준온도(-20°C)와 4°C의 온도 조건별로 시료를 3개씩 꺼내어 각 시료마다 5회 반복 측정하였다.

시료의 장기안정성 평가는 측정결과로부터 회귀분석을 이용하여 확인하였고(KS A ISO Guide 35, 2005)고, 단기안정도 평가는 기준온도(-20°C)와 4°C의 온도 조건별로 농도 차이를 조사하여 안정도 여부를 판단하였다(Bcr information, 1993).

이때 기간별 안정성에 대한 유효성의 확인은 회귀분석을 통한 t-검정을 실시하여 아래와 같은 수식(11)을 통해 Student-t factor와 직선의 기울기의 불확도( $sbI$ )의 곱이 5% 유의 수준에서  $|bI|$ 보다 크거나 같을 경우, 그리고 5% 유의 수준에서 P값이 대부분 0.05보다 클 경우에는 각 온도조건에서 숙련도 후보물질이 큰 변화가 없는 것으로 판단한다(KS A ISO Guide 35, 2005).

$$|bI| \leq t\text{-factor (95\%, n-2)} \cdot sbI \quad (11)$$

시료의 단기안정성과 관련하여, 운송조건에 대한 시료의 안정 여부는 보관온도와 운송온도 조건에 따른 측정결과로부터 단기 운송 안정도 인자( $R_T$ )와 불확도( $U_T$ )를 구하여  $R_T + U_T$ 와  $R_T - U_T$  범위내에 1을 포함하는지의 여부로 판단하였다. 이때  $R_T$ 와  $U_T$ 는 3개 시료 측정결과와 평균과 변동(coefficient of variation, CV)로부터 구하며, 두 보관 조건에서 -20°C 보관 시료는  $\bar{X}_T$ 와  $CV_{-20}$ , 4°C 보관시료는  $\bar{X}_{4^\circ\text{C}}$ 와  $CV_{4^\circ\text{C}}$ 라 하면 두 조건에서의 평균값의 비( $R_T$ )와 온도에 따른 불확도( $U_T$ )는 다음과 같이 구하였다.

$$R_T = \bar{X}_T / \bar{X}_{4^\circ\text{C}} \quad (12)$$

$$U_T = \left( CV_T^2 + CV_{4^\circ\text{C}}^2 \right)^{\frac{1}{2}} \cdot R_T \quad (13)$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 토양중 BaP의 정량성에 영향을 미치는 요인 조사

#### 3.1.1. BaP 표준원액 제조를 위한 적정 용매의 조사

검정곡선 작성용 BaP 표준원액 조제를 위한 적정 용매를 선발하기 위해 디클로로메탄, 아세톤, 아세톤/메틸알콜(9:1) 및 노말 헥산 등 4종의 용매를 대상으로 3단계로 표준물질에 대한 용해 정도를 조사하였다.

1단계에서는 표준물질에 용매를 일정량 씩 가하고 흔들



Fig. 2. Photograph on dissolution of high purity reagent BaP by different solvents used for preparing BaP standard stock solution.

어 주면서 용해정도를 확인한 결과, 디클로로메탄 용매 처리에서는 표준물질이 완전 용해되었고, 아세톤과 아세톤/메틸알콜(9:1) 용매 처리는 용액이 투명한 연한 녹색을 띄면서 용해되었으나 표준물질이 완전 용해되지 않고 일정량이 침전되었으며, 노말 헥산 용매 처리에서는 용액이 흐린 녹색을 띄면서 상당량의 표준물질이 용해되지 않고 침전되었다.

2 단계에서는 1 단계에서 완전 용해되지 않은 아세톤, 아세톤/메틸알콜(9:1) 및 노말 헥산 등 3종 용매에 대해 초음파 처리를 한 후 각 처리별 표준물질의 용해 정도를 확인한 결과, 아세톤 과 아세톤/메틸알콜(9:1) 용매 처리에서는 표준물질이 완전 용해되었으나 노말 헥산 용매 처리에서는 큰 변화가 없었다.

3 단계에서는 1, 2단계에서 상당량의 표준물질이 용해되지 않은 노말 헥산 용매 처리에 대해 50°C 수욕 상에서 10 분간 가열한 결과 2단계에서와 같이 용해되지 않았다.

Fig. 2는 용매의 종류별 표준물질의 용해정도를 사진으로 나타낸 것으로 노말 헥산(4)은 3단계 처리에서도 표준물질이 완전히 용해되지 않고 부피 플라스크의 바닥에 침적되어 있는 것을 볼 수 있었다.

이상의 결과로 보아 노말 헥산 용매의 경우 1,2,3 단계의 처리에서도 표준물질이 완전 용해되지 않아 BaP 표준원액 제조용 용매로는 적합하지 않은 것으로 판단되며, 이에 따라 BaP의 표준원액 제조에 노말 헥산을 용매로 사용하여도록 한 규정(MOE, 2009b)은 재 검토가 되어야 할 것으로 판단된다.

### 3.1.2. 용매 조성이 다른 BaP 표준원액별 검정곡선의 비교

용매를 달리하여 제조한 BaP 표준원액을 사용하여 검정곡선을 작성할 때 용매의 종류에 따라 검정곡선이 달라지는지 여부를 확인하기 위해 3.1.1의 3 단계 처리를 통해 표준물질이 완전 용해된 디클로로메탄, 아세톤 및 아

세톤/MeOH(9:1) 등 3종의 용매를 이용하여 BaP 표준원액을 제조하고, 이와 함께 디클로로메탄과 아세톤 등 2종의 용매로 제조된 상업용 표준원액을 구입하여 총 5종의 표준원액을 대상으로 검정곡선 작성용 표준용액을 제조하여 용매 종류별 검정곡선 상의 기울기를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

표준원액 제조 처리에서의 용매 종류별 검정곡선상의 기울기의 크기는 Dichloromethane(DCM) > Acetone/MeOH(9:1) > Acetone의 순으로 DCM 용매 처리가 Acetone이나 Acetone/MeOH(9:1) 용매 처리에 비해 크게 나타났다. 또한, 상업용 표준원액에서도 비록 표준원액 제조 처리에 비해 기울기의 크기는 다소 차이가 있으나 DCM 용매 처리가 Acetone 용매 처리에 비해 기울기가 크게 나타나 표준물질 제조 처리와 같은 경향을 나타냈다.

이와 같이 DCM 용매가 타 용매에 비해 기울기가 크게 나타나는 것은 기기 상에서 BaP 성분의 기기 지시 값이 높게 나타난데 기인한 것으로 보인다. 동일한 기기조건에서 용매의 종류에 따라 BaP 표준용액의 검정곡선 상의 기울기의 크기가 서로 달라지는 원인에 대해 상업용 BaP 표준물질 제조사에 질의한 결과 용매에 따라 GC/MS의 injection port에서 용매의 팽창(solvent expansion)에 기인되는 것이라는 회신을 받은바 있다. 그러나 이러한 원인을 정확히 규명하기 위해서는 추후 더 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

위의 실험결과로 보면 BaP 표준원액의 제조에 사용된 용매의 종류에 따라 검정곡선 상의 기울기가 달라짐으로써 검정곡선을 이용해 얻어지는 시료중의 BaP의 농도는 차이가 날 수 있어 BaP 표준원액을 제조하여 사용하거나 상업용 표준원액의 구입 시에도 BaP 분석에 적합한 용매의 선택이 중요한 것으로 판단된다.

이와 관련하여 디클로로메탄 용매는 본 실험에서 제시된 타 용매에 비해 표준물질에 대한 용해력이 크고, 기기 상의 BaP 성분의 기기 지시 값이 높게 나타나 검정곡선

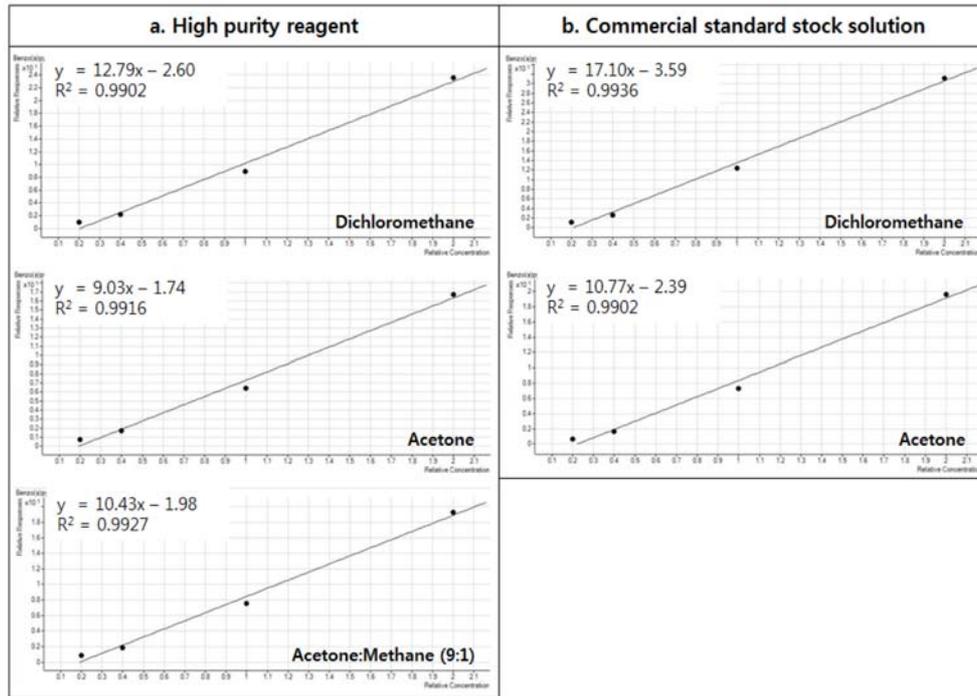


Fig. 3. Comparison of calibration curve by different BaP standard stock solutions prepared using various solvents.

상의 기울기가 크게 나타났으며, BaP 분석을 위한 시료의 최종 검액을 만드는데 사용되는 용매이다(MOE, 2009b). 따라서 토양중 BaP 분석을 위한 BaP 표준원액을 제조 시 디클로로메탄 용매의 사용이 합당할 것으로 판단되며 상업용 BaP 표준물질 사용 시에도 해당 용매로 제조된 것을 사용하는 것이 바람직 한 것으로 판단된다.

3.2. 균질성 평가

숙련도 표준시료에 대한 균질성은 KS Q ISO 13528 (2009) 및 IUPAC protocol(Thompson et al., 2006)에 따라 평가하고 있다. KS Q ISO Guide 13528(2009)은 균질성 평가 시 발생할 수 있는 이상치에 대한 조치나 병내 균질도의 허용한계에 대한 규정이 없어 적용성에 한계성을 가지고 있는 것이 사실이다. 반면, IUPAC protocol (Thompson et al., 2006)은 측정값 중 이상치의 유무를 확인하고, 병내 균질도( $s_w$ )는  $0.5 * \sigma_{pa}$  값보다 작아야 한다는 요건( $s_w/\sigma_{pa} < 0.5$ )을 제시하고 있어, KS Q ISO 13528(2009)를 보완한 측면이 있다.

숙련도 평가에 사용되는 대상 물질에 대한 숙련도 표준 편차( $\sigma_{pa}$ )의 결정은 KS Q ISO 13528(2009)에서는 여러 가지 방법을 제시하고 있으며, 본 연구에서는 외국의 국가 측정연구기관에서 적용하고 있는 숙련도 표준편차(일명 목표 표준편차)를 참고하여 우리 실정에 맞게 적용하

고자 하였으며, BaP 항목에 대한 토양 숙련도프로그램을 운용하고 있는 독일의 BAM은 숙련도 표준편차( $\sigma_{pa}$ )를 12%로 적용하고 있다(PROFEA, 2009). 그러나 본 연구에서는 BaP 물질의 토양 내 불안정성과 해당물질의 토양 숙련도 프로그램에서의 최근 도입 등 제 여건을 감안하여 숙련도 표준편차( $\sigma_{pa}$ )를 15%로 설정하여 적용하였다.

이를 토대로 두 배치의 숙련도 후보 표준물질(BaP-I 및 BaP-II)에 대해 KS Q ISO 13528(2009) 및 IUPAC protocol(Thompson et al., 2006)에서 제시한 방법에 따라 병간 균질성을 평가한 결과는 Table 1과 같다.

평가 결과 두 배치의 후보물질에 대해 KS Q ISO 13528(2009)과 IUPAC protocol(Thompson et al., 2006)에서 제시한 기준과 비교해 보면 모두 적합한 것으로 나타났다. 한편, BaP-I 배치에서의 병간 균질도( $s_b$ )의 값은 KS Q ISO 13528(2009) 평가에서는 N으로 표기되어 있으며, 이는 측정반복의 분산이 시료의 불 균질성에 의한 분산보다 커서 음의 값을 갖는 경우로, 불 균질한 정도가 가려진 상태이다.

시료 반복간의 불 균질성 정도에 대한 판단기준은 KS Q ISO 13528(2009)에서는 없는 반면, IUPAC protocol (Thompson et al., 2006)에서는 측정반복과 관련된 병내 균질도( $s_w$ )가 숙련도 표준편차의 0.5배( $0.5 * \sigma_{pa}$ ) 값보다 작으면 해당 시료는 균질한 것으로 평가하고 있다( $s_w/\sigma_{pa}$

**Table 1.** Summary of homogeneity test results for soil candidate PTMs

		Mass fraction (mg/kg)	
		BaP-I	BaP-II
KS A ISO 13528	Average	3.67	5.23
	$s_x$	0.09	0.10
	$s_w$	0.17	0.11
	$s_b$	N*	0.06
	$0.3\sigma$	0.17	0.24
	$s_b \leq 0.3\sigma$	Accept	Accept
IUPAC proocol	$s_w^2$	0.03	0.01
	$s_b^2$	0.01	0.004
	$(0.3\sigma)^2$	0.03	0.06
	$F_1(0.3\sigma)^2 + F_2s_w^2$	0.08	0.12
	$s_b^2 < F_1(0.3\sigma)^2 + F_2s_w^2$	Accept	Accept

\*: negtive

**Table 2.** Statistical results of long term stability study of BaP in soil candidate PTMs

Analysis of Data	Parameter	BaP-I	BaP-II
Linear Regression	Intercept, $b_0$	2.46	3.90
	Slope, $b_1$	-0.0003	-0.04
	$s(b_1)$	0.03	0.04
	t-factor ( $t_{0.95, n-2}$ )* $s(b_1)$	0.11	0.18
ANOVA Regresson	p-value	0.99	0.46

< 0.5).

따라서 해당 기준을 적용해 보면 병내 균질도가 음의 값을 나타낸 BaP-I은 병내 균질도( $s_w$ )/숙련도 표준편차( $\sigma_{pa}$ )의 비가 0.30으로 0.5보다 적어 병내 균질 도는 문제가 없는 것으로 나타났다.

이에 따라 제조한 토양 숙련도 후보물질은 BaP 숙련도 표준시료로서의 균질성을 충분히 만족하는 것으로 판단할 수 있다.

### 3.3. 안정성 평가

#### 3.3.1. 장기 안정성 평가

제조된 두 배치의 후보표준물질(BaP-I, BaP-II)에 대해 실험실에서의 장기보관으로 인한 안정성을 확인하기 위해 시료 제조 후 1개월부터 6개월 동안 -20°C에서 보관된 시료의 BaP 분석 자료를 이용하여 회귀 식을 통해 얻은 안정도의 결과는 Table 2와 같다.

두 배치 모두 이들이 함유한 BaP 농도는  $n-2$  자유도와  $p=0.95$ 일 때 Student-t factor와 직선의 기울기의 불확도( $sb_1$ )의 곱이 5% 유의 수준에서 기울기  $|b_1|$ 보다 크고,

5% 유의 수준에서 p값이 모두 0.05보다 큰 것으로 나타나 이들 두 후보 표준물질은 6개월 동안 각 성분 모두 함량에 변화가 없이 안정한 것으로 나타났다.

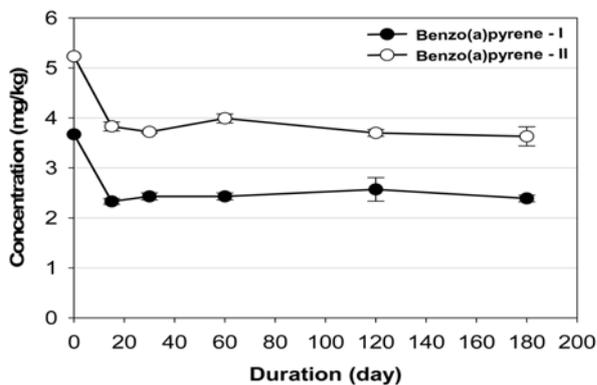
#### 3.3.2. 보관 온도별 안정성

시료 운송과정에서의 안정성을 확인하기 위한 평가로 시료의 보관온도 조건에 따른 함량변화 차이를 조사하여 단기안정성을 평가한 결과는 Table 3과 같다. 각 온도별 변동계수를 평가한 결과 BaP-I은 0.9~3.0%, BaP-II은 0.6~2.3%로 적게 나타났으며, 두 후보 물질별로 보면, BaP 농도가 낮은 BaP-I이 BaP-II보다 변동계수가 다소 높은 경향을 보이고 있다. 이는 저 농도에서는 농도간의 변동 폭이 높고 농도에 비해 더 커짐에 기인된 것으로 판단 된다.

그리고 보관온도(-20°C)와 운송온도(4°C) 조건에 따른 농도 차이를 확인한 결과 두 후보물질 모두 불확도 범위 내에 1을 포함하고 있으므로 보관온도 조건에 따른 함량 별 차이가 없다는 것을 확인함으로써 단기 운송조건하에서 안정한 것으로 확인할 수 있었다.

**Table 3.** Results of short term stability of BaP in soil candidate PTMs by different storage conditions

Analyte		0.5 month		1 month	
		-20°C	4°C	-20°C	4°C
BaP-I	Averg.conc. (mg/kg)	2.33	2.37	2.43	2.36
	SD (mg/kg)	0.058	0.021	0.07	0.025
	CV (%)	2.5	0.9	3.0	1.0
	Rt		0.983		1.03
	uRt		0.026		0.032
	(Rt + uRt)		1.009		1.061
	(Rt - uRt)		0.957		0.998
BaP-II	Averg.conc. (mg/kg)	3.83	3.72	3.72	3.67
	SD	0.09	0.021	0.014	0.05
	CV (%)	2.3	2.1	0.6	1.4
	Rt		1.01		1.014
	uRt		0.032		0.015
	(Rt + uRt)		1.042		1.028
	(Rt - uRt)		0.979		0.998

**Fig. 4.** Graphical illustration of trend of long term stability study for soil BaP candidate PTMs at storage condition of -20°C.

### 3.3.3. BaP 후보 PTMs의 15일 후 농도 감소원인 규명

토양중 BaP의 안정성 평가를 위해 제조된 두 배치의 BaP 후보물질에 대상으로 0일 부터 180일간에 걸쳐 BaP 농도를 주기적으로 조사하여 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

2 배치의 BaP 후보물질 모두 0일에 비해 15일 이후에 BaP 농도가 BaP-I 배치의 경우 30~37%, BaP-II 배치에서는 24~31% 정도 감소하고 있는 경향을 나타내고 있다.

이와 같이 시료조제 15일 이후에 그 농도가 일정수준 감소하는 원인을 규명하고자 먼저, 본 실험의 수행과정에서 발생할 수 있는 문제점을 점검하고 시료의 BaP 농도감소에 영향을 주는 요인들에 대한 문헌 조사도 실시하였다.

1차적으로 본 실험을 통해 발생할 수 있는 문제점은 0

일의 시료는 방사선 처리를 하지 않은 반면, 15일 이후의 시료는 토양 미생물에 영향을 사전 제어하기 위해 방사선 처리를 실시한 것이 확인되었다. 또한 문헌조사 결과 토양 BaP의 감소원인으로 미생물의 생분해 및 열에 의해서도 영향도 확인되었다(Hatch and Burton, 1999, Semple et al., 2003).

따라서, 이에 대한 원인 규명을 위해 실험의 처리로 방사선 처리와 멸균처리 및 대조군을 주 처리 구를 두고 이들 처리 구에 미생물의 영향을 보기위해 질소처리 및 무처리를 두어 질소 처리의 효과도 함께 보고자 하였다.

본 실험을 위해 시료의 조제는 2.1의 항에 따라 실시하였고, 이때 BaP의 토양 처리 농도는 10 mg/kg으로 하였다. 방사선 처리는 2.1항에 준해 실시하였고, 멸균은 멸균기(HANBAEK HB-506-6)에서 온도 121°C, 압력 0.122 Mpa에서 15분간 실시하였다. 또한 BaP 토양시료의 미생물에 의한 영향을 확인하기 위해 시료 병입 전 각 처리마다 질소 충전 구와 무 처리구를 두었고 이때 질소 충전은 질소가스(99.99%)를 사용하였다. 각 처리구의 시료 수는 총 24병[3(주구)×2(세구)×4(반복)]으로 처리후 15일 동안 4°C에서 보관한 후 시료의 BaP 농도를 분석하였다. 이때 시료의 BaP 농도분석은 2.2.3항에 따랐다.

각 처리별 토양중 BaP 농도를 비교한 결과는 Fig. 5와 같이 대조군을 100(7.25 mg/kg)으로 볼 때 처리 군별 토양중 BaP의 감소 정도는 방사선 처리군이 31%, 고압 살균군이 11%의 순으로 컸다. 또한 각 처리구에서 질소처리와 무처리 간에는 일정한 경향이 없어 질소처리에 의한

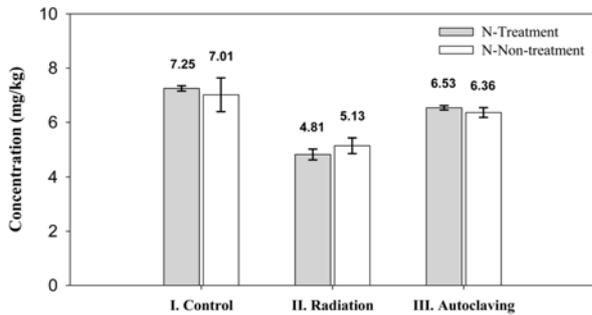


Fig. 5. Comparison of BaP concentration in soil by different treatments.

효과는 인정되지 않아 토양중 미생물에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다.

이들 처리에서 보면 토양중 BaP의 감소는 고압살균에 의해서도 11% 정도로 감소 효과가 있지만 BaP의 감소의 주된 영향은 31%가 감소된 방사선처리에 의한 것으로 판단된다.

따라서 Fig. 2에서 나타난 0일에 비해 15일 이후에 토양중 BaP 농도가 두 배치에서 24~37% 정도 감소된 것은 0일 시료는 방사선 처리를 하지 않은 반면 15일 이후 시료는 방사선 처리에 의한 것으로 방사선의 처리가 토양중 BaP 물질을 분해 또는 파괴시킨 것에 기인된 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구는 토양 매질을 반영한 2종의 토양 분석용 BaP 숙련도 표준물질을 개발하기 위해 수행된 연구결과의 일부로, 토양중 BaP의 정량성에 영향을 미치는 요인 실험과 후보표준물질에 대한 균질성, 안정성 평가를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

BaP 표준물질을 사용하여 표준용액을 조제할 경우 용매의 종류에 따라 표준물질의 용해 정도는 DCM > Acetone > Acetone/MeOH(9 : 1) > 노말 헥산 순이었으며, 토양오염공정시험기준에서 표준물질의 용매로 제시된 노말헥산은 3단계 처리에 의해서도 표준물질이 완전 용해되지 않았다.

BaP 표준물질에 용매의 종류별로 표준원액을 조제하여 용매의 종류별 BaP 검정곡선상의 기울기의 크기를 비교해 보면 DCM > Acetone > Acetone/MeOH(9 : 1) 순이었으며, 상업용 BaP 표준원액에서도 DCM > Acetone로 표준원액 제조 처리와 동일한 경향을 나타내었다. 이에 따라, 어떤 용매로 제조된 표준원액을 검정곡선 작성용으로 사용하는냐에 따라 토양에서 측정된 BaP의 농도 값은 크게

차이가 날 수 있다.

이와 관련하여 디클로로메탄 용매는 타 용매에 비해 표준물질에 대한 용해력이 크고, 기기상의 BaP 성분의 기기 지시 값이 높게 나타나 검정곡선상의 기울기가 크게 나타났으며, BaP 분석을 위한 시료의 최종 검액을 만드는데 사용되는 용매로, BaP 표준원액 제조 시 사용되는 용매로 디클로로메탄이 합당할 것으로 판단되며 상업용 BaP 표준물질 사용 시에도 해당 용매로 제조된 것을 사용하는 것이 합당할 것으로 판단된다.

제조한 2종의 토양 후보표준물질에 대해 균질도 확인을 위해 ISO 13528 및 IUPAC protocol에 규정된 절차에 따라 BaP의 숙련도표준편차( $\sigma_{pa}$ )를 15%로 하였을 때 두 후보 표준 물질 모두 충분히 균질한 것으로 확인되었다. 또한, 이들 2종의 토양 후보표준물질에 대해 안정성 확인을 위해 ISO Guide 35에 규정된 절차에 따라 조사한 결과, 2배치 모두 장기 안정성과 운송과정에서의 단기 안정성에 문제가 없는 것으로 나타났다.

그러나 안정성 평가를 위해 시료조제 후 15일 이후에 측정된 토양중 BaP 농도에서는 시료 조제 후 0일에 측정된 토양중 BaP 농도에 비해 두 배치에서 24~37% 정도 그 농도가 감소되었다. 따라서 이에 대한 원인을 규명하기 위해 시료에 방사선 조사(助射) 및 멸균등의 처리를 두고 실험을 수행한 결과 주 원인은 시료의 방사선 조사에 기인된 것으로 확인되었다.

#### 사 사

본 연구의 주 내용은 국립환경과학원 ‘토양분야 숙련도 시험 표준시료 제근방법확립을 위한 연구(NIER, 2012)’ 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### References

- Bcr information (CRM 063R), 1993, Certification Report, 8-9 p.
- ChemYQ, Dictionary, Information, Benzo(a)pyrene, <http://www.chemyq.com/En/xz/xz1/2378ytfkx.htm>. (accessed 14.08.29)
- Hatch, A.C. and Burton, G.A., 1999, Photo-induced toxicity of PAHs to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*: effects of mixtures and behavior, *Environ. Pollut.*, **106**, 157-167.
- Juhasz, A.L. and Naidu, R., 2000, Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **45**, 57-88.

Kim, G.H., Kim, K.Y., Sa, D.M., Seo, J.S., Son, B.G., Yang, J.E., Eom, K.C., Lee, S.E., Jeong, K.Y., Jeong, D.y., Jeong, Y.T., Jeong, J.B., and Hyeon, H.N., 2006, Soil Science, Hyangmunsu, Seoul, 471 p.

KS A ISO Guide 35, 2005, Certification of Reference Materials-General and Statistical Principles, Korean Standards Association, Republic of Korea, 54 p.

KS L 1614, 2001, Determination of Particle Size Distributions for Fine Ceramic Raw Powders by Laser Diffraction Method, Korean Standards Association, Republic of Korea, 9 p.

KS L ISO 18757, 2012, Fine Ceramics (Advanced Ceramics, Advanced Technical Ceramics) - Determination of Specific Surface Area of Ceramic Powders by Gas Adsorption Using the BET Method, Korean Standards Association, Republic of Korea, 10 p.

KS Q ISO 13528, 2009, Statistical Methods for Use in Proficiency Testing Interlaboratory Comparisons, Korean Standards Association, Republic of Korea, 61 p.

Ministry of Environment (MOE), 2009a, Act on Environmental Testing & Inspection etc.

Ministry of Environment (MOE), 2009b, Soil Standard Analytical Methods, 11, 23-31, 159-172 p.

Ministry of Environment (MOE), 2012, Soil Environment Conservation Act.

Ministry of Environment (MOE), 2014, Waste Standard Analytical Methods, 57-60 p.

National Academy of Agricultural Science (NAAS), 2010, Method for analysis of soil physico-chemical properties, 51-60 p.

Proficiency Testing (PT) Scheme Environmental Analysis (PROFEA), 2009, Round #4 (Report to Participants), BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Berlin, 50 p.

Semple, K.T., Morriss, A.W.J., and Paton, G.I., 2003, Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis, *Eur. J. Soil Sci.*, **54**, 809-818.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., and Wood, R., 2006, The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196.

Whitehouse, B.G., 1984, The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons, *Mar. Chem.*, **14**, 319-332.