에너지 분산 X-선 분석장치가 장착된 투과전자현미경을 이용한 석면분석방법

1998

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 산업재해예방 기술연구 개발 및 보급사업의 일환으로 수행한 "에너지분산 X선 분석장치가 장착된 투과전자현미경을 사용한 석면분석방법" 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12

주관연구부서: 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센타

연구책임자 : 책임연구원 유 일 재

공동연구원 : 위촉연구원 한 정 희

위촉연구원 김 광 진

기술직 4급 정 용 현

기술직 4급 이 준 연

목 차

Ⅰ. 서 론 1

Ⅱ. 재료 및 방법 2

Ⅲ. 결 과 8

Ⅳ. 고 찰 13

Ⅴ. 결 론 14

참고 문헌 15

A study on establishing asbestos analysis method using a transmission electron microscope with Energy dispersive X-ray analyzer(TEM-EDX)

Jeong Hee Han, Kwang Jin Kim, Yong Hyun Chung, Jun Yeon Lee, and Il Je Yu

Industrial Chemical Research Center, Industrial Health Research Institute, Korea
Industrial Safety Corporation. 104-8, Moonji-dong, Yusung-gu, Taejon, 305-380, Korea

Abstract

To establish an accurate asbestos analysis method for a workplace sample, chrysotile, amosite, crocidolite, tremolite, actinolite, anthophyllite asbestos fibers were analyzed for their morphology, atomic contents and electron diffraction. The morphology of asbestos fiber was evaluated in 10,000× magnification. The atomic contents were analyzed by transmission electron microscopy with energy dispersive X-ray analyzer (TEM-EDX). Further the asbestos fibers were assessed for the electron diffraction(ED) patterns to provide an additional criterion for classifying the asbestos fibers. Twenty asbestos fibers were initially randomly selected for morphological evaluation, based on an aspect ratio (3:1=length:diameter). Then the fibers were determined for their EDX and ED patterns. Our results showed that only chrysotile fiber has hollow tube structure to distinguish from other asbestos fibers. Although asbestos fibers had similar morphology, chrysotile, amosite, crocidolite, tremolite, actinolite and anthophyllite fibers had their typical EDX and ED patterns. Our results on the atomic contents of asbestos fibers were very similar to other researchers, but amosite and crocidolite had a little difference in atomic contents compared with the results from other researchers. The difference may be due to the difference in ㄷequipment and asbestos samples. A study on asbestos samples from biological specimens to establish a criterion for determining occupational asbestos exposed diseases should be done on future.

I. 서 론

근래 들어 석면에 폭로된 근로자의 피해사례보고가 늘어나고 있고 석면과 유사한 대체물질의 수입이 늘어나면서 석면의 유해성에 대해 많은 논란이 일어나고 있어 정확한 석면분석방법이 요구되고 있다. 그리고 석면은 종류별로 그 노출기준과 유해성이 차이가 있으므로 석면의 종류를 분석하는 것도 중요한 일이 되었다. 석면을 분석하는 방법에는 Optical Microscopy(광학현미경법), Phase Contrast Microscopy(위상차현미경법), Polarized Light Microscopy(편광현미경법), SEM(Scanning Electron Microscopy(주사전자현미경법)), Transmission Electron Microscopy(투과전자현미경법)등 여러 가지 방법이 있으나 아직까지 우리 나라에서는 일반적으로 위상차현미경을 사용하는 고전적인 방법을 사용하고 있다(Kohyama et al. 1996). 이미 선진국에서는 EDX(에너지분산 X선 분석장치)장비를 장착한 투과전자현미경(TEM-EDX)을 사용한 석면분석방법이 널리 보편화되어 있다. TEM-EDX를 이용한 석면분석방법은 고배율로 위상차현미경보다 더욱 미세한 크기의 fiber도 자세히 관찰할 수 있어 50~70배정도 더 정확하게 계수할 수 있고(Verma et al. 1995) EDX를 사용하여 극미량의 원소도 정확하게 분석할 수 있으며 전자회절상(Electeron diffraction)을 이용하여 결정체의 독특한 구조를 알 수 있다. 그러므로 TEM-EDX를 이용한 석면분석방법은 현재로서는 석면의 성상과 종류를 가장 정확하게 분석할 수 있는 방법이라고 할 수 있다. 그러나 아직까지 우리 나라에서는 TEM-EDX를 이용한 석면분석방법이 정립되지 않아 이에 대한 필요성이 대두되고 있다. 이번 연구에서는 TEM-EDX를 이용하여 석면을 종류별로 분석하여 형태와 구성성분 그리고 결정구조를 얻어 앞으로 작업장내 석면분석에 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제작

표준시료를 각각 Mortar와 Pestle로 잘게 분쇄하여 마개가 있는 bottle에 소량(약 1 ㎎)을 넣고 증류수 100 ㎖를 가해서 2시간 동안 초음파로 분산한 후 그 혼합물을 membrane filter(Millipore #GTTP02500, nuclepore filter, pore size 0.2 ㎛ diameter 25 ㎜)에 흡입여과 하였다. 여과시킨 filter를 건조한 후 carbon coating 하여 그 중 일부(약 3 ㎟)를 잘라내어 carbon coated nickel grid(SPI #2020N, diameter 3 ㎜, 200 mesh)위에 놓고 chloroform vapor를 이용하여 filter를 용해하여 제거하였다. 하룻밤정도 두어 건조한 후 이 sample grid를 EDX(Kevex Sigma)가 장착된 투과전자현미경(Hitachi-7100)을 사용하여 분석하였다. 이것을 Figure 1에 그림으로 나타내어 보았다.

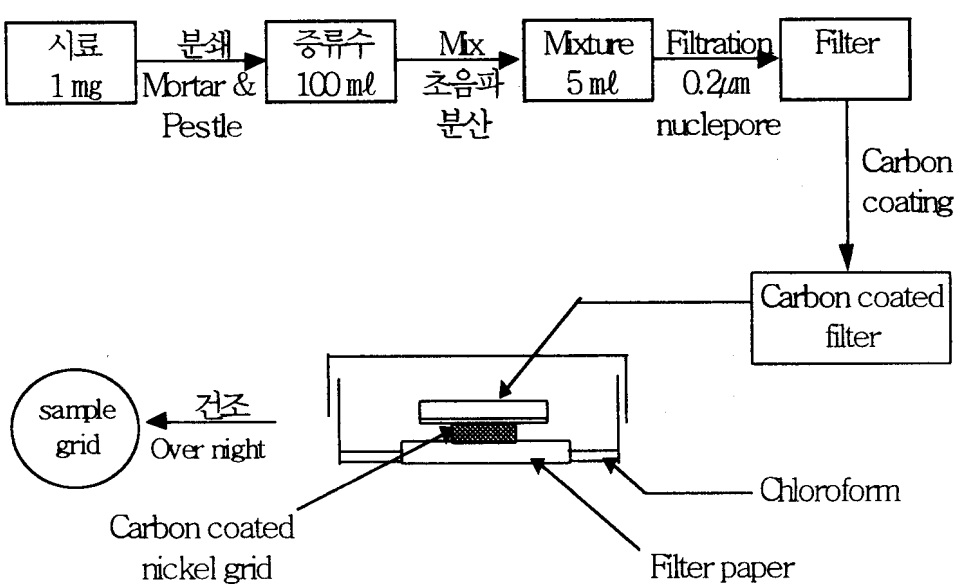


Figure 1. Sample preparation method

2. 분석방법

시료는 EDX가 장착된 TEM으로 분석하였다. 가속전압은 100 kv로 하였고 시료를 넣고 저배율로 관찰하여 좋은 시야상을 선택한 후 고배율로 확대하여 그 형태와 길이를 자세히 관찰하였다. 석면의 특징인 섬유상의 형태를 가지고 있는가, 특이한 구조를 가지고 있는가, 길이와 직경의 비(Aspect ratio)는 섬유상의 기준인 3:1이상인가를 알아보았다. 그리고 EDX spectrum을 얻어 정성분석과 정량분석을 행하였다. EDX는 시료상에 전자빔을 조사했을 때 방출하는 X선을 peak형태로 나타내어주는 장비인데 원소마다 고유의 spectrum을 가지고 있기 때문에 정성분석과 정량분석을 할 수 있다. 마지막으로 석면은 결정체 구조이므로 전자회절상(Electron Diffraction) 패턴을 얻어 그 결정구조를 파악하여 석면의 종류를 분석하였다. 그리고 필요시 계수, 통계 처리하여 석면을 평가하였다. 이런 분석방법을 알기 쉽게 Figure 2에 도식하였다.

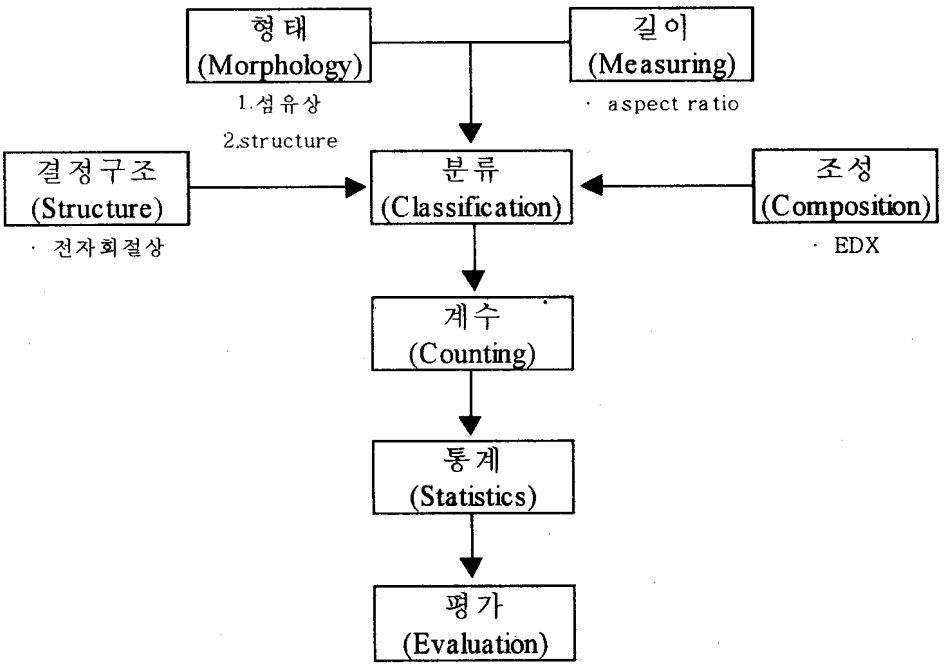


Figure 2. Evaluation of Asbestos

III. 연구결과

대표적인 6종의 석면표준품(UICC fiber, International Union against Cancer)을 분석하였다(Table 1). 사문석(serpentine)계열인 백석면으로 잘 알려진 chrysotile과 각섬석(amphiboles)계열인 갈석면 amosite, 청석면 crocidolite, 그리고 tremolite, actinolite, anthophyllite을 분석하였다. 석면은 모두 침상결정의 가늘고 긴 섬유소(fiber)로 이루어져 있었고 결정구조를 가지고 있어 각 석면의 고유한 결정구조를 파악할 수 있었다.

사문석계열인 chrysotile은 다른 각섬석계열의 석면과는 다른 독특한 성상을 가지고 있어 쉽게 구별할 수 있었다. 10,000배에서 관찰했을 때 fiber는 가늘고 길며 굽어진 모양을 가지고 있었으며, fiber를 200,000배정도의 고배율로 확대하면 중앙에 chrysotile 특유의 관모양의 구조를 볼 수 있었다. 이것을 Hollow tube 구조라고 하au chrysotile에만 특징적으로 존재한다(Kohyama et al, 1993)(Figure 3B). 그리고 hollow tube구조로 인해 다른 종류의 석면과는 다른 독특한 전자회절상 패턴을 보여주었다(Figure 3C). 주성분은 Mg와 Si이었으며 Fe를 소량 함유하고 있었다(Figure 3D).

Amosite와 crocidolite는 fiber가 모두 긴 막대모양을 하고 있어(Figure 4, 5 A) 형태적으로 유사하나 EDX와 전자회절상으로 구별할 수 있었다(Figure 4, 5 A&B). Amsite, crocidolite 모두 주성분은 Si와 Fe이었으나 amosite에는 Mg와 Mn이 소량 함유되어 있었고(Figure 4C) crocidolite는 Na와 Mg를 소량 함유하고 있었다(Figure 5C). Crocidolite에는 특징적으로 Na가 나타나기 때문에 amosite와 좋은 구별이 되었다.

Tremolite와 Actinolite는 비교적 짧은 fiber로 이루어져 있었고 EDX spectrum의 peak가 유사하였다. 주성분은 Si와 Mg, Ca이었으며 Fe를 소량 함유하였다(Figure 6, 7 C). 그러나 tremolite보다 actinolite가 Fe의 함유량이 상대적으로 높았다. 그리고 tremolite 시료는 섬유상 형태가 드물게 나타났다. Fiber는 어떤 일정한 형태를 가지고 있지 않고 다양한 형태를 보이고 있었고 전자회절상도 구별하기 힘들었다(Figure 6 A&B). 이에 비해 actinolite는 fiber가 막대모양을 띠고 있고 전자회절상도 차이가 났다(Figure 7 A&B).

Anthophyllite는 fiber가 굵고 길이가 비교적 짧았으며(Figure 8A) 전자회절상은

Figure 8B와 같이 나타났다. 주성분은 Si와 Mg이었으며 Fe를 소량 함유하고 있어 chrysotile과 구성성분은 같았으나 그 성분비에서 많은 차이가 나고Hollow tube 구조가 없어 chrysotile과 구별할 수 있었으며 전자회절상도 고유의 구조를 보여주고 있다.

원소구성비의 기준치 설정을 위해 20개의 fiber를 무작위로 추출하여 EDX로 분석하여 원소구성비를 일본 나고야 위생연구소의 원소구성비(Sakai et al, 1991)와 비교하여 Table 2에 나타내었다. Chrysotile은 Mg 52.0±3.5 %, Si 45.9 ±3.4 %, 그리고 Fe를 2.1±0.9 % 함유하고 있었다. Amosite는 Si 54.2±3.8 %, Fe 38.6±3.2 %, Mg 5.7±1.2 %, 그리고 Mn을 1.5±0.5 % 함유하였다. Crocidolite는 Si 57.8±3.8 %, Fe 33.5±4.4 %, Na 6.7±2.6 %, 그리고 Mg를 2.0±1.2 % 함유하여 amosite와 유사한 성분비를 보여주고 있으나 구성원소에서 약간의 차이가 있었다. Tremolite는 Si 57.9±3.2 %, Mg 27.2±2.8 %, Ca 14.2±1.8 %, 그리고 Fe를 0.6±0.4 % 함유하였다. Actinolite는 Si 58.8±3.7 %, Mg 22.2±3.0 %, Ca 13.0±2.4 %, 그리고 Fe를 5.9±1.2 % 함유하고 있어 구성성분은 tremolite와 같았으나 Fe가 비교적 많이 함유되었다. Anthophyllite는 Si가 62.2±2.5 %, Mg가 30.7±2.7 %, 그리고 Fe를 7.1±1.9 % 함유하였다. 일본 나고야 시립위생연구소의 기준치와 비교해 볼 때 유사한 결과를 보여주고 있으나 amosite와 crocidolite는 Si와 Fe의 원소구성비가 다소 많은 차이를 보였다. 이것은 분석한 석면표준시료와 분석장비의 차이를 감안하면 비교적 유사하다고 할 수 있다.

Table 1. Class of Asbestos

	종 류	이론적 화학조성식
사문석(Serpentine)	Chrysotile	$Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$
	Amosite	$(Fe,Mg)_7(Si_8O_{22})(OH)_2$
	Crocidolite	$Na_2Fe^{II}_3Fe^{III}_2(Si_8O_{22})(OH)_2$
각섬석(Amphiboles)	Tremolite	$Ca_2Mg_5(Si_8O_{22})(OH)_2$
	Actinolite	$Ca_2(Mg,Fe)_5(Si_8O_{22})(OH)_2$
	Anthophyllite	$(Mg,Fe)_7(Si_8O_{22})(OH)_2$

Table2. Element composition of standard asbestos (Atomic %: 평균±표준편차)

석면의 종류	원 소	평균±표준편차	일본 나고야
Chrysotile	Mg	52.0 ± 3.5	52.1 ± 2.8
	Si	45.9 ± 3.4	46.4 ± 3.0
	Fe	2.1 ± 0.9	1.7 ± 0.7
Amosite	Mg	5.7 ± 1.2	4.9 ± 1.1
	Si	54.2 ± 3.8	42.9 ± 1.4
	Mn	1.5 ± 0.5	4.0 ± 0.8
	Fe	38.6 ± 3.2	48.2 ± 1.4
Crocidolite	Na	6.7 ± 2.6	8.4 ± 1.2
	Mg	2.0 ± 1.2	—
	Si	57.8 ± 3.8	45.0 ± 2.4
	Fe	33.5 ± 4.4	24.1 ± 2.0
Tremolite	Mg	27.2 ± 2.8	28.0 ± 2.3
	Si	57.9 ± 3.2	54.4 ± 2.0
	Ca	14.2 ± 1.8	6.5 ± 2.5
	Fe	0.6 ± 0.4	1.0 ± 1.2
Actinolite	Mg	22.2 ± 3.0	24.1 ± 2.0
	Si	58.8 ± 3.7	51.1 ± 3.4
	Ca	13.0 ± 2.4	15.0 ± 1.6
	Fe	5.9 ± 1.2	8.9 ± 1.3
Anthophyllite	Mg	30.7 ± 2.7	34.2 ± 1.7
	Si	62.2 ± 2.5	55.8 ± 1.5
	Fe	7.1 ± 1.9	9.0 ± 2.5

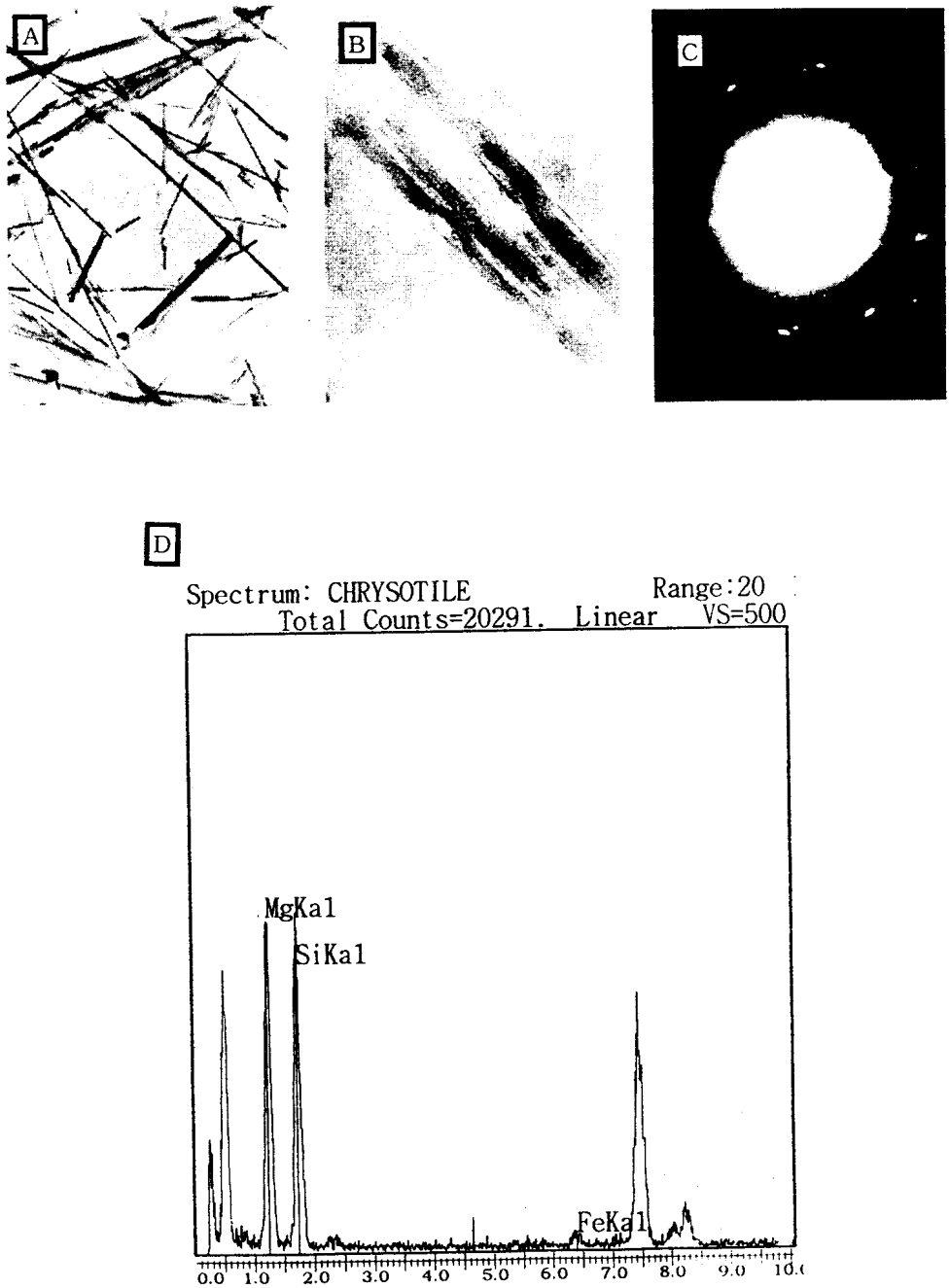
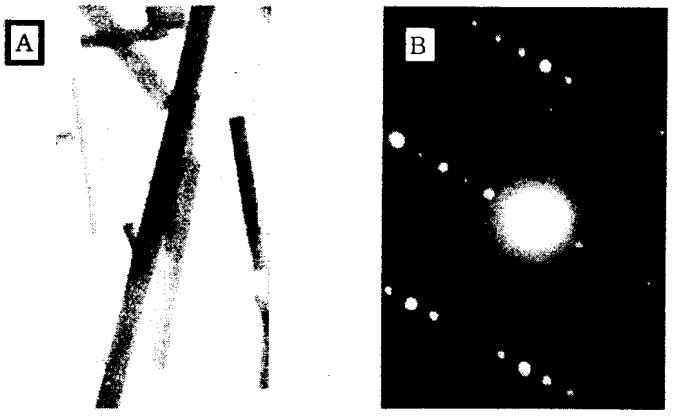


Figure 3. Chrysotile. A, fiber(×10,000) ; B, Hollow tube structure(×200,000); C. Electron Diffraction(camera length 1.2m); D, EDX spectrum



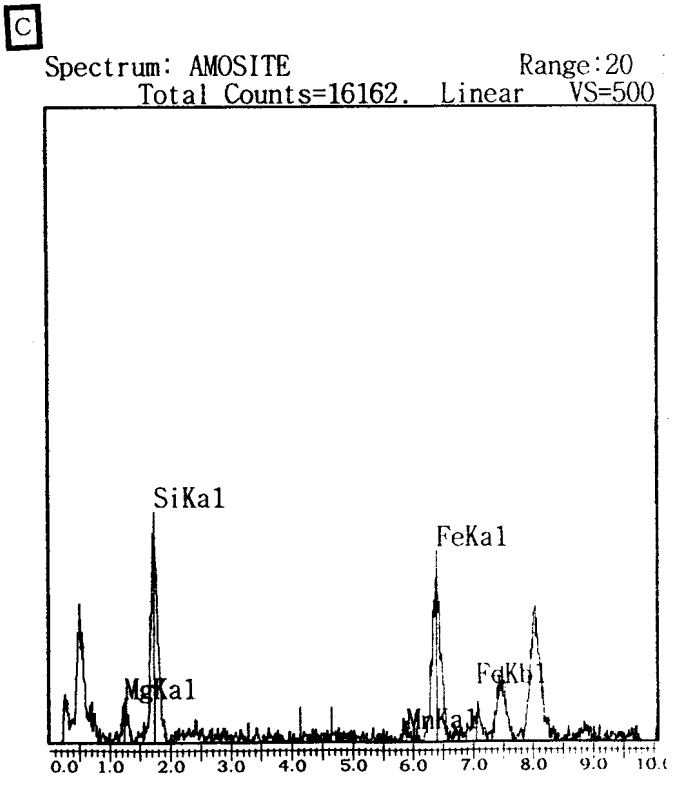
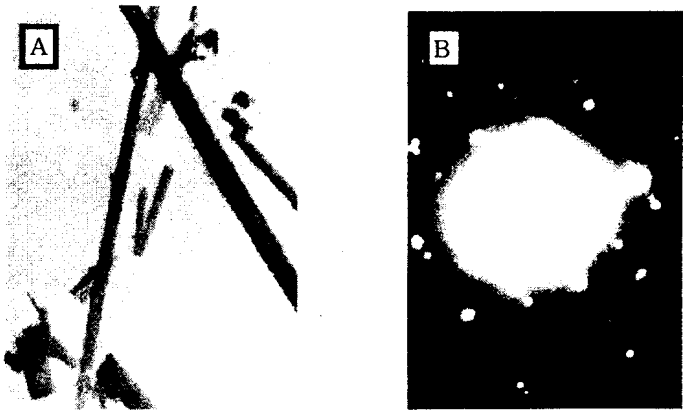


Figure 4. Amosite. A, fiber(×10,000) ; B, Electron Diffraction(camera length 1.2m); C, EDX spectrum



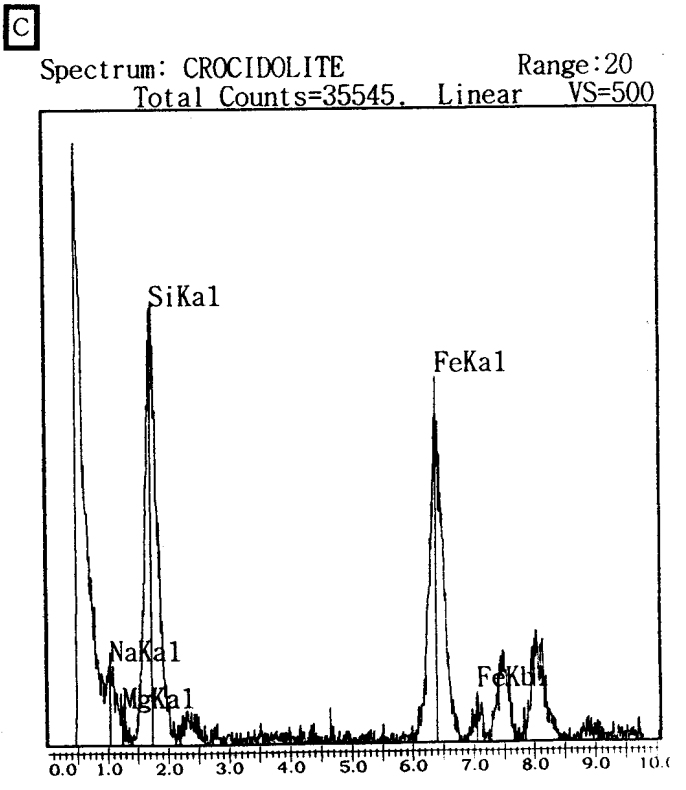
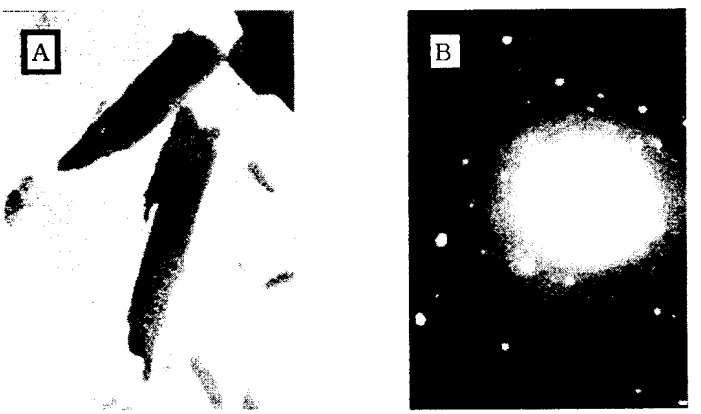


Figure 5. Crocidolite. A, fiber(×10,000); B, Electron Diffraction(camera length 1.2m); C, EDX spectrum



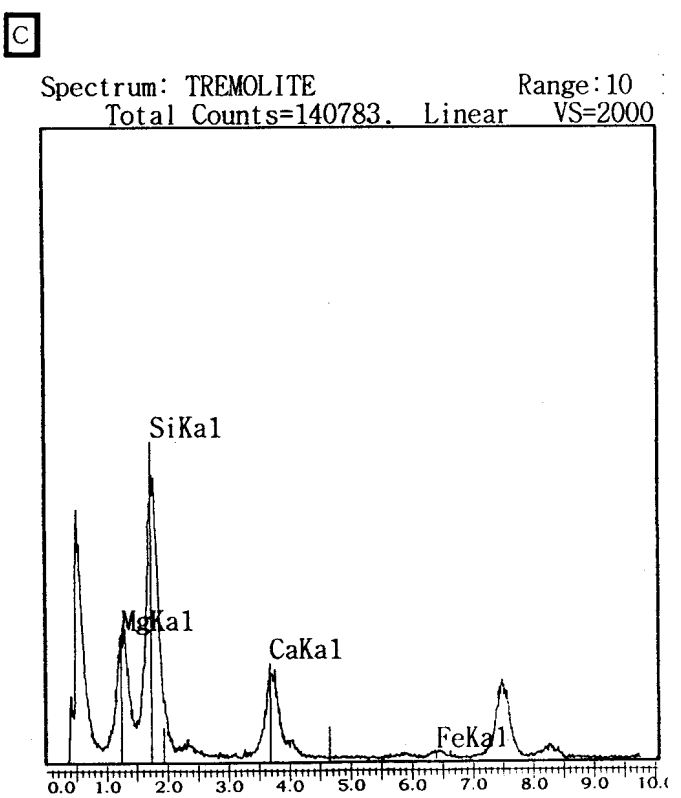


Figure 6. Tremolite. A, fiber(×10,000); B, Electron Diffraction(camera length 0.8m); C, EDX spectrum

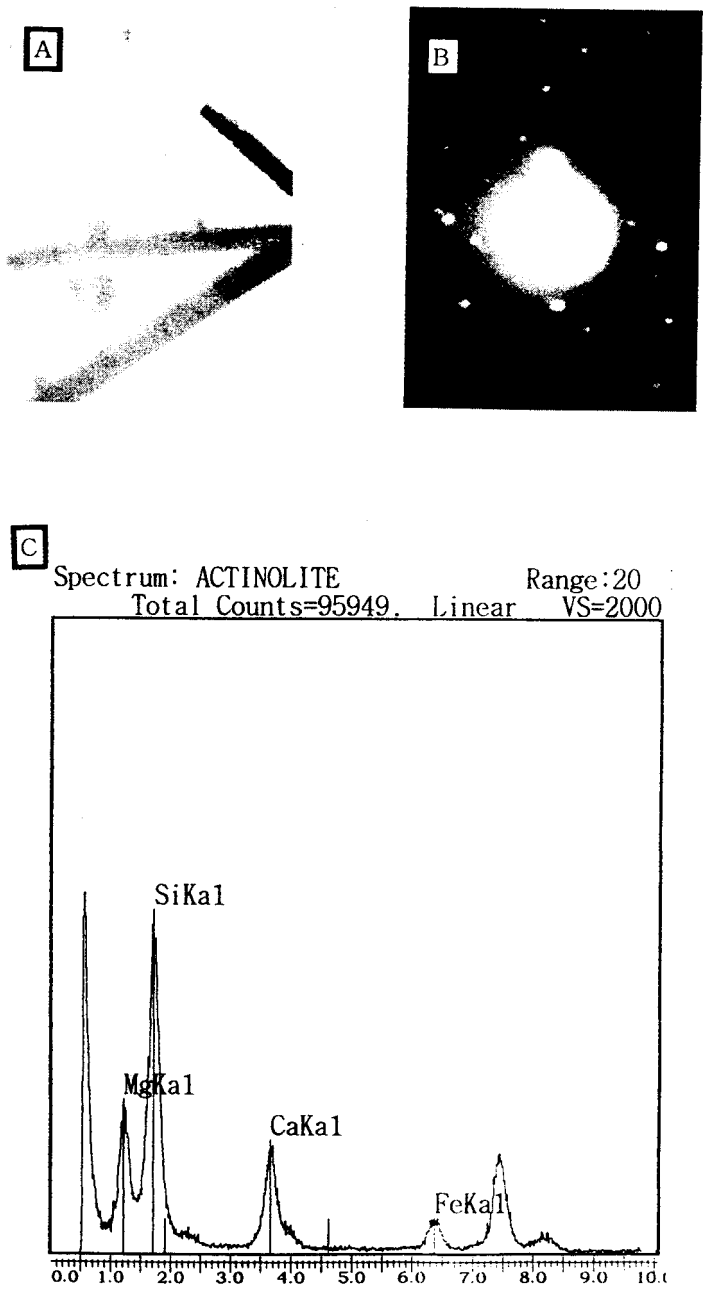
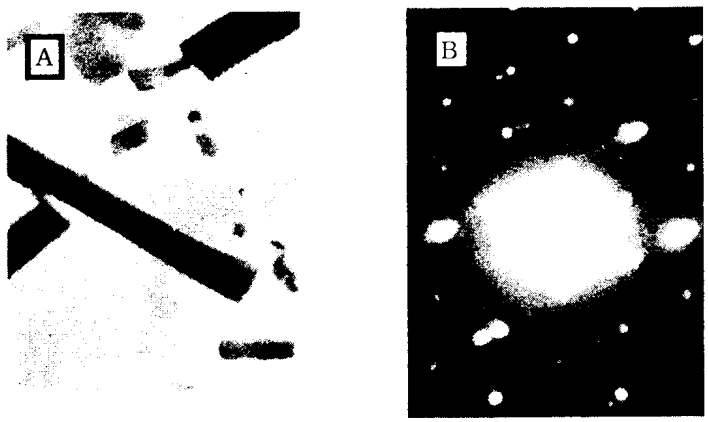


Figure 7. Actinolite. A, fiber(×10,000); B, Electron Diffraction(camera length 1.2m); C, EDX spectrum



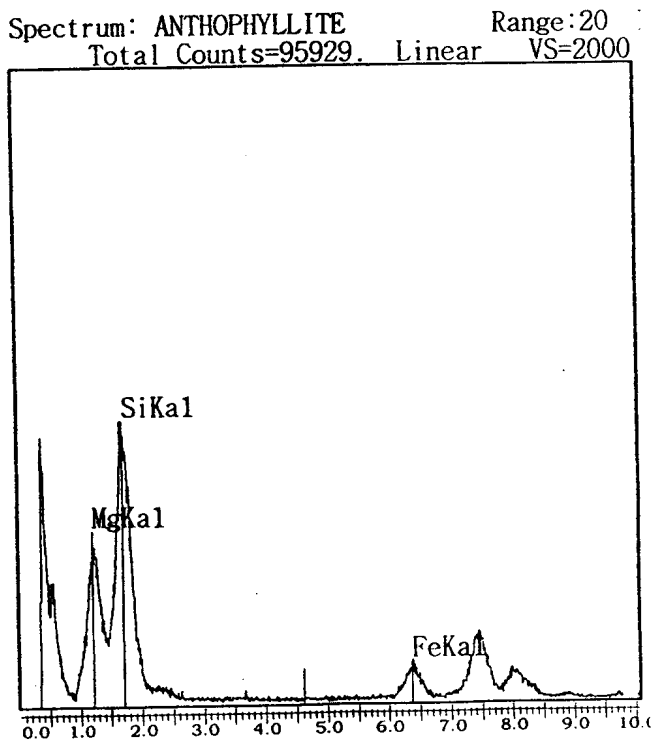


Figure 8. Anthophyllite. A, fiber(magnification 10,000×); B, Electron Diffraction(camera length 1.2m); C, EDX spectrum

IV. 고 찰

본 연구에서는 국내최초로 TEM-EDX를 이요한 석면분석방법을 정립하고자 하였다. 이 방법의 정립을 위해서는 우리가 보유하고 있는 TEM-EDX 장비를 이용해 표준석면시료를 분석하여 각 석면의 형태, 원소구성비, 전자회절상을 얻어 앞으로의 석면분석에서의 기준치로 사용하고자 하였다. 이번에 분석한 석면의 원소구성비는 이미 발표된 외국논문자료와 약간의 차이가 있었으나 분석기기와 석면표준품의 차이라고 생각되었다. 이렇게 TEM-EDX를 이용한 석면분석방법으로 이전의 석면분석법으로 분석할 수 없었던 미량의 석면이 존재하는 시료나 여러 종류의 석면이 혼합되어 있는 시료를 더욱 정확하게 분석할 수 있게 된 것은 괄목할 만한 성과라고 할 수 있다. 이 결과는 앞으로의 bulk 시료와 작업환경측정 시료와 인가의 폐내 석면의 존재를 밝히는 데 많은 도움을 주리라고 생각된다. 폐내에 존재하는 석면의 원소구성비는 표준시료와 차이를 보이고 있는데 (Sakai et al., 1998) 이것은 폐내에서 분비되는 효소와 산의 영향으로 인해서 석면이 분해되는 석면의 지속성(durability)에 기인한 것으로 생각된다. 그리고 앞으로는 TEM-EDX를 이용한 석면의 중량비분석방법의 개발, 연구가 필요하다고 생각되는데 우리 나라 산업안전보건법에는 석면의 수입불가여부가 중량비로 규정되어 있어 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 이를 위해서 석면은 산에 강하므로 산으로 시료를 처리하여 석면만 남게 하여 남은 시료의 중량을 계산하는 방법과 농도에 대한 중량곡선을 그려 시료의 중량을 계산하는 방법을 연구중이며 현재 후자의 연구를 진행하고 있다.

V. 결 론

석면시료의 정확한 분석방법의 정립을 위해서 chrysotile, amosite, crocidolite, tremolite, actinolite, anthophyllite의 6종류의 석면표준시료를 각각 형태, 원소구성비, 전자회절상을 분석하였다. 석면 fiber의 형태는 10,000배의 배율에서 관찰하였고 원소조성비는 TEM-EDX를 이요하여 분석하였다. 그리고 석면의 분류에 추가적인 기준을 제공하기 위해 전자회절상을 얻어 석면을 평가하였다. 석면표준시료에서 섬유의 형태를 가지고 있고 aspect ratio가 3:1이상인 20개의 석면섬유를 무작위로 추출하여 EDX와 전자회절상을 얻었다. 각 석면들은 형태적으로 유사한 면을 보여주었으나 chrysotile은 다른 석면과는 달리 독특한 hollow tube 구조를 가지고 있었으며 각 석면들은 고유의 원소조성과 전자회절상을 보여주고 있었다. 그리고 우리가 분석한 원소조성비는 다른 외국의 연구자료와 비교해 볼 때 유사한 데 반해 amosite와 crocidolite는 다소 많은 차이가 있었는데 이는 분석기기와 석면표준시료의 차이로 생각된다. 이번 연구는 석면에 노출된 근로자의 직업병 판단을 위한 생체시료의 석면분석에 기초자료를 제공하게 될 것이다.

참고 문헌

Churg A, Wright J.L., Depaoli L. and Wiggs B., 1989, Mineralogic Correlates of Fibrosis in Chrysotile Miners and Millers, Am Rev Respir Dis; 139; 891-896

Dufrensene A., Harrigan M., Massé S. and Begin R., 1995, Fibers in Lung Tissues of Mesothelioma Cases Among Miners and Millers of the Township of Asbestos, Quebec, American Journal of Industrial Medicine; 27:581-592

Guen J.M.M.L. and Galvin S. 1981, Clearing and Mounting Techniques for the Evaluation of Asbestos Fibers by the Membrane Filter Method, Occupational Hygine Society; 24,3: 273-280

Kennedy G.L., and Kelly D.P., 1993, Introduction to Fiber Toxicology, Academic Press; 15-42

Kohyama N., 1987, Analytical Electron Microscopy for Occupational Health and Environmental Science, National Institute of Industrial Health; 27: 88-103

Kohyama N. and Kurimori S., 1996, A Total Sample Preparation Method for the Measurment of Airborne Asbestos and Other Fibers by Optical and Electron Microscopy, National Institute of Industrial Health; 34: 185-203

Kohyama N., Shinohara Y. and Suzuki Y., 1996, Mineral Phases and Some Reexamined Characteristics of the International Union Against Cancer Standard Asbestos Samples, American Journal; 30: 515-528

Roberson K.T., Thomas T.C. and Sheramn L.R., 1992, Comparison of Asbestos Air Samples By SEM-EDXA, British Occupational Hygiene; 36: 265-269

Sakai K., Hisanaga N., Kojima A. and Takeuchi Y., 1991, Elemental of Asbestos Fibers Recovered from Human Lung, Annual Report of Nagoya City Public Health Research Institute; 37: 116-11

Schlecht P.C. and Shulman S.A., 1995, Phase Contrast Microscopy Asbestos Fiber Counting Performance in the Proficiency Analytical Testing Program, American Industrial Hygiene Association Journal: 56: 480-489

Steel E.B. and Small J.A., 1984, Accuracy of Transmission Electron Microscopy for the Analysis of Asbestos in Ambient Environments, American Chemical Society; 57: 209-213

Verma D.K. and Clark N.E., 1995, Relationships Beetween Phase Contrast Microscopy and Transmission Electron Microscopy Results of Samples from Occupational Exposure to Airborne Chrysotile Asbestos, American Industrial Hygiene; 56: 866-873

Yu I.J., Moon Y.H., Sakai K., Hisanaga N., Park J.D. and Takeuchi Y., 1998, Asbestos and Non-asbestos Fiber Content in Lungs Korean Subjects with No Known Occupational Asbestos Exposure History, Elevier Science; 3: 293-300