

보건분야 - 교육자료

연구원 2009-14-94

석면분석전문가양성교육 교재

위상차현미경을 이용한 공기 중 석면 측정 · 분석

한국산업안전보건공단
산업안전보건연구원

차 례

I. 석면	1
1. 석면의 정의	1
2. 건강장해	3
3. 관련 규제	4
II. 위상차현미경	8
1. 위상차현미경의 구성	8
2. Köhler 조명	10
3. 위상차현미경의 원리와 구성	12
4. 위상차현미경 조절법	16
5. HSE/NPL 테스트 슬라이드	18
6. Walton-Beckett 그래티쿨	21
III. 공기 중 석면 측정 · 분석법	24
1. 측정 · 분석법의 개요	24
2. 적용범위 및 제한점	25
3. 시료채취 계획	27
4. 기구 및 시약	31
5. 시료채취 및 분석	33
6. 결과 처리	38
7. 변이와 정도관리	41
참고문헌	44
[붙임]	
1. A 규정에 의한 섬유계수법 예시	46
2. B 규정에 의한 섬유계수법	47
3. 석면 계수분석 양식(예시)	48
4. 공기 중 석면분석법 비교	49

I. 석면

1. 석면의 정의

‘석면(asbestos)’이란 광물학적 넓은 의미로는 석면형태(asbestiform)의 결정습성(crystal habit)을 보이는 규산염 광물을 총칭하는 용어로서, 가늘고 긴 섬유 및 섬유다발의 형태를 띠고 쉽게 더 가는 섬유로 나누어지며, 실로 찢 수 있을 만큼의 유연성과 높은 난연성, 내화학적, 열 전기 절연성 등 유용한 물성을 보여 여러 가지 상업적인 용도(직물, 종이, 페인트, 브레이크라이닝, 타일, 시멘트 건축자재 등)로 이용에 적합한 광물을 지칭한다¹⁾. 이 중에서도 상업적으로 채취하고 이용되어 사람에게 노출될 가능성이 높은 여섯 종의 석면을 우리나라를 비롯한 대부분의 해외 선진국에서는 환경보건상의 이유로 채취 및 사용 등을 규제하고 있다²⁾. 우리가 ‘석면’이라고 말할 때에는 일반적으로 규제적인 의미로서 법으로 사용이 규제되는 표 1의 여섯 종의 광물을 지칭하는 것으로, 광물 분류상으로는 크게 사문석계(serpentines)와

[표 1] 석면의 기본적인 화학조성과 석면형태/비석면형태 광물

광물군	석면	비석면 ¹	화학 조성
사문석	백석면(chrysotile)	리자다이트(lizardite) 안티고라이트(antigorite)	$Mg_3Si_2O_5(OH)_4$
각섬석	갈석면(amosite)	커밍토나이트(cummingtonite) 그루너라이트(grunerite)	$(Mg,Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$
	청석면(crocidolite)	리베카이트(riebeckite)	$Na_2Fe_3^{+2}Fe_2^{+3}Si_8O_{22}(OH)_2$
	안소필라이트석면(anthophyllite asbestos)	비석면형 안소필라이트(non-asbestiform anthophyllite)	$(Mg,Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$
	트레모라이트석면 ² (tremolite asbestos)	비석면형 트레모라이트(non-asbestiform tremolite)	$Ca_2(Mg,Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$
	악티노라이트석면 ³ (actinolite asbestos)	비석면형 악티노라이트(non-asbestiform actinolite)	$Ca_2(Mg,Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$

¹ 석면과 동일한 화학조성을 가지지만 결정습성이 석면형태가 아닌 광물

² $Mg/(Mg+Fe^{+2}) = 0.9 \sim 1.0$

³ $Mg/(Mg+Fe^{+2}) = 0.5 \sim 0.9$

1) American Geological Institute, Glossary of geology, 2008, <http://glossary.agiweb.org>

2) US OSHA standard 29CFR1910.1001(b)

각섬석계(amphiboles) 석면으로 구분된다. 여섯 가지 석면 중 백석면은 사문석계 석면에 속하며, 나머지 다섯 가지 석면은 각섬석계 광물에 속한다.

상업적 가치가 있는 수준의 대규모 매장이 확인되고 주로 사용된 석면의 대부분은 백석면으로, 최근에는 러시아, 캐나다, 중국, 카자흐스탄 등에서 주로 생산되고 있다. 국내에서 지금까지 사용된 석면 또한 대부분 백석면으로 추정되며 갈석면, 청석면, 트레모라이트석면 등의 각섬석계 석면은 드물게 검출되는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 석면을 섬유상 광물이라고 말하지만 광물의 결정습성 중 석면형태(asbestiform)란 여러 가지 섬유형태 중의 하나로, 섬유에 포함되는 보다 좁은 개념의 용어이다. 따라서 섬유상 광물이라고 해서 모두 석면인 것은 아님에 주의해야 한다. 자연계에서 섬유상 광물은 매우 흔하지만 그 중 석면형태의 광물, 즉 석면은 드물게 발견된다. 각섬석의 경우 지각을 구성하는 광물 중 약 5%를 차지하는 매우 흔한 광물 중 하나이지만, 석면형태를 보이는 각섬석계 석면의 대규모 매장은 매우 드물게 발견된다. 특히 악티노라이트와 트레모라이트 및 안소필라이트는 석면형태보다는 주로 주상(prismatic)형의 결정습성을 보이는 것으로 알려져 있다¹⁾. 따라서 모든 악티노라이트, 트레모라이트 또는 안소필라이트가 석면은 아니며, 석면을 지칭할 때에는 반드시 ‘석면’이라는 말을 붙여 악티노라이트석면, 트레모라이트석면 또는 안소필라이트석면이라는 용어를 사용하는 것이 보다 정확한 표현이다.

1) Cornelis Klein, The Manual of Mineral Science, 22nd, 2002

2. 건강장해

석면은 피부나 점막과 접촉하여 접촉성 피부염을 일으키기도 하나 석면에 의한 주요 건강장해는 호흡기를 통해 폐에 침입함으로써 유발되는 석면폐증, 중피종, 폐암과 관련이 있다. 이들 석면질환은 잠복기가 길어서 일반적으로 노출 후 약 20~30년 이상이 경과한 후에 발병하는 특징을 보인다.

· 석면폐(Asbestosis)

장기간의 석면 흡입으로 인해 발병되며, 일단 발병되면 석면노출이 중단되더라도 치유가 불가능하다. 주요 증상으로는 반흔조직이 딱딱해지고 폐에 기형이 초래되어 호흡이 점점 어려워진다. 폐에 대한 혈액공급이 어려워져 폐기능이 저하되고 심장기능에 무리가 가해지며, 석면섬유에 의해 폐포가 비대해져 산소를 받아들이고 이산화탄소를 배출하는 기능이 저하된다. 석면폐는 석면에 대한 노출량이 많을수록 발병률이 높아지고 잠복기는 짧아지는 경향을 보인다. 비록 예외가 있기는 하지만 일반적으로 석면폐는 고농도의 직업적 석면노출과 관련성이 높다.

· 악성중피종(Malignant mesothelioma)

과거에는 희귀한 종양으로 알려져 있었으나 근래에 들어 점차 발병빈도가 높아지고 있다. 일반적으로 폐의 바깥 표면(흉막)에 발생하는 암으로, 복막 또는 드물지만 기타 부위에서 발병되기도 한다. 중피종은 석면과 강한 인과관계가 있는 것으로 알려져 있다. 석면폐가 발병하지 않더라도 단독으로 발병되기도 하며 상대적으로 낮은 수준의 석면노출과 관련성이 있다. 중피종은 석면의 환경적 노출로 인한 피해자의 대다수를 차지하며 알려진 적절한 치료법이 없는 질병이다.

· 폐암/기관지 암증(Asbestos-related lung cancer/bronchial carcinoma)

석면노출에 의한 가장 주요한 악성 종양으로 직업적 또는 환경적 노출 모두에 의해 발병할 수 있으며, 특히 석면노출과 흡연은 높은 상승작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 석면노출 작업자의 폐암 발병 위험도는 담배를 피우지 않는 석면 작업자가 직업적 석면노출이 없고 담배를 피우지 않는 자에 비해 약 5배, 담배를 피우고 석면노출이 없는 자가 약 10배, 담배를 피우는 석면 작업자가 약 55배 수준에 달하는 것으로 알려져 있다.

3. 관련 규제

석면은 난연성, 내마모성 등 특유의 우수한 물리화학적 특성을 이용하기 위해 단열재, 전기절연재, 난연재, 마찰재의 원료 등 매우 다양한 용도로 사용되어 왔다. 특히 20세기 초에 연속으로 석면시멘트판을 제작하는 기계인 핫чек머신이 개발되어 사용되면서 석면은 각종 건축자재 원료로 주로 사용되기 시작하여, 제2차 세계대전을 거치면서 그 사용량과 응용범위를 넓혀왔다. 그러나 1960년대 이후부터 공기 중 석면에 노출된 사람에게서 석면폐, 중피종, 폐암 등 건강장해 발생 문제가 알려지기 시작하면서 1980년대 초부터 세계적인 석면의 사용량은 급감하였다. 따라서 현재 석면을 사용한 건축자재 등의 제품 생산은 대부분의 선진국에서는 이미 금지되었거나 금지하는 과정 중에 있다. 그러나 최근에도 일부 아시아 개발도상국 등에서는 사용량이 증가 추세에 있어 국제적인 환경보건상의 문제가 되고 있다.

우리나라에서 석면은 화학물질 및 물리적인자의 노출기준(노동부 고시 2008-26 호)에 따라 ‘발암성 물질로 확인된 물질(A1)’로 분류되며, 그 치명적인 유해성으로 인해 근로자를 석면노출로부터 보호하기 위한 석면규제는 표 2과 같이 지속적으로 강화되어 왔다. 2009년 5월 현재 노동부 산업안전보건법에서는 백석면 및 백석면을 1 중량% 초과 함유하는 물질을 허가대상물질로, 갈석면, 청석면, 안소필라이트석면, 트레모라이트석면, 악티노라이트석면 및 이들 석면을 1 중량% 초과함유하는 물질을 제조등 금지물질로 규제하고 있다¹⁾. 2009년 1월부터 일부 예외를 제외하고 0.1 중량% 를 초과 석면을 함유하는 제품의 제조, 수입, 양도, 제공 또는 사용이 금지되었다. 지속적으로 관련 규제가 강화됨에 따라 우리나라의 석면사용은 다른 비석면 광물이나 유리섬유, 합성섬유 등 석면 대체물질로 대체되고 있으며, 일반 제조업에서 석면에 노출되는 근로자 수는 크게 줄어든 것으로 예측된다. 그러나 이미 지난 수십년간 생산되고 사용되어온 우리 생활환경 주변의 다양한 형태의 석면함유 제품으로 인해 건축물이나 시설 등의 유지, 보수, 해체, 철거 등 작업 시 석면이 함유된 자재로부터 방출되는 공기 중 석면은 앞으로 발생할 석면노출의 주요 요인이 될 가능성이 매우 크다. 이에 따라 우리나라에서는 2009년 2월 6일 건축물 등의 석면해체·철거 시 근로자를 석면노출로부터 보호하기 위해 산업안전보건법 일부개정법률이 공포되어 2009년 8월 7일부터 시행되고 있다.

1) 산업안전보건법 시행령 제30조 허가대상물질에서 백석면에 대한 직접적인 지칭은 없으나 해외의 석면에 대한 규제적 정의에 비추어 볼 때 제14호의 ‘법 제29조에 따른 석면을 제외한 석면’은 백석면을 지칭하는 것으로 볼 수 있다. 석면의 정의를 광물학적 넓은 의미를 적용하여 확대해석하면 허가대상물질은 백석면 뿐만 아니라 석면형태를 가지는 다른 광물까지 포함하는 것으로 해석될 수도 있으나, 이하 교재에서 석면은 상기 여섯 가지 석면만을 지칭하는 것으로 한다.

[표 2] 우리나라 산업안전보건법상 석면 관련 규제 변천사

- 1990년 7월 : 산업안전보건법 산업보건기준에 관한 규칙 제정 시 석면을 특정화학물질 1류로 분류(90. 7. 23. 노동부령 제62호)
 - 특화물1류인 석면은 제조 및 사용 허가 대상물질
- 1997년 5월 : 청석면과 갈석면의 제조·수입·양도·제공 또는 사용을 금지(97. 5. 16. 대통령령 제15372호)
- 1999년 6월 : 제조등의 금지 유해물질에 청석면, 갈석면 중량 1% 초과 함유하는 물질 추가(99. 6. 8. 대통령령 제16388호)
- 2003년 6월 : 안소필라이트석면, 트레모라이트석면, 악티노라이트석면을 추가 금지(03. 6. 30. 대통령령 제18043호)
- 2003년 7월 : 산업보건기준에 관한 규칙이 전면개정되면서 ‘제12장 허가대상유해물질에 의한 건강장해의 예방’ 내에 ‘제6절 석면 제조·사용작업 및 해체·제거작업의 조치기준’을 신설하여 건축물 해체·제거작업을 엄격히 관리하도록 함(03. 7. 12 노동부령 제195호)
- 2003년 7월부터 화학물질 및 물리적인자의 노출기준이 개정·시행되면서 백석면 등 모든 석면의 노출기준을 0.1 개/cm³로 강화(02. 2. 4. 노동부 고시 제2002-2호)
 - 2003년 7월 이전 : 백석면 2 개/cm³, 갈석면 0.5 개/cm³, 청석면 0.2 개/cm³, 석면(기타형태) 2 개/cm³
- 2007년 1월부터 중량 1% 초과하여 석면을 함유하는 지붕·천장·벽 또는 바닥재용 석면시멘트제품 및 자동차관리법상 자동차용 석면마찰제품의 제조·수입·양도·제공 또는 사용 금지. 다만, 압출성형시멘트판은 2008. 1월부터 금지(06. 9. 13 노동부 고시 제2006-25호)
- 2007년 2월 : 산업보건기준에 관한 규칙 ‘제6절 석면 제조·사용작업 및 해체·제거작업의 조치기준’의 작업기준에 사전조사의무, 경고표지 설치, 흡연 등의 금지 등을 추가하여 건축물 해체·제거작업 시 조치기준 강화(07. 2. 5 노동부령 제266호)
- 2009년 1월부터 중량 0.1% 초과하여 석면을 함유하는 모든 석면함유제품의 제조·수입·양도·제공 또는 사용 금지. 다만, 잠수함 및 미사일용 석면개스킷제품, 미사일용 석면단열제품, 화학공업설비용으로서 100℃ 이상 온도의 부식성유체를 취급하는 부분에 사용되는 입경 1400mm 이상의 석면조인트시트개스킷, 화학공업 설비용으로 사용되는 입경 2300mm 이상의 석면조인트시트개스킷은 대체품 개발 시 까지 제조·수입·양도·제공 또는 사용 가능(07. 7. 2. 노동부 고시 제2007-26호)
- 2009년 8월 7일 : 일정면적 이상의 건축물 등 해체·제거 시 사전에 지정된 석면조사기관을 통한 석면조사를 의무화하고, 일정면적 또는 양 이상의 석면제거 시 등록된 석면해체·제거전문업체를 이용토록 하며, 작업완료 후 석면의 공기 중 농도 측정을 의무화(산업안전보건법 일부 개정법률, 2009년 2. 6. 공포)

개정된 법률에 따라 2009년 8월 7일부터 일정면적 이상의 건축물 또는 설비 해체·제거 시 노동부로부터 지정받은 석면조사기관을 통한 사전 석면조사, 등록된 전문업체를 통한 석면 해체·제거 및 작업완료 후 공기 중 석면농도 측정이 의무화되었다. 환경부는 유해화학물질관리법에 따라 백석면 및 백석면을 1% 이상 함유한 물질을 취급제한물질로, 나머지 다섯 가지 각섬석계 석면 및 각섬석계 석면을 1% 이상 함유한 물질을 취급금지물질로 규제하고 있으며, 폐기물관리법에 따라 석면을 1% 이상 함유하는 물질을 지정폐기물로서 엄격히 관리하고 있다.

석면의 직업적 환경적 노출을 예방하기 위한 우리나라의 공기 중 석면농도기준은 표 3과 같다. 국내에서 적용되는 있는 공기 중 석면농도 기준은 크게 작업자 개인 노출 농도와 환경 중 지역시료 농도로 구분할 수 있다.

작업자 개인노출 농도란 석면 또는 석면이 함유된 물질을 취급하거나 석면에 노출될 우려가 있는 작업자에 대한 석면농도 기준이다. 우리나라에서 석면은 허용기준 이하 유지 대상 유해인자로서 화학물질 및 물리적인자의 노출기준(노동부 고시 제 2009-3)에 따라 1일 8시간 시간가중평균(TWA, Time-Weighted Average) 농도 0.1 개/cm³로 규제되고 있다. 공기 중 농도 0.1 개/cm³는 1976년 미국 국립산업안전보건연구원(NIOSH)에서 석면의 발암성과 당시 일반적으로 적용가능한 분석방법인 위상차현미경법을 고려하여 최초 권고한 것이다. 미국 국립산업안전보건연구원은 이 농도 기준을 발암성 이외의 석면 건강장해를 예방하고, 석면에 의한 암 발생 위험도를 실질적으로 낮추기 위한 농도 수준으로서 제안하였다. 그러나 석면에 의한 암 발생을

[표 3] 우리나라의 공기 중 석면농도 기준(2009년 9월 28일 현재)

부처	관련법규	대상	기준	비고
노동부	산업안전보건법	석면에 노출되는 근로자	0.1 개/cm ³	규칙 별표 11의3
		석면해체·제거 후 작업완료 확인	0.01 개/cm ³	규칙 제80조의9
		석면에 노출되는 근로자 (사무실)	0.01 개/cm ³	사무실 공기관리 지침 (노동부 고시 제2006-64)
환경부	다중이용시설 등의 실내공기질 관리법	다중이용시설	0.01 개/cm ³	시행규칙 별표 1, 3
교육부	학교보건법	학교 시설	0.01 개/cm ³	시행규칙 별표 4의2

완전히 막을 수 있는 방법은 석면의 사용금지 뿐이라고 권고하였다¹⁾. 따라서 동 석면농도 기준은 폐암이나 악성중피종과 같은 암 발생 위험으로부터 완전히 안전한 수준을 규정한 것은 아니므로, 석면과 같은 발암성물질은 공기 중 농도가 노출기준 이하이더라도 가능한 낮은 수준으로 유지하기 위해 노력해야 한다.

환경 중 지역시료 농도란 사무실, 석면해체·제거 후 작업장, 일반 대기 중의 공기 중 석면농도 기준으로 모두 0.01 개/cm³로 규제되고 있다(표 3. 참조). 이 농도는 위상차현미경을 이용한 공기 중 석면농도의 측정·분석 시 결과의 변이를 고려할 때 재현성 있게 평가 가능한 최소한의 농도 수준으로, 사실상 석면의 건강장해로부터 안전한 공기 중 석면농도 수준을 의미하는 것은 아니다. 따라서 공기 중 석면농도가 0.01 개/cm³ 이하라는 것은 공기 중에 석면을 포함한 섬유의 농도가 위상차현미경을 이용해 실질적으로 분석 가능한 최소 수준의 농도 이하라는 의미로 이해할 수 있다.

1) NIOSH/OSHA, Workplace Exposure To Asbestos: Review and Recommendations, DHHS(NIOSH) Publication 81-103, 1976

II. 위상차현미경

1. 위상차현미경의 구성

공기 중 석면의 계수분석 시 사용하는 위상차현미경(PCM, Phase Contrast Microscope)은 Köhler 조명(Köhler illumination)을 잘 구현할 수 있는 투과조명방식의 현미경을 사용한다. 위상차현미경을 이용한 공기 중 석면분석은 경험적인 방법이므로 약속된 일정 사양을 만족하는 현미경을 사용해야 분석결과를 타 분석기관의 분석결과나 노출기준과 비교할 수 있다. 석면 계수분석을 위한 위상차현미경의 일반적인 사양은 다음과 같다(광학현미경의 주요 부위별 명칭은 그림 1 참조). 세부적인 사양은 제조사와 모델에 따라 다소 차이가 있으므로 관련 매뉴얼을 참조한다.

광원(Light Source)

- 할로겐램프 광원
- 투과조명 방식

집광기(Condenser)

- 집광고리(condenser annulus)가 삽입된 집광기

대물렌즈(Objective)

- 10배 위상차대물렌즈
- 40배 위상차대물렌즈(N.A. 0.65~0.75)
- ※ 석면 분석 시 총배율은 400배임

재물대(Stage)

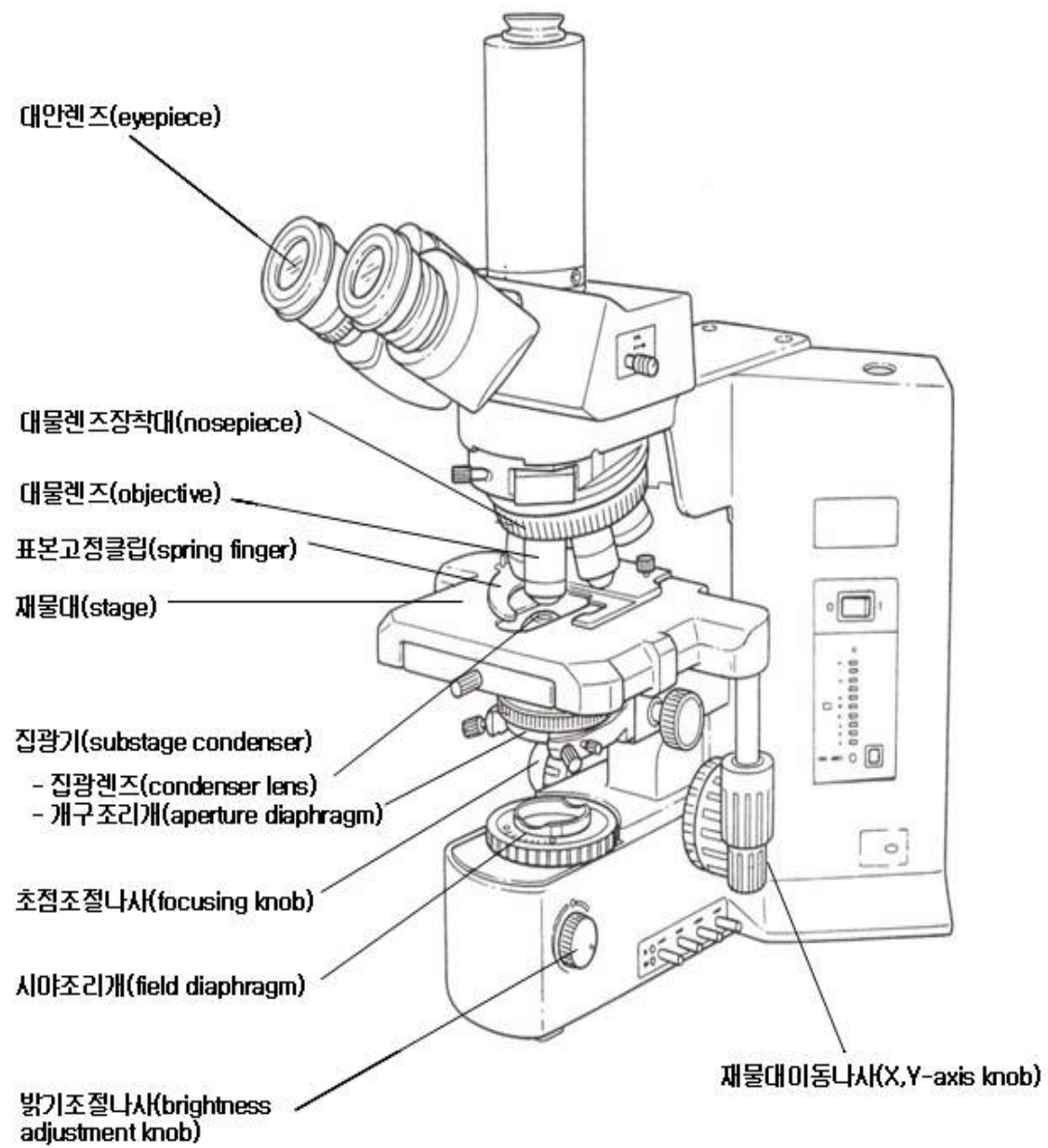
- X, Y-축으로 이동 가능한 형태로 슬라이드 고정을 위한 표본고정 클립이 있는 것

대안렌즈(Eyepiece)

- Binocular 또는 trinocular 타입의 헤드
- Wide-eyefield 또는 Huygenian 타입의 10배 대안렌즈로 Walton-Beckett 그라티쿨 삽입이 가능한 형태

기타

- Walton-Beckett 그라티쿨 (Type G-22)
- Phase centering telescope
- 그린필터($\lambda \approx 530$ nm) 또는 블루필터



[그림 1] 광학현미경의 주요 부위별 명칭

2. Köhler 조명

광학현미경을 통해 이미지를 관찰할 때 표본을 조명하는 방법은 양질의 이미지를 관찰하기 위한 가장 중요한 요소 중의 하나이다. Köhler 조명(Köhler illumination)은 광학현미경에서 표본을 조명하는 방법 중 하나로서, 1893년에 독일 Carl Zeiss사의 August Köhler가 고안하였다. 이 조명방법을 사용하면 시야 전체를 밝고 균일하게 조명하고 눈부심 현상을 최소화하며 현미경의 분해능과 초점심도를 향상시켜 좋은 이미지를 관찰할 수 있으므로, 현대 대부분의 광학현미경에서 채택하고 있다. 따라서 광학현미경에서 좋은 이미지를 관찰하기 위해서는 Köhler 조명이 잘 구현되도록 해야 한다.

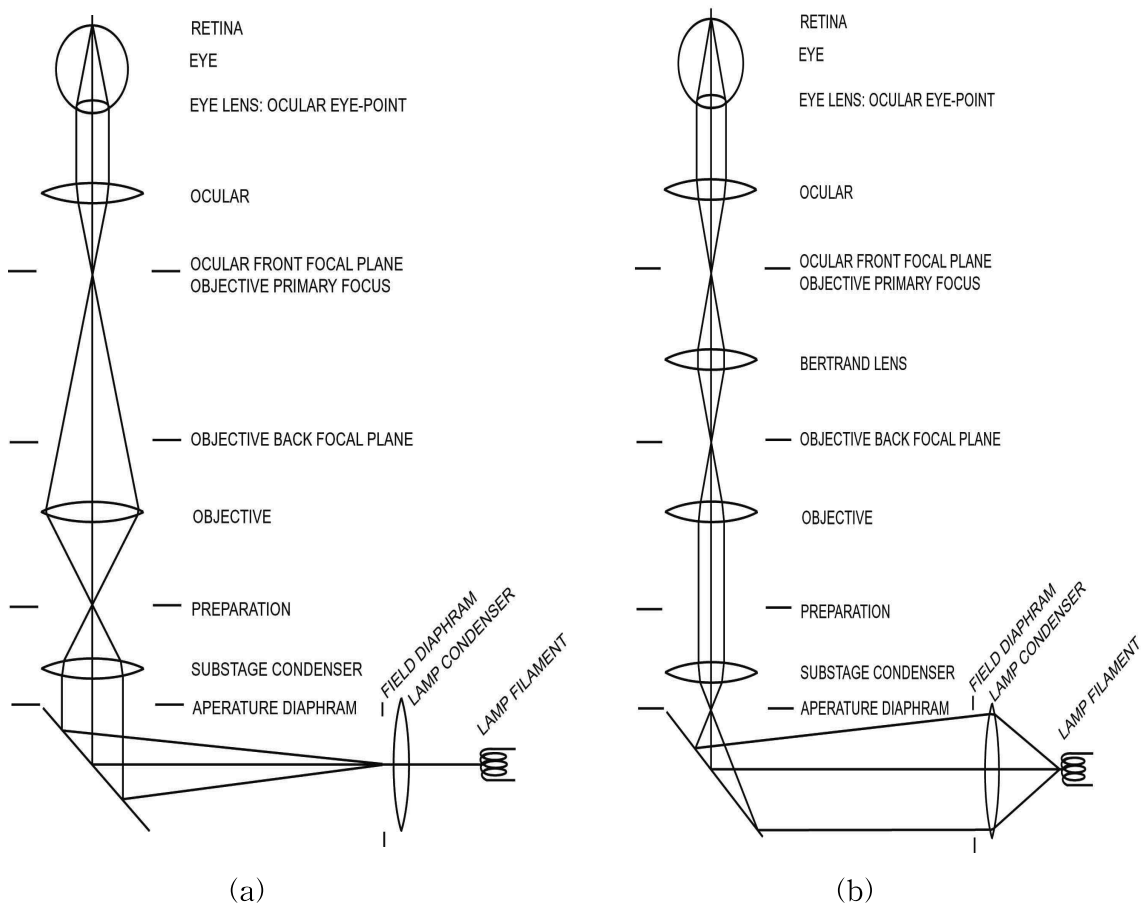
Köhler 조명을 구현하기 위해서는 현미경의 여러 광학부품의 위치를 적절히 조절하여 다음 2 개의 켈레이미지(conjugate image)가 형성되도록 해야 한다. 켈레이미지란 현미경의 광학경로 상에서 동시에 초점이 맞는 면의 이미지를 말하는 것이다. 그림 2에서 (a)는 우리가 관찰하는 표본의 이미지를 형성하는 빛의 광학경로를 나타낸 그림으로 시야조리개, 표본, 대안렌즈의 전방초점면(front focal plane)에서 동시에 초점이 맞는 켈레이미지가 형성된다. 반면에 (b)는 현미경 조명이 형성하는 광학경로를 나타낸 그림으로서 램프 필라멘트, 개구조리개, 대물렌즈의 후방초점면(back focal plane)에서 동시에 초점이 맞는 켈레이미지가 형성된다.

켈레이미지를 형성시켜 좋은 Köhler 조명을 구현하기 위해서는 현미경의 광학부품을 조절하여 다음과 같은 요건을 만족시켜야 한다.

- 1) 램프 필라멘트의 이미지가 개구조리개의 개구부와 대물렌즈의 후방초점면에서 초점과 중심이 맞아야 하며, 전체 시야에 가득 채워져 보여야 함
- 2) 시야조리개의 이미지가 표본 및 관찰하는 시야에서 초점과 중심이 맞아야 하며, 관찰하는 시야의 넓이만큼 개방되어야 함

최근에 시판되고 있는 현미경 모델들은 대부분 램프 필라멘트의 중심과 초점이 미리 맞춰져 고정된 형태(pre-centered type)로 램프 필라멘트와 램프 집광기의 조절이 필요 없거나, 광학경로 상에 디퓨저(diffuser) 등 광학부품이 삽입되어 필라멘트의 이미지를 직접 관찰할 수 없는 경우가 많으므로 현미경 조작 시 상기 요건 1)은 생략할 수 있다. 따라서 요건 2)를 만족하도록 현미경을 부품을 조작하면 좋은 Köhler 조명을 구현할 수 있다.

동일한 사양의 현미경을 사용하더라도 현미경의 조절 상태에 따라 관찰되는 이미지의 질은 크게 차이날 수 있다. 석면분석 시 나쁜 이미지는 검출한계를 높여서 분석상의 오류를 일으킬 수 있으므로, 분석자는 항상 최상의 이미지를 관찰할 수 있도록 현미경을 관리하고, 매일 일련의 연속된 분석을 시작하기 전에 현미경이 최상의 분해능을 구현할 수 있도록 조절한 후 사용해야 한다.



[그림 2] Köhler 조명의 광학경로; (a)orthoscopic viewing: 시야조리개, 표본, 대안 렌즈의 전방초점면이 켈레이미지를 형성, (b)conoscopic viewing: 램프 필라멘트, 개구조리개, 대물렌즈의 후방초점면이 켈레이미지를 형성

3. 위상차현미경의 원리와 구성

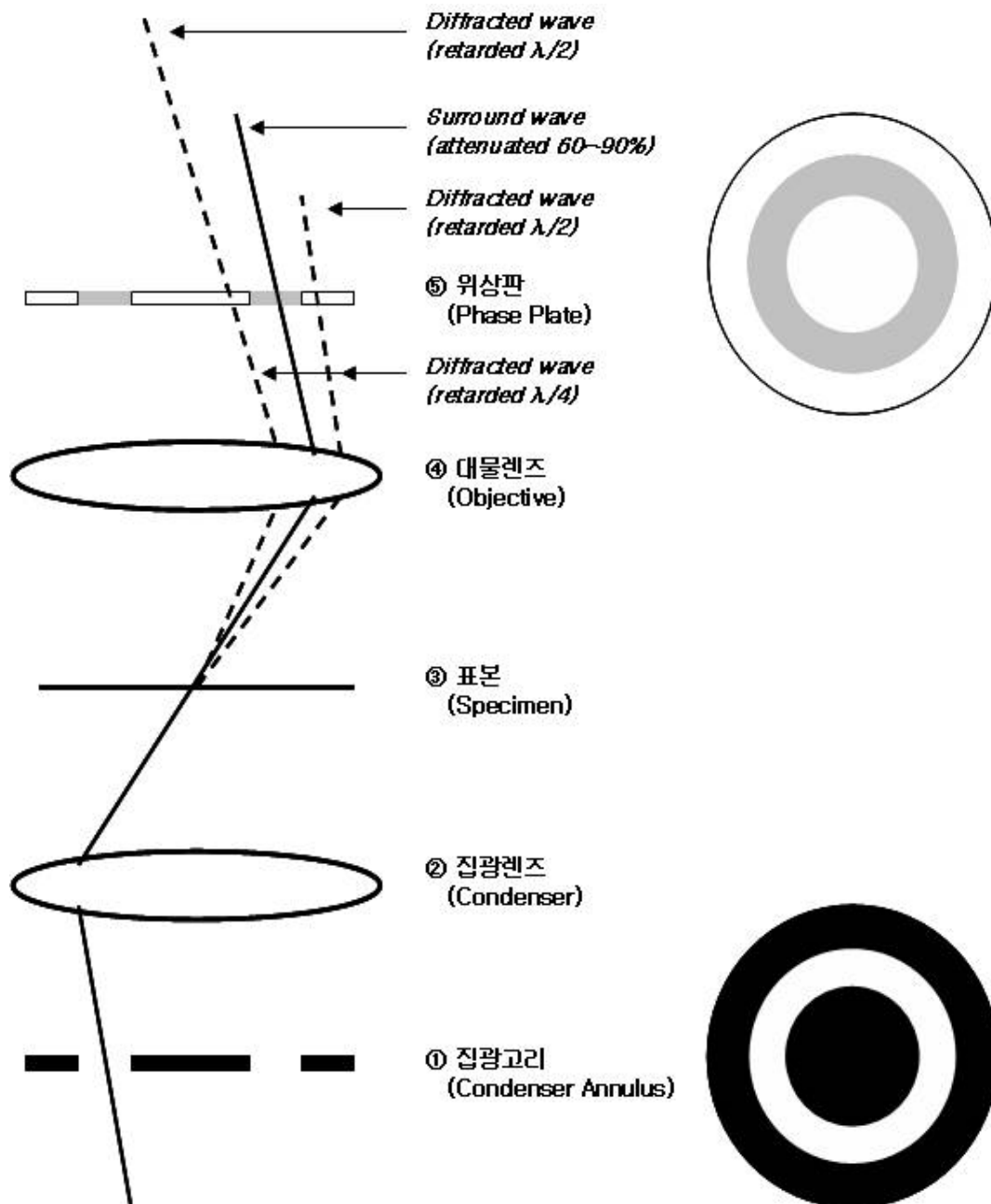
위상차현미경(phase contrast microscope, PCM)은 1934년에 독일의 물리학자 프리츠 제르니케(Frits Zernike)가 얇고 투명한 현미경 표본으로부터 높은 명암비의 이미지를 관찰할 수 있도록 고안한 광학현미경 중 하나이다. 위상차현미경은 표본에서 입자를 투과한 빛과 투과하지 않은 빛 사이에서 발생하는 미세한 위상의 차이를 진폭의 차이로 바꾸어 높은 명암비로 입자를 또렷하게 관찰할 수 있도록 한다.

위상차현미경에서 일반 명시야현미경(bright field microscope)에 비해 높은 명암비의 이미지를 관찰하게 되는 원리를 그림 3에 도식화 하였다. 현미경의 할로겐램프로부터 발생된 등위상선(동일한 위상을 갖는 빛)은 재물대 하단 집광기(substage condenser)의 초점평면(focal plane)에 위치한 ①집광고리(condenser annulus)와 ②집광렌즈(condenser)를 통해 표본을 조명한다. 빛은 ③표본을 지나면서 두개의 경로로 나누어진다. 하나는 표본을 지나며 표본 중 입자가 아닌 입자 주변을 투과하여 원래의 광학경로에 따라 진행하는 등위상선으로 이를 주변파(surround wave, S-wave, S)라고 한다. 다른 하나는 표본 중 입자를 투과하며 넓은 호의 형태로 회절되어 대물렌즈의 개구부 전체로 퍼져 지나가는 빛으로 이를 회절파(diffracted wave, D-wave, D)라고 한다. 빛이 어떤 매질을 투과할 때 빛의 진행속도는 매질의 굴절률에 따라 달라지는데, 이때 빛의 진행속도는 매질의 굴절률이 클수록 속도는 느려지고 매질의 굴절률이 작을수록 빨라진다. 만약 입자의 굴절률이 주변 매질보다 크다면(일반적으로 입자보다 낮은 굴절률의 굴절용액을 사용한다) 현미경의 램프로부터 발생된 등위상선은 입자를 투과하는 회절파가 주변파에 비해 느린 속도로 투과되므로, 회절파는 주변파에 비해 상대적으로 지체(retardation)되어 위상의 차이가 발생한다. 이와 같이 두 빛 사이에 발생하는 상대적인 위상의 차를 위상편위(phase shift, δ)라고 하며, 다음과 같이 라디안 값으로 정의된다.

$$\text{위상편위(Phase Shift)} = \delta = 2\pi\Delta/\lambda$$

이때 Δ 는 두 빛의 광로차(optical path difference)로, 굴절률 n_1 과 n_2 를 갖는 두 매질 사이의 광로차는 아래 식과 같이 정의된다.

$$\text{광로차(Optical Path Difference)} = \Delta = (n_2 - n_1) \cdot t$$



[그림 3] 위상차현미경의 광학경로 및 구성

예를 들어, 미국산업안전보건연구원의 측정·분석법인 NMAM #7400에 따라 백석면 섬유를 위상차현미경으로 관찰한다고 가정하고 광로차를 계산해보자. 백석면의 굴절률은 약 1.55이고 백석면 섬유를 둘러싸는 고정액은 트리아세틴(triacetin)으로 굴절률은 약 1.43이다. 관찰하고자 하는 백석면 섬유의 두께가 $1\ \mu\text{m}$ 라면, 두 빛의 광로차는 위 식에 따라 $(1.55-1.43)\times 1\ \mu\text{m}$ 이므로 계산하면 $120\ \text{nm}$ 이다. 이것은 가시광선 중 녹색 빛의 파장($\lambda=530\ \text{nm}$)의 약 1/4에 해당한다. 따라서 백석면 섬유를 투과한 빛인 회절파가 백석면을 둘러싸고 있는 트리아세틴을 투과한 주변파에 비해 빛의 파장의 약 1/4 만큼 지체되어 두 빛 사이에는 $\pi/2$ 의 위상편위가 발생한다.

이렇게 위상차현미경에서 표본을 지나며 경로가 구분되고 위상의 차이가 발생한 두 빛은 ④대물렌즈를 지나 ⑤위상판(phase plate)을 투과한다. 위상판을 투과하면서 입자파에 비해 밝기가 강한 주변파는 위상판의 검은색 고리부분을 투과하면서 빛의 60~90%가 흡수되고, 주변파에 비해 다시 파장의 1/4 만큼 위상이 지체되어 추가로 $\pi/2$ 의 위상편위가 발생한다. 결국 위상판을 투과한 같은 파장의 두 빛은 비슷한 진폭을 가지되 위상의 차이는 파장의 1/2에 해당되는 π , 즉 위상이 서로 반대인 빛으로 조작된다. 이렇게 조작된 두 빛은 현미경의 중간 이미지평면(intermediate image plane)에서 빛의 간섭현상(interference)을 일으키며 합쳐진다. 우리가 관찰하고자 하는 입자의 이미지를 형성하는 빛인 입자파(particle wave, P-wave, P)는 회절파와 주변파가 합쳐진 간섭현상의 결과로 형성되며, 이를 수식으로 표현하면 다음과 같다.

$$P = S + D$$

주변파와 회절파는 위상이 서로 반대(약 π)이므로 이런 경우 상쇄간섭(destructive interference)이 발생한다. 따라서 입자파는 주변파와 회절파의 상쇄간섭의 결과이므로 입자파는 주변파에 비해 작은 진폭을 가지게 된다. 현미경에서 이미지의 명암은 입자와 입자 주변 이미지를 형성하는 빛의 상대적 세기(intensity)의 차이, 즉 입자파와 주변파의 진폭 차이에 의존한다. 위상차현미경에서 주변파와 회절파의 상쇄간섭 결과인 입자파는 주변파에 비해 작은 진폭을 가지므로, 입자가 주변에 비해 어둡게 보여서 투명하고 얇은 입자를 보다 높은 명암비로 관찰할 수 있다.

다시 한번 정리하면, 위상차현미경의 구성에 있어 가장 중요한 개념은 집광고리를 이용한 조명을 이용해 표본을 통과한 주변파와 회절파를 분리시키고, 이를 대물렌즈의 후방초점면에 위치한 위상판의 서로 다른 위치에 투영시켜 진폭과 위상을

각각 조절하여 두 빛의 간섭효과를 극대화시킴으로서 높은 명암의 이미지를 얻는 것이다. 이러한 조작을 위해 위상차현미경에는 일반적인 명시야법의 현미경(bright field microscope)에 두개의 주요 부품이 추가되어 있다.

하나는 집광고리로 집광기 집광렌즈의 전방초점면에 위치한다. 집광고리는 빛이 투과할 수 있는 원형의 고리가 있는 검은색 불투명한 재질의 얇은 판으로 위상차현미경은 집광고리를 투과하는 빛으로 표본을 조명한다.

다른 하나는 위상판으로 대물렌즈의 후방초점면에 위치한다. 위상판은 주변파와 회절파에 파장의 1/4 만큼 상대적인 위상 차이를 가하고, 주변파의 빛의 세기를 60~90% 흡수하여 진폭을 줄여주는 역할을 한다. 이처럼 위상판이 장착된 대물렌즈를 위상차대물렌즈(phase objective)라고 한다.

위상차현미경에서 좋은 이미지를 관찰하기 위해서는 집광고리를 투과 후 회절되지 않은 빛인 주변파는 모두 위상판의 검은색 고리 부분을 투과해야 한다. 그러기 위해서는 관찰하는 대물렌즈의 배율에 따라 집광고리와 위상판 내 고리의 시야상 크기가 맞도록 조절해야 한다. 이를 위해 위상차대물렌즈는 위상판 고리의 크기에 따라 Ph1, Ph2 등의 마킹으로 구분되어 있으며, 현미경 재물대 하단의 집광고리에도 크기에 따라 Ph1, Ph2 등으로 동일하게 마킹되어 대물렌즈의 위상판과 잘 맞는 크기의 집광고리를 광로에 삽입할 수 있도록 되어 있다.



[그림 4] 위상차현미경의 주요 부품

4. 위상차현미경 조절법

동일한 사양의 현미경을 사용하더라도 현미경의 조절 상태에 따라 관찰되는 이미지의 질은 크게 달라지며, 석면 분석 시 결과에 영향을 미치게 된다. 따라서 분석자는 항상 최상의 이미지를 관찰할 수 있도록 현미경을 조절하고 매일 일련의 분석을 시작하기 전에 현미경의 분해능을 확인해야 한다.

다음의 현미경 조절 과정은 앞에서 설명한 최적의 Köhler 조명과 위상차를 구현하기 위한 일반적인 과정이다. 세부과정은 제조사와 장비 모델에 따라 다소 차이가 있을 수 있으므로 제조사의 매뉴얼을 참고한다.

- 1) 두 대안렌즈 사이의 거리를 조절하여 분석자의 동공 사이의 거리에 맞도록 시간거리(interpupillary distance)를 조절한다.
- 2) 적당한 표본을 현미경 재물대 위에 올려놓는다.
- 3) 집광기의 회전판(rotating disc)을 돌려서 명시야 상태(집광고리가 삽입되지 않은 상태)로 맞춘다.
※ 보통 'O' 또는 'B'로 표기되어 있다.
- 4) 시야조리개와 개구조리개를 최대로 개방한다.
- 5) 집광기를 최대 높이로 올린다.
※ 일반적으로 표본 바로 아래 약 0.5~1 mm 높이. 집광렌즈가 표본에 닿지 않도록 주의한다.
- 6) 40배 대물렌즈로 표본에 초점을 맞춘다.
※ 초심자의 경우 10배의 낮은 배율의 대물렌즈로 초점을 맞춘 후 40배 대물렌즈를 사용하면 보다 쉽게 초점을 맞출 수 있다.
- 7) 현미경 시야를 한쪽 눈으로 각각 관찰하며 다이옵터(diopter)를 조절한다. 이미지 또는 레티클이 가장 또렷하게 관찰되도록 한다.
- 8) 시야조리개를 최대한 닫은 후, 집광기의 높이를 조절하여 시야조리개의 개구부 가장자리가 또렷하게 보이도록 초점을 맞춘다.
- 9) 집광기 중심조절나사를 이용해 시야조리개의 개구부가 시야 중앙에 오도록 조절한 후, 시야조리개 개구부가 시야에 접하도록 연다.

10) 개구조리개의 개구부를 적절히 조절한다.

※ 개구조리개는 최대로 연 후 점차 좁혀가며 최상의 이미지를 얻도록 조절하되 일반적으로 제조사에서 제시하는 적절한 개구 수준에 맞추는 것이 바람직하다. 개구조리개의 개구부가 작아질수록 이미지의 분해능과 밝기는 감소하나 명암은 증가하고, 반대로 개구조리개의 개구부가 커질수록 이미지의 분해능과 밝기는 증가하고 명암은 감소한다. 위상차현미경에서는 개구조리개의 개구부가 작아질수록 이미지 결함 중 하나인 후광효과(halo effect)가 증가하여 이미지의 질이 나빠질 수 있다.

11) 집광기의 회전판을 돌려서 집광고리를 삽입한다.

※ 대물렌즈에 표기된 것과 같은 크기의 집광고리를 삽입한다.

12) 대안렌즈 하나를 제거하고 phase centering telescope를 삽입한다.

13) 집광고리 중심조절나사를 조절하여 집광고리의 이미지(밝은 고리형태의 이미지)와 위상판의 이미지(어두운 고리형태의 이미지)의 중심이 서로 일치하도록 조절한다.

※ 반드시 집광고리의 밝은 고리 이미지가 위상판의 어두운 고리형태의 이미지 내에 포함되어야 한다.

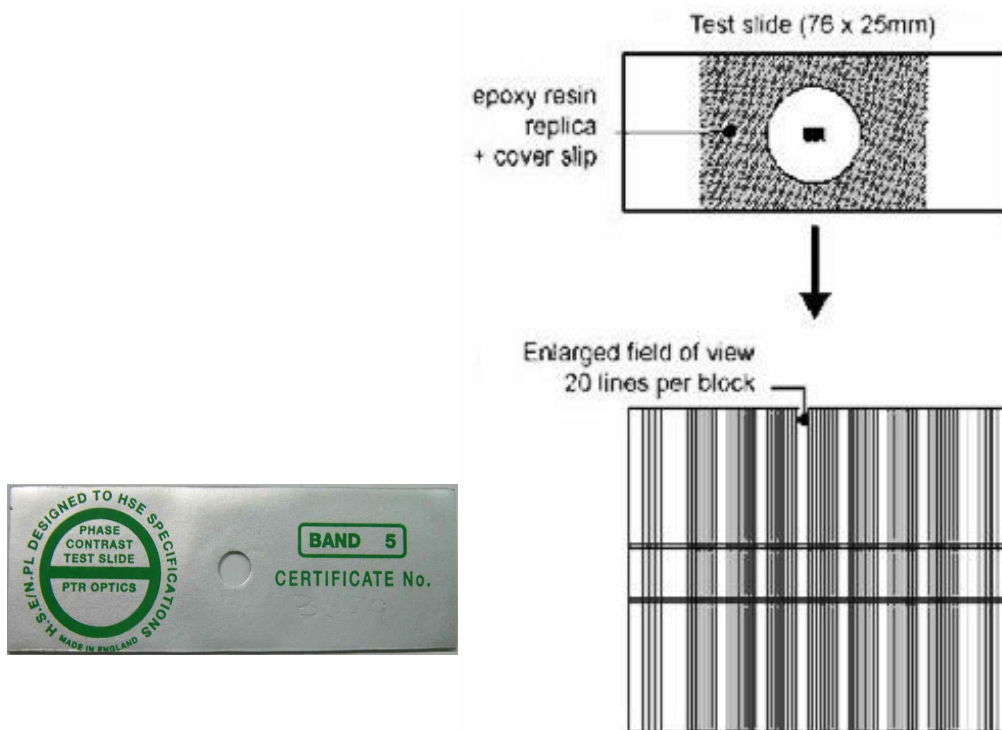
※ 이때 9)에서 이용한 집광기 중심조절나사를 이용하여 조절하지 않도록 주의한다.

14) Phase centering telescope를 제거하고 대안렌즈를 삽입한다.

5. HSE/NPL 테스트 슬라이드

HSE/NPL 테스트 슬라이드는 석면 계수분석 시 위상차현미경의 분해능 확인을 위해 영국안전보건연구소(Health and Safety Laboratory, HSL)에서 영국국립물리연구소(National Physical Laboratory, NPL) 및 PTR Optics와 공동으로 개발한 표준 슬라이드이다.

HSE/NPL 테스트 슬라이드의 관찰부위는 7개의 밴드로 구성되어 있으며, 각 밴드는 너비 $0.25 \sim 1.1 \mu\text{m}$ 의 20개의 선으로 이루어져 있다. 굴절률 1.58인 수지에 깊이 대 너비의 비가 약 1.1인 V자 모양의 홈을 새기고 그 위를 굴절률 1.485인 수지로 홈을 채운 후 0.17 mm 의 커버슬립을 덮어 제작된다. 각각의 밴드는 $20 \mu\text{m}$ 의 간격을 두고 배열되어 있으며 분해능 확인을 위한 테스트 구간은 두 줄 또는 세 줄로 된 장방형의 구간으로 구분되어 있다. 각각의 HSE/NPL 테스트 슬라이드는 일련번호를 매겨 공인된 시험성적서와 함께 시판된다.



[그림 5] HSE/NPL 테스트 슬라이드

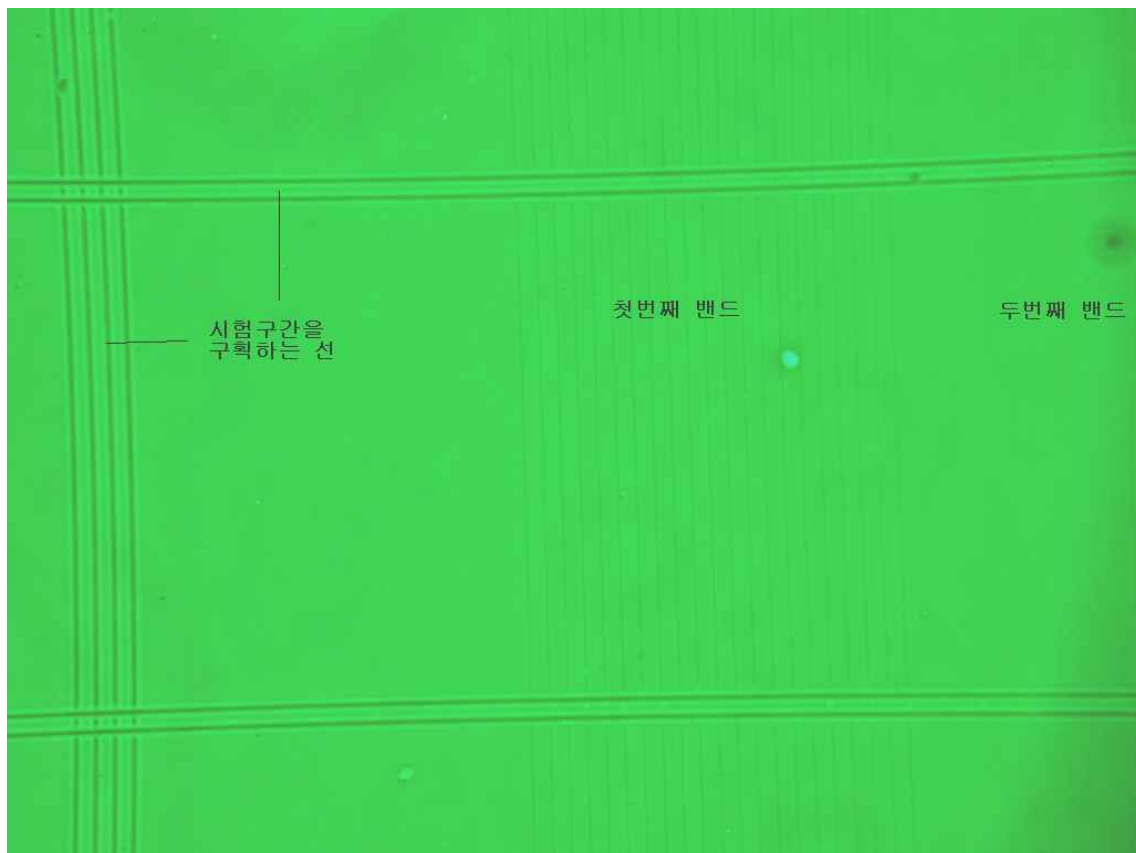
[표 4] 각 밴드 별 선의 너비 및 최대 위상 변화값

밴드 번호	선 너비 (μm)	녹색광($\lambda=530\text{nm}$) 투과 시 최대 위상편이
1	1.08	6.6°
2	0.77	4.7°
3	0.64	3.9°
4	0.53	3.2°
5	0.44	2.7°
6	0.36	2.2°
7	0.25	1.5°

현미경의 분해능은 검출 가능한 석면섬유의 최소 지름과 분석결과에 영향을 미치므로, 정확한 석면 분석을 위해 분석자는 매일 일련의 분석을 시작하기 전에 HSE/NPL 테스트 슬라이드를 이용해 현미경의 분해능을 반드시 확인해야 한다. 분해능의 기준은 붉은 색의 'Band 4'로 마킹된 HSE/NPL 테스트 슬라이드를 사용할 경우 네 번째 밴드가 완전히 보이고, 다섯 번째 밴드는 부분적으로 보이며, 여섯 번째 밴드는 보이지 않는 수준일 때 현미경의 분해능이 만족스러운 것으로 판단할 수 있다. 녹색의 'Band 5'로 마킹된 HSE/NPL 테스트 슬라이드를 사용할 경우 다섯 번째 밴드가 완전히 보이고, 여섯 번째 밴드는 부분적으로 보이며, 일곱 번째 밴드는 보이지 않는 수준일 때 현미경의 분해능이 만족스러운 것으로 판단할 수 있다. 이때 '보이는(visible)'이란 의미는 매우 주의해서 면밀히 관찰했을 때 해당 밴드의 20개 선이 시험구간 내에서 길이방향으로 위에서 아래까지 모두 끊어지지 않고 관찰되는 수준을 의미한다. 관찰 결과가 동 기준을 벗어나면 현미경의 분해능이 석면을 분석하기에 너무 낮거나 높은 것으로 볼 수 있다. 최근 유통되는 위상차현미경은 잘 세팅하여 관찰할 경우 대부분 이러한 분해능 수준을 만족한다. 만약 위와 같은 기준을 만족하지 못하고 현미경의 분해능이 저하되었을 때에는 광학부품을 잘 닦고 Köhler 조명과 위상차가 잘 구현되도록 현미경을 다시 조절하여 관찰하고, 그래도 분해능이 나아지지 않을 때에는 제조사에 기술지원을 요청해야 한다.

다음은 HSE/NPL 테스트 슬라이드를 이용하여 현미경의 분해능을 확인하는 일반적인 과정이다.

- 1) 40배 대물렌즈와 10배 대안렌즈를 이용하여 현미경이 위상차 모드에서 최적의 성능을 갖도록 조절한다.
- 2) HSE/NPL 테스트 슬라이드를 알루미늄 라벨이 붙은 면이 위쪽을 향하도록 재물대에 위에 올려놓는다.
- 3) 슬라이드의 투명한 원형의 중심 부위에 있는 시험구간으로 재물대를 이동하고 현미경의 초점을 맞춘다.
- 4) 첫 번째 밴드로부터 하나씩 각 밴드를 시야의 중심으로 이동 후 초점을 맞추어 가며 관찰한다.



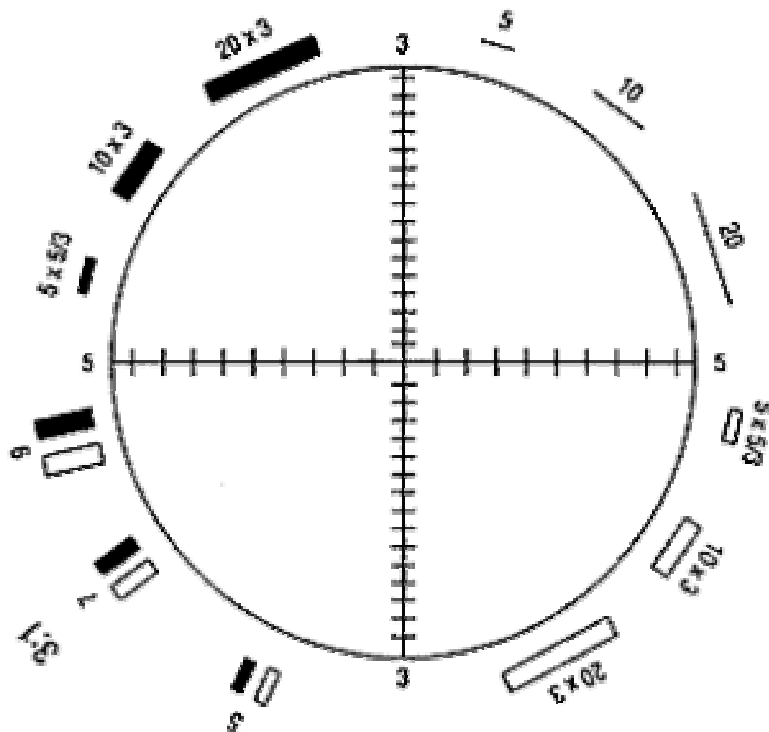
[그림 6] HSE/NPL 테스트 슬라이드의 시험구간을 위상차현미경으로 관찰한 이미지 (400배)

6. Walton-Beckett 그레티쿨

Walton-Beckett 그레티쿨은 석면 계수분석 시 사용되는 레티클(reticle)로서, 1977년 영국 IOM(Institute Of Medicine) 소속의 W. H. Walton과 S. T. Beckett이 최초 고안하였다.

Walton-Beckett 그레티쿨은 현미경 시야 중심부위에 시야 상 지름이 $100\ \mu\text{m}$ 인 원으로 계수면적을 정의하고, 원의 지름 선상에 각각 $3\ \mu\text{m}$ 와 $5\ \mu\text{m}$ 의 스케일이 있어 섬유 크기를 쉽게 가늠하도록 하였다. 또한 계수면적을 정의한 원의 주위에 가는 섬유의 길이 가늠을 위한 5, 10, 20 μm 길이의 선과 길이 대 지름의 비 3:1인 섬유 형태가 인쇄되어 있어 분석 시 활용할 수 있도록 하였다.

Walton-Beckett 그레티쿨은 계수면적을 원형으로 고안함으로서 계수 시 눈의 이동과 광학수차(field curvature aberration 등)의 영향을 최소화 하였으며, 대안렌즈를 회전시켜도 계수면적의 변화가 없어서, 분석 시 관찰하고자 하는 섬유와 스케일을 쉽게 비교할 수 있는 장점을 지니고 있다.



[그림 7] Walton-Beckett 그레티쿨

6.1. Walton-Beckett 그레티쿨의 세부사양

석면의 계수를 위한 Walton-Beckett 그레티쿨의 지름은 400배 배율로 관찰 시 현미경 시야에서 $100 \pm 2 \mu\text{m}$ 에 해당하는 길이(visual size)를 만족해야 한다. 현미경 제조사들은 이러한 사양을 만족하는 그레티쿨과 함께 현미경을 적절히 구성하여 판매하기도하나, 때로는 같은 모델의 같은 렌즈를 사용한 현미경이라도 현미경에 따라 이러한 기준을 만족하지 않을 수도 있다. 따라서 Walton-Beckett 그레티쿨은 현미경이 완전히 설치된 후에 동일 모델이라도 각 현미경 마다 전문 판매처로부터 맞춤형 제작하는 것이 바람직하다.

전문 제작 판매처로부터 Walton-Beckett 그레티쿨을 맞춤형 제작하기 위해서는 다음 세 가지 정보가 필요하다.

- 1) 현미경 대안렌즈 경통의 내부 지름, d
- 2) 계산된 Walton-Beckett 그레티쿨의 실제 인쇄 지름, dc
- 3) 계수법 (A rule or B rule)

위에서 ‘1)현미경 대안렌즈 경통의 내부지름’은 대안렌즈 내부에 삽입되는 레티클 렌즈의 지름을 의미한다. ‘2)계산된 Walton-Beckett 그레티쿨의 실제 인쇄 지름’은 그레티쿨을 삽입할 현미경으로 400배로 관찰 시 시야에서 그레티쿨의 지름이 $100 \mu\text{m}$ 가 되도록 하기 위한 실제 인쇄 지름을 의미하는 것으로, 다음 제II장 6.2.에 계산법을 기술하였다. 마지막으로 ‘3)계수법’은 분석 시 적용하고자 하는 계수법을 의미하는 것으로 석면 분석에는 A rule을 적용하여 분석한다.

6.2. Walton-Beckett 그레티쿨의 실제 인쇄 지름, dc 계산법

- 1) 사용 가능한 그레티쿨(reference graticule)을 대안렌즈 내에 넣는다.
 - ※ 이때 사용하는 그레티쿨은 Walton-Beckett 그레티쿨, Porton 그레티쿨 등 현미경 시야 내에서 양 끝단이 명확히 관찰 가능한 것이면 어떤 것이라도 사용 가능하다. 그레티쿨은 항상 분석자의 우세한 눈(주로 사용하는 눈) 쪽에 삽입하여 관찰한다.
- 2) 재물대에 스테이지 마이크로미터(stage micrometer)를 올려놓고 40배 대물렌즈를 표본에 맞춘다.
- 3) 시간거리와 현미경의 초점을 적절히 조절하여 그레티쿨과 스테이지 마이크로미터의 선이 명확히 보이도록 한다.
 - ※ 시간거리는 그레티쿨의 지름 계산이 끝날 때 까지 바꾸지 않는다.

4) 스테이지 마이크로미터를 이용하여 그레티쿨의 길이, $L_0(\mu\text{m})$ 를 측정한다.

※ 0.01 mm/div 스테이지 마이크로미터를 이용할 경우 작은 눈금의 1/10인 1 μm 까지 측정한다.

5) 그레티쿨을 꺼내 실제 그레티쿨의 길이, $L_a(\text{mm})$ 를 측정한다.

※ 최소 눈금크기 1/64 inch 이하의 정밀자 등을 이용하여 반복 측정한다. 그레티쿨을 꺼내지 않고 버니어가 장착된 재물대를 이용해 측정할 수도 있다.

6) 다음 비례식을 이용하여 Walton-Beckett 그레티쿨의 지름, $d_c(\text{mm})$ 를 계산한다.(결과는 소수점 둘째자리까지 반올림한다)

$$L_a \text{ mm} : L_0 \mu\text{m} = d_c : 100 \mu\text{m}$$

6.3. Walton-Beckett 그레티쿨의 계수면적 보정법

1) 재물대에 스테이지 마이크로미터를 올려놓는다.

2) 40배 대물렌즈를 표본에 맞춘다.

3) 시간거리와 현미경의 초점을 적절히 조절하여 그레티쿨과 스테이지 마이크로미터의 선이 명확히 보이도록 한다.

4) 재물대를 조절하여 그레티쿨의 양 끝이 스테이지 마이크로미터의 눈금과 동일 선상에 위치하도록 한 후, 그레티쿨의 한쪽 끝을 스테이지 마이크로미터의 임의의 한 눈금에 맞춘다.

5) 그레티쿨의 지름, $d(\text{mm})$ 를 스테이지 마이크로미터 눈금의 1/10 까지 측정한다.

6) 아래 식에 따라 측정한 그레티쿨의 지름, $d(\text{mm})$ 로부터 시야상의 그레티쿨의 면적, $A_f(\text{mm}^2)$ 를 계산한다. 계산한 결과는 0.00754 $\text{mm}^2 \sim 0.00817 \text{mm}^2$ 이내여야 한다.

※ 현미경 광학부품을 교체 또는 재조립 했거나 시간거리에 변경이 있는 경우에는 그레티쿨의 면적을 다시 보정하여 분석결과 계산에 사용한다.

$$A_f = \pi d^2/4$$

Ⅲ. 공기 중 석면 측정·분석법

1. 측정·분석법의 개요

시료채취펌프로 셀룰로스막여과지(MCE)에 일정 부피의 공기를 여과포집한다. 시료채취한 여과지는 아세톤 증기를 이용하여 투명화된 슬라이드로 전처리하고 위상차현미경으로 정해진 계수법에 따라 길이가 $5\ \mu\text{m}$ 이상이며 길이 대 지름의 비가 3:1 이상인 섬유를 계수한다. 분석결과는 개/ cm^3 (채취된 섬유수/채취한 공기의 부피)로 표현된다.

2. 적용범위 및 제한점

2.1. 적용범위

본 교재의 측정·분석방법을 이용해 분석한 결과는 현행 국내 석면의 노출기준과 직접 비교 가능하다. 노동부 산업안전보건법의 작업환경에서 공기 중 석면노출에 대한 8시간 시간가중평균(TWA) 노출기준인 $0.1 \text{ 개}/\text{cm}^3$ 와 사무실 실내공기질 관리지침 및 환경부 다중이용시설법의 권고기준인 $0.01 \text{ 개}/\text{cm}^3$ 는 위상차현미경법에 의한 분석결과를 기준으로 한 것이므로, 본 측정·분석방법을 이용하여 적절히 시료채취전략을 수립하여 채취·분석한 경우 근로자 개인시료와 지역시료 노출(권고)기준과의 비교평가에 모두 적용할 수 있다. 또한 과거의 국내외 역학조사와 작업환경측정 자료 또한 대부분 위상차현미경법으로 분석한 결과이므로, 본 측정·분석방법의 결과는 작업환경 중 석면 노출에 대한 위해도평가에도 적절히 이용할 수 있다.

2.2. 제한점

위상차현미경을 이용한 분석방법은 입자의 길이 대 지름의 비(aspect ratio)를 확인하여 섬유상 입자와 비섬유상 입자를 구분·분석하는 방법으로, 공기 중의 입자 중 길이가 $5 \mu\text{m}$ 이상이며 길이 대 지름의 비가 3:1 이상인 모든 섬유상 물질을 석면으로 간주하여 분석한다. 석면과 석면이 아닌 섬유를 구분하지 못하므로, 비섬유 섬유상 물질은 분석의 방해물질로 작용하여 이러한 입자의 농도가 높은 환경에는 본 측정·분석방법을 적용하기 어렵다. 비섬유 섬유와 석면 섬유의 구분 분석이 필요한 경우는 주사전자현미경(SEM)이나 투과전자현미경(TEM) 등을 이용해 화학조성이나 결정특성 등을 추가로 분석해서 석면 여부를 구분할 수 있다¹⁾. 또한 비섬유상 입자도 과포집될 경우 현미경 시야에서 섬유상 입자의 관찰을 어렵게 하므로 본 측정·분석방법의 검출한계를 증가시키는 방해물질로 작용한다.

본 측정·분석방법은 광학현미경이 가지는 분해능의 한계로 인해 여과지에 채취된 모든 공기 중 석면을 검출할 수 없다. 가장 가는 개별 석면섬유(fibril)의 지름은 작게는 약 $0.02 \mu\text{m}$ 로 알려져 있으며 이런 가는 섬유는 위상차현미경으로 검출할 수 없다. 위상차현미경으로 석면 분석 시 검출 가능한 섬유의 최소지름은 약 $0.2 \sim 0.4 \mu\text{m}$ 정도로 알려져 있다. 예를 들어 길이가 $10 \mu\text{m}$ 이며 길이 대 지름의 비가 100:1인 섬유의 지름은 $0.1 \mu\text{m}$ 로, 이러한 섬유는 본 분석방법으로 검출할 수 없다.

1) EDXA(energy dispersive X-ray analyzer) 등 화학조성 분석이 가능한 추가장비를 장착해야 분석 가능하다. 이와 같은 전자현미경을 분석전자현미경(analytical electron microscope, AEM)이라 한다.

위상차현미경으로 관찰되는 석면섬유는 현미경 시야 상에서는 가는 섬유형태로 보 이더라도 사실은 개별 석면섬유의 다발이다. 따라서 위상차현미경을 이용한 석면분 석 결과는 여과지에 채취된 섬유 중 관찰이 가능한 일정 지름 이상의 일부 섬유만 을 계수한 결과이므로 공기 중 모든 석면섬유 농도가 아니며, 석면섬유 농도를 가 능할 수 있는 일정한 지표로서의 농도로 이해해야 한다. 만약 각각의 개별섬유 수 준의 작은 크기의 석면섬유를 관찰하려면 투과전자현미경(TEM)이나 전계방사 주 사전자현미경(FE-SEM)을 이용해야한다.

3. 시료채취 계획

공기 중 석면 섬유농도 평가 시 시료채취 계획은 평가하고자 하는 대상에 따라 크게 개인시료 노출평가와 지역시료 노출평가로 구분하여 계획을 수립해야 한다.

개인시료 노출평가란 목적에 따라 석면 또는 석면함유물질을 취급하는 제조업 근로자, 건축물 중 석면함유 건축자재의 유지보수 또는 해체 제거 작업자 등을 대상으로 작업자 호흡기 영역 내에서 시료를 채취·분석하여 공기 중 석면섬유 농도를 노출기준과 비교하거나 위해도를 평가하기 위해 실시하는 시료채취 등을 말한다.

지역시료 노출평가는 건축물 중 석면함유 건축자재의 유지보수 또는 해체 제거 작업장이나 석면 비산 방지조치를 위한 봉인 등의 작업 시 작업장 외부로 석면 비산여부 확인, 석면에 오염되었거나 석면함유 건축자재가 사용된 장소의 해체·제거 작업 후 작업 완결여부 확인, 석면을 함유한 건축물 내부 실내, 선박 또는 기타 구조물 내의 석면 섬유 비산여부 모니터링을 위해 실시하는 시료채취 등을 말한다. 다만 본 측정·분석방법을 일반 환경 중 지역시료의 노출평가에 적용 시에는 비석면 섬유상 입자가 분석에 방해물질로 작용하여 분석결과가 실제 농도에 비해 과대평가될 가능성이 높으므로, 분석결과를 일반 환경 중의 석면 노출에 따른 위해도 평가에 이용하는 것은 적절하지 않다.

3.1. 시료의 채취유량, 채취시간, 시료의 수

공기 중 석면의 채취 유량, 채취 시간, 시료의 수는 시료채취의 목적, 공기 중 섬유상 입자와 비섬유상 입자의 농도, 시료채취장소의 상황 등에 따라 달라진다.

시료채취 유량은 0.5~16 L/min 의 범위 내에서 결정한다. 유량이 0.5 L/min 보다 적으면 계수 가능한 석면섬유가 채취되지 않을 수 있으며, 유량이 16 L/min보다 크면 입경이 큰 입자가 채취되어 계수 시 방해물질로 작용하거나 여과지에 손상을 가져 올 수 있다. 일반적으로 개인시료는 약 2 L/min, 지역시료는 약 10 L/min 정도의 유량으로 시료 채취한다.

본 측정·분석방법에서는 여과지에 채취된 섬유를 계수분석 시 발생하는 변이가 측정·분석법의 검출한계(LOD)를 결정짓는 주요 원인으로 작용한다. 따라서 공기 중 석면 시료채취시의 포집 공기량은 재현성 있는 계수분석이 가능한 최소한의 섬유 수 이상이 분석될 수 있도록 결정해야 한다. 여과지에 채취된 섬유의 계수분석 시 변이는 100개 시야 당 섬유 수가 약 40개 이하로 섬유밀도가 낮으면 분석결과가

과대평가되는 경향을 보이며, 1개 시야 당 섬유 수가 5개 이상으로 섬유밀도가 높으면 분석결과가 과소평가되는 경향을 보이는 것으로 알려져 있다. 특히 여과지에 채취된 섬유밀도가 매우 낮아 100개 시야 당 10개 이하의 섬유가 계수되면 계수 분석의 변이가 급격하게 증가하므로, 이 수준에 해당하는 농도를 사실상 본 측정·분석방법의 정량한계(LOQ)로 볼 수 있다. 따라서 시료채취자는 분석결과에 대한 일정 수준 이상의 정밀도를 확보할 수 있도록 최소 100개 시야 당 10개 이상의 섬유가 계수되었을 때 평가하고자 하는 노출기준의 초과여부 판단이 가능하도록 시료채취 계획을 수립해야 한다. 시료채취 시 여과지 단위면적 당 채취되어야 하는 섬유 수(E , f/mm^2)와 유량(Q , L/min), 비교하고자 하는 노출기준(L , $개/cm^3$)에 따른 최소시료채취시간(t , min)은 다음과 같은 식으로 계산할 수 있다.

$$t(min) = \frac{A_c E}{QL10^3}$$

<예제 1>

노출기준이 0.1 $개/cm^3$ 인 개인시료를 평가하기 위해 지름이 25 mm 인 여과지(유효여과면적, $A_c \approx 385$ mm^2)를 사용하여 2 L/min 의 유량으로 시료를 채취하고자 한다. 이때 최소시료채취시간(t)을 계산해보자. (단, 채취되어야 하는 섬유 수는 100 시야 당 20 개, Walton-Beckett 그라티쿨의 시야당 계수면적은 0.00785 mm^2 를 적용한다)

☞ 1) 채취되어야 하는 섬유수(E)를 계산한다.

$$\text{채취되어야 하는 섬유수}(E) = \frac{(20 \text{ 개}/100 \text{ 시야})}{(0.00785 \text{ } mm^2/\text{시야})} = 25.5 \text{ 개}/mm^2$$

2) 최소시료채취시간(t)을 계산한다.

$$\text{최소시료채취시간}(t) = \frac{(385 \text{ } mm^2)(25.5 \text{ 개}/mm^2)}{1000(2 \text{ L}/min)(0.1 \text{ 개}/cm^3)} = 49 \text{ min}$$

계산된 최소시료채취시간(t)은 49 분이다. 이것을 채기량으로 계산하면 98 L 이다. 따라서 시료가 과포집되지 않는 범위 내에서 각 시료채취매체 당 2 L/min 의 유량으로 최소 49 분 이상 시료채취하면(98 L 이상 채기하면) 평가하고자 하는 노출기준인 0.1 $개/cm^3$ 초과여부를 100 시야 당 20 개의 섬유를 계수하는 계수 분석의 변이 내에서 평가할 수 있다. 이와같이 분석의 신뢰성을 확보하기 위해 작업자 개인노동부 작업환경측정 및 정도관리규정(노동부고시 제2009-3호)의

[표 5] 미국 OSHA에서 권고하는 시료 채기량

작업/환경	공기량 (L)
석면 해체 · 제거작업 (먼지가 많은 경우)	100
석면 해체 · 제거작업 (먼지가 적은 경우)	240
사무실 환경	400 ~ 2,400

공기 중 석면 계수분석법에 따르면 시료채취매체 당 최소 400 L 이상 채기하
 되, 먼지가 많은 환경에서는 이보다 적게 채기할 수 있도록 규정하고 있다. 그
 러나 예제에서 보듯이 채기량이 약 98 L 미만이면 노출기준을 신뢰성 있게 평
 가할 수 없으므로, 먼지가 많은 환경이라도 가급적 각 시료채취매체 당 98 L
 이상은 채기해야 측정결과의 신뢰성을 확보할 수 있다.

<예제 2>

노출기준이 0.01 개/cm³인 지역시료를 평가하기 위해 지름이 25 mm인 여과지
 (유효여과면적, Ac ≒ 385 mm²)를 사용하여 2 L/min의 유량으로 시료를 채취하
 고자 한다. 이때 최소시료채취시간(t)을 계산해보자. (단, 채취되어야 하는 섬유
 수는 100 시야 당 20개, Walton-Beckett 그라티쿨의 시야당 계수면적은 0.00785
 mm²를 적용한다)

☞ 1) 채취되어야 하는 섬유수(E)를 계산한다.

$$\text{채취되어야 하는 섬유수}(E) = \frac{(20 \text{ 개}/100 \text{ 시야})}{(0.00785 \text{ mm}^2/\text{시야})} = 25.5 \text{ 개/mm}^2$$

2) 최소시료채취시간(t)을 계산한다.

$$\text{최소시료채취시간}(t) = \frac{(385 \text{ mm}^2)(25.5 \text{ 개/mm}^2)}{1000(2 \text{ L/min})(0.01 \text{ 개/cm}^3)} = 491 \text{ min}$$

계산된 최소시료채취시간(t)는 491분이다. 이것을 채기량으로 계산하면 982 L
 이다. 따라서 시료가 과포집되지 않는 범위 내에서 각 시료채취매체 당 2
 L/min의 유량으로 최소 491분 이상 시료채취하면(982 L 이상 채기하면) 평가하
 고자 하는 노출기준인 0.01 개/cm³ 초과여부를 100개 시야 당 20개의 섬유를 계
 수하는 계수분석의 변이 내에서 평가할 수 있다. 이와 같이 계수분석의 최소한
 의 정밀도를 확보하기 위해 노동부 석면조사 및 정도관리규정(노동부고시 제
 2009-3호)에 따르면, 석면 해체 · 제거작업 완료 후 밀폐막 내의 완료 후 공기

중 석면농도 측정 시에는 최소 1,200 L 이상의 공기를 채취하도록 규정하고 있다. 다만 일반 실내공기의 경우 공기 중 다른 분진의 방해로 인해 1,200 L 이상 채기 시 분진이 과포집되어 분석이 불가능할 수도 있으므로, 환경부 실내공기질공정시험방법에 따르면 600 L의 공기를 채취하도록 규정하고 있다.

4. 기구 및 시약

4.1. 기구

- 1) 채취매체 : 기공 크기 0.8 μm , 직경 25 mm 멤브레인 여과지(membrane cellulose ester filter)
50 mm의 전도성 카울(extension cowl)이 있는 직경 25 mm의 3단 카세트 및 백업 패드(backup pad)를 이용한다. 공기가 새지 않도록 카세트의 연결부위는 절연테이프 등으로 감아서 사용한다.
※ 전도성 카울을 사용해야 정전기와 기류에 의한 방해 작용이 없어 유효채취면적에 대해 균일한 시료채취가 가능하다.
- 2) 시료 채취용 펌프 및 튜브 : 개인시료 채취 시에는 약 2 L/min의 유량으로 시료채취가 가능한 배터리가 장착된 개인시료 채취용 펌프를 사용한다. 지역시료 채취 시에는 개인시료 채취용 펌프를 사용하거나 보다 높은 채취 유량이 필요한 경우 16 L/min 까지 시료채취가 가능한 고정식 지역시료 채취용 펌프를 사용한다.
※ 지역시료 채취 시에는 삼각대 등을 이용해 시료채취매체의 높이가 작업자의 호흡기 높이에 위치하도록 한다.
- 3) 전선(multi-stranded wire) 및 클램프 : 시료 채취 시 여과지 카세트에 발생하는 정전기 제거를 위해 사용한다.
- 4) 위상차현미경 : positive phase, 10배 대안렌즈, 40배 대물렌즈(N.A.: 0.65~0.75), 총배율 400배, 그린필터($\lambda=530\text{nm}$) 등
※ 제 II 장의 현미경의 세부사양 참조.
- 5) 슬라이드글라스 : 25×75 mm, 두께 약 1 mm
- 6) 커버슬립 : 24×35 mm(여과지 2등분 시), No. 1 1/2
※ 여과지를 4등분 시에는 22×22 mm의 커버슬립이 사용에 적당하다. 커버슬립의 두께는 대물렌즈에 특별히 명기되어 있지 않은 경우 일반적으로 No. 1 1/2호를 사용한다.
- 7) 수술용 칼 : #10호, 곡선형 날(curved blade) 사용
- 8) 핀셋 : 여과지용
- 9) 아세톤 증기화장치
- 10) 마이크로피펫(50~500 μl) 또는 주사기

11) Walton-Beckett 그래티쿨 Type G-22

※ 제 II 장의 그래티쿨 보정법에 따라 계수면적을 보정하여 사용

12) HSE/NPL 테스트 슬라이드

13) 스테이지 마이크로미터 : $0.01 \text{ mm/div} \times 100 \text{ div}$ 또는 동등수준 이상

14) Phase centering telescope : 집광고리와 위상판의 이미지를 관찰하고 중심을 맞추기 위해 사용

4.2. 기구

1) 아세톤: 시약등급

2) 트리아세틴(glycerol triacetate): 시약등급

3) 투명 매니큐어

5. 시료채취 및 분석

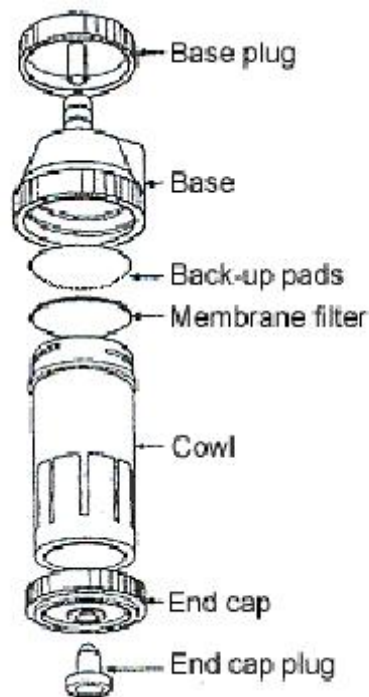
5.1. 시료채취

1) 시료채취 펌프의 유량을 보정한다.

- ※ 시료채취에 사용할 것과 같은 세트(포장박스) 중의 카세트를 이용하여 유량 보정에 사용한다.
- ※ 유량 보정은 가급적 현장에서 실시하여야 온도와 압력 등 환경적 요인에 의한 펌프의 유량 변동을 막을 수 있다. 만약 유량 보정을 현장에서 실시하지 못할 때에는 펌프 제조사에 문의하여 온도와 압력변화에 따른 보정식을 통해 유량을 보정한다.

2) 채취매체는 근로자의 호흡기위치(코로부터 반경 30 cm 이내)에 위치하도록 하고, 상단부 뚜껑을 열어 공기가 흡입되는 쪽을 열고(open face) 개방된 면이 지면을 향하도록 하여 시료채취한다.

- ※ 지역시료 채취 시에는 전선과 클램프로 카울을 접지하여 정전기 발생을 억제시킨다. 카울은 시료 채취 시 여과지를 보호하고 정전기에 의해 시료 채취 시 손실이 발생하는 것을 방지해 여과지의 모든 면적에 입자가 균일하게 채취되도록 하는 역할을 한다. 특히 고유량으로 채취하여 정전기가 많이 발생할 우려가 있는 지역시료 채취 시에는 카세트를 접지하여 정전기 발생을 억제시켜야 한다. 공기 중 습도가 낮으면 정전기의 발생이 더욱 심하므로 주의한다.



[그림 8] 공기 중 석면 시료채취매체

3) 전체 시료 수의 10 % 이상(최소 2개 이상)의 현장공시료(field blank)를 준비한다.

※ 현장공시료는 시료채취한 카세트와 같은 세트의 것으로, 현장에서 카세트 상단부 작은 마개(end cap plug)를 약 30초 동안 열었다 막은 후 시료와 함께 운반한다.

4) 0.5~16 ℓ/min 의 유량으로 시료채취한다.

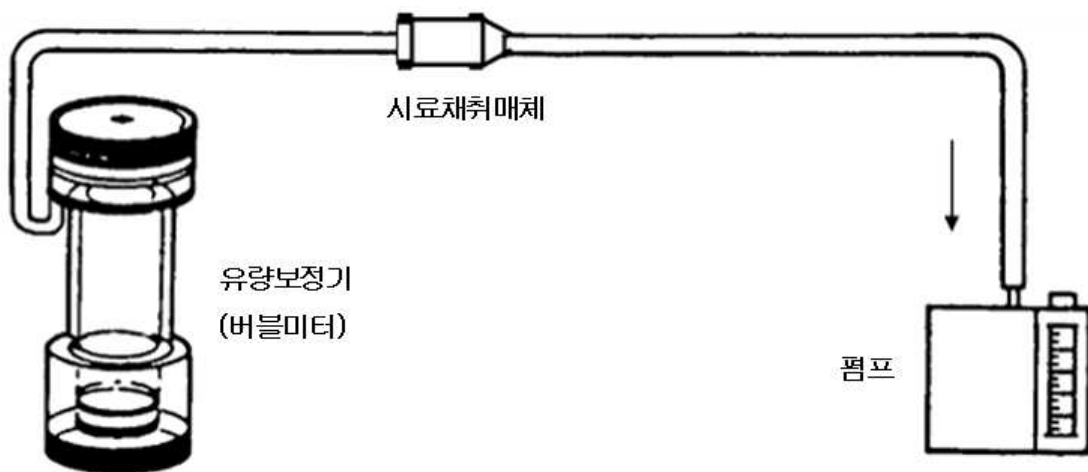
※ 여과지에 분진이 과포집되지 않도록 주의한다. 여과지에 채취된 분진의 면적이 시야의 25~30% 이상 과포집되면, 여과지가 불투명해지고 분진이 서로 겹쳐지므로 분석결과가 과소평가될 우려가 있다. 시료채취 중에는 작은 손전등 등을 이용하여 여과지에 분진이 과포집되어 분진의 층이 발생하였는지를 수시로 점검하고 분진의 층이 보이면 즉시 시료채취매체를 새것으로 교체해야 한다.

5) 각 시료채취 펌프의 유량을 보정한다.

6) 시료채취가 끝난 시료는 마개(end cap, end cap plug)를 막고 밀봉하여 시료가 크게 흔들리거나 시료에 진동이 가해지지 않도록 운반한다.

※ 펌프의 가동이 멈추고 시료를 펌프와 분리한 후 마개를 닫도록 한다. 펌프 가동 중에 마개를 먼저 닫으면 카세트 내부에 음압이 발생하여 여과지에 채취된 분진이 떨어질 수 있다.

※ 시료를 보호하기 위해 스티로폼 등 정전기를 유발할 수 있는 물질을 사용해서 포장하지 않도록 주의한다.



[그림 9] 유량 보정; 유량보정기는 1차 표준(버블미터)을 사용한다(버블미터는 주기적으로 교정 받아 사용해야 한다).

5.2. 전처리

- 1) 카세트를 열고 난 후 여과지의 오염을 막기 위해 마개를 열기 전에 젖은 형질 등을 이용하여 카세트의 외부를 닦는다.
- 2) 슬라이드글라스와 커버슬립에 먼지가 없도록 깨끗이 닦는다.
- 3) 카세트를 분리한다.
 - ※ 카세트 분리 시 내부에 음압이 발생하는 것을 막기 위해 카세트 끝단의 작은 마개(end cap plug)를 먼저 제거한다. 수술용 칼 등을 이용하여 카세트의 카울(extension cowl)과 베이스(base) 사이를 밀봉한 테이핑을 절개한 후, 카울과 베이스를 조심스럽게 분리한다.
- 4) 핀셋으로 여과지의 가장자리를 잡고 카세트에서 조심스럽게 꺼낸 후 시료를 채취한 면이 위쪽을 향하도록 슬라이드글라스 위에 올려놓는다.
 - ※ 여과지의 시료가 채취된 면을 건드리거나 오염시키지 않도록 주의한다.
 - ※ 시료채취된 여과지는 정전기를 띠고 있으므로 슬라이드글라스 위에 쉽게 고정된다.
- 5) 여과지의 손상 없이 시료채취가 이루어졌는지 여과지를 면밀히 점검한다.
 - ※ 만약 여과지의 가장자리가 접혀있거나 파손되어 있거나 가장자리에 카울에 의해 원형으로 눌러진 자국이 명확히 남아 있지 않으면, 카세트의 조립 상태가 불량하여 시료 채취 시 공기가 누출되었을 가능성이 있다. 이런 경우 분석결과는 실제 농도가 과소평가될 우려가 있다.
- 6) 수술용 칼을 이용하여 날의 면을 따라 굴리듯이 움직여서 여과지를 이등분으로 절단한다.
 - ※ 전처리 중 시료의 훼손에 대비하고, 정도관리나 전자현미경을 이용한 추가 분석 등을 위해 시료의 일부를 남겨두는 것이 바람직하므로, 여과지를 절단하여 일부분만 전처리 한다. 전처리에 사용되지 않고 남은 여과지 조각은 다시 카세트에 넣어 보관한다.
- 7) 절단한 여과지를 올린 슬라이드글라스를 아세톤 증기화장치의 증기가 나오는 부분 하단에 잘 맞춰 놓고, 아세톤 증기화장치에 제조사의 매뉴얼에 따라 적절한 양의 아세톤을 주입하여 여과지를 투명화 시킨다.
 - ※ 지나치게 많은 양의 아세톤을 사용하면 여과지에 채취된 분진이 아세톤 증기에 의해 떨어질 수 있으므로 여과지를 투명화 시킬 수 있는 최소량을 사용한다.
 - ※ 사용되는 아세톤의 양은 적지만 연속된 작업 시 과량의 아세톤 증기에 노출되거나 폭발의 위험이 있으므로 반드시 환기가 잘되는 후드에서 작업한다.
- 8) 여과지가 투명화 되면 즉시(30초 이내) 마이크로 피펫 또는 주사기 등을 사용하여 여과지 위에 트리아세틴을 떨어뜨린다.
 - ※ 트리아세틴은 커버슬립을 덮었을 때 전체를 투명하게 채울 수 있는 적당량을 사용한다. 25 mm 여과지를 이등분하여 전처리 시 약 3~4방울 정도가 적당하다. 트리아세틴을 과량 사용하면 채취된 분진의 이동이 일어날 수 있으므로 주의한다.

- ※ 여과지의 투명화 후 즉시 트리아세틴 처리를 하지 않으면 투명화 된 여과지의 굴절률이 증가하여 현미경으로 관찰시 이미지의 명암이 나빠지므로 주의한다.
- 9) 커버슬립을 기포가 생기지 않도록 주의해서 천천히 여과지 위에 얹는다.
 ※ 커버슬립을 얹은 후 밀거나 과하게 누르면 여과지에 채집된 섬유이 이동이 일어날 수 있으므로 주의한다.
- 10) 여과지가 투명화되는 과정은 다소 시간이 걸린다. 여과지의 투명화를 촉진시키기 위해서는 슬라이드가온기(slide warmer)나 핫플레이트 또는 오븐 등을 이용하여 약 50~55℃에서 수 분 이상 가열한다. 이때 온도가 너무 높으면 트리아세틴이 증발하여 기포가 생길 수 있으므로 주의한다.
- 11) 커버슬립의 가장자리를 매니큐어로 칠하여 밀봉하고, 유리 마킹용 펜을 사용하여 슬라이드의 후면에 여과지의 가장자리를 표시한다.

5.3. 계수분석

- 1) 제조사의 매뉴얼에 따라 현미경이 최적의 Köhler 조명과 위상차 이미지 형성 조건을 구현할 수 있도록 조절한다(제Ⅱ장 참조).
- 2) HSE/NPL 테스트 슬라이드를 이용해 위상차현미경의 분해능을 확인한다(제Ⅱ장 참조). 매일 일련의 분석을 시작하기 전에 주기적으로 확인해야 한다.
- 3) 현미경 재물대에 전처리한 시료를 올리고 총배율 400배에서 초점을 맞춘 후 A 규정에 따라 계수한다(붙임 1. A 규정에 의한 섬유 계수법의 예시 참조).
- 4) 100개의 섬유가 계수될 때 까지 최소 20개 이상 충분한 수의 계수면적을 계수하되, 계수한 시야 수가 100개를 넘지 않도록 한다.

[표 6] 섬유 계수법 - A 규정

- 섬유의 길이 5 μm 이상, 길이 대 지름의 비 3:1 이상의 섬유를 계수한다.
- 섬유의 양쪽 끝이 모두 계수면적 안에 있으면 1개, 한쪽 끝만 계수면적 안에 있으면 1/2개로 계수한다.
- 섬유의 양쪽 끝이 원의 면적 밖에 있거나 원의 면적을 관통하는 섬유는 계수하지 않는다.
- 하나의 줄기에서 여러 갈래로 쪼개진 섬유는 1개로 계수한다.
- 섬유다발은 각 섬유의 끝이 명확히 보이지 않으면 전체를 하나의 섬유로 간주하여 계수하고, 각 섬유의 끝단이 보일 경우 각각을 하나의 섬유로 간주하여 계수한다.

[표 7] 계수 시 주의사항

- 전처리한 여과지의 한 부분에 치우치지 않게 전체적인 면적을 골고루 계수한다. 시야의 이동은 여과지의 한쪽 끝에서 지름을 따라 반대 끝까지 계수하고, 수직으로 조금 움직여 반대 방향으로 계수한다. 최소 하나의 지름선상은 한쪽 끝에서 중심을 지나 반대편까지 분석이 되도록 한다.
- 시야를 이동할 때에는 분석자가 의도적으로 시야를 선택하지 않도록 현미경에서 잠시 눈을 떼고 이동시킨다.
- 입자당어리 또는 섬유다발이 계수면적의 1/6 이상을 차지하면 그 시야는 버리고 다른 곳으로 시야를 이동한다. 버린 시야는 분석결과 계산에 포함하지 않는다.
- 40배 대물렌즈는 초점심도(depth of field)가 매우 짧으므로 같은 시야 내에서도 계수 가능한 모든 섬유가 동시에 초점이 맞지 않을 수 있다. 따라서 매 시야마다 계속해서 미세초점조절나사(fine focusing knob)를 조절하면서 주의 깊게 계수한다.
- 여과지의 유효시료채취면적에 대해서만 계수한다. 여과지 가장자리로부터 3 mm, 여과지를 절단한 면으로부터 2 mm까지의 가장자리 부분은 계수하지 않는다.
- 석면과 비석면 또는 석면의 종류를 섬유의 형태만 가지고 임의로 구분하여 계수하지 않도록 한다(즉, 계수규정에 따라 모든 섬유를 계수한다). 만약 섬유의 구분이 필요한 경우는 전처리하지 않은 여분의 여과지로 전자현미경 등 다른 분석방법을 이용해 추가로 분석해야 한다.
- 정전기가 발생하여 시료채취에 영향을 미칠 수 있다. 특히 상대습도가 낮거나(20% 미만) 에어로졸 발생원 가까이에서 시료채취 시 정전기가 크게 발생할 수 있다. 이런 경우 입자가 여과지의 전체 시료채취면적에 균일하게 채취되지 않고 여과지 중심에서 가장자리로 갈수록 채취된 섬유밀도가 줄어든다. 분석 중 이런 현상이 관찰되면 가능한 여과지의 중심부위에 가까운 시야를 선택하여 계수하도록 한다.

6. 결과 처리

6.1. 유효시료채취면적 계산

- 1) 시료채취 여과지 표면에 실제로 시료가 채취되는 면적인 유효시료채취면적(effective collection area)을 측정·계산한다.

$$A_c = \frac{\pi D^2}{4}, mm^2$$

A_c : 유효시료채취면적, mm^2

D : 시료가 채취되는 여과지 면의 지름, mm

6.2. 섬유농도 계산

- 1) 아래의 식에 따라 여과지의 단위면적당 섬유밀도, E (개/ mm^2)를 계산한다.

※ 계산된 섬유밀도가 1300 개/ mm^2 를 초과하거나 여과지 면적의 25 ~ 30% 이상이 입자로 덮여 있는 경우 결과통보 시 계수불가 또는 분석결과가 실제에 비해 과소평가될 가능성이 있음을 명시해야 한다.

$$E = \frac{\left(\frac{F}{n_f} - \frac{B}{n_b}\right)}{A_f}, \text{개}/mm^2$$

E : 단위면적당 섬유밀도 (개/ mm^2)

F : 시료에서 계수된 섬유수

n_f : 시료에서 관찰한 총 시야수

B : 공시료에서 계수된 섬유수

n_b : 공시료에서 관찰한 총 시야수

A_f : 계수면적(graticule field area, 제Ⅱ장 6.3.에 따라 보정한 값을 사용, 약 0.00785 mm^2)

- 2) 아래의 식에 따라 공기 중 섬유농도, C (개/ cm^3)를 계산한다.

$$C = \frac{(E)(A_c)}{V \times 10^3}, \text{개}/cm^3$$

C : 공기 중 섬유농도 (개/ cm^3)

E : 단위면적당 섬유밀도, 개/ mm^2

A_c : 여과지의 유효시료채취면적(제Ⅲ장 6.1.에 따라 보정한 값을 사용, 약 385 mm^2)

V : 공기채취량(ℓ)

6.3. 공시료

석면의 분석을 위한 공시료는 채취매체공시료, 현장공시료, 실험실공시료로 크게 구분된다. 공시료는 현장에서 채취한 시료와 동일한 전처리 과정을 거쳐 함께 분석한다.

- 채취매체공시료(sampling media blank)

사용하지 않은 새 시료채취매체 박스를 개봉 시 마다 1~4개를 분석한다. 시료채취 전에 시료채취매체의 오염 여부를 확인하는데 사용된다. 채취매체의 제조사가 여과지가 분진으로 오염되지 않았음을 확인하여 시판하는 채취매체로서, 현장공시료의 분석결과가 허용 가능한 범위 내이면 채취매체공시료를 분석하지 않을 수 있다.

- 현장공시료(field blank)

현장에서 채취하는 시료와 동일한 과정을 거치되 펌프를 이용한 시료채취만 하지 않은 시료로서, 시료채취 및 운반과정에서의 오염여부 확인을 위해 사용된다. 최소 2개 이상, 시료채취수의 10% 만큼 준비한다.

- 실험실공시료(lab blank)

시료의 실험실 내에서의 오염 여부 확인을 위한 시료로서, 매일 일련의 분석시 또는 채취매체공시료가 오염되었거나 시료의 실험실 내 오염이 의심되는 경우에 분석한다.

이상적으로 채취매체공시료에서는 계수 가능한 섬유상 입자가 관찰되지 않아야 한다. 만약 연속된 2개 이상의 채취매체공시료나 현장공시료에서 100개 시야 당 3개 이상의 섬유가 계수되면 시료의 오염 여부를 확인해야 한다. 만약 현장공시료에서 100 시야 당 3개 이상의 섬유가 계수되고 이 수치가 시료에서 계수된 100 시야 당 섬유수의 10%를 초과하면, 해당 시료세트의 분석결과는 사용하지 않는 것이 바람직하다. 예를 들어 현장공시료에서의 분석결과가 100 시야 당 4개이고 시료 분석결과가 100 시야 당 15개인 경우, 현장공시료에서의 분석결과가 3개 이상이며 시료 분석결과의 10 %를 초과(27 %)하므로, 해당 시료세트의 분석결과는 사용하지 않는 것이 바람직하다.

6.4. 결과통보

본 측정·분석법을 적용하여 분석한 섬유농도 결과는 현실적으로 과포집되지 않는 수준에서 가능한 채기량과 낮은 섬유밀도의 시료 분석 시 발생하는 분석결과의 높은 변이를 고려할 때 소수점 셋째자리 수준의 낮은 값은 거의 의미 없다. 따라서 0.01 개/cm³ 보다 낮은 분석결과는 거의 의미가 없으나 분석결과가 0.01 개/cm³에 가까운 경우 수치를 반올림함하면 노출기준 초과 여부가 달라질 수도 있으므로, 분석 결과는 석면조사 및 정도관리 규정(노동부 고시 제2009-32)에 따라 소수점 넷째자리에서 반올림하여 소수점 셋째자리까지 표기한다.

동일한 시료를 여러 번 분석하였을 경우에는 분석한 결과의 평균을 이용하여 결과통보할 수 있다. 또한 결과통보 시에는 공기 중 섬유농도 뿐만 아니라 적용한 측정·분석법, 계수한 시야 및 섬유 수, Walton-Beckett 그래티쿨의 면적, 개인시료 또는 지역시료 여부, 채취한 공기량, 시료채취 위치, 검출한계¹⁾ 등 시료의 분석결과와 관련된 정보를 함께 결과통보하면 정확한 분석결과 정보전달에 도움이 된다.

1) 검출한계(LOD)는 여과지 섬유밀도 7 개/㎤를 기준으로 시료의 채기량을 고려하여 공기 중 섬유농도(개/cm³)로 계산한다.

7. 변이와 정도관리

공기 중 석면 농도의 참값을 아는 것은 불가능하기 때문에 본 측정·분석법의 정확도는 평가할 수 없다. 그러나 계수분석 과정에서 발생하는 불확실성은 분석법 자체가 지니는 가정과 기존의 연구결과로부터 추정 가능하다.

계수분석의 정밀도는 계수된 섬유수와 여과지에 섬유가 얼마나 균일하게 분포되어 있는가에 따라 달라진다. 섬유분포의 균일성은 푸아송분포(Poisson distribution)로 잘 설명되어지는데, 이론적으로 여과지 표면에 임의로 분포하고 있는 섬유(푸아송분포의 섬유) 계수 시의 변이계수(S_r)는 계수된 섬유 수(N)에 따라 달라진다.

$$S_r = 1/\sqrt{N}$$

그러나 실제 변이계수는 분석자가 동일 시료를 반복하여 계수분석했을 때 개인의 주관적 오차와 분석자 간에 발생하는 변이에 의해 더욱 커진다. 이때 추가되는 변이 요소에 의한 변이계수는 Odgen의 연구결과에 따르면 아래 식과 같이 표현된다.

$$S_r = (N + 0.04N^2)^{1/2}/N$$

국내에서는 서울대학교 보건대학원의 분석자 3명을 대상으로 실시한 기존 연구결과(백남원 등, 1991)에 따르면 계수한 섬유수가 100 개/㎖ 이상인 경우 분석자 개인 변이와 동일 실험실 내 분석자 간의 변이는 Odgen의 연구결과와 유사한 수준을 보이는 것으로 보고된 바 있다.

실험실 간의 변이는 현장시료를 이용하여 46개 실험실에 대해 수행한 해외의 연구결과(AIA, 1983)에 따르면 실험실 간의 변이계수는 약 0.45로 보고된 바 있으며, 실험실에서 제조된 표준시료를 이용하여 평가한 PAT 프로그램 참여 실험실에 대한 연구결과에서는 이보다 약간 적은 변이계수(0.25~0.42)를 보인 것으로 보고된 바 있다. 국내에서는 아직 충분한 자료가 없으나 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원에서 실시한 석면분석정도관리에 참여한 기관에서 보고한 분석결과에 따르면 섬유밀도(백석면) 80~181 개/㎖인 실험실 표준시료에 대해 변이계수는 0.4~0.46으로 해외의 연구결과와 큰 차이를 보이지 않았다.

Ogden이 제안한 석면의 계수분석에 대해 90% 신뢰구간의 상한값(UCL)와 하한값(LCL)을 구하는 식은 다음과 같다.

$$UCL = \frac{2X + 2.25 + [(2.25 + 2X)^2 - 4(1 - 2.25S_r^2)X^2]^{1/2}}{2(1 - 2.25S_r^2)}$$

$$LCL = \frac{2X + 4 - [(4 + 2X)^2 - 4(1 - 4S_r^2)X^2]^{1/2}}{2(1 - 4S_r^2)}$$

S_r : 실험실간의 변이계수

(약 100개 섬유 계수시의 실험실간 변이계수)

X : 계수한 섬유수

UCL : 95% 상한값

LCL : 95% 하한값

[표 10] 계수된 섬유수에 따른 90% 신뢰구간의 상·하한치 예측값

100 계수면적 계수시 계수한 총섬유수	변이계수	90% 신뢰구간의 상·하한치 예측값 섬유수 (평균섬유수에 대한 백분율)	
		LCL	UCL
5	0.42	2 (37%)	18 (360%)
10	0.42	4 (44%)	32 (317%)
20	0.34	10 (52%)	45 (226%)
50	0.30	29 (59%)	95 (191%)
100	0.28	62 (62%)	177 (177%)
200	0.28	126 (63%)	349 (175%)
300	0.28	190 (63%)	522 (174%)

※ 변이계수는 호주 NAP 프로그램에 참가하고 있는 실험실간 변이계수에 대한 연구결과 (NATA, 2002)를 임의 적용

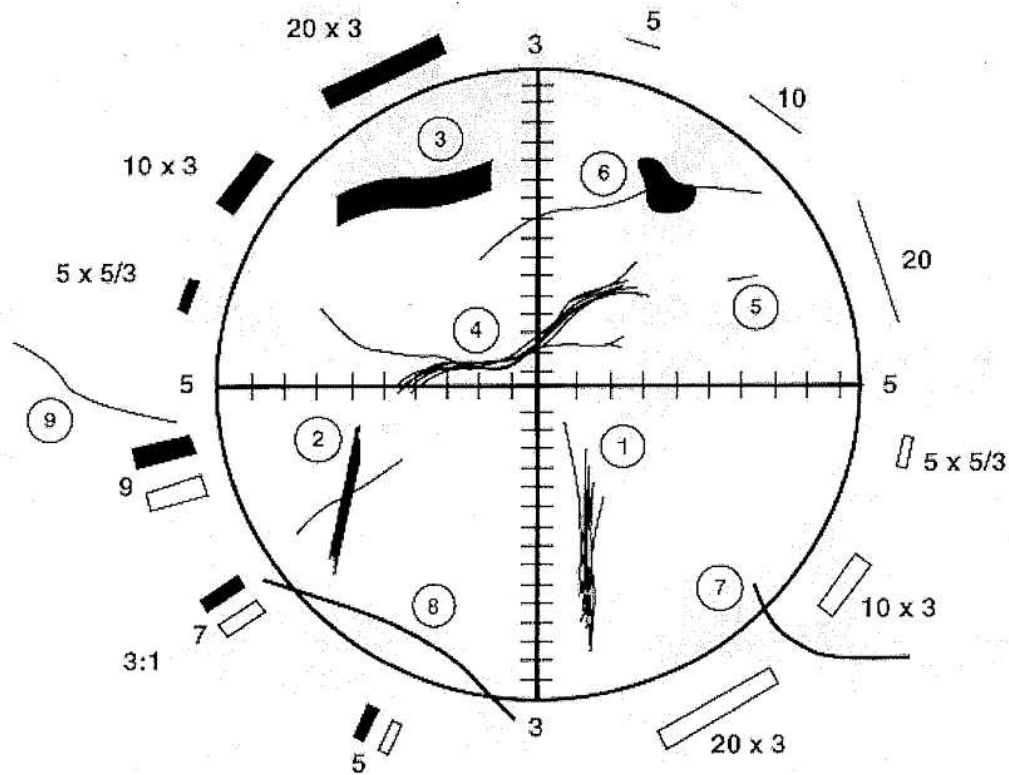
위의 두 식을 이용하여 계산한 섬유 수에 따른 90% 신뢰구간의 상·하한치 예측값을 표 10에 나타내었다. 섬유 수에 따른 변이계수는 호주 NAP 프로그램 참여 실험실을 대상으로 한 연구결과(NATA, 2002)를 사용하여 계산하였다. 표에서 보듯이 100개 시야를 계수 시 계수한 섬유 수가 10개 이하면 정밀도가 크게 낮아지며, 계수한 섬유 수가 100개 이상이면 정밀도가 거의 일정한 수준으로 유지되는 것을 알 수 있다. 따라서 일정 수준 이상의 정밀도 확보를 위해서는 시료 채취 시 100개 계수면적 당 약 100개 이상, 적어도 100개 계수면적 당 최소 10개 이상의 섬유가 관찰되도록 시료채취해야 하며, 이에 따라 적절한 시료채취 계획을 수립해야 한다.

특정 실험실의 변이계수에는 분석자의 계수분석 능력, 장비의 상태, 시료의 형태 등 다양한 변수가 영향을 미칠 수 있다. 석면의 계수분석은 분석결과에 변이가 매우 크므로 각 분석실험실은 적절한 정도관리 프로그램이나 실험실 인증프로그램에 참여하여 분석결과가 기준값에 근접하도록 하고 변이계수를 줄여 재현성 있는 값을 얻을 수 있도록 지속적으로 노력해야 한다.

참고문헌

1. Oppenheimer Goldberg, Köhler Illumination, Microscope (1980) 28
2. H. Wolfgang Zieler, The Optical Performance of the Light Microscope, Part one Ch.4
3. Chang-Hyun Park, Mi-Jung Yeom and Chang-Sub Uhm, History of Microscope from the Magnifying Glass to the Field Emission Electron Microscope, Korean J. Electron Microscopy 33(2) 93-104(2003)
4. Nikon Microscopy U., Phase Contrast Microscopy, <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>
5. J. M. M. Le Guen, T. L. Ogden and T. Shenton-Taylor, The HSE/NPL Phase-Contrast Test Slide, Ann. Occup. Hyg. Vol. 28, No. 2, pp. 237-247, 1984
6. W. H. Walton and S. T. Beckett, A Microscope Eyepiece Graticule for the Evaluation of Fibrous Dusts, Ann. Occup. Hyg. Vol. 20, No. 1, pp. 19-23, 1977
7. National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH), NIOSH Manual of Analytical Method (NMAM) 7400, 4th ed, 1994
8. Health and Safety Laboratory(HSL), Methods for the Determination of Hazardous Substances (MDHS), 39/4, 1995
9. Occupational Safety and Health Administration(OSHA), Method ID 160 In OSHA Analytical Methods Manual, 1990
10. Occupational Safety and Health Administration(OSHA), Sampling and Analysis (Non-mandatory), 29 CFR 1926.1101,
11. National Occupational Health and Safety Commission(NOHS), Guidance Note on the Membrane Filter Method for Estimation Airborne Asbestos Fibres, 2nd Edition, 2005
12. National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH), NIOSH Manual of Analytical Method (NMAM) 7402, 4th ed, 1994

13. American Society for Testing and Materials(ASTM), Standard Practice for Sampling and Counting Airborne Fibers, Including Asbestos Fibers, in the Workplace, by Phase Contrast Microscopy(with an Option of Transmission Electron Microscopy), D7201-06
14. U.S. Environmental Protection Agency(EPA), Standard 40 CFR Part 763 Subpart E Appendix A: Interim Transmission Electron Microscopy Analytical Methods, 1997
15. U.S. Environmental Protection Agency(EPA), Asbestos Sampling, SOP #2015, 1994
16. American Society for Testing and Materials(ASTM), Standard Practice for Flow Rate Calibration of Personal Sampling Pumps, D5337-04
17. Cornelis Klein, The Manual of Mineral Science, 22nd ED.
18. U.S. Geological Survey(USGS). Asbestos: Geology, Mineralogy, Mining, and Use, 2002
19. Abell, M., S. Shulman and P. Baron, The Quality of Fiber Count Data, Appl. Ind. Hyg., 4, 273-285, 1989
20. Schlecht, P. C. and S. A. Schulman, Performance of Asbestos Fiber Counting Laboratories in the NIOSH Proficiency Analytical Testing(PAT) Program, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 47, 259-266
21. Laurie Kazan-allen, Killing The Future - Asbestos Use in Asia, July, 2007
22. NIOSH/OSHA, Workplace Exposure To Asbestos: Review and Recommendations, DHHS(NIOSH) Publication 81-103, 1976
23. 한국산업안전공단 산업안전보건연구원, 제1회 석면분석정도관리 실시 결과
24. 한국산업안전공단 산업안전보건연구원, 제2회 석면분석정도관리 실시 결과
25. 강보영, 신용철, 백남원, 위상차 현미경법을 이용한 공기중 석면농도 분석에서의 정도관리, 한국산업위생학회지, 제1권, 제2호, 11월, 1991



번호	섬유수	비 고
①	1개	섬유다발의 형태로 각 섬유의 양 끝단이 확인되지 않으므로 섬유 전체를 하나하나 계수하지 않고 1개의 섬유다발로 계수
②	2개	가는 섬유들이 모여진 섬유다발과 단일 섬유가 동시에 관찰될 경우 섬유다발과 섬유를 각각 계수함
③	1개	폭이 3 μm 이상이라도 섬유의 길이 대 지름의 비가 3:1 이상이면 계수
④	1개	섬유다발에 많은 가지 나온 경우, 섬유가지는 섬유다발의 일부분으로 계수
⑤	계수하지 않음	섬유의 길이가 5 μm 보다 작으므로 계수하지 않음
⑥	1개	섬유가 분진에 가려져 있으나 양끝이 보이고 동일한 섬유로 판단되는 경우, 섬유의 길이, 길이 대 지름의 비가 A 규정에 적합하면 계수
⑦	1/2개	섬유의 한쪽 끝만 계수면적 안에 있으면 1/2개로 계수
⑧	계수하지 않음	섬유의 양끝이 계수면적 밖에 있으므로 계수하지 않음
⑨	계수하지 않음	섬유가 계수면적 밖에 있으므로 계수하지 않음

붙임 2. B 규정에 의한 섬유 계수법

<섬유 계수법 - B 규정>

- 섬유의 끝만을 계수하며 섬유의 길이 5 μm 이상, 지름 3 μm 이하의 섬유를 계수한다.
- 길이 대 지름의 비 5:1 이상의 섬유를 계수한다.
- 섬유의 끝이 계수면적 안에 있는 섬유를 계수하며, 섬유의 양쪽 끝이 부분이 계수면적 안에 있으면 2개, 한쪽 끝만 계수면적 안에 있으면 1개로 계수한다.
- 섬유 덩어리와 섬유다발의 끝이 구분이 가능할 때 최대 10개(5개 섬유)를 계수한다.
- 200개의 끝이 계수되도록 충분한 시야 수를 계수한다. 섬유가 많더라도 20개 이상의 시야를 관찰하고 섬유 수에 관계없이 100개 시야에서 계수를 중단한다.
- 섬유가 분진 등의 다른 입자에 붙어 한쪽 끝이 보이지 않으면 보이는 부분만 계수한다.
- 계수한 전체의 끝의 수를 2로 나눈 값이 섬유의 수이다.

붙임 3. 석면 계수분석 양식(예시)

분석기관명: _____

주소: _____

전화번호/팩스: _____

시료정보

시료명: _____

시료번호: _____

시료접수일: _____

채기량(L): _____

여과지지름(mm): _____ 25 mm

분석정보

분석법: NMAM 7400, 15 Aug 1994, A rule

레티클: Walton Beckett 그라티쿨

현미경: OOOOO OO-O

W-B 그라티쿨의 계수면적: 0.00785 mm²

유효시료채취면적: 385 mm²

정량한계(LOQ): 10 개/100시아

시아 당 섬유수

1	21	41	61	81
2	22	42	62	82
3	23	43	63	83
4	24	44	64	84
5	25	45	65	85
6	26	46	66	86
7	27	47	67	87
8	28	48	68	88
9	29	49	69	89
10	30	50	70	90
11	31	51	71	91
12	32	52	72	92
13	33	53	73	93
14	34	54	74	94
15	35	55	75	95
16	36	56	76	96
17	37	57	77	97
18	38	58	78	98
19	39	59	79	99
20	40	60	80	100

시료 계수 결과

총섬유수: _____ 개

총시아수: _____ 개

시아 당 섬유수: _____ 개/시아

공시료 계수 결과

전체 공시료에서 계수된 총섬유수: _____ 개

전체 공시료에서 관찰한 총시아수: _____ 시아

시아 당 섬유수: _____ 개/시아

시아 당 섬유수: _____ 개/시아

(시료의 시아 당 섬유수 - 공시료의 시아 당 섬유수)

분석결과

$$\text{섬유밀도} = \frac{(\text{시아 당 섬유수})}{(\text{W-B 그라티쿨의 계수면적})} = \frac{(\text{개/시아})}{0.00785 \text{ mm}^2} = \boxed{\text{개/mm}^2}$$

$$\text{공기 중 석면 농도} = \frac{(\text{섬유밀도})(\text{유효시료채취면적})}{(\text{채기량})1000} = \frac{(\text{개/mm}^2)(385 \text{ mm}^2)}{(L)(1000 \text{ cm}^3/L)} = \boxed{\text{개/cm}^3}$$

분석일자: _____

분석자명: _____

불임 4. 공기 중 석면분석법 비교

공기 중 석면 농도 분석을 위해서는 일반적으로 일정 부피만큼의 공기 중 입자상 물질을 여과지를 이용하여 여과 채취한 후, 적절한 전처리과정을 거쳐서 현미경을 이용해 계수분석하는 방법이 사용된다. 시료채취에 사용되는 여과지는 시료채취 후 적용할 분석 방법에 따라 적절한 시료채취매체를 사용한다. 채취된 입자 중 석면은 현미경을 이용해 계수분석한다. 분석에 사용되는 현미경은 이미지를 구현하는 광원에 따라 크게 가시광선을 사용하는 광학현미경과 전자를 사용하는 전자현미경으로 구분된다. 광학현미경은 여과지에 채취된 가늘고 투명한 석면입자를 보다 높은 명암비로 관찰하기 위해 위상차현미경(phase contrast microscope, PCM)을 사용한다. 전자현미경은 입자 표면에서 전자의 산란을 이용해 이미지를 구현하는 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 또는 입자를 투과하는 전자의 세기를 이용해 이미지를 구현하는 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)이 사용된다. 전자현미경의 경우 입자의 화학조성 확인을 위한 별도의 장비인 EDXA(energy dispersive X-ray analyzer)를 추가로 장착하여 입자의 분석이 가능하므로 이러한 전자현미경을 분석전자현미경(analytical electron microscope, AEM)이라고 한다.

여과지에 채취된 입자가 석면인지 확인을 위해서는 석면형태인지 여부 판단을 위해 입자의 형태를 관찰하고 석면 특유의 화학적 조성 및 결정특성을 보이는지 확인해야 정확하게 석면인지 여부를 구분할 수 있다. 따라서 석면 분석 시에는 분석방법에 따라 이 세 가지 석면의 특성 중 한 가지 이상을 확인하여 석면을 구분 분석한다.

· 형태(morphology)

입자의 형태 관찰은 일반적인 다른 화학물질 분석과 달리 석면 분석 시 현미경을 사용하는 요인이다. 석면을 구분하기 위해서는 ‘길이 대 지름의 비(aspect ratio)’를 관찰하여 입자가 섬유상인지 비섬유상인지 구분한다. 일반적으로 석면의 길이 대 지름의 비는 작게는 20에서 1000 이상에 이르는 것으로 알려져 있다. 따라서 분석방법에 따라 3:1 또는 5:1과 같이 일정 길이 대 지름의 비를 적용하여 석면을 포함한 섬유상 입자와 비섬유상 입자를 구분한다.

· 화학조성(chemical composition)

석면을 구성하는 화학식 또는 원소의 비율을 말한다. 석면은 자연에서 생성되

는 광물이기 때문에 세부 화학조성은 석면의 산지에 따라 다소 차이를 보인다. 명칭상 석면의 종류별 기본적인 화학 조성은 표 1을 참조한다.

· 결정구조(crystal structure)

석면 특유의 미시적, 거시적인 성질은 고유의 결정 구조에서 기인한다. 석면의 분석 시에는 석면의 결정구조에서 기인하는 광학적 특성을 이용하여 석면 구분에 이용할 수 있다.

공기 중 석면분석 시 주의할 점은 공기 중 석면의 정확한 개수 농도는 알 수 없다는 것이다. 석면은 쉽게 보다 가는 섬유로 나누어지고, 공기 중 비산되는 석면입자는 수십에서 수백 나노미터 이상의 다양한 지름을 가지므로 시료채취한 여과지를 전처리하는 방법이나 분석장비의 검출 가능한 석면의 최소 지름, 적용하는 계수법에 따라 공기 중 석면의 농도 분석결과는 크게 달라진다. 따라서 석면의 분석결과를 해석할 때에는 측정·분석 시 활용한 방법에 따른 결과판단 기준을 적용해야 하며, 측정·분석법의 장단점을 정확히 파악하여 분석결과를 잘못 확대해석하는 일이 없도록 주의해야 한다.

○ 위상차현미경법(phase contrast microscopy, PCM)

전통적으로 산업위생분야에서 석면을 취급하는 근로자의 노출평가를 위해 사용해진 가장 일반적인 공기 중 석면 섬유 계수 분석법이다. 시료 채취 매체로 기공 0.8 μm , 지름 25 mm MCE 여과지를 이용하여 공기 중의 입자상 물질을 채취한 후 아세톤으로 투명하게 전처리한 표본을 위상차현미경에서 400 배의 배율에서 관찰하며, 현미경 시야 상의 지름이 100 μm 인 Walton-Beckett 그라티클 내의 길이 5 μm 이상, 길이 대 지름의 비 3:1 이상의 섬유상 물질을 약속된 계수법에 따라 계수하는 방법이다. 위상차현미경을 이용한 주요 측정·분석방법으로는 미국 NIOSH NMAM #7400, OSHA ID-160, 영국 HSE MDHS 39/4, 노동부 작업환경측정 및 정도관리 규정 중 허용기준 설정 대상인자의 측정·분석방법, 한국산업안전보건공단 KOSHA Code A-1-2004, 환경부 실내공기질공정시험방법 등이 있다.

장점 : 전처리가 간편해서 전처리 중 시료의 훼손 가능성이 적고 빠른 분석결과 산출이 가능하다. 장비가 작고 이동이 쉬워서 건축물의 석면 해체작업장 등에서의 석면노출을 매일 모니터링(daily monitoring)하거나 현장에서 즉시 분석 결과를 산출할 수 있는 장점이 있다. 현행 국내의 작업환경 중 공기 중 석면에 대한 노출기준인 0.1 개/ cm^3 와 실내공기 중의 관리기준인 0.01 개/ cm^3 는 모두 위상차현미경법에 의한

<여과지에 채취된 공기 중 석면의 분석기술 비교>

구분	위상차현미경	주사전자현미경	투과전자현미경
확대 배율	400배	2,000~10,000배	5,000~20,000배
검출가능한 섬유의 최소지름	0.25 μm	0.1 μm	0.01 μm 이하
화학조성 분석	불가능	가능 ¹	가능 ¹
결정특성 분석	불가능	불가능	가능

¹ EDXA를 장착한 경우임

결과를 기준으로 한 것이기 때문에 위상차현미경법을 이용한 분석결과는 현행 노출기준과 직접적으로 비교가 가능하다는 점에서 매우 큰 장점을 가지고 있다. 또한 과거의 국내외 역학조사와 작업환경측정 결과 등의 자료 또한 대부분 위상차현미경법으로 분석할 결과이기 때문에 측정결과를 노출기준과 과거 자료를 이용한 위해도 평가에 적용하기에도 적당하다.

단점 : 위상차현미경법은 석면의 분석을 위한 3가지 특징 중 길이 대 지름의 비(aspect ratio)만을 이용하여 섬유상 입자와 비섬유상 입자를 구분·분석하므로 섬유상이면서 비석면인 입자상 물질과 석면 섬유를 구분하지 못하고 모두 석면으로 간주하여 분석하게 된다. 따라서 학교나 지하철 역사와 같이 비석면 섬유상 물질의 농도가 높은 환경에는 적용하기가 어렵고 분석결과가 과대평가 될 우려가 있다. 또한 위상차현미경은 분해능과 배율이 낮아 여과지에 채취된 모든 공기 중 석면을 검출할 수 없다. 위상차현미경을 이용한 석면분석 결과는 여과지에 채취된 섬유 중 관찰이 가능한 일정 지름 이상의 일부 섬유만을 계수한 결과이므로 공기 중 모든 석면섬유의 농도가 아니며, 석면섬유농도를 가늠할 수 있는 일정한 지표로서의 농도임에 유의해야 한다. 일반적으로 위상차현미경으로 석면 분석 시 검출 가능한 섬유의 지름은 약 0.2~0.4 μm 이상인 것으로 알려져 있다. 예를 들어 만약 길이가 10 μm 이며 길이 대 지름의 비가 100:1인 섬유가 있다면, 지름이 0.1 μm 로 본 분석방법으로는 검출할 수 없다. 가장 가는 개별 석면섬유(fibril)의 지름은 약 0.02 μm 로 알려져 있으므로 이런 작은 지름의 섬유는 위상차현미경에서는 검출할 수 없다. 따라서 위상차현미경으로 관찰되는 석면섬유는 현미경 시야 상에서는 가는 섬유형태로 보이더라도 사실은 개별 석면섬유의 다발이다. 만약 가장 가는 지름의 각각의 개별 섬유를 관찰하려면 투과전자현미경(TEM)을 이용해야 한다.

○ 투과전자현미경법(transmission electron microscopy, TEM)

투과전자현미경법은 석면의 동정에 있어서 현재까지 가장 정확하고 신뢰할 수 있는 궁극적인 방법이다. 입자가 섬유상 물질인지의 형태 확인은 물론 현미경에 장착된 EDXA(energy dispersive X-ray analyzer)를 이용해서 물질의 화학 조성을 확인하고, SAED(selected area electron diffraction) 패턴을 이용하면 결정구조의 특성을 확인함으로써 석면을 구분할 수 있다. 투과전자현미경을 이용한 주요 측정·분석방법으로는 미국 NIOSH NMAM #7402, 미국 EPA AHERA Method 등이 사용되고 있다.

장점 : 투과전자현미경법은 석면의 동정을 위하여 확인하여야 하는 형태, 화학조성, 결정구조를 모두 확인 가능하므로, 현재 일반적으로 상용화된 석면분석 기술 중 가장 정확한 석면의 정성분석방법으로 여겨지는 방법이다. 해상도와 확대배율이 높아서 위상차현미경에서 관찰할 수 없는 매우 가늘거나 짧은 개별 석면섬유(fibril)까지도 분석이 가능하다. 따라서 투과전자현미경법은 미국 EPA의 AHERA 측정분석법과 같이 건축물 중 석면의 해체작업이 끝나고 난 후 작업 완결여부의 확인을 위한 공기 중 석면 섬유농도의 분석에 이용하거나, 매우 낮은 석면 섬유농도를 보이는 일반 환경 공기 중의 석면 분석, 비석면 섬유상 입자가 다량 발생할 수 있는 학교, 지하철 역사 등의 공기 중 석면분석 및 연구목적의 분석에 주로 적용된다.

단점 : 투과전자현미경법은 가장 정확하게 석면을 동정할 수 있는 분석법이지만 분석한 결과를 현행 국내 노출기준과 대부분의 과거 역학조사 자료 등과 직접적으로 비교가 불가능하다. 따라서 전자현미경의 분석결과는 적용한 측정·분석법에 따라 별도의 기준으로 평가해야 한다. 대표적인 측정분석법인 미국 EPA의 AHERA Method에서는 공기 중 시료의 분석결과를 공시료 수준과 비교하거나, 실내와 실외의 분석결과를 비교하여 차이가 있는지 여부를 통해 결과를 해석한다. NIOSH NMAM #7402의 경우는 위상차현미경에서 관찰이 가능한 지름 $0.25 \mu\text{m}$ 이상이면서 길이 $5 \mu\text{m}$ 이상, 길이 대 지름의 비 3:1 이상인 섬유 중 석면의 비율을 계수분석한 후 위상차현미경의 분석결과를 보정하여 석면 농도를 산출하는데 이용된다. 전자현미경으로 이와 같이 위상차현미경에서 검출되는 기준으로 계수하는 크기의 섬유를 PCME(PCM equivalent) 섬유라고 하며, 현행 노출기준의 평가를 위한 목적으로 석면을 계수분석 할 때에는 PCME 섬유의 농도를 기준으로 평가한다. 투과전자현미경은 장비가 비싸고 분석비용이 고가이며 시료의 전처리 과정이 복잡해서, 전처리 중 시료의 훼손 가능성이 상대적으로 높고 분석결과 산출에 오랜 시간이 소요된다는 단점도 지니고 있다.

○ 주사전자현미경법(scanning electron microscopy, SEM)

주사전자현미경법은 EDXA를 장착하여 섬유상 물질의 화학 조성의 확인이 가능한 전자현미경법의 하나로 주로 영국, 독일 등 유럽에서 널리 쓰이고 있는 분석방법이다. 주사전자현미경을 이용한 주요 측정·분석방법으로는 영국 MDHS 87 등이 있다.

장점 : EDXA를 장착하여 입자의 화학조성을 확인할 수 있어 석면, 비석면 및 석면의 종류 확인이 가능하다. 위상차현미경에 비해 분해능이 좋아서 지름 약 0.1 μm 의 섬유까지도 관찰 가능하다. 시료의 전처리가 투과전자현미경에 비해 상대적으로 간편해서 투과전자현미경에 비해 저렴한 비용과 시간으로 위상차현미경에 비해 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있다.

단점 : SAED 패턴을 이용한 시료의 결정구조 확인이 불가능해서 일부 무기섬유와 석면의 구분 및 각섬석의 종류 구분이 어려운 등 투과전자현미경법에 비해 분석 결과의 신뢰도가 떨어진다. 주사전자현미경은 분해능이 위상차현미경보다는 우수하나 투과전자현미경에 비해 나빠서 개별 석면섬유까지는 분석이 불가능하다.

<주요 공기 중 석면의 측정·분석법 비교>

구분	NMAM 7400	NMAM 7402	AHERA TEM
분석장비	위상차현미경	투과전자현미경	투과전자현미경
섬유의 정의	길이대지름의비 $\geq 3:1$ 길이 $\geq 5 \mu\text{m}$ 지름 $\geq 0.25 \mu\text{m}$	길이대지름의비 $\geq 3:1$ 길이 $\geq 5 \mu\text{m}$ 지름 $\geq 0.25 \mu\text{m}$	길이대지름의비 $\geq 5:1$ 길이 $\geq 0.5 \mu\text{m}$
분석결과	fibers/cc	PCME 섬유 중 석면의 % 비율	structures/cc
결과판단	개인시료 0.1 f/cc 지역시료 0.01 f/cc	단독적용 불가	$\leq 70 \text{ st/mm}^2$ 또는 외기와 통계적으로 유의한 차이가 없는 수준
적용목적	작업환경 중 개인/ 지역시료의 섬유상 입자 농도 분석	PCM 결과 중 석면의 비율 보정	석면해체/제거작업 후 작업 환경여부 확인

본 교재에 기재된 내용은 집필자의 개인적 견해이며, 우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

**위상차현미경을 이용한
공기 중 석면 측정·분석**

(보건분야-교육자료 연구원 2009-14-94)

발 행 일 : 2009년 3월 초판 인쇄
2009년 9월 개정

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 강 성 규

발 행 처 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

집 필 자 : 권지운 (연구원, 직업환경연구실)

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100-805

Homepage : <http://oshri.kosha.or.kr>

인쇄 : 무진문화(02-2274-7091)

[비매품]