Journal of the Korean Chemical Society
Vol. 37, No. 9, 1993
Printed in the Republic of Korea

ICP-MS에 의한 생체시료 중의 극미량 금속오염도 측정

朴昶浚* · 李相澔† · 鄭求珣† · 李光雨
한국표준과학연구원 무기분석연구실
†서강대학교 화학과
(1993. 3. 30 접수)

Determination of Trace Metals in Biological Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Chang-Joon Park*, Sang-Ho Lee†, Koo-Soon Chung†, and Kwang-Woo Lee
Analytical Chemistry, Korea Research Institute of Standards and Science (KRISS), Taejon 305-606, Korea
†*Department of Chemistry, Sogang University, Seoul 121-742, Korea*
(Received March 30, 1993)

요 약. 정도관리용 생체기준물질 중의 극미량원소에 대한 분석법을 확립하였다. 생체시료를 질산-과산화수소 혼합산화제와 함께 테플론 가압분해용기에 넣어 마이크로파 오븐에서 분해하는 시료전처리법(microwave digestion)을 사용하였다. 시료를 분해시키기 전에 정량할 극미량금속의 안정 동위원소를 첨가하여 동위원소희석 질량분석법을 적용하였다. 혈액과 소나무잎 기준물질에 이러한 분석방법을 적용하여 기준값과 일치되는 결과를 얻었다.

ABSTRACT. An analytical method has been developed to determine trace elements in biological samples. The biological samples are added to a laboratory-bulit Teflon bomb together with nitric acid-hydrogen peroxide mixture and enriched stable isotopes. The samples are decomposed in a microwave oven. The decomposed sample solutions are analyzed by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. The analytical results of the biological samples agree well with the reference values.

서 론

인체나 동물의 혈액, 혈청, 장기 및 식물의 잎 등의 생체시료는 무기원소를 미량 또는 다량 포함하고 있다. 그 중에서 Cd, Pb, As, Hg 등 공해와 오염, 질병의 원인이 되는 미량원소가 있으므로 이러한 원소들의 생체 함유량을 정확히 결정할 수 있는 분석법의 확립이 요구되고 있다.

일반적으로 생체시료는 분석에 사용할 수 있는 시료의 양이 적으며, 농도 수준도 낮은 경우가 많고 다량의 유기물을 포함하므로 특수한 시료처리 방법이 필요하다. 지금까지 생체시료의 처리에는 단독 혹은 혼합산을 이용한 대기압하에서의 산분해법[1]이나 건식회화법[2], 또는 희석법[3]이 주로 이용되어왔다. 그러나 대기압하에서의 산분해법의 경우 처리시간이 길고 안전에 유의하여야 하며, 건식회합물의 경우에는 서서히 가온하므로 완전연소까지 시간소모가 많고 장시간의 가열로 인해 휘발성 성분의 손실이 크다[4]. 희석법은 시료의 유기물 함량이 적은 경우 사용될 수 있으나 산분해법에 비해 신뢰성이 크지 않다[1]. 최근에는 마이크로파를 이용하여 밀폐용기안에서 고온고압으로 시료를 분해시키는 산처리 방법이 많이 이용되고 있다[5~7]. 이 방법은 가열판을 이용한 방법보다 분해시간이 훨씬 빠르며 시료의 오염이 적고 휘발성 원소의 손실이 적다.

최근들어 ICP와 질량분석기를 결합한 유도결합 플라즈마-질량분석기(ICP-MS)가 고감도의 분석기기로서 주목받고 있다[8,9]. 이 방법은 많은 원소에 대해 극미량 수준까지 분석이 가능하며 분석정밀도가 높

고 플라즈마 중 화학종의 규명이 가능하며 방출법에 비해 분광간섭이 훨씬 적은 장점이 있다. 이 외에도 동위원소 존재비의 측정이 가능하므로 안정한 농축 동위원소를 사용하여 동위원소희석 질량분석법에 응용이 가능하다[10,11]. 동위원소들은 질량만 다르고 물리적 화학적 성질은 비슷하므로 극미량성분의 정밀분석에서 가장 좋은 내부표준물로 이용될 수 있다. 따라서 알고 있는 양의 안정한 농축동위원소를 시료에 넣어주면 시료의 취급 중 또는 분석전 처리 중 발생할 수 있는 측정원소의 손실이나 매트릭스 효과에 의한 분석시의 오차는 모두 동위원소에 동일한 영향을 미치므로 동위원소비율 측정에 의한 마지막 분석결과에는 거의 영향을 미치지 않기 때문에 분석에 이용할 수 있는 가장 우수한 검량방법[12~14] 중 하나이다.

본 연구에서는 고체상태 혹은 다량의 유기물을 포함하는 액체상태의 생체물질을 분석이 가능한 상태로 만들기 위해 마이크로파를 이용하는 질산-과산화수소 혼합산화제 시료처리법을 확립하고, 극미량성분의 분석에 뛰어난 ICP-MS에 동위원소희석법을 적용함으로써 생체물질 중의 극미량금속에 대한 절대분석법을 확립한다.

실 험

시 약. 모든 실험에 사용한 물은 Milli-Q 탈염장치를 통과시킨 후 석영으로 만들어진 끓는점 이하(subboiling) 증류장치로 증류하여 사용하였다. 시료분해에 사용한 진한 질산도 특급시약(Avondale Laboratories, England)을 같은 방법으로 증류하여 사용하였고 과산화수소는 30% 특급시약(Junsei Chemicals, Japan)을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 각 금속의 농축안정동위원소(^{62}Ni, ^{65}Cu, ^{111}Cd, ^{123}Sb, ^{206}Pb)는 US Services(Summit, NJ, USA)에서 구입하였다.

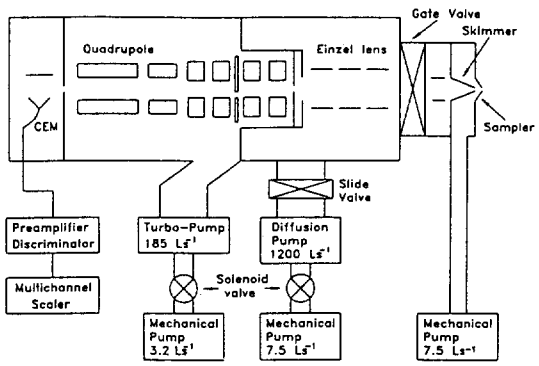

Fig. 1. Schematic diagram of ICP-MS system.

기기 및 장치. 본 실험에서 사용한 ICP-MS 기기는 한국표준과학연구원에서 자체 제작한 것[15]으로 기기의 개략적 구조는 *Fig.* 1에 그리고 작동조건은 *Table* 1에 나타내었다. 본 기기가 다른 상업용 기기(VG, Perkinlmer)와 다른 점은 기기의 sampler와 skimmer orifice를 알미늄으로 제작한 것과 플라즈마에서 오는 적외선 영역의 광자가 검출기(CEM4870, Galileo Electro-Optics)에 도달하여 잡음을 일으키는 것을 방지하기 위하여 photon stop을 사용하는 대신에 *Fig.* 2에 나타낸 것과 같이 이온들의 통과방향을 약 45° 굴절시켰다가 다시 원래방향으로 굴절시키는 방법을 사용하였다. 또한 interface를 통과하여 들어오는 gas를 높은 펌핑속도로 뽑아주어야 하는 첫번째 진공용기에서는 펌프의 수명을 고려하여 diffusion pump를 그리고 quadrupole과 검출기를 포함하는 두번째 진공용기에서는 깨끗한 진공을 위하여 turbo pump를 사용하였다.

시료분해를 위한 가압분해용기는 *Fig.* 3과 같은

Table 1. Operating conditions for ICP-MS system

Inductively coupled plasma	
Forward power	1.2 kW
Reflected power	<2 W
Coolant flow rate	12 *l*/min
Auxiliary jflow rate	0.5 *l*/min
Carrier gas flow rate	0.4 *l*/min
Sample uptake rate	0.8 *l*/min
Sampling depth	10 mm
Mass spectrometer	
Interface pressure	1.7 torr
Quadrupole chamber pressure	3×10^{-6} torr
Sampler orifice (aluminium)	1 mm
Skimmer orifice (aluminium)	0.7 mm
Data acquisition	
Measurement mode	Multichannel scanning
Channel dwell time	5 ms
Average No. of channels per mass	13.7
Integration time per channel	1 s

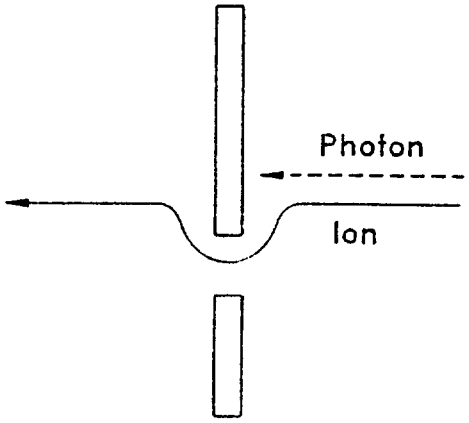

Fig. 2. Ion path to block photons.

모양으로 본 실험실에서 제작하여 사용하였다. 내부의 분해용기는 고압 테플론으로 제작하였으며, 테플론 O-ring을 넣어 고압에 의한 내용물의 손실을 막도록 하였다. 분해용기의 내부 부피는 15 m*l*이다. 외부의 지지용기는 폴리프로필렌으로 되어 있다. 마이크로파 오븐은 출력을 조정할 수 있는 가정용 전자레인지(Goldstar MR343SF)를 이용하였다.

생체시료의 분해. 소나무잎 시료의 경우 100℃로 2시간 동안 건조시켜 일정 무게로 만든 후 시료를 테플론 분해용기에 넣고 농축동위원소 적정량과 진한 질산과 과산화수소를 첨가한 후 뚜껑을 닫고 폴리프로필렌 용기에 넣어 완전히 잠갔다. 이것을 마이크로파 오븐에서 낮은 출력(300 W)으로 5분간 가열한 후 높은 출력(700 W)에서 1분간 가열하고 냉동실에서 2시간 정도 냉각시킨 후 용기를 열었다. 충분히 냉각되지 않은 상태에서 열면 내부의 압력에 의한 시료의 누출이 있을 수 있다. 분해된 시료용액은 25 m*l*로 묽혀 분석하였다. 혈액시료의 경우에는 과산화수소에 의한 거품의 넘침을 방지하기 위해 시료의 진한 질산을 먼저 넣고 혈액과 잘 섞은 후 과산화수소와 농축동위원소 적정량을 첨가하였다. 이후의 과정은 소나무잎 시료의 경우와 동일하다.

결과 및 고찰

최적분해조건. 마이크로파를 이용하여 진한 질산만으로 생체시료를 분해하는 경우 대체로 짙은 노란색의 용액이 얻어진다. 분무기의 끝(tip)이 막

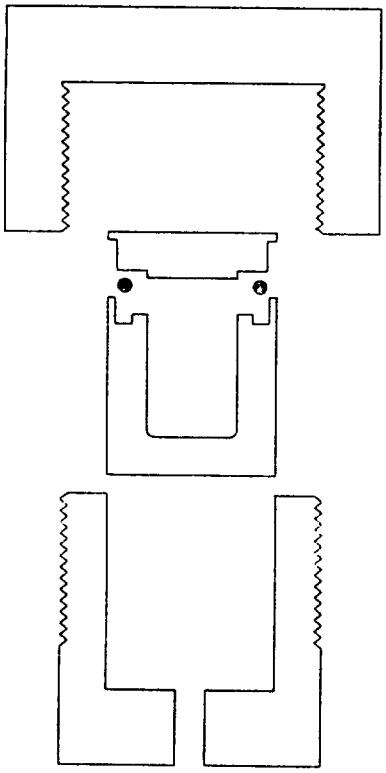

Fig. 3. Microwave digestion bomb.

히지 않도록 하려면 시료를 더 분해하여 맑은 용액을 얻어야 하는데 이를 위해서는 다량의 질산이 필요하다. 그런데 진한 질산용액은 간섭효과에 의한 신호의 감소를 주며 테플론 가압분해용기의 내부부피도 한정되어 있으므로 적정량의 질산과 함께 강한 산화제인 과산화수소를 이용하여 시료를 분해하였다. 이 경우 생체시료의 유기물 분해 후의 용액은 무색의 투명한 용액이 된다. 유기물과 급격히 반응하는 과산화수소를 생체시료에 가하면 바로 거품이 넘쳐 흐르므로 먼저 질산을 가하고 섞은 후에 과산화수소를 가한다. 시료분해시 과량의 과산화수소는 고온에서 모두 분해되므로 최종시료용액은 질산용액이라 할 수 있다.

본 실험에서는 테플론 가압분해용기의 내부부피가 허용하는 한도내에서 되도록 적은 양의 진한 질산을 사용하여 투명하고 맑은 용액이 되는 조건으로 분해하였다. 소나무잎 0.3 g인 경우에는 3 m*l* 진한 질산과 2.5 m*l* 과산화수소로 충분히 분해하였고, 1 m*l* 이하 혈액인 경우 1 m*l* 진한 질산과 1 m*l* 과산화수

Table 2. Isotopes used in isotope dilution method.

Element	Isotope	Abundance (%)	
		Spike	Natural
Ni	60	1.13	26.4
	62[a]	97.10	3.71
Cu	63	0.3	69.1
	65[a]	99.7	30.9
Cd	111[a]	96.31	12.8
	112	1.95	24.1
Sb	121	1.4	57.3
	123[a]	98.6	42.7
Pb	206[a]	92.15	24.1
	208	1.25	52.4

[a]Spike isotope.

소로 완전 분해하였다.

동위원소희석법. 동위원소희석법은 높은 정밀도와 높은 정확도를 줄 뿐만 아니라 시료의 전처리 도중 발생하기 쉬운 측정원소의 손실이 마지막 분석결과에 아무런 영향을 미치지 않는 장점도 제공한다. 따라서 첨가동위원소를 가압분해용기에 시료와 산용액과 함께 넣어주면 고온고압의 분해상태에서 약간의 측정원소 손실이 있더라도 원래 시료 중 존재하던 측정원소와 같은 원소의 첨가동위원소 항상 동일한 비율로 손실될 것이므로 본 방법에서와 같이 동위원소의 비율을 측정하게 되면 이와 같은 측정원소의 손실은 마지막 분석결과에 오차의 요인이 되지 않는다. 한편 어느 측정원소의 안정동위원소(stable isotope)가 3개 이상 존재할 때 첨가동위원소로 어떤 것을 선택하는가의 문제가 있다. 또한 첨가동위원소의 농축도 및 첨가동위원소의 첨가량에 따라 동위원소비율 측정시에 발생하는 오차가 분석결과에 전파되는 정도가 크게 다를 수 있기 때문에 이러한 문제를 고려하여야 한다[14]. *Table* 2에는 본 실험에서 측정한 5개 원소에 대하여 동위원소희석법에 사용한 2개의 동위원소와 첨가동위원소의 농축도를 자연존재비와 함께 나타내었다.

분석결과. 미국립표준연구원(NIST)의 표준기준물인 소나무잎(SRM 1575)을 분석하여 Ni, Cu, Cd, Sb 그리고 Pb의 5개 원소를 정량하였다. 고압분해용기의 한정된 용량 때문에 5개 측정원소의 첨가동위원소를 한번에 다 넣을 수 없어 1.0 μg ^{62}Ni와 0.19 μg ^{123}Sb은 각각 약 0.3 g의 한 batch의 시료에 가하였다. 한편 0.76 μg ^{65}Cu, 0.2 μg ^{111}Cd, 4.3 μg ^{206}Pb은 다른 batch의 시료에 넣어 마이크로파 오븐에서 각각 분해 후 분석하였다. *Fig.* 4에는 질량 60과 66 사이 ^{62}Ni와 ^{65}Cu가 각각 소량 첨가(spike)된 질량스펙트럼을 나타내었다. 이와 같이 농축된 동위원소를 첨가시켜 변화된 동위원소비율을 측정하여 구한 NIST SMR 1575의 다섯 개 시료에 대한 측정값의 평균을 NIST의 검정치와 함께 *Table* 3에 나타내었는데 두 값은 잘 일치하였다.

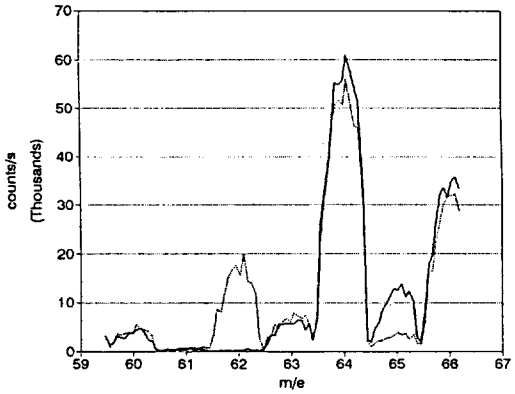

Fig. 4. Ni and Cu isotope peaks illustrating isotope dilution method (dotted line: 0.27 g pine needle + 1.0 μg ^{62}Ni, solid line: 0.27 g pine needle + 0.76 μg ^{65}Cu).

Table 3. Determination of trace element in NIST SRM 1575 pine needle

Element	Determined (μg/g)	Certified (μg/g)
Ni	3.31 ± 0.33	(3.5)
Cu	3.29 ± 0.28	3.0
Cd	0.17 ± 0.03	(<0.5)
Sb	0.21 ± 0.03	(0.2)
Pb	11.0 ± 1.1	10.8

Values in parentheses are not certified and are given for information only.

Norway의 Nycomed Phama사에서 구입한 정확도 관리용 혈액 2종(level 1, level 3)의 Cd, Pb 함량을 동위원소희석법을 이용하여 측정하였다. *Fig.* 5에는 0.5 m*l*의 혈액에 0.29 μg ^{206}Pb을 첨가시켜 얻은 Pb 동위원소스펙트럼과 ^{206}Pb을 첨가시키지 않은 혈액 시료로부터 구한 자연존재비의 동위원소스펙트럼을

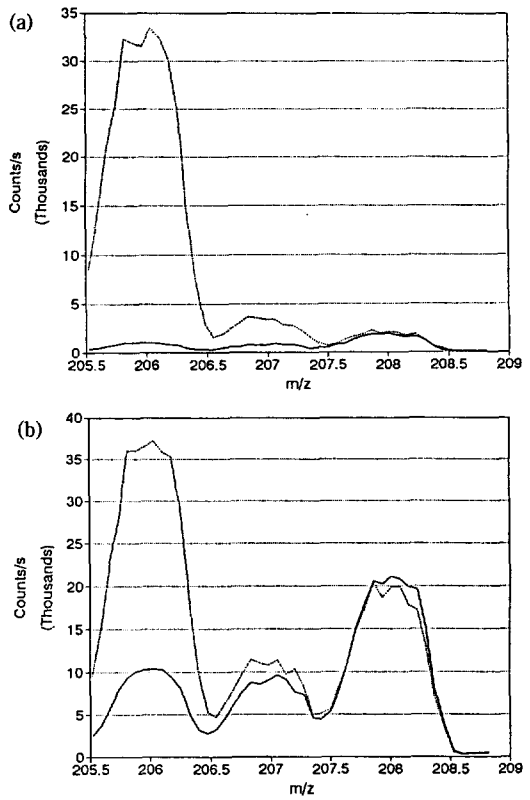

Fig. 5. Pb isotope peaks illustrating isotope dilution method (dotted line: 0.5 m*l* blood + 0.29 μg ^{206}Pb solid line: no spiking) (a) level 1, (b) level 3.

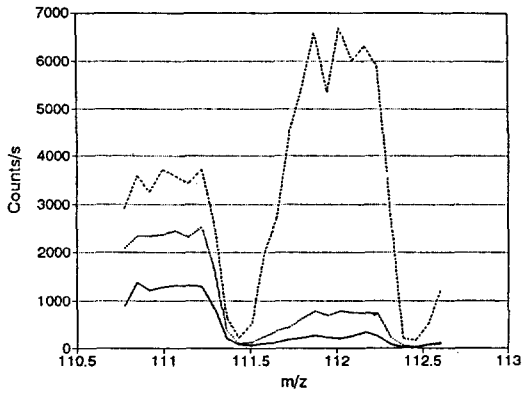

Fig. 6. Cd isotope peaks illustrating isotope dilution method (solid line: 0.5 m*l* level 1 blood + 5 ng ^{111}Cd. Dotted line: 0.5 m*l* level 3 blood + 12 ng ^{111}Cd. Centered line: 10 ppb Cd standard).

Table 4. Determination of Cd and Pb in Nycomed Phama blood

Element	Sample	Determined (ng/m*l*)	Recommended (ng/m*l*)
Cd	Level 1	2.9± 0.7	2.7 (2.4~3.0)
	Level 3	14.5± 0.5	13.2 (12.7~13.6)
Pb	Level 1	40± 4	42 (37~46)
	Level 3	687± 10	671 (635~709)

Values in parentheses are ranges.

Table 5. Determination of Cd and Pb in Japanese reference blood

Element	Sample	Determined (ng/m*l*)	Recommended (ng/m*l*)
Cd	A	16± 2	16.3
	B	1.5± 0.5	2.1
	C	5± 1	7.5
Pb	A	55± 10	47.8
	B	130± 5	149.2
	C	435± 40	512.9

함께 나타내었다. 또한 *Fig.* 6에는 0.5 m*l* level 1 혈액에 5 ng ^{111}Cd을 첨가시킨 용액과 0.5 m*l* level 3 혈액에 12 ng ^{111}Cd을 첨가시킨 용액 및 ^{111}Cd을 첨가하지 않은 10 ppb Cd 표준용액으로부터 얻은 질량스펙트럼을 함께 나타내었다. *Table* 4에는 이들 정도관리용 혈액 2종 분석값을 Nycomed Phama사에서 제공한 값과 함께 나타내었는데 두 값은 잘 일치함을 볼 수 있다. 한국의 혈액분석실험실의 정확도를 평가하기 위하여 일본의 직업보건기구(Japan Federation of Occupational Health Organizations)로부터 도입한 혈액시료 3종을 같은 방법으로 분석하였다. *Table* 5에는 측정값을 일본에서 제공한 값과 비교하여 나타내었는데 대체로 잘 일치하나 본 실험에서의 측정값이 약간 낮음을 알 수 있다. 그러나 본 실험방법인 IDSM법은 절대분석법이기 때문에 실제 참값에 가장 가까운 값으로 판단되며, 제작사가 추천한 값에는 약간의 참값에서 편기(bias)가 있는 것으로 해석된다.

검출한계. *Table* 6에는 NIST SRM 1575 소나

Table 6. Detection limits

Element	Blank (μg/g)	Detection limit (μg/g)
Ni	0.097± 0.01	0.030
Cu	0.094± 0.008	0.024
Cd	0.002± 0.005	0.015
Sb	0.008± 0.008	0.024
Pb	0.008± 0.005	0.015

무잎의 분석조건에서 구한 바탕값과 표준편차와 함께 본 분석방법의 검출한계를 나타내었다. *Table* 6의 바탕값은 가압분해용기에 소나무잎을 분해할 때와 같은 양의 질산과 과산화수소 그리고 절반 정도의 농축동위원소를 첨가시켜 동위원소 희석법으로 구한 값들이다. 혈액시료의 경우 0.3 g 대신 1 m*l* 이하를 사용하고 산용액도 소나무 시료에 비하여 1/3을 사용하므로 혈액시료의 검출한계는 *Table* 6의 소나무잎 시료의 검출한계의 약 1/10이다. 검출한계는 바탕값 측정시의 표준편차의 3배에 해당하는 신호를 줄 수 있는 농도로 계산한 것이다.

결 론

소나무잎과 혈액의 생체시료를 테프론 가압분해용기에 질산과 과산화수소를 넣고 마이크로파 오븐에서 분해시켰을 때 투명한 맑은 용액을 얻을 수 있었다. 이 용액을 ICP-MS로 분석하여 NIST 검정치 혹은 기준값과 잘 일치하는 측정값을 구할 수 있었다. 현재 이에 따라 한국표준과학연구원에서 개발중인 혈액인증기준물(CRM)의 유독원소 농도값의 정확한 검정을 위하여 본 생체시료분석법을 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

인 용 문 헌

1. Zhuang and R. M. Barns, *Appl. Spectrosc.*, **39**, 793 (1985).
2. R. H. Scott and A. Strasheim, *Anal. Chim. Acta*, **76**, 71 (1975).
3. R. L. Dahlquist and J. W. Knoll, *Appl. Spectrosc.*, **32**, 1 (1978).
4. T. T. Gorsuch, *Analyst*, **84**, 135 (1964).
5. M. Burguera and J. L. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, **179**, 351 (1986).
6. I. Kojima, A. Kato, and C. Iida, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 101 (1992).
7. D. W. Mincey, R. C. Williams, J. J. Giglio, G. A. Graves, and A. J. Pacella, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 97 (1992).
8. H. Vanhoe, C. Vandecasteele, J. Versieck, and R. Dams, *Anal. Chem.*, **61**, 1851 (1989).
9. C. J. Park, S. R. Park, S. R. Yang, M. S. Han, and K. W. Lee, *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, 641 (1992).
10. D. Beauchemin, J. W. McLaren, and S. S. Berman, *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 775 (1988).
11. D. Beauchemin *et al.*, *Anal. Chem.*, **59**, 778~783 (1987).
12. A. A. Van Heuzen, T. Hoekstra, and B. Van Wingerden, *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 483 (1989).
13. G. E. M. Hall, C. J. Park, and J. C. Pelchat, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, 189 (1987).
14. C. J. Park and K. W. Lee, 분석과학, **3**, 25 (1990).
15. C. J. Park and K. W. Lee, *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, 431 (1991).