



## ICP-OES를 이용한 우유의 Selenium 분석

김효중\* · 박종길 · 신정걸 · 백영진

(주)한국야쿠르트 중앙연구소

### Determination of Selenium in Milk by ICP-OES

Hyo-Joong Kim\*, Jong-Gil Park, Jung-Gul Shin and Young-Jin Back

R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

#### Abstract

The purpose of this paper was to determine the quantity of selenium in milk by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. The sample was digested in teflon vessel containing nitric-hydrogen peroxide acid mixture. After digestion, the sample is treated with additional hydrochloric acid. Total selenium was reduced with sodium borohydride and concentrated hydrochloric acid in a simplified hydride generation(HG) manifold. The optimum conditions of HG are 2 M for HCl, 1.5% for NaBH<sub>4</sub>, 1.2 mL/min for sample flow. Recovery rates by the standard addition method were 88.0% at 10 ppb and 92.2% at 10 ppm. The relative standard deviations were 4.8 and 3.2%, respectively. This method showed a good accuracy and precision. And so it was highly suitable for determination of small quantity of selenium in milk.

Key words : selenium, ICP, milk, hydride generation

#### 서론

셀렌(Selenium, Se)은 황과 같이 주기율표에서 group XIV에 속하는 원소로서 많은 준금속(metalloid) 성질을 공유한다. 그러나 셀렌 화합물은 그에 대응하는 황 화합물에 비하여 친핵성이 크다(Gravin et al, 2001). 이러한 성질로 인하여 체내에서 특별한 역할을 담당하게 된다. 자연계에서 셀렌은 무기 형태로는 selenite, selenate, elemental selenium으로 존재하며, 유기 형태로는 selenomethionine, selenocysteine 등 sulfur-containing amino acid의 형태로 존재한다(Raymond et al, 1998). 셀렌이 필수 영양 원소로서 인식되기 시작한 것은 불과 40여년이 되었고, 그 전에는 주로 셀렌의 독성에 관한 연구가 주를 이루었다(Gerald et al, 1998). 셀렌의 항산화 작용은 glutathione peroxidase를 필수로 여러 셀렌 단백질에서 발단이 되고(Rotruck et al, 1973), 면역기능을 유지하는데 중

요하며 바이러스 질병에 상당한 효과가 있다(Franke, 1984; Ip, 1998; Zongjian et al, 1999).

셀렌의 이러한 유익한 역할에도 불구하고 inorganic selenium은 강한 세포 독성을 나타내기 때문에 의약품이나 화장품에의 응용이 매우 제한적이므로(Schrauzer, 2000) 세포 독성이 없고 항산화 기능을 가진 organic selenium의 개발이 중요하다. 셀렌의 중요 공급원은 곡류, 육류, 어패류 등이며 곡류 및 식물성 식품의 셀렌 함량은 그 식물이 자란 토양에 의하여 공급되며, 인위적인 공급원은 가축의 사료에 유기형태의 셀렌 화합물을 첨가하여 우유 등으로 생산이 가능하다.

인위적인 셀렌 공급으로 인한 우유 등의 제품은 그 함유량이 극미량이므로 새로운 분석법 확립이 요구된다. 셀렌 분석은 습식, AAS, ICP 등을 이용하여 직접 분석을 실시하면 분석 감도에 한계가 있어 극미량 성분을 정량하기에는 매우 적절하지 못하다(Kim et al, 1995).

따라서 본 연구에서는 시료에 대하여 분석 감도를 높이기 위해 수소화 반응(HG, Hydride Generation)(Eugene et al., 1997; Miguel et al., 1992; Vijan et al., 1980)을 수행한 후 ICP-OES를 이용하여 극미량의 셀레늄 분석법을 확립하고자 하였다.

\* Corresponding author : Hyo-Joong Kim, R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd., 418-12 Kome-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Si, Kyunggi-Do 449-900, Korea. Tel: 82-31-286-9600, Fax: 82-31-286-9601, E-mail: hjkim@re.yakult.co.kr

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

시료를 분해하기 위해서 nitric acid, hydrochloric acid 및 hydrogen peroxide는 trace-metal-analysis grade를 사용하였고, 셀렌의 기화를 위해서  $\text{NaBH}_4$  및  $\text{NaOH}$ 는 Aldrich사(USA)의 특급 시약을 사용하였다.

분해 장치는 Foss Tecator사(Denmark)의 Digestor를 이용하였고, 수소화 반응을 위한 kit는 Perkin Elmer(USA)에서 제공한 FIA(Flow Injection Analysis System)-HY kit(Fig. 1)를 이용하였다. 또한 셀렌의 정성 및 정량을 위해서 Perkin Elmer사의 ICP-OES(Optima 3000 XL, USA)를 사용하였다.

### 시료 전처리

우유 10 g을 100 mL의 Teflon 비이커에 준비한 후 수분을 제거하여 진한 질산 50 mL를 가하고, 12시간 동안 1차 분해를 하였다. 예비 탄화를 위하여 과산화수소 4 mL를 가하여 30분간 반응시켰다. 예비 탄화가 끝난 후  $100^\circ\text{C}$ 로 가열하여 3시간 분해하고 다시  $150^\circ\text{C}$ 로 3시간 분해하였다. 위의 분해 과정은 용액이 무색을 나타낼 때까지 반복하였다. 만약 옅은 노란색으로 착색이 되면 과산화수소 0.5 mL로 여분의 유기 성분을 제거한 후 digester에서 용액을 증발시켰다. 증발된 용액을 100 mL 부피 플라스크에 2 M 염산으로 정용한 후 시험 용액으로 하였다.

### HG 조건 및 기기조건

수소화 반응에 영향을 미치는 산의 농도, 환원제( $\text{NaBH}_4$ )의 농도 및 시료 유속에 따른 최적의 조건을 구하였다. 3차 증류수( $18\text{M}\Omega \cdot \text{cm water}$ )에 셀렌의 최종농도가 1 ppm으로 한 후 염산의 농도를 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 M로 각각 제조하였다. 환원제는 0.1 M의  $\text{NaOH}$ 를 사용하여 0.5, 1, 1.5, 2, 3과 4%로 각각 제조

하였고, 시료의 유속은 0.7~1.6 mL/min에서 각각 최대의 intensity를 측정하였다. 각 각의 실험은 Fig 1에서 보는 HG-kit를 이용하여 셀렌을 기화시켰고, Table 1의 조건으로 분석하였다.

### 직선성 및 검출한계

2 M의 염산 용액으로 셀렌의 표준물질을 각각 0.001, 0.01, 0.1, 1과 10 ppm으로 제조하였다. 검량선의 표준용액으로는 3차 증류수를 이용하여 정용하였고, 환원제의 농도는 1.5%로 하여 수소화 반응을 진행시킨 후 ICP로 분석하였다. ICP를 통해 얻어낸 표준물질의 피크 면적비를 이용하여 검량선을 작성하였고, 검출한계와 정량한계는 Morrison 방법(Morrison, 1980)에 따라 구하였다.

### 회수율

셀렌이 함유되지 않은 우유에 셀렌의 표준물질을 각각 0.01~1 ppm이 되게 첨가한 후 시료처리 조건과 동일하게 처리 하였다. 우유에 셀렌의 표준물질을 첨가하지 않은 것을 blank로 하였으며, 전처리 된 각각의 시료를 염산 2 M로 정용하고 상기된 HG 조건과 ICP 조건으로 회수율을 측정하였다. 이때 회수율은 blank에서 측정한 값의 차이로부터 계산하여 산출하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 시료전처리 및 검출한계

셀렌은 휘발성 무기성분이므로 전처리시 불용화 및 휘발되는 손실을 최소화 하기 위해 분해 온도를  $100\sim 150^\circ\text{C}$ 으로 하였고, 분해용기의 memory effect를 줄이기 위해 teflon 재질의 플라스크를 이용하였다. 유기 분해력이 탁월한 과염소산(perchloric acid)은 분해시 발생하는 증기가 산화력이 있는 물질(oxidizable material)과 반응시 폭발력이 있으므로 질산을 선

Table 1. Instrument conditions of ICP-OES

Parameters	Conditions
Wavelength	196.026 nm
Nebulizer flow	High
Nebulizer	Ultra sonic
RF Power	1100 watts
Plasma argon	15 L/min
Auxiliary argon	1.0 L/min
Nebulizer argon	0.95 L/min
Sample uptake	1.2 mL/min

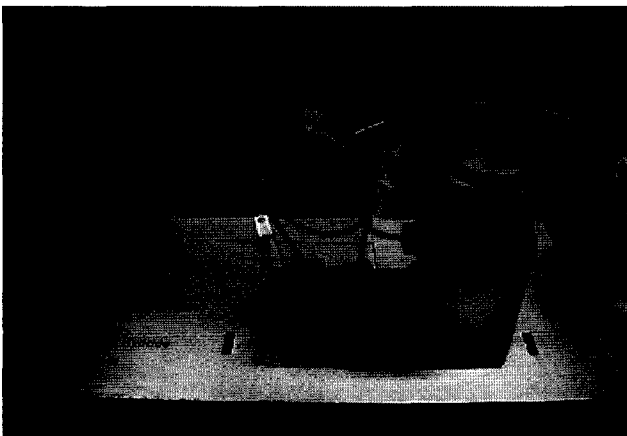


Fig. 1. Simple HY-kit for hydride generation system.

택하였다. 또한 황산도 분해력은 탁월하나 그 자체 점도가 크므로 수소화 발생장치에 이용되는 ultra-sonic nebulizer에서 분무되는 역할을 방해하므로 재현성이 떨어지는 단점이 있었다. 시료에 미량의 유기물이 존재하면 수소화 반응으로 인한 가스 생성량이 많아짐으로 ICP의 플라즈마를 불안정하게 한다. 따라서 재현성 있는 분석 데이터를 얻기 위해서는 과산화수소로 인한 탈색이 중요하였다.

Signal/Noise를 고려하여 셀렌의 검출한계를 구한 결과 5 ppb 수준 이었고, 정량 한계치는 16.8 ppb인 것으로 나타났다.

**최적의 HG 조건**

식품에서 셀렌의 상태는 주로 Se(IV)로 존재하므로 미량의 셀렌을 분석하기 위해서는 SeH<sub>2</sub> 등으로의 기화가 필요하다. 즉 이러한 hydride-forming 원소들은 검출한계를 향상시킬 뿐만 아니라 시료에 의한 matrix 효과도 줄인다(Allen et al., 1997; Oruncio et al., 1996). 수소화 반응장치는 별도의 gas-liquid separator를 이용하여 가스 상태의 셀렌 화합물과 산성 용액을 분리하여 셀렌 화합물만 ICP의 nebulizer로 보내는 역할을 하였다.

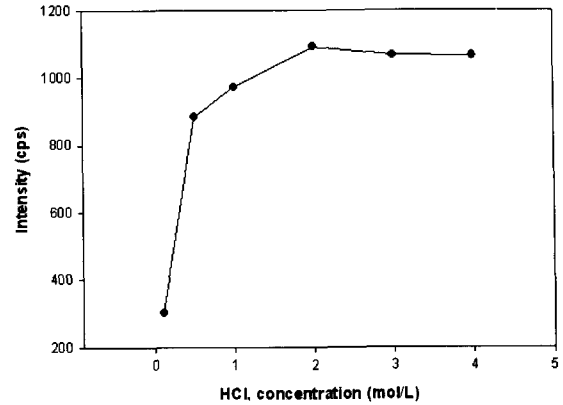
최적의 HG 조건(Table 2)을 구하기 위하여 우선 산 농도에 의한 영향을 살펴보았다. 이때 염산 농도의 범위는 0.1~4.0 M이었고, 염산 농도가 높을수록 intensity는 증가함을 보였으며, 2.0 M에서 최대 cps(counter per sec)로 나타났다(Fig 2). 염산 2.0 M을 기준으로 한 환원제의 최적 농도 효과는 Fig 3에서 보는 바와 같다. 1.5%에서 최대 cps로 나타났고, 2% 이상이면 일정한 cps를 보이는데 이것은 시료에 존재하는 셀렌의 수소화 반응이 모두 진행되었기 때문이다.

Fig 4에서와 같이 시료 유속에 의한 영향을 파악하기 위해 그 유속을 0.7~1.6 mL/min으로 하였고, 이때의 HG 조건 중 산은 2.0 M로 환원제는 1.5%로 하였다. 유속이 증가할수록 cps는 증가하였고, 최대 cps는 1.3 mL/min으로 나타났다. 따라서 최대 cps는 1.3 mL/min이었지만 플라즈마의 안정성을 고려해 볼 때 최적의 유속조건은 1.2 mL/min로 나타났다.

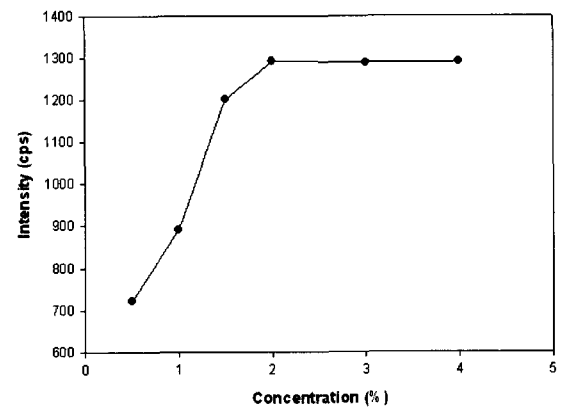
**회수율**

**Table 2. Values of the optimized parameters in hydride generation system**

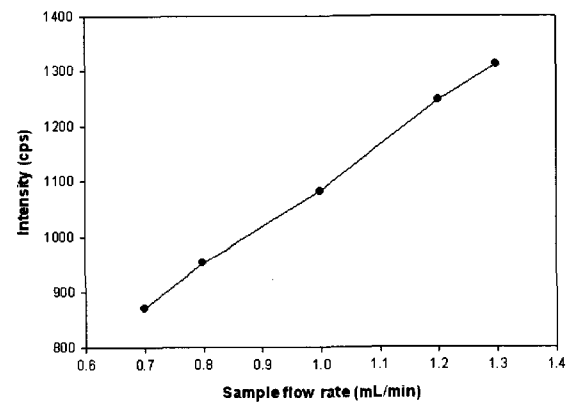
Parameters	Selenium
HCl(M)	2
NaBH <sub>4</sub> (%)	1.5
Flow of HCl and NaBH <sub>4</sub> (mL/min)	1.2



**Fig. 2. Influence of acid strength, using hydrochloric acid, on signal intensity for selenium.**



**Fig. 3. Influence of reductant using sodium borohydride on signal intensity for selenium.**



**Fig. 4. Influence of sample flow rate on signal intensity for selenium.**

회수율 측정은 Table 3에서 보는 바와 같이 저농도와 고농도의 셀렌 표준물질을 대조구 우유에 첨가하여 시험하였다. 평균 회수율은 첨가 표준액의 농도가 높을수록 증가하였다. 10 ppm이 되게 첨가한 우유에서 92.2%의 회수율을 보였고, 100과 10 ppb가 되게 첨가한 우유에서는 각각 90.1과

**Table 3. Recovery ratio of Se in milk containing some concentrations of Se**

Sample concentration spiked( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery ratio(%)	
	Average $\pm$ SD <sup>1)</sup>	RSD(%) <sup>2)</sup>
0.01	88.0 $\pm$ 4.4	4.8
0.1	90.1 $\pm$ 3.5	3.8
10	92.2 $\pm$ 2.9	3.2

<sup>1)</sup> SD: Standard deviation.

<sup>2)</sup> RSD: Relative standard deviation.

88.0%로 나타났다. 3회 반복실험에 의한 상대표준편차(RSD, %)와 표준편차(SD, %)는 10 ppb에서 4.8과 4.4%로, 100 ppb에서 3.8과 3.5%로, 10 ppm에서 3.2와 2.9%로 나타났다. 첨가된 농도가 낮을수록 RSD와 SD의 값이 높아지는 경향을 나타내었으나 모두 신뢰할 만한 수준이었다.

### 직선성

우유 matrix 영향에 의한 직선성을 알아보기 위하여 우유에 셀렌 표준물질을 최종농도가 0.001~10 ppm가 되게 첨가하였다. 우유에서 셀렌은 직선성이 확보되었고, 셀렌 측정 파장인 196.026 nm에서 다른 원소들과의 간섭도 없는 것으로 나타났다. 0.001 ppm의 첨가농도는 검출한계 이하이므로 직선성을 구하는데 제외시켰다. 0.1, 1과 10 ppm에 해당하는 피크 면적비는 거의 일정한 비율로 증가함을 알 수 있었고, 0.01 ppm의 경우에는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 이때의 상관계수(R)는 0.98이었고, 기울기는 0.28로서 우수한 직선성을 나타내었다. HG법을 이용하지 않았을 경우의 직선성보다는 다소 떨어지나 감도를 높이고 화학적 간섭을 제거할 수 있는 장점이 크므로 우유에 미량의 셀렌 측정이 가능하였다.

### 요 약

우유의 셀렌 함량을 측정하기 위하여 ICP-OES를 이용한 분석법을 확립하였다. 시료전처리는 우유의 수분을 제거한 후 질산과 과산화수소를 이용하여 유기성분을 제거하였고, 최종적으로 다시 과산화수소로 미량의 유기성분을 산화시켰다. 셀렌은 휘발성 무기성분이므로 전처리된 용액에  $\text{NaBH}_4$ 와 HCl을 이용하여 셀렌의 수소화(hydride) 반응으로 끓는점을 높이고 분석감도를 향상시켰다. 수소화 반응 중 HCl 농도의 최적조건은 2 mol/L에서 최대 cps(counter per sec)로 나타났다.  $\text{NaBH}_4$ 와 시료 유속의 최적조건은 각각 1.5%와 1.2 mL/min인 것으로 나타났다. 따라서 위의 HG 조건이 시료 매트릭스에 따른 간섭효과를 제거하였으며, 최적의 정량조건임

을 알 수 있었다. 이 조건으로 표준물질을 이용한 셀렌의 직선성 상관계수(R)는 0.98로서 우유에 함유된 셀렌 분석에 적용할 수 있었다. Standard addition method를 이용한 회수율은 10 ppb에서 88.0% 이었고, 첨가된 농도가 증가할수록 회수율 및 RSD는 정확성 및 정밀성을 확보할 수 있었다.

### 참고문헌

- Allen, L. B. and Siitonen, P. H. (1997) Methods for the determination of arsenic, cadmium, copper, lead and tin in sucrose, corn syrups, and high-fructose corn syrups by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **45**, 162-165.
- Eugene, J., Thomas, W., Nowicki, J. B., and Russell, T. (1997) Comparison of Closed-Vessel and Focused Open-Vessel Microwave Dissolution for Determination of Cadmium, Copper, Lead and Selenium in Wheat, Wheat Products, Corn Bran, and Rice Flour by Transverse-Heated Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of AOAC International* **80**, 379-387.
- Franke, K. W. (1984) A New Toxicant Occurring Naturally in Certain of Plant Foodstuffs. *Journal of Nutrition* **8**, 597-608.
- Gavin, E. and Arteel, S. H. (2001) The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **10**, 153-158.
- Gerald, F. and Combs, J. (1998) Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmaco. Ther.* **79**, 179-192.
- Ip, C. (1998) Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. *Journal of Nutrition* **128**, 1845-1854.
- Kim, A. A. and Brandon, I. (1995) Simultaneous determination of Arsenic, Selenium, and Antimony in Environmental Samples by Hydride Generation for Inductively Coupled Plasma Atomic emission Spectrometry. *Journal of AOAC International* **78**, 1055-1060.
- Miguel, N., Maria, C., and Herminia, L. (1992) Determination of Arsenic in Vegetable Samples by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of AOAC International* **75**, 1029-1031.
- Morrison, G. H. (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry* **52**, 2242-2249.
- Oroncio, J. and Rodriguez, M. N. (1996) Determination of Total Arsenic and Selenium in Soils and Plants by Atomic

- Absorption Spectrometry with Hydride Generation and Flow Injection Analysis Coupled Techniques. *Journal of AOAC International* **79**, 764-768.
11. Raymond, J., Turner, J. H., and Diane, E. T. (1998) Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Bio Metals* **11**, 223-227.
  12. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Kafeman, D. G., and Hoekstra, H. G. (1973) Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* **179**, 588- 590.
  13. Schrauzer, G. N. (2000) Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *Journal of Nutrition* **130**, 1653-1656.
  14. Vijan, P. N. and Leung, D. (1980) Reduction of Chemical Interference and Speciation Studies in the Hydride Generation-Atomic Absorption Method for Selenium. *Analytica Chimica Acta* **120**, 141-146.
  15. Zongjian, C. Z., Thompson, H. J., Lisk, D., and Ganther, H. E. (1999) Chemoprevention of Mammary Cancer with Se-Allylselenocysteine and Other Selenoamino Acids in the Rat. *Anticancer Research* **19**, 2875-2880.
- 

(2003. 11. 28. 접수 ; 2003. 12. 12. 채택)