

식품 중 종분화 분석을 위한 HPLC-ICP-MS의 이용

서혜영 · 신동빈

식품분석센터

Application of High Performance Liquid Chromatograph-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer for Speciation Analysis in Food

Hye-Young Seo, Dong-Bin Shin

Food Analysis Center

서 론

최근 과학기술의 발전으로 극미량 분석 기술이 점차 늘어나고 있으며, 세계 각국의 환경 규제 강화로 인한 중금속 분석과 식품, 생물 및 의학 분야에서 원소들의 다양하고 중요한 영향들을 정확히 파악하기 위한 원소 분석 등 여러 분야에서 극미량 원소의 분석을 필요로 하고 있다. 현재 극미량 원소 분석을 위해 가장 효과적이고 널리 활용되고 있는 원소 분석기기는 유도결합 플라즈마 질량분석기(inductively coupled plasma mass spectroscopy, 이하 ICP-MS라 칭함)로서 다 원소 동시분석이 가능하고, 분석시간이 빠르며, 높은 감도로 검출한계가 낮은 장점이 있다. 그러나 ICP-MS는 시료 중 총 금속의 농도 측정은 가능하지만 금속의 산화상태나 알킬이 결합한 형태, 생체분자에 어떻게 결합되어 있는지 등에 대한 정보는 제공하지 못한다. 특히, 자연계에 존재하는 다양한 금속과 비금속들

의 섭취, 축적, 운송, 저장 및 상호작용은 그들의 특정한 기본적 형태에 의해 영향을 받기 때문에 원소의 산화 상태, 화학적 결합 등 복합적인 형태를 파악하는 것은 원소의 생물학적 유용성이나 독성을 평가할 때 필수적인 요소가 된다. 따라서 시료 내에 존재하는 하나 혹은 그 이상의 개별 화학종에 대한 정성·정량분석, 즉 종분화 분석(speciation analysis)이 요구되고 있다. 지금까지 종분화 분석을 위해 많은 분석기술들이 사용되어져 왔지만, 매우 낮은 검출한계 능력을 갖는 ICP-MS와 뛰어난 분리 능력을 갖는 고성능 액체 크로마토그래프(high performance liquid chromatograph, 이하 HPLC라 칭함)를 연결한 HPLC-ICP-MS가 극미량 함유된 원소들의 종분화 분석에 중요한 분석기술로 자리 잡고 있다. 본 논설에서는 종분화 분석에 있어 중요한 의미를 가지는 HPLC-ICP-MS의 원리와 식품분야 활용방안에 대하여 소개하고자 한다.

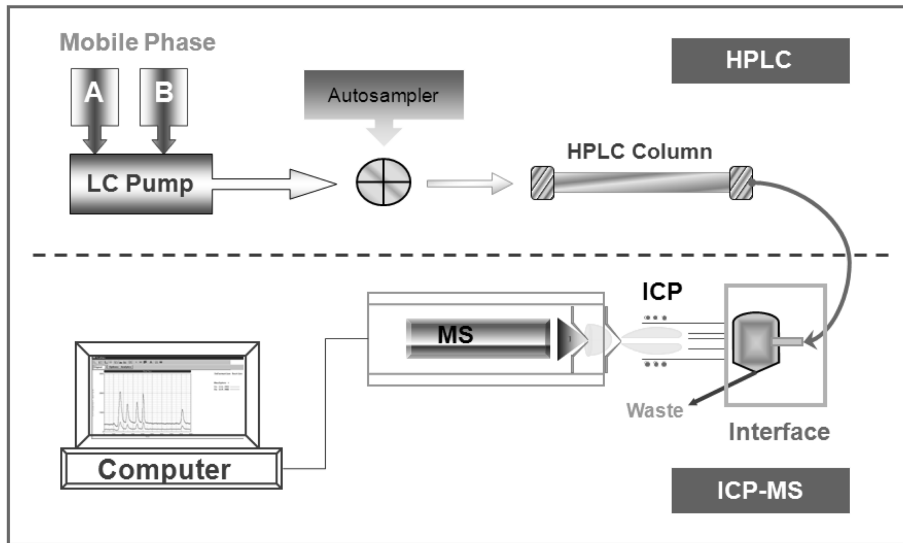


그림 1. HPLC-ICP-MS의 모식도(출처: PerkinElmer)

원 리

HPLC-ICP-MS는 뛰어난 분리 능력을 갖는 HPLC와 높은 감도와 매우 낮은 검출 한계를 갖는 ICP-MS의 검출 능력을 이용하여 두 장비를 연결한 형태로 중분화 분석에 주로 사용되는 결합기술이다. 먼저 액체 시료를 분리하기 위한 특정 칼럼과 이동상을 이용하여 HPLC의 칼럼을 통과시키고, 칼럼을 통해 분리되어 용출되는 시료를 분무기로 ICP-MS에 주입하여 원소별 농도를 측정한다(그림 1). 이때 ICP-MS로 주입된 시료는 아르곤 플라즈마 내에서 높은 열에너지에 의하여 기화, 원자화, 이온화 과정을 거쳐 sampler cone와 skimmer cone을 지나 여러 개의 정전기적 렌즈를 통과하고 질량분석기를 지나 검출된다. 그리고 개별 peak에 대한 크로마토그래피의 머무름 시간과 질량분석기에서 원소 존재비의 일치로 개별 화학종들의 농도를 계산하게 된다.

ICP-MS로 검출하기 위한 화학종들의 분리는 분석하고자 하는 종들의 물리·화학적 특성에

따라 양이온 교환, 음이온 교환, 역상, 이온쌍 등 LC의 분리 특성을 이용하여 머무름 시간에 따라 분리한다. 이러한 LC의 가장 중요한 장점 중의 하나는 다양한 이동상과 고정상을 사용하기 때문에 이용 가능한 분리기작의 범위가 넓다는 것이다. 그러나 중분화 분석에 있어서 필수적인 본래 화학종 정보의 보존은 분리방법과 시약의 선택에 영향을 받을 수 있으므로 주의를 기울여야 한다. ICP-MS와 연결하여 사용하는 대표적인 LC는 다음과 같다.

1. 역상 액체 크로마토그래피

역상 액체 크로마토그래피(reversed-phase liquid chromatography, RPLC)는 가장 보편적으로 사용되는 분리방법으로 이동상 보다 낮은 극성의 고정상(C_8 또는 C_{18}) 표면이 있는 칼럼을 사용한다. RPLC에서의 분리는 일반적으로 종간의 선택성을 증가시키는 유기용매(메탄올, 에탄올 등)의 비율에 따라 상대적인 친수성에 의해 분

리되는데, 분리된 종들의 검출을 위해 ICP-MS와 연결할 때 이동상 내 유기용매의 농도에 의해 제한을 받는다. RPLC에서 용출되는 고농도의 유기용매가 플라즈마로 도입되면 반사전력이 증가되어 플라즈마 꺼짐 현상을 초래하며, 아르곤 플라즈마의 이온화 특성을 변화시켜 원소종들에 대한 검출 감도의 변화를 유발한다. 또한 너무 많은 양의 탄소가 플라즈마 내로 주입될 경우 토오치(torch)와 콘(cone)에 다 원소 방해물질들과 탄소의 침착을 일으키며, 탄소가 약간의 전도성을 나타내기 때문에 유도코일에서부터 탄소가 침착된 토치까지 불꽃 방전이 일어난다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 최근에는 미세분무기나 탈용매장치를 중분화 분석에 사용하고 있으며, micro-LC와 같이 낮은 유속으로 분리하는 LC와 결합하여 점차적으로 그 활용이 증가하고 있다.

2. 역상 이온쌍 크로마토그래피

역상 이온쌍 크로마토그래피(reversed-phase ion pairing chromatography, RPIPC)는 이온성 화학종들의 분리와 정량을 하는 RPLC의 한 분

류이다. 우수한 재현성 및 짧은 분석시간으로 한 번의 분리에 의해 이온성 및 비이온성 화합물의 분리가 가능하며, 유기용매의 비율 그대로 복잡한 혼합물에서 분석물질의 선택성을 높이기 위해 이동상 내에서 반대이온의 크기 및 농도를 변화시킬 수 있는 장점이 있다. 최근 과불소화 이온쌍 시약(예를 들면, TFA, HFBA 등)이 광범위하게 사용되고 있으며, 셀레노 아미노산류에서 우수한 분리능을 제공하고 있다. 그림 2는 메탄올과 물을 동일한 비율로 유지하면서 과불소화 이온쌍 시약 종류에 따른 몇몇 셀레늄 종에 대한 분리도의 변화를 보여주고 있다. RPIPC-ICP-MS에 의한 중분화 분석에서는 RPLC를 사용할 때와 같이 유기용매와 산류에 의해 원소종들이 쉽게 변할 수 있으므로(중전환 반응), 분리하는 동안 분석물질의 안정성에 대하여 RPLC보다 더 세심한 주의가 요구된다.

3. 크기 배제 크로마토그래피

젤 투과 크로마토그래피(gel permeation chromatography)로 잘 알려진 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography, SEC)는

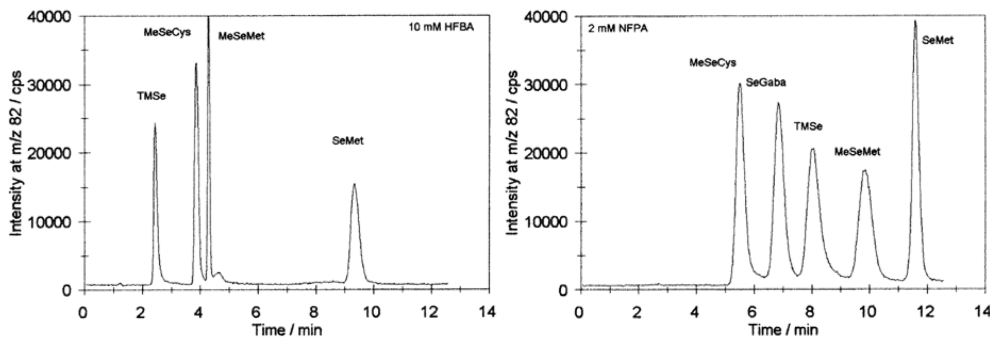


그림 2. 과불소화 이온쌍 시약에 따른 셀레늄 종의 분리도 차이 (좌) hepta-fluorobutyric acid(10 mM), (우) nonafluoropentanoic acid(2 mM). 분리된 셀레늄 종: selenomethionine (SeMet), methylselenomethionine(MeSeMet), methylselenocysteine(MeSeCys), selenogammaaminobutyric acid(SeGaba) 및 trimethylselenonium ion(TMSe)

특정한 내경의 기공을 가지는 고정상을 사용하여 용액 내에서 시료의 크기에 따라 분자를 분리하기 위해 사용된다. 고정상의 기공에 들어가기에 너무 큰 시료 분자들은 완전히 배제되어 첫 번째로 용리되고, 반면에 작은 분자들은 고정상과 상호작용하여 그들의 유효 크기에 따라 용리된다. 이러한 기작은 특히 상당히 큰 단백질이나 폴리펩타이드의 분리를 위해 유용하나, SEC에서 작은 이론단의 수는 상대적으로 분리능이 떨어지게 되고, 각 분리된 분획에 여전히 다수의 화합물들을 함유할 수도 있기 때문에 대부분 보조분리에 의한 분리가 필요하다.

SEC의 주요 장점은 시료에 존재하는 금속과 분자 사이 관계의 형태를 예측하기 위해 사용될 수 있는 머무름 시간과 분자질량 사이에 성립될 수 있는 상관관계로 미지의 화학종을 확인할 수 있다는 것이다. 또한 SEC는 온화한 분리방법으로 원소 화학종의 손실이나 칼럼 내에서의 변화가 없어 불안정하고 약한 금속복합형 생고분자(metal-complexing biopolymers)의 분리에 뛰어나다. SEC에서 분석물질에 대한 고정상의 부정적인 영향을 최소화하기 위해서 완충용액에서 염(예를 들면, NaCl) 농도를 높이는 것이 도움이 되나, 너무 높은 염 농도는 유기금속복합체들의 특성을 바꿀 수 있으며, 제안되는 농도(0.3~0.5 M)는 결정적으로 ICP-MS의 분무기와 cone의 막힘 현상을 유발할 수 있어 대체 이동상이 사용되어야 한다.

4. 이온 교환 크로마토그래피

중분리 분석에서 이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography, IEC)의 가장 중요한 장점들 중 하나가 SEC에 비해 분리 효율

이 우수하고 광범위하게 응용할 수 있다는 것이다. IEC에 포함된 일련의 과정들은 하전된 용질 이온과 반대로 하전된 고정상 표면 사이에서 이온 교환 평형에 기초한 것으로, 용질 이온들과 이동상 내의 등가이온은 고정상에 대한 반대 이온으로 경쟁한다.

IEC를 수행하기 위한 이동상은 수용성 염 완충용액으로 구성된 것을 사용하는데 종종 메탄올 또는 아세토니트릴과 같은 유기용매가 혼합되며, 대부분 크로마토그래피가 진행되는 동안 이온 강도를 증가시키는 기울기 용리를 사용하고 있다. 기울기 용리는 복잡한 혼합물을 분리하는데 효율적이지만 HPLC-ICP-MS로 사용될 때 몇 가지 단점이 있다. 분석이 종료되면 칼럼은 새로운 이동상으로의 평형이 필요하므로 시간이 오래 걸리고, 분리하는 동안 이동상의 조성이 변하기 때문에 바탕선이나 감도에 변화를 줄 수 있다.

IEC는 Cr(III)/Cr(IV) 또는 Sb(III)/Sb(V)/methyl-Sb처럼 다른 원자가 상태로 공유결합한 원소종의 분리를 예측하는데 용이하며, 그 외에 공유결합의 셀레노 아미노산류 또는 비소화합물들의 분리에 자주 이용되고 있다.

5. 카이랄 크로마토그래피

카이랄 크로마토그래피(chiral chromatography, CC)는 카이랄 고정상을 사용하여 거울상이성질체와 고정상의 카이랄 리간드(chiral ligand) 사이에서 일시적인 부분입체이성질의 복합체를 형성하는 것에 기초하고 있다. CC는 제약산업에서 주로 사용되는 기술로 ICP-MS를 이용한 연구는 드물지만, 최근 셀레늄 보충제에서 L,D-Se-methionine의 분리를 위해 ICP-MS에 크라운

에테르(crown ether) 칼럼의 결합이 성공적으로 수행됨으로써 이 방법의 잠재력이 입증되었다.

화학종들의 분리를 위해서 위에 언급한 HPLC 들을 수행한 후 검출을 위해 시료를 ICP-MS로 주입하는 연결 장치가 분무기(nebulizer)이다. 최근 상용화 되고 있는 분무기는 아르곤 기체의 물리적 힘을 이용한 유압식 분무기가 있으며 깨끗한 시료에 사용되는 등축형 분무기(concentric nebulizer)와 복잡한 시료에 적합한 직교형 분무기(cross-flow nebulizer)가 대부분을 차지하고 있다. 그러나 이러한 유압식 분무기는 분무 효율이 1~5% 정도로 매우 낮아 분무 효율이 높은 직접 주입 분무기(direct-injection nebulizer, DIN), 초음파 분무기(ultrasonic nebulizer, USN) 등이 HPLC-ICP-MS의 연결 장치로 고안되었다. DIN은 유압식 분무장치와 비교하여 검출한계가 10~100배 개선되는 결과를 가져왔으나, 고농도의 유기용매를 사용할 경우 플라즈마의 냉각이 관찰되었고, 이온형태의 흐름을 변화시켰으며, sampler cone의 손상을 유발하는 등 운영상에 문제점이 있는 것으로 보고되었다. 최근에는 분무효율이 높은 미세등축형 분무기(microconcentric nebulizer)가 ICP-MS와 Microbore LC의 연결 장치로서 매우 적합한 시스템으로 보고되었으며, 용리액의 조성변화에 대한

신호변화가 관찰되지 않아 용리액의 조성과 기울기 용리에 상관없이 화학종들의 정량이 가능한 연결 장치로 각광 받고 있다.

식품분야 활용방안

많은 미량 원소들은 영양학적으로 중요하지만, 원소의 다양한 형태에 따라 독성의 유무가 달라지기 때문에 다양한 식품에서 HPLC-ICP-MS에 의한 미량 원소들의 중분화 분석에 대한 관심이 높아지고 있다. 대부분의 중분화 분석은 토양, 수질, 환경 분야에 집중되어 있으며, 식품분야에서 주로 분석되고 있는 중분화 원소들은 비소(As), 셀레늄(Se), 주석(Sn) 등으로 다음과 같이 연구가 진행되어 있다.

1. 비소 중분화 분석

비소(arsenic, As)는 그 화학종의 형태에 따라 독성이 다른데, 무기 비소종(arsenite, arsenate)들은 monomethylarsonic acid(MMA)와 dimethylarsinic acid(DMA)보다 독성이 강하고 arsenobetaine(AsB)과 arsenocholine(AsC)은 상대적으로 무독성인 것으로 알려져 있다. 따라서 총 비

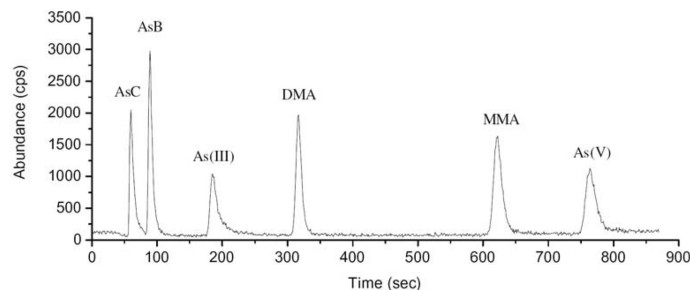


그림 3. 비소종(As III, As V, DMA, MMA, AsB 및 AsC)의 기울기 음이온 교환 ICP-MS 크로마토그램 : 이동상-중류수(A)/50 mM (NH₄)₂CO₃(B) 기울기 용리, 유속 1.8 mL/min

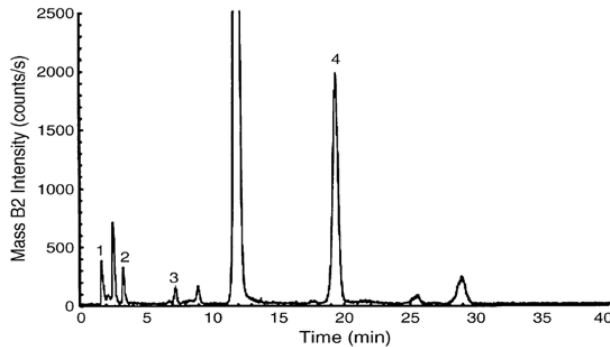


그림 4. 235 ppm 셀레늄 마늘의 이온쌍 크로마토그램: 1, inorganic selenium; 2, Se-methyl-DLselenocysteine; 3, selenomethionine; 4, selenoethionine

소의 측정으로는 충분한 정보를 얻을 수 없으며, 그 영향을 정확하게 평가하기 위해서는 아주 낮은 검출한계를 갖는 분석 장치에 의한 중분화 분석이 반드시 필요하다.

HPLC-ICP-MS에 의한 비소 중분화 분석에 사용되는 분리방법으로는 주로 RPIPC와 IEC가 사용되었으며, 각각 C_{18} 과 음이온교환 칼럼을 사용하여 As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC 등과 같은 주요 비소종을 분석하였다(그림 3). 비소가 오염된 토양에서 생산된 사과와 비소 중분화 분석을 시작으로 당근, 쌀, 버섯류 등에 대한 연구가 진행되었으며, 해양생물에서의 비소 생물변형으로 상어, 바닷가재, 어류, 건조해산물 등에 대한 비소 중분화 분석이 이루어져 있다.

2. 셀레늄 중분화 분석

셀레늄(selenium, Se)은 독성이 있으면서도 필수적인 미량원소로 이중적인 성격을 띠고 있어 환경, 의학, 생명공학에서 주된 관심이 되고 있으며, 셀레늄 함량이 높은 마늘은 유방암 예방에 효과가 있다고 알려지는 등 최근에 더욱 관심의 대상이 되고 있는 원소이다. 셀레늄의 독성과 생물학적 유용성은 이 원소가 존재하는 화학적 형

태의 종에 따라 크게 좌우하며, 무기 셀레늄보다는 유기 셀레늄이 독성이 약한 것으로 알려져 있다. 유기 셀레늄은 생명체 내에서 강한 이성질체적 선택성을 나타내어 이성질체의 형태에 따라 생물이용 가능성과 독성이 서로 다르게 작용한다.

HPLC-ICP-MS에 의한 셀레늄 중분화 분석의 분리기전은 이온교환과 역상 이온쌍 크로마토그래피가 사용되고 분리되는 이동상의 pH와 강하게 연결되어 있는데, pH는 음이온 셀레늄 화학종의 pKa값의 범위여야만 한다.

셀레늄 중분화에 대한 연구는 대부분이 셀레늄 강화 효모에 집중되어 있으며, 견과류(브라질 호두, 호두, 캐슈, Pekan 등), 양파, 마늘, 대구, 셀레늄 함유 영양보조제 등에서 Se-methylselenocysteine(SeMeSeCys), Se-allylselenocysteine(AllSeCys), Se-propylseleno-cysteine(PrSeCys), selenocystine(SeCys), selenohomocystine(SeHoCys2), Se-methylselenomethionine(SeMeSeMet), selenomethionine(SeMet), selenoethionine(SeEt) 등과 같은 셀레노 아미노산류와 trimethylselenonium ion(TMSe), dimethylselenonium propionate ion(DMSePr) 화학종이 분리되었다. 셀레늄 강화 마늘에서 셀레늄 화학종을 분석한 결과는 그림 4와 같다.

3. 주석 중분화 분석

주석(tin, Sn)은 부드럽고 휘어지기 쉬운 은색 금속으로서 다른 화학물질과 결합하여 다양한 화합물을 형성하며, 토양 속에 자연적으로 존재하기 때문에 야채, 과일, 고기, 생선 등을 통해 섭취될 수 있다. 주석은 주석금속, 무기주석화합물(염화주석, 불화주석, 산화주석 등) 및 유기주석화합물(dimethyltin, dibutyltin, diethyltin, tributyltin, dioctyltin, triphenyltin 등)로 나누는데 주석금속과 무기주석화합물은 독성이 낮으나 유기주석화합물 중 삼량체(trimer)는 독성이 매우 강하다.

지금까지 주석의 중분화 분석은 질량분석기, 원자발광검출기 또는 ICP-MS가 연결된 기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC)가 주요 도구가 되어 왔다. 그러나 시간이 오래 걸리고 선택성이 떨어지는 단점 때문에 HPLC 분리가 점차적으로 관심의 대상이 되어 왔다. 주석의 중분화에서 HPLC-ICP-MS는 새로운 분야이다. 주석 화학종의 성질이 이온성이기 때문에 이온 교환 분리가 양이온 교환 칼럼을 사용하여 쉽게 이루어지게 된다. 또한 유기주석 화학종들은 고정상에 쉽게 흡착될 것이기 때문에 이동상에 높은 비율의 메탄올 등이 필요하다. 따라서 주석의 중분화 분석을 위해서는 유기용매에 의한 ICP-MS 검출에 미치는 영향을 최소화하기 위해서 냉각된 안개상자(cooled spray chamber)나 탈용매장치가 필요하게 된다.

어류에서 유기주석 분석에 관한 연구가 많이 이루어졌으며, 무기주석, trimethyltin(TrMT), tributyltin(TrBT), triphenyltin(TrPT) 등에 대한 중분화 분석이 이루어졌다.

이와 같이 HPLC-ICP-MS는 식품 중 독성 문

제가 되는 중금속의 중분화 분석에 활용가능하며, 원소선택성 검출기인 ICP-MS의 결합으로 코발트(Co)를 함유하는 비타민 B₁₂, 구리, 아연 등을 함유하는 methalothionine류 등 금속이나 비금속을 함유하는 화학종들의 분리 및 분석에 활용할 수 있다.

기대 효과

HPLC-ICP-MS는 광범위한 가변성이 있는 중분화 도구이다. 식품분야에서 HPLC-ICP-MS를 활용한 중분화 분석은 화학적 형태에 따라 독성이 다르게 나타나는 중금속의 중분화에 대한 정확한 정보를 제공함으로써 중금속 등 화학적 위해물질의 안전성 평가를 위한 과학적 데이터를 마련할 수 있다. 이를 토대로 식품에서 비소 등의 기준규격을 설정하여 식품의 안전성을 확보할 수 있고, 국제 교역에서 무기비소, 유기주석 등 관련법규의 규제에 대응할 수 있는 과학적 근거자료를 제공할 수 있다. 또한 마늘의 셀레늄 화합물 등 기능성 성분의 정량적 데이터 제공을 통한 기능성 식품의 신뢰성을 제고하여 식품산업의 발전을 도모할 수 있다. 더 나아가 식품 중 다양한 원소종의 중분화 분석을 통해 무기종과 유기종의 생물변형에 대한 구조적 체계를 규명하는 연구에 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 김유정, 김양호, 정경숙, 심창선, 최나리, 김종철, 음준범, 요시야키 나카지마, 요코 엔도, 유철인, 급성 유기주석 중독 1례, 대한산업의학

- 회지, **18**(3), 255-262, 2006
2. 정세훈, 정성욱, 박신화, 이중주, ICP-MS를 이용한 극미량 원소 분석 기술, RIST 연구논문, **22**(2), 100-105, 2008
 3. Arnault I, Auger J, Seleno-compounds in garlic and onion, *Journal of Chromatogr. A*, **1112**(1), 23-30, 2006
 4. Birda SM, Gea H, Udena PC, Tysona JF, Block E, High-performance liquid chromatography of selenoamino acids and organo selenium compounds Speciation by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatogr. A*, **789**(1-2), 349-359, 1997
 5. Cao X, Hao C, Wang G, Yang H, Chen D, Wang X, Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products, *Food Chem*, **113**(2), 720-726, 2009
 6. Gammelgaard B, Bendahl L, Sidenius U, Jons O, Selenium speciation in urine ion-pairing chromatography with perfluorinated carboxylic acids and ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom*, **17**(6), 570-575, 2002
 7. Larsen EH, Pritzl G, Hansen SH, Speciation of eight arsenic compounds in human urine by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection using antimonate for internal chromatographic standardization, *J. Anal. At. Spectrom*, **8**(4), 557-563, 1993
 8. Makarow A, Szpunar J, Species-selective determination of cobalamin analogues by reversed-phase, HPLC with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom*, **14**(9), 1323-1327, 1999
 9. Michalke B, The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects, *Trends Anal. Chem*, **21**(2), 142-153, 2002
 10. Montes-Bayon M, DeNicola K, Caruso JA, Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1000**(1-2), 457-476, 2003
 11. Shum SCK, Pang H, Houk RS, Speciation of mercury and lead compounds by microbore column liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization, *Anal. Chem*, **64**(20), 2444-2450, 1992
 12. Sutton KL, Ponce de Leon CA, Ackley KL, Sutton RMC, Stalcup AM, Caruso JA, Development of chiral HPLC for selenoamino acids with ICP-MS detection: application to selenium nutritional supplements, *Analyst*, **125**(2), 281-286, 2000

서혜영 이학박사

- 소속 한국식품연구원 식품분석센터
- 전문분야 식품화학분석
(식품 향기성분 분석, 식품 위해물질 분석)
- E-mail hyseo@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9340

신동빈 농학박사

- 소속 한국식품연구원 식품분석센터
- 전문분야 식품공학(마늘 성분변화, 가공식품 유통기한 설정 연구)
- E-mail shindb@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9126