Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 27, No. 6, 269-276, 2014
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2014.27.6.269

A short study of uncertainty for post column isotope dilution method in HPLC-ICP/MS

Mingyu Joo and Yong-Nam Pak★

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education
Cheng-Won, Chung Buk 363-791, Korea

(Received August 27, 2014; Revised December 3, 2014; Accepted December 3, 2014)

HPLC-ICP/MS에서 후 컬럼 동위원소 희석법의 기초적인 불확도 연구

주민규 · 박용남★

한국교원대학교 화학교육학과

(2014. 8. 27. 접수, 2014. 12. 3. 수정, 2014. 12. 3. 승인)

Abstract: A short study for the uncertainty of post column isotope dilution method has been performed for the analysis of Selenomethionine in HPLC-ICP/MS. Major error sources studied were concentration and the flow rate of Se isotope solution, atomic weights of Se in spike and sample, and isotope ratio measured for the spiked sample. Uncertainties were obtained for each factor and the contribution for the total concentration uncertainty was 54.4% and 0.61%, 0.0072% and 0.018%, and 45.0%, respectively. The biggest contribution factor was concentration of the spike solution and the second was the isotopic ratio measured for the spiked sample solution. The mass flow rate of spike and atomic weights did not show much contribution. The calculated total uncertainty was 1.46 ng·g^{-1} for the standard SeMet (126.30 ng·g^{-1}). The experimental result was 127.09±1.46 ng·g^{-1} and the relative uncertainty was 1.20%.

요 약: 후 컬럼 동위원소 희석법의 불확도를 HPLC-ICP/MS에서 Selenomethionine을 분석할 경우에 대하여 간단히 연구하였다. 주요하다고 생각한 오차의 원인으로 셀레늄 동위원소 용액의 농도와 흐름속도, 스파이크 용액과 시료 용액에서의 셀레늄 원자량, 그리고 스파이크된 시료용액에서 측정된 동위원소의 비를 선택하였다. 각 요인에 따른 불확도를 구하고 전체 농도의 불확도에 미치는 요인을 계산한 결과, 각각에 대하여 54.4%와 0.61%, 0.0072%와 0.018%, 그리고 45.0%를 얻었다. 가장 큰 요인은 스파이크 동위원소 용액의 농도이며 두 번째는 스파이크가 첨가된 시료용액에서의 동위원소비이었다. 스파이크 용액의 질량흐름속도와 원자량의 불활도는 크게 영향을 끼치지 못하였다. 계산된 전체불확도는 126.30 ng · g^{-1} SeMet 표준용액에 대하여 1.46 ng·g^{-1}으로서 실험결과는 127.09 ng·g^{-1}을 얻었고 상대불확도는 1.20%이었다.

Key words: species unspecific isotope dilution, uncertainty, error calculation, HPLC-ICP/MS

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)43-230-3732 Fax : +82-(0)43-232-7176
E-mail : pakyn@knue.ac.kr

1. 서 론

유도결합 플라즈마(ICP; Inductively Coupled Plasma)와 질량 분석기(MS; Mass Spectrometer)의 결합은 시료준비가 용이하며 분석시간이 절약되는 장점을 가진 고급 분석기술로서 최근에 가장 널리 사용되는 기술중의 하나이다. 또한 동위원소 희석법(ID; Isotope Dilution)[1-3]은 높은 정확성과 정밀성으로 현대의 분석기술에서 가장 강력한 정량분석법중의 하나이다. 이에 ID법을 ICP/MS에 사용하는 연구들[4-6]이 현대의 과학 및 공학 전 분야에 걸쳐서 많이 보고되고 있다. 그 원리와 구체적 사용법에 대하여서는 잘 알려져 있기 때문에 여기에서는 논의하지 않을 것이다.

ID법을 ICP/MS에 적용하는 것에 한 걸음 더 나아가 분리기술이 합쳐진 HPLC (high performance liquid chromatography)-ICP/MS에 적용할 때에 그 기술은 더욱 큰 의미를 가진다. 대다수의 시료들이 여러 가지 화합물의 혼합으로 이루어져 있기 때문에 이 들을 효율적으로 분리하는 HPLC의 능력과 낮은 농도의 시료를 고감도로 민감하게 검출하는 ICP/MS의 능력을 결합한 HPLC-ICP/MS의 기법에 ID까지 적용시키는 것은 최신 분석기술의 정화라 할 수 있다.

따라서 HPLC-ICP/MS에 ID법을 적용하여 각 화합물의 농도를 정확히 정량분석을 하는 것은 당연한 수순이지만, ID법의 적용에 있어서 각 화합물에 대한 표준물 즉, 동위원소로 표지된 표준물을 사용하여야 한다. 때로 이 표준물을 구하기가 어려우며 따라서 시료 화합물에 관계없이 정량할 수 있는 species unspecific ID 법이 개발되었다.[7,8] 이 방법은 species specific ID 보다는 정확성이 떨어지지만 모든 화합물(주어진 원소의)에 대하여 적용하는 것이 가능하다. Species unspecific ID는 컬럼 뒤에 표준동위원소물이 첨가되므로 후 컬럼 ID법(PCID; post column ID)이라고도 불린다. PCID에서는 신호세기(CPS) 대신 동위원소 비를 사용하므로 기기의 불안정과 매트릭스 효과에 의한 오차에도 관계없이 원하는 원소의 정확한 정량 가능하고 동위원소로 표지된 화학종 없이 정량이 가능하며 동시에 여러 화학종을 정량 할 수 있는 장점이 있다. 하지만 컬럼 내에서의 분리라던가 시료의 주입 및 시료의 전처리에 관한 오차는 전혀 보정할 수 없는 단점이 있다.

결국 화학종에 따른 동위원소 표준물을 합성하지 않아도 된다는 장점을 가지고 있지만 최종 농도를 구하기까지 여러 요인들이 복합적으로 포함되어 있어서 정확성이나 정밀성이 떨어진다. 불확도에 대한 연구는 많이 조사된 바 있으며 국내에서도 우진춘 등[9,10]에 의하여 잘 정리 보고되었다. 하지만 PCID에 있어서의 오차의 원인을 구체적으로 분석한 연구들은 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 PCID에 있어서의 불확도를 계산하고자 하였는데 모든 요인들을 다 고려하기에는 어려운 점이 있으며 우선 중요하며 또한 계산하기 쉬운 요인들에 대하여 조사하고 사용하였다. 특히 질량흐름식을 사용하여 불확도를 계산하고 농도에 대한 합성불확도를 구하였다. 아직 국내외적으로 PCID에 있어서의 본격적인 불확도 연구는 거의 없으므로 이 연구의 의의는 크다 하겠다.

2. 이론적 배경

2.1. 동위원소 희석법

동위원소 희석법에서 동위원소의 비는 다음과 같이 얻을 수 있다. 만일 N이 몰수이고 s와 sp가 시료와 스파이크를 나타낸다면 시료와 스파이크의 혼합물인 m의 몰수 N_m은 $N_m = N_s + N_{sp}$으로 나타낼 수 있으며 동위원소 a와 b에 대하여서는 각 각 N_m^a과 N_m^b로 나타낼 수 있다. 따라서 a와 b 동위원소의 비 $R_m=(N_m^a)/(N_m^b)$은 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_{sp}^a}{N_s^b + N_{sp}^b} = \frac{N_a A_s^a + N_{sp} A_{sp}^a}{N_s A_s^b + N_{sp} A_{sp}^a} \quad (1)$$

단, 여기에서 A는 동위원소의 함유량을 나타낸다. 이 식을 시료의 농도 Ns에 관하여 정리하면 다음과 같이 얻을 수 있다. 실험에서는 동위원소비 R_m을 측정하여 시료의 농도를 구한다.

$$N_s = N_{sp} \frac{R_m A_{sp}^b - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (2)$$

2.2. 후 컬럼 동위원소 희석법(post column isotope dilution analysis)의 농도 계산식

후 컬럼 동위원소 희석법에 적용하기 위하여 위의 표현식을 바꾸어야 한다. 크로마토 그라피의 용리액에 포함되어 있는 용질(시료)의 흐름속도 ($mol \cdot min^{-1}$)는 시료용액의 농도 N_s($mol \cdot g^{-1}$용액)와 흐름속도 f_s ($mL \cdot min^{-1}$) 및 밀도 d_s($g \cdot mL^{-1}$)에 의해 결정되며 스파이크의 흐름량은 스파이크용액의 무게농도 N_{sp} ($mol \cdot g^{-1}$)와 흐름속도 f_{sp} ($mL \cdot min^{-1}$) 및 밀도 ($g \cdot mL^{-1}$)로 결정된다. 동위원소 a와 b의 전체흐름량은 각 각 ($N_s^a d_s f_s + N_{sp}^a d_{sp} f_{sp}$) 와 ($N_s^a d_s f_s + N_{sp}^a d_{sp} f_{sp}$) 같이 주어진

다. 그러므로 a와 b의 비 R_m은 다음과 같다.

$$R_m = \frac{N_s^a d_s f_s + N_{sp}^a d_{sp} f_{sp}}{N_s^b d_s f_s + N_{sp}^b d_{sp} f_{sp}} \quad (3)$$

이 식을 시료의 농도 N_s에 관하여 다시 정리하면 다음의 식을 얻는다.

$$N_s d_s f_s = N_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{R_m A_{sp}^b - A_{sp}^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (4)$$

이 식은 on-line으로 동위원소를 주입할 때의 사용할 수 있는 식이며 이 식을 시료에서의 b/a의 동위원소비 $R_S=(A_S^b)/(A_S^a)$와 스파이크에서의 동위원소비 $Rs_p=(A_{SP}^a)/(A_{SP}^b)$를 이용하여 변형하면 다음과 같다.

$$N_s d_s f_s = N_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a}\left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s}\right) \quad (5)$$

위 식에서 농도를 원소의 원자량을 사용하여 $N_s d_s f_s$를 $c_s d_s f_s$로 바꾸면 다음 식으로 변형이 가능하며 시료에 대한 최종 질량흐름속도식이 된다. c_S와 c_{Sp} 그리고 M_S와 M_{Sp}는 각 각 시료와 스파이크의 원소의 무게농도(ng g^{-1}용액) 및 원자량에 해당하며 $c_s d_s f_s$의 단위는 질량흐름단위인 ng·min^{-1}로 나타난다.

$$c_s d_s f_s = m f_s = c_s d_{sp} f_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a}\left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s}\right) \quad (6)$$

2.3. 불확도(uncertainty)[11]

불확도는 측정결과에 관련하여 측정량을 합리적으로 추정한 값의 분산 특성을 나타내는 파라미터로 측정량의 값에 대한 신뢰성 있는 추정값이 되며 합성표준불확도는 측정결과의 가능한 오차에 대한 신뢰성 있는 척도가 된다. 분석 방법을 인정을 받기 위해 측정불확도를 평가하는 절차를 보유하고 적용해야한다.[12]

2.3.1. 불확도 평가 구분

반복 측정된 값으로부터 계산되는 요인은 A형 불확도 평가를 사용하여 표준불확도를 구하였고 기존의 측정 데이터, 교정성적서 및 기타 인증서에 주어진 데이터를 사용하는 경우에는 B형 불확도 평가를 사용하여 표준불확도를 구하였다.

2.3.2. 감응계수(sensitivity coefficient)

각 측정량의 불확도 인자가 전체 결과값에 미치는 영향을 표현한 것으로 (식 7)와 같이 구한다.

$$c_i \equiv \frac{\partial f}{\partial x_i} \approx \frac{\Delta y}{\Delta x_i} \quad (7)$$

2.3.3. 합성 표준불확도(combined standard uncertainty, $u_c(y)$)

측정결과가 여러 개의 다른 입력량으로 부터 구해질 때의 표준불확도를 합성 불확도라고하며, 불확도 전파의 법칙인 (식 8)을 이용하여 구하였다.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)^2 u(x_i)^2} \quad (8)$$

2.3.4. 확장 불확도 (expanded uncertainty, U)

확장 불확도를 구하기 위해 Welch-Satterthwaite (식 9)을 이용해 유효자유도를 구하고 이를 이용하여 신뢰수준 95.5%의 포함인자 *k*값을 산출된 합성 표준불확도에 곱하여 (식 10)과 같이 구한다.

$$V_{eff} = \frac{u_c(y)^4}{\sum_{i=1}^{n}\frac{c_i \cdot u(x_i)^4}{v_i}} \quad (9)$$

$$U = k \cdot u_c(y) \quad (10)$$

2.3.5. 검정곡선의 불확도

셀레늄 표준용액을 이용하여 검정곡선을 작성하였으며, 선형 회귀식은 (식 11)을 이용하였으며 이때의 상대불확도는 (식 12)을 이용하여 계산하였다.

$$A_j = C_i \times m + b \quad (11)$$

$$u(C_o) = \frac{S}{m}\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (12)$$

A_j = j^{th} measurement of the CPS of the calibration
C_i = Concentration of the i^{th} calibration curve
m = Slope of the calibration curve
b = Intercept of the calibration curve
S = Standard deviation
p = Number of measurements to determine
n = Number of measurements for th calibration C_o
Co= Concentration of sample
$\bar{C}$ = Mean value of the different calibration standards
i = Index for the number of calibration standards
j = Index for the number of measurements to obtain the calibration standards

2.4. PCID에서 농도구하기

PCID법으로 셀레늄 동위원소를 구하는 연구는 본 실험실에서 수 차 발표[13-15]되었으므로 자세한 실험과정은 생략한다. 다만 여기에서는 불확도 구하기에 관련된 부분만 개략적으로 언급하고자 한다. 정확한 $^{78}Se/^{80}Se$의 비를 얻기 위하여서는 각 동위원소에 대한 정확한 신호의 세기를 얻어야 한다. ^{78}Se에 대하여서는 ^{77}Se이 충돌기체인 수소와 반응하여 일부가 수소화물인 $^{78}SeH^+$를 만들어 동중간섭을 가지므로 이에 대한 보정을 하여야 한다. 또한 시료에 많이 존재하는 ^{79}Br 충돌기체인 수소와의 반응으로 BrH^+를 만들어 *m/z* 80에서 동중간섭을 가지게 된다. BrH^+에 대한 보정인자를 구하여 *m/z* 80에서 셀레늄에 대한 정확한 신호의 세기를 결정한다. 또한 자연존재비를 사용하여 mass bias에 대하여 보정하고 검출기에 대한 dead time보정을 하였다.

첨가하는 동위원소 ^{78}Se 스파이크 용액의 농도는 표준용액으로부터 검정곡선법을 사용하여 결정하고 동위원소비는 직접 측정하여 사용하였다. 연속적으로 주입되는 스파이크 동위원소용액의 흐름량은 농도와 흐름속도의 곱으로 계산되었다. 이 때 흐름량은 주어진 시간동안의 평균흐름량을 미리 측정하거나 아니면 좀 더 정확한 방법으로 저울위에서 흘러 들어가는 스파이크량을 실시간으로 측정하고 계산에 사용되었다. 시료와 스파이크의 흐름량 및 동위원소의 비율을 이용하여 시간에 따른 신호세기의 변화를 시간에 따른 질량의 변화로 변환시킨 크로마토그램을 얻는다. 각 봉우리에 대하여 면적을 합하면(또는 시간에 따라 적분하면) 주어진 화학종에 대한 총량을 구할 수 있고 화학종별 농도를 구할 수 있었다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 PCID에서의 불확도 연구 중 가장 중요하다고 여겨지는 동위원소 용액 및 동위원소비의 측정에 관련된 불확도를 중심으로 연구하였고 또한 불확도의 결정에 용이한 요인들을 우선 선택하였다. 나머지 조건들, 기기의 최적조전이나 충돌기체의 최적조건 및 HPLC에 관련된 시료흐름이나 시료주입량에 의한 불확도는 작다고 가정하여 무시하거나 매우 길고도 복잡한 과정을 거쳐서 계산하여야 하므로 본 연구에서는 취급하지 않았다. 물론 이 가정은 틀릴 수 있으나 본 연구에서는 다만 실험에서 통제가 쉽고 동시에 매우 중요한 요인인 스파이크 동위원소 용액에 대한 불확도를 집중적으로 연구하여 다른 여러 요인들과 비교함으로서 후 컬럼 동위원소 희석법에서의 불확도를 어느 정도 알아보고자 하였다. 시료의 전처리에 대한 부분이나 HPLC에 관련된 불확도는 매우

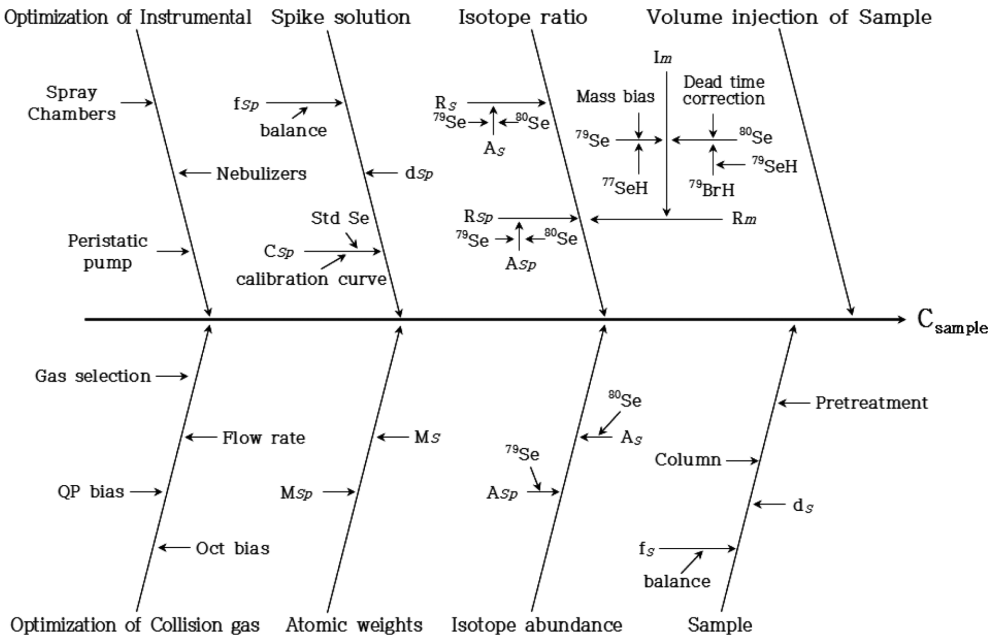

Fig. 1. Fish bone diagram of uncertainty sources in post column ID.

크다고 생각이 되며 이 부분에 대한 자세한 연구와 계산은 좀 더 본격적인 연구를 통하여 이루어져야 한다고 생각이 된다.

3.1. PCID의 불확도 모델

전체적인 불확도 요인 및 인자들에 대한 항목들을 *Fig.* 1의 fish bone 그림에 도식적으로 나타내었다. 그림에서 나타내었듯이 불확도에 기여하는 요인으로는 8 개의 큰 요소로 나누어 볼 수 있다. 이 들은 기기의 최적조건, 충돌기체의 최적조건, 표준 스파이크 량의 불확도, 원자량에 대한 불확도, 동위원소 존재량의 불확도, ICP/MS에서의 정확한 동위원소비의 결정에서의 불확도, 주입하는 시료의 량, 그리고 시료전처리와 HPLC 에서 주입량에 대한 불확도들이다.

ICP/MS를 작동할 때에 사용되는 연동펌프, 분무실, 분무기는 최적의 기기조건에서 작동하였다. 충돌 기체의 최적 조건은 충돌기체의 종류, 흐름속도 QP bias, Oct bias를 통해 신호 대 바탕비가 최대가 되는 조건을 찾아 신호에서 오는 통계적 오차를 줄였다. 이 값들은 최적 상태에서는 변동이 매우 작아 농도결정에 관련된 불확도의 값이 작을 것으로 가정하였다. 특히 동위원소비를 사용하므로 플라즈마의 조건이 조금 변하더라도 서로 상쇄되므로 이러한 가정은 타당한 것으로 생각된다.

시료와 동위원소 용액에 대한 셀레늄의 원자량과 동위원소의 존재비는 주어진 값으로 사용하였고 불확도를 계산하였다. 시료의 불확도는 주입하는 양, 흐름속도, 추출률, 컬럼에서의 손실 등에 영향을 받는다. 주입량과 흐름속도는 HPLC에 의해 주어진 값을 사용하였다. 추출율과 컬럼에서의 시료의 손실 항목은 사실 매우 불확도가 클 수 있는 부분이며 PCID가 가진 가장 큰 단점이기도 하다. 하지만 이 항목들은 우연오차로서 이 들에 대한 정확한 불확도 계산은 매우 어려우며 시간이 많이 걸릴 것이므로 본 연구에서는 제외하였고 차후의 본격적인 연구에서 시도되어야 할 것으로 판단하였다.

시료와 동위원소 용액에서 동위원소비는 주어진 동위원소 존재비를 통해서 계산되며, HPLC-ICP/MS PCID로 측정된 신호로 구한 동위원소비는 후 컬럼 동위원소 이론적 배경에서와 같이 신호를 보정하여 사용하게 된다. 가장 중요한 불확도 요인으로서는 첨가되는 동위원소량이 있다. 이것은 동위원소 용액의 농도와 흐름속도로 결정이 되는데 스파이크하는 동위원소의 농도는 표준용액을 사용하여 결정하였다. Schiel[16]의 실험에 따르면 연동펌프의 흔들림에서 오는 오차가 가장 크며 중요하다고 보고하였다. 본 연구에서는 연동펌프를 통하여 주입되는 량은 저울에서 직접 실시간으로 측정하여 사용함으로 불확도를 감소시켰다.

3.2.1. 감응계수

위에서 언급한 불확도 인자에 대한 감응계수는 시료의 질량 흐름속도식을 편미분함으로써 구할 수 있었다. 식 (13)-(17)은 각 각 스파이크 용액의 흐름속도 mf_{sp}와 농도 C_{sp} 및 원자량 M_{sp}와 시료의 원자량 M_s, 그리고 스파이크가 첨가된 시료에 대하여 측정된 동위원소비 R_m에 대한 감응계수를 나타내었다.

$$C_1(mf_{sp}) = \frac{\partial mf_s}{\partial mf_{sp}} = c_{sp} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (13)$$

$$C_2(c_{sp}) = \frac{\partial mf_s}{\partial c_{sp}} mf_{sp} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (14)$$

$$C_3(M_s) = \frac{\partial mf_s}{\partial M_s} = c_{sp} \cdot mf_{sp} \cdot \frac{1}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (15)$$

$$C_4(M_{sp}) = \frac{\partial mf_s}{\partial M_{sp}} = c_{sp} \cdot mf_{sp} \cdot \frac{M_s}{-M_{sp}^2} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad (16)$$

$$C_5(R_m) = \frac{\partial mf_s}{\partial R_m} = c_{sp} \cdot d_{sp} \cdot mf_{sp} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{(1 - R_m R_s)^2} \right) \quad (17)$$

3.2.2. 셀레늄 동위원소 용액 농도의 검정곡선 불확도

스파이크 동위원소 용액의 농도를 결정하기 위하여서는 먼저 셀레늄 표준용액을 사용하여 역동위원소 희석법으로 결정하여야 한다. 따라서 측정 결과값의 불확도의 요인 중에 검정곡선의 비직선성이 포함된다.

검정곡선의 불확도 측정을 위해 4 개 셀레늄 표준용액(100.0, 50.00, 25.00, 10.00 ng·g^{-1})을 제조하여 측정하였으며, ^{78}Se에서 직선성은 R^2=0.9999로 높은 상관성을 나타내었다. 검정곡선은 선형 회귀분석을 통해 산출하였으며, 검정곡선의 불확도($u(\Delta_{col}C_{sp})$)는 (식 13)~(식 17)의 식을 사용하여 계산하고, Se 용액의의 ^{78}Se의 존재 비를 고려하여 불확도를 구하였다. 검정곡선의 표준불확도는($u(\Delta_{cal}C_{sp})$)는 0.068 ng·g^{-1}이며,

상대 표준불확도($u(\Delta_{cal}C_{sp})/\Delta_{cal}C_{sp}$)는 0.018 ng·g^{-1}이고, 이때 자유도는 측정횟수가 20 회 이므로 2를 빼면 18 이다.

3.2.3. 셀레늄 동위원소 용액의 질량 흐름속도의 불확도

저울을 이용하여 셀레늄 동위원소 용액의 질량 흐름속도를 135회 반복 분석한 결과 평균값(mf_{sp}) 및 표준 편차는 각각 0.48±0.01 g·min^{-1}이며 A type의 표준오차로 산출된 표준불확도($u(mf_{sp})$는 8.6×10^{-4} g·min^{-1}이며 상대 표준불확도($u(mf_{sp})/mf_{sp}$)는 1.8×10^{-3} ($8.6\times10^{-4}/0.48$)이고 자유도는 측정횟수가 135이므로 134이다.

3.2.4. 시료와 셀레늄 동위원소 용액의 셀레늄 원자량의 불확도

셀레늄 원자량에 대한 불확도는 양성자와 중성자 전자의 질량과 셀레늄 동위원소를 계산하고 시료와 셀레늄 동위원소 용액의 셀레늄 존재비에 따라 계산하면 시료에서 5.53×10^{-6} g·mol^{-1}이 된다. 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$ 으로 나누면 표준불확도($u(M_s)$)는 3.20×10^{-6} g·mol^{-1}이며, 상대 표준불확도($u(M)_s/M_s$)는 4.01×10^{-8}이다. 셀레늄 동위원소 용액에서 셀레늄 원자량에 대한 불확도는 9.30×10^{-6} g·mol^{-1}이므로 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$ 으로 나누면 표준불확도 ($u(M_{sp})$)는 5.37×10^{-6} g·mol^{-1}이며 상대 표준불확도($u(M_{sp})/M_{sp}$)는 6.83×10^{-8} 이다.

3.2.5. 측정된 동위원소비 R_m에 대한 불확도

스파이크가 첨가된 시료에 대하여 측정된 동위원소비 Rm에 대한 농도의 불확도는 먼저 이론적으로 구해 볼 수 있다. *Fig.* 2에서 나타난 것처럼 농도의 상대오차는 Rm에 따라 달라질 수 있다. 여기에서 error magnification factor는 Rm의 상대불확도에 따른 농도의 상대 불확도($(dC/C)/(dR_m/R_m)$)이다. 질량흐름속도를 135회 측정하였고 각 변수에 대한 값을 계산하면

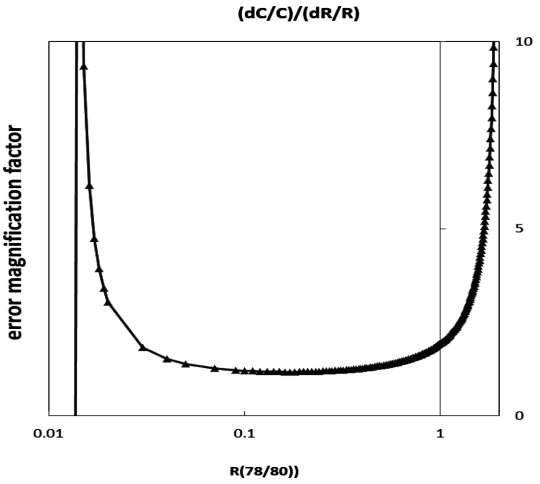

Fig. 2. Concentration uncertainties with the isotope ratio of $^{78}Se/^{80}Se$.

0.045가 된다.

3.2.6. 합성 표준불확도 및 확장 불확도

각 요인들에 대한 불확도와 감응계수 및 자유도 값들을 계산하여 다음의 *Table* 1에 요약하여 정리하였다. 표에서 나타난 감응계수의 값이 구간인 것은 HPLC-ICP/MS피크의 구간으로서 구간에 따라 값이 달라지기 때문이다.

합성표준불확도는 다음과 같이 나타낼 수 있으며 각 요인에 대한 표준불확도와 감응계수를 이용하여 구하였다.

$$u^2(mf_s) = C_1^2u^2(mf_{sp}) + C_2^2u^2(c_{sp}) + C_3^2u^2(M_s) + C_4^2u^2(M_{sp}) + C_5^2u^2(R_m)$$

그 결과 값을 구해보면 합성 표준불확도는 0.0065~9.10 이 되었다. 확장 불확도 산출을 위해 유효 자유도를 계산하면 3.4×10^{-4}~1.6×10^{7}이 되며 이 값으로 부터 신뢰수준 95.45%에 해당하는 각각의 포함인자

Table 1. Parameters used for the calculation of uncertainty in PCID

Parameter (X_i)	mf_{sp}	c_{sp}	M_s	M_{sp}	R_m
Type of uncertainty	A	A	B	B	A
Probability distribution	-	-	Rectangle	Rectangle	-
Coverage factor	-	-	$\sqrt{3}$	$\sqrt{3}$	-
Standard uncertainty $u(X_i)$	8.6×10^{-4}	0.068	3.20×10^{-6}	9.30×10^{-6}	0.045
Sensitivity coefficient Ci	0.211~764	0.026 ~95.5	0.0013 ~4.63	0 ~ 0.0013	0.115~57
Degree of freedom	134	18			134

2~14의 값을 합성 표준불확도에 곱하면 시료의 질량 흐름속도의 확장 불확도는 0.035~18.1 ng·min^{-1}이 되었다. 피이크의 초반부와 후반기에서는 비록 불확도는 크지만 감응계수가 작기 때문에 합성표준불확도는 작게 나타난다. 시료 농도는 시료의 질량 흐름속도를 시간에 대하여 적분하여 구하므로 불확도도 형식에 맞게 구하면 된다. SeMet의 농도는 127.09 ng·g^{-1} 일 때에 1.46 ng·g^{-1}으로 상대불확도는 1.20%가 되었다. 물론, 이 값은 계산하여 얻은 값으로 실제의 전체 확장 불확도의 일부값이다. 주어진 시료에 대하여 여러 번 실험을 반복하여 얻은 실험값에 대하여 얻은 확장 불확도는 상대표준편차가 1.65% 수준이었다. 즉, 아직 고려하지 않았던 다른 변수들인 시료의 흐름량과 시료 주입량에 대한 불확도 그리고 플라즈마의 불확도 등이 포함되어야 할 것이다.

만일 시료의 추출률에 대한 불확도 값을 포함시킨다면 그 값은 더욱 더 커질 것이나 여기에서는 주어진 시료에 대한 것으로 한정하여 포함시키지 않았으며 HPLC 컬럼 내에서의 손실이 있거나 시료의 흐름량에 대한 상대불확도 역시 고려하지 않았다.

3.3. 불확도 인자의 상대기여도

위에서 언급한 각 요인들이 질량흐름속도의 전체 불확도에 미치는 영향을 계산하여 *Fig.* 3에 나타내었다. 본 연구에서 조사한 여러 인자들의 상대 불확도가 시료의 질량 흐름속도에 미치는 영향을 보면 셀레늄 동위원소 용액의 농도(55%) > 스파이크가 첨가된 시료용액에서의 측정된 동위원소비(45%) > 셀레늄 동위원소 용액의 질량 흐름속도(1.25%) > 셀레늄 동위원소 용액의 셀레늄 원자량(0.0135%) > 시료의 셀레늄 원자량(0.0046%)의 순서로 나타났다. 따라서 가장 크게 영향을 미치는 요인은 셀레늄 동위원소 용액의 농도이므로 PCID에서 불확도를 개선하는 가장 중요한 요인은 셀레늄 동위원소 용액 제조의 정확성이라고 할 수 있다.

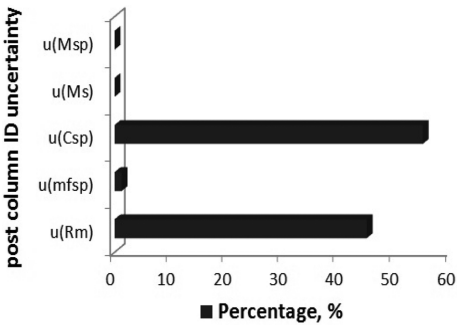

Fig. 3. Uncertainty contribution of the factors for the concentration.

4. 결 론

본 연구에서는 우선 고려하기 쉬운 요인들에 관련된 불확도를 중심으로 하여 질량 흐름식에서 농도에 대한 합성 불확도를 간단히 계산하였고 의미 있는 결과를 얻었다. 불확도 인자로서는 셀레늄 동위원소 용액의 농도, 셀레늄 동위원소 용액의 질량 흐름 속도, 셀레늄 동위원소 용액의 셀레늄 원자량, 시료의 셀레늄 원자량, 및 측정동위원소비를 사용하였다. 각 요인에 대하여 수학적 계산 및 통계적 처리를 통해 각 불확도 인자들이 전체 불확도에 미치는 영향을 산출하였는데 그 결과 셀레늄 동위원소 용액의 농도와 측정동위원소비가 가장 큰 요인으로 나타났으며 나머지들은 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 차후에는 시료의 순도의 불확도와 시료 제조 과정에서의 무게 측정의 불확도, 전처리 과정의 불확도까지 고려하여 전체적인 PCID의 측정 불확도의 연구가 심도 있게 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 일반연구(2010-0010880)의 도움으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. C. Swart, O. Rienitz and D. Schiel, *Talanta*, **83**, 1544-1551 (2011).
2. P. Rodriguez-Gonzalez, J. M. Marchante-Gayon, J. I. Garcia-Alonso and A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta B,* **60**, 151-207 (2005).
3. L. Rottmann and K. G. Heumann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 221-228 (1994).
4. L. Hinojosa Reyes, J. M. Marchante Gayon, J. I. Garcia Alonse and A. Sanz Medel., *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 11-21 (2003).
5. M. F. Gine and A. P. Packer, *J. Braz. Chem. Soc.*, **21**(4), 575-589 (2010).
6. P. C. Uden, *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 422-434 (2002).
7. M. E. Del Castillo-Busto, M. Montes-Bayon and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, **78**, 8218-8225 (2006).

8. L. Rottmann and K. G. Heumann, *Fresenius J. Anal. Chem*., **350**, 221-235 (1994).
9. J. C. Woo, *Anal. Sci. Technol.,* **13**(4), 1-13 (2000).
10. J. C. Woo, S. H, Oh, B. M. Kim, H. K. Bae, K. S. Kim and Y. D. Kim, *Anal. Sci. Technol.,* **18**(6), 475-482 (2005).
11. Korea Laboratory Accreditation Scheme (KOLAS), 'Evaluation of measurement data Guide to the expression of uncertainty in measurement', Republic of Korea, 2012.
12. ISO/IEC, 'General requirements for the competence of testing and calibration laboratories', 17025 second edition, 2005.
13. H. Y. Jang, H. Min, J. Lee and Y. N. Pak, *Anal. Sci. Technol*., **26**(3), 182-189 (2013).
14. J. Jeong, J. Lee, and Y. N. Pak, *Bull. Korean Chem. Soc*., **34**(12), 3817-3824 (2013).
15. E. Kim, M. Joo, H. Kwon and Y. Pak, *Anal. Sci. Technol.,* **26**(5), 307-314 (2013).
16. C. Swart, O. Rienitz and D. Schiel, *Anal. and Bioanal. Chem*., **401**(6), 2025-2031 (2011).