

FI-HG-AAS를 이용한 전처리 과정에서 사용되는 예비환원제의 종류에 따른 요중 비소 분석결과 비교

최승현* · 최재욱*[†] · 조용민* · 배문주**

*고려대학교 환경의학연구소

**연세대학교 보건대학원

Comparisons of Urinary Arsenic Analysis by Pre-reductant for Preconditioning via the FI-HG-AAS Method

Seung-Hyun Choi*, Jae Wook Choi*[†], YongMin Cho*, and Munjoo Bae**

*Institute for Occupational & Environmental Health, Korea University, Seoul, Republic of Korea

**Graduate School of Public Health, Yonsei University, Seoul, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives: The method of analyzing urinary arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS) is generally used because it shows relatively greater sensitivity, low detection limits, low blocking action, and is simple to operate. In this study, the results of analysis according to three pre-reductants commonly used in the FI-HG-AAS method were compared with each other.

Methods: To analyze urinary arsenic, nineteen urine samples were collected from adults aged 43-79 years old without occupational arsenic exposure. Analysis equipment was FI-HG-AAS (AAAnalyst 800/FIAS 400, Perkin-Elmer Inc., USA). The three pre-reductants were potassium iodide (KI/AA), C₃H₇NO₂S (L-cysteine), and a mixture of KI/AA and L-cysteine (KI/AA&L-cysteine).

Results: In the results of the analysis, the recovery rate of the method using KI/AA was 82.3%, 95.7% for L-cysteine, and 123.5% for KI/AA and L-cysteine combined. When compared with the results by use of high performance liquid chromatography inductively-coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS), the method using L-cysteine was the closest to those using HPLC-ICP-MS (98.57 µg/L for HPLC-ICP-MS; 74.96 µg/L for L-cysteine; 69.23 µg/L for KI/AA and L-cysteine; 13.06 µg/L for KI/AA) and were significantly correlated (R²=0.882). In addition, they showed the lowest coefficient of variation in the results between two laboratories that applied the same method.

Conclusion: The efficiency of hydride generation is considered highly important to the analysis of urinary arsenic via FI-HG-AAS. This study suggests that using L-cysteine as a pre-reductant may be suitable and the most rational among the FI-Hg-AAS methods using pre-reductants.

Keywords: Hydride Generation atomic absorption spectrometry, KI/ascorbic acid, L-cysteine, Pre-reductant, Urinary arsenic

[†]Corresponding author: Institute for Occupational & Environmental Health, Korea University, 73, Incheon-ro, Seongbuk-gu, Seoul, 136-705, Republic of Korea, E-mail: shine@korea.ac.kr, Tel: +82-2-2286-1407, Fax: +82-2-927-7220
Received: 6 July 2015, Revised: 7 October 2015, Accepted: 13 October 2015

I. 서 론

환경 중 비소는 발암성을 가지는 독성물질이다.¹⁾ 대부분의 포유류는 무기비소를 3가로 환원시켜 대사하고 이어 산화 메틸화작용에 의해 5가 비소가 된다. 무기비소와 메틸화된 대사산물은 주로 4-5일 이내에 소변으로 배설되며 상대적으로 낮은 생물축적률을 가진다. 무기와 유기 3가 비소 화합물은 5가의 형태보다 더욱 잠재적인 독성을 가지는 것으로 알려져 있다. 만성적인 무기비소 노출은 피부 병변, 폐와 피부암, 신장 손상, 중추신경계 손상과 당뇨의 위험을 증가시키는 것으로 보고된다.¹⁻³⁾

비소의 노출에 대한 생물학적 지표로는 혈액, 요, 모발, 손발톱 등이 사용된다. 이들 중 혈액 내 비소는 몇 시간 이내에 혈액으로부터 배출되기 때문에 아주 최근의 노출만을 반영한다.^{4,5)} 모발과 손발톱의 경우 외부오염에 의한 영향을 받을 수 있으며, 비교적 손쉽고 정확한 방법으로서 요를 통한 비소 농도 분석방법이 일반적으로 사용되고 있다.⁶⁻⁸⁾

요중 비소를 분석하는 방법은 다양하며, 그 중 Graphite Furnace / Correction Zeeman 분석법은 추출 등의 처리가 복잡하고 분석기간이 다소 길다. Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) 방법은 고가의 장비가 사용되며 검출한계가 낮다는 장점을 가지지만 유지 및 분석 비용이 많이 들고 다중원소 방해 등의 제한을 가진다.⁹⁾ 반면, Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (FI-HG-AAS) 방법은 감도가 비교적 좋고 검출한계가 낮은 편이며, 방해작용이 적고 분석이 간단하다는 장점을 가지고 있다. 또한 다루기 편리하고 분석결과 출력력이 빠른 등의 장점을 가져 일반적으로 많이 이용되는 분석방법이다.

초기의 HG-AAS 방법은 예비환원제를 사용하지 않고 강염산을 사용하여 산도를 조절하였으나,¹⁰⁾ 분석시간 단축을 위하여 많은 실험실에서 자동화된 흐름주입 시스템(flow injection system)을 사용하게 되었고 이는 전통적인 방식에 비하여 외부 오염과 분석물질의 손실 및 방해이온이 적다. 하지만 이러한 자동화 시스템에서는 분석결과가 과소평가될 수 있으며 이를 극복하기 위하여 적절한 예비환원제의 적용과 보다 엄격한 정도관리가 필요하다.¹¹⁾

FI-HG-AAS 방법에서 적용되는 수소화물 생성법

(hydride generation)은 수소화물 형성에 영향을 미치는 방해요인, 예를 들어 분석용액 중의 분석원소의 산화상태와 공존하는 금속이온의 종류, 산의 종류 및 농도에 영향을 받는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 특히 비소 분석에서 수소화물 생성은 원소의 산화상태에 의존하며 5가 비소는 3가 비소 양이온보다 낮은 감도를 나타낸다. 이는 높은 산화상태에서는 환원제인 NaBH_4 에 의한 환원 및 수소화물 생성 속도가 느리기 때문인 것으로 보고되고 있다. 따라서 비소 분석 전, 예비환원제를 첨가하여 산화상태를 3가로 조절하는 과정이 필요하다. 금속이온의 방해요인을 제거하고 수소화율을 향상시키기 위하여 시료 용액 중의 방해 물질을 차단하고 5가 비소를 3가 비소로 환원시키는 예비환원제로서 $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ (L-cysteine), thiourea, potassium iodide(KI-AA) 등이 사용된다. L-cysteine은 수소화물 생성 반응 매체로서 다른 환원제에 비하여 빠르고 효율적인 환원력과 분석물질 용액의 저장 시 안정적인 장점을 가지며, 방해물질의 방해작용 감소, 적합한 감도, 수소화율 향상 등의 장점을 가지고 있다.¹²⁾ 반면 자동화 시스템에서 환원제로 KI를 사용하는 경우 요중 비소의 결과가 보다 낮게 평가될 수 있는데, 이는 흐름 주입 시스템에서 더 짧은 반응 시간으로 인하여 원자화 장치로의 직접적인 수소화물 전이가 이루어지기 때문인 것으로 보고된다.¹³⁾

우리나라에서는 예비환원제로서 과소평가의 우려를 가지는 KI-AA를 주로 사용한 FI-HG-AAS 분석법을 이용하여 폐금속광산, 산업단지 주변지역 주민 건강영향조사 등의 국가 연구용역 사업의 요중 비소 분석을 수행하였다. 이들 사업에서 주민들의 요중 비소 농도는 $2.0 \mu\text{g/g creatinine}$ 에서 최대 $15.28 \mu\text{g/g creatinine}$ 로 보고되어 사업마다, 혹은 분석기관마다 보고된 요중 비소 농도의 편차가 크게 나타나고 있다.¹⁴⁾ 또한 국민환경보건기초조사 사업 등 대규모 국가연구사업에서 우리나라 국민들의 요중 비소 농도 기하평균은 $41.1 \mu\text{g/g creatinine}$,¹⁵⁾ $114.5 \mu\text{g/g creatinine}$ ¹⁶⁾ 등의 값이 보고된 바 있다. 이상의 국가 연구 사업 결과들에서, 요중 비소의 농도는 예비환원제의 종류, 각 분석기관 사용기기의 분석조건에 따라 상당히 넓은 범위의 상이한 결과를 나타내었으며 결과적으로 이들 결과를 비교, 평가하기 어렵다는 문제점을 제기할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 주로 사용되는 예비환원제에 의한 FI-HG-AAS법과 HPLC-ICP-MS 방법과의 비교 분석을 통하여 각 예비환원제에 따른 분석방법의 타당성을 검증, 각 예비환원제의 신뢰성을 평가하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 요 시료채취

요중 비소 분석을 위하여 43-79세 분포의 직업력이 없는 성인에게서 채취된 소변 시료를 사용하였다. 소변은 중금속 제거 세척을 실시한 소변 전용 용기(specimen cup, pp)에 일시뇨(spot urine)를 받아 드라이아이스로 채워진 아이스 박스로 이송하였으며, 오염되지 않도록 주의하여 분석 전까지 냉동 보관하였다.

2. 요중 비소 분석 및 실험조건

분석 기기는 FI-HG-AAS(AAnalyst 800/FIAS 400, Perkin-Elmer Inc., USA)를 사용하였다. 분석에 필요한 예비환원제인 5% KI-5% ascorbic acid 용액으로 5 g KI(potassium iodide 99%, Sigma, USA)와 5 g ascorbic acid(99%, Sigma, USA)를 탈이온수 100 mL에 용해시켰다. 10% L-cysteine / 0.03 M HCl 용액은 10 g L-cysteine(Merck, Germany)을 0.03 M HCl(반도체용, 동우화인켐㈜, 한국) 100 mL에 녹여 제조하였다. 6 g의 NaBH₄(99%, Sigma, USA)와 0.5 g NaOH(98%, Sigma, USA)를 1 L 탈이온수에 용해시키고 1 mL silicon deforming agent(Perkin-Elmer)를 첨가한 후 표선을 맞추어 0.5% NaBH₄ in 0.05% NaOH를 만든다. HCl carrier 용액인 0.03 M HCl 용액은 2.5 mL c-HCl(36%)를 탈이온수 1 L로 용해하였다.

3가 비소 표준원액(1,000 µg/L, Aldrich, USA)을 단계적으로 희석하여 100 µg/L로 제조하고 이것을 묽혀 일련의 농도로 매회 사용하며 교정표준(calibration standard) 용액은 2.0-32.0 µg/L 농도로 조제하였다. 회수율을 검정하기 위한 표준시료를 조제하기 위하여 직업적 노출이 없는 정상인 소변을 1일 간 냉장보관하고 다시 냉동시킨 후 해동하여 여과하였다. As(III)(Arsenic trioxide, Fluka, USA), As(V)(Sodium arsenate dibasic Heptahydrate, Sigma-

Aldrich, USA), DMA(Sodium cacodylate trihydrate, Sigma, USA)와 MMA(Disodium methyl arsonate hexahydrate, CHEM SERVICE, USA)의 표준물질을 사용하여 여과한 소변에 알고 있는 4가지 비소 화학종을 첨가하여 조제하였다. 분석의 절차는 CDC(Center for Diseases Control)의 방법(Laboratory procedure manual, Urine arsenic speciation HPLCICPDRCMS, method no. ITU003B)을 준수하였다.

상업용 표준 인증물질(CRM; certified reference material)로 ClinCheck(RECIPE Chemicals, Germany) Urine Control Level I, II와 NIES(The National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan) CRM no. 18 human urine을 사용하였고, 표준 인증물질(SRM; standard reference material)로 SRM 2669 I, II(National Institute of Standard and Technology, NIST, USA)를 사용하였다. ClinCheck Level I, II의 참고 값과 참고범위를 제시하였는데, 이것은 네 가지 비소 화학종이 혼합된 형태로 존재한다. NIES no. 18 CRM은 주로 비소 화학종의 중분리 분석과 총비소 분석에 사용되며 무기비소와 그 대사산물에 대한 정확한 참고 값을 제공하지 않는다. NIST SRM은 여러 비소 화학종이 존재하며 무기비소와 그 대사산물, 즉 4가지 화학종[As(III), As(V), MMA, DMA]의 농도를 합한 i-As sum의 참고 값을 FI-HG-AAS법에 사용하였다.

KI-AA의 경우, 5% KI/5% AA으로 조제하고 운반체 용액(carrier solution)은 10% HCl을 사용하였다. 수소화물 생성 시약은 0.5% NaBH₄/0.05% NaOH의 농도로 조제하였다. 시료 1 mL를 15 mL 코니컬 튜브에 넣고 진한 염산 1 mL와 5% KI/5% AA 1 mL를 첨가한 후, 60분 동안 실온에서 방치하고 10 mL로 표선을 맞추었다. L-cysteine의 경우, 0.03 M의 HCl로 10%를 조제하고 수소화물 생성 시약은 0.5% NaBH₄/0.05% NaOH의 농도로, 운반체 용액은 0.03 M HCl로 분석하였다. 시료를 10배 희석한 후 1 mL를 취하여 코니컬 튜브에 넣고 10% L-cysteine 예비환원제를 첨가한 후 표선을 맞추고 60분 간 방치하였다. KI/AA & L-cysteine의 경우 5% KI/5% AA와 0.4 M HCl로 0.4% L-cysteine을 만들고 운반체 용액은 0.04 M HCl로 수소화물 생성 시약은 0.6% NaBH₄/0.5% NaOH의 농도로 만들었다.

시료는 10배 희석한 후 1 mL를 취하여 코니컬 튜브에 넣고 0.4% L-cysteine(in 0.4 M HCl) 예비환원제 1 mL를 첨가한 후 5% KI/5% ascorbic acid 1 mL를 넣고 50분 방치, 10 mL로 표전을 맞추었다. 이와 같이 각 예비환원제로 전처리 한 시료는 FI-HG-AAS로 분석하였다. HPLC-ICP-MS를 이용한 요중 비소의 화학종 분리 분석은 일본 동경대학교 실험실에서 실시하였다.

국내에서 FI-HG-AAS를 사용하는 A대학 실험실과 본 연구 실험실에서 폐금속광산 주민 시료 중 무작위 추출한 19개의 시료를 각각 분석하여 비교하였다. 두 대학 실험실에서 적용한 방법은 동일하다.

3. 통계분석

본 연구에서는 동일한 대상자에게서 같은 시기에 채취한 소변 시료를 네 가지 방법으로 분석하였다. 네 방법에 따른 요중 비소 농도 분석을 위하여 Mann-Whitney test를 수행하여 각 방법 간 분석결과의 농도 값 차이를 검증하였다. 또한 실험실 간 분석결과 간의 상호관련성을 검증하기 위하여 상관분석을 실시하였다. 95% 신뢰수준 하에서 통계적 유의성을 검증하였으며(p-value<0.05), 통계분석에는 SPSS statistical software(Ver. 20.0; PASW Statistics, USA)를 사용하였다.

III. 결 과

Table 1은 직업적 노출이 없는 정상인의 소변에 알고 있는 농도의 4가지 비소 화학종 당 2가지 농도 수준 3세트씩 총 24개의 시료를 각 예비환원제로 전처리 후 분석한 결과이다(총 72개시료). 분석 농도에서 소변 자체의 농도를 빼고 보정한 농도를 산출한 결과 KI/AA 예비환원제에서의 회수율은 평균 82.3%를 나타내었다. L-cysteine 예비환원제의 경우 평균 95.7%의 회수율을 보였으며, KI/AA & L-cysteine에서는 평균 123.5%의 회수율을 보였다. 종별로 구분하였을 때, As(III)와 As(V)에서는 KI/AA 예비환원제 방법이 가장 높은 회수율을 보였던 반면 DMA에서는 가장 낮은 회수율을 나타냈다. L-cysteine 예비환원제의 경우 As(III) 94.1%, As(V) 98.2%, DMA와 MMA에서의 회수율이 각각 87.2%와 103.2%였으며, KI/AA & L-cysteine에서는 As(III) 84.1%,

As(V) 68.5%, DMA 129.2%, 그리고 MMA가 212.1%의 회수율을 나타내었다.

산업용 CRM ClinChek I, II는 세 가지 환원제 모두에서 88~104.5%의 좋은 회수율을 나타냈으나 As(III), As(V), DMA, MMA가 혼합된 표준 인증물질(SRM)인 NIST 시료에서는 각기 다른 양상을 나타내었다. 즉 KI/AA 예비환원제에서는 73.2%, 58.6%의 회수율을 보였으며, L-cysteine만 사용한 전처리에서는 92.5%, 100.3%로 가장 근접한 회수율을 나타내었다. 한편 KI / AA & L-cysteine 예비환원제에서는 112.5%, 127.3%로 상대적으로 과대평가되었다(Table 2).

HPLC-ICP-MS 방법을 이용한 요중 비소 분석 결과, 요중 비소의 평균 농도는 98.57 µg/L이었다. KI/AA, L-cysteine, 그리고 KI/AA & L-cysteine 방법에서의 요중 비소 분석결과의 평균 농도가 각각 13.06, 74.97, 69.23 µg/L으로 평가되었으며, 네 가지 방법에 따른 요중 비소 농도를 비교하기 위하여 HPLC-ICP-MS를 이용한 요중 비소 농도 결과를 기준(reference)로 하고 각 전처리 방법에서 도출된 평균값과의 차이를 비교한 결과 KI/AA 방법에 따른 요중 비소 분석결과에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(Table 3). 즉, 같은 시료에 대한 분석 결과 기준값과 평균 농도에서 차이가 있었다.

Table 2는 표준시료에 대한 환원제별 분석결과로 회수율의 차이는 있으나, reference value 대비 크게 벗어나지는 않는다. 반면에 실제 시료를 분석한 Table 3은 환원제에 따라 농도 차이가 매우 크기 나타났다. 이러한 표준시료와 실제시료의 차이는 시료에 존재하는 비소 화학종의 분율에 기인한다. 산업용 표준시료의 경우 단지 3가 비소만으로 제조되고 이것은 Table 2에서 보여지듯이 reference value에서 크게 벗어나지 않는 결과를 나타내는 것이다. 그러나 실제 시료는 4가지 화학종이 다른 분율로 존재하며 특히 과소평가의 원인인 DMA의 경우 약 70%이상 함유되어 있기 때문에 환원제에 따른 농도 차이가 나타나는 것이다.

Fig. 1은 HPLC-ICP-MS를 통하여 얻은 요중 비소 농도와 각 예비환원제를 사용하여 분석한 요중 비소 농도 간 상관관계를 분석한 결과를 보여준다. HPLC-ICP-MS 분석 결과와 L-cysteine 방법을 통한 분석 결과 간의 상관계수는 0.940(R²=0.883; p-value<0.010)

Table 1. Recovery rates of four arsenic species in 297 normal urine($\mu\text{g/L}$)

Species	Target values	KI/AA				L-cysteine				KI/AA & L-cysteine						
		Found value	CV (%)	Normal urine value	Corrected Recovery (%)	Found value	CV (%)	Normal urine value	Corrected Recovery (%)	Found value	CV (%)	Normal urine value	Corrected Recovery (%)			
As(III)	21.5	25.88±1.57	6.1	5.14±0.11	20.74	96.6	38.44±1.42	3.7	16.84±1.09	21.60	100.6	42.86±3.26	7.6	24.55±0.54	18.31	85.2
	53.7	57.09±1.15	2.0	5.14±0.11	51.96	96.8	63.91±0.25	0.4	16.84±1.09	47.07	87.7	69.10±2.65	3.8	24.55±0.54	44.55	83.0
Mean					96.7					94.1						84.1
As(V)	20.8	31.81±4.08	12.8	5.14±0.11	26.67	128.2	36.44±2.47	6.8	16.84±1.09	19.60	94.2	37.95±0.40	1.1	24.55±0.54	13.40	64.4
	52.0	62.24±2.33	3.7	5.14±0.11	57.11	109.8	69.95±0.99	1.4	16.84±1.09	53.11	102.1	62.28±0.28	0.4	24.55±0.54	37.72	72.5
Mean					119.0					98.2						68.5
DMA	21.4	5.94±0.30	5.0	5.14±0.11	0.81	3.8	35.24±0.54	1.5	16.84±1.09	18.40	86.0	53.95±0.14	0.3	24.55±0.54	29.40	137.3
	53.5	11.99±0.43	3.6	5.14±0.11	6.83	12.8	64.19±3.54	5.5	16.84±1.09	47.35	88.5	89.32±2.51	2.8	24.55±0.54	64.76	121.0
Mean					8.3					87.2						129.2
MMA	21.1	27.26±0.93	3.4	5.14±0.11	22.13	105.0	39.92±1.38	3.5	16.84±1.09	23.08	109.5	69.83±0.63	0.9	24.55±0.54	45.30	215.0
	52.7	60.78±0.11	0.2	5.14±0.11	55.65	105.6	67.86±0.93	1.2	16.84±1.09	51.02	96.8	134.72±2.79	2.1	24.55±0.54	110.17	209.0
Mean					105.3					103.2						212.1
Mean					82.3					95.7						123.5

DMA, dimethylarsinic acid; MMA, monomethylarsonic acid; CV, coefficient of variation, N=24개

Table 2. Recovery rates of four arsenic species in reference materials

Reference material	Name	Reference value	Tolerance value	KI/AA			L-cysteine			KI/AA & L-cysteine		
				Conc. ($\mu\text{g/L}$; mean±SD)	CV (%)	Recovery (%)	Conc. ($\mu\text{g/L}$; mean±SD)	CV (%)	Recovery (%)	Conc. ($\mu\text{g/L}$; mean±SD)	CV (%)	Recovery (%)
CRM	ClinCheck 1	43.5	34.8-52.2	45.50±0.48	1.1	104.5	42.1±0.62	1.5	96.7	41.56±0.16	0.4	95.5
	ClinCheck 2	82.1	65.7-98.5	84.47±0.76	0.9	102.9	77.3±1.15	1.5	94.2	72.25±0.56	0.8	88.0
SRM	NIST I	9.22	-	6.75±1.70	-	73.2	8.53±0.19	2.2	92.5	10.4±0.50	4.8	112.5
	NIST II	43.67	-	25.58±0.64	2.5	58.6	43.79±0.78	1.8	100.3	55.6±0.43	0.8	127.3

Conc., concentration; CRM, certified reference material; SRM, standard reference material; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation

Table 3. Comparison results between the method using HPLC-ICP-MS with each method using 3 pre-reductants of FI-HG-AAS

No.	AB (ppb)	As(III) (ppb)	DMA (ppb)	MMA (ppb)	As(V) (ppb)	Total As	i-As sum (HPLC-ICP-MS)	KI/AA(% [*])	L-cysteine(% [*])	KI/AA&L-cysteine(% [*])
1	175.13	2.56	67.37	10.13	7.35	262.54	87.41	7.75(8.87)	42.91(49.09)	48.28(55.23)
2	29.76	5.00	34.19	6.03	7.07	82.05	52.29	5.38(10.29)	25.31(48.40)	26.20(50.11)
3	71.26	2.24	35.25	7.12	9.68	125.55	54.29	3.86(7.11)	22.01(40.54)	23.28(42.88)
4	28.43	2.46	33.17	5.82	7.95	77.83	49.40	4.67(9.45)	27.48(55.63)	28.60(57.89)
5	13.97	0.96	26.93	1.25	3.76	46.87	32.90	3.05(9.27)	17.61(53.53)	17.84(54.22)
6	35.67	0.57	50.40	3.38	2.20	92.22	56.55	4.72(8.35)	31.26(55.28)	30.23(53.46)
7	20.55	0.55	42.19	1.38	1.41	66.08	45.53	2.48(5.45)	12.77(28.05)	14.65(32.18)
8	6.58	1.66	29.13	2.69	5.06	45.12	38.54	3.27(8.48)	13.46(34.92)	11.93(30.95)
9	71.73	3.91	34.24	8.45	11.10	129.43	57.70	6.45(11.18)	28.25(48.96)	33.54(58.13)
10	61.27	1.31	46.56	21.19	6.60	136.93	75.66	6.60(8.72)	42.26(55.86)	22.02(29.10)
11	124.38	6.51	132.86	18.21	39.74	321.70	197.32	24.43(12.38)	157.34(79.74)	159.60(80.88)
12	90.68	8.35	78.63	10.74	3.12	191.52	100.84	19.04(18.88)	80.52(79.85)	82.84(82.15)
13	42.48	8.56	66.83	11.68	5.38	134.93	92.45	16.62(17.98)	79.73(86.24)	80.91(87.52)
14	105.74	6.44	56.75	10.11	3.46	182.50	76.76	14.63(19.06)	80.10(104.35)	84.09(109.55)
15	34.01	7.88	100.27	14.47	27.37	184.00	149.99	22.74(15.16)	130.71(87.15)	149.10(99.41)
16	40.79	4.68	99.67	28.55	56.03	229.72	188.93	17.87(9.46)	136.70(72.35)	127.15(67.30)
17	93.17	4.03	100.13	14.29	12.26	223.88	130.71	18.51(14.16)	136.40(104.35)	123.65(94.60)
18	81.35	2.49	116.51	18.64	16.59	235.58	154.23	33.06(21.44)	163.61(106.08)	161.35(104.62)
19	105.74	6.44	56.75	10.11	3.46	182.50	76.76	23.03(30.00)	89.18(116.18)	63.63(82.89)
20	191.00	2.19	181.02	53.24	16.62	444.07	253.07	23.00(9.09)	181.49(71.72)	95.77(37.84)
Mean							98.57	13.06(12.74)	74.96(68.91)	69.23(65.55)
p-value ^e							Reference	<0.001 ^e	0.134 ^e	0.081 ^e

DMA, dimethylarsinic acid; MMA, monomethylarsonic acid

^{*}rate of As concentration (%) of AAS compare with those of HPLC-ICP-MS(when concentration of HPLC-ICP-MS is 100%)

[†]Results of comparison of differences of mean and distribution with the reference(concentrations of urinary arsenic by HPLC-ICP-MS analysis) by Mann-Whitney test

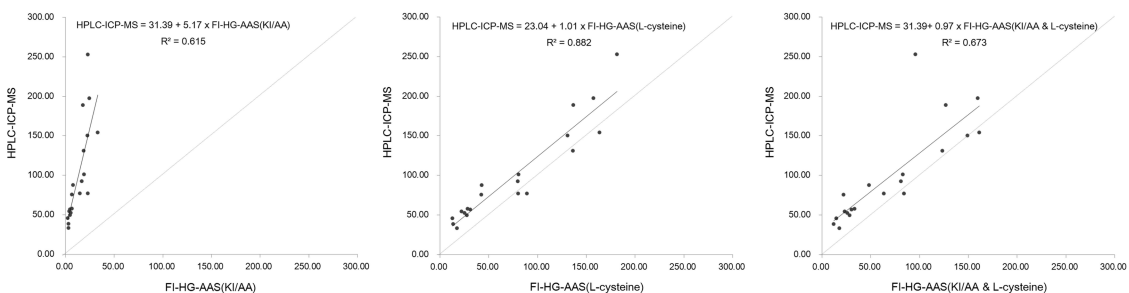


Fig. 1. Correlation between urinary As concentrations(by the methods of HPLC-ICP-MS(y-axis) and FI-HG-AAS(x-axis) Dotted lines in each graph means an ideal correlation of R=1.0

이였으며, KI/AA의 경우 상관계수는 0.784(R²=0.615, p<0.001), KI/AA & L-cysteine에서는 0.821(R²=0.673, p<0.001)으로 L-cysteine 방법을 적용하였을 때

HPLC-ICP-MS 방법에서의 요 중 비소 분석 결과와 L-cysteine 방법에서의 요중 비소 분석 결과가 가장 높은 상관계수를 나타내었다.

Table 4. Comparison of urinary As concentrations of inter-laboratories cross-check in each pre-reducing agent(Mean±SD; µg/L)

N	KI/AA		L-cysteine		KI/AA & L-cysteine	
	Lab-A	Lab-B	Lab-A	Lab-B	Lab-A	Lab-B
19	12.03±8.20	9.77±6.54	49.58±31.93	52.59±35.55	126.92±89.65	66.90±50.39
p-value*	0.452		0.751		0.009	
Average of inter-lab variation	16.82%		11.06%		45.92%	

*Comparison of urinary As concentrations between Lab-A and Lab-B for same samples by Mann-Whitney test

†Average of coefficient variation(%)between Lab-A and Lab-B of each sample

Table 5. Limits of Detection µg/l

Pre-reducing agent	LOD	LOQ	M D L	M L Q
KI / AA & L-cysteine	0.53	1.75	0.56	1.79
L-cysteine	0.45	1.5	0.50	1.60
KI / AA	0.018	0.06	0.023	0.077

LOD = 3xSD , LOQ=10xSD M D L =3.14xSD, MLQ =10xSD

국가 연구사업의 대상이 된 특정지역 주민의 요 19개를 무작위 추출하여 FI-HG-AAS를 사용하고 있는 A대학교 실험실(Lab-A)과 본 실험실(Lab-B)에서 각각의 3가지 예비환원제를 사용하여 교차분석을 실시한 결과 L-cysteine만 단독으로 사용한 경우 유의하게 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 기존의 KI/AA를 사용한 분석법은 유의한 차이가 있었으나 두 실험실 모두에서 현저히 과소평가됨을 확인할 수 있었다. KI/AA & L-cysteine 예비환원제를 사용한 경우 실험실간 평균 농도가 유의한 차이를 나타냈으며 A대학교 실험실이 2배 이상 높게 평가되는 것으로 조사되었다. 또한 각 시료별로 A 실험실과 B 실험실에서 산출된 요중 비소 농도의 변이계수를 산출한 결과, KI/AA & L-cysteine을 예비환원제로 이용하여 분석한 경우 평균 변이계수가 45.92%였으며, KI/AA의 경우 16.82%, L-cysteine의 경우 11.06%로 평가되었다(Table 4).

각 방법의 검출한계는 공시료를 10회 반복 분석하여 표준편차(SD)를 구하고 검출한계(limit of detection, LOD)는 표준편차의 3배, 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 표준편차에 10배를 적용하였다(NIOSH, 1995; 한국산업보건연구원, 1995; IUPAC, 1997). 방법 검출한계(MDL, method of detection limit)는 비노출 normal urine을 각 예비환

원제 별로 전처리하여 각 분석 과정을 거쳐 7회 반복 측정하고 산출한 표준편차에 3.14를 곱하여 계산하였다(Wisconsin Department of Natural Resources, 1996; Thomsen V, 2003). 방법정량한계(MLQ)는 표준편차에 10을 곱하여 산출하였다. 검출한계는 KI / AA가 0.018 µg/l L-cysteine은 0.45 µg/l, KI / AA & L-cysteine은 0.53 µg/l으로 나타났다(Table 5).

IV. 고 찰

본 연구에서, 세 가지 예비환원제를 이용한 FI-HG-AAS 방법에 있어 L-cysteine을 예비환원제로 이용한 분석결과가 가장 적합한 회수율을 보였으며, HPLC-ICP-MS를 적용한 방법과의 분석결과 차이가 가장 적고, 실험실 간 분석결과의 차이도 가장 적은 것으로 평가되었다.

FI-HG-AAS 분석법은 상대적으로 간단하고 높은 감도와 빠른 분석시간, 적은 시료 오염 가능성 등의 장점으로 요중 비소의 분석법으로 널리 이용되어 왔으며,⁷⁾ 많은 연구자들에 의하여 FI-HG-AAS 방법을 이용한 요중 비소 분석결과가 보고된 바 있다. Howard와 Salou는 Hydride Generation법으로 분석하기 전에 예비환원제로서 L-cysteine을 비소화학종을 포함하는 표준용액에 첨가하면 4가지 비소화학종, 즉 arenite[As(III)], arsenate[As(V)], MMA와 DMA의 감도를 증가시키고 방해금속의 영향을 피할 수 있다고 보고하고 있다. 이 연구에서 4가지 비소화학종 각각에 대해 90% 이상의 높은 회수율을 얻었으며, 이는 cysteine-tetrahydroborate 중간체가 tetrahydroborate 단독으로 존재할 때 보다 더 높은 환원력을 가지기 때문이라고 보고하였다.¹⁷⁾ 예비환원제로서 L-cysteine을 사용한 Guo 등의 연구에서도 arenite[As(III)], arsenate[As(V)], MMA와

DMA의 회수율은 각각 100%, 100%, 96%, 95%를 나타내었으며, KI/AA 예비환원제를 사용할 경우 DMA의 회수율이 10%이하라고 보고하였다.¹³⁾ Speváčková 등은 운반체 용액의 농도를 중요한 인자로 보았으며 105%의 회수율을 얻었다.¹⁸⁾ Shraim 등에 의하면 예비환원제로 L-cysteine을 사용할 경우 낮은 산도(0.001-0.03M HCl)에서 비소의 감도가 증가하였다고 보고하고 있다.¹⁹⁾

또한 L-cysteine은 약한 산 농도 하에서 효과적으로 5가 비소를 3가 비소로 환원하여 수소화율을 향상시키는 반면, KI/AA의 경우 강한 산성 용액에서 수소화율이 높은 것으로 전해진다.²⁰⁾ Guo 등은 상업용 CRM인 Lyphocheck Level 1, 2, NIST SRM 2670, Seronorm과 4개의 실제 소변시료를 사용하여 L-cysteine과 KI/AA 예비환원제의 회수율을 비교 실험하였다. KI/AA 예비환원제를 사용할 경우 Lyphocheck Level 1, 2는 88.5%와 93.4%, NIST SRM 2670은 23%, Seronorm은 결과가 없었고 실제 시료 4개는 실험실간 공동연구로 참값을 구하여 비교한 결과 저농도 25.3%, 고농도 54.6%로 과소평가됨을 보고하였다.¹³⁾

자동화된 FI-HG-AAS 시스템에서는 수소화물 생성이 어려운 비소화합물이 검출되지 않아 과소평가될 수 있다. Arsenobetaine(As-B), arsenocholine과 같은 비소화합물은 수소화물을 생성하지 않기 때문에, 독성학적으로 관련된 4가지 비소화합물의 합 [As(III)+As(V)+DMA+MMA]만이 휘발성 수소화물(hydride)을 형성한다는 가정하에 HG-AAS 방법이 주로 사용된다. 하지만 음식에서 기인하는 arsenosugars가 HG에서 휘발성 수소화물을 생성할 수 있으며, 또한 수소화물 생성 시스템에 따라 수소화물 생성 효율에 차이를 나타낼 수 있다.²¹⁾

다른 문제점으로 무기 비소와 메틸화된 비소 화합물은 서로 다른 감도를 나타내므로 상용화된 FI-AAS를 사용할 때 검량선 작성을 어렵게 만든다.²²⁾ 단일 3가 비소화합종으로 검량선을 작성하고 고정된 산 농도에서 4개 비소화합종을 분석할 경우 수소화율의 차이로 인한 오차가 발생할 수 있다.^{17,20,22)}

이와 같이, FI-HG-AAS 방법을 적용한 요중 비소 분석에 있어 수소화물 생성은 분석결과에 영향을 미치는 중요한 변수이며, KI/AA을 예비환원제로 사용한 분석 방법은 과소평가의 문제가 제기된다. 하지

만 우리나라의 일부 국가 연구사업에서는 KI/AA를 사용한 FI-HG-AAS 분석방법이 사용되어 왔으며, 이러한 연구들에서 보고된 연구대상자들의 요중 비소 농도는 KI/AA과 L-cysteine을 혼합하는 방법을 적용한 연구들에 비하여 현저히 낮은 농도를 나타내고 있다. 이는 비소 노출에 대한 우리나라 국민들의 참고치(reference value)를 제시함에 있어 혼란을 초래할 수 있으며, 예비환원제의 종류, 각 분석기관 사용기기의 분석조건에 따라 상이한 결과를 나타내는 이들 결과를 비교 평가할 수 없다는 문제점을 제기한다. 본 연구는 이러한 문제점을 세가지 예비환원제를 이용한 FI-HG-AAS법과 HPLC-ICP-MS법을 비교함으로써 이러한 문제점들의 원인을 밝히고 증명하였다. 국내에서 고가의 HPLC-ICP-MS 장비를 보유한 실험실은 주로 국가 연구 기관이거나 상업적 분석을 대행하는 실험실뿐이며 그 수도 많지 않다. 반면에 FI-HG-AAS는 대부분 실험실에서 보유하고 있는 범용적인 장비라는 이점을 고려해 볼 때 많은 양의 시료를 분석하는 1차 스크린의 도구로서 적합할 것으로 판단된다.

본 연구에서 사용한 시료의 양이 제한적이고, 다양한 조건 하에서 반복적으로 이루어진 분석에 있어 불가피한 분석오차의 발생 등은 본 연구의 제한이라고 할 수 있다. 또한 본 연구에서는 HPLC-ICP-MS 방법에서 산출된 요중 비소 농도를 참값의 개념으로 적용하였다. 현재까지 알려진 기기분석 방법 중 HPLC-ICP-MS 방법이 일반적으로 가장 정확한 것으로 여겨지지만 이 역시 완전한 참값이라고 할 수는 없다. 하지만 본 연구를 통하여 국내에서 사용되는 예비환원제 KI/AA의 경우 비소 화합종 중 DMA가 현저히 낮게 과소평가됨을 확인하였고 L-cysteine 예비환원제를 사용한 방법이 HPLC-ICP-MS 법과 근사한 측정값을 나타냈다. 또한 같은 분석 방법을 사용하는 실험실간의 차이는 기기마다 다른 수소화율에 따른 결과임을 알 수 있었다.

3가지 예비환원제의 비교에서 기존의 예비 환원제(KI/AA)에 의한 전처리법이 과소평가됨을 확인하였고 그 원인은 DMA의 회수율이 낮아 즉, 수소화물 생성 효율이 떨어지기 때문이라고 판단된다. 3가지 전처리 법에 따라 FI-HG-AAS로 분석한 각각의 평균농도와 HPLC-ICP-MS 분석 농도와 비교하였을 때 일치도는 L-cysteine전처리법이 가장 높았고 KI

/ AA & L-Cysteine 전처리, KI / AA 전처리법 순을 나타내었다. 따라서 L-cysteine을 예비환원제로 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

V. 결 론

FI-HG-AAS를 이용한 요중 비소 분석방법은 감도가 비교적 좋고 검출한계가 낮은 편이며, 방해작용이 적고 분석이 간단하다는 장점을 가지고 있어 일반적으로 많이 사용되고 있다. 동일한 시료를 이용하여 FI-HG-AAS 방법에서 적용되는 세 종류의 예비환원제(KI/AA, L-cysteine, KI/AA & L-cysteine)의 종류별로 분석결과를 비교한 결과, 세 가지 예비환원제를 이용한 FI-HG-AAS 방법에 있어 L-cysteine을 예비환원제로 이용한 분석결과가 가장 적합한 회수율을 보였으며, HPLC-ICP-MS를 적용한 방법과의 분석결과 차이가 가장 적고, 실험실 간 분석결과와의 차이도 가장 적은 것으로 평가되었다. 예비환원제를 사용한 전처리가 적용된 FI-HG-AA 방법에 있어 수소화를 생성은 결과 수치에 영향을 미치는 중요한 변수이며, 본 연구에서 도출된 결과는 과소평가가 발생할 수 있는 KI/AA 방법보다는 L-cysteine을 적용한 요중 비소 방법이 가장 합리적임을 보여준다.

References

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 100.Pt C 2012: 11.
2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some drinking water disinfectants and contaminants, including arsenic. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* vol. 84 2004.
3. Gehle K, Harkins D, Johnson D, Rosales-Guevara L. Case studies in environmental medicine: arsenic toxicity. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* 2000: 1-42.
4. Tam GK, Charbonneau SM, Bryce F, Pomroy C, Sandi E. Metabolism of inorganic arsenic (74As) in humans following oral ingestion. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 50(2): 319-322.
5. Vahter M, Marafante E. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem Biol Interact* 1983; 47(1): 29-44.
6. Hughes MF. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* 2006; 114(11): 1790-1796.
7. Brima EI, Haris PI, Jenkins RO, Polya DA, Gault AG, Harrington CF. Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216(1): 122-130.
8. Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Sauvart-Rochat MP. What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water? *Environ Int* 2012; 39(1): 150-171.
9. ATSDR. Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology, Atlanta, GA, USA: 2007.
10. Norin H, Vahter M. A rapid method for the selective analysis of total urinary metabolites of inorganic arsenic. *Scand J Work Environ Health* 1981; 7(1): 38-44.
11. Human Biomonitoring Commission of the German Federal Environmental Agency. Substance Monograph: Arsenic - Reference Value in Urine. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2003. 46, 12, 1098-1106 .
12. Kumar AR, Riyazuddin P. Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal Sci* 2005; 21(12): 1401-1410.
13. Guo T, Baasner J, Tsalev DL. Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1997; 349(1): 313-318.
14. Lee JH, Lee US, Hong SC, Jang BK. A study on the optimal analytical method for the determination of urinary arsenic by hydride generation-atomic absorption spectrometry. *J Environ Health Sci* 2009; 35(5): 402-410.
15. Lee JH, Lee CK, Moon CS, Choi IJ, Lee KJ. Korea national survey for environmental pollutants in the human body 2008: heavy metals in the blood or urine of the Korean population. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215(4): 449-457.
16. Park S, Lee BK. Strong positive associations

- between seafood, vegetables, and alcohol with blood mercury and urinary arsenic levels in the Korean adult population. *Arch Environ Contam Toxicol* 2013; 64: 160-170.
17. Howard AG and Salou C. Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydride AAS determination of dissolved arsenic species. *Analytica Chimica Acta* 1996; 333: 89-96.
 18. Speváková V, Cejchanová M, Cerná M, Speváček V, Smíd J, Benes B. Population-based biomonitoring in the Czech Republic: urinary arsenic. *J Environ Monit* 2002; 4(5): 796-798.
 19. Shraim A1, Chiswell B, Olszowy H. Speciation of arsenic by hydride generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS) in hydrochloric acid reaction medium. *Talanta* 1996; 50(5): 1109-1127.
 20. Le XC, Cullen WR, Reimer KJ. Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1994; 285(3): 277-285.
 21. Schmeisser E, Goessler W, Kienzl N, Francesconi KA. Volatile analytes formed from arsenosugars: determination by HPLC-HG-ICPMS and implications for arsenic speciation analyses. *Anal Chem* 2004; 76(2): 418-423.
 22. Heitland P, Köster HD. Fast determination of arsenic species and total arsenic in urine by HPLC-ICP-MS: concentration ranges for unexposed german inhabitants and clinical case studies. *J Anal Toxicol* 2008; 32(4): 308-314.
 23. Hinners TA. Arsenic speciation: Limitations with direct hydride analysis. *Analyst* 1980; 105(1253): 751-755.