

A comparison study of ^{76}Se , ^{77}Se and ^{78}Se isotope spikes in isotope dilution method for Se

Leewon Kim, Seoyoung Lee and Yong-Nam Pak[★]

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education
Taesungtapyun 250, Chengju, Chung Buk 28173, Korea

(Received June 25, 2016; Revised August 21, 2016; Accepted August 23, 2016)

셀레늄의 동위원소 희석분석법에서 첨가 스파이크 동위원소 ^{76}Se , ^{77}Se 및 ^{78}Se 들의 비교분석

김리원 · 이서영 · 박용남[★]

한국교원대학교 화학교육학과

(2016. 6. 25. 접수, 2016. 8. 21. 수정, 2016. 8. 23. 승인)

Abstract: Accuracy and precision of ID methods for different spike isotopes of ^{76}Se , ^{77}Se , and ^{78}Se were compared for the analysis of Selenium using quadrupole ICP/MS equipped with Octopole reaction cell. From the analysis of Se inorganic standard solution, all of three spikes showed less than 1 % error and 1 % RSD for both short-term (a day) and long-term (several months) periods. They showed similar results with each other and ^{78}Se showed was a bit better than ^{76}Se and ^{77}Se . However, different spikes showed different results when NIST SRM 1568a and SRM 2967 were analyzed because of the several interferences on the m/z measured and calculated. Interferences due to the generation of SeH from ORC was considered as well as As and Br in matrix. The results showed similar accuracy and precisions against SRM 1568a, which has a simple background matrix, for all three spikes and the recovery rate was about 80% with steadiness. The %RSD was a bit higher than inorganic standard (1.8 %, 8.6 %, and 6.3 % for ^{78}Se , ^{76}Se and ^{77}Se , respectively) but low enough to conclude that this experiment is reliable. However, mussel tissue has a complex matrix showed inaccurate results in case of ^{78}Se isotope spike (over 100 % RSD). ^{76}Se and ^{77}Se showed relatively good results of around 98.6 % and 104.2 % recovery rate. The errors were less than 5 % but the precision was a bit higher value of 15 % RSD. This clearly shows that Br interferences are so large that a simple mathematical calibration is not enough for a complex-matrixed sample. In conclusion, all three spikes show similar results when matrix is simple. However, ^{78}Se should be avoided when large amount of Br exists in matrix. Either ^{76}Se or ^{77}Se would provide accurate results.

요 약: 팔중극자 반응셀을 장착한 사중극자 유도결합플라즈마 질량분광기에서 동위원소 희석법을 사용

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)43-230-3732 Fax : +82-(0)43-232-7176

E-mail : pakyn@knue.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하여 셀레늄을 분석할 때에 여러 다른 스파이크 동위원소들 ^{76}Se , ^{77}Se , 및 ^{78}Se 에 대한 정확도와 정밀도를 비교하였다. 무기 셀레늄 표준용액에 대한 분석결과, ID분석법의 정확도는 매일의 결과는 물론 장기 간(세 달간)에도 세 개의 스파이크 모두 1% 이내의 오차만을 보여주었고 %RSD도 1% 수준이었다. 동위원소 스파이크 ^{76}Se , ^{77}Se 은 그 결과값은 비슷하며 ^{78}Se 이 조금 더 나은 결과를 보여주었다. 하지만 실제 시료인 기준물질 NIST SRM 1568a(쌀분말)과 NIST SRM 2967(홍합)에서는 사용하는 스파이크 동위원소에 따라 서로 다른 정확도와 정밀도를 보여주는데 가장 큰 이유는 측정 및 계산에 사용된 m/z 에 대한 서로 다른 여러 간섭 때문으로 나타났다. ORC사용으로 인한 SeH의 생성때문에 나타나는 간섭을 보정한 뒤 매트릭스에 포함된 Br, As에 의한 간섭에 대한 보정을 하였다. 결과, 비교적 간단한 매트릭스를 가진 쌀분말일 때 ^{76}Se , ^{77}Se , 및 ^{78}Se 은 서로 비슷한 결과를 얻었으며 각 각 80% 정도의 회수율을 꾸준히 보여주었다. 정밀도는 ^{78}Se 의 경우에는 1.8% RSD로서 무기표준물의 경우와 비슷하다. ^{76}Se 와 ^{77}Se 은 각 각 8.6%, 6.3% RSD로서 약간 높지만 전체적으로 이 실험은 신뢰할 수 있다고 보인다. 매트릭스가 복잡한 홍합의 경우에도 ^{76}Se 와 ^{77}Se 은 오차가 5% 이내로서 정확한 결과를 보여주나 정밀도는 RSD 15% 수준으로 조금 높은 편이다. 하지만 ^{78}Se 의 경우에는 정확도도 나쁘지만 정밀도가 매우 나빠서 (100% 이상의 RSD) 신뢰할 수 없는 결과를 보여준다. 이는 ^{78}Se 의 경우, 워낙 Br의 간섭이 크기 때문에 비록 수학적 보정을 한다하여도 충분하지 않음을 보여준다. 따라서 스파이크 동위원소를 선택할 때에는 매트릭스가 간단하다면 신호가 높은 ^{78}Se 동위원소를 선택하는 것이 조금 더 유리할 수 있지만 Br이나 간섭이 많을 때는 ^{78}Se 은 피하고 ^{76}Se 이나 ^{77}Se 을 선택하여야 하며 이 경우 충분히 좋은 결과를 보여 줄 수 있다.

Key words: Se, ID method, Se spikes, ORC ICP/MS, isobaric interference

1. 서 론

셀레늄은 21세기의 비타민으로서 알려져 있고 인체에 꼭 필요한 필수원소^{1,2}이지만 매우 작은 양만 필요로 한다. 인체에서의 셀레늄농도는 암과 관련이 있고 Roman³은 초기 대장암환자에서의 셀레늄 농도의 비이상성을 보고하였으며 독일의 Meyer⁴는 전립선암 환자와 신장암 환자의 경우에 셀레노 단백질 농도가 환자군이 통제군보다 낮다고 보고하였다. 하지만 필요하다고 해서 셀레늄을 과량 섭취하게 되면 독이 되며 심하면 셀레늄 중독증을 일으키기도 한다. 따라서 인체 또는 생체에서의 극미량 셀레늄분석을 매우 낮은 농도에서 정확하게 분석해야 하는데 이는 여러 어려움이 있을 수 있다. ICP/MS (inductively coupled plasma/mass spectrometry)는 미량의 원소를 정확하고 신속하게 분석할 수 있는 장점이 있으며 질량에 대한 정보가 가능하다.^{5,6} 특히 동위원소 희석 (ID; isotope dilution)법을 적용할 수 있는데 ID법은 현재까지 분석방법중에 가장 정확한 방법으로 알려져 있으며 따라서 셀레늄을 이 방법으로 정량하는 것이 정확할 것이다.⁷ 셀레늄은 여러 동위원소들(m/z 74, 76, 77, 78, 80, 그리고 82)을 가지고 있으므로 ID법을 위한 여러 동위원

소들의 조합이 가능하다. 이들 중 m/z 74는 동위원소비가 너무 작아 (0.47%) 사용하기 부적절하며 m/z 76, 77, 78 및 82가 모두 가능하다. 본 연구에서는 m/z 76, 77, 및 78을 동위원소 spike로 사용하여 셀레늄을 분석할때의 정확도와 정밀도를 비교하였다.

실제 시료에 대하여 셀레늄을 ID법으로 정량할 때에는 몇 가지 어려움이 있는데 특히 ICP/MS에서의 동중간섭들이 많이 존재한다. 다음의 Table 1에 의하면 각 셀레늄 동위원소들에 대한 잘 알려진 동중간섭 요인들을 보여주고 있다.

물론 이 외에도 각 시료에 따른 여러 간섭이온들이 존재할 수 있다. Ar ICP/MS에서 동중간섭은 주로 Ar

Table 1. Spectral interferences on the determination of Se in biological samples by ICP-MS

Se	Abundance (%)	Interference
74	0.89	$^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$
76	9.37	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{31}\text{P}_2^{14}\text{N}^+$
77	7.63	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{ArH}^+$, $^{38}\text{Ar}_2\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$
78	23.77	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{31}\text{P}_2^{16}\text{O}^+$
80	49.61	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{79}\text{BrH}^+$
82	8.73	$^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$, $^{81}\text{BrH}^+$

에 의한 것들로서 m/z 80 [$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$] 이 가장 크다. 그리고 m/z 78 [$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$] m/z 76 [$^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$]에 의한 간섭들이 나타난다. 그러므로 셀레늄을 분석할 때에 동중간섭을 일으키는 Ar 화학종들을 팔중극자 반응셀(ORC; octapole reaction cell)을 사용하여 제거하는데 이 때에 사용되는 수소기체가 일부 반응을 일으켜 원치 않는 수소화합물을 만들어 낸다.⁸ 스펙트럼은 매우 복잡하게 되며 더욱 큰 문제는 셀레늄도 수소기체와 반응하여 SeH를 형성하게 된다. 이 때 각 동위원소들은 m/z 가 하나씩 증가하게 되어 주의 깊은 보정을 하지 않으면 매우 잘못된 결과를 얻기 쉽다. 이러한 문제 때문에 Lobinski⁹는 충돌기체로서 수소대신 Xe를 사용하여 ArH들에 의한 바탕간섭들을 줄일 수 있었다. 하지만 정확도는 개선이 되었지만 감도는 10 배 정도 오히려 나빠졌음을 보고하였다. Masatoshi는 셀레늄의 분석에서 질소 마이크로파 유도플라즈마를 사용하여 아르곤의 바탕에서 기인하는 간섭을 제거하는 연구를 하였으나 감도는 높지 않았다.¹⁰

그리고 실제 시료속에 존재하는 몇 이온들은 셀레늄에 대하여 여러 동중간섭 화학종들을 만들어 낼 수 있게 되는데 대표적으로 Br은 ORC에서 BrH를 형성하여 m/z 80 및 82에 나타나게 된다. 그러므로 실제시료의 정량에서 Br이 존재할 때에는 BrH에 의한 보정을 꼭 해주거나 미리 매트릭스에서 제거하여야 할 것이다. 암석과 같은 매트릭스가 복잡한 경우에는 특히 더욱 그렇게 해야 한다.¹¹

셀레늄을 동위원소 회석법으로 분석하는 것은 쉽지 않으며 반드시 여러 간섭요인들을 제거해 나가야 한다. 본 연구에서는 ORC ICP/MS에서 셀레늄의 정확한 정량분석을 위하여 동위원소 회석법을 적용할 때에 이러한 간섭효과들을 배제하고 가장 효과적인 spike를 찾기 위하여 셀레늄 동위원소 spike m/z 76, 77, 및 78에 대하여 연구하고 비교하였는데 ORC ICP/MS에서의 셀레늄의 분석에서 spike동위원소들에 대한 비교연구는 아직 잘 나타나고 있지 않다.

2. 연구방법

본 연구에 사용된 기기 및 방법은 선행연구^{12,13}에서 발표한 것을 기본으로 하여 본 연구에 맞게 최적조건을 찾아 사용하였다.

2.1. 시약 및 시료

실험에 사용한 모든 용기와 기구는 강산으로 수 시

간 세척하여 사용하였다. 시약 및 시료 조제에 사용되는 수용매는 Millepore direct-Q system에서 비저항이 18.2 M Ω 이상인 삼차 탈 이온수를 사용하였다. 용기 세척 및 시료 제조에 사용한 질산은 동우화인켄사에서 구입한 반도체급 시약을 사용하였고 셀레늄 표준 용액은 Sodium selenate decahydrate (SeVI, 99.999%, Sigma-Aldrich)를 2% HNO₃에 묽혀 사용하였다. 사용된 spike 동위원소(Trace Sciences International Corp., DE, USA)는 ⁷⁶Se (<98.50 \pm 0.20%), ⁷⁷Se (<97.20 \pm 0.20%) 및 ⁷⁸Se (<97.9 \pm 0.20%)를 사용하였다.

2.2. SRM 시료의 준비

시료를 용해하는 방법은 비커법과 마이크로파 분해법이 있다. 본 연구에서는 두 가지 방법을 다 사용하여 시료를 준비하고 비교하여 보았다. 먼저 전통적인 비커법에서는 100 mL 테플론 비커에 시료와 스파이크 동위원소 용액을 넣은 후 70% HNO₃ 15 mL를 첨가 후 150 °C에서 6 시간 이상 가열하였다. 다시 31% H₂O₂를 3 mL 첨가 후 150 °C에서 2 시간 이상 가열한 뒤 식힌다. 높은 농도가 필요할 때에는 130 °C~140 °C로 가열하여 용액을 증발시킨다. 마이크로파 분해법은 용기에 시료 약 1.0 g을 넣은 후에 70% HNO₃을 3 mL 그리고 31% H₂O₂를 1 mL 첨가 후 1800 W(온도는 190~200 °C)로 35 분간 가열한다. 용매인 2% HNO₃을 적당량 첨가 후 0.45 μm membrane으로 필터링하여 사용한다.

2.3. 기기 및 실험조건

ICPMS는 사중극자 형태인 질량분석기를 가진 HP 회사(Agilent, Tokyo, Japan)의 모델 7500 ce를 사용하였는데 이 기기는 동중간섭을 제거하는 장치로 팔중극자 반응셀을 장착하고 있다. ORC에 사용되는 반응기체로는 수소나 헬륨등이 사용될 수 있는데 본 연구에서는 수소를 주로 사용하였다. 셀레늄에 대한 간섭 신호로서 가장 큰 m/z 80에 대하여 H₂의 흐름 속도를 0 mL min⁻¹에서 6 mL min⁻¹까지 0.5 mL min⁻¹ 간격으로 변화시키면서 신호대 바탕비를 측정하고 최적값을 가진 흐름을 결정하였다. 본 실험에서 사용된 ICP/MS의 최적 조건을 다음의 Table 2에 요약하였다.

ICP/MS를 사용하여 동위원소 회석법으로 셀레늄을 정량할 때에는 동위원소로서 ⁷⁶Se, ⁷⁷Se, 또는 ⁷⁸Se를 사용할 수 있다. 일차적으로는 신호값이 큰 ⁷⁸Se을 사용하고 대응동위원소로 ⁸⁰Se을 측정하여 그 비를 사용하는 것이다. ⁷⁶Se와 ⁷⁷Se의 경우는 둘 다 ⁷⁸Se을 대응

Table 2. Operating conditions of ICP/MS used in the experiment

Plasma Parameters		
RF power	1600	W
Sample depth	6.0	mm
Carrier gas	1.00	Lmin ⁻¹
Ar plasma gas	15.0	Lmin ⁻¹
Ar aux. gas	1.0	Lmin ⁻¹
Sampler and Skimer	Ni 1.0 and 0.4 mm id	
H ₂ Gas	5.0	mLmin ⁻¹

Table 3. Data acquisition parameters used for ICP/MS for this experiment

Integration time (per point)	0.3 s
Peak pattern	TRA (1)
Acquisition mode	Isotope Analysis
Monitored isotope	<i>m/z</i> 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81
Repetition	20

하는 동위원소로 선택하였다. 수소를 사용한 충돌셀 ICP/MS에서는 수소화합물들이 만들어지고 이들에 대한 보정이 필요하게 된다. 또한 ^{78}Se 을 사용하는 경우에는 ^{79}Br 을 모니터링하여 *m/z* 80에 대한 BrH의 생성이 얼마인가를 알아야 한다. 피크당 한 개의 질량을 모니터링하고 적분시간은 0.3초를 사용하였고 20회 반복하여 측정하였다. 따라서 한 *m/z*당 총 측정시간은 6.0초가 된다. 여러 실험조건을 다음의 Table 3에 요약하였다.

2.4. 실험방법

한 표준물질에 대하여 셀레늄의 최종농도가 각 각 50 ng g⁻¹ 근처가 되도록 3 개의 시료를 채취한 뒤 각 시료에 스파이크를 첨가하여 3 개의 용액을 만들고 각각에 대하여 3회 반복 측정하였다. 첨가하는 동위원소의 양은 스파이크와 대응동위원소의 비가 1에 근접하도록 하였다. 다른 스파이크에 대하여서도 같은 방법으로 동일하게 시료를 제작하여 총 9 개의 시료를 준비하고 측정하였다.

먼저 무기표준셀레늄 용액을 사용하여 질량편차 (mass bias)를 보정하고, 그 값을 이용하여 시료에 대하여서도 적용하였다. 다음은 스파이크를 넣지 않은 시료 및 스파이크에 대하여 각 동위원소별 함량을 측정하였다. 그리고 스파이크를 첨가한 시료를 측정하되 ^{76}Se , ^{77}Se , 및 ^{78}Se 을 첨가한 시료순서대로 측정하였다. 각 스파이크에 대하여 3개씩의 시료를 제조하였으므로 9회 측정을 하게 되며 다시 이것을 3회 반복하여

측정하므로 스파이크 첨가한 시료는 총 27 회의 측정이 이루어지게 된다. 수 개월간에 걸쳐 총 6 회의 실험을 되풀이하여 정밀도를 검증하였다. 실제시료인 표준물질도 마찬가지로 측정하였다. 즉, 시약바탕용액과 시료자체 그리고 스파이크를 첨가한 시료순으로 측정하되, 3 개에 대하여 3 회씩 반복측정하므로 (한 스파이크당) 3 개의 스파이크를 사용하면 총 27 회 측정이 된다. 다른 날자에 시료를 새롭게 제조하여 측정하기를 4 회 반복하여 정밀도를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 동위원소 회석법의 정확도와 정밀도

3.1.1. 무기 표준용액을 사용한 검증

정확한 농도결정을 위하여서는 얻어진 신호값을 몇 가지 처리해야 하는데 먼저 바탕용액으로 사용한 2% 질산용액의 값을 빼준 뒤 질량편차값을 보정한다. 실제 시료에서는 시약바탕의 값을 빼주었다. Se 표준용액을 이용하여 *m/z* 74부터 82까지 측정한 뒤 자연동위원소비와 비교해 보면 *m/z* 82값이 실제보다 더 크게 나타난다. *m/z* 74에서부터 82까지의 측정동위원소비를 자연동위원소비로 나눈값을 도시하면 이론적으로는 모두 1이어야 하겠지만 질량의 차이대 신호값을 도시해 보면 기울기값이 1보다 큰 결과를 보여주게 되는데 이것은 질량편차 때문이며 기울기가 1이 되도록 보정하여야 한다.

그 다음의 보정은 SeH 생성에 대한 보정이다. ORC에서는 수소반응기체와 셀레늄(또는 다른 이온)이 반응하여 수소화합물을 만들고 결과로 *m/z*가 원래값보다 1 증가하여 나타나게 된다. 수소화합물에 대한 것은 복잡하기는 하여도 수학적으로 보정하면 비교적 정확하게 결과를 얻을 수 있다. 보정하는 방법은 선행 연구에 잘 나타나 있다.¹⁴ 무기표준용액에 대하여 이

Table 4. Measured isotope ratio for Se standard solution (250 ng g⁻¹) in ORC ICP/MS

Isotope	Measured, %	Natural, %
74	0.90±0.01	0.89
76	9.39±0.03	9.37
77	7.66±0.01	7.63
78	23.60±0.18	23.77
80	49.63±0.09	49.61
82	8.82±0.06	8.73
SUM	100	100

러한 처리를 행한 다음 측정동위원소비를 이론치와 비교하여 Table 4에 실었다. 결과는 실험치에 대한 보정이 잘 이루어지며 정확한 결과를 얻을 수 있음을 알게 있었다.

따라서 어떤 특별한 간섭이나 방해가 없다면 셀레늄에 대한 ID 분석법은 정확한 결과를 보여주며 3개의 동위원소 스파이크는 모두 동일한 결과를 보여주어야 할 것으로 기대된다. 같은 농도 조건하에서는 ^{78}Se 이 조금 더 나은 정밀도를 보여줄 것으로 기대한다. 그 이유는 m/z 78와 80의 신호가 가장 크므로 m/z 76/78 및 m/z 77/78의 경우에서 보다 더 좋은 정밀도를 줄 것이다. 물론 이 때의 오차는 오직 통계학적 오차만이 남아 있다고 생각하는 경우이다. 즉, 모든 방해요인들이 제거되고 통계학적 오차만 남는다면 신호 대 잡음의 비는 \sqrt{N} 에 비례하므로 m/z 78/80의 경우에는 다른 경우에 비하여 $\sqrt{2}$ 정도가 더 좋을 것으로 생각된다.

무기 표준용액에서는 어떤 다른 원소나 방해원소들이 존재하지 않으므로 현재의 시스템에서 보여줄 수 있는 가장 좋은 값들을 얻을 수 있다. 단기간(하루)과 장기간의(수 개월)에 대한 정확도 및 정밀도를 조사하였는데 결과를 각각 Table 5와 Table 6에 나타내었다. 먼저 하루 내에서의 실험(Table 5)에서 보면 3개의 스파이크 모두 회수율이 100% 근처로서 매우 정확하게 1.0% 미만의 오차만을 보여준다. 정밀도를 보면 모두 1.0% 미만의 RSD를 보여주고 있다. 각 스파이크 동위원소를 비교해 보면 76과 77은 같은 수준이고 78은 약간 좋다고 볼 수 있다. 이는 예측된 경우이지만 그 차이는 매우 작다. 결국 셀레늄의 ID 분석법에서 단기간의 실험은 매우 정확하고 정밀하다고 볼 수 있다.

장기적인 정밀도는 수 개월에 걸쳐서 측정하였다. 각 값들은 약 일주일 간격으로 실험한 것을 보여준다. 결과를 Table 6에 나타내었는데 각 값들은 3개의 시료에 대한 평균값들이며 측정값과 실제값의 차이를

Table 6. Accuracy and stability of ID for Selenium analysis with ORC ICP/MS for a long period-within several months (standard solution; 250.00 ng g⁻¹)

No.	Error, %		
	^{76}Se	^{77}Se	^{78}Se
1	-0.28 ± 0.22	0.69 ± 0.19	-0.19 ± 0.18
2	0.61 ± 0.38	2.00 ± 0.30	-0.51 ± 0.12
3	0.51 ± 0.88	0.67 ± 0.42	0.48 ± 0.18
4	-0.80 ± 0.65	-0.08 ± 0.061	0.017 ± 0.30
5	-0.96 ± 0.18		0.88 ± 0.58
6	0.07 ± 0.13		-0.08 ± 0.10
Average ± SD	-0.14 ± 0.66	0.82 ± 0.86 (0.32 ± 0.42)*	0.10 ± 0.50

*() is when the outlier experiment is ruled out
n=3

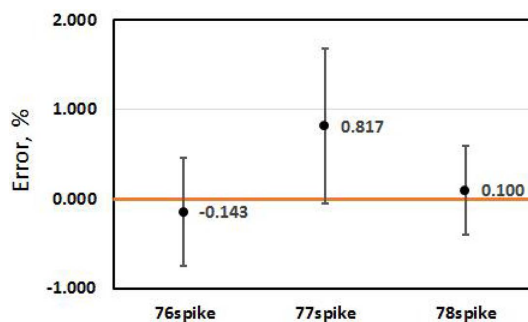


Fig. 1. Comparison of isotope spikes for Se inorganic standard solution (for a long period of several months).

%오차로 나타내었다. 이 것은 각 실험마다 농도가 약간씩 다르기 때문에 오차로 나타내는 것이 더 좋다.

각 동위원소들에 대한 정확도와 정밀도를 서로 잘 비교하여 보기 위하여 Fig. 1에 95% 수준으로 신뢰 구간을 나타내었다.

^{76}Se , ^{77}Se 및 ^{78}Se 스파이크 모두 거의 모두 1.0% 이내의 오차(또는 99.0% 이상의 회수율)를 보여줄 정

Table 5. Accuracy and stability of ID for Selenium analysis with ORC ICP/MS for a short period-within a day (standard solution; 250.00 ng g⁻¹)

sample	^{76}Se		^{77}Se		^{78}Se	
	Measured ng g ⁻¹	Recovery %	Measured ng g ⁻¹	Recovery %	Measured ng g ⁻¹	Recovery %
1	251.83	100.73	251.04	100.42	252.00	100.80
2	252.18	100.87	250.39	100.16	250.24	100.09
3	249.14	99.66	252.91	101.16	250.67	100.26
Average ± SD	251.05 ± 1.66	100.42 ± 0.66	251.45 ± 1.31	100.58 ± 1.31	250.97 ± 0.52	100.39 ± 0.92
%RSD	0.66		0.52		0.21	

도로 높은 정확도를 보여준다. ^{76}Se 과 ^{78}Se 은 모두 0.1% 근처의 오차만을 보여주는데 ^{77}Se 의 경우에도 1% 이내의 오차로 매우 만족할 만한 값을 보여준다. 스파이크 동위원소간을 서로 비교해 보면 ^{78}Se 이 ^{76}Se 이나 ^{77}Se 에 비해 조금 좋음을 보여주지만 ^{76}Se 이나 ^{77}Se 모두 만족할 만한 값을 보여준다고 할 수 있다. ^{77}Se 의 경우에는 두 번째의 약간 특이한 값을 제외하면 오차는 0.32% 밖에 되지 않는다. 특이한 값만 빼면 ^{76}Se 이나 ^{78}Se 과 일치한다고 볼 수 있다. 정밀도의 경우에는 표준편차가 약 1% 미만으로서 역시 좋은 결과를 보여주고 있다. 결과적으로 불 때에 팔중극자 충돌셀을 장착한 사중극자 ICP/MS에서 셀레늄에 대한 동위원소 회석법은 하루 이 내의 단기뿐 아니라 수 개월간의 장기적인 실험에서도 정확하고 안정된 값을 얻을 수 있음을 보여준다. 장기간의 오차의 경우, 정밀도를 비교하여 불 때에 ^{78}Se 을 사용한 경우가 더 좋을 것이라고 기대하였으나 현재의 실험조건하에서는 스파이크 간에 별 차이가 없었다. 따라서 현재 보여주고 있는 오차가 과연 어느 정도가 어떤 오차인지는 알기 위하여 농도에 따른 오차를 실험하였다.

3.1.2. 농도에 따른 오차분석

만일 현재의 오차가 오직 통계오차에 의해서라면 결정된다면 오차는 신호값 즉, 농도의 제곱근에 반비례하게 될 것이다. 이를 위하여 농도를 변화시키면서 오차를 측정된 뒤 그 결과를 Fig. 2에서 나타내었다.

농도는 50 ng g^{-1} 에서부터 약 700 ng g^{-1} 까지 변화시켰는데 ^{78}Se 의 경우에는 최대 500 ng n^{-1} 까지만 가능하였고 더 높은 농도에서는 10^7 cps 이상의 높은 신호값으로 인하여 검출기의 모드가 변화되므로 조사하

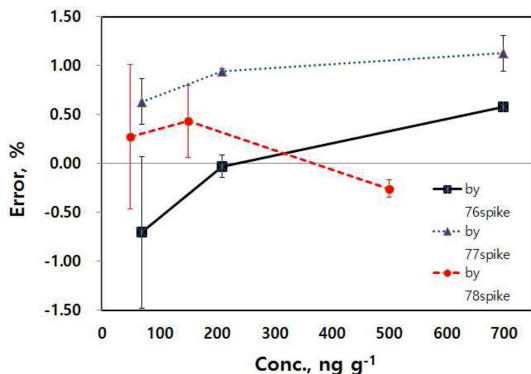


Fig. 2. Change of errors and precision for different Se spikes with concentration. Error bar represents standard deviation.

지 않았다. ^{76}Se , ^{77}Se 및 ^{78}Se 모두 농도에 따라 정확도는 거의 달라지지 않았고 정확하였다. 하지만 정밀도(표준편차)를 보면 농도가 증가할때에 개선되는 것으로 보아 현재 보이는 오차는 통계오차가 크다는 것을 보여주고 있다. 모든 동위원소들이 같은 값을 보여주지 않는 것을 보아서 각 동위원소마다 약간의 다른 오차원인이 있을 것이라고 추측된다. 예를 들어, ^{78}Se 의 경우에는 다른 동위원소보다 높은 신호값(같은 농도에서)임에도 불구하고 큰 오차를 보여주는데 이것은 ^{78}Se 의 신호에 대한 오차의 원인이 단순한 통계오차만은 아니라는 것을 반증하고 있다. 또한 농도가 낮아지면 통계 오차는 $\sqrt{\text{농도}}$ 에 따라 커진다. 하지만 측정된 오차값은 통계오차가 예상하는 것보다 훨씬 더 크게 증가하는 것으로 보아서 또 다른 원인 예를 들어, 아직 Ar dimer들이 완전히 제거되지 않는등의 원인이 있는 것으로 보인다.

3.2. SRM의 분석에서의 스파이크 동위원소의 비교

3.2.1. 비커법과 마이크로파 분해법의 비교

시료를 분해할 때에 정확하게 분해하는 것이 매우 중요하다. 마이크로파 분해법은 시간이 빠르고 상대적으로 간단하지만 높은 온도로 인하여 셀레늄이 휘발될 수 있으므로 조심해야 한다.¹⁵ 전통적인 비커법은 시간이 많이 걸리나 좀 더 정확하다. 따라서 이 두 방법에 따라 다르게 제조된 시료를 비교하여 정확도를 알아보고자 한다. 쌀 표준물질을 대상으로 하여 두 방법을 적용하여 나타난 결과를 Table 7에 실었다. 세 동위원소 모두 결론적으로는 두 방법간의 차이는 거의 없는 것으로 나타났기 때문에 편리하고 시간이 적게 걸리는 마이크로파 분해법을 사용하였다.

3.2.2. Br 및 As에 의한 간섭보정

3.1.1에서 언급한 보정을 행한 뒤에도 실제시료에는 여러 매트릭스에 의한 간섭이 많은데 셀레늄에는 여러 동위원소들이 많이 존재하기 때문에 그 간섭효과

Table 7. Comparison of acid digestion with beaker and microwave digestion methods (SRM 1568a; $0.38 \mu\text{g g}^{-1}$)

No.	Concentration, $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Beaker	Microwave
^{76}Se	0.280 ± 0.033	0.280 ± 0.029
^{77}Se	0.330 ± 0.064	0.294 ± 0.012
^{78}Se	0.302 ± 0.098	0.298 ± 0.063

가 더욱 심각하고 정확한 결과를 얻는데 어려움이 있을 수 있다. 시료의 매트릭스 중 As와 Br에 의한 간섭이 심각하므로 이에 대하여 수정해야 한다. 비소의 경우에는 신호가 m/z 75에서 나타나므로 셀레늄에 대하여 직접 간섭을 하지는 않지만 수소와 반응하여 AsH가 되면 m/z 76에 간섭을 주게 된다. Br은 시료에 많이 존재하며 수소반응기체와 반응하여 많은 BrH를 생성하게 되어 m/z 80과 82에 심각한 간섭을 주게 된다. 이 들에 대한 값들을 보정하여야 정확한 결과를 얻을 수 있게 된다. 측정결과, 비소의 경우에는 m/z 75의 비소가 ^{76}Se 에 1.2%정도의 간섭신호를 주게 된다. 만일 비소가 10^6 cps라면 그 값은 약 12,000이 된다. 홍합의 SRM 의 경우에 m/z 75의 신호값이 매우 높아서 AsH에 의한 간섭이 클 것으로 예상된다. 브롬의 경우에는 BrH 생성비가 23.0%로 측정되었고 이 값은 셀레늄의 정량에 상당한 간섭을 가져오므로 잘 보정하여야 한다.

단계별 보정에 따른 동위원소비값을 Table 8에 실었다. 결과를 보면 측정되는 동위원소비는 자연 동위원소비와 매우 다르나 단계별 보정후에는 존재비가 개선되고 최종결과값은 1568a의 경우에는 비교적 일치하는 값을 보여준다. 하지만 아직 홍합의 경우에는 보정되지 않은 요인들이 남아있는 것으로 보인다.

쌀 기준물질(NIST 1568a)의 경우, 좋은 결과를 보여주는데 이 것은 쌀 기준물질의 매트릭스가 아주 복잡하지는 않는 것으로 생각된다. 하지만 매트릭스가

복잡한 홍합(NIST 2976)의 경우에는 Br에 대한 보정을 하지 않았을 때에는 매우 심각한 오차를 보여주며 수학적 보정을 하였을 때에는 훨씬 더 좋은 결과를 보여준다. 물론 As에 대한 보정을 행하였을 때에는 좀 더 나은 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 보정후에도 m/z 74에 대한 간섭이 완전히 배제되지 않은 것으로 나타나지만 본 연구의 ID법에는 사용하지 않으므로 그 영향은 작다고 보인다. 결국 시료에 따라 매트릭스가 다르므로 간섭의 보정은 시료에 맞게 주의 깊게 행하여야 할 것으로 보인다.

3.3. SRM NIST 1568a(쌀분말)와 NIST 2976(홍합)의 분석

NIST SRM 인 쌀분말과 홍합에 대한 결과를 Table 9에 나타내었다. 그리고 각 스파이크간의 비교를 Fig. 3과 4에 나타내었다.

비교적 매트릭스가 간단한 쌀 분말시료에 대한 분석을 보면 회수율은 약 80% 근처를 나타내고 있으며 ^{77}Se 를 사용하였을 때가 조금 더 좋은 결과를 보여준다. 정밀도 또한 8% 미만의 RSD로서 신뢰할만한 값을 보여준다. 쌀분말 기준시료에 대한 실험을 수 개월 간에 걸쳐서 여러 방법으로 시도해 본 결과 그 결과 값은 일정한 값을 보여주었는데 이것으로 보아 본 실험에 대한 신뢰성은 높으며 NIST에서의 분석값이 오히려 약간의 문제점이 있지 않나 생각된다. 이는 NIST에서는 동위원소 회석법이 아닌 일반 ICP/MS방

Table 8. Improvement of measured isotopic abundances for SRM after correction of interferences from As and Br

m/z	Natural ratio, %	Rice flour (1568a)			Mussel (2976)		
		No removal	Interference removal of		No removal	Interference removal of	
			BrH ⁺	BrH ⁺ , AsH ⁺		BrH ⁺	BrH ⁺ , AsH ⁺
74	0.89	1.10	1.60	1.61	4.53	5.91	6.24
76	9.37	7.63	10.03	9.49	12.51	15.06	10.13
77	7.63	6.49	7.51	7.59	6.21	6.33	7.01
78	23.77	19.43	22.91	23.03	19.51	21.44	22.56
80	49.61	50.08	48.91	49.19	45.59	43.33	45.69
82	8.73	15.27	9.04	9.09	11.66	7.92	8.35

Table 9. The result of Se analysis for SRMs with different isotope spikes

Spike	Reference value	^{76}Se	^{77}Se	^{78}Se
SRM 1568a	0.38 ± 0.04	0.300 ± 0.026	0.323 ± 0.020	0.293 ± 0.005
SRM 2976	1.80 ± 0.15	1.774 ± 0.253	1.875 ± 0.323	1.68 ± 1.04

n = 4

AVG ± SD

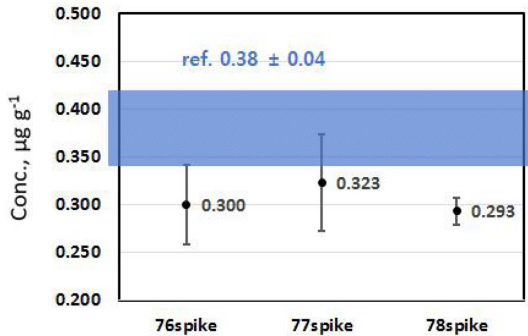


Fig. 3. Comparison of isotope spikes for Se analysis with NIST 1568a (rice flour). Error bar represents 95 % CI (n = 4).

법과 NAA(Neutron activation analysis)을 사용한 것으로 보고하고 있기 때문이다. 물론 95 % 신뢰수준으로 보면 본 실험값은 기준치와 일치함을 알 수 있다. (Fig. 3).

매트릭스가 복잡한 혼합에 대한 실험에서는 ⁷⁶Se과 ⁷⁷Se의 동위원소의 경우, 회수율이 각각 99%와 104%로 정확한 결과를 보여준다. 하지만 정밀도는 쌀분말의 경우보다 조금 나쁜 것으로 나타났는데 각각 14.3%와 17.2%의 RSD값을 보여준다. 비록 이 값은 매우 정밀하지는 않지만 ⁷⁸Se의 경우에 비교하여 보면 비교적 신뢰할 수 있는 수준으로 생각된다. 하지만 ⁷⁸Se의 경우에는 정확도도 문제이지만 무엇보다 정밀도의 문제가 심각한 것으로 나타났다. 그림에서처럼 95%의 신뢰구간으로 표시하면 ⁷⁸Se의 경우에는 0 이하의 농도까지 포함하게 되는 부정확성을 보인다. 이는 Br간섭의 영향으로 수학적 보정시, 보정인자를 조금만 잘못 적용하여도 결과가 매우 달라지기 때문에 보정인자의 값은 실험전에 잘 구해놓아야 한다. 하지만 실험때마다 여러 조건의 변화로 인하여 BrH의 생성비율이 달라질 수 있으며 이 값은 Br신호가 높음으로 인하여 ⁸⁰Se 신호값에 심한 간섭을 야기하게 된다. 결국, 셀레늄 분석의 경우에 Br의 간섭이 심할 경우에는 ⁷⁸Se을 사용하는 동위원소 회석법의 정확한 적용을 할 수 없게 된다.

Reyes의 연구⁷에서도 ⁷⁷Se을 스파이크로 사용하여 혈청에서의 Se를 정량할 때에 m/z 77/78을 사용한 경우와 m/z 77/80을 사용한 것을 비교하였을 때에 후자가 나쁜 결과를 보여줌을 보고하였고 그 이유는 혈청에서의 Br에 의한 간섭이 심하기 때문이라고 한 바 있다. 셀레늄 뿐 아니라, 다른 원소의 측정에서도 동위원소 회석법을 적용하려면 매트릭스를 주의깊게 살

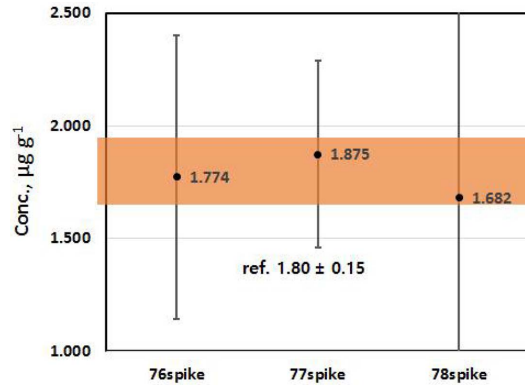


Fig. 4. Comparison of isotope spikes for Se analysis with NIST 2976 (mussel tissue). Error bar represents 95 % CI (n = 4). For 78 spike, the CI is more than 2 µg g⁻¹, which makes a negative concentration.

펴야 하고 필요하다면 매트릭스를 분리하거나 제거하는 복잡한 작업을 선행하여야 한다.¹⁶ 본 연구에서는 셀레늄을 분석할 경우에 비록 간섭이 존재하여도 매트릭스를 분리하지 않고 다른 동위원소를 택하여서 좋은 결과를 얻을 수 있음을 보일 수 있었다.

4. 결론 및 제언

셀레늄의 동위원소 회석법은 매우 까다롭고 매트릭스에 의한 영향을 많이 받고 있다. 특히 충돌셀기체로 수소를 사용하는 경우에는 셀레늄자체가 SeH⁺를 만들게 되어 정확한 동위원소비를 측정하는 것이 어려워진다. 거기에 더하여 매트릭스 원소에 따라 여러 간섭이 생기게 되며 매트릭스와 수소의 반응에 따라서도 동중간섭이 이루어지므로 결과에 오차를 주게되며 이것들을 반드시 보정하여야 할 것이다. 간단한 매트릭스의 경우에는 일차적으로는 신호가 가장 큰 ⁷⁸Se을 사용하는 것이 더 좋은 결과를 주지만 ⁷⁶Se이나 ⁷⁷Se 모두 사용할 수 있다. 하지만 복잡한 매트릭스나 Br이 많이 존재할 때에는 수학적 보정만으로는 충분하지 않으며 ⁷⁸Se 보다는 ⁷⁶Se이나 ⁷⁷Se을 사용하는 것이 유리하다. 결론적으로 시료의 특성에 따라 동위원소 스파이크를 선택하는 것이 중요하며 ⁷⁸Se를 사용해야 한다면 반드시 간섭이온을 제거하는 것이 필요할 것이다.

References

1. J. T. Daegen, M. A. Beilstein and P. D. Whanger, J.

- Inorg. Biochem.*, **41**, 261-271 (1991).
- H. Koyama, K. Omura, A. Ejima, Y. Kasanuma, C. Watanabe and H. Satoh, *Anal. Biochem.*, **267**, 84-91 (1999).
 - M. Roman, P. Jitaru and C. Barbante, *Metallomics*, **6**, 25-54 (2014).
 - H. A. Meyer, T. Endermann, C. Stephan, M. Stoedter, T. Behrends, I. Wolff, K. Jung and L. Schomburg, *PLOS ONE*, **7**(10), e46644 (2012).
 - P. Niedzielski and M. Siepak, *Polish J. of Environ. Studies*, **12**(6), 653-667, 2003.
 - F. Jenner, P. Holden, H. Mavrogenes, H. O'Neil and C. Allen, *Geostand. Geoanal. Res.*, **33**(3), 309-317 (2009).
 - L. H. Reyes, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 11-16 (2003).
 - N. Yamada, J. Takahashi and K. Sakata, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **17**(10), 1213-1222 (2002).
 - D. Schaumloeffel K. Bier and R. Lobinski, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **22**, 318-321 (2007).
 - T. Shirasaki, J. Yoshinaga, M. Morita, T. Okumoto and K. Oishi, *Tohoku J. Exp. Medicine*, **178**(1), 81-90, (1996).
 - A. Forrest, R. Kingsley and J. Schiling, *Geostand. Geoanal. Res.*, **33**(2), 261-269 (2009).
 - J. Ahn, H. Kwon and Y. Pak, *Anal. Science & Tech.*, **27**(2), 92-99 (2014).
 - M. Park and Y. Pak, *Anal. Science & Tech.*, **28**(6), 417-424 (2015).
 - H. Cho and Y. Pak, *J. Kor. Chem. Soc.*, **55**(3), 472-477 (2011).
 - M. M. Castineira, R. Brandt and A. N. Jakubowski, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370**, 553-558 (2001).
 - K. Cho, C. Park, J. Suh and M. Han, *Anal. Science & Tech.*, **13**(3), 297-303 (2000).