

<http://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.1.20>

Study on production process of graphite for biological applications of ^{14}C -accelerator mass spectrometry

Yeong Su Ha*, Kye-Ryung Kim, Yong-Sub Cho, Kyumin Choe, and Chaewon Kang

Korea Multi-purpose Accelerator Complex (KOMAC), Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI), Gyeongju, Korea.

ABSTRACT

Accelerator mass spectrometry (AMS) is a powerful detection technique with the exquisite sensitivity and high precision compared with other traditional analytical techniques. Accelerator mass spectrometry can be widely applied in the technique of radiocarbon dating in the fields of archeology, geology and oceanography. The ability of accelerator mass spectrometry to measure rare ^{14}C concentrations in microgram and even sub-microgram amounts suggests that extension of ^{14}C -accelerator mass spectrometry to biomedical field is a natural and attractive application of the technology. Drug development processes are costly, risky, and time consuming. However, the use of ^{14}C -accelerator mass spectrometry allows absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) studies easier to understand pharmacokinetics of drug candidates. Over the last few decades, accelerator mass spectrometry and its applications to preclinical/clinical trials have significantly increased. For accelerator mass spectrometry analysis of biological samples, graphitization processes of samples are important. In this paper, we present a detailed sample preparation procedure to apply to graphitization of biological samples for accelerator mass spectrometry.

Key Word: Accelerator mass spectrometry, Radiocarbon, Graphitization, Multidisciplinary research, Biological applications.

Introduction

가속기질량분석법(accelerator mass spectrometry, AMS)은 가속기를 이용한 질량분석법으로 동위원소가 가지는 질량차이를 이용해 가속기를 지나며 질량이 다른 원자가 서로 분리된 후 안정동위원소(stable isotope)와 방사성동위원소(radioisotope)의 비를 측정할 수 있는 분석법이다. 가속기질량분석기는 이온원, 저에너지 빔 수송 장치, 가속기탱크, 질량분석 장치 및 이온빔 검출장치로 구성된다(Figure 1). 이온원은 측정 샘플을 이온화하여 이온빔으로

만들어 주고, 이 이온빔이 전자석 등으로 구성된 저에너지 빔 수송 장치를 통과하여 분석하고자 하는 동위원소 외 타 원소는 걸러진다. 이 후 빔은 가속기에 주입되고 이온빔의 전자를 벗겨내어 전하를 변환하는 과정을 거쳐 2단계로 가속이 진행된다. 이 과정에서 분석하고자 하는 동위원소와 같은 질량을 가진 분자 동중체(molecular isobar)들이 걸리면서 분석의 정밀도가 높아지는 것이다. 가속기에서 나온 빔은 분석전자석(analyzing magnet) 및 정전분석기(electrostatic analyzer)를 통과하며 질량이 다른 동위원소 별로 정밀하게 분리되고 이는 전하의 양에 따라 파라데이 컵(Faraday

Received: June 15, 2020 / Revised: June 24, 2020 / Accepted: June 26, 2020

Corresponding Author : Yeong Su Ha, Korea Multi-purpose Accelerator Complex (KOMAC), Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI), 181 Mirae-ro, Geoncheon-eup, Gyeongju, Gyeongbuk, 38180, Korea. Tel: 82-54-750-5526, Fax: 82-54-750-5409, E-mail: ysha19840704@kaeri.re.kr.

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

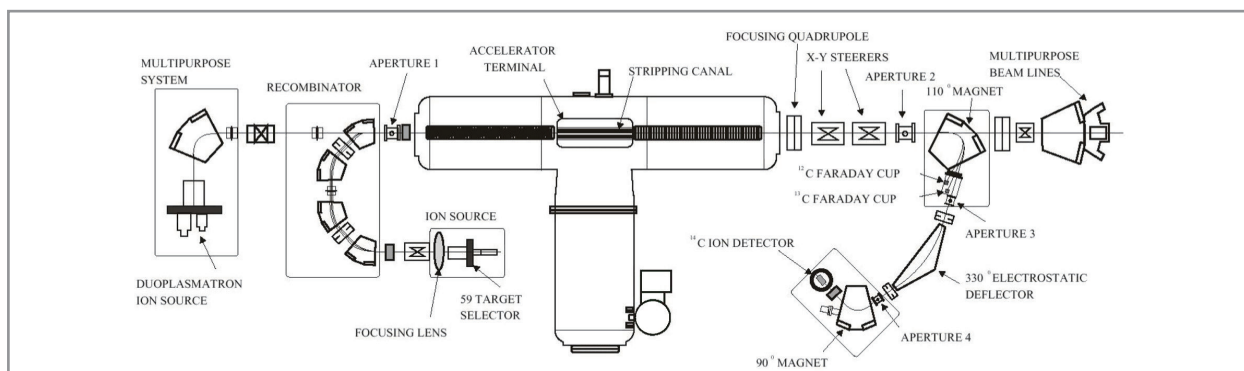


Figure 1. Schematic diagram of tandem accelerator for the AMS and the multi-purpose ion beam utilization system.

cup)이나 방사선 검출기로 그 양이 측정되어 최종적으로 동위원소의 비율이 확정된다(1). 이러한 가속기질량분석법은 매우 높은 감도를 바탕으로 탄소측정에 있어 방사성동위원소와 안정동위원소의 비가 10^{-16} 까지 측정이 가능하여 수 mg 내지는 그 보다 적은 양의 샘플(sub-mg)에 대한 분석이 가능한 장점을 가진다(2). 특히 ^{14}C 의 경우 5,730년의 긴 반감기를 바탕으로 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 비를 구하여 샘플의 연대를 측정할 수 있어 고고학, 지질학, 해양학, 환경연구 등 다양한 분야에 응용하여 사용되고 있다(3). 1980년대에 들어 Lawrence Livermore National Laboratory에서 ^{14}C -가속기질량분석법을 이용해 생체시료 분석을 통한 대사체 및 극미량의 농약성분 연구에 이용하였는데, 기존에는 샘플의 양이 너무 소량이라 측정에 어려움이 많았으나

가속기질량분석법을 이용함으로써 분석 및 정량이 용이하게 되었다(4). Lawrence Livermore National Laboratory의 연구를 시작으로 최근에는 ^{14}C -가속기질량분석법을 생물학과 바이오 테크놀로지 연구를 위한 생의학 가속기질량분석법으로 개발 및 사용하고 있는 추세이다(Figure 2).

^{14}C 은 긴 반감기로 인해 붕괴가 천천히 진행되어 액체섬광계수기(liquid scintillation counter, LSC)와 같은 decay counting 방식은 비효율적인데, 인간을 대상으로 한 방사능 표지 연구를 기준으로 충분한 검출감도를 얻기 위해서는 100~200 μCi 의 방사능을 투여해야 한다(5, 6). 반면에 가속기질량분석법의 경우 검출감도가 자연수준의 ^{14}C 수준으로 액체섬광계수기와 비교하여 적어도 10^6 배 이상 높은 attomole (10^{-18})~zeptomole(10^{-21}) 수준까지 정량이 가능하다(4, 7). 이러한 이유로 micro-dosing(치료용량의 1/100 또는 최대 100 μg 이하 투여)과 micro-tracing(방사능 비표지 치료물질은 치료용량을 투여하고 방사능표지 치료물질은 micro-dosing 수준으로 투여) 연구에 응용이 가능하여 방사능 투여량을 크게 낮추면서 생체 내 약물 및 대사산물의 ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion)를 예측할 수 있어 신약개발분야에서 가속기질량분석법의

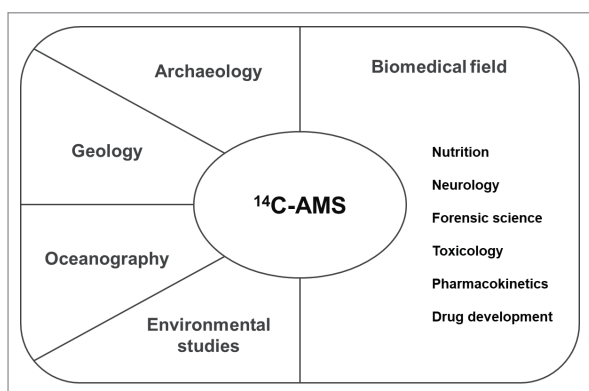


Figure 2. Major applications of AMS in various research fields.

활용빈도가 높아지고 있다(8). 신약개발에 있어 전임상 또는 초기 임상단계에서 생체 내 약물대사 및 분포에 관한 정보는 추후 임상시험에 드는 시간 및 비용을 크게 줄일 수 있을 뿐만 아니라 임상 성공률을 증가시키는데 중요한 역할을 할 수 있다(9). 최근 신약개발에 대한 성공률을 향상시키기 위해 다양한 신약 개발 패러다임이 소개되고 있는 가운데 앞선 장점들을 바탕으로 현재 다수의 다국적 제약회사에서 표준적인 임상시험의 하나로 ^{14}C -가속기질량분석법을 채택하고 있는 추세이다(10,11).

한국원자력연구원(Korea Atomic Energy Research Institute, KAERI) 양성자과학연구단(Korea Multi-purpose Accelerator Complex, KOMAC)은 2017년에 서울대학교로부터 가속기질량분석을 위한 3-MV 탄뎀 가속기와 시료 전처리 시스템을 이전해와 장비의 정상화 및 보다 정확한 가속기질량분석법의 확립을 위해 연구 중에 있다(12). 방사성탄소의 가속기질량분석을 위해서는 탄소성 물질을 흑연(graphite)으로 전환해주는 시료의 흑연화(graphitization) 과정이 필요한데, 현재 우리 연구기관은 수 mg 시료의 흑연화 과정을 연구 중에 있으며 이는 추후에 생의학 가속기질량분석법으로의 응용에 있어 중요한 과정으로 생각된다. 생의학 시료의 흑연화 과정을 최적화 하는 과정에서 옥살산(4990C)을 표준시료로 검증을 진행하는데 이는 생의학 시료 역시 진공 원심 분리기를 이용한 건조과정 이후는 일반적인 흑연화 전처리 과정을 거치기 때문이다(13,14). 이 논문에서는 우리 연구기관에서 수행한 가속기질량분석용 표적 제작을 위한 무연탄(anthracite)과 옥살산(oxalic acid)을 이용한 탄소성 물질의 흑연화 과정에 대한 연구 결과를 소개하고자 한다.

Materials

1. 장비 및 시약

흑연화 전처리 과정에 사용된 무연탄(장성, 도계)은 해당 지역으로부터 시료를 제공받았으며, 옥살산(4990C)은 방사성 탄소연대 측정법의 표준물질(standard reference material, SRM)로 National Institute of Standards and Technology (NIST)로부터 구매하였다. 시료의 연소에 사용된 틴 캡슐 (tin capsule)은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)로부터 구매하였으며, elemental analyzer (EA) 장치(NC2500, ThermoQuest, San Jose, CA, USA)를 이용해 진행하였다. 흑연화를 위한 환원과정에서 사용된 철 촉매(Fe catalyst)는 NOAH Technologies Corporation (San Antonio, TX, USA)로부터 구매하였으며, 제작된 표적(target)의 가속기질량분석은 한국과학기술연구원(Korea Institute of Science and Technology, KIST)의 6-MV 탄뎀 가속기(High Voltage Engineering Europe, Amersfoort, Netherlands)를 이용해 진행하였다.

2. 시료의 연소 및 CO_2 포집

실험에 사용하는 모든 실험 도구는 에탄올과 초순수 증류수로 세척 후 120°C 드라이오븐에서 가열 건조 후 사용하였다. 적정량의 시료 (무연탄 : 3 mg, 옥살산 : 9 mg)를 덜어 내어 틴 캡슐에 옮겨 담은 후 틴 캡슐의 입구를 포셉을 이용해 접어서 시료를 동봉하여 연소를 할 수 있도록 준비한다. 시료가 담긴 틴 캡슐을 EA 장치의 연소부에 넣어 고온의 플라즈마를 이용해 연소를 진행하고 CO_2 가스형태로 EA 장치 외부로 내보내게 된다. 외부로 나온 CO_2 가스는 연결된 관을 통해 흘러 액체질소에 담겨있는 석영 초차를

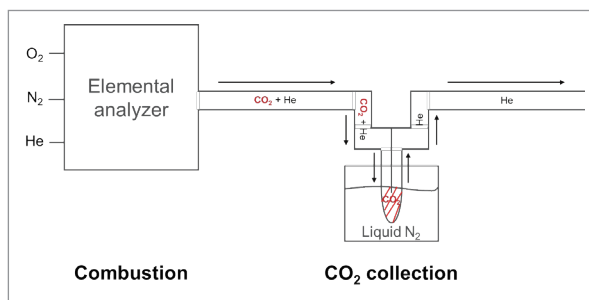


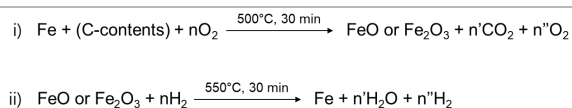
Figure 3. The schematic diagram of sample combustion and CO₂ collection system.

지나며 낮은 온도로 인해 급격하게 얼어붙으며 포집이 이루어지게 된다(Figure 3).

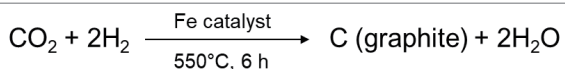
3. 흑연화

CO₂를 C (graphite)로 환원시켜 주기 위해 Fe을 촉매로 사용하게 되는 데, 3 mg의 Fe 가루를 덜어 흑연화 보트에 옮겨 담은 후 Fe가 담긴 흑연화 보트를 반응 튜브 끝으로 밀어 넣어 준다. 반응 튜브를 환원 장치에 연결한 후 Fe에 존재할지 모르는 탄소성 물질을 제거하기 위해 순수한 O₂ 가스를 반응 튜브에 넣어 준 후 500°C로 가열하여 CO₂로 만들어 준 후 진공 펌프를 이용해 환원장치 밖으로 배기 시켜준다. 그리고 O₂로 인해 Fe이 산화된 형태(FeO, Fe₂O₃)로 존재하므로 H₂ 가스를 반응 튜브에 넣어 준 후 550°C로 가열하여 Fe와 H₂O로 반응시켜 H₂O를 water trap으로 제거하여 준다(Scheme 1). CO₂가 포집된 초자를 환원장치에 연결한 후 시료를 연소하여 얻은 CO₂ 가스를 반응 튜브에 밀어 넣어 준다. 그 후

Scheme 1. Pretreatment of Fe powder to remove carbon contents and to activate Fe catalyst.



Scheme 2. Reduction of the CO₂ gas to carbon in the form of graphite.



Fe 촉매와 H₂ 가스 존재 하에서 550°C로 6시간 동안 가열시켜 흑연화를 진행한다(Scheme 2).

4. 표적제작 및 가속기질량분석

클린벤치 내에서 흑연화된 시료를 곱게 갈아준 후 표적제작용 틀에 넣고 공압프레스를 이용해 2 bar 압력으로 10초간 프레스 시켜 준다. 프레스가 완료된 표적은 지퍼백을 이용해 동봉한 후 한국과학기술연구원에 가속기질량분석을 의뢰하였다.

Results and Discussion

1. CO₂ 포집 및 흑연화

CO₂ 가스의 어는 점은 -78.5°C로 액체질소(-196°C)에 담겨 둔 석영 초자를 지날 때면 초자상에 얼어 고체 상태로 포집이 이루어지게 된다. 이 초자를 밀봉한 후 환원장치로 이동시켜 연결시켜 준다. 무연탄(장성, 도계) 3 mg 및 옥살산 9 mg의 연소를 통해 얻은 CO₂는 환원장치의 압력계를 통해 보았을 때 약 200 torr 정도의 값을 보여준다. 여기에 2.5배가 되는 500 torr의 H₂ 가스를 밀어 넣어 Fe 촉매 하에서 550°C로 반응을 진행해주게 되면 시간의 흐름에 따라 점점 압력이 떨어지다가 2시간 후면 거의 평형을 이루며 더 이상 크게 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있다(Figure 4A). 반응이 평형을 이루는 시간을 고려해 충분히 반응을 진행시켜 주기 위해 6시간 가열을 진행시켜 준 후 흑연화 과정을 종료하였다. 흑연화가 종료되면 Fe 촉매상에 흑색 또는 진한 회색으로 흑연화 된 시료를 육안으로 확인할 수 있다(Figure 4B).

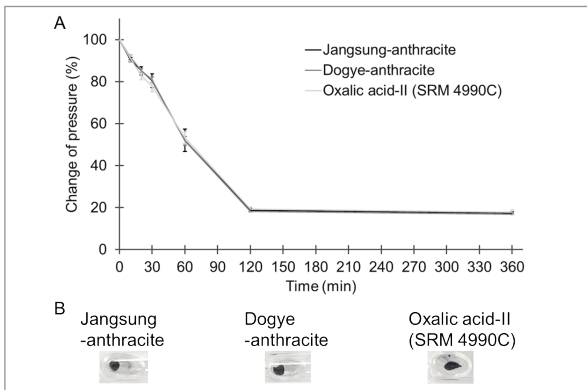


Figure 4. (A) Change of pressure versus elapsed time with 550°C of reduction temperature (n = 5 each). (B) Photograph of the graphitized samples.

2. 가속기질량분석 결과

공압프레스를 이용해 표적으로 제작된 무연탄과 옥살산 흑연화 시료의 방사성 탄소 측정을 위한 가속기질량분석을 진행하였다. 그 결과는 Figure 5와 같았다. 흑연화 과정에서 발생할 수 있는 오염이나 현재 우리 연구소의 백그라운드 수준을 측정하기 위해 무연탄을 사용해 흑연화를 진행한 후 가속기질량분석을 진행해 보았는데, 그 결과 $F^{14}C$ 값은 0.0026 ± 0.0006 를 보여주었으며 $^{14}C/^{12}C$ 비는 $3.45 \times 10^{-15} \pm 1.04 \times 10^{-15}$ 값을 보여주었다(Figure 5A). 현재 측정을 통해 얻은 백그라운드 수준은 0에 미치지 못하였지만 측정 값에 있어 one-sigma 불확실성을 기준으로 그 범위 내에 대부분의 값이 분포해 있기 때문에 정밀성에는 크게 문제가 없는 것으로 판단된다. 추후에 고고학 시료를 분석하기 위해서는 시료의 흑연화 및 표적 제작과정의 최적화를 통해 백그라운드 수준을 좀 더 낮출 필요가 있을 것으로 생각된다. 하지만 ^{14}C 을 예비화합물에 임의로 도입해 가속기질량분석에 응용하는 경우 ^{14}C 의 측정값이 훨씬 높은 생의학적 가속기질량분석법의 특징을 고려하였을 때 현재 우리 연구소에서 실험을 통해 얻은 백그라운드 수준은 문제가 되지 않을 것으로 판단된다(15,16).

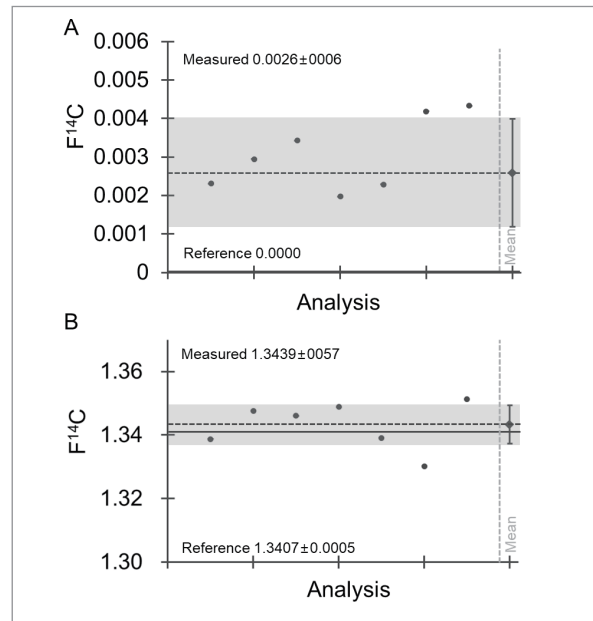


Figure 5. $F^{14}C$ values of (A) blank anthracite and (B) SRM 4990C Oxalic acid-II. Symbols and error bars to the right of the dashed light gray line show the average and its associated one-sigma uncertainty highlighted by gray bar. The solid black line show the nominal value of samples.

우리 연구소의 가속기질량분석 시스템의 정확도 및 신뢰성을 확인하기 위해 표준물질인 옥살산(SRM 4990C)의 분석을 진행한 결과 $F^{14}C$ 값은 1.3439 ± 0.0057 를 보여주었으며 $^{14}C/^{12}C$ 비는 $1.54 \times 10^{-12} \pm 1.69 \times 10^{-14}$ 값을 보여주었다(Figure 5B). 기존 보고된 표준물질의 $F^{14}C$ (1.3407 ± 0.0005)와 비교해 보았을 때 차이는 0.003 수준으로 허용 가능한 범위 내에 차이를 보여주는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5)(17,18). 무연탄 측정뿐만 아니라 옥살산 측정에서도 측정 값들이 대부분 one-sigma 불확실성 기준으로 그 범위 내에 존재하는 결과를 통해 정밀성에서는 크게 문제가 없다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.

무연탄과 옥살산의 흑연화 시료를 통해 현재 우리 연구소의 가속기질량분석 전처리 시스템이 잘 가동되고 있다는 사실을 확인할 수 있었으며, 이는 생의학 가속기질량분석에서도 시료의 흑연화에 응용

가능할 것으로 판단된다. 물론 생의학 시료의 흑연화 과정은 무연탄과 옥살산의 흑연화 과정과 조금의 차이를 보이지만 궁극적으로 금속 촉매를 이용한 흑연화라는 관점에서 현재 시스템을 조금만 수정하여 충분히 응용 가능할 것으로 생각된다.

Conclusion

^{14}C -가속기질량분석법의 다양한 응용분야 중 생의학적 응용을 위한 흑연화 과정에 대해 연구해 보았다. 백그라운드 수준을 확인하기 위한 무연탄 시료와 현 시스템의 적절성을 평가하기 위한 표준시료인 옥살산을 이용해 흑연화를 진행하였다. 그 결과 흑연화가 잘 진행되었으며 무연탄과 옥살산 시료에 대해 기존 보고된 결과들과 비교해 보았을 때 F^{14}C 값과 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율은 기대했던 값을 얻을 수 있었다. 추후에는 이러한 실험 결과를 바탕으로 생의학적 응용에 보다 용이한 시스템을 구축하고, 신약개발에 있어 다양한 목적에 맞는 시료의 흑연화에 적절한 연구방법에 대한 부가적인 실험을 계획하고 있다.

Acknowledgments

가속기질량분석에는 한국과학기술연구원 특성분석센터의 이관호 박사님과 서서라 연구원께서 도움을 주셨습니다. 이 연구는 과학기술정보통신부의 한국원자력연구원 가속기운영 연구비의 지원을 받아 수행하였으며, 다른 이해 관계는 없음을 밝힙니다.

References

1. Fifield LK. Accelerator mass spectrometry and its applications. *Rep Prog Phys* 1999;62:1223-1274.
2. Hellborg R, Skog G. Accelerator mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2008;27:398-427.
3. Kutschera W. Accelerator mass spectrometry: state of the art and perspectives. *Adv Phys-X* 2016;1:570-595.
4. Dueker SR, Vuong LT, Lohstroh PN, Giacomo JA, Vogel JS. Quantifying exploratory low dose compounds in humans with AMS. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:518-531.
5. Vogel JS. Accelerator mass spectrometry for quantitative in vivo tracing. *Biotechniques* 2005;38:S25-S29.
6. Turteltaub KW, Vogel JS. Bioanalytical applications of accelerator mass spectrometry for pharmaceutical research. *Curr Pharm Des* 2000;6:991-1007.
7. Vuong LT, Song Q, Lee HJ, Roffel AF, Shin SH, Shin YG, Dueker SR. Opportunities in low-level radiocarbon microtracing: applications and new technology. *Future Sci OA* 2016;2:FSO74.
8. Vogel JS, Love AH. Quantitating isotopic molecular labels with accelerator mass spectrometry. *Methods Enzymol* 2005;402:402-422.
9. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:203-214.
10. Bae SK, Shon JH. Microdosing studies using accelerator mass spectrometry as exploratory investigational new drug trials. *Arch Pharm Res* 2011;11:1789-1797.
11. Seymour MA. Accelerator mass spectrometry: its role as a frontline bioanalytical technique. *Bioanalysis* 2011;3:2817-2823.
12. Cho YS, Ha JM, Suk JK, Kim KR. Conceptual design of 110-degree bending magnet for 3-MV tandem accelerator beam line at KOMAC. *Transaction of the Korean Nuclear Society Autumn Meeting* 2017;17A-427.
13. Kim SH, Kelly PB, Ortalan V, Browning ND, Clifford AJ. Quality of graphite target for biological/biomedical/

- environmental applications of ^{14}C -accelerator mass spectrometry. *Anal Chem* 2010;82:2243-2252.
14. Kim SH, Kelly PB, Clifford AJ. Biological/biomedical accelerator mass spectrometry targets. 1. Optimizing the CO_2 reduction step using Zinc dust. *Anal Chem* 2008;80:7651-7660.
 15. Vogel JS, Nelson DE, Southon JR. ^{14}C background levels in an accelerator mass spectrometry system. *Radiocarbon* 1987;29:323-333.
 16. Getachew G, Kim SH, Burri BJ, Kelly PB, Haack KW, Ognibene TJ, Buchholz BA, Vogel JS, Modrow J, Clifford AJ. How to convert biological carbon into graphite for AMS. *Radiocarbon* 2006;48:325-336.
 17. Gottschalk J, Szidat S, Michel E, Mazaud A, Salazar G, Battaglia M, Lippold J, Jaccard SL. Radiocarbon measurements of small-size foraminiferal samples with the mini carbon dating system (MICADAS) at the university of bern: implications for paleoclimate reconstructions. *Radiocarbon* 2018;60:469-491.
 18. Hong W, Park JH, Kim KJ, Woo HJ, Kim JK, Choi HW, Kim GD. Establishment of chemical preparation methods and development of an automated reduction system for AMS sample preparation at KIGAM. *Radiocarbon* 2010;52:1277-1287.