

Comparison of chemical and photochemical generation of hydrides in Se speciation study with HPLC-HG-ICPMS

Hana Ji and Yong-Nam Pak*

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education
(Received September 6, 2012; Revised October 22, 2012; Accepted November 14, 2012)

HPLC-ICPMS를 이용한 셀레늄 화학종의 연구에서 화학적 및 광화학적 수소화물 발생법의 비교

지하나 · 박용남*

한국교원대학교 화학교육학과
(2012. 9. 6. 접수, 2012. 10. 22. 수정, 2012. 11. 14. 승인)

Abstract: In this research, hydride generation in HPLC-ICPMS for the selenium speciation was investigated. Chemical and photochemical vapor generation techniques were compared for the effective generation of selenium vapour. HBr/KBrO_3 was used for the chemical reduction and a UV lamp was used for the photochemical reduction. It was found out that the photochemical reduction was more effective than the chemical reduction in all of selenium species studied. The optimum conditions for the generation of vapour are 0.4% KI, 2.5% NaBH_4 , and 1.0 M HCl. The enhancement factor using a photochemical hydride generation was from 6.3 to 16.7 times for inorganic and organic selenium species.

Key words: Se, Se speciation, hydride generation, photochemical reduction, HPLC-HG-ICPMS

1. 서 론

유도결합 플라즈마 질량분석법(ICP-MS; inductively coupled plasma-mass spectrometry)은 ng/g 혹은 그 이하의 낮은 검출한계와 동위원소비의 측정능력 때문에 극미량 분석이 요구되는 여러 분야에서 널리 이용되고 있다. 하지만 아직 몇 원소들에 대하여서는 더욱 높은 감도가 요구되며 동위원소비를 측정할 때에 공존원소에 의한 매트릭스 간섭 현상이 나타난다는 단

점을 가지고 있다. 따라서 분리 기술을 이용하여 여러 성분이나 화학종들을 분리한 뒤 민감하게 분석하는 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)-ICPMS 방법이 유용하게 사용되고 있다.^{1,2} 이 외에도 모세관 전기영동(CE; capillary electrode),³⁻⁵ 기체 크로마토그래피(GC; gas chromatography)^{6,7} 등의 분리기술들이 ICPMS와 연결하여 화학종연구에 주요하게 쓰이고 있다.

셀레늄은 생체 내 필수 극미량 원소이지만 과다 섭

★ Corresponding author

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

E-mail : pakyn@knue.ac.kr

취시 독성을 갖게 되고, 결핍시 질병을 유발하기 때문에 인체에 적합한 적정량을 정확히 분석해야 한다. 셀레늄의 분석에는 무기성 Se (selenate, selenite)과 유기성 Se (selenomethylselenocystein, selenomethionine, selenocystine)을 모두 포함하므로 다양한 형태로 존재하는 여러 셀레늄 화학종들을 분석할 때에는 HPLC-ICPMS가 매우 유용하다.⁸ 또한, 시료중의 셀레늄의 양은 매우 작은 경우가 많다. 따라서 극미량으로 존재하는 여러 셀레늄 화학종들을 높은 감도로 분석하는 것이 필요하다. 수소화물 발생법(HG; hydride generation)은 시료 용액을 기체형태로 전환시켜 감도세기를 증가시킬 뿐 아니라, 매트릭스를 제거함으로써 기질 방해로부터의 해방, 시료의 점성 등에 의한 물리학적 간섭과 분광학적 방해 및 이온화 방해 등을 적게 받을 수 있는 장점들이 있다. 따라서 수소화물 발생법을 HPLC-ICPMS에 도입하면 셀레늄의 분석은 더욱 효과적이 될 것이다.

수소화물 발생장치를 HPLC에 연결하여 ICPMS로 검출하는 HPLC-HG-ICPMS 방법은 HPLC에서 분리되는 여러 셀레늄 화학종들을 증기로 전환시켜 검출하므로 감도를 개선시킬 수 있을 것이다. ICPMS를 이용한 셀레늄의 분석에 Br이 동중간섭할 수 있는데⁹ HPLC에서는 Br이 셀레늄과 함께 용리될 수 있지만 HG를 사용하면 Br이 제거되어 정확한 분석과 동위원소비의 측정이 가능하게 된다. Darrouzes와 Potin-Gautier 등¹⁰은 이온교환 크로마토 그래피에서 수소화물을 생성시켜 검출한계의 개선과 Br에 의한 간섭을 배제한 뒤 HPLC-ICPMS로 샘플에 있는 셀레늄을 민감하게 분석할 수 있었다. 감도개선은 약 3배 정도로 높지 않으나 Br의 간섭배제가 효과적이었다.

하지만 모든 셀레늄화학종들이 다 수소화물을 발생시키지는 않으며 발생효율도 다르다. 따라서 여러 화학종들이 수소화물 발생장치에 도입되기 전에 이들을 연속적으로 Se⁴⁺로 환원시켜야 한다. 여기에는 마이크로파를 이용한 방법^{11,12}이나 화학적인 방법과 광화학적 방법^{13,15}이 사용될 수 있다.

광화학적 방법은 비교적 최근에 Sturgeon¹⁴에 의하여 알려지기 시작했으며 원자흡수 분광법 또는 ICP-OES¹⁵에 이용되었다. Simon 등¹⁶은 주로 HPLC에서 연속적으로 광화학적 환원을 통하여 셀레늄의 여러 화학종들의 수소화물들을 발생시킨 뒤 원자형광법으로 검출하는 연구를 보고한 바 있다. 최근에 소개되고 있는 광화학적 수소화물 발생법은 화학적 방법에 비하여 빠르며 화학시료의 소비가 적고 수소기체의 발

생이 적어서 플라즈마의 안정성이 높으며 전이금속의 방해가 적다고 알려져 있다.¹⁷

본 연구에서는 HPLC-HG-ICPMS에서 셀레늄 화학종들을 on-line 상에서 화학적으로 환원시키는 방법과 광화학적 방법으로 환원시키는 두 방법을 비교 연구하고 최적의 수소화물 발생조건을 찾아내었다.

2. 실험 및 방법

셀레늄의 여러 화학종들을 HPLC (HPLC Model 626 dual pump, Alltech, USA)를 사용하여 분리시킨 다음 수소화물을 발생시키고 팔중극자 반응셀(Octopole Reaction Cell)이 장착되어 있는 ICP-MS (Agilent 7500ce, U.S.A.)를 사용하여 검출하였다. 컬럼은 역상 RP₈ Symmetryshield™ (Waters, U.S.A.)을 사용하였다. 수소화물 발생장치는 상업용으로 제작된 장치 FIAS (Perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하였다.

2.1. 시약 및 시료

시약과 시료의 제조는 환경적 오염을 최소화하기 위하여 clean booth내에서 진행하였다. 실험에 사용한 용기 및 기구는 진한 염산으로 산세척 후 탈 이온수로 씻고 건조하여 사용하였다. 시약제조에는 18.2 M/cm 초순수(Millipore direct-Q system) 탈 이온수를 사용하였다.

셀레늄 표준용액은 Sigma Aldrich사의 Sodium selenite (Se⁴⁺), Sodium selenate (Se⁶⁺), Se-methylselenocystein (Se-M-C), Se-DL-methionine (Se-Met), L-Selenocystein (Se-Cys)를 각각 100 ng/g를 만들어 사용하였다. 용기의 세척과 시료에 사용한 질산은 동위원수에서 구입한 반도체급 시약을 사용하였다. 메탄올은 J.T. Baker사의 99.8%의 HPLC급 시약을 사용하였고 이온쌍시약으로는 nonafluorovaleric acid를 사용하였다. 이 동상은 메탄올을 초순수 물에 넣어 5%로 묽히고 nonafluorovaleric acid를 0.05%되게 가한 뒤, 질산이나 NaOH를 사용하여 pH를 2.5로 조절하였다.

2.2. 기기의 최적조건

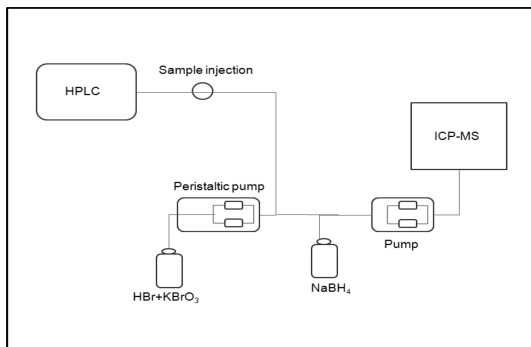
먼저 ICP-MS 기기의 최적 조건을 찾기 위하여 Agilent 회사의 tuning solution을 사용하였고 감도와 신호대 잡음의 비가 크고 % RSD가 낮은 조건을 찾았다. 충돌기체는 He와 H₂를 사용하여 비교하였고 이 때 표준용액은 셀레늄 10 ng/mL의 표준시약을 이용하였다. ICPMS와 HPLC의 최적조건을 다음 Table 1에 실었다.

Table 1. Optimized experimental conditions for ICPMS and HPLC

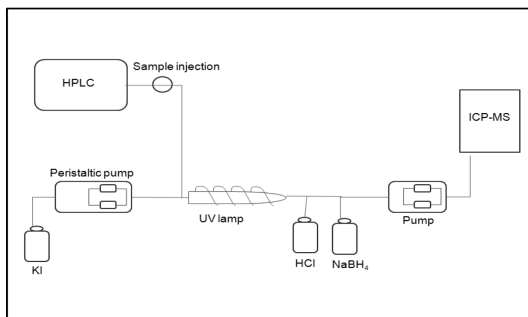
ICPMS	
RF Power (W)	1560
Carrier Gas (L/min)	0.92
Makeup Gas (L/min)	0.10
Collision gas, H ₂ (mL/min)	3.5
HPLC	
Column	Symmetryshield™ RP ₈ (3.5 μm, 4.6×150 mm)
Injection volume (μL)	50
Flow rate (mL/min)	0.90
Mobile phase	5% Methanol (pH 2.5)
Ion-pairing reagent	0.05% nonafluorovaleric acid

2.3. 실험 절차

HPLC에서 용리되는 셀레늄 화학종들은 수소화물 발생장치로 들어가기 전에 먼저 환원이 되어야 한다. 화학적 환원법에서는 HBr/KBrO₃를 용리액과 연속적으로 혼합시킨 뒤 수소화물 장치로 들어가게 하였다



(a)



(b)

Fig. 1. Schematic diagram of the HPLC-HG-ICPMS for (a) chemical reduction method and (b) photochemical reduction method.

(Fig. 1(a)). 광화학적 방법(Fig. 1(b))에서는 HPLC 용리액에 KI를 먼저 혼합시키고 반응코일을 통하여 일정시간 동안 UV를 쬐여 Se⁴⁺로 환원시켰다. 이후 환원된 셀레늄은 NaBH₄와 혼합하여 수소화물 장치로 들어가 수소화물을 발생하고 기체생성물은 Ar운반기체에 의해 ICP-MS로 들어가게 된다.

3. 결과 및 고찰

본 실험 전에는 항상 기기를 최적화 하였다. HBr/KBrO₃를 사용한 화학적 방법과 UV를 사용한 광화학적 방법에 대한 최적 조건들을 구하고 그 결과를 아래의 Table 2에 실었다. 플라즈마에서 두 방법의 조건들은 비슷하나, 운반기체와 흐름속도에 있어서 약간의 차이를 보이고 있다.

3.1. HPLC-ICPMS를 사용한 셀레늄 종들의 분리

먼저 HG를 사용하지 않은 상태에서 셀레늄 종들의 분리도와 신호 세기를 측정하였다(Fig. 2). ICPMS의 신호는 ⁷⁷Se가 사용되었는데 그 이유는 비록 신호의 세기는 작지만 다른 동위원소들에 비해서 가장 작은 동중간섭을 보여주기 때문이었다. 셀레늄 표준시료(Se⁴⁺, Se⁶⁺, Se-Met, Se-Cys, 그리고 Se-M-C)를 측정하여 좋은 결과를 얻었는데 여기에서는 대표적으로 Se⁴⁺와 Se-M-C만 나타내었다.

3.2. 화학적 환원법을 사용한 HPLC-HG-ICPMS

다음에는 HPLC에서 분리된 여러 셀레늄 화학종들을 화학적으로 환원시킨 뒤에 수소화물 발생장치로 보내고 발생된 수소화물을 ICPMS로 측정하였다. 화학적 환원제로서는 HBr/KBrO₃ 용액을 사용하였다. 여러 시약의 최적 농도를 구하여 본 결과, HBr은 47% wt/v, KBrO₃는 1.5×10⁻² M, 그리고 NaBH₄는 0.5% wt/v을 얻을 수 있었다.

Table 2. Optimum instrumental conditions for chemical and photochemical reductions for Se in HPLC-HG-ICPMS

	Chemical	Photochemical
RF power (kW)	1.6	1.5
Carrier gas (L/min)	0.92	0.6
Makeup gas (L/min)	0.10	0.6
Collision gas (mL/min)	4.0	3.5
Reagent flow rate (mL/min)	HBr/KBrO ₃ ; 1.1	KI; 0.5 KCl; 0.3 NaBH ₄ ; 0.4

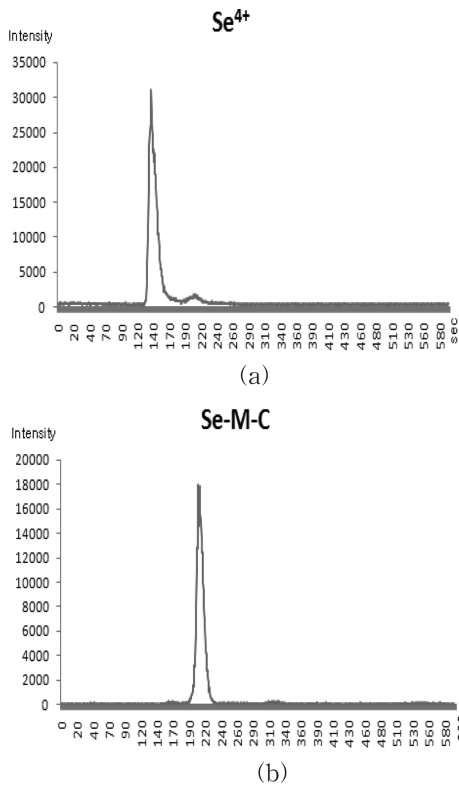


Fig. 2. Chromatogram of Se^{4+} (a) and Se-M-C (b) for HPLC-ICPMS (100 ng/g, 50 μL injection).

이 조건하에서 먼저 셀레늄 표준시료(Se^{4+} , Se^{6+} , Se-Met, Se-Cys, Se-M-C)를 측정하였다. HG를 사용하였을 때에 Se^{4+} 는 3.3 배 정도 신호세기가 커졌지만 Se^{6+} 는 측정되지 않았으며 Se-Met, Se-Cys, Se-M-C의 신호는 오히려 작아지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 즉, 화학적인 환원법으로는 HPLC의 용리액내의 셀레늄 화학종들을 효율적으로 환원시키지 못하는 것으로 보인다. 또한, Se의 동위원소비를 측정해 보면 m/z 80과 82에서 큰 오차를 보여준다. 이것은 $^{79}\text{Br}^{\text{H}^+}$ 과 $^{81}\text{Br}^{\text{H}^+}$ 의 생성으로 인한 것으로 보이며 화학적 환원제에서 사용되는 Br이 ICPMS의 충돌셀에서 반응하여 Br^{H^+} 가 생성되는 것으로 생각된다.

3.3. 광화학적 방법을 사용한 HPLC-HG-ICPMS

광화학적 환원을 용이하게 하기 위하여 먼저 용리액에 KI를 넣어주어 혼합시켜 주었다. KI의 범위를 0.1-0.5%에서 살펴본 결과, 0.4%에서 여러 셀레늄 화학종의 신호세기가 높으며 안정된 결과를 보여 주었다. 환원제와 산에 대한 최적농도를 구하기 위하여

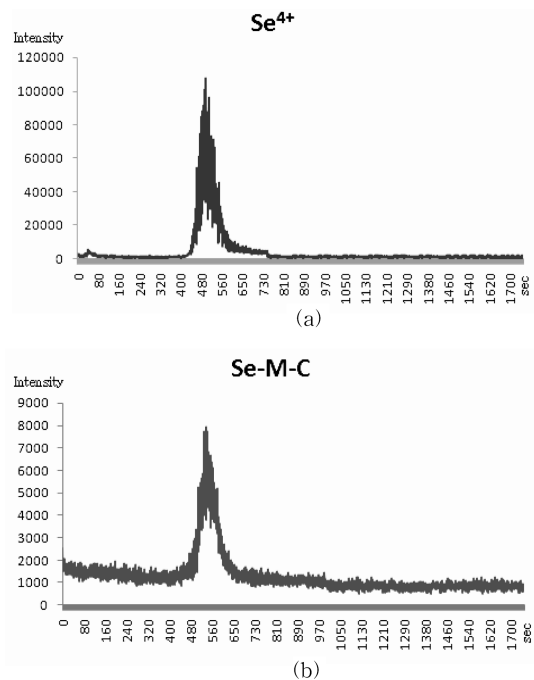


Fig. 3. Chemical reduction for Se^{4+} (a) and Se-M-C (b) in HPLC-HG-ICPMS.

NaBH_4 의 범위를 0.5-4.0%에서 살펴보고 염산 농도의 범위는 0.5-5 M에서 살펴본 결과, 비록 화학종에 따라 조금씩 감도가 달랐지만 가장 공통적인 최적조건으로 2.5% NaBH_4 , 0.4% KI, 그리고 1.0 M의 HCl을 얻었다.

광화학적 환원을 사용한 HPLC-HG-ICPMS의 결과를 Se^{6+} 와 Se-M-C에 대하여 보여주었다(Fig. 4). 화학적 환원에서는 나타나지 않았던 Se^{6+} 의 경우에도 신호가 나타나고 있음을 보인다. 수소화물 발생법을 사용하기 전과 비교하면 감도가 증가함을 알 수 있었으며 Se-M-C의 경우에도 신호가 크게 증가하였다.

화학적 방법과 광화학적 방법에 의한 수소화물의 발생을 실험하고 신호의 증가비(HG 사용 시의 신호/HG 사용하지 않을 때의 신호)를 비교하여 그 결과를 다음의 Table 3에 실었다.

화학적 환원의 경우, Se^{4+} 와 Se-M-C를 제외하고는 수소화물 발생법에 의한 신호의 증가가 보이지 않았다. 비록 신호는 약간 증가할 수 있지만 여러 화학시약들을 사용함으로써 시료가 묽어져 농도는 감소하기 때문에 결과적으로 감도의 개선은 이루어 지지 못한 편이다. 반면에 광화학적 환원은 모든 셀레늄 화학종들의 신호가 증가하였으며 Se-M-C의 경우에는 약 17

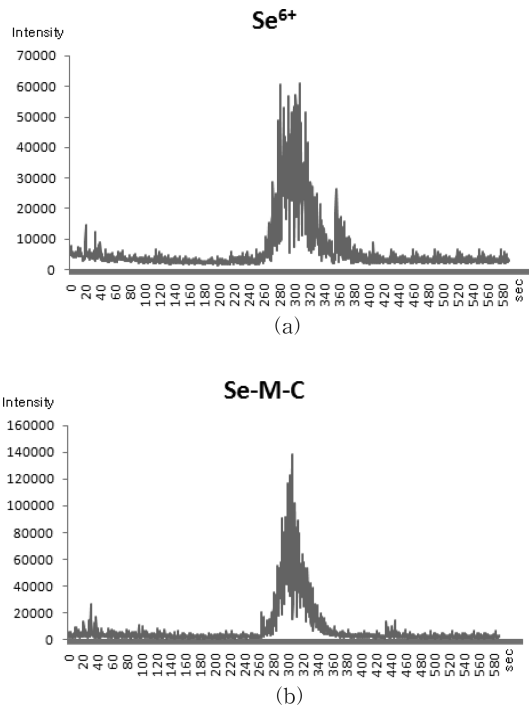


Fig. 4. Photochemical reduction for Se⁶⁺ (a) and Se-M-C (b) in HPLC-HG-ICPMS.

Table 3. Comparison of sensitivity enhancement for chemical and photochemical reduction of Se in HPLC-HG-ICPMS

	Enhancement factor*		
	Chemical HPLC-HG-ICPMS	Photochemical HPLC-HG-ICPMS	Photochemical/chemical
Se ⁴⁺	4.87	12.8	2.63
Se ⁶⁺	-	6.30	NA
Se-Met	1.09	10.0	9.17
Se-Cys	1.19	14.7	12.4
Se-M-C	2.79	16.7	5.98

*Peak area of ⁷⁷Se is used for calculation
NA; not able to calculate

배까지 증가하였다. 화학적 환원과 광화학적 환원의 신호의 증가비를 조사해보면 모든 화학종의 경우에 광화학적 환원이 월등한 감도의 증가를 나타내었고 Se-Met이나 Se-Cys을 보면 10배 정도 효율이 높음을 알 수 있다. 또한 매트릭스 간섭의 경우, 광화학적 환원의 경우에는 m/z 79에서 깨끗한 바탕을 얻을 수 있음으로 보아 Br의 간섭이 배제된 것으로 생각된다.

다만, 신호에서의 잡음이 HG를 사용하지 않은 경우와 비교해 보면 증가하였는데 이것은 수소화물 발생법의 본질상 흐름의 변화에 대하여 매우 민감하게 반응하기 때문이다. 또한 수소기체의 발생 및 격렬한 환원반응으로 잡음이 증가하는 것으로 생각되며 무엇보다도 용리액에서의 이온쌍 시약도 반응에 참여하는 것으로 생각된다. 따라서 역상보다는 이온교환 컬럼을 사용하는 것이 더 안정적인 신호를 얻을 것으로 생각되며 이 부분에 대한 연구를 지속중이다.

4. 결론 및 제언

본 연구에서는 셀레늄 화학종의 분리분석에서 감도를 증진시키기 위하여 HPLC-ICPMS에 HG를 연결하여 연구하였다. HPLC-HG-ICPMS에서 광화학적 환원을 이용한 셀레늄 분석의 최적 조건은 NaBH₄의 농도는 2.5%, KI의 농도는 0.4%이며, HCl은 1.0 M이고 운반기체의 흐름속도는 1.2 L/min이었다. 극미량으로 존재하는 여러 셀레늄 화학종들을 분석하는데 광화학적 환원이 효율적이며 감도는 약 17배 까지 증가할 수 있었다. 화학적인 방법과 광화학적인 두 방법을 비교할 때, 화학적인 방법은 감도의 개선이 적고 ⁷⁹Br⁻H⁺의 영향을 받았지만 광화학적인 방법은 모든 원소에 대하여 감도의 개선이 잘 이루어 졌으며 Br매트릭스의 간섭까지 제거할 수 있음을 알 수 있었다.

현재 on-line HPLC-HG-ICPMS 환원의 경우 크로마토그램을 보면 잡음이 심하며 피크의 폭이 넓은데 좀 더 안정적으로 수소화합물기체를 발생시키는 연구가 필요할 것으로 보인다. HPLC 이동상의 흐름속도를 조절하여 잡음을 줄이고 무엇보다 현재 사용하고 있는 C₈ 컬럼에서 이온교환 컬럼으로 바꾼다면 잡음이 많이 줄어들 것으로 기대된다. 광화학적 환원에 의한 연속적 수소화합물의 생성연구는 단지 셀레늄의 화학종연구 뿐 아니라 비소 및 다른 금속의 화학종 연구에도 폭 넓은 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학연구재단 일반연구(2012-0002946)의 지원으로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski and M. Potin-

- Gautier, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 645-650 (1999).
2. N. Jakubowski, R. Lobinskib and L. Moens, *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**, 1-4 (2004).
 3. J. A. Day, S. S. Kannamkumarath, E. Yanes, M. Montes-Bayo'n and J. A. Caruso *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**, 27-31 (2002).
 4. A. R. Timerbaev, *Talanta*, **52**, 573-581 (2000).
 5. J. W. Olesik, in 'Elemental Speciation: New Approaches for Trace Element Analysis', p. 151. J. A. Caruso, K. L. Sutton and K. L. Ackley Ed., Elsevier, New York, 2000.
 6. S. P. Mendez, M. M. Bayon, E. B. Gonzalez and A. Sanz Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1333-1339, (1999).
 7. C. Jorgelin, R. Wuillouda, A. Vonderheidea, J. Caruso, *Spectrochimica Acta*, **59B**, 755-792 (2004).
 8. H. Ge, X. J. Cai, J. F. Tyson, P. C. Uden, E. R. Denoyer, E. Block, *Anal. Commun.*, **33**, 279-287 (1996).
 9. H. Cho, Y. Pak, *J. of Kor. Chem. Soc.*, **55**(3), 472-477 (2011).
 10. A. Darrouzes and M. Potin-Gautier, *Talanta*, **75**, 362-368 (2008).
 11. M. E. Moreno, C. Perez-Conde and C. Camara, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **15**, 681-693 (2000).
 12. M. Johansson, G. Bordin and A. R. Rodriguez, *Analyt.*, **125**, 273-281 (2000).
 13. M. Vilano and R. Rubio, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **15**, 177-185 (2000).
 14. X. M. Guo, R. E. Sturgeon, Z. Mester and G. J. Gardner, *Anal. Chem.*, **75**, 2092-2100 (2003).
 15. X. M. Guo, R. E. Sturgeon, Z. Mester and G. J. Gardner, *Anal. Chem.*, **76**, 2401-2408 (2004).
 16. S. Simon, A. Barats, F. Pannier and Martine Potin-Gautier, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **383**(4), 562-569 (2005).
 17. Y. Yin, J. Liu, G. Jiang, *Trends in Anal. Chem.*, **30**(10), 1672-1684 (2011).