

Bioanalytical method validation for determination of arsenic speciation in dog plasma using HPLC-ICP/MS

Jong-Hwan Kim, Young Sang Kwon, Min-Chul Shin, Su Jong Kim¹ and Jong-Su Seo[★]

Environmental Toxicology Research Center, Korea Institute of Toxicology, Jinju 52834, Korea

¹Pharmaceutical Division, Komipharm International Co. Ltd, Shiheung 15094, Korea

(Received August 11, 2016; Revised September 23, 2016; Accepted September 23, 2016)

Dog 혈장 중 HPLC-ICP/MS를 이용한 비소 화학종 분석법 검증

김종환 · 권영상 · 신민철 · 김수정¹ · 서종수[★]

안전성평가연구소 환경독성연구센터, ¹(주)코미팜 의약사업부

(2016. 8. 11. 접수, 2016. 9. 23. 수정, 2016. 9. 23. 승인)

Abstract: The approach presented in this article refers to the bioanalytical method validation for the detection and quantitative determination of arsenic species including arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), dimethylarsinic acid (DMA) and monomethylarsonic acid (MMA) in dog plasma by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP/MS). The arsenic species were separated using an agilent As speciation column by a mobile phase of 2 mM sodium phosphate monobasic, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate, 10 mM sodium acetate, 3 mM sodium nitrate and 1 % ethyl alcohol at pH 11 (adjusted with 1M NaOH). The method validation experiment was obtained selectivity, linearity, accuracy, precision, matrix effect, recovery, system suitability, dilution integrity and various stabilities. All calibration curves showed good linearity ($R^2 > 0.999$) within test ranges. The lower limit of quantitation (LLOQ) was 5 ng/mL for As(III), As(V) and DMA, and 20 ng/mL for MMA. The system suitability and dilution values were within 6.5 % and 7.7 %. Subsequently, the developed and validated HPLC-ICP/MS method was also successfully applied to determine the arsenic speciation in dog plasma samples, and the recoveries for the spiked samples were in the range of 91.5–102.2 %. Therefore, this method could be applied to the evaluation of arsenic exposure, health effect assessment and other bio-monitoring studies in biological samples.

요 약: 비글견 혈장 중 arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), dimethylarsinic acid (DMA)와 monomethylarsonic acid (MMA)를 정량하기 위한 분석법의 유효성을 검증하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 비소를 중 분리하기 위하여 액체크로마토그래피 (HPLC) 와 결합된 유도결합 플라즈마 질량분석기 (ICP/MS) 를 사용하였으며, 비소를 정량하는 검출기에서 스펙트럼 간섭을 최소화하기 위하여 산소(O₂)를 반응기체로 하는 DRC (dynamic reaction cell)모드를 이용하였다. 분석법의 유효성을 검증하는 항목으로 선택성, 직선성,

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)55-750-3750 Fax : +82-(0)55-750-3768

E-mail : jsseo@kitox.re.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.

정확성, 정밀성, 생체시료효과, 회수율, 시스템 적합성, 회석의 타당성과 안정성 실험을 실시하였다. 선택성의 결과 정량에 방해되는 피크는 없는 것으로 확인 되었으며, 정량범위에서 평균 상관계수가 0.999 이상의 좋은 직선성을 보였다. 최저정량한계는 As(III), As(V)와 DMA는 5 ng/mL이었고, MMA는 20 ng/mL이었다. 생체시료의 영향, 시스템 적합성 과 회수율 항목을 통해 정량성에 대한 영향이 없음을 확인 하여 비글견 혈장 중 비소 종을 분리하여 정량하는 분석법의 유효성을 검증하였다. 따라서 본 연구에서 제시한 분석법은 건강에 유해한 비소의 농도를 정량 및 평가하는데 적용될 것이다.

Key words: Arsenic speciation, Dog plasma, Method validation, HPLC-ICP/MS

1. 서 론

비소(Arsenic, As)는 지각과 생물환경 중에 다양한 형태의 화합물로 널리 분포하는 금속물질로서 강한 독성을 가지고 있는 주요 환경오염물질이다. 비소화합물은 미국 환경보호국(Environmental Protection Agency, EPA)과 국제암연구소 (International Agency of Research on Cancer, IARC)에서 인체발암물질로 인간에게 노출된 경우 위해성이 매우 큰 물질로 엄격히 관리하고 있으며,¹ 발암성뿐만 아니라 피부질환과 심혈관계질환 등 인체에 위해성이 높은 화학물질로서 주목받고 있다.^{2,3}

비소의 인체노출 경로는 주로 경구와 호흡기를 통하므로 직업적으로 비소에 노출되지 않는 일반인들에 있어서 비소의 주요 노출원은 비소에 오염된 물과 토양 및 식품 섭취에 의한 노출이 대부분이다.^{4,6} 비소는 무기비소인 arsenite (As(III)), arsenate (As(V))와 유기비소인 arsenocholine (AsC), arsenobetaine (AsB), dimethyl arsenate (DMA), monomethyl arsenate (MMA), trimethyl arsenate (TMA) 등 다양한 형태로 존재하며, 일반적으로 비소의 노출에 의해 생체 내에서 확인되는 비소 화학종은 arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), dimethylarsinic acid (DMA) 그리고 monomethylarsonic acid (MMA)이다(Fig. 1).⁷

생체 내에서의 arsenate (As(V))는 arsenite (As(III))로 환원되며, arsenite (As(III))은 간에서 methylation작용으로 dimethylarsinic acid (DMA)와 monomethylarsonic acid (MMA)으로 대사되어 체외로 배설되며,⁸ 일반적

으로 유기비소인 dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA) 보다 무기비소인 arsenite (As(III)), arsenate (As(V))가 독성이 상대적으로 강한 것으로 알려져 있는데 As(III)는 As(V)보다 10 배 정도 독성이 강하고 유기비소에 비해서는 70 배 정도 독성이 강한 것으로 알려져 있다.^{9,10} 따라서 비소형태에 따른 독성의 강도가 다름에 따라 어떤 형태의 비소가 존재하는지가 독성연구에서 중요한 요소이며 비소의 위해성을 정확하게 평가하기 위한 비소화학종별 함량 조사연구에 있어서 보다 정확하고 정밀한 비소 종의 분리와 분석을 위해서는 감도가 우수한 분석기기 적용에 의한 종 규명분석이 반드시 필요하다.⁹

비소가 환경과 식품 등을 통해 사람에게 노출되어 질병을 유발하기 때문에 환경 및 식품 등에 함유되어 있는 비소 종의 농도와 체내에 있는 비소 종의 농도를 측정하기 위한 선행연구에서는 수종의 비소 종 분리 분석,¹¹ 어류중 비소의 중분화 분석,¹⁰ 수소화물 발생-유도결합 플라즈마 원자 방출 분광법을 이용한 죽염중의 비소 중분리 분석¹² 그리고 HG-AAS법에 의한 요 중 비소의 최적 분석법에 관한 연구¹³ 등의 분석연구에서 다양한 분석기술들이 비소(Arsenic) 종 분리에 적용되어 왔다.^{9,10,14} 주로 high performance liquid chromatography (HPLC)나 capillary zone electrophoresis와 같은 크로마토그래피 분리법이 이용되며 검출기로는 atomic absorption spectrometry (AAS), atomic absorption spectrometry (HG-AAS), atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) 또는 inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) 등의 검출기로 정량하는 방법이 이용되어진다.¹⁴⁻¹⁶

다양한 비소 종 분리 및 분석방법 중 최근에는 대부분 HPLC-ICP/MS를 이용하고 있다. HPLC-ICP/MS는 HPLC의 뛰어난 분리능과 ICP-MS의 매우 낮은 검출한계능을 갖춘 분석 장비로써 무기 및 유기 비소 종들을 손쉽게 검출할 수 있는 뛰어난 재현성을 보임

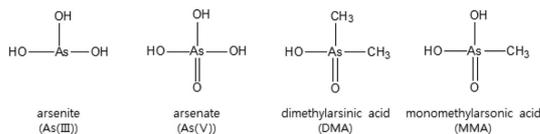


Fig. 1. Chemical structures of arsenite, arsenate, dimethylarsinic acid, monomethylarsonic acid.

으로써 활용도가 높아지고 있다.¹⁷ 이러한 ICP-MS의 높은 효율성에도 불구하고 다중 이온 간섭에 의한 질량 겹침과 간섭원에 의해 비소 중 농도의 정확한 정량 분석을 수행하기에는 많은 제약을 주고 있으며 이러한 간섭원은 미량의 비소 중분리 분석에 있어서 중요한 방해요소로 작용하고 있다. 이와 같이 스펙트럼 겹침 현상과 같은 문제점을 해소하기 위해 최근에는 DRC (Dynamic reaction cell) 기술을 이용하여 적절한 반응가스(메탄, 산소, 수소, 암모니아 등)로 간섭원을 제거하거나 혹은 분석원을 다른 질량수로 변환시켜 분자종의 간섭없이 완벽히 분석할 수 있는 기술이 도입되고 있다.⁹

최근 국내에서는 생체시료 중 비소를 포함한 중금속을 ICP-MS를 이용한 동시분석에 관하여 많은 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁸⁻²⁰ 그러나, 분석방법이 공식적이고 표준화되어 있지 않은 실정이다. 특히, 혈장 중 비소 분석을 위한 국내/외적으로 통일된 표준분석법이 확립되어 있지 않은 단계이다. 따라서 본 연구는 HPLC-ICP/MS의 DRC 기법을 적용하여 dog 혈장 중 arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), dimethylarsinic acid (DMA) 그리고 monomethylarsonic acid (MMA)의 동시 분리 분석을 위한 분석법을 검증하여 미량급속 생체노출 시험법에 기초 자료로 활용하고자 수행하였다.

2. 실험 방법

2.1. 표준물질 및 시약

시험에 사용된 표준물질 arsenite (99.99%), arsenate (99.3%)는 High-Purity Standard (North Charleston, SC, USA)에서 구입하였고 dimethylarsinic acid (DMA, 99.5%)와 monomethylarsonic acid (MMA, 99.5%)는 Chem Service (West Chester, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 내부표준물질 (internal standard, IS)로 사용된 tellurium (Te, $\geq 99.8\%$)은 Fluka (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 70% Nitric acid ($\geq 99.999\%$)와 Sodium phosphate monobasic ($\geq 98\%$), Ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt dehydrate (99.0-101.0%), Sodium acetate ($\geq 99\%$), Sodium nitrate ($\geq 99\%$)는 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) 제품을, ethanol (99.9%)은 Burdick & Jackson (Brooklyn, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Dog 공혈장은 헤파린 항응고제를 사용한 beagle dog 중을 사용하였으며, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이하에서 보관하며 사용하였다.

2.2. 검량선용 (calibration standard) 및 품질관리 시료(quality control sample, QC sample)의 조제

As(III), As(V) 그리고 DMA의 저장표준용액은 200 $\mu\text{g/mL}$, MMA는 800 $\mu\text{g/mL}$, IS는 100 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 0.2% 질산용액을 이용하여 조제를 한 후 냉장보관 하여 사용하였다. 저장표준액과 물을 이용하여 작업표준액을 조제하였으며, 농도는 As(III), As(V) 그리고 DMA는 100~10000 ng/mL , MMA는 400~40000 ng/mL , IS는 25 ng/mL 이 되도록 하였다. 검량선용 혈장시료를 만들기 위해 공혈장과 작업표준용액을 95:5 (v/v) 비율로 첨가하여 As(III), As(V)와 DMA의 검량선 농도는 5~500 ng/mL , MMA의 검량선 농도는 20~2000 ng/mL 이 되도록 조제하였고, blank (내부표준 물질을 처리하지 않은 시료)와 zero blank (내부표준 물질만을 처리한 시료)의 경우에는 작업표준용액 대신에 물을 사용하여 조제하였다. QC 혈장시료 농도로 As(III), As(V)와 DMA는 5 (최저정량한계, LLOQ), 10 (저농도 QC, LQC), 80 (중간농도 QC, MQC), 400 (고농도 QC, HQC) ng/mL 이 되도록 조제하였고, MMA의 경우 20 (LLOQ), 40 (LQC), 320 (MQC), 1600 (HQC) ng/mL 가 되도록 공혈장과 작업표준용액을 이용하여 조제하였다. 혈장시료의 전처리는 Blank와 zero blank를 포함한 검량선 혈장시료와 각각의 QC 혈장시료 50 μL 에 IS 450 μL 씩을 첨가하여 사용하였다.

2.3. HPLC-ICP/MS

분석기기는 Flexar LC (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), NexION300x ICP/MS (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 혈장 중 비소 중 분리 분석을 위하여 ICP/MS의 DRC모드를 이용하여 측정하였으며, 반응기체로 산소(O_2)를 이용하여 질량 값 91로 비소를 분석하였다. 내부표준 물질로 사용된 tellurium은 질량 값 130으로 분석하였다. 이동상은 2 mM sodium phosphate monobasic, 0.2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt dehydrate, 10 mM sodium acetate와 3 mM sodium nitrate를 1 M NaOH를 이용하여 pH 11.0 \pm 0.2로 맞추는 후 ethanol을 1% 되도록 첨가하였다. 비소 중 분리를 위한 컬럼은 Agilent사의 G3288-80000, 4.6 \times 250 mm (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며 비소 중 분리 분석을 위한 HPLC-ICP/MS 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

2.4. 분석법 검증

생체시료중의 분석물질을 정량 분석함에 있어서 분

Table 1. HPLC-ICP/MS operating conditions and parameters

HPLC condition	
Mobile phase	2 mM Sodium phosphate mono basic, pH 11.0
	0.2 mM EDTA
	10 mM CH ₃ COONa
	3.0 mM NaNO ₃
	1% ethanol
Flow rate	1 mL/min
Column	G3288-80000 (4.6 × 250 mm)
Pump program	Equal time 5 min
	Run 13 min
Injection volume	50 µL
ICP/MS condition	
Nebulizer Gas Flow	1.07
Auxiliary Gas Flow	1.20
Plasma Gas Flow	18.00
Deflection Voltage	-8.50
ICP RF Power	1600
Gas A Flow	0.5

석법 검증은 중요하며 검증단계는 분석법의 신뢰성과 재현성을 증명하는 모든 과정이라고 할 수 있다.²¹ Dog 혈장 중 As(III), As(V), DMA, MMA를 정량하기 위한 분석법 검증을 위해 선택성, 직선성, 정확성, 정밀성, 생체시료 효과, 회수율, 시스템 적합성, 회석도, 그리고 안정성 항목을 실시하였다. 분석법 검증은 FDA 가이드라인 ‘Guideline for Industry on Bioanalytical Method Validation’에 의거하여 수행하였다.²²⁻²³

선택성은 최소 6 개체의 공혈장으로 부터 blank, zero blank, LLOQ 시료를 이용하여 평가하였으며, 직선성은 검량선의 blank, zero blank와 최저정량한계를 포함한 최소 6농도의 시료로 확인하였다.

정확성은 분석결과로 얻어진 측정값과 실제값의 근접성을 나타내는 것으로 상대오차 (Relative Error, % RE)로 표현하였고, 정밀성은 한 농도를 반복 분석하였을 때 측정값들 간의 근접성을 나타내며 변동계수 (Coefficient Variation, % CV)로 나타내었다. % RE와 % CV의 계산식은 아래의 계산식에 따라 계산하였다.

$$\% RE = [(Calculated\ concentration - Theoretical\ concentration) / Theoretical] \times 100$$

$$\% CV = (Standard\ deviation\ of\ concentration / Mean\ concentration) \times 100$$

정확성과 정밀성은 LLOQ, LQC, MQC, HQC를 각 농도당 6 개씩 분석하였으며, 배치간 정확성과 정밀성을 측정하기 위하여 3배치의 시험결과로 평가하였다.

생체시료영향은 이동상에 첨가한 시험물질의 피크면적 (A)와 공혈장을 전처리한 후 시험물질을 첨가한 시료의 피크면적 (B)를 비교하여 아래의 계산식을 적용하여 평가하였다.

$$Matrix\ effect\ (\%) = (B / Mean\ of\ A) \times 100$$

회수율은 공혈장을 전처리한 후 시험물질을 첨가한 시료 (C)와 시험물질을 처리한 후 회석된 시료 (D)를 비교하여 평가하였다. 생체시료효과와 회수율은 6개 체에서 얻어진 공시료를 이용하여 LQC, MQC, HQC 농도에서 측정하여 아래의 계산식에 따라 평가하였다.

$$Recovery\ (\%) = (Mean\ of\ D / Mean\ of\ C) \times 100$$

시스템적합성은 LLOQ 농도의 시료를 6번 반복 주입하여 피크면적으로 평가하였다. 회석도는 시료의 농도가 검량선 최고농도를 초과하거나 분석에 사용될 시료의 양이 충분하지 못한 경우에 동일 생체시료로 회석을 하여도 분석에 영향이 없음을 입증함으로써 평가하였다. 고농도의 혈장시료를 공혈장으로 10 배, 50 배로 6회씩 회석하여 회석도를 측정하였다.

Carry-over effect는 시료를 연속하여 측정 할 때 분석기기 내에서 바로 전에 주입된 시료의 잔류된 분석물질 또는 내부표준물질이 다음 시료에 영향이 있는지를 확인하는 것이며, 고농도의 시료 또는 검량선의 최고정량한계 시료 바로 다음에 blank 시료를 측정하여 확인하였다.

재주입재현성은 시료분석 중 기기고장 등의 이유로 분석이 중단된 후 재주입을 하여 분석을 해도 결과에 영향이 없음을 입증하는 것으로 검량선과 LQC, HQC 농도의 시료를 자동주입기에 48시간 보관 후 재주입 분석을 하여 측정하였으며, 부분 배치 및 전체 배치의 재주입 재현성이 있는지를 확인하기 위하여 본래 검량선 및 재주입된 검량선으로 결과를 측정하였다.

안정성은 시료의 처리과정 중 단기간 안정성, 추출 후 안정성 그리고 냉/해동 안정성을 확인하였으며, 단기 안정성은 상온에서 24시간 보관 후 평가하였고, 추출 후 안정성은 전처리한 시료를 자동 주입기에 47시간 보관 후 평가하였다. 냉/해동 안정성의 경우에는 4 번의 냉/해동 과정을 거친 후 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

HPLC-ICP/MS를 이용한 혈장 중 비소 분석방법의 선택성(특이성)을 평가하기 위하여 6개체의 공혈장을 사용하여 blank, zero blank 및 As(III), As(V), DMA, MMA 와 IS(내부표준물질)이 처리된 LLOQ 농도의 시료를 이용하여 평가하였다(Fig. 2) 분석대상물질이 용리되는 구간에서 간섭피크는 관찰되지 않았으며, 직선성은 각 비소 종에 대한 상관계수 (r^2)는 0.99908~0.99949의 범위를 나타내었다(Fig. 3). 검량선의 정확성을 평가하는데 기준인 상관계수(coefficient of correlation, r)는 0.99 이상의 만족하는 결과를 얻을 수 있었다.

분석법의 정확성과 정밀성은 분석결과로 얻어진 측정값과 실제값의 근접성을 나타내는 것으로 상대오차(%RE) 변동계수(%CV)로 나타내었고, LLOQ를 포함한 4농도를 6반복으로 분석하였으며, 4농도의 정확성(%RE) 및 정밀성(%CV)에 대한 배치내 및 배치간의 결과를 Table 2에 나타내었다. 배치내 및 배치간의 정확성(%RE)과 정밀성(%CV)은 15% 이내였으며, LLOQ에서는 20% 이내의 범위를 보여 비소 종 분리에 적합한 수준이라 판단되었다.

생체시료효과와 회수율은 LQC, MQC 및 HQC의 농도 수준으로 평가하였으며, 그 결과는 Table 3과 4에 나

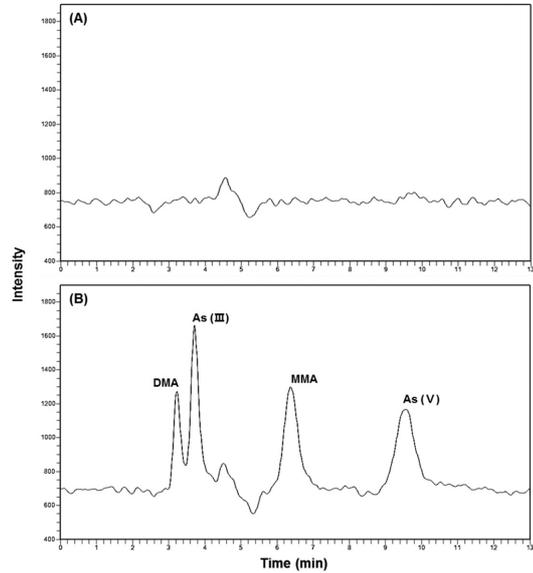


Fig. 2. HPLC-ICP-MS of (A) blank plasma, (B) blank plasma spiked with the four arsenic species at LLOQ (DMA: 5 ng/mL, t_R = 3.2 min; As (III): 5 ng/mL, t_R = 3.7 min; MMA: 20 ng/mL, t_R = 6.4 min; As (V): 5 ng/mL, t_R = 9.8 min).

타내었다. 생체시료효과와 회수율은 As(III)는 103.7~109.7%, As(V)는 86.6~97.2%, DMA는 90.1~97.2%,

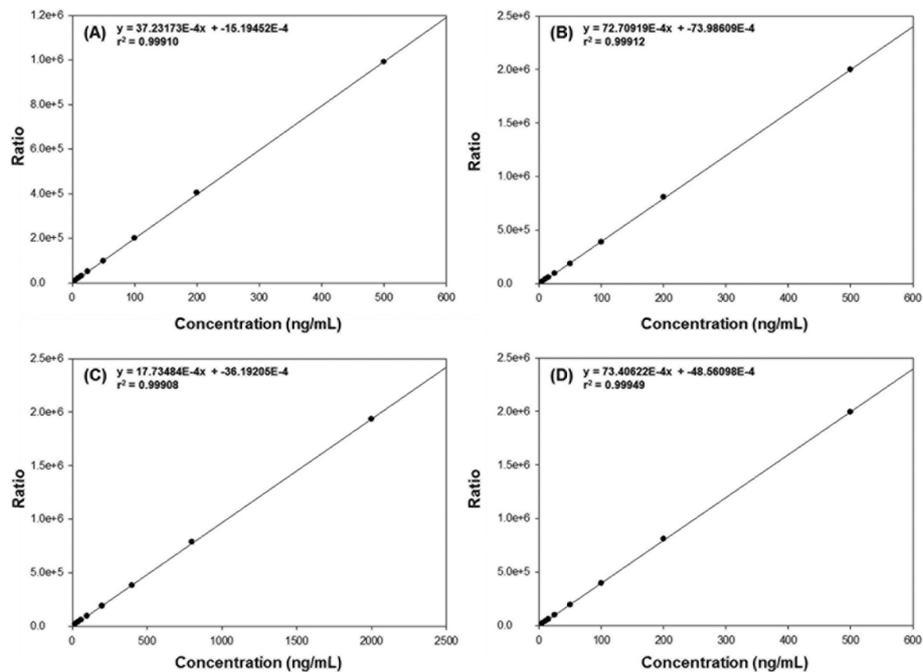


Fig. 3. Representative calibration curves of (A) DMA, (B) As(III), (C) MMA and (D) As(V) in dog plasma.

Table 2. Intra- and inter-batch accuracy and precision of As(III), As(V), DMA and MMA in dog plasma (n= number of samples)

	Nominal concentration (ng/mL)			
	5	10	80	400
As(III)				
Intra-batch % RE (n=6)	16.8	2.5	0.7	2.9
Inter-batch % RE (n=18)	8.9	1.6	1.5	3.4
Intra-batch % CV (n=6)	3.1	5.6	2.5	3.3
Inter-batch % CV (n=18)	7.9	4.4	3.5	4.3
As(V)				
Intra-batch % RE (n=6)	-4.4	-3.7	-2.0	5.7
Inter-batch % RE (n=18)	3.0	1.5	-0.9	4.6
Intra-batch % CV (n=6)	4.8	8.5	1.4	3.3
Inter-batch % CV (n=18)	7.6	7.6	2.7	4.9
DMA				
Intra-batch % RE (n=6)	14.5	8.8	-1.0	0.1
Inter-batch % RE (n=18)	5.9	4.8	0.4	1.6
Intra-batch % CV (n=6)	3.2	4.6	2.8	3.2
Inter-batch % CV (n=18)	9.1	5.2	3.3	5.2
MMA				
	Nominal concentration (ng/mL)			
	20	40	320	1600
Intra-batch % RE (n=6)	13.5	3.7	-4.3	3.3
Inter-batch % RE (n=18)	5.3	2.4	-1.5	3.5
Intra-batch % CV (n=6)	7.3	3.8	2.7	3.4
Inter-batch % CV (n=18)	8.0	4.0	3.4	4.9

MMA는 92.5~100.7%로 생체시료효과를 나타내었으며, %CV 값은 0.9~7.6%의 결과를 보였다(Table 3), 회수율은 As(III)는 93.0~99.4%, As(V)는 91.5~97.2%, DMA는 93.0~102.2%, MMA는 91.8~98.8%의 범위를 보였고, %CV 값은 3.2~4.8%의 결과를 나타내어 생체시료효과와 회수율이 15% 이내의 만족스러운 결과를 확인할 수 있었다.

시스템적합성을 평가하기 위하여 As(III), As(V), DMA, MMA의 LLOQ 농도의 시료를 6회 반복 주입하여 얻은 분석성분의 면적의 %CV 결과는 각각 5.0, 6.5, 3.6, 5.0%로 평가기준에 적합하였다(결과 미제시). 분석법의 회석 영향평가는 고농도의 시료를 동일한 공시료를 이용하여 10 배, 50 배로 각 6 개씩 회석하여 만들어 분석하였고, 측정된 농도의 %RE와 %CV로 평가하였다. 그 결과 %RE는 -13.8~-6.3%, %CV는 0.8~7.7%의 범위의 결과를 보였다(Table 5).

분석법 적용 시 시료의 처리과정 중 단기간의 보관, 냉/해동 및 분석과정 진행 후 분석대상물질의 안정성

Table 3. Matrix effect of As(III), As(V), DMA, MMA in dog plasma

	Nominal concentration (ng/mL)		
	10	80	400
As(III)			
Matrix effect (%)	103.7	106.9	109.7
CV (%)	4.7	2.5	1.3
As(V)			
Matrix effect (%)	97.2	88.8	86.6
CV (%)	7.6	1.8	1.9
DMA			
Matrix effect (%)	90.1	95.5	97.2
CV (%)	3.6	0.9	1.6
MMA			
	Nominal concentration (ng/mL)		
	40	320	1600
Matrix effect (%)	92.5	100.7	97.4
CV (%)	2.1	1.8	2.1

Table 4. Recovery of As(III), As(V), DMA, MMA in dog plasma

	Nominal concentration (ng/mL)		
	10	80	400
As(III)			
Recovery (%)	99.5	98.6	92.9
CV (%)	4.5	3.3	1.4
As(V)			
Recovery (%)	97.7	96.2	91.5
CV (%)	9.7	4.1	2.0
DMA			
Recovery (%)	102.3	99.6	93.0
CV (%)	4.1	4.5	2.0
MMA			
	Nominal concentration (ng/mL)		
	40	320	1600
Recovery (%)	95.6	98.8	91.8
CV (%)	7.3	2.3	2.4

을 평가하기 위해 dog 혈장 내 As(III), As(V), DMA, MMA의 단기 안정성은 약 -80 °C에서 냉동보관 중이던 LQC와 HQC 농도의 시료를 실온에서 24시간 경과 후 분석하여 평가하였고, 추출 후 안정성은 전처리 후 실온의 자동주입기에서 47시간동안 보관 후 분석하여 변화율을 확인하였다. 냉/해동 안정성은 LQC

Table 5. Dilution effects of As(III), As(V), DMA, MMA in dog plasma

Theoretical concentration (ng/mL)	Dilution factor	Found concentration		
		Mean±SD (ng/mL)	%RE	%CV
As(III)				
80	50	71.0401±5.46	-11.2	7.7
400	10	359.6517±6.82	-10.1	1.9
As(V)				
80	50	68.9905±4.22	-13.8	6.1
400	10	374.8050±2.94	-6.3	0.8
DMA				
80	50	73.6106±3.47	-8.0	4.7
400	10	355.3168±7.26	-11.2	2.0
MMA				
320	50	292.3339±14.92	-8.6	5.1
1600	10	1386.8218±18.57	-13.3	1.3

Table 6. Stability of As(III), As(V), DMA, MMA in dog plasma

	Initial concentration (ng/mL)	Mean Found concentration (ng/mL)	% Change ^{a)}
As(III)			
Short-term stability (n=3, 24 hr)	10.1395	8.7393	-13.8
Post-preparative stability (n=3, 47 hr)	417.9852	359.5850	-14.0
Freeze/Thaw stability (n=3, 4 cycles)	9.9667	10.4349	4.7
	403.5599	375.2424	-7.0
	10.1395	10.6551	5.1
	417.9852	415.0078	-0.7
As(V)			
Short-term stability (n=3, 24 hr)	9.5975	10.7439	11.9
Post-preparative stability (n=3, 47 hr)	408.9801	384.1728	-6.1
Freeze/Thaw stability (n=3, 4 cycles)	10.8399	9.3697	-13.6
	427.2464	398.5307	-6.7
	9.5975	9.2095	-4.0
	408.9801	435.8086	6.6
DMA			
Short-term stability (n=3, 24 hr)	9.2514	9.4950	2.6
Post-preparative stability (n=3, 47 hr)	400.0800	367.5686	-8.1
Freeze/Thaw stability (n=3, 4 cycles)	9.2906	10.6708	14.9
	406.5194	377.2570	-7.2
	9.2514	10.6287	14.9
	400.0800	429.3940	7.3
MMA			
Short-term stability (n=3, 24 hr)	43.9702	38.3462	-12.8
Post-preparative stability (n=3, 47 hr)	1650.7687	1499.9162	-9.1
Freeze/Thaw stability (n=3, 4 cycles)	38.7744	40.3627	4.1
	1577.2715	1546.1416	-2.0
	43.9702	39.0337	-11.2
	1650.7687	1651.4328	0.0

^{a)}%Change = (Mean concentration of stored samples - Mean concentration of initial samples) / Mean concentration of initial samples × 100

와 HQC 농도의 시료를 초회에는 약 -80 °C에서 24시간 이상보관 후 실온에서 완전히 해동하였으며, 이 후 3번의 냉/해동을 거치는 동안 약 -80 °C에서 12시간 이상보관 후 실온에서 완전히 해동하여 4번째 냉/해동이 순환이 되었을 때 분석하여 평가하였다. 분석법 적용의 안전성평가 결과는 대상 분석종의 초기 측정된 농도 평균의 ±15% 이내인 결과를 보였다(Table 6). 본 연구에서 적용된 분석법은 시료의 처리과정 또는 특정시간 동안에 생체시료 내 분석대상 물질이 안정성이 유지되는 것으로 판단되었다.

4. 결 론

본 연구에서는 혈장 중 비소의 극미량 분석방법을 확립하기 위한 분석 조건을 정립하여 HPLC-ICP/MS를 이용하여 dog 혈장 중 As(III), As(V), DMA, MMA의 분석법을 확립하였다. 본 분석법에서 As(III), As(V), DMA의 정량범위는 5~500 ng/mL, MMA의 정량범위는 20~2000 ng/mL이었으며, 검량선의 평균상관계수(r)는 최소 0.99908이상으로 양호한 직선성을 나타내어 혈장 중 As(III), As(V), DMA, MMA의 농도를 정량할 수 있음을 확인 하였다. 뿐만 아니라 분석법의 선택성, 직선성, 정확성, 정밀성, 생체시료효과, 회수율, 시스템 적합성, 희석도, 안정성 평가를 통해 분석법 검증을 수행하였다. 본 연구를 통해 제시된 분석법은 혈장 중 비소 중의 생체모니터링 관련 응용분야에 유용한 기초 자료가 될 것으로 판단된다.

References

1. M. K. Paik, W. I. Kim, J. H. Yoo, J. K. Kim, M. J. Kim, G. J. Im, M. K. Hong and A. S. Om, *J. Food Hyg. Safety*, **25**(1), 16-23 (2010).
2. M. Y. Lee, B. I. Jung, S. M. Chung, O. N. Bae, J. Y. Lee, J. D. Park, J. S. Yang, H. Lee and J. H. Chung, *Environ. Health Perspect.*, **111**(4), 513-517 (2003).
3. J. Mahata, A. Basu, S. Ghoshal, J. N. Sarkar, A. K. Roy, G. Poddar, A. K. Nandy, A. Banerjee, K. Ray, A. T. Natarajan, R. Nilsson and A. K. Giri, *Mutat. Res.*, **534**(1-2), 133-143 (2003).
4. S. K. Lee, J. Y. Yang, K. W. Kim, S. Y. Lee, T. J. Kwon and Y. C. Yoo, *J. Environ. Toxicol.*, **18**, 101-109 (2003).
5. H. K. Das, A. K. Mitra, P. K. Sengupta, A. Hossain, F. Islam and G. H. Rabbani, *Environ. Int.*, **30**(3), 383-387

- (2004).
6. J. W. Chen, H. Y. Chen, W. F. Li, S. H. Liou, C. J. Chen, J. H. Wu and S. L. Wang, *Chemosphere*, **84**(1), 17-24 (2011).
 7. P. Bhattacharya, G. Jacks, K. M. Ahmed, J. Routh and A. A. Khan, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **69**(4), 538-545 (2002).
 8. R. Bhattacharyya, D. Chatterjee, B. Nath, J. Jana, G. Jacks and M. Vahter, *Mol. Cell. Biochem.*, **253**(1-2), 347-355 (2003).
 9. G. J. Jeong and D. C. Kim, Speciation analysis of arsenic species in surface water. *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **30**(6), 621-627 (2008).
 10. H. Choi, S. K. Park, D. S. Kim and M. H. Kim, Risk assessment of arsenic in agricultural products. *Korean J. Environ. Agric.*, **29**(3), 266-272 (2010).
 11. O. N. Bae, M. Y. Lee, S. M. Chung, J. H. Ha and J. H. Chung, *J. Environ. Toxicol.*, **21**(1), 1-11 (1986).
 12. K. Y. Ryu, S. L. Shim, I. M. Hwang, M. S. Jung, S. N. Jun, H. Y. Seo, J. S. Park, H. Y. Kim, A. S. Om, K. S. Park and K. S. Kim, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**(1), 1-6 (2009).
 13. K. Y. Song, J. H. Park, Y. J. Cho, W. K. Baek, K. Y. Kwon, H. S. Kim and C. M. Kang, *Korean J. Pediatr.*, **43**(3), 327-334 (2000).
 14. E. Terlecka, *Environ. Monit. Assess.*, **107**(1-3), 259-284 (2005).
 15. A. M. Featherstone, E. C. Butler, B. V. O'Grady and P. Michel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**(12), 1355-1360 (1998).
 16. T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Tominaga and A. Miyazaki, *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**(12), 1546-1552 (2000).
 17. S. K. Shin and T. S. Kim, *Anal. Sci. Technol.*, **15**(2), 1-38 (2002).
 18. S. Y. Lee, H. J. Oh, Y. H. Choi, J. W. Kim and S. H. Kim, *Korean J. Lab. Med.*, **24**(6), 362-370 (2004).
 19. Kim S. R. 'Analytical method for lead and cadmium in whole blood by inductively coupled plasma-mass spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry' Ph. D. Dissertation, Soonchunhyang University, 2008.
 20. Kim Y. J. 'The study on trace heavy metal analysis and arsenic speciation using ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometry)' Ph. D. Dissertation, Korea University, 2011.
 21. S. B., Lee, J. S. Yang, S. B. Choi and H. S. Shin, *Anal. Sci. Technol.*, **25**(3), 190-196 (2012).
 22. Guideline for Industry on Bioanalytical Method Validation, FDA/CDER, May 2001.
 23. Guideline on Bioanalytical Method Validation, MFDS, Dec, 2013.