

## 셀레늄 함유 건조효모제제 중 셀레늄 분석방법에 관한 연구

오세종<sup>†</sup> · 오영택 · 윤원용 · 박성배

서울특별시보건환경연구원  
(1994년 2월 2일 접수)

### Determination of Selenium in Dried Yeast Preparations

Sea Jong Oh<sup>†</sup>, Young Taek Oh, Won Yong Yoon and Sung Bae Park  
Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment  
(Received February 2, 1994)

In order to improve the sensitivity of the current assay methods of selenium in dried-yeast preparations, atomic absorption spectrophotometry (AAS), high performance liquid chromatography (HPLC) and UV-Vis spectrophotometry were employed. The sample was prepared with the digestion by acid mixture of hydrochloric acid, nitric acid and perchloric acid after elimination of ether-soluble substances. The range of quantitation of selenium was 1.0~6.0 µg/ml by UV-Vis spectrophotometry, 5.0~20.0 µg/ml by HPLC and 0.03~0.10 µg/ml by AAS.

**Keywords**—Selenium, Dried-yeast preparation, Assay

여러 종류의 화합물의 형태로 존재하는 셀레늄은 그 농도에 따라서 생체내 필요 미량원소로 작용하여 과산화지질 분해제거, 심근 퇴행성 질환과 심장내에 현저한 효과가 있으며 암예방과 치유, 중금속해독 및 인체 신진대사에 필요한 역할을 하지만 장기간 필요량 이상(200 µg/day) 투여하면 간장장애, 신장장애, 피부염, 발암성 등이 보고되고 있다.<sup>1,2)</sup>

셀레늄을 함유하는 제제는 셀레늄 함유 건조효모와 토코페롤과의 복합 연질캡셀로 오일 성분이 많아 일반 습식 분해나 산소연소 플라스크법에 의해서는 분해가 충분치 않기에 이 제제를 분석하기 위한 분해방법과 지금까지의 제제중 셀레늄 검정방법을 개선하여 2,3-디아미노나프탈렌 유도체(4,5-benzopiaselenol) 합성을 이용한 흡광 광도법 및 고속액체크로마토그래프법(HPLC)과 Continuous Hydride Generation을 이용한 원자흡광측정법(atomic absorption spectrophotometry, AAS)에 대하여 검사하였기에 보고하고자 한다.<sup>3-6)</sup>

### 실험 방법

#### 기기

DU-70 흡광도측정기(Beckman), HPLC(Waters associates, Model 440, Waters 484 Tunable Absorbance Detector, Waters 746 Data Module), 원자흡광도측정기(Hitachi Z-8100 Polarized Zeeman, HFS-2-Hydride Formation System) 등을 실험에 사용하였다.

#### 시약

2,3-디아미노나프탈렌, 시클로헥산 및 과염소산(70%)은 Sigma Chemical사 제품을, 암모니아수, 염산, 히드록실아민, 염산, 질산 및 sodium borohydride는 GR 등급을 사용하였다.

#### 시액의 조제

디아미노나프탈렌 용액—2,3-디아미노나프탈렌 100 mg과 염산 히드록실아민 500 mg을 0.1 N 염산에 녹여 100 ml로 하였다.

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

**표준원액의 조제**—금속 셀레늄 100 mg을 정확히 칭량하여 100 ml 용량 플라스크에 넣고 50 ml의 질산을 넣어 가온 용해하여 증류수로 표선까지 채워 1000 µg/ml의 표준원액을 조제하였다.

**표준액의 조제**—표준원액을 증류수로 희석하여 표준액 농도를 셀레늄이 ml당 3, 5, 10, 30, 50, 60, 100, 200 µg이 되게 만들었다.

#### 흡광 광도법에 의한 정량법

**검량선의 작성**—표준액 10, 30, 60 µg/ml을 각각 1 ml씩을 취해 증류수 10 ml을 가한 후 암모니아수로 pH를 2.0±0.2로 조절한 다음 염산 히드록실아민 200 mg을 넣고 가온 용해시킨 후 2,3-디아미노나프탈렌시액 10 ml을 넣고 100분 동안 방치시켰다. 그 다음, 분액여두로 옮기고 시클로헥산 10 ml를 정확하게 가해 진탕, 추출하고 정지 후 시클로헥산층을 취해 소량의 무수 황산나트륨으로 탈수한 후 378 nm에서 공시험을 대조로 흡광도를 측정하여 Fig. 1과 같은 검량선을 작성하였다.

**검액의 조제 및 분석**—셀레늄 50 µg에 해당되는 양의 시료를 정확히 취하여 Ether 50 ml씩 2회 추출, 원심분리한 후 그 잔사에 질산 5 ml, 염산 2.5 ml, 과염소산(70%) 5 ml를 가하여 가온 용해시킨 다음 분해장치에 옮기고 약간의 증류수로 원심분리관을 세척하여 분해장치에 모아서 저온에서 용액이 무색·미황색이 되고 과염소산의 흰 연기가 날 때까지 가열분해시킨 후 200 ml 비이커에 분해액과 증류수 약 50 ml로 세척한 세액을 모아서 암모니아로 pH 2.0±0.2로 조절한 다음 표준액과 동일하게 조작하고 시클로헥산층을 378 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### HPLC법에 의한 정량법

**검량선의 작성**—표준액 50, 100, 200 µg/ml를 각각 1 ml씩 취하여 이후 상기 흡광광도법에 의한 분석법과 동일하게 조작하여 시클로헥산층 10 µl씩 Table I의 조건에 따라 칼럼에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 피이크 면적법으로 Fig. 2와 같은 검량선을 작성하였다.

**검액의 조제 및 분석**—셀레늄 50 µg에 해당되는 양의 시료에 대하여 상기 흡광광도법과 동일한 방법으로 조작하고, 시클로헥산층 10 µl씩을 HPLC에 주입하여 셀레늄의 양을 정량하였다.

#### AAS법에 의한 정량법

**검량선의 작성**—표준액 3, 5, 10 µg/ml를 각각 1

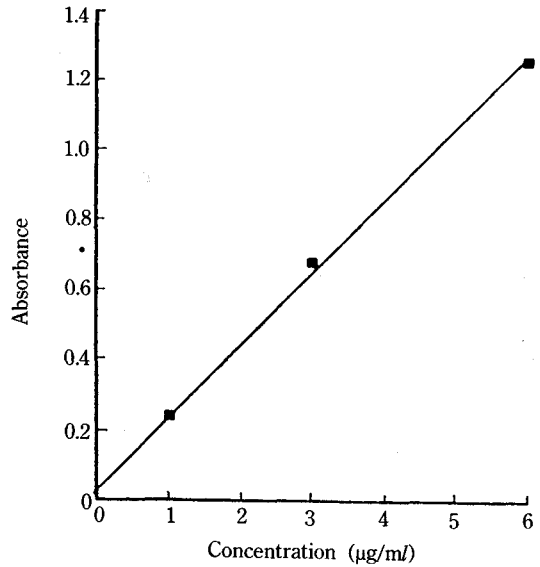


Figure 1—Calibration curve of selenium by UV-Vis spectrophotometry.

Table I—HPLC Condition for Selenium Analysis

Column	: µ-Bondapak C <sub>18</sub>
Detector	: UV 378 nm
Chart speed	: 0.25 cm/min
Injection volume	: 10 µl
Flow rate	: 1.0 ml/min
Mobile phase	: 70% MeOH with Pic B <sub>6</sub>

Table II—AAS Condition for Selenium Analysis

Lamp current	: 12.5 mA
Wavelength	: 196.0 nm
Slit	: 1.3 nm
Atomizer	: STD burner
Flame	: H <sub>2</sub> -Ar
Fuel flow	: 5.0 l/min
Oxidant press	: 160 kPa
Oxidant flow	: 13.9 l/min
Burner height	: 12.5 mm

ml씩 취하여 100 ml 용량 플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 채운 후 Table II의 조건으로 Continuous Hydride Generation을 이용한 AAS법으로 Fig. 3과 같은 검량선을 작성하였다.

**검액의 조제 및 분석**—셀레늄 50 µg에 해당되는

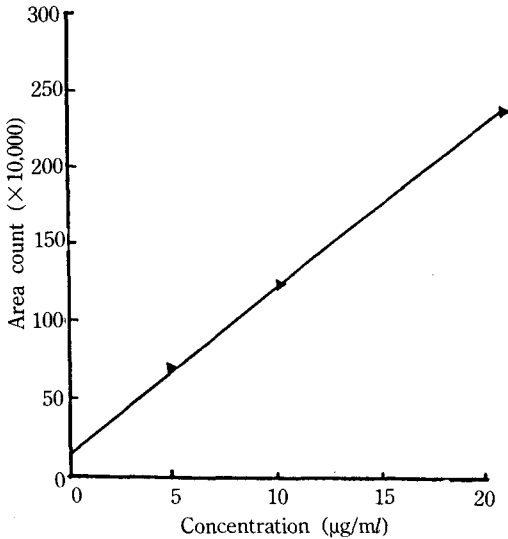


Figure 2—Calibration curve of selenium by HPLC.

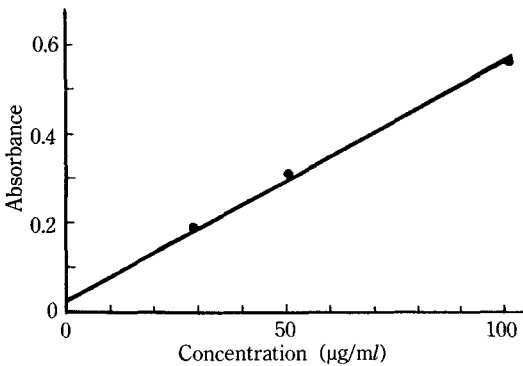


Figure 3—Standard calibration curve of selenium by ASS.

양의 시료에 대하여 상기 흡광광도법과 동일한 방법으로 가열분해시킨 후 100 ml 용량 플라스크에 증류수 50 ml로 세척하여 넣고 증류수로 표선까지 채워 AAS법으로 정량하였다.

**회수율 시험**

농도 10 µg/ml의 표준액 5 ml를 취하여 검액과 동일하게 분해조작 후 표준액과 비교하여 흡광 광도법, HPLC법, AAS법으로 5회 분석하여 회수율을 구하였다.

**결과 및 고찰**

셀레늄을 함유하는 건조효모의 연결 캡셀제중 한 캡셀의 내용량은 약 850-950 mg이고 주성분으로 셀레늄은 50 µg, 토코페롤은 200 mg, 부형제로써 지방성분인 경화유를 180-230 mg, 콩기름을 300-400 mg을 함유하는 것으로 표기되어 있다. 이 중 셀레늄을 정량하기 위하여는 우선 유기성분을 분해하여 셀레늄을 이온화시켜야 하는데 건식법으로는 셀레늄이 가열과정에서 손실이 50% 이상으로 많았으며 습식이나 산소연소 플라스크법으로는 유기물과 지방성분이 거의 분해되지 않은 등 문제점이 있었다. 따라서 분해에 앞서 지방성분을 에틸로 추출제거하는 과정을 삽입하여 양호한 결과를 얻었으나, 에틸 추출잔사를 정량적으로 취하여 산소연소플라스크로 분해시키는데 방법상의 문제점이 많으므로 Fig. 4와 같은 분해장치를 이용하였다. 분해시의 주의점은 격렬한 가열을 피하고 분해액이 무색-미황색으로 투명하고 과염소산의 백색연기가 나기 시작할 때 가열을 중지하는 것이다. 또 셀레늄 표준액의 산분해시 회수율은 90.0-93.0%이므로(Table III) 정량시에는 표준액도 시료와 동일하게 산처리하여 보정하여야 할 것으로 사료된다.

흡광도법은 USP의 limit test<sup>6)</sup>를 개선하여 셀레늄과 2,3-디아미노나프탈렌 유도체(4,5-benzopiase-lonol)을 만들어 시클로헥산으로 추출, 378 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 HPLC에 의한 분석방

Table III—Recovery of Selenium in UV-Vis Spectrophotometry, HPLC, and AAS Methods

Sample No.	Added (µg)	UV-Vis Spectro.		HPLC		AAS	
		Found (µg)	Recovery (%)	Found (µg)	Recovery (%)	Found (µg)	Recovery (%)
1	50	45.3	90.6	45.6	91.2	45.0	90.0
2	50	46.5	93.0	46.0	92.0	45.1	90.2
3	50	46.0	92.0	45.8	91.6	45.3	90.6
4	50	45.2	90.4	45.7	91.4	45.6	91.2
5	50	45.6	91.2	46.1	92.2	45.1	90.2

Table IV—Contents of Selenium in Samples

	UV-Vis Spectro. (%)	HPLC (%)	AAS (%)	Selenium, labeled (μg)
1	95.6± 0.43	96.6± 0.31	97.3± 0.38	50
2	93.0± 0.18	95.3± 0.27	94.3± 0.29	50
3	94.7± 0.28	96.4± 0.21	95.8± 0.37	50
4	96.8± 0.36	98.0± 0.31	97.4± 0.35	50
5	96.7± 0.41	97.1± 0.22	96.4± 0.36	50

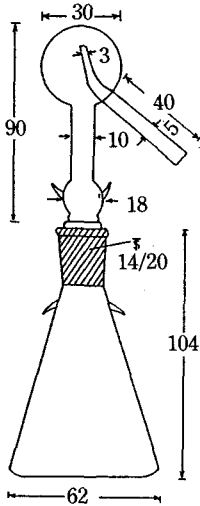


Figure 4—Digestion apparatus for selenium analysis (mm).

법은 Table I의 조건에 따라 흡광도법의 시클로헥산층을 주입함으로써 가능하였으나 감도관계로 셀레늄은 표준액 50-200 μg을 취하는 것이 양호한 직선성을 나타냈으며 검출 파장 378 nm에서 가장 예민하였으나 254 nm에서도 측정이 가능하였다.

원자흡광광도법은 Continuous Hydride Generation법을 이용하여 분석하였으며 셀레늄 3-10 μg 정도에서 정량이 가능하였으며(Fig. 3의 검량선 참조) 상기 세가지 방법 중 가장 적은 양으로 분석이 가능하였다.

시판시료 5종에 대하여 셀레늄을 흡광광도법, HPLC법, AAS법 모두가 셀레늄함유 건조효모의 연질캡셀제 중 셀레늄의 품질관리에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 결론

1. 시료의 산분해전에 부형제인 지방성분의 제거가 필요하며 산분해시 회수율(90.0-93.0%)을 고려하여 표준액도 시료와 동일하게 처리, 보정하여야 할 것으로 사료된다.

2. 셀레늄 검량선은 흡광광도법은 1.0-6.0 μg/ml, HPLC법은 5.0-20.0 μg/ml, AAS법은 0.03-0.10 μg/ml에서 모두가 양호한 직선성을 나타냈으며 상기 세 가지 방법은 모두 시료검정에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 문헌

- 1) Keshan Disease Research Group of Chinese Academy of Medical Science, Epidemiological studies on the etiologic relationship of selenium and keshan disease. *Chin. Med. J.*, **92**, 471-476 (1979).
- 2) 日本藥學會編, 위생시험법주해, p.67-70 (1990).
- 3) C.A. Parker and L.G. Harvey, Luminescence of some piaszelenols, *Analyst*, **87**, 558-563 (1962).
- 4) APHA-AWWA-WPCF, Standard methods for the examination of water and waste water, 3-128~3-141, *Selenium* (1989).
- 5) K. Takaranagi and G.T.F. Wong, Fluorimetric determination of selenium (IV) and total selenium in natural waters, *Anal. Chim. Acta*, **148**, 263-269 (1983).
- 6) U.S. Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII, p.1527 (1990).