

ICP-MS와 AAS를 이용한 체내 혈청 Cu, Zn 분석에 관한 연구

삼광의료재단

이 예 진 · 김 동 엽 · 이 고 은 · 조 영 숙

Analysis of Copper, Zinc in Serum Using ICP-MS & AAS

Yea-Jin Lee, Dong-Yub Kim, Go-Eun Lee, and Young-Suk Jo

Samkwang Medical Laboratory, Seoul 137-887, Korea

The exposure of human beings to toxic trace metals (Cu, Zn) continues to be an important public health issue and concern. This study was conducted to assess the exposure to trace metals (Cu, Zn) in the general Korean population by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and Atomic absorption spectrometry (AAS). Serum samples were obtained from 40 healthy volunteers. Specimens were collected in special container and we applied sample processing to minimize contamination. We used ICP-MS and AAS to analyze simultaneously the concentration of metals including copper, zinc. Distribution of trace metal levels in the general healthy population showed lower values. The results in this study can provide background data for clinical studies associated with trace metal exposure in the Korean population.

Key Words : ICP-MS, AAS, Cu, Zn

I. 서 론

산업고도화에 따라 환경오염과 관련된 생체 내 유해물질 측정에 대한 요구가 늘어나고 있는 추세이다. 중금속을 비롯한 환경오염물질에 의해 인체의 면역기능이 저하되거나 여러 생리 기능에 장애를 가져오며 암을 비롯한 여러 가지 질병에 대한 감수성이 증가한다고 알려져 있다(Mayer, 1999). 작업환경의 오염이 사회의 중요한 문제로 대두되고 있어 해당 근로자들이 신체이상과 작업과의 연관성을 확인하려는 경우가 많아졌으며, 일상생활 환경

이 오염물질 또는 유해물질에 노출이 되어 받는 영향에 대한 일반인의 관심도 점차 고조되고 있다. 이에 따라 음식이나 물, 토양, 공기 등에 포함된 유해물질의 양 측정에 서부터 생체 내 유해물질의 축적 정도나 건강에 미치는 영향 및 위험도 등에 대한 평가가 필요하게 되었다. 그런데, 인체가 중금속에 노출될 수 있는 경로는 매우 다양하고 개인마다 흡수 및 대사, 노출기간 등이 매우 달라서, 환경물질을 직접 정량하는 방법이 생체내 노출량을 직접 반영한다고 볼 수 없다. 따라서 인체가 중금속에 노출된 정도를 평가하기 위해서는 생물학적 지표를 이용하여 보다 정확한 노출정도를 예측하고 위험도를 평가하는 것이 바람직하다. 단 중금속은 체내 극미량으로 존재하는 원소이기 때문에 민감도가 매우 우수하고 정확한 방법이 요구된다(김, 2002).

교신저자 : 이예진, (우)137-887, 서울특별시 서초구 양재동 9-60 삼광빌딩, 특수화학검사팀
Tel : 02-3497-5124, 016-9920-6101
E-mail : radic@smlab.co.kr

ICP-MS(Inductively coupled plasma mass spectrometry: 유도결합 플라즈마 질량분석기)는 AAS(Atomic absorption spectrometry : 원자흡광 분광광도계) 같은 분석 장비들에 비해 많은 장점을 갖고 있다. ICP-MS는 유도 결합 방법으로 생성된 고온의 플라즈마를 이온원으로 사용하므로 이온화 효율이 좋고 해석이 단순한 질량분석 스펙트럼을 제공하며 방해 물질의 영향이 적은 특성이 있다. 그러므로 ppb이하의 극미량 분석에서도 뛰어난 정밀도를 얻을 수 있어 100~1000 배 정도의 낮은 검출 한계와 뛰어난 재현성과 정밀도를 제공해 준다(김과 임, 2006). AAS보다 ICP가 갖는 주요한 두 가지 장점은 많은 원소들에 대하여 10⁵까지의 동적 농도 범위가 넓은 점과, 시료 중의 여러 원소들을 동시에 분석할 수 있도록 비교적 간단하게 응용할 수 있는 점 등이다. 다수 원소용 ICP 기기는 시료를 단 한번만 분무시켜도 되는 큰 장점을 가진다(Savory와 Hermann, 1999). AAS를 사용하면 다만 한가지나 두 가지 원소만이 동시에 정량 분석될 수 있다. 따라서 AAS로 다수 원소들을 분석하려면 분무, 기기 변수의 조정 및 시료의 적절한 행적을 반복하여야 한다.

본 연구자들은 임상적으로 의미가 있는 미량 중금속들 중 한국인 일반집단에서의 혈청 Cu, Zn의 농도를 AAS, ICP-MS 방법으로 측정하여 그 기초 자료를 구축하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 측정대상 및 검체 선정

삼광의료재단 원내 정상인 40 명의 혈청을 대상으로 남, 녀 성별은 구분 없이 연령대는 20~30대로 수집하였다. 검체 수집은 공복상태에서 시행되도록 하였으며 식이에 대한 특별한 사전 통제는 하지 않았다. 검체는 일회용 스테인레스 스틸 주사바늘을 이용하여 혈액을 채취하여 항응고제가 첨가되지 않은 용기에 수집하였다.

2. 검체 준비

30 분간 응고 시간이 지난 뒤 바로 혈청을 분리하였으며 분석 전까지 밀봉하여 냉동상태로 보관 하였다. 미량 중금속 측정에 있어서는 검체 수집, 운반, 조작 등 검사

전 어느 단계에서든 일어날 수 있는 오염을 최소화하는 것이 무엇보다 중요하다. 전 과정에 있어 증류수는 type I 을 이용하고 용기의 세척 시에는 10% 질산(HNO₃)과 type I 증류수를 이용하였다(Ash와 Komaromy-Hiller, 1997). 검사용기나 검사환경관리를 포함하여 전 과정에 있어서 외부오염을 최소화할 수 있도록 유의하였다. Type I 증류수와 폴리프로플렌 용기의 오염 여부 확인 및 검증을 정기적으로 시행하였다.

3. 검체 전처리

미량 존재하는 중금속의 측정을 위한 검체 처리 방법은 여러 가지가 있으나 단계를 추가할수록 오염 및 오차의 가능성은 더욱 커지기 때문에 가능한 단순한 처리과정을 택하는 것이 바람직하다(이 등, 2004).

ICP-MS 방법은 1% HNO₃ 을 이용하여 혈청을 10 배 희석하였고, AAS 방법의 경우 멸균증류수를 이용하여 혈청을 6배 희석하였다.

4. 중금속 농도 측정

각각의 방법은 표준물질을 이용하여 제조한 세가지 농도의 물질을 사용하여 측정법의 신뢰성을 확인하였으며 정도관리 물질이 검사실에서 자체 설정한 허용 범위 안에 있는지 확인 후 분석을 진행하였다. 허용 범위를 벗어나는 경우에는 장비점검 등 오류의 원인을 파악 후 해결한 후 재분석하였다.

1) ICP-MS

Perkin Elmer Elan DRC-e장비(USA)를 이용하여 standard mode로 측정하여 3 회 반복 scanning 후 평균값을 취하였고, multi element calibration set 3을 이용하여 제조한 물질을 사용하여 측정법의 신뢰성을 확인하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

2) AAS

Varian SpectAA 220 장비를 이용하여 3 회 측정 반복한 결과의 평균값을 취하였고, Cu, Zn standard 물질을 사용하여 직선성을 확인하였다.

분석조건은 Table 2와 같다.

Table 1. Condition of measurement (ICP-MS)

Item	Component	Value
RF power	forward	1.35 KW
	reflected	<3 W
Gas flow rated	Plasma Ar	18 L/min
	Nebulizer Ar	0.9 L/min
	Auxiliary Ar	1.3 L/min
Interface	Sampling cone	Nickel 1.1 mm
	skimmer cone	Nickel 0.9 mm
Mass Spectrometer	Ion lens voltage	Optimized for 10 ppb Be(9), Co(59), In(115), U(238)
	Scan mode	Peak hopping
	Dwell time	6.36 sec
	No of replicates	3
	sample uptake time	35 sec
	sample acquisition time	15 sec
	post wash time	35 sec

Table 2. Condition of measurement (AAS)

Item	Value
Calibration mode	Concentration
Measurement Mode	Integrate
Wavelength	3
Wavelength	Cu : 324.8 nm Zn : 213.9 nm
Flame Type	Air/Acetylene
Air Flow	13.5 L/min
Acetylene Flow	2.00 L/min
Standard	Cu : 300,600,900 µg/dL Zn : 150,300,600 µg/dL

Table 3. Evaluation of precision

Item method	Concentration	Intra assay (%)	Inter assay (%)	
Cu AAS	Low	2.60	1.36	
	Middle	0.37	0.94	
	High	1.20	1.10	
ICP-MS	Low	0.30	1.12	
	Middle	0.23	0.79	
	High	0.58	0.36	
Zn AAS	Low	1.90	2.11	
	Middle	1.21	0.76	
	High	0.79	1.94	
	ICP-MS	Low	0.69	0.98
		Middle	0.46	0.64
		High	0.42	0.35

① 정밀도 평가

정밀도 평가는 동일 시료들을 반복 측정하여 변동계수 (coefficient of variation: CV)로 표현 하였고, intra assay 와 inter assay를 시행하였다. 그 결과는 다음과 같으며 CV가 3% 미만으로 높은 정밀도를 나타내었다.

② 결과 분석

표준물질에 의한 표준곡선을 얻어 직선성을 확인한 뒤

이에 의해 검체 중 분석 대상물질의 농도를 계산하였다. ICP-MS의 경우 detector에 의해 각각의 m/z(mass-to-charge ratio: 질량 대 전하비)에 해당하는 counts를 측정 하고 해당 counts 수를 농도로 환산하였고 AAS의 경우 각 각의 농도 값을 그대로 확인 하였다.

Table 4. Concentration in serum Copper (µg/dL)

Item	N	mean	SD	Percentiles			
				2.5	50	95	97.5
AAS	40	74.2	20.2	48.2	70.8	114.7	159.0
ICP-MS	40	70.6	17.3	48.5	69.1	103.5	147.9

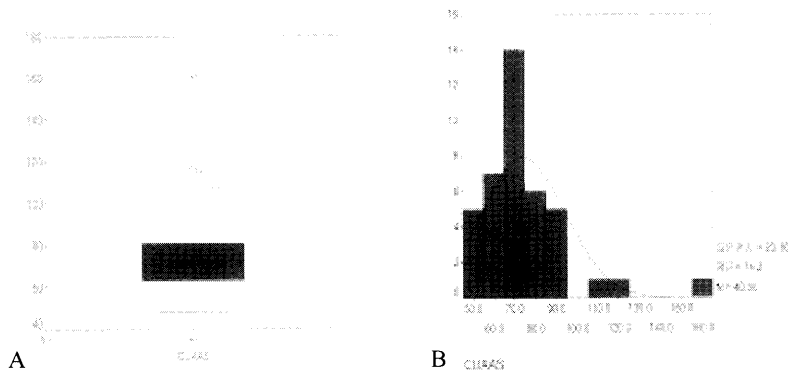


Fig. 1. AAS analysis for copper. A. Cu graph B. frequency analysis

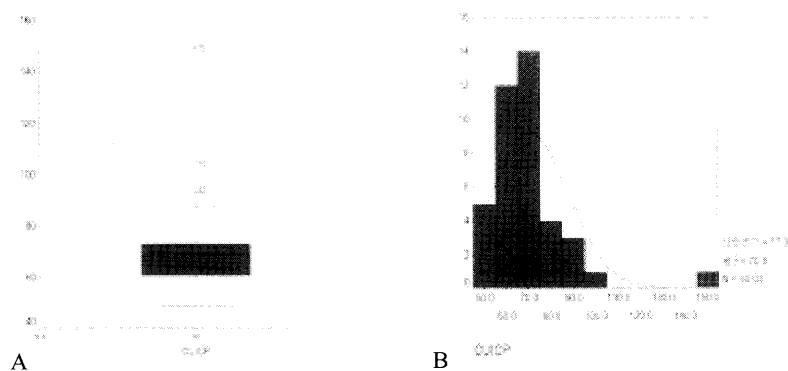


Fig. 2. ICP-MS analysis for copper. A. Cu graph, B. Cu frequency analysis

종합하여 볼 때 두 원소의 각 방법에 따른 정밀도는 우수하며 AAS와 ICP-MS 방법 간의 상관계수가 Cu의 경우 $r=0.9202$ 로 높은 일치율을 보였고, Zn의 경우 $r=0.7275$ 의 결과를 보였다. Cu의 경우 ICP-MS 와 AAS로 분석 결과는 대체로 비슷하고, Zn의 경우 ICP-MS 보다 AAS 분석 시 결과 값이 positive bias를 보이는 것을 확인하였다.

IV. 고찰

전 세계적으로 중금속 측정은 AAS 방법으로 많이 하고 있는 실정이나 점차적으로 ICP-MS 방법으로 전환되고 있다. 또한 각각의 금속에 대한 지식이 축적되고 분석 기술이 발전할수록 위해도 평가가 필요하다고 인정되고 기술적으로 측정이 가능한 대상 중금속의 종류는 더욱 많아질 것이 분명하다. 본 연구의 경우 한국 일반인에서 혈청내 Cu, Zn 노출 수준 평가를 위한 AAS와 ICP-MS

Table 5. Concentration in serum Zinc (µg/dL)

Item	N	mean	SD	Percentiles			
				2.5	50	95	97.5
AAS	40	87.4	13.3	61.5	86.3	117.6	130.0
ICP-MS	40	64.2	9.7	46.7	64.0	81.5	89.0

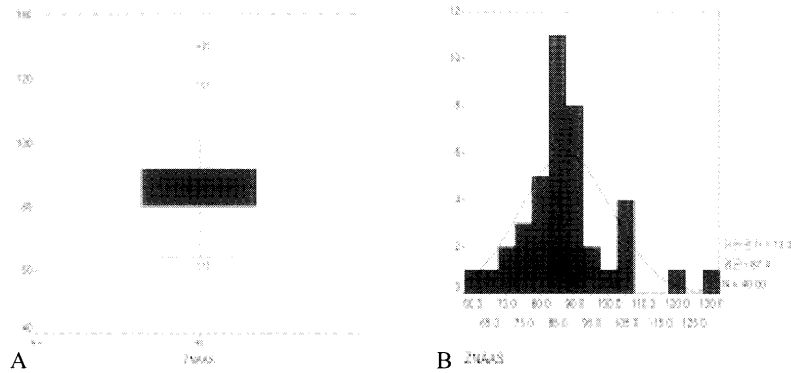


Fig. 3. AAS analysis for zinc. A. Zn graph B. frequency analysis

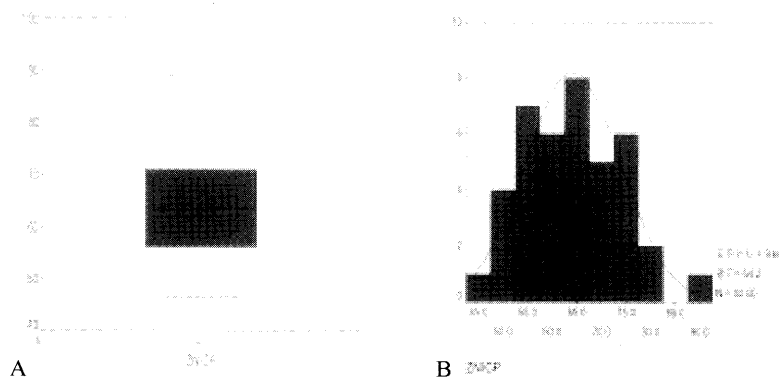


Fig. 4. ICP-MS analysis for zinc. A. Zn graph, B. Zn frequency analysis

방법 간의 객관적인 기초 자료를 얻기 위해 검체 수집에 서부터 분석에 이르기 까지 Cu, Zn 측정결과의 신뢰성을 확보하고자 노력을 기울였다.

본 연구에 포함된 Cu, Zn은 필수 미량원소로서 인체 대사에 중요한 역할을 하지만 과량 축적될 경우나 결핍되었을 경우 역시 위해 작용을 일으킨다고 알려져 있다. 이에 본 연구를 통하여 얻은 자료는 일반인 체내의 중금속 축적 수준을 파악하고 AAS와 ICP-MS 방법 간의 상

관성에 대한 기초 자료를 구축하고자 하였다.

본 연구 결과를 종합하여 볼 때 ICP-MS 와 AAS로 측정된 결과 값을 비교하였을 때 유의한 차이가 없고(Table 4, 5), 새롭게 대두되고 있는 ICP-MS 경우 간단하게 여러 원소들을 동시에 분석할 수 있도록 응용할 수 있는 점과 시료를 단 한번만 분무시키면 된다는 장점을 가지므로 임상적으로 Cu, Zn 검사에 적용하여도 무방하리라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ash KO, Komaromy-Hiller G. Analysis of clinical specimens using inductively coupled plasma mass spectrometry. In Wong SH, Sunshine I. eds. Handbook of analytical therapeutic drug monitoring and toxicology. p107-126, CRC press Inc, Boca Raton, 1997.
2. Mayer TP. Toxic Metals. In : Buritis CA And Ashwood ER, eds, Tiets textbook of clinical chemistry. 3rd ed. p783-784, WB Saunders, Philadelphia, 1999
3. Savory J, Heman MM. Advances in instrumental methods for the measurement and speciation of trace metals. *Ann Clin Lab Sci* 29:118-126, 1999.
4. 김경희, 임현숙. 성인 여성의 미량 무기질(Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Mo 및 Cr)섭취량. 한국가정과학회지 2006
5. 김선희. 한국인의 체내 중금속 오염도 조사 연구. 독성물 국가 관리사업 연구보고서 제1권, The Annual Report of KNTP, Vol.1, 497-519. 2002.
6. 이수연, 오현주, 최윤희, 김종원, 김선희. 유도결합플라즈마질량분석기를 이용한 체내 미량금속 분석. 대한진단검사의학회지 제 24권 제 6호 2004