

ICP/MS에 의한 전혈 중 납의 분석방법 연구

박경수 · 김선태

한국과학기술연구원 특성분석센터

(1997. 2. 20. 접수)

A study on the determination of lead in whole blood by ICP/MS

Kyung Su Park, Sun Tae Kim

Advanced Analysis Center, KIST, Cheongryangri, Seoul 131, Korea

(Received Feb. 20, 1997)

요약 : ICP/MS에 의해 전혈 중의 납을 정확하게 분석하는 방법을 개발하였다. 전혈시료를 납의 오염과 손실 없이 마이크로파 분해장치에서 분해시키고, 96개 혈액 시료 중의 Pb²⁰⁸을 ICP/MS로 측정하여 분석하였다. 실제 인체 혈액 시료 중의 Pb 함량은 2.50~22.8 μ g/dL 범위였다. NIST SRM 955a series를 분석함으로써 이 분석방법의 정확도를 확인하였다.

Abstract : An accurate analysis method for the determination of lead in whole blood by ICP/MS was developed. Whole blood samples were decomposed in microwave digestion system without any contamination and loss of lead. The 96 samples were analyzed by ICP/MS using mass²⁰⁸ isotope of lead. Lead concentrations of human whole blood were ranged of 2.50~22.8 μ g/dL. The accuracy of this analysis method was verified by analyzing of NIST SRM 955a series(lead in blood).

Key words : Analysis of whole blood, Blood analysis by ICP/MS, Lead in blood.

1. 서론

20세기 말 급속한 산업 발달은 환경을 극도로 오염시켰고, 이로 인해 인체까지 오염되어 각종 질병을 유발시킴으로써 인체시료 중 오염물질을 분석해야 할 필요성이 크게 증가하고 있다. 오염물질을 분석하기 위해서는 인체시료들 중 혈액을 가장 많이 활용하며, 대표적인 오염물질인 납을 분석함으로써 오염도를 측정하는 것이 일반화되어 있다.

그러나 우리 나라에서의 전혈 중의 납 분석은 분석자마다, 분석기관마다 다르며, 분석 결과에 있어서 재현성 있는 결과를 주지 않으므로 아직까지 정상인의

혈액 중의 납 농도조차 모르고 있는 실정이다. 그러므로 건강척도라고도 할 수 있는 혈중 납 농도는 대단히 중요하며, 이를 위한 납 분석방법의 개발은 지극히 중요한 연구라고 말할 수 있다.

납은 인체내에 극미량 존재할 수 있으므로 극미량분석법인 흑연로를 이용하는 원자흡수분광법(ETAAS)^{1-5, 10-15}이나 플라로그래피와 같은 전기분석법⁶, 또는 유도결합 플라즈마 원자방출분광법(ICP/AES)^{16,17} 등을 이용하여 분석할 수 있다.

ETAAS는 극소량의 시료로도 극미량까지 분석할 수 있기 때문에 납의 분석에 가장 많이 이용하여 왔으나, 재현성이 낮고 매트릭스의 영향을 많이 받는 등의

단점이 있어 정확한 결과를 얻기 어렵다. 그러므로 ETAAS로는 분석기관끼리의 결과도 서로 다르고, 약간의 전처리 차이로도 상이한 분석 결과를 주기 때문에 인체 오염도 판명에 어려움이 있다. 한편, 전기분석법은 전처리조작도 까다롭고 ETAAS보다 다량의 시료를 필요로 하기 때문에 이용하기 어렵다. 또한 ICP/AES는 검출한계도 높고, 혈액내에 공존하는 철 등의 분광학적인 간섭을 받으며, 재현성도 떨어지는 단점이 있다.

본 연구에서는 위의 분석법들 대신, 최근에 개발되어 각광을 받기 시작한 유도결합 플라즈마 질량분석법(ICP/MS)을 이용하여 전혈 중의 납을 분석하고자 시도했다. 이 방법은 ETAAS보다 검출한계가 1~2 order 낮기 때문에 극소량의 시료를 가지고도 극미량까지 분석할 수 있는 잇점이 있으며, 동시 다원소 측정이 가능하고, linear dynamic range가 넓으며 ICP/AES에서의 분광학적인 간섭이 없다.

혈액을 분해시키는 방법에는, 질산과 같은 산화성 산으로 대기압하에서 분해시키는 방법과 closed system의 압력하에서 분해시키는 방법이 있다. 대기압하에서 혈액시료를 직접 분해시키는 방법은 다량의 산류를 사용해야만 하고, 시간이 많이 걸리므로 오염과 손실의 기회가 많아지는 단점이 있다. 그러나 압력을 이용하는 방법은 소량의 산류로도 오염과 손실을 최소화하면서 단시간내에 분해시킬 수 있는 장점이 있다. 특히 최근에 개발되어 각광을 받고 있는 마이크로파 분해장치에 의한 가압가열방식은 전통적인 열전도 가열과는 전혀 다른 방법으로, 표면에서만 열이 전달되지 않고 마이크로파 에너지가 산과 시료에 깊숙히 침투하여 쌍극자 회전(dipole rotation)과 이온전도(ionic conduction)를 일으킴으로써 산류의 온도가 급격히 상승하고 시료에 산류가 빨리 침투하게 되어 단시간내에 시료를 분해시킬 수 있다. 아울러 closed system이므로 압력이 증가하여 시료의 분해가 촉진된다.

본 연구에서는 이와 같은 마이크로파 분해장치의 장

점과 ICP/MS의 장점을 최대한으로 이용하여, 건강의 척도로 활용되는 혈중 납농도를 신속하고도 정확하게 분석하는 방법에 대해서 연구하였다.

2. 실험

2.1. 분석기기 및 장치

본 실험에서 전혈 중 납을 분석하기 위해 사용한 분석기기는 Perkin-Elmer사의 ELAN 5000 model inductively coupled plasma mass spectrometer(ICP/MS)로서 작동조건은 Table 1과 같다. 본 연구에서 사용한 ICP/MS는 free running type의 RF generator가 부착되어 있고, 이온을 생성시키는 부분인 유도결합 플라즈마와 생성된 이온을 검출하는 질량분석제로 이루어져 있다. 전혈 중에 존재하는 유기물을 분해시키기 위해 ECM 30 exhaust/capping module이 부착된 Milestone사의 MLS 1200모델 microwave digestion system을 사용했다.

2.2. 시약 및 시료

본 실험에서 사용한 납의 표준용액은 Perkin-Elmer사의 10mg/L 표준용액을 묽힌 후 사용하였다. 혈액을 전처리하기 위해 분석용 특급 과산화수소수와 동우반도체사의 반도체급 질산을 사용하였다. 본 실험에서 사용한 물은 일반적인 증류기에서 1차 증류한 후 이온교환수지를 통과시킨 것을 사용하였다. 표준 전혈시료는 NIST의 SRM 955a series로서 부패하지 않도록 냉장 보관하였으며, 분석 직전에 개봉하여 전처리하였다. Control 혈액은 산업보건협회의 정도관리위원회에서 구했으며, 전혈시료는 서울의대 부속병원 예방의학교실로부터 입수하였다.

2.3. 실험방법

60mL 용량의 Teflon 재질로 된 vessel에 혈액 1mL를 넣고, 진한 질산 2mL와 과산화수소수 0.2mL를 넣

Table 1. Instrumental Parameters for ICP/MS

RF power	1,000 watt	Sample uptake flow	1.0mL/min.
Plasma argon flow	14.8L/min.	Nebulizer	Cross flow type
Auxiliary argon flow	0.84L/min.	Quadrupole chamber	2×10^{-7} torr
Nebulizer gas flow	0.90L/min.	Resolution	0.8 ± 0.1

Table 2. Data acquisition

Replicate time (ms)	300	Number of replicates	5
Dwell time (ms)	100	Points / spectral peak	3
Sweeps / reading	3	Estimated sample times (min.:sec)	0 : 15
Reading / replicate	1	Mass number of Pb	208

고 뚜껑을 닫았다. Vessel을 safety shield에 넣은 후 microwave unit에 넣고 300W에서 5분, 600W에서 3분 동안 분해시킨다. 실온으로 식혀서 25mL 용량플라스틱에 옮긴 후 눈금까지 증류수로 묽혔다.

Control 혈액 각 1mL에 납을 10, 50, 100, 1,000ng씩 각각 spike하고, 위와 같이 전처리를 거친 후 Table 2와 같은 조건의 ICP/MS로 측정 후 검정곡선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 전혈 시료의 전처리

극미량분석은 전처리 과정이 간단하고 시간이 짧을수록 오염과 손실을 최소화 할 수 있으므로 정확한 분석결과를 얻을 수 있다. 그러나 혈액과 같이 유기물을 다량 함유하는 경우에는 정확한 결과를 얻기 어렵다. 혈액분석에서는 ETAAS를 가장 많이 이용하고 있으므로 ETAAS의 장단점을 ICP/MS와 비교 검토하고자 한다.

대기압하에서 질산과 같은 산화성 산류에 의한 혈액의 전처리는 시간도 많이 걸리고 다량의 산류에 의한 오염도 증가하고, 주위로부터의 오염이 올 수 있으며 경우에 따라서는 손실도 일으킬 수 있다. 그러므로 혈액시료 중의 납을 분석하기 위해서는 matrix modifier를 첨가하고 묽혀서 ETAAS의 조건을 잘 선정 한 후 직접분석을 시도하는 일이 많다.

그러나 혈액을 전처리하지 않고 Triton X-100과 같

은 용매로 5배 내지 10배 묽혀 직접 분석하는 ETAAS는 오염과 손실을 최소화 할 수 있지만 단점이 더 많다. 특히 납은 비교적 휘발성이 큰 금속이기 때문에 (Table 3) 회화과정에서 납의 손실을 우려하여 낮은 온도로 회화시킨다. 이로 인해 유기성분이 불완전 분해되어 원자화과정에서 심한 매트릭스 간섭을 받게 되므로 높은 바탕선이 나타난다. 또한 시료마다 회화 정도가 달라 재현성이 낮은 분석 결과를 준다. 그러므로 납의 휘발을 줄이면서 높은 온도에서 회화시키기 위해 matrix modifier의 종류를 달리하거나 양을 변화시키기도 하지만 유기물의 완전한 파괴는 어렵다. 또한 혈액시료를 유기용매로 묽힐 때 균일한 용액으로 만들기 어렵고, 점도 등 때문에 일정량의 시료를 주입하는 데도 문제가 있다.

한편, ICP/MS를 이용하여 분석할 때에도 전처리를 필요로 하는데 검출한계가 낮은 점을 이용하여 용매로 묽혀 직접 분석하는 경우가 많다. ICP/MS를 이용해 인체시료 중의 금속성분들을 분석한 예를 들면 다음과 같다. B. Casetta 등⁷은 biological fluids를 1%(v/v) 질산으로 20배 묽혀 ETV-ICP/MS를 사용해서 Pt를 분석하였으며, P. Twiss 등⁸은 직업병 환자의 faecal material을 질산, 염산, 과염소산으로 분해시키고, ICP/MS로 Th와 U을 분석한 바 있다. A. Stroh⁹는 전혈을 0.2%(v/v) 암모니아 용액과 Triton X-100으로 10배 묽힌 후 ICP/MS를 사용해서 Pb와 Cd를 분석하였다. B. Casetta 등과 A. Stroh의 분석방법은 시료를 분해시키지 않고 용매로 묽혀 직접 분석

Table 3. Volatility of the elements

Volatile	Intermediate	Refractory
Ag, As, Bi, Cd,	Au, Co, Cr, Cu,	Al, Ba, Be, Dy, Er, Eu,
Cs, Hg, Os, Pb,	Fe, Ga, Ge, In,	Gd, Hf, Ir, La, Mo, P,
Sb, Se, Te, Tl,	K, Li, Mg, Mn,	Pd, Pt, Re, Rh, Si, Sr,
Zn	Na, Ni, Sn	Ti, U, V, Y, Yb

함으로써 시료 전처리로부터 오는 오염과 손실을 최소로 하였으며, 플라즈마의 높은 온도에 주입함으로써 혈액 중에 공존하는 유기물의 완전분해를 시도했지만 시료의 점도 차이로 인한 물리적인 방해영향 등을 수반할 수 있다고 본다.

그러므로 정확한 분석을 하기 위해서는 전혈을 완전히 분해시켜야만 한다. 전혈을 분해시키기 위해서는 질산, 과염소산, 또는 과산화수소수와 같은 산화성 산류를 사용해야 하지만 과염소산이나 과산화수소수는 혈액과 급격한 반응을 일으켜 closed system인 마이크로파 분해장치내에서 폭발이 일어날 수 있으므로 사용량을 감소시키든지 사용을 피하는 것이 좋다. 그러므로 질산을 단독으로 사용하는 것이 좋다. 질산은 또한 ICP/MS로 측정시 분광학적인 방해가 가장 적고, 납과 난용성 침전을 형성하지 않는다. 또한 마이크로파 분해장치는 closed system이므로 압력에 따른 질산의 b.p.가 상승되어 질산만으로도 과염소산의 효과를 거둘 수 있는 잇점이 있다. 본 연구에서는 이와 같은 사항들을 고려하여 질산을 사용하기로 결정하고, 전혈 중에 공존하는 lipid의 분해를 촉진시키기 위해 소량의 과산화수소수를 첨가하였다.

본 실험에서는 시료 1mL에 질산 2mL와 과산화수소수 0.2mL를 가해 마이크로파 분해장치에서 8분간 처리하여 전혈을 완전 분해시킴으로써 전처리과정의 손실이나 오염을 최소로 하고자 노력했다. ETAAS와 ICP/MS는 소량의 시료를 취하는 것은 유사하나 용매로 물히는 데 소요되는 시간이나 분해시키는 데 소요되는 시간은 차이가 없다. 그러나 ICP/MS는 ETAAS에 비해 검출한계가 1~2배 낮기 때문에 최종 부피를 동일 부피로 해도 ETAAS보다 낮은 농도까지 분석이 가능한 잇점이 있다.

3.2. ICP/MS에 의한 납의 분석

혈액은 약 45% 정도가 혈구로 이루어진 끈적한 액체이고, 다량의 유기물, 나트륨, 칼륨, 칼슘 등을 포함하고 있다. 분해가 끝난 혈액 시료용액 중에는 상당량의 무기물이 존재하게 되어 물리적 방해나 질량 방해와 같은 여러 가지 간섭현상을 일으킬 수 있다. 분해가 끝난 어떤 전혈 시료 중 나트륨은 1.8ppm, 칼륨은 5ppm 정도 검출되었는데, 분석하고자 하는 원소의 10³ 배 정도였다. 이러한 무기물에 의한 시료의 점도 증가와 같은 물리적인 방해문제는 peristaltic pump를 사

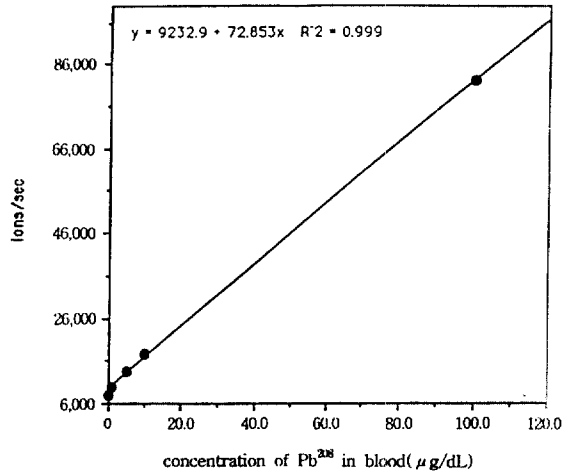


Fig. 1. Calibration curve of Lead in blood

용하고, control 혈액시료에 일정량의 금속 standard를 spike하여 검정곡선을 작성함으로써 매트릭스를 일치시켜 해결할 수 있었다. 이 때 얻은 검정곡선은 Fig. 1과 같았다.

일반적으로 질량수 80 이하인 원소의 경우에는 polyatomic species나 isotope에 의한 mass interference가 많은데, 납은 원자량이 200 이상이므로 이러한 간섭이 전혀 없다(Fig. 2). 또한 Fig. 3과 같이 control 혈액 시료라 해도 Pb²⁰⁸을 소량 포함하므로 반드시

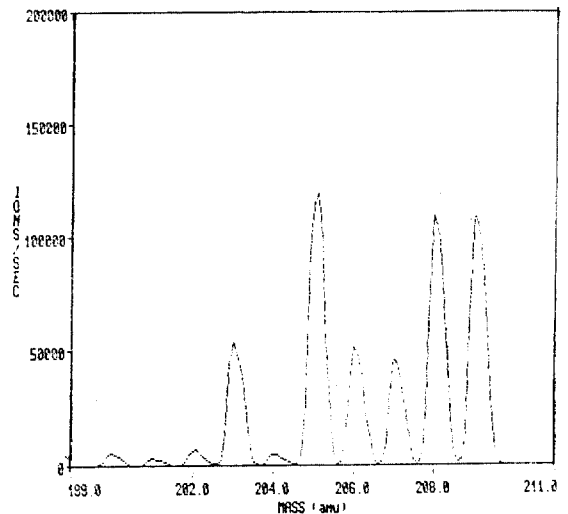


Fig. 2. Mass spectra of standard metals spiked blood (Added amount : 10 μg/dL, Mass range : 200~210, Estimated sample time : 12 secs., Points/spectral : 10)

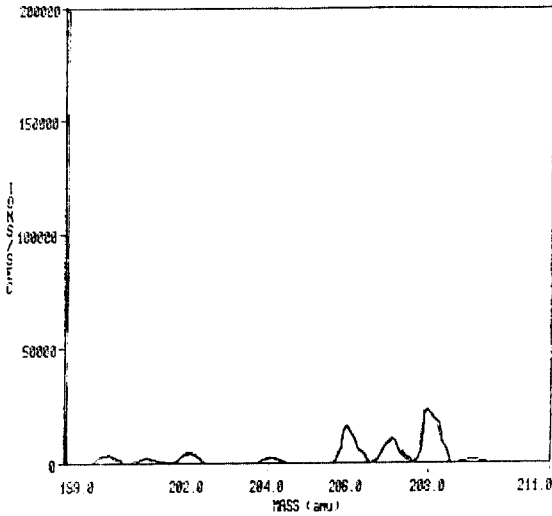


Fig. 3. Mass spectra of control blood.
(Mass range : 200~210, Estimated sample time : 12 secs., Points/spectral : 10)

Table 4. Relative abundance of the natural isotopes for the Pb determination

Mass no.	Relative abundance					
204	Hg	6.85	Pb	1.48		
205					Tl	70.5
206			Pb	23.6		
207			Pb	22.6		
208			Pb	52.3		

시 보정해 주어야 함을 알 수 있다.

또한 납을 정량하기 위한 Pb²⁰⁸은 자연 존재비가 가장 커서(Table 4) 감도도 가장 좋고, 다른 원소의 동위 원소와 겹침이 없으므로 혈중 납농도 측정시 예상되는 간섭현상은 거의 없다.

3.3. 표준시료의 분석

정확도 측정을 위해 납이 함유된 표준 전혈시료인 NIST의 SRM 955a series를 본 연구에서 확립한 방법으로 분석한 결과는 Table 5와 같다.

NIST에서 certify한 값과 본 연구에 의해 확립된 분석방법으로 분석한 결과는 서로 잘 일치 하였으므로 수집된 전혈시료에 그대로 적용시켰다.

Table 5. Lead concentrations(μg/dL) in whole blood (NIST SRM 955a)

SRM	Measured value	Certified value
955a - 1	5.19 ± 0.08	5.01 ± 0.09
955a - 2	13.45 ± 0.22	13.53 ± 0.13
955a - 3	30.55 ± 0.18	30.63 ± 0.32
955a - 4	53.10 ± 0.20	54.43 ± 0.38

3.4. 전혈시료 중의 납의 분석

마이크로파 분해장치에서 분해시켜 ICP/MS로 납을 분석하는 본 방법을 표준시료에 적용시켰을 때 정확도 높은 분석결과를 얻었으므로 실제 시료에 적용시켰다. 서울의대 부속병원 예방의학교실에서 채취한 전혈시료 중 96개를 위의 확립된 분석방법으로 전처리 후 ICP/MS로 분석하여 Table 6의 결과를 얻었다. 이 표에서 알 수 있는 바와 같이 Pb가 검출되지 않은 전혈시료는 없었으며, 2.50~22.8μg/dL의 농도 범위로 검출되었으며, 이들의 평균농도는 6.89μg/dL였다.

4. 결론

본 연구결과 얻은 결론은 다음과 같다. 전혈시료를 마이크로파 분해장치로 분해하여 ICP/MS로 납을 분석하는 방법에 대해 연구하였다. 소량의 전혈시료에 소량의 질산과 과산화수소수를 가하여 마이크로파 분해장치에서 짧은 시간 동안 분해시킴으로써 오염과 손실을 최소로 하였으며, 이로부터 얻어진 시료용액 중의 납을 질량간섭이 거의 없고 자연존재비가 가장 큰 Pb²⁰⁸을 이용하여 ICP/MS로 분석하였다.

시료 용액내에 공존하는 matrix들의 간섭을 보정하기 위해 control 혈액에 납 표준용액을 spike하여 분해 후 검정곡선을 작성하였다. 확립된 분해방법을 NIST SRM 955a series에 적용시켜 정확도를 확인하고 실제 인체로부터 채취한 전혈시료들을 분석하였다.

감사의 글

본 연구 결과는 1994년도 과학기술처 출연 연구비 지원에 의한 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

Table 6. Lead concentration in whole blood sample.

Sample no.	Pb ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Sample no.	Pb ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Sample no.	Pb ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Sample no.	Pb ($\mu\text{g}/\text{dL}$)
1	7.39	25	4.04	49	7.81	73	8.49
2	5.99	26	3.11	50	8.67	74	4.48
3	4.45	27	6.22	51	5.31	75	3.51
4	5.17	28	11.0	52	5.04	76	6.63
5	5.21	29	5.33	53	12.0	77	4.07
6	3.20	30	5.34	54	3.34	78	5.54
7	4.55	31	4.55	55	5.18	79	4.25
8	4.42	32	3.68	56	6.75	80	6.24
9	5.64	33	16.4	57	4.86	81	7.17
10	4.38	34	4.41	58	5.87	82	7.39
11	3.87	35	2.78	59	4.23	83	14.1
12	4.89	36	2.73	60	4.86	84	5.96
13	4.66	37	9.50	61	6.97	85	5.86
14	2.76	38	13.8	62	3.85	86	4.83
15	5.04	39	11.7	63	8.66	87	5.94
16	4.30	40	2.95	64	8.90	88	11.3
17	7.47	41	12.1	65	7.00	89	22.8
18	5.81	42	4.01	66	10.1	90	7.25
19	14.0	43	2.50	67	5.04	91	9.75
20	11.7	44	6.21	68	9.61	92	9.75
21	6.52	45	4.21	69	5.07	93	17.8
22	7.20	46	9.92	70	8.10	94	6.95
23	5.97	47	3.85	71	6.62	95	11.5
24	3.19	48	3.46	72	15.8	96	8.75

참고문헌

1. D. T. Miller, et al. *Analyst*, **112**, 1701-1704(1987).
2. C. P. Bosnak, et al., *Atomic Spectroscopy*, **14**(3), 80-82(1993).
3. S. T. Wang and H. P. Demshar, *Analyst*, **117**, 959-961(1992).
4. D. K. Eaton and J. A. Holcombe, *Anal. Chem.*, **55**, 946-950(1983).
5. C. G. Bruhn, et al., *Anal. Chim. Acta*, **198**, 113-123 (1987).
6. B. J. Feldman, et al., *Anal. Chem.*, **66**, 1983-1987 (1994).
7. B. Casetta, et al., *Atomic Spectroscopy*, **12**(3), 81-86 (1991).
8. P. Twiss and R. J. Walting, *ibid.*, **15**(1), 36-39 (1994).
9. A. Stroh, *ibid.*, **14**(5), 141-143(1993).
10. M. W. Arbouine and N. J. Smith, *ibid.*, **12**(2), 54-58 (1991).
11. A. T. Wan and P. Froomes, *ibid.*, **12**(3), 77-80(1991).
12. M. Rida, et al., *ibid.*, **15**(1), 87-89(1994).
13. D. L. N. Collet and S. M. Jones, *ibid.*, **12**(3), 69-73 (1991).
14. D. C. Paschal and G. G. Bailey, *ibid.*, **12**(5), 151-154(1991).
15. F. Jian, et al., *ibid.*, **12**(6), 212-214(1991).
16. R. L. Dahlquist and J. W. Knoll, *Appl. Spectrosc.*, **32**, 1-29(1978).
17. H. Uchida et al., *Anal. Chim. Acta*, **123**, 57-63(1981).