

<REVIEW>

HPLC와 결합된 검출기를 이용한 환경분야에서 비소, 셀레늄의 종분화

윤철호 · 정경호* · 홍종기

한국기초과학지원연구원 유해물질분석팀
*한국해양연구원 극지연구본부

Speciation of Arsenic and Selenium Compounds in the Environmental Field using HPLC Coupled to Specific Detectors

Cheolho Yoon, Kyungho Chung*, Jongki Hong

*Hazardous Substance Research Team, Korea Basic Science Institute,
126-16, 5St., Anam-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul, 136-701, Korea*
**Polar Sciences Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute,
Ansan P.O. Box29, Seoul 425-600, Korea*

This review deals with liquid phase separation of major arsenic and selenium species followed by element specific detection. The species-selective trace elements analysis is critically evaluated with particular emphasis on the use of techniques combining high performance liquid chromatography(HPLC) with an element specific detectors(e.g. AAS, ICP or ICP-MS). The potential and limitation of hyphenated techniques as a tool for speciation of arsenic and selenium compounds in environmental materials is discussed using a number of examples drawn from the latest research papers.

Key words: Arsenic, Selenium, Speciation, HPLC

1. 서 론

금속 종분화에 대한 관심은 종분화 분석이라 불리는 분석화학의 출현으로 유발되었다. IUPAC 지침에 따르면 “종(species)”은 “특정 분자, 전자, 핵 구조에서 한 원소”, “종분화(speciation)”는 “여러 종들의 출현이나 분포”, “종분화 분석(speciation analysis)”은 “한 시료 내에 한 원소의 하나 또는 그 이상의 화학 종들을 확인하고 정량화하는 분석”이라 명기되어 있다.¹⁾

환경에서 종분화 정보의 필요성에 대한 두 가지의 일반적인 주된 영역은 (1) 잠재적으로 위험한 종의 분석으로 환경적 위해성 평가와 (2) 단순한 무기 종과 무기금속 이온의 생물변형의 구조적 체계를 규명하는데 있다.²⁾

금속과 비금속은 대기, 수질 및 토양에서 중요한 오염 물질이다. 기원에 따라 환경의 생물상에 의해 생물변이될 수 있는 다양한 종의 형태로 환경에 유입된다.

납이나 주석과 같은 원소는 더 많은 변형을 행할 수 있는 유기금속 종의 형태로 환경에 유입된다. 인간 활동으로 유발되는 유기 금속 오염물질(예로, 자동차의 유기 납, 오존 방지용 도료의 유기주석)과 독성 산화 환원상(예, Cr(VI), Sb(III)) 종들의 모니터링은 환경화학에서 오랫동안 관심을 받아온 주된 영역이었다. 특히 수은과 같은 원소는 기원 종의 독성보다 다른 독성을 가지는 최종 형태 때문에 금속의 biomethylation에 더 많은 관심을 받아 왔다. 이것은 오염물질과 주변환경과의 생지화학을 이해하여야 가능하다. 그러므로 수질, 토양, 퇴적물에서 중금속과 전이 금속이 용존 유기물과 상호작용하고 이동하는 지화학적 체계의 연구와 환경생물에서 수많은 필수(아연, 구리), 독성(카드뮴, 수은, 비소) 미량원소의 생체 항상성 조절, 물질대사, 해독작용 등의 환경적, 경제적 중요성에 관심이 초점이 되어 왔다.^{3,4)} Fig. 1은 금속과 비금속 종의 종분화 분석과

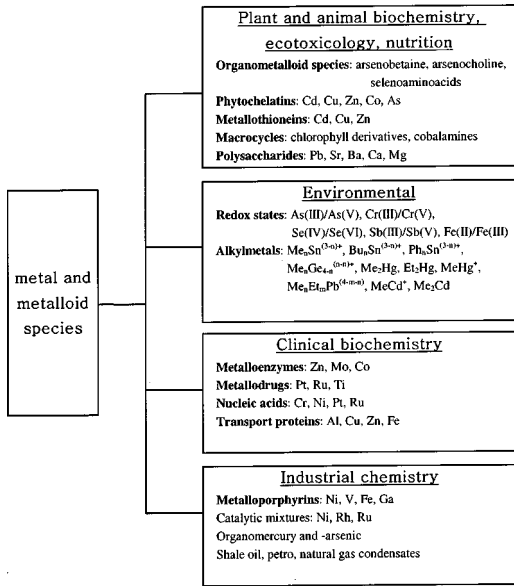


Fig. 1. Target areas and species of concern in speciation-related research.

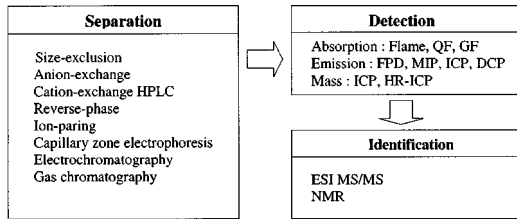


Fig. 2. Schematic representation of frequently used hyphenated techniques for speciation analysis.

관련된 연구의 주요 분야와 관심 종을 도식화하였다. 산화, 환원상태에 따라 4가, 6가 혹은 3가, 5가 등으로 존재하는 이온가별 원소와 메틸이나 에틸과 같은 알킬 화로 존재하는 종들 및 특정 원소의 배위 결합이나 공유 결합으로 존재하는 종들이 주요 관심의 대상이다.

금속과 비금속의 원소별 중분화에 대한 관심은 여러 형태간의 차이를 구별할 수 있는 새로운 분석기술의 개발로 증가하였다. 이들 중에 따른 특정 기술은 고분해 크로마토그래피 분리와 한 원소의 선별적 검출기 등의 온라인 결합으로 가능하다.

Fig. 2는 분석하고자 하는 종들의 물리, 화학적 특성에 따라 양이온 교환, 음이온 교환, 역상, 이온쌍, 및 기체 크로마토그래피 등의 분리 특성을 이용하여 머무름 시간에 따라 분리한다. 이렇게 분리된 종들은 온라인으로 결합된 원자흡수분광기(atomic absorption spectrometry, AAS), 원자방출 분광기(atomic emission spectrometry, AES), 원자형광 분광기(atomic fluorescence spectrometry, AFS), 유도결합 플라즈마 원자방출 분광기(inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP/AES) 및 유도결합 플라즈마 질량분석기(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP/MS) 등으로 시간에 따라 각각의 종들을 검출한다. 이들 종들은 전자분무이온화 질량분석기(electrospray ionization mass spectrometry, ESI/MS)나 핵자기공명 분광기(nuclear magnetic resonance spectrometry, NMR) 등으로 분자량과 구조를 확인할 수 있다.

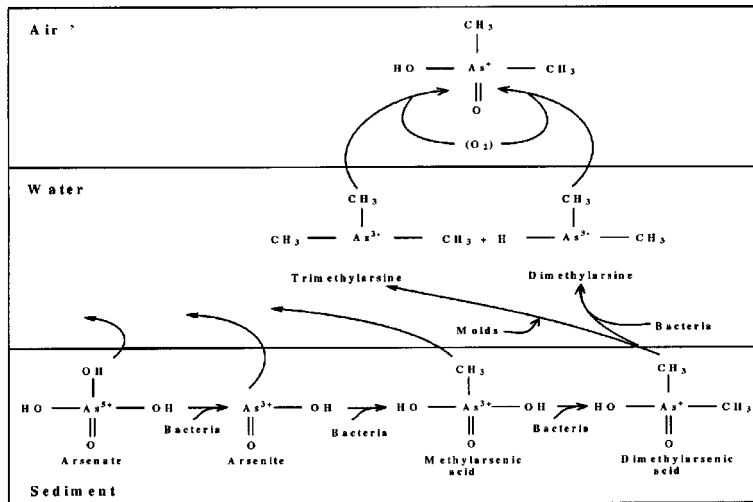


Fig. 3. The biological cycle for arsenic in natural system.

많은 원소 중에서 특히 VA 와 VIA 족에 속하는 원소들은 증분화 연구에서 액체 크로마토그래피와 결합하여 가장 만족스러운 결과를 주는데 이는 휘발성 유도체를 형성하는 과정의 복잡한 단계를 포함하는 기체 크로마토그래피와의 분석과는 차이가 있다. 검량 한계와 방해 물질에 의한 감도 차이는 액체 크로마토그래피와 결합한 검출기에 따라 다르다.

최근 EPA에서는 첫 번째 중금속 내분비계 장애물질(환경호르몬)로 비소(arsenic)를 독성화학물질 리스트에 올렸다. 소량의 비소에 노출되어도 특정 유형의 암과 당뇨병 및 혈관 질환의 발병 위험이 증가한다는 사실이 발견되었다. 음용수에 들어 있는 비소가 폐암, 피부암을 유발하는 것이 확실하며 신장과 간암의 유발 가능성도 있다고 밝힌 바 있다.

특히 해양 생물에서 비소 생변형은 다양한 범위에서 유기비소 화합물을 내포하는 것으로 알려져 있다. arsenobetaine(AsB)과 같은 arsenosugar는 인간에게 무해한 것으로 알려져 있으나 체내에서 arsenosugar는 dimethylarsinic acid(DMA)로 전환되며⁵⁾ 이는 인간에게 잠재적으로 발암 물질로 작용한다고 밝혀졌다.⁶⁾ Fig. 3은 자연계에서 비소의 생지화학적 순환을 간단히 도식화한 것이다.

한편, 셀레늄(selenium)은 독성이면서도 필수적인 미량원소로 이중적 성격을 띄고 있어 환경, 의학이나 생명학에서 많은 관심의 대상이 되는 원소이다. 적절한 셀레늄은 노화방지, 감상선 기능, 생식 능력, 세균 감염 방지 등에 작용하는 단백질과 결합하는 구성 요소이다.⁷⁾

하지만 과잉의 섭취는 탈모나 손톱, 발톱의 손실, 간 기능 및 순환계 장애 등을 일으켜 독성으로 작용하며 셀레늄의 결핍은 심장병,⁸⁾ 관절염,⁹⁾ 암,^{10,11)} 에이즈¹²⁾와 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 셀레늄의 독성과 생물학적 유용성은 이 원소가 존재하는 화학적 형태의 종에 크게 좌우한다. 무기 셀레늄보다는 유기 셀레늄이 독성이 덜 한 것으로 알려져 있다. 또한 유기 셀레늄은 생명체내에서 강한 이성질체적 선택성을 나타내는데 이 두 개의 이성질체 형태에 따라 생물이용 가능성과 독성이 서로 다르게 작용한다. 일반적으로 L-form이 주로 체내로 동화되는데 이는 D-form보다 L-form이 더 독성이 강할 수 있다는 것을 의미한다.¹³⁾

결과적으로 비소나 셀레늄의 단순한 총량적 개념으로는 충분한 정보를 얻을 수 없으며 경우에 따라 그들이 존재하는 매트릭스내에서 종들의 증분화 정도에 따른 분포의 차이점과 필요하다면 그들의 이성질체별 분

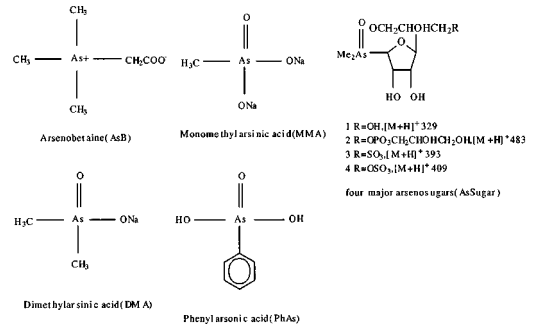


Fig. 4. The chemical structures of major arsenic compounds.

포를 명백히 할 필요가 있다.

따라서, 여기에서는 수질, 토양 그리고 퇴적물 등과 같은 매트릭스에서 HPLC와 결합된 검출기를 이용하여 비소와 셀레늄의 증분화 분석에 적용되는 일반적인 분석법을 서술하고자 한다.

2. 비소 증분화 분석법(Arsenic speciation methods)

Arsenite(As(III))와 arsenate(As(V))와 같은 무기 비소는 monomethylarsonic acid(MMA)와 dimethylarsinic acid(DMA)와 같은 유기 비소 화합물보다 독성이 강하며 무기 비소 중에서는 arsenite가 arsenate보다 더욱 독성이 강하다. 일반적인 비소 화합물의 구조는 Fig. 4와 같다.

비소 증분화 분석에 사용되는 최근의 방법은 감도가 좋은 검출기와 HPLC를 온라인으로 결합한 기술이 사용되고 있다. 여기에 사용되는 검출기로는 유도결합 플라즈마 질량분석기(ICP/MS), 수소 이온 발생 원자 형광분광기(hydride generation, HG-AFS), 수소 이온 발생 원자 흡광 분광기(HG-AAS), 수소 이온 발생 유도결합 원자 방출 분광기(HG-ICP/AES), 수소 이온 발생 유도결합 질량 분석기(HG-ICP/MS) 등이 있다.

비소의 분리 분석에 사용되는 칼럼으로는 주로 역상(reversed-phase)의 이온쌍과 이온교환 칼럼을 사용하였으며 일부는 vesicular 칼럼을 사용하기도 하였다.

2.1. 역상을 이용한 비소 증 분리(Reversed-phase separation of As species)

ICP/MS를 이용하여 분석한 경우 주로 사용된 칼럼

Table 1. As species separation by ion-pairing reversed-phase chromatography coupled o specific detectors.

Column	Matrix	Species	Detection	Ref.
Dionex NS-1 5 μ m (250 \times 4.1 mm)	Groundwaters, NIST SRM 1643b	As(III), DMA, MMA, As(V)	HG-AAS	2, 3
C18 Phenomenex ODS(3) 5 μ m 2 \times (250 \times 4.6 mm), 30C, 70C	Urine (NIST SRM 2670)	As(V), As(III), AsB, MMA, DMA, AsC, TMAAs	MD-HG-AAS, HG-AFS	9, 10
C18 BST Rutin 10 μ m (25 \times 4.6 mm), 24C	Standards, Six drilled well waters, Fresh water (NIST 1643c)	As(III), DMA, MMA, As(V)	HG-AFS, HG-USN-AFS	20, 19
Hamilton PRP-1 10 μ m (250 \times 4.6 mm) or (150 \times 4.1 mm)	Dogfish muscle (DORM-1), Three mineral bottle waters, 12 spring waters, Fish muscle, mussel tissue (BCR CRM 278)	AsC, AsB, As(III), DMA, MMA, As(V)	ICP-MS, HG-ICP-MS	21, 22, 23
SGE Inertsil ODS-2 5 μ m (100 \times 1.0 mm) or (250 \times 4.6 mm)	Standards, Urine	As(III), DMA, MMA, As(V), Asorg	DIN-ICP-MS	14
C18 Spherisorb 3 μ m (150 \times 1 mm)	Standards, Water (NIST SRM 1643a), Soil extract (NIST SRM 2709), Urine (NIST SRM 269(n))	As(III) /AsB, DMA, MMA, p-As, As(V), 4-OH	HEN-ICP-MS	15

은 C18과 PRP-1이며 등용매 용리(isocratic elution)가 가장 많이 사용되었다. 연구된 종들은 수질이나 토양에서 볼 수 있는 As(III), As(V), MMA, DMA와 생물체에서 볼 수 있는 AsB(arsenobetaine), AsC(arsenocholine) 종으로 매우 낮은 용리액(eluent)의 흐름을 제외하고는 전체 분석시간은 10분 정도로 나타났다. 일반적인 ICP/MS로는 검출한계가 종 당 1 ppb에 가까우며 이는 HG-AAS와 유사한 값을 나타내었다. DIN(direct injection nebulizer)¹⁴⁾이나 HEN (high efficiency nebulizer)¹⁵⁾를 사용할 경우 1 ppt 보다 낮은 절대검출한계를 나타내기도 하였다.

HPLC와 ICP/MS 사이에 HG를 연결하여 분석하는 방법도 시도되었는데 검출한계가 20-100 ppt로 매우 감도가 좋은 방법이라고 제시하였다.¹⁶⁾ 그러나, 역상 크로마토그래피는 실제 시료에는 적용하기가 힘들다고 주장하기도 하였는데 이 방법은 매트릭스에 기인한 방해물질과 pH에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다.¹⁷⁾ 오히려 이온 교환상이 선택성은 낮지만 이러한 영향에는 덜 민감한 것으로 나타났다.

ICP/MS 외의 검출기를 이용하여 비소의 종들을 분석하는 경우 대부분 C18칼럼과 등용매 용리 조건을 사용하였다. 분리되는 순서는 일정치 않으며 용리액의 조성이 약간이라도 다르면 순서는 크게 변하는 것으로 나타났다.

가장 낮은 검출한계는 post column hydride generation으로 얻을 수 있으며 HPLC-ICP 검출은 오

히려 상당히 높은 검출한계를 보여 실제적인 적용은 어려운 것으로 나타났다. 최근의 vesicular 크로마토그래피는 합성된 시료나 표준물질을 분석하는데 사용되었고 이는 종종 AFS와 결합하여 사용되었으나 역상 크로마토그래피에서 얻은 검출한계보다 좋은 결과를 보이지 못하였으나 수소 이온 발생기와의 연결은 좋은 검출한계를 보인다.^{18,19)} Table 1은 역상 칼럼을 이용하여 비소 종을 분석한 예를 요약하였다.

2.2. 이온 교환을 이용한 비소 종 분리(Ion exchange separation of As species)

ICP/MS를 이용한 분리법으로 이온 교환 HPLC-ICP/MS방법이 적용되고 있는데, 이는 As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC 등과 같은 대부분의 비소 종을 분석할 수 있다는 장점이 있다. ICP/MS와 HPLC의 온라인 연결의 장점은 극히 단순하며 일부 이동상은 플라즈마에 직접 주입할 수 있으며 낮은 검출한계를 제공하기 때문이다. 또한 0.1 ppb정도로 낮은 검출한계 때문에 음용수와 같은 시료는 직접적인 분석이 가능하며 어류,²⁴⁾ 연체동물,²⁵⁾ 청량음료,²⁶⁾ 와인, 토양, 소변,^{27,28)} 퇴적물²⁹⁾과 같이 여러 매트릭스에서 쉽게 처리, 분석할 수 있다.

ICP/MS의 다른 검출기를 이용한 경우, Hamilton PRP-X100칼럼과 phosphate용리액을 가장 많이 사용하였으며 용리액은 등용매 혹은 기울기(gradient)용매를 사용하였다. 기울기 용매의 경우 post column hydride

Table 2. Separation of arsenic species by anion exchange chromatography coupled to specific detector

Column	Matrix	Species	Detection	Ref.
Dionex IonPac AS7, 10m (250 × 4 mm), Dionex AS4A-SC (125 × 3 mm), Dionex PA-10 (250 × 4 mm)	Fish and mussel extract, DORM-2, mushroom, water samples, Microorganism in sewage sludge	AsB, As(III), DMA, AsC, MMA, PhAs, As(V), TMA _s O, AsC, TMA _s	ICP-MS	34 35 36
Hamilton PRP-X100 10m (150 × 4.1 mm)(250 × 4.1 mm) or Zorbax 300 SCX* 5m (150 × 4.6 mm)	Certified river sediment (NIST SRM 2704), Algae, Synthetic sediment, synthetic fish, In-house soil, in-house sediment, river sediment (BCR CRM 320)	AsSugar A, As(III), DMA, MMA, AsSugar B, As(V), AsSugar C, AsSugar D, AsB, TMA _s O, AsC, TMA _s	ICP-MS	37 38 39 29
Supelcosil LC SAX1 5m (250 × 4.6 mm), 25C, 30C or Superdex peptide HR 10/30 13m (300 × 10 mm) with Supelguard SAX1	Soils, earthworms, Urine, mineral waters, Marine algae, Seaweeds, Estuarine water	AsSugar D, AsSugar A, AsSugar C, As(V), DMA, AsB, MMA, AsSugar B, TMA _s , AsC, TMA _s O, As(III)	ICP-MS TN-ICP-MS	40 41 42 43 44
ION-120 (120 × 4.6 mm) with guard column (20 × 4.6 mm)	Urine (NIST SRM 2670)	AsB, As(III), DMA, MMA, As(V)	ICP-MS	45 28
Hamilton PRP-X100 10m (250 × 4.1 mm)	Spiked river, Spiked mineral waters, Ground water, Waste water, Synthetic sediment extract, Drinking water, Creek waters of a old mining area, Synthetic fish extract, Spot urine samples, Urine (NIST SRM 2670), Bio-Rad Lyphochek urine, Dogfish muscle (DORM-1), Seafood products, Spiked mineral water, Mushroom extract, Marine organisms, Mussel tissue (BCR CRM 278), Cod muscle (BCR CRM 422)	DMA, MMA, As(V), AsB, AsC, As(III)	HG-AAS, FAAS, Thermo-oxidation- HG-QFAAS (lamp off and lamp on), UV-photo-oxidation- HG-QFAAS (lamp off and lamp on) HG-QFAAS, GFAAS, HG-AFS, UV-HG-AFS, ICP-OES, HG-ICP-AES	46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57

* cation exchange column

generation과 함께 사용하기도 하였다. 수소 이온 발생 장치를 사용할 경우 arsenite보다 DMA에서 비소 종의 측정 효율이 떨어지는 것으로 나타나는데³⁰⁾ 각 유기 비소종의 효율 정도를 고려하여야 한다. 용리액의 pH가 10보다 낮은 경우, 용리 순서는 보통 As(III), DMA, MMA, As(V)이며 더 높은 pH에서는 DMA가 먼저 용리되고³¹⁾ 그 후 MMA가 용리된다.³²⁾ 이러한 차이는 유기 비소 종의 수소성 상호작용으로 설명할 수 있다.

ICP/MS 검출기를 이용한 분석법과 마찬가지로 분석 종은 As(III), As(V), MMA, DMA이며 AsB, AsC, TMA_s 등도 고려되었으며 대부분 수질, 소변, 토양, 퇴적물, 어류, 연체동물 조직 등 다양한 시료들을 다루고

있다. 최근의 논문에서는 DORM-1(dogfish)와 같은 certified reference material(CRM)을 사용하여 총 비소 함량을 분석하고 있다. 검출한계는 매우 다양한데, ICP/AES나 AF-AAS와 수소이온 발생기를 결합하여 분석한 방법이 가장 낮아 수돗물을 직접 분석할 수 있다. Fig. 5는 이온 교환 칼럼을 이용하여 비소 종을 분석한 일반적인 크로마토그램이다.

또한 HPLC-ICP/MS로 분석한 종들은 Fig. 2와 같이 NMR이나 ESI-MS/MS등으로 확인할 수 있는데 Fig. 6은 ESI-MS/MS를 이용하여 분자량 이온인 m/z 408.9와 483에서 As-sugar의 비소 종을 확인한 질량 스펙트럼이다.

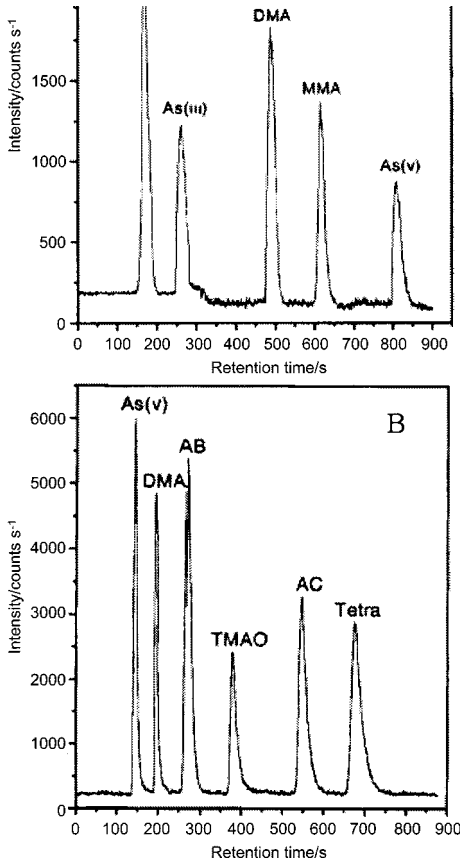


Fig. 5. HPLC-ICP/MS chromatograms for the separation of As(III), As(V), MMA, DMA, AB(arsenobetaine), AC(arsenocholine), Tetra (tetramethylatonium ion) and TMAO (trimethylarsine oxide) using Hamilton PRP-X100 anion exchange column(A) and Nucleosil 5SA cation exchange column(B).³³⁾

3. 셀레늄 증분화 분석법(selenium speciation methods)

일반적으로 셀레늄은 생물학적 활성도가 매우 높은 것으로 알려져 있다. 셀레늄은 아주 쉽게 생명체로 흡수되는데 체내에 존재하는 셀레늄은 효소 산물이나 유전자 산물로 크게 분류할 수 있다. 전자는 환원, methylation과 selenoamino acid합성과 같은 효소작용의 산물이며 후자는 selenocysteinyl residue의 코드화에 따른 유전자 산물로 셀레늄이 동화되는 과정에서 생성되는 산물이다.⁵⁸⁾ 셀레늄은 생체 플라즈마에서 extracellular glutathione peroxidase인 두 개의 selenoprotein으로 존재한다.^{59,60)} 이들의 신진대사는 selenite가 selenide로 환

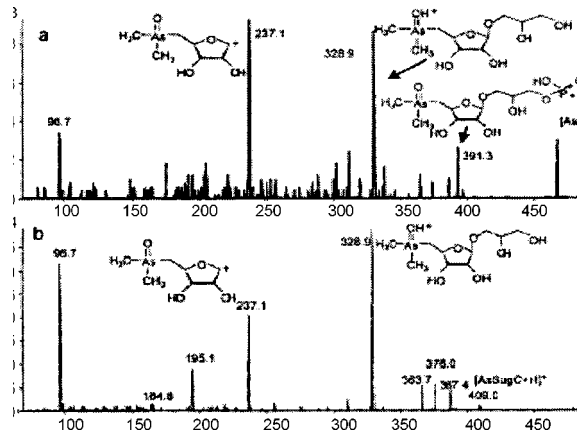


Fig. 6. Mass spectra of signal suspected from arsenosugars by ESI-MS/MS.⁴³⁾

원되고, selenide는 selenocysteine로 변환된다. 이와 같이 비특정적으로 여러 단백질과 결합하여 selenoprotein으로 존재하며, monomethylselenol, trimethylselenonium, dimethylselenide와 같은 대사물질로 methylation되는 메커니즘 등을 포함한다.^{61,62)} 셀레늄은 주로 음식으로 공급되며 호흡이나 노방출로 제거되는데 노방출은 셀레늄 제거의 주요 경로이며 50% 이상이 이러한 경로를 통해 제거된다. 소변에 의한 셀레늄 방출이 전 세계적으로 차이점을 보이는 것은 그들의 음식습관이나 그들 토양의 셀레늄 함량에 크게 의존한다.¹⁹⁾ 생물시료에서 셀레늄의 증분화 분석은 분석화학에서 여러 해 동안 풀지 못한 부분으로 남아 있는데 우선적으로 인간의 소변에서 관찰된 셀레늄의 총 농도가 극히 낮고 공신력 있는 표준물질의 부족과 유기 셀레늄 화합물의 열적 안정성으로 복잡한 생물 매체에 동화되면서 셀레늄 확인 과정을 더욱 복잡하게 하고 있기 때문이다.⁶³⁾ 일반적인 selenoamino acid의 구조는 Fig. 7과 같다.

현재 사용되는 액체 크로마토그래피의 두 가지 유형은 이온 교환이나 역상 이온쌍 분리가 가장 널리 사용되고 있으나 vesicular 크로마토그래피, 특정 역상 크로마토그래피가 최근에 셀레늄의 증분화 연구에 도입되었다.

3.1. 역상을 이용한 셀레늄 증 분리(Reversed-phase separation of Se species)

이 방법에서 가장 많이 사용된 컬럼은 Table 3에서 예시된 바와 같이 C18이며 대표적인 이동상은 tetrabutylammonium용액과 메탄올을 주로 사용하였다. 셀레늄의 증분화 분석 중에서 무기 종을 분리하는 방

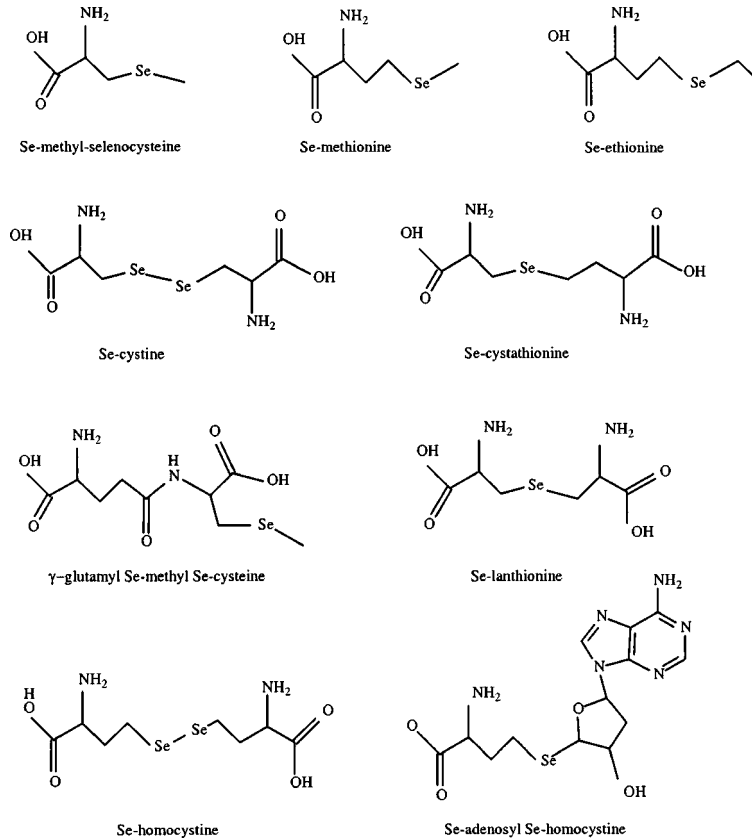


Fig. 7. The chemical structures of selenoamino acids.⁵⁸⁾

Table 3. Separation of selenium species by ion-pairing reversed-phase or vesicle-mediated chromatography

Column	Matrix	Species	Detection	Ref.
Hamilton PRP-1 10 μ m (250 \times 4 mm), 5 μ m (150 \times 4.6 mm) or (400 \times 4.1 mm)	Animal Supplementation, Standards Urine (NIST SRM 2670), White clover (CRM 402)	TMSe, SeCys, Se h-Cys, SeMet, SeEth, Se(IV), Se(VI), SeMet	FAAS, USN-ICP-MS, GFAAS(on-line)	69, 64, 68
C ₁₈ Spherisorb 10 μ m (250 \times 4.6 mm) or 5 μ m (210 \times 4.6 mm)	Spiked waters, Yeast, Urine, Standards	SeCys, SeMet, SeEth, Se(IV), Se(VI) TMSe, SeCys, SeC(NH ₂) ₂	ICP-MS, MD-HG-AAS, MD-HG-ICP-MS	70, 71, 66, 65, 67
C ₁₈ Nucleosil 5 μ m (ns mm)	Standards	SeCys, Se h-Cys, SeMet, SeEth	HHPN-HR-ICP-MS	72
Teicoplanin bond phase (chirobiotic T) 10 μ m(9250 \times 4.6 mm)	Yeast	DL-SeMet, DL-SeEth, DL-SeCys, L-SeMet	ICP-MS	73

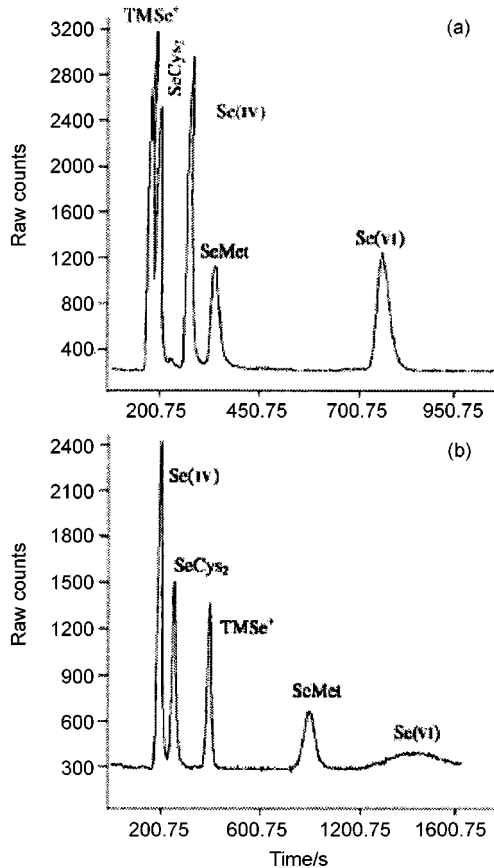
법에서는 보통 유속이 1 ml/min이며 머무름 시간은 10 분보다 짧은 시간내에 분석되며 Se(VI) 이온이 가장 늦게 분리되는 것으로 나타났다. 유기셀레늄을 포함하는

7가지 셀레늄 종의 분리 분석 방법 중에서 프레임 원자 흡수 분광기를 검출기로 사용한 방법은 매우 감도가 낮으며 용리액의 메탄올 함량이 많은 경우 유도결

Table 4. Separation of selenium species by anion exchange chromatography

Column	Matrix	Species	Detection	Ref.
ESA Aion III 10m (250 × 4 mm)	Animal supplementation, Standards	TMSe, SeCys, Se(IV), SeCys, SeMet, Se(VI), SeEth	FAAS ICP-MS	69, 75
Merck Polyspher IC AN-2 10m (120 × 4.6 mm)	Standards, Cooked cod, BCR CRM 402 (white clover)	SeMet, Se(Cys) ₂ , Se(IV), Se(VI)	FAAS ICP-MS	76, 77
Hamilton PRP-X100 10m (250 × 4.6 mm) or GS-200* (500 × 7.6 mm)	Yeast, Spiked urine, Bacterial sample, Spiked waters, Selenium enriched vegetables, Garlic	TMSe, Se(IV), SeMet, SeEth, SeCys, Se(VI), SeC(NH ₂) ₂ , MetSeCys, SeallylSeC, AllylSeCys	GFAAS(on-line), ICP-AES, FI-HG-AAS, HG-MIP-MS, ICP-MS	78, 79, 80, 81, 70, 82, 83
Crownpak(+) (ns mm)	yeast, garlic, onion	MetSeCys, GlnSeMetCys, SeLan, SeCys, SecysTat, SeMet, SeEth, Se h-Cys, AdnSe h-Cys	ICP-MS	58

* Gel-permeating column

**Fig. 8.** Chromatogram of Se species obtained for anionic(a) and cationic(b) exchange chromatography (SeCys: selenocysteine, SeMet: Selenomethionine, TMSe⁺: trimethylselenonium ion).⁸⁴⁾

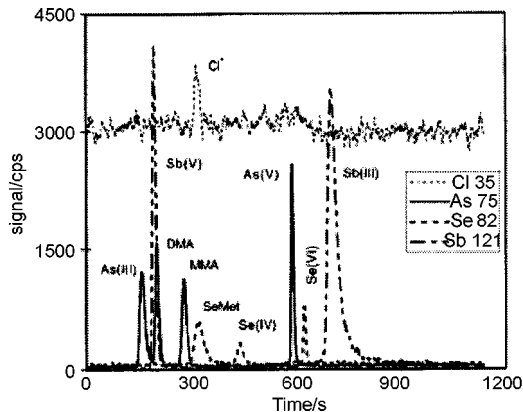
합 플라즈마 검출기로는 검출하기가 쉽지 않은 것으로 나타났다. 조사된 논문 중에서는 소변,⁶⁴⁻⁶⁷⁾ 채소류⁶⁸⁾ 등 실제 시료를 분석한 것이 있다. 소변의 경우, vesicle-mediated chromatography와 기울기 용리 모드를 사용하여 7가지의 셀레늄 종들을 분리하였다. 가장 낮은 검정한계는 ICP/MS 검출기를 이용한 것으로 ultrasonic nebulizer ICP/MS 전에 post column on-line hydration과 같은 방법으로 얻을 수 있었다. 일반적으로 ICP/MS를 직접 사용하여 얻은 검출한계는 온라인 GFAAS나 THG-AAS로 얻은 것과 유사한 것으로 나타났다.^{66,67)} 그러나 원자 흡수 분광기의 사용은 연차적인 검출로 인해 측정시간의 증가를 초래한다.

3.2. 이온 교환을 이용한 셀레늄 종 분리(Ion exchange separation of Se species)

Table 4에서 처럼 많은 음이온 교환 칼럼이 사용되고 있으나 Hamilton PRP-X100이나 ESA Anion III가 가장 많이 사용되었다. 용리액은 phosphate, carbonate, citrate, phthalate가 기본적으로 사용되고 있다. 무기 셀레늄 종의 분리 순서는 일정치 않으나 보통 Se(VI)가 가장 오랫동안 머무는 것으로 나타났다. Se-cystine, Se-methionine, trimethylselenium(TMSe)과 같은 유기 셀레늄 종들은 주로 pH와 용리액의 농도에 크게 좌우되는 것으로 나타났다.⁷⁴⁾ Fig. 8은 음이온과 양이온 교환 칼럼으로 분석한 크로마토그램으로 칼럼에 따라 각 종들의 분리능이 다르며 종들의 용리 순서도 다름을 볼 수 있다.

Table 5. Simultaneous separation of arsenic and selenium

Column	Matrix	Species	Detection	Ref.
Hamilton PRP-X100 10m (125 × 4.0 mm), 25C or (250 × 4.6 mm)	Mineral water(As), two certified waters(Se(IV) + Se(VI)), Standards	As(III), DMA, Se(IV), As(V), MMA, As(V), Se(VI), PhAs	ICP-MS	85, 86, 87
Cetac ANX1606As (100 × 2 mm)	Water(Se), spiked ground water, soil extracts(As)	As(III), As(V), Se(IV), Se(VI)	MCN-ICP-MS	88
Dionex AS14 (250 × 4 mm) with AG14 guard column(50 × 4 mm)	Soil(NIST SRM 2710), urine(NIST SRM 2670n), fish(DORM-2)	As(III), DMA, MMA, As(V), SeMet, Se(IV), Se(VI), Sb(V), Sb(III), AsB, PhAs, Te(VI)	ICP-MS	89, 90

Fig. 9. HPLC-ICP/MS chromatogram of a standard containing As, Se and Sb species.⁸⁹⁾

현재 온라인 ICP/MS검출은 가장 흔히 사용되는 방법으로 가장 낮은 검출한계를 제공한다. 대부분 표준액을 분석하였으며 실제 시료로는 동물성 식품 첨가제, 효모, 소변, 어류, 채소류, certified reference material이다.

4. 비소와 셀레늄 종의 동시분석(simultaneous arsenic and selenium speciation)

극히 일부분의 논문들이 As와 Se의 동시 분석을 다루었는데 특히 비휘발성 원소인 비소, 셀레늄, 텔루륨(tellurium), 안티몬(antimony)의 분석이 HPLC-ICP/MS나 CE-ICP/MS를 이용하여 행해지고 있다.

비소와 셀레늄은 약간의 공통된 화학적 특성을 가지는데, 산화된 산의 형태인 무기 형태가 우점한다. As(III), As(V), MMA, DMA가 음이온처럼 나타나는 pH 조건 하에서 Se(IV)와 Se(VI) 역시 이온화됨으로 동시 분석이 가능한 것이다.

분석용 칼럼으로는 Table 5에서와 같이 역상과 이온

교환상 모드가 주로 이러한 목적을 위해 사용되었다. 보통 selenite가 arsenate 전에 용리되며 selenate가 가장 늦게 분리되는 것으로 나타났다.

비소와 셀레늄 종들뿐만 아니라 동시에 안티몬과 텔루륨 종들도 동시에 분석한 논문들도 있는데 이 때의 분석은 올바른 용리액을 선택하여야 하며 용리액과 pH에 따라 이들 종들 간의 용리 순서가 바뀔 수 있음을 확인하여야 한다. Fig. 9는 ICP/MS를 이용하여 비소, 셀레늄, 안티몬 종을 동시 분석한 결과로 비소 종과 염소이온(chloride)의 머무름 시간이 다름을 보여 주고 있다.

감사의 글

본 논문은 환경부 차세대 핵심 환경기술 개발사업 중 환경측정자료의 고품질 기술개발 사업의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

- 1) D. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, H. P. Van Leeuwen and L. G. Danielsson, *IUPAC guidelines for terms related to speciation of trace elements*, 1997.
- 2) J. Szpunar, Robiski, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, 363, 550.
- 3) J. M. Stillman, F. C. Shaw III, K. T. Suzuki, "Metallothioneins. Synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelations and metalthiolate complexes", 1992, VCH, NewYork.
- 4) J. F. Rioden, B. L. Valee, "Metallothionein and related molecules, methods in enzymology", 1991, Academic press, New York.
- 5) X. C. Le, W. R. Cullen and K. T. Reimer, *Clin. Chem.*, 1994, 40, 617.

- 6) S. Yamamoto, Y. Konishi, T. Murai, M. A. Shibata, T. Matsuda, K. Kuroda, G. Endo and S. Fukushima, *Appl. Organomet. Chem.*, **1994**, 8, 197.
- 7) J. L. Shisler, T. G. Senkevich, M. J. Berry and B. Moss, *Science*, **1998**, 279, 102.
- 8) J. K. Huttunen, *Biomed. Environ. Sci.*, **1997**, 10, 220.
- 9) K. Kose, P. Dogan and Y. Kardas, *Biol. Trace Elem. Res.*, **1996**, 53, 51.
- 10) M. J. Parnham and E. Grap, *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, 36, 3095.
- 11) J. M. Fox, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1992**, 14, 275.
- 12) M. K. Baum, G. Shor-posner, S. Lai, *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retroviol.*, **1997**, 15, 370.
- 13) P. A. M. Adam and O. A. Levander, *Nutr. Res.*, **1987**, 7, 601.
- 14) S. C. K. Shum, R. Neddersen and R. S. Houk, *Analyst*, **1992**, 117, 577.
- 15) S. A. Pergantis, E. M. Heithmar and T. A. Hinners, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1997**, 122, 1063.
- 16) C. J. Hwang, S. J. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 289, 205.
- 17) J. Szpunar-Lobinska, C. Witte, R. Lobinski, F. C. Adams, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 351, 351.
- 18) A. Woller, Z. Mester, P. Fodor, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1995**, 10, 609.
- 19) Z. Mester, A. Woller, P. Fodor, *Microchem. J.*, **1996**, 54, 184.
- 20) Z. Mester and P. Fodor, *J. Chromatogr.*, **1996**, 756, 292.
- 21) D. Beauchemin, K. W. M. Siu, J. W. McLaren and S. S. Berman, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1989**, 4, 285.
- 22) P. Thomas and K. Sniatecki, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1995**, 10, 615.
- 23) P. Thomas and K. Sniatecki, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1995**, 351, 410.
- 24) S. Branch, L. Ebdon, P. O'Neill, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1994**, 9, 33.
- 25) S. Caroli, F. La torre, F. Petrucci, N. Violante, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **1994**, 1, 205.
- 26) B. S. Sheppard, J. A. Caruso, D. T. Heitkemper, K. A. Wolnik, *Analyst*, **1992**, 117, 557.
- 27) E. H. Larsen, G. Pritzl, S. H. Hansen, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1993**, 8, 557.
- 28) R. Ritsema, L. Dukan, T. Roig Navarro, et al., *Appl. Organomet. Chem.*, **1998**, 12, 591.
- 29) P. Thomas, J. K. Finnie, J. G. Williams, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1997**, 12, 1367.
- 30) T. A. Hinners, *Analyst*, **1980**, 105, 751.
- 31) X. C. Le, W. R. Cullen, K. J. Reimer, *Talanta*, **1994**, 41, 495.
- 32) X. Zhang, R. Cornrlis, J. De Kimpe and L. Mees, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1996**, 11, 1075.
- 33) K. Falk and H. Emons, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 643.
- 34) S. Londesborough, J. Mattusch and R. Wennrich, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 363, 577.
- 35) J. Mattusch, R. Wennrich, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3649.
- 36) E. B. Wickenheiser, K. Michalke, C. Drescher, A. V. Hirner and R. Hensel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1998**, 362, 498.
- 37) P. Yeh1, J. E. Tyson, *Anal. Commun.*, **1997**, 34, 49.
- 38) A. D. Madson, W. Goessler, S. N. Pederson and K. A. Francesconi, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 657.
- 39) C. Demesmay, M. Olle, M. Porthault, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1994**, 348, 205.
- 40) A. Geiszinger, W. Goessler, D. Kuehnelt, K. Francesconi and W. Kosmus, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32, 2238.
- 41) S. Saverwyns, X. Zhang, F. Vanhaecke, R. Cornelis, L. Moens and R. Dams, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1997**, 12, 1047.
- 42) J. Szpunar, S. McSheehy, K. Poe, V. Vacchina, S. Mounicou, I. Rodriguez and R. Obiski, *Spectrom. Acta B*, **2000**, 55, 779.
- 43) S. Mcsheehy and J. Szpunar, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 79.
- 44) M. H. Florencio, M. F. Duarte, S. Facchetti, et al., *Analisis*, **1997**, 25, 226.
- 45) X. Wei, C. A. Brockhoff-schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2001**, 16, 12.
- 46) M. Gomez, C. Camara, M. A. Palacios and A. Lopez-Gonzalvez, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 357, 844.
- 47) J. Stummeyer, B. Harazim and T. Wippermann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 354, 344.
- 48) Z. Iejkovec, J. T. van Elteren and A. R. Byrne, *Talanta*, **1999**, 49, 619.
- 49) J. Zheng, W. Goessler and W. Kosmus, *Chromatographia*, **1998**, 47, 257.
- 50) D. L. Tsalev, M. Sperling and B. Welz, *Analyst*, **1998**, 123, 1703.
- 51) D. Velez, N. Ybanez and R. Montoro, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1996**, 11, 271.
- 52) R. Rubio, A. Padro and G. Rauret, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1995**, 351, 331.
- 53) J. L. Gomez-Ariza, D. Sanchez-Rodas, R. Beltran, W. Corns and P. Stockwel, *Appl. Organomet. Chem.*, **1998**, 12, 439.
- 54) J. T. van Elteren and Z. Slejkovec, *J. Chromatogr.*, **1997**, 789, 339.

- 55) Z. Slejkovec, J. T. van Elteren and A. R. Byrne, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 358, 51.
- 56) A. El Moll, R. Heimburger, F. Lagarde and M.J.F. Leroy, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 354, 550.
- 57) R. Rubio, A. Padrao J. Alberti and G. Rauret, *Mikrochim. Acta*, **1992**, 109, 39.
- 58) C.A. Ponce de Leon, K.L. Sutton, J.A. Caruso and P.C. Uden, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 1103.
- 59) G. F. Burk, K. E. Hill, J. A. Awad, J. D. Morrow, T. Kato, K. A. Cockell and P. R. Lyons, *Hepatology*, **1995**, 21, 561.
- 60) K. E. Hill and R. F. Burk, *Biomed. Environ. Sci.*, **1997**, 10, 198.
- 61) D. G. Barceloux, *Clin. Toxicol.*, **1999**, 37, 145.
- 62) M. S. Alaejos and C. D. Romero, *Clin. Chem.*, **1993**, 39, 2040.
- 63) W. Z. Shou, M. M. Woznichak, S. W. May and R. F. Browner, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3266.
- 64) K.L. Yang and S. J. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 307, 109.
- 65) J. M. Marchante-Gayon, J.M. Gonzalez, E. Blanco and A. Sanz-Medel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 355, 615.
- 66) J. M. Gonzalez LaFuente, M. L. Fernandez Sanchez and A. Sanz-Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **1996**, 11, 1163.
- 67) J. M. Gonzalez LaFuente, M. Dlaska, M. L. Fernandez Sanchez and A. Sanz-Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1998**, 13, 423.
- 68) M. Potin-Gautier, C. Boucharat, A. Astruc and M. Astruc, *Appl. Organomet. Chem.*, **1993**, 7, 593.
- 69) G. Kolbl, K. Kalcher and K. J. Irgonic, "Identification and determination of selenium compounds in samples of environmental importance", **1996**, 161-172, V. G. Kumar Das, Narosa Publishing House, New Delhi.
- 70) Y. Cai, M. Cabanas, J. L. Fernandez-Turiel, M. Abalos and J. M. Bayona, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 314, 183.
- 71) S. McSheehy, P. Pohl, J. Szpunar, M. Potin-Gautier and R. Obiski, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2001**, 16, 68.
- 72) I. Feldmann, N. Jakubowski, D. Stuewer and C. Thomas, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 371.
- 73) S. P. Mandez, E. B. Gonzalez and A. S. Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 1109.
- 74) G. Kolbl, K. Kalcher and K. J. Irgonic, *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 284, 301.
- 75) G. Kolbl, *Max. Chem.*, **1995**, 48, 185.
- 76) H. M. Crews, P. A. Clarke, D. J. Lewis, L. M. Owen, R. Strutt and A. Izquierdo, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1996**, 11, 1177.
- 77) G. A. Pedersen and E.H. Larsen, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 358, 591.
- 78) N. Gilon, M. Potin-Gautier and M. Astruc, *J. Chromatogr.*, **1996**, 750, 327.
- 79) A. Hagege, S. Niemczyk, M. J. E. Leroy, *Analisis*. **1995**, 23, 476.
- 80) A. Chatterjee, Y. Shibata, A. Tanaka and M. Morita, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 436, 253.
- 81) B. Michalke, H. Witte and P. Schramel, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2001**, 16, 593.
- 82) H. Ge, X. J. Cai, J. F. Tyson, P. C. Uden, E. R. Denoyer and E. Block, *Anal. Commun.*, **1996**, 33, 279.
- 83) S. M. Bird, H. Ge, P. C. Uden, J. F. Tyson, E. Block and Denoyer, *J. Chromatogr.*, **1997**, 789, 349.
- 84) P. Moreno, M. A. Quijano, A. M. Gutierrez, M. C. Perez-conde and C. Camara, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2001**, 16, 1044-1050.
- 85) T. Guerin, M. Astruc, A. Batel and M. Borsier, *Talanta*, **1997**, 44, 2201.
- 86) T. Guerin, M. Astruc, M. Astruc, A. Batel and M. Borsier, *J. Chromatogr. Sci.*, **1997**, 35, 213.
- 87) P. Thomas, K. Pereira and D. Koller, *Analisis*, **1997**, 25, 19.
- 88) A. Woller, H. Garraud, J. Boisson, A.M. Dorthe, P. Fodor and O.E.X. Donard, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1998**, 2, 141.
- 89) T. Lindemann, A. Prange, W. Dannacker and B. Neidhart, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 364, 462.
- 90) B. Gammelgaard and O. Jons, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2000**, 15, 945.