

Furnace Atomizer를 이용한 微量血液中 Pb檢出에 關한 研究

慶熙大學校 醫科大學 豫防醫學教室

金亨錫・朴良元・具燾書

= Abstract =

Lead Determination in 25 μ l Whole Blood Sample by Atomic Absorption Spectrophotometer with Furnace Atomizer

Hyung-Suk Kim, Ph. D.,

Yang Won Park, M.D., Ph. D., Do Seu Koo, M.D., Ph.D.

Department of Preventive Medicine, School of Medicine,

Kyung Hee University, Seoul, Korea

To determine Pb level in blood, we usually used to pull out about 5ml blood from venous vessel and this sample was digested with acids to decompose organic matter and then determined the Pb contents by Atomic Absorption Spectrophotometer with flame. But recent trend in quantitating Pb in small amount of sample is very much recommended in clinical chemistry specially pediatrics, and industrial hygiene and occupational health area. Authors tried to determine Pb contents in small amount blood of 25 μ l by using capillary tube method and got the possibility of determination of ng amount of Pb in 25 μ l whole blood sample without any pretreatment of sample.

I. 緒 論

지금까지 血液中 Pb成分을 檢出하려면 最少限 血液 5ml를 採取하여 HNO₃, HCl, H₂SO₄같은 酸으로 血液中 有機物質을 分解시킨후 flame으로 Atomic Absorption Spectrophotometer에 依하여 測定하여 왔다. 그러나 採血하는 過程에서 번거로움과 獻血者의 不便한 關係로 문제점이 惹起될 수 있으며, 特히 小兒科患者에게서 採血하기가 어려운점등이 있어서 採血問題가 恒시 고려되고있는 實情이다.¹⁾ 한편 從前方法에서는 正常人이나 非正常人の 血中Pb의 濃度가 보통分析되는 flame AAS法으로는 測定限界(detection limit)의 범위에 있기 때문에 MIBK등으로 抽出하는 번거로운 過程이 있으며, 이러한 抽出過程에서 생길 수 있는 誤差로 말미암

아 實驗結果値가 不正確한 경우가 많다. 그리하여 近年에 여러가지의 새로운 方案이 提案되고 있으며²⁻⁴⁾ 小兒科分野에서는 正確한 分析値를 얻을 수 있어야하고 試料의 前處理를 行하지않고 分析할 수 있어야하는 등 새로운 分析法이 要求되고있는 實情이다. 또한 産業保健分野에서 근로자의 血液中 Pb量을 간단히 測定할 수 있는 方法이 모색되어야하며 기타 職業保健分野에서도 새로운 測定法の 開發이 또한 要求되고 있다.

最近 從前부터사용되던 Atomic Absorption Spectrophotometer에 Furnace Atomizer를 부착하여 小量의 血液試料中 微量의 Pb를 正確히 측정할 수 있는 方法이 發表되고 있으며 detection limit도 flame AAS法보다도 몇배나더 낮은 極微量도 測定possible한 方法이 發表되어지고 있다⁵⁻⁸⁾.

著者等은 capillary tube를 利用하여 25 μ l의 血液中

에 Pb량을 測定하였던바 다음과 같은 成績을 얻었기에 이를 發表하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 試料血液: 경희의료원 건강관리과에서 해외과전 근로자들의 採血을 試料로 하였다.

2. Surfactant: Triton X-100 (Eastman Organic Chemicals) 0.01%용액

3. Pb stock solution: 미국 Fisher Scientific Co.

4. Pb working standard solution: HNO_3 (1:1)으로 Pb stock solution을 희석하여 0.1ppm Pb solution으로 조제하였다.

5. Glassware: 모든 유리용기는 HNO_3 (1:5)로 씻고 다시 再증류수로 씻었다.

6. 分析裝置: Pb의 分析機器로는 美國의 Instrumentation Laboratory社(IL)제품인 Atomic Absorption Spectrophotometer, model 551을 本體로하고 deuterium background corrector를 갖춘 graphite furnace, model IL 655로서 실험하였고 이때 機械의 parameter는 다음과 같다.

Lamp: Pb hollow cathode lamp

Lamp Current: 5mA

Wavelength: 283.3nm

Analysis mode: DB A-Bkg

Integration Time: 12 sec

Readout mode: P/H

Purge Gas: Argon (30ml/min)

Temperature Program: dry at 400°C for 25 sec
ash at 650°C for 25 sec
atomize at 1900°C for 10 sec

7. 分析過程: 5ml plastic tube에 surfactant인 Triton X-100을 600 μ l를 넣은후 capillary tube로 血液 25 μ l를 加하여 가볍게 混和한다. 다음 Eppendorf micropipet로 희석된 血液試料 25 μ l를 取하여 graphite microboat에 넣고 별도로 3個의 graphite microboat에 血液試料를 上記와 같이 넣은후 이것에 Pb標準溶液 5 μ l, 10 μ l, 및 15 μ l를 넣은 후 이들을 90°C가 되는 hot plate에서 건조시킨 후 standard addition方法으로 Pb량을 測定한다. 즉, boat holder를 가지고 건조된 試料가 담긴 graphite boat를 flameless atomizer에 넣고 6項에서 記述한 條件下에서 分析한다.

III. 實驗結果 및 考察

血液中 鉛定량은 作業環境中 鉛暴露의 重要한 指標로 活用되어지고 있다. 血液中 鉛의 定量法으로 以前

에는 Atomic Absorption Spectrophotometer를 利用하여 flame으로 測定하였으나 flame法은 試料調製에 時間이 많이소요되며 操作이 繁雜하다⁹⁾. 이러한 理由로 최근 flameless法이 많이 利用되고있는 傾向이며¹⁰⁾ flameless法은 flame法에 比하여 操作이 容易하고 微量의 試料로서 高感度로 측정할 수 있는 特性을 가지고 있다.

Flameless法은 試料를 micropipet로 graphite boat에 넣어 실험하므로 信賴度가 높은 精密한 結果를 얻는데는 熟練된 技術이 필요하게 된다.

Table 1. Recovery of Pb added to blood

Pb added (ng)	Expected (ng)	Recovered (ng)	Avarag recovered (%)
0	9.31	9.10	91.0
0.5	14.31	13.70	95.7
1.0	19.31	20.08	104.0
1.5	24.31	23.20	95.4

Table 1에서 보는바와같이 9.31ng이 들어있는 血液을 실험하니 측정된량이 9.10ng으로서 平均回收率이 91.0%로 나타났고 이 血液에 Pb標準液을 0.5ng을 添加한 試料에서의 平均回收率은 95.7%이었고 Pb標準溶液 1.0ng을 添加한 試料에서는 平均回收率이 104.0%이였으며 Pb標準溶液을 1.5ng 添加한 試料에서는 回收率이 95.4%로 나타나 本實驗에 있어서 分析方法은 상당히 良好하다고 생각되며 正密度도 또한 신빙성이 높다고 생각된다. 한편 試料 血液인 matrix와 surfactant인 Triton X-100에 依한 peak height (P/H)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Table 2와 같이 여러 試料에 Pb標準液을 添加하여 平均值, 標準偏差 및 variation을 算出하니 誤差의 범위가 극히적게 나타났으며 測定值의 正確度가 높음을 보여주었다. Rosen¹¹⁾에 依하면 再來式의 Atomic Absorption Spectrophotometer으로 flame을 利用하는 方法보다 flameless로 측정하는 方法이 30~40배 以上 敏感하다고 하였다.

Table 2. The result of standard addition to the samples and P/H.

Sample	Mean(P/H)	Var	SD
600 μ l*+25 μ l**	0.106(n=9)	0.00024	0.0164
600 μ l+25 μ l+5 μ l***	0.259(n=3)	0.00049	0.0271
600 μ l+25 μ l+10 μ l	0.3503(n=3)	0.00029	0.02119
600 μ l+25 μ l+15 μ l	0.4453(n=3)	0.000107	0.0127

*: 0.01% Triton X-100.

** : whole Blood.

***: 0.1% Pb Standard Solution.

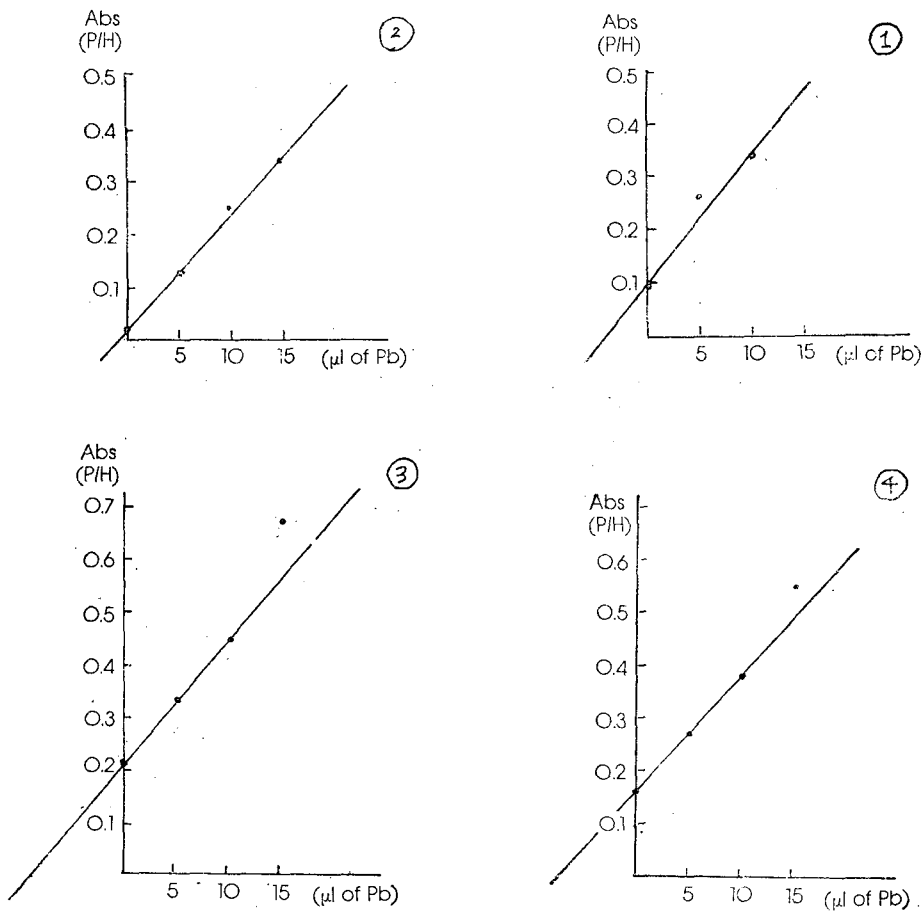


Fig. 1. Standard addition method to each blood sample with 5, 10, and 15 μ l of 0.1ppm Pb solution.

Table 3. Pb standard solution addition to blood sample

1	000025	0.118)m=0.062	
	000026	0.084		
	000027	0.073		
	000028	0.258		a
	000029	0.329		b
	000030	0.472	c	
2	000032	0.014)m=0.018	
	000033	0.015		
	000035	0.025		
	000036	0.136		a
	000037	0.255		b
	000038	0.344	c	
3	000039	0.240)m=0.216	
	000040	0.208		
	000041	0.199		
	000042	0.339		a
	000043	0.454		b
	000044	0.676	c	
4	000015	0.209)m=0.164	
	000046	0.135		
	000047	0.148		
	000048	0.277		a
	000049	0.382		b
	000050	0.553	c	

a: 5 μ l addition of 0.1ppm Pb Standard Solution
 b: 10 μ l addition of 0.1ppm Pb Standard Solution
 c: 15 μ l addition of 0.1ppm Pb Standard Solution
 m: mean value

다음 Table 3과 Fig. 1은 4개의 未知試料의 P/H와 standard addition method를 이용한 血液中 Pb의 量을 表示한 Table과 그림이다. 이 實驗에서 各試料의 첫 3개는 試料만의 P/H이고 다음은 0.1ppm Pb標準液 5 μ l를 添加한 試料의 P/H이며, 다음은 10 μ l, 그리고 끝에는 15 μ l를 첨가한 試料의 P/H이다. 이 結果를 가지고 graph를 그린 Fig. 1에서 4개의 直線이 거의 平行으로 가는 것을 볼 수 있다. 이때 이 平行線은 本實驗 結果가 신뢰성이 있으며 正確度를 알려준다고 생각된다. 만일 정확성이 없다면 standard addition method에서 각각의 直線은 平行으로 表示되지 않을 것이다. 여기에서 著者 등은 다음과 같은 관련한 方法을 구상할 수 있다. 즉, 血液試料에 Pb標準液으로 standard addition을 加하여 furnace atonizer로 測定한 直線을 正確히 一回만 作成한 후 다음 試料부터는 試料自體의 P/H만 구한다음 이 P/H점을 通過하는 平行線을 연결하면 試料中 含有된 Pb量을 간편하게 求할 수 있을 것이라고 생각되어진다.

Ⅳ. 結 論

血液試料 25 μ l로서 Pb량을 正確히 檢出할 수 있는 방법을 研究한 結果 Furnace Atomizer를 利用하여 血液中 Pb의 量이 ng程度의 微量金屬을 측정할 수 있음을 알아냈으며 standard addition method로서 얻어진 直線을 利用하여 다른 試料도 標準液의 添加없이 간편하게 Pb량을 측정할 수 있음을 알았다.

—References—

1. Chisolm, J.J.: *Screening techniques for undue lead exposure in children, biological and practical considerations. J. Pediat* 79, 719~725, 1971.
2. Qazi, Q.H. and Madahar, D.P.: *A simple rapid test for Pb poisoning. J. Pediat.*, 79, 805~808, 1971.
3. Weissberg, J.B., Lipschuty, F. and Oski, F.A.: *A sensitive laboratory test for the detection of children lead poisoning. N. Eng. J. Med.*, 284, 565~569, 1971.
4. Strande, C.S.: *A method for screening for lead exposure based on the assay of erythrocyte ALA dehydratase Thrans AM Pediatr. Soc.*, 191, 1971.
5. Matousek, J.P. and Stevens, B.J.: *Biological applications of the carbon rod atomizer in atomic absorption spectroscopy, Clin. Chem.*, 17, 363~368, 1971.
6. Amos, M.D. et al: *Carbon Rod Atomizer in atomic absorption and fluorescence spectroscopy and its clinical application, Anal Chem.*, 43, 211~215, 1971.
7. Donega, H.M. and Burgess, T.E.: *Atomic absorption analysis by flameless atomization in controlled atmosphere, Anal. Chem.*, 42, 1521~1524, 1970.
8. Hwang, J.Y. et al: *Microdetermination of Lead in Blood by a flameless atomic absorption spectrometry, Anal. Chem.*, 43, 1319~1321, 1971.
9. Watanabe, T. et al: *Comparative study on determination of lead in blood by flame and flameless atomic absorption spectrophotometry with and without wet digestion, Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 39, 121~126, 1977.
10. Hwang, J.Y. et al: *Direct flameless atomic absorption determination of lead in blood, Anal. Chem.*, 45, 795~798, 1973.
11. John F. Rosen: *The microdetermination of blood lead in children by flameless atomic absorption, J. Lab. Clin. Med.*, 10, 567~576, 1972.