

직업병 검진을 위한
검사방법의
실제(4)

연 원자흡광법

(요중 및 혈액중 연량측정법)

특수건강진단의 직업병 검사효율을 증가시키기 위한
대책의 일환으로 '직업병 검진수기(- 사진에 의한 해설,
興生社出版部, 日本)'를 발췌하여 시리즈로 게재하는 것이다

< 김형아 >

I. 원 리

원자흡광(흡수)분광법은 1902년 Wood, 1934년 Zemansky 등에 의해 원리가 제창되고, 다시 1955년 Walsh에 의해 원자흡광장치가 제안되어, 1960년경 한걸 급속히 발전된 측정법이다.

원자흡광분석은 불꽃 중에 원자상태(기저상태)로 된 금속의 특유한 광흡수를 이용한 분석법이다.

일반적으로 혈중, 요중 연량의 원자흡광에 의한 측정에는 킬레이트제를 이용한 추출법이 이용되고 있다. 킬레이트제로는 디시존(디페닐티오카바존), APDC(피로리딘디티오카바민산암모늄), Na-DDTC(디에틸디티오카바민산나트륨) 등이 이용되고 있다. APDC와 Na-DDTC로는 추출할 때 PH가 다를 뿐, 다른 조작은 같고, 전자는 열, 산성에서 안정하여 여기서는 APDC 추출원자흡광법과 디시존추출원자흡광법의 2가지 방법에 대해 기술한다. APDC는 40여종의 금속과 킬레이트화물을 만들며 그 화합물의 색은 금속에 따라 다소 다르다.

II. 요중 및 혈액 중 연량의 디시존추출-원자흡광법

1. 기구·시약

시 약

1) 황산, 질산, 과염소산

2) 구연산암모니아용액

구연산 50g을 물에 녹여, 암모니아수로 알칼리성으로 하여(PH 약9.5), 물을 가해 전량을 100ml로 한다. 적당한 농도의 디시존클로로포름으로 연을 제거한 후 사용한다.

3) 티몰블루 지시약

티몰블루를 소량의 에틸알코올에 녹여, 여기에 물을 가해 0.04%정도의 용액으로 한다.

4) 암모니아수

5) 5% 시안화칼륨용액

시안화칼륨 5g을 100ml의 물에 녹여, 암모니아수로 알칼리성으로 하여 디시존클로로포름으로 연을 제거하여 사용한다.

6) 20% 염산히드로크실아민용액
염산히드로크실아민 20 g을 물에 녹여 암모니아수로 알칼리성으로 하여 물로 100 ml되게 한다. 디시존클로로포름으로 연을 제거

7) 디시존클로로포름용액
약 100 mg/l의 용액으로 한다.

8) 0.5% 시안화칼륨용액

5)를 10배 희석한다.

9) 2% 질산

질산 2 ml를 취해 물로 100 ml되게 한다.

10) 연표준용액

디시존·벤젠법 참조

< 주의사항 >

황산, 질산, 과염소산은 연정량용이라고도 약간의 연을 함유하는 수가 있다.

기 구

Kjeldahl 플라스크, 분액퍼널, 마개있는 시험관, 피펫, 메스실린더, 비이커 등 유리기구 일체, 습식회화를 위한 열원장치, 원자흡광분광광도계.

< 주의사항 >

1) Kjeldahl 플라스크, 분액퍼널, 시험관, 비이커 등은 초경질유리를 사용한다.(예를들면 Pyrex제 등).

2) 유리기구류는 반드시 2% 질산에 담구어 잘 씻은 후 증류수 또는 연을 함유하지 않은 물로 다시 씻은 후 사용한다.

2. 조작방법

1) 회 화

① 요...요 100 ml를 Kjeldahl 플라스크에 취해 질산 20 ml를 가해 가열한다. 용액이 담황색투명하게 되면 그친다. 냉각 후 과염소산 3 ml를 가해 가열하여, 용액이 미황색 내지 무색에 가깝게 될 때까지 가열한다. 가열할 때 도가 지나치는 것을 방지하는 것이 중요하며 약 2 ml 남으면 가열을 그친다.

② 혈액...혈액 약 10 ml를 미리 평량해 둔 Kjeldahl 플라스크에 넣어 다시 평량하여 혈액의

중량을 구하고, 질산 20 ml를 가해 가열한다. 용액이 담황색투명하게 되면 그친다. 다음으로 황산 3 ml를 가하고 색이 없어질 때까지 가열한다. 냉각후 과염소산 2 ml를 가해 미황색 내지 무색에 가깝게 될 때까지 가열한다. 이 경우에도 가열할 때 연이 소실되지 않도록, 약 2 ml 남으면 가열을 그치는 것이 필요하다.

2) 회화액을 물 또는 연이 없는 증류수 약 50 ml를 써서 분액퍼널에 옮긴다.

3) 구연산암모니아용액 5 ml를 가한다.

4) 지시약 티몰블루 용액 5~6방울을 가한다.

5) 암모니아수로 알칼리성으로 한다. 연은 PH 8.5~11에서 추출되지만 PH 9.0~9.5 정도가 좋다.

6) 5% 시안화칼륨용액 5 ml를 가한다.

7) 20% 염산히드로크실아민용액 1 ml를 가한다.

8) 5 ml의 디시존클로로포름으로 2회 추출하고, 클로로포름을 시험관에 합해 둔다. 추출이 불충분한 경우는 다시 반복한다. 추출이 완료되면 클로로포름층은 녹색을 띤다. 클로로포름층을 합한다.

9) 시험관에 모아진 클로로포름층을 분액퍼널에 옮기고, 0.5% 시안화칼륨용액 20~30 ml로 가볍게 씻고, 다시 20~30 ml의 물로 씻은 후, 마개있는 시험관에 옮겨 2% 질산 10.0 ml를 가해 세계 흔든다. 이 때 물이 클로로포름층에 흘러들어 가면, 물층은 알칼리성이기 때문에 2% 질산의 산도가 떨어져 연의 질산에로의 이행이 나쁘게 된다. 따라서 물층이 조금이라도 클로로포름층에 흘러가지 않도록 주의해야 한다.

10) 질산층의 연농도를 원자흡광분광광도계에 의해 측정한다. 마개있는 시험관을 이용할 때는 그 상층의 질산층을 측정한다.

11) 기준으로는 1 ppm의 표준용액을 측정하여 그 파고를 이용한다. 1, 2, 3 ppm 등의 표준계열로 검량선을 작성해도 좋다.

(그림 1 참조)

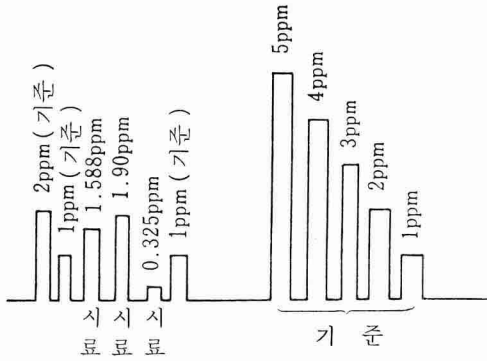


그림 1. 히다치 207 형 원자흡광분광광도계를 이용한 경우의 표준용액의 파괴(1, 2, 3, 4, 5 ppm) 및 실제 측정예(2% 질산용액)

〈 주의사항 〉

1) 본 방법으로는 요중 연량 10 µg/ℓ, 혈중 연량 10 µg/100 g 정도부터 측정 가능하다. 요의 경우에, 본 방법에 의해 측정할 수 없는 경우는 요량을 증가시켜 측정하든가, 질산층을 농축시켜 측정한다.

2) 본 방법에서 중요한 점은 디시존추출을 완전하게 하는 것이며, 디시존추출 때 물층이 들어가지 않게 하는 것도 중요하다.

3) 측정 때는 그 때마다 맹검치를 측정해 두어야 한다. 또 시약, 기타 전 공표분치는 1 µg 이하가 되게 할 필요가 있다.

4) 원자흡광측정은, 적기는 하나, 시간이 지남에 따라 변한다. 따라서, 가능하면 자주 검량선을 작성한다.

Ⅲ. 요중 및 혈액중 연량의 APDC-MIBK 추출 - 원자 흡광법

A. 요중 연량의 측정법

(1) 회화에서 측정하는 방법

1. 기구·시약

1) 황산, 질산, 암모니아수

2) 1% 피로리딘디티오카바민산암모늄(AP-DC) 용액

APDC 1 g을 물 100 ml에 녹인다. 연을 함유한 것이 많으므로, 구입할 때 공표분을 측정해 둔다.

3) 메틸이소부틸케톤(MIBK)

물에 포화한다.

4) 연표준용액

5) Kjeldahl 플라스크

6) 기타 전과 같다.

2. 조작방법

1) 회화

요 50 ml를 Kjeldahl 플라스크에 취하고 황산, 과염소산으로 습식회화한다. 회화법은 디시존추출원자흡광측정법의 경우와 같이 한다.

2) 회화액을 2차증류수 50 ml로 분액퍼널에 옮겨, 암모니아수로 PH를 3.5로 한다. PH계로 정확하게 맞춘다(시험관 전극을 이용하면 편리하다). PH 시험지로도 좋지만 측정치의 변동이 많이 된다.

3) 1% APDC 용액 3 ml를 가해 흔들고, MIBK 10 ml를 가해 수분간 흔든다.

4) 수 분 정지한 후 마개있는 원심관에 MIBK 층 모두와 물층의 일부를 넣고 원심분리한 후, MIBK 층을 측정한다.

5) 1 ppm 연표준용액 10 ml를 원심관에 취해 PH 3.5로 하고, 1% APDC 용액 3 ml, MIBK 10 ml를 가해 세계 흔들어, 분리된 후 MIBK 층을 측정하는 것이 1 ppm의 높이이다. 이 높이와 시료의 높이를 비교하여 연량을 측정한다.(그림 2)

검량선을 작성하는 경우는, 연표준용액 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml를 원심관에 취해 PH를 3.5로 하여, 위와 같이 처리하면 0.5, 1, 1.5 및 2 ppm 계열이 된다.

〈 주의사항 〉

1) 본 방법에서 요 50 ml를 사용하는 경우는 요중 연량 4 µg/ℓ 정도부터 측정 가능하다.

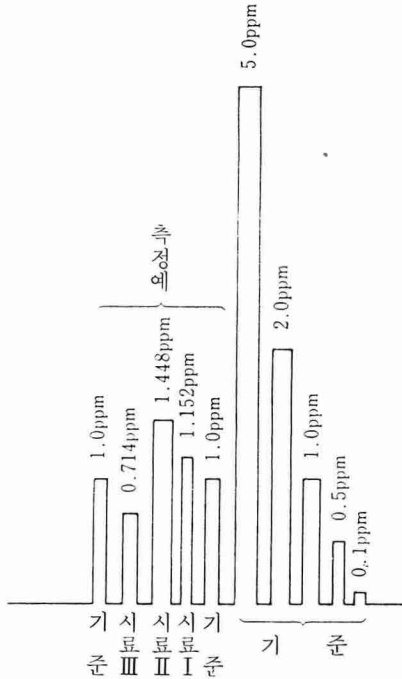


그림 2. 히다치 207형 원자흡광분광광도계를 이용한 경우, APDC-MIBK법에 의한 파고의 높이와 실제측정 예 (MIBK 10 ml 사용한 경우)

- 2) MIBK 층에 추출된 후는 가능한 한, 빨리 측정해야만 한다. 40 분 이내에 측정하면 좋다.
- 3) 이 방법에서도 맹검치는 반드시 측정해야만 한다.
- 4) APDC-MIBK 법은, 종종 문제는 있지만, 지극히 간단하고, 또 디시존법과 같이 고도의 기술을 필요로 하지 않을 뿐만 아니라 원자흡광측정에서 감도의 증가를 기대할 수 있다. 각종 산업 현장에서 중독검진에 이 방법을 쓰는 경우, 내용을 잘 이해한 후 사용하면, 좋은 측정법이 아닌가 생각된다.

(2) 회화하지 않고 측정하는 방법

1. 시약·기구

- 1) 10% 삼염화초산 (Trichloroacetic acid : TCA) 용액
삼염화초산 10 g 을 물 10 ml 에 녹인다. 가능하면 연합유량이 적은 것을 선택한다.
- 2) 1% APDC 용액 : 전과 같다.

- 3) MIBK : 전과 같다.
- 4) 연표준용액 : 전과 같다.
- 5) 분액퍼널 등 전과 같다.

2. 조작방법

요 50 ml 를 분액퍼널에 취해, 10% TCA 용액으로 PH 를 3.5 로 한다. 1% APDC 용액 3 ml 가하고, MIBK 10 ml 를 가해 수분간 흔들고 정치시킨 후, 마개있는 원심관에 MIBK 층 전량과 물층의 일부 (가능하면 많이) 를 넣어, 수분간 원심분리하고 가능한 한 빨리 MIBK 층을 측정한다. 연표준용액에 대해서도 똑같이 행한다.

< 주의사항 >

- 1) 본 방법에서는 요 50 ml 사용하는 경우, 요 중 연량 4 µg/l 정도까지 측정가능하다.
- 2) 요는 오래 되지 않은 것이 좋다.
- 3) 연이 APDC 보다 킬레이트력이 큰(예를 들면 Ca-EDTA 투여시의 요중 EDTA- 연과 같이) 것과 결합하고 있는 경우에는 회화해서 측정한다.

B. 혈액중 연량의 측정법

(1) 회화하여 측정하는 방법

1. 기구·시약

디시존추출 원자흡광법과 같다.

2. 조작방법

1) 회화

혈액 5 ~ 10 ml 를 취해, 디시존추출·원자흡광측정법·항과 같이 처리한다.

2) 회화액을 2 차증류수 약 50 ml 로 분액퍼널에 옮겨, 암모니아수로 PH 3.5 로 한다.

3) 1% APDC 용액 25 ml 를 가해 흔든다. MIBK 10 ml 를 가해 수분 흔들고, 수분 방치후, MIBK 층과 물층을 분리하려면 마개있는 원심관에 MIBK 층 전량과 물층을 넣어 원심분리한다.

4) 원심분리후 MIBK 층을 가능한 한 빨리 측정한다.

< 주의사항 >

- 1) 본 방법에서 혈액 10 ml 를 사용한 경우, 혈중 연량 2 µg/100 g 정도부터 측정가능하다.

2) 측정할 때는 그 때마다 맹검치를 측정하여 두는 것이 절대로 필요하다. 시약 공표본을 포함해서 $1\mu\text{g}$ 이하에서 할 필요가 있다.

3) 혈액에는 철을 비롯하여 많은 금속이 공존하기 때문에, APDC 1% 용액 25 ml를 사용한다.

4) 혈액중의 연량을 측정하는 경우, 트리에탄올아민으로 철을 빼는 방법이 있지만 트리에탄올아민은 PH 9로 사용해야만 하므로 조작방법 2)에서 PH 9로 하여, 10% 트리에탄올아민 용액 5 ml를 가하고 조작방법 3)의 1% APDC 용액 대신, 1% DDTC 용액 5 ml를 가해 MIBK로 추출한다.

(2) 회화하지 않고 측정하는 방법

Berman에 의해 고안되어 Selender 등에 의해 계속 연구된 삼염화초산에 의한 단백질제거법이 간편하여 널리 사용되고 있다고 생각되어 이 방법을 기초로 해서 기술한다.

1. 시약·기구

- 1) 5% 삼염화초산용액
- 2) 암모니아수
- 3) 1% APDC 용액
- 4) MIBK
- 5) 연표준용액
- 6) 마개있는 원심관, 원심분리기
- 7) 분액피펫, 피펫류, 메스실린더, 비이커 등 유리제품
- 8) PH미터

9) 원자흡광분광광도계

10) 진동기

2. 조작방법

1) 혈액 5~10 ml를 취해 미리 평량해 둔 마개있는 원심관에 옮겨 재평량하여 혈액의 무게를 측정해 둔다.

2) 5% TCA 용액 20 ml를 가해 잘 흔들고 3,000 rpm에서 수분간 원심시킨 후 상층을 분액피펫에 옮긴다.

3) 남은 침전물에 연이 없는 증류수 약 20 ml를 가해 세게 흔들어 수분간 원심분리하여, 상층을 앞의 분액피펫에 더한다.

4) 암모니아수로 PH 3.5로 맞춘다.

5) 1% APDC 용액 5 ml 가하여 수분 흔들고, MIBK 10 ml를 가하여 수분간 흔든다.

6) 정지후 MIBK 층을 분리하여 MIBK 층을 될수록 빨리 측정한다.

7) 연표준용액에 대해서도 같은 방법으로 처리한다.

< 주의사항 >

1) 본 방법에서 혈액 10 ml를 사용하면, 혈중 연량 $2\mu\text{g}/100\text{g}$ 정도의 표본부터 측정 가능하다.

2) 혈액중의 연은 $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ 그외 단백질등과도 결합되어 있고, 또 Ca-EDTA 투여의 경우에는 EDTA-연으로 되어 있다. 특히 후자의 경우는 회화하여 측정하는 것이 좋다.

