

직업병 검진을 위한
검사방법의
실체(2)

요중텔타- 아미노레블린산 측정법

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

< 김형아 >

I. 蒲田·Granick 법

1. 원 리

2 종류의 이온교환수지를 이용하여 δ -아미노레블린산(ALA로 약하여 씀)을 분리하여 ALA피롤을 만들어 이것을 에리히(Ehrlich) 시약에 의해 적색을 띄게 하여 비색정량한다.

2. 기구·시약

○ 기 구

크로마토관(피검요 1개당 3개, 내경 9mm 전후, 길이 30cm. 단, 그중 1개는 길이 10cm 정도라도 됨), 시험관(20~30ml용적), 눈금 시험관(10~12ml용적), 유리막대, 퍼넬, 피

펫, 탈지면, pH메타 또는 pH시험지, 삼각플라스크, 수조(Water bath), 분광광전광도계, 칼럼받침대

○ 시 약

1) 양이온교환수지 : unber-light IRC 50, 100~200 mesh

2) 음이온교환수지 : 다우엑스 1×8, 200~400 mesh

3) 메틸알코올, 빙초산, 초산나트륨, 염화제 2수은, 과염소산, 파라-디메틸아미노벤즈알데히드, 염산, 수산화나트륨, 아세틸아세톤

○ 수지의 조정

1) unber-light IRC

1 피검요당 7ml정도 필요. 삼각플라스크에 필요량을 취하고 증류수를 10~20 배 가하여 혼

들어 정치시킨 후 상층을 버린다. 위층이 맑게 될 때까지 (3~4회) 이것을 반복한다.

상층을 버리고, 1N NaOH를 수지의 10~20배의 양을 혼합하여 하루 밤 방치한다.

상층을 버리고, 증류수로 세척한다. 알칼리성이 되지 않을 때까지 반복한다(약 10회).

상층을 버리고, 1N 염산을 가한다. 이것으로 2회 세척한다.

염산성분이 없어질 때까지 증류수로 세척한다(약 10회).

초산완충액(pH 4.8)을 넣어 둔다.

2) 다우엑스 1-X8

1 피검요당 5ml 정도 필요. 삼각플라스크에 필요량을 취해 1)과 같이 세척한다.

3N 초산나트륨을 수지의 10배양 만큼 넣고 이것으로 3회 세척한다.

한번 더 이것을 가해 하루 밤 방치한다.

상층을 버리고, 알칼리성이 없어질 때까지 증류수로 세척한다.

초산나트륨도 다량의 염소이온을 함유하는 수가 있으므로 미리 질산으로 이것을 점검해도 좋다.

○ 시약의 조정

1) 1M 초산완충액 pH 4.6

빙초산 57ml와 초산나트륨 136g에 물을 가해 전량 1ℓ 되게 한다.

2) 메틸알코올-초산혼합액

2:1 (부피비, V/V)로 혼합한다.

3) 에리히시약

파라-디메틸아미노벤즈알데히드	4 g
빙초산	168 ml
과염소산	40 ml
염화제 2 수은	0.7 g

물을 가해 전량 220 ml 되게 한다.

4) 1M 초산

○ 칼럼의 조정

제 1 칼럼 : 다우엑스 1-X8, 높이 3cm

제 2 칼럼 : unber - light IRC 7cm

제 3 칼럼 : 다우엑스 1-X8 1cm

피검요 1개당 위의 3개의 칼럼을 준비한다. 칼럼은 스탠드에 수직으로 놓고 유리막대로 주의깊게 솜을 채워 물을 흘려서 기포를 없앤다.

수지의 부유액을 피펫에 취하여 균일하게 채워 나간다. 채웠으면 그 위에 솜을 넣고 증류수를 흘린다.

3. 방법

1) 요의 조제 : 정상요면 3.0ml, 폭로정도에 의하지만, 연작업자면 0.5, 1.0 또는 2.0ml를 정확하게 취해 1M 초산으로 pH 5~6에 맞춘다.

2) 피검요를 완전히 제 1 칼럼에 흘려보낸다. 유출액을 제 2 칼럼에 받고, 제 2 칼럼의 유출구에 시험관(20~30ml)을 놓아 유출액을 받는다.

3) 증류수 6ml를 제 1 칼럼에 흘려 칼럼을 세척한다.

4) 증류수 10ml를 제 2 칼럼에 흘려 세척한다.

5) 세척액(유출액)에 아세틸아세톤 0.5ml와 초산완충액 1ml를 가해 잘 혼합한다.

6) 수조에서 10분간 끓인다(ALA 피롤 형성).

7) 냉각방치 후, 이것을 제 3 칼럼에 흘린다. 유출액은 버려도 좋다. ALA 피롤은 여기에 농축된다.

8) 1M 초산 5ml를 제 3 칼럼에 흘려보내 씻는다. 유출액은 버린다.

9) 10ml의 눈금시험관을 칼럼 아래에 놓고 메틸알코올-초산혼합액 4ml를 흘려 ALA 피롤을 용출시켜 이것을 받는다.

10) 5ml까지 메틸알코올-초산혼합액을 가한다.

11) 에리히시약 5.0ml를 가해 혼합한다.

12) 혼합 후 15분에, 에리히 시약 : 메틸알코올-초산혼합액 1:1의 혼합액을 공표본으로 하여 비색한다. 552mμ.

13) 물(mol) 흡광도 5.3×10^4 라는 계수로

부터 농도를 계산한다.

계산은, 시료량 $v\text{ ml}$ 일 때

$$\frac{131}{5.3} \times \frac{1}{v} \times \text{OD} = \text{mg ALA}/\ell \text{ 요이다.}$$

검량선의 작성

측정수기에 의해서는 위 계수가 부적당한 경우가 생기기 때문에, 맞는 검량선을 만드는 것이 좋다. 이 경우는 다음과 같은 순서에 의한다.

1) ALA 표준제품 (authentic sample) : 병에 들어 있는 ALA·HCl 결정 100 mg을 구입한다.

분자량 : ALA = 131.1, ALA·HCl = 167.6

2) 적당량의 ALA·HCl 을 천평으로 정확하게 평량하고 물을 가하고, 묽은 초산나트륨액으로 pH5 ~ 6 에 맞추어 여기에 물을 첨가하여 10 mg ALA/ℓ 표준액을 만든다.

3) 이것을 희석하여 1, 2, 3, 5 mg/ℓ 를 만들어 요와 같은 조작으로 분리비색한다.

4) 회수시험도 하는 것이 좋다.

5) 그림 1 에 검량선의 한 예를 보였다.

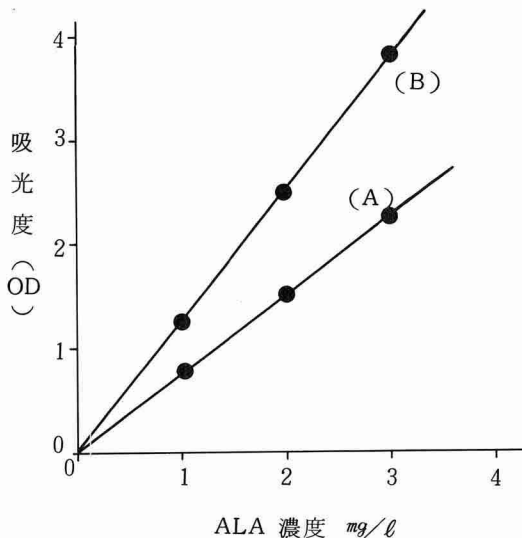


그림 1 浦田·グラニック法에 의한 檢量線의 1例

(A)는 3개의 칼럼을 통과한 경우,

(B)는 칼럼을 통과시키지 않고 발색시킨 경우,

ALA농도 1,2 및 3mg/ℓ 의 표준용액 각 2ml 를 사용했다. (A)의 경우, ALA농도 = 12.3 × ODmg/ℓ 로 된다. 이것은 계산식

$(131/5.3) \times (1/2)$ 과 거의 일치한다.

4. 주의사항

1) 수지의 조제는 원법에서는 칼럼을 사용하고 있으나 여기서는 바치법에 의했다. 냉소에서 2~3주간은 보존가능.

2) 에리히 시약은 그 때마다 만들 필요가 있다.

3) 표준제품을 칼럼을 통과시키지 않고 발색시키면, 3개의 칼럼을 통과시킨 경우보다 60%정도 큰 값을 얻는다. 칼럼을 통과시킴으로써 ALA의 일부는 손실되는 것으로 알려졌다, 앞의 물 흡광계수는 그것을 고려한 것이므로 그냥 써도 지장이 없다.

4) 비색할 때 공표본은 물이어도 좋다.

II. Mauzeroll·Granick 법

1. 원 리

蒲田·Granick 법 (A법)과 같다. 단, 이 방법은 아미노아세톤을 분리하지 않는다.

2. 기구·시약

○ 기 구

크로마토관 (1 피검요당 2개, 내경 7mm, 길이 30cm), 시험관 (5~10 ml, 10~13 ml 용적), 눈금시험관 (10~12 ml 용적), 유리막대, 펄널, 유리점유 (탈지면도 됨), pH메타 또는 pH시험지, 수조, 삼각플라스크, 칼럼받침대, 분광광전광도계.

○ 시 약

1) 음이온교환수지 : 다우엑스 2-X8, 200~400 mesh

2) 양이온교환수지 : 다우엑스 50-X8, 200 ~ 400 mesh

3) 빙초산, 초산나트륨, 수산화나트륨, 과염소산, 염산, 파라-디메틸아미노벤즈알데히드, 아세틸아세톤

○ 수지와 시약의 조정

1) 다우엑스 2-X8의 조정

1검체당 약 3 ml 필요. 삼각플라스크에 필요량을 넣고 A법 수지조정의 2)와 같이 행한다.

2) 다우엑스 50-X8의 조정

1검체당 약 1.5 ml 필요. 삼각플라스크에 필요량을 취해 A법 수지조정의 1)과 같이 행한다. 단, 마지막의 초산완충액은 필요하지 않다.

3). 1M 초산완충액 : pH 4.6, A법과 같다.

4) 에리히 시약

파라-디메틸아미노벤즈알데히드 1 g을 약 30 ml의 빙초산에 녹이고 70% 과염소산 8.0 ml를 가해 빙초산으로 전량이 50 ml되게 한다.

5) 0.5 M 초산나트륨

칼럼의 조제

제 1 칼럼 : 다우엑스 2-X8 높이 2 cm

제 2 칼럼 : 다우엑스 50-X8 높이 2 cm

그 뒤는 A법에 준한다.

3. 방 법

1) pH 5 ~ 7의 요 1.0 ml를 제 1칼럼에 흘려보낸다. 유출액은 시험관에 받는다.

2) 2 ml 물로 2회 씻고 1)의 유출액과 함께 한다.

3) 함께 한 유출액을 완전히 제 2 칼럼에 흘린다. 여기에 ALA와 요소가 잡힌다.

4) 물 16 ml로 요소를 씻어 흘려 보낸다. 칼럼에서 나온 용액에 에리히 시약을 가해 황색을 띄는 경우는 요소가 남아 있는 증거이므로 다시 물을 흘려 씻는다.

5) 0.5 M 초산나트륨 3 ml를 흘린다. 수지의 위부터 3/4 부분이 밝은 색으로 변한다. 유출액은 버린다.

6) 0.5 M 초산나트륨 7 ml로 ALA를 유출시킨다. 이것을 눈금시험관에 받는다.

7) 아세틸아세톤 0.2 ml를 가하고 초산완충액으로 10.0 ml되게 혼합한다.

8) 수조에서 10 분간 끓인다.

9) 냉각 방치한 후, 이 액 2.0 ml에 에리히 시약 2.0 ml를 가한다.

10) 혼합 15 분후 공표본을 이용하여 553 mμ에서 비색한다. 공표본은 요 대신 물로 같은 조작을 하여 만든다. 비색은 1 cm 비색관으로 한다.

11) $OD \times 47 = mg \text{ ALA} / \ell \text{ 요}$

4. 주의사항

1) 수지조제에는 원법에서는 칼럼을 이용하고 있다. 그 경우에는 수지 2-X8을 칼럼에 채워 3M 초산나트륨으로 C1이 없어질 때까지 씻고 다음에 물로 초산나트륨이 없어질 때까지 씻는다. 수지 50-X8 경우는, 칼럼에 채워 물로 씻고-2N 수산화나트륨에 하루 방치-물로 씻고-4N 염산-2N 염산으로 6회-1N 염산-물로 씻는다.

2) 검량선을 방법 A와 같이 해서 구하면 좋다.

3) 사용한 칼럼 중의 수지는 재생할 수 있다

4) 방법 A와 비교하면, 칼럼이 1개 적어도 된다. 그러나 이 방법은 요소를 씻는데 시간이 걸리고 아미노아세톤을 함께 측정해야 되는 결점이 있다.

5) 요중의 ALA는 0 ~ 4°, 암소보존으로 2주간은 안정하다는 보고도 있지만 2주간으로 반감되었다는 보고도 있다.

6) 2M 주석산 0.25 ml를 시험관에 넣고 건조시켜 여기에 요 약 10 ml를 넣으면 pH가 2.4 ~ 2.7이 된다. 이렇게 해서 보존하면 25 °C에서도 2주간은 충분히 안정하다.

Ⅲ. 和田法

1. 원 리

우로빌리노겐 (Urobilinogen) 등 에리히 시약 발색물질을 용매로 제거한 후, ALA 피를을 만들어 에리히 시약에 의해 적색으로 발색시켜 비색정량한다. 따라서 이온교환수지를 사용하지 않는 방법이다.

2. 기구·시약

○ 기 구

시험관 (20 ~ 30 ml, 12 ~ 13 ml 및 7 ~ 8 ml 용적), 피펫, 솜, 피펫류, pH메타 또는 pH 시험지, 수조, 분광광전광도계

○ 시 약

n-부틸알코올, 클로로포름, 20% 초산, 1M 인산나트륨완충액 pH 6.8, 아세트초산에틸·인산나트륨완충액 1:20의 혼합액

○ 에리히 시약

파라-디메틸아미노벤즈알데히드	4 g
빙초산	128 ml
과염소산 (70%)	40 ml
염화제 2수는 0.2 M	10 ml
염 산	40 ml

3. 방 법

1) 시험관에 요 2.0 ml를 취해 20% 초산 2.0 ml를 추가한다.

2) 여기에 부틸알코올 8 ml를 가해 세게 흔들어 혼합하고, 정치한다. 2층으로 분리한다.

3) 상층을 아스피레이터 (aspirator) 로 제거하고 하층을 2개의 시험관에 각각 0.5 ml씩 취한다.

4) 한 개에는 아세트초산에틸·인산나트륨완충액 혼합액 1.5 ml를 넣고

5) 다른 한 개에는 아세트초산에틸을 함유하

지 않은 인산나트륨완충액 1.5 ml를 넣는다. 이것이 공표본이다.

6) 두 시험관을 수조에서 10 분간 끓인다.

7) 식힌 후, 에리히 시약 2 ml를 가한다. 적색을 띤다.

8) 여기에 클로로포름 4.0 ml를 가하고 흔들어서 이 적색물질을 추출한다.

9) 클로로포름층을 공표본과 함께 556 mμ에서 비색한다.

검량선

원법과 같이 표준제품에 의해 같은 조작으로 분리, 비색하여 구한다.

4. 판 정

원법과 같다.

5. 주의사항

1) 이 방법은 ALA 농도 5 mg/l 이상 경우에는 원법 A와 잘 일치한다. 그러나 농도가 낮은 경우는 평균 30% 정도 높게 된다. ALA 1 mg/l 이하의 요에서 2배 값으로 나오는 일도 드물지는 않다. 따라서 정상치를 구하는 데는 적당한 방법이라고 할 수 없다.

2) 클로로포름추출물 비색에는 물층을 아스피레이터로 제거한 후 클로로포름을 솜으로 걸러낸 것을 사용하는 방법이 좋다.

3) 20 mg/l 이상 ALA를 함유한 요의 경우는 요를 희석하여 실시한다.

