

생체내 혈중 납 표준물질의 제조

정규철·최호춘

대한산업보건협회 산업보건연구소

= Abstract =

In Vivo Preparation of Standard Reference Materials of Lead in Blood

Kyou-Chull Chung, Ho-Chun Choi

Korea Industrial Health Association Institute of Occupational Health

This report describes a preparation and characterization of canine blood lead(Pb) standard reference material(SRM). Three adult beagle dogs(A, B, and C) were orally dosed with gelatin capsules containing $Pb(NO_3)_2$, equivalent to 10~80mg Pb/kg body weight. Blood was drawn 24 hours after the dose from the cephalic vein into lead free 500ml Pyrex beaker in which EDTA.K was contained as an anticoagulant. The amount of lead given to individual dog was varied arbitrarily.

Three month later, 3 canine animals were orally dosed with lead secondarily to make mixed SRM(D1) which was mixed different concentrations of lead in bloods with A1, B1, and C1 in vitro. The SRMs for A, B, C, A1, B1, C1, and D1 were distributed 2ml each into more than 300 lead free bottles, and were stored in refrigerator at 4°C.

The amount of lead in canine whole blood samples were determined using a Varian 30A atomic absorption spectrophotometer(AAS) with a model GTA-96 graphite tube atomizer with D2 background correction and a Hitachi Z-8100 AAS with Zeeman background correction. The sensitivity and detection limits for lead determination of Varian 30A were 0.46 μ g/L, 0.34 μ g/L, and 0.56 μ g/L, 0.14 μ g/L of Hitachi Z-8100, respectively. Day to day variations in determination of blood lead concentration in a certain sample were $31.11 \pm 1.36 \mu\text{g}/100\text{ml}$ by Varian 30A, and $33.08 \pm 0.82 \mu\text{g}/100\text{ml}$ by Hitachi Z-8100, showing the difference of 3% between the two results.

* 이 연구는 1994년도 특수건강진단기술협회의 연구비에 의한 것임.

At the blood lead concentrations of $56.31 \pm 1.98 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (A), $40.89 \pm 0.80 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (B), $59.01 \pm 1.38 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (C), the precisions of replicated measurements by AAS were 3.52%, 1.96%, and 2.34%, respectively.

Coefficient variation(CV) of SRMs(A, B, and C) within a standard sample were ranged from 0.92% to 7.50%, and those between 5 standard samples were 1.21%, 2.64%, and 1.11%, respectively, showing inter-vial variation of $1 \mu\text{g}/100\text{ml}$.

Lead levels in SRMs during one month storage were unchanged. The overall recoveries were 89.6~100.4%, 91.6~101.9%, 90.3~100.0% for A, B, and C SRMs, means were $56.46 \pm 2.69 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $39.35 \pm 1.89 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $57.40 \pm 2.31 \mu\text{g}/100\text{ml}$, and measurement ranges were $52.88 \sim 59.26 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $37.47 \sim 41.68 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $54.80 \sim 60.69 \mu\text{g}/100\text{ml}$, respectively. Those results were laid within confidence limits values.

The lead concentrations in the mixed sample(D1) stored over one month period were ranged from $32.76 \mu\text{g}/100\text{ml}$ to $33.54 \mu\text{g}/100\text{ml}$, with CV ranging from 1.2% to 2.7%. The results were similar to each of single samples(A1, B1, and C1) in respect of homogeneity and stability.

Results of the mixed blood sample analysed after 1 month storage at 4°C by four other laboratories(L1, L2, L3, L4) were similar with those of our laboratory(L5 ; $31.18 \pm 0.24 \mu\text{g}/100\text{ml}$, acceptable range by CDC ; $25.18 \sim 37.18 \mu\text{g}/100\text{ml}$), showing the concentrations of $25.91 \pm 1.19 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (L1), $34.16 \pm 0.22 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (L2), $35.68 \pm 0.85 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (L3), $30.95 \pm 0.46 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (L4) in each samples.

Key word : Lead in blood, Preparation standard reference materials

1. 서 론

납 중독을 진단하는 데 있어서는 납 취급 근로자의 혈액중 납 농도 및 작업환경 중의 납 농도를 측정하게 된다(Keppler 등, 1970; Subramanian 등, 1983). 그러나 혈액 중의 납 농도 측정은 정상인에게 미량으로 존재할 뿐만 아니라 납에 폭로된 근로자일지라도 $100 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 이하의 농도에 머물러 있어 분석하는 데 어려움이 많다. 1970년대에 이르러 ppb 단위의 미량 분석이 가능한 원자흡수 분광분석기(atomic absorption spectrophotometer, AAS)를 점차 사용하게 되어 현재는 생체 중 미량 중금속을 분석하는데 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 혈액은 점도가 높으며 다른 여러 가지 물질로 이루어져 있으므로 분석 조건이 까다로운

문제점이 있다. 더구나 실험실간의 분석조건 및 사용되는 기종이 달라서 자칫 잘못하면 실험실간의 납 농도 측정치가 각각 달라져서 직업병을 정확히 판정하는데 어려움이 생긴다.

노동부에서는 1992년부터 노동부장관이 고시하는 바에 의하여 모든 특수건강진단기관은 정도관리를 받도록 규정하였으며(노동부, 1992), 이에 대한산업보건협회에서는 1992년부터 특수검진기관에 대한 분석의 정확도를 판정할 수 있도록 외부 정도관리 프로그램을 시작하였다.

미국 과학기술연구소(National Institute of Science and Technology, NIST)와 질병관리 및 예방센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)에서는 혈액 중의 납 농도 분석을 위한 정도관리용 생체

시료를 위해서 소(bovine)에게 납을 경구 투여하여 만들고 있다(Cox 등, 1989). 국내에서도 실험관 내에서 소의 혈액에 일정량의 납 용액 및 항응고제를 첨가하여 정도관리용 표준시료를 제조하였으나(노동부, 1994), 혈액이 잘 용해되지 않는 응집현상이 나타났으며 시료의 저장에 있어서도 신빙성이 낮았다. 이는 납이 혈액속의 단백질 및 헴 등이 다른 물질과 상호작용하기 때문만이 아니라 유리상태의 납이 실험관 표면에 부착되는 것과도 관련이 있을 것으로 추정된다(Wang, 1985; Subramanian, 1983; Nackowski, 1977).

이에 반해서 납을 경구적으로 생체내에 투여하여 만든 표준시료에서는 95% 이상 납이 적혈구와 결합하여 안정한 상태를 유지할 뿐만 아니라, 납이 인체내에 흡수되는 기전과 동일시되므로 혈액 중의 납 농도 분석을 하는 정도관리용 표준시료로서 매우 적절하리라 생각된다.

이에 저자들은 개에게 납을 경구투여하여 혈중 납 농도를 분석하기 위한 정도관리용 시료로서 사용할 수

있는 안정성 및 균질성이 높은 표준시료를 만들고자 이 연구를 시도하였다.

1. 연구 재료 및 방법

1) 연구 재료

체중 10~14kg의 Beagle종 개 3 마리(A, B 및 C)에 체중 1kg 당 10~80mg의 납에 해당되는 양의 분말 질산화납($Pb(NO_3)_2$)을 젤라틴 캡슐에 넣어 경구투여 하였다. 납을 경구투여한 지 24 시간 뒤에 개의 상완 주정맥에서 채혈하여 솔빈산(sorbic acid)과 EDTA.K로 처리한 비이커에 각각 담은 후, 거어즈로 2~3회 여과하였다. 각 개에서 채혈한 A, B, C의 혈액을 각각 잘 섞은 후 2ml 씩 유리병에 나누어 넣어 4℃ 냉장고에 저장하였다.

3개월 후, 3 마리 개에 제2차로 체중 1kg 당 10~80mg의 납에 해당되는 질산화 납을 경구투여하여 각각 다른 농도의 A1, B1 및 C1의 혈중 납 표준시료를 얻었

Table 1. Optimized instrumental and analytical parameters for the determination of lead in canine blood by Varian 30A Hitachi Z-8100 atomic absorption spectrophotometer

Parameters						
Calibration Mode: Standard Additions, Sample volume: 10 μ l						
Dilution:	1% Triton X-100	1%HNO ₃	St. Sol	Sol	10% (NH ₄) ₂ HPO ₄	Blood
Add 1	1600 μ l	-	100(30 μ g/dl)		200	100
Add 2	1600	-	100(60 μ g/dl)		200	100
Add 3	1600	-	100(90 μ g/dl)		200	100
Add 0	1600	100	-		200	100
Sample	1600	100	-		200	100
Blank	1700	100	-		200	-
Instrument:	Varian 30A			Hitachi Z-8100		
Lamp Current:	5 mA			7.5 mA		
Wavelength:	283.3nm			283.3 nm		
Sample Introduction:	Sampler Premixed			Sampler Premixed		
Replicates:	2			2		
Background Correction:	on(D2)			on(Zeeman effect)		
Argon Flow:	3 L/min			0.2 L/min		
Drying Temperature:	85-95-120-300 °C(60 sec)			80-85-95-120-300 °C(90 sec)		
Ashing Temperature:	800 °C(50 sec)			300-600-600 °C(50 sec)		
Atomization Temp:	2300 °C(2.3 sec)			2000 °C(4.0 sec)		
Sensitivity:	0.46 μ g/L			0.56 μ g/L		
Detection Limit:	0.34 μ g/L			0.14 μ g/L		

Table 2. Comparison of atomic absorption spectrometer of Varian 30A(D2) and Hitachi Z-8100(Zeeman system) for determination of lead in blood

Date	Subject	Varian 30A(V)		Hitachi Z-8100(H)		H - V
		Mean	S.D.(C.V.%)	Mean	S.D.(C.V.%)	Mean
1	1	28.57	0.32(1.1)	31.97	0.66(2.0)	3.40
	2	31.07	0.45(1.4)	33.72	0.82(2.4)	2.65
	3	30.07	0.27(0.9)	33.18	0.36(1.1)	3.11
7	4	32.95	0.73(2.2)	34.67	0.80(2.3)	1.72
	5	32.46	1.25(3.8)	33.45	1.59(4.8)	0.99
	6	32.17	0.40(1.2)	32.49	0.29(0.9)	0.32
14	7	31.05	2.51(8.1)	32.31	0.34(1.1)	1.26
	8	31.40	1.07(3.4)	33.27	0.79(2.4)	1.87
	9	30.22	0.65(2.1)	32.70	0.44(1.3)	2.48
	Total	31.11	1.36(4.4)	33.08	0.82(2.5)	1.97

• H-V, difference of concentration between Varian 30A(V) and Hitachi Z-8100(H)

Table 3. Precisions of replicated measurements of lead in canine blood by furnace atomic absorption spectrophotometry

SRM	Replicated No.	Mean	S.D	C.V.(%)
A	10	56.31	1.98	3.52
B	10	40.89	0.80	1.96
C	10	59.01	1.38	2.34

unit : $\mu\text{g}/100\text{ml}$

• SRM, standard reference material

다. A1, B1 및 C1의 시료에서 동량의 혈액을 취하여 실험실에서 잘 혼합한 것을 표준시료(D1)로 하였다.

2) 혈중 납의 분석 조건

개의 혈중 납 농도를 분석하기 위해 사용한 원자흡수 분광기(AAS)는 전기로가 부착된 Varian 30A와 Hitachi Z-8100이었다. 전자는 중수소 램프(D2)에 의해서 바탕보정(background correction)을 하였으며, 후자는 Zeeman effect system에 의해서 바탕보정을 하였다.

혈중 납의 농도를 분석하는 기기의 최적조건은 표 1과 같았다. 검량선 방법은 표준물 첨가법에 의한 혈액의 점성도 및 다른 matrix의 방해작용을 최소화하였으며, 혈액을 20배 희석하여 적정한 흡광도 수치에 의한 검량선을 작성하였다. 전기로의 온도 프로그램은 혈액이 튀지 않고 납 성분이 기화되지 않으며, 다른 방해물

질이 완전히 기화되도록 단계별 적정 회화 온도에서 가열시켰다.

그 결과 AAS 모델 Varian 30A 와 Hitachi Z-8100 기기의 측정 감도는 각각 $0.46\mu\text{g}/\text{L}$, $0.56\mu\text{g}/\text{L}$ 이며, 검출한계는 각각 $0.34\mu\text{g}/\text{L}$, $0.14\mu\text{g}/\text{L}$ 이었다.

3. 연구 결과

1) Varian 30A와 Hitachi Z-8100 원자흡수 분광기로 측정된 혈중 납 농도치의 비교

두 기기로 측정된 날짜별 혈중 납 농도치를 비교하여 보았다. 이때 사용한 표준시료는 1개(subject)의 바이알마다 3번 반복하여 취하였으며, 한 개의 시료마다 원자흡수 분광기에서 2번 반복측정 하였다(표 2).

각 표준시료의 희석에 따른 측정치의 변이계수는

Table 4. Precision of intra-and inter-vial measurements for concentrations of lead in canine blood.

SRM	n		Blood lead concentrations in vials($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)					
			1	2	Intra-vial		4	5
A	15	Mean	53.70	53.42	53.10	54.43	54.63	53.86
		S.D.	1.83	1.39	1.98	3.38	2.42	0.65
		C.V.(%)	3.41	2.60	3.73	6.21	4.41	1.21
B	15	Mean	40.70	39.13	42.10	40.34	40.22	40.50
		S.D.	2.02	1.66	1.44	1.09	1.00	1.07
		C.V.(%)	4.96	4.24	3.42	2.70	2.49	2.64
C	15	Mean	57.09	56.09	57.09	57.33	55.98	56.72
		C.D.	4.28	1.37	1.35	0.58	1.29	0.63
		C.V.(%)	7.50	2.44	2.36	0.92	2.30	1.11

Varian 30A가 0.9~8.1%, Hitachi Z-8100이 0.9~4.8%이었으며, 같은 표준시료를 3일간 분석한 평균 농도는 Varian 30A의 경우 $31.11 \pm 1.36 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 이며, Hitachi Z-8100의 경우 $33.08 \pm 0.82 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로써 두 기기간의 평균 농도 차이는 $1.97 \mu\text{g}/100\text{ml}$ ($0.32 \sim 3.40 \mu\text{g}/100\text{ml}$)이었다.

2) 전기로 원자흡수 분광기에 의한 혈중 납 농도의 정밀도

원자흡수 분광기의 반복측정에 대한 정밀도를 산출하기 위하여 혈중 납 표준시료 A, B, C에 대하여 각각 10번 반복 측정하였다(표 3).

표준시료 A는 시료의 평균농도 $56.31 \pm 1.98 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 3.52%의 변이계수를 나타냈으며, B는 $40.89 \pm 0.80 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 1.96%, C는 $59.01 \pm 1.38 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 2.34%를 나타내어 표준시료 A, B 및 C의 반복측정의 변이계수는 모두 4% 미만이었다.

3. 표준시료의 저장 용기내 및 용기간의 균질도

정도관리용 표준시료로서 갖추어야 할 조건으로는

우선 시료의 균질도를 들 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 시료를 저장할 용기내 및 용기간의 혈중 납 농도에 어느 정도의 균질성이 있는지 실험하였다(표 4).

동일 용기내의 표준시료를 반복측정한 변이계수는 A에서 2.60~6.21%, B는 2.49~4.96%, C는 0.92~7.50%이었다. A, B 및 C의 3개 표준시료를 저장한 5개 용기내의 평균 납 농도는 각각 $53.86 \pm 0.65 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $40.50 \pm 1.07 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 및 $56.72 \pm 0.63 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로써 변이계수는 각각 1.21%, 2.64% 및 1.11%이었다. 또한 A, B 및 C의 용기간의 평균 납 농도 범위는 각각 $53.10 \sim 54.63 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $39.13 \sim 42.10 \mu\text{g}/100\text{ml}$, $55.98 \sim 57.33 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로서 용기간의 최대 농도 차이는 $2.97 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 시료의 균질성이 매우 높았다.

4) 납 표준시료의 저장 기간에 의한 안정도

표준시료의 저장기간에 의한 안정도를 알아보기 위하여 표준시료를 4℃ 냉장고에 저장하고 1 주마다 한 달 동안 납 농도를 측정된 결과는 표 5와 같다.

채혈 후 24시간된 혈중 납 농도를 100%로 하고 표준시료 A, B 및 C의 한 달 후의 회수율은 각각 89.6~100.4%, 91.6~101.9% 및 90.3~100.0%으로써 시료의 안

Table 5. Stability of lead in canine blood during one month storage at 4°C

unit: $\mu\text{g}/100\text{ml}$

Date	Lead concentrations in canine blood(Mean \pm S.D.)		
	A	B	C
1	59.04 \pm 3.88(100.0)	40.91 \pm 0.73(100.0)	60.69 \pm 2.08(100.0)
7	55.33 \pm 0.64(93.7)	37.47 \pm 1.35(91.6)	55.93 \pm 1.02(92.2)
14	55.80 \pm 0.95(94.5)	39.03 \pm 1.46(95.4)	58.58 \pm 0.26(96.5)
21	52.88 \pm 0.51(89.6)	37.66 \pm 1.66(92.1)	54.80 \pm 0.91(90.3)
28	59.26 \pm 2.31(100.4)	41.68 \pm 1.82(101.9)	57.02 \pm 1.35(94.0)

note : Numbers in parenthesis indicate recovery rate(%)

Table 6. Lead concentrations in canine blood analyzed in our laboratory and acceptable range recommended by CDC

Samples	Lead concentrations($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)				Acceptable range recommended by CDC**
	Mean S.D.	n	Range	95% C.L*	
A	56.46 \pm 2.69	15	52.88~59.26	51.08~61.84	47.99~64.93
B	39.35 \pm 1.89	15	37.47~41.68	35.57~43.13	33.35~45.35
C	57.40 \pm 2.31	15	54.80~60.69	52.78~62.02	48.79~66.01

* : 95% confidence limits(Mean \pm 2 S.D.)

** : Acceptable range recommended by the Centers for Disease Controls is \pm 15% of target for vials over than values $40\mu\text{g pb}/100\text{ml}$, and $\pm 6\mu\text{g pb}/100\text{ml}$ for values less than $40\mu\text{g pb}/100\text{ml}$.

정성이 매우 높았다. 평균값은 각각 $56.46 \pm 2.69\mu\text{g}/100\text{ml}$, $39.35 \pm 1.89\mu\text{g}/100\text{ml}$ 및 $57.40 \pm 2.31\mu\text{g}/100\text{ml}$ 였으며 측정농도의 범위가 $52.88 \sim 59.26\mu\text{g}/100\text{ml}$, $37.47 \sim 41.68\mu\text{g}/100\text{ml}$, $54.80 \sim 60.69\mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 측정값이 모두 95% 신뢰구간내에 포함되었다(표5). 또한 표준시료 A, B, 및 C의 농도가 미국 질병관리 예방센터(Centers for Disease Controls, CDC)에서 추천하는 분석시의 허용범위 내에도 충분히 적용되었다(표 6).

5) 혼합 표준시료의 균질도

개를 사용해서 정도관리용 혈중 납 분석용 표준시료를 제조할 때에는 단일개체에서 동일한 표준시료를 대량 제조하기 어려운 제한점이 있다. 그러므로 다량의 표준시료를 제조하기 위해서는 여러 개체에서 얻은 시료를 혼합한 혼합 표준시료(D1)를 만들지 않을 수 없

다. 이러한 목적으로 3마리 개에게 각기 다른 양의 납($10 \sim 80\text{mg}$ of Pb/kg of body weight)을 각각 경구 투여하여 얻은 혈중 납의 농도가 다른 A1, B1 및 C1의 시료를 각각 일정량 취하여 실험관에서 혼합하여 혼합 표준시료(D1)를 만들었다. 혼합 표준시료(D1)의 균질성과 보존기간에 따른 납농도의 안정성을 측정한 결과는 표 7과 같다.

혼합 표준시료의 경과일수에 따른 측정치는 $32.76 \sim 33.54\mu\text{g}/100\text{ml}$ 이며 변이계수(C.V.%)는 $1.2 \sim 2.7\%$ 를 나타내어 단일 시료 A1, B1 및 C1의 각각의 측정치인 $22.59 \sim 24.58\mu\text{g}/100\text{ml}$ (C.V.= $0.4 \sim 4.9\%$), $17.63 \sim 19.87\mu\text{g}/100\text{ml}$ (C.V.= $1.3 \sim 5.5\%$) 및 $50.19 \sim 52.63\mu\text{g}/100\text{ml}$ ($0.8 \sim 3.1\%$)와 비슷한 변화 양상을 보였다.

표준시료 V1, V2, V3는 동일한 혼합 표준시료로 타 유관기관과 농도 비교를 하였다(표 8). L1의 실험실은

3개의 표준시료의 평균 농도가 $25.91 \pm 1.19 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 이며, L2는 $34.16 \pm 0.22 \mu\text{g}/100\text{ml}$, L3는 $35.68 \pm 0.85 \mu\text{g}/100\text{ml}$, L4는 $30.95 \pm 0.46 \mu\text{g}/100\text{ml}$, L5는 본 연구실의 결과로서 평균 농도가 $31.18 \pm 0.24 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 이었으며, 5개 실험실의 평균 농도는 $31.58 \pm 3.75 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 이었다. 각 기관마다의 표준시료간 변이계수는 0.6~4.6% 범위를 보였으며, 기관간은 11.9%를 나타냈다.

5개 기관에 대한 농도 비교에 있어서 본 연구소(L5)의 측정치를 대표값으로 할 때 CDC의 허용농도 범위는 $25.18 \sim 37.18 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 5개 기관의 측정값이 모두 포함되었으며, 또한 5개 기관의 평균 농도를 대표값으로 선정했을 때 허용농도 범위도 $25.57 \sim 37.57 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로 기관 모두 허용범위 내에 들어갔다.

4. 고 찰

납은 광업, 각종 제조업, 건설, 도소매업, 전기가스 및 통신업 등 많은 산업 분야에서 사용하고 있는 물질이며, 이에 상응하여 납 중독의 특수건강진단이 요구되는 근로자의 수도 많다. 또한 우리나라 직업병 유소 전자로 색출되는 근로자의 수도 다른 유해물질에 의한 것 보다 훨씬 많다.

납 취급 근로자의 건강관리를 위한 생물학적 폭로 지표로서 혈중 납의 농도를 측정하고 있다. 그러나 혈중 납을 측정할 때 가장 많이 사용되는 원자흡수 분광기는 미량분석이 가능한 장점이 있는 반면에 분석조건이 까다롭고 미량분석에서 오는 측정오차, 오염도 등

Table 7. Homogeneity of lead concentrations in mixed and individual canine blood samples during one month storage at 4°C

Date	Lead concentrations of canine blood samples							
	D1		A1		B1		C1	
	Mean	S.D.(CV%)	Mean	S.D.(CV%)	Mean	S.D.(CV%)	Mean	S.D.(CV%)
1	32.92	± 0.45(1.3)	23.87	± 1.18(4.9)	19.06	± 0.25(1.3)	50.19	± 0.51(1.0)
14	32.96	± 0.74(2.3)	24.58	± 0.43(1.7)	19.87	± 0.99(5.0)	52.46	± 0.43(0.8)
21	33.54	± 0.89(2.7)	22.59	± 0.10(0.4)	17.63	± 0.30(1.9)	52.52	± 0.50(1.0)
30	32.76	± 0.39(1.2)	23.21	± 0.56(2.4)	18.00	± 0.99(5.5)	52.63	± 1.62(3.1)

∴ D1 = A1 + B1 + C1

Table 8. Comparison of blood lead concentration in an identical standard reference materials analyzed at five different laboratories

Laboratory	SRM				Acceptable range by CDC				
	V1	V2	V3	Total(C.V.%)					
L1	24.65	± 1.81	27.02	± 1.92	26.05	± 1.71	25.91	± 1.19(4.6)	
L2	33.87	± 0.54	34.40	± 0.75	34.10	± 0.83	34.16	± 0.22(0.6)	
L3	36.66	± 0.52	35.18	± 0.67	35.19	± 0.38	35.68	± 0.85(2.4)	
L4	31.44	± 2.24	30.90	± 2.13	30.52	± 2.92	30.95	± 0.46(1.5)	
L5	31.17	± 0.64	31.43	± 0.91	30.95	± 0.72	31.18	± 0.24(0.8)	25.18~37.18
Total	31.58	± 4.46	31.79	± 3.24	31.36	± 3.58	31.58	± 3.75(11.9)	25.57~37.57

∴ D1 = Our laboratory

의 문제가 따른다(Subramanian KS, 1986; Brodie KG and Routh MW, 1984).

생물학적 시료 중의 납을 분석하려면 고도의 분석 능력과 기본적인 장비를 갖추어야 할 것이다. 측정기관에서의 어긋난 분석 데이터는 직업병 및 납 중독 진단 여부에 문제가 된다. 이러한 문제를 없애기 위하여 미국 및 다른 유럽국에서는 일정 농도의 혈중 납 표준 물질을 만들어(Target value), 각 측정기관에서 분석의 정확도 및 정밀도를 평가하고 있다(Anglove JT, 1992; Lauwerys R et al, 1975).

우리나라에서도 생체 표준시료를 제조하여야 한다는 중요성을 인식하고 1994년도에 실험관 내에서 소피에 인위적으로 납을 첨가하여 표준시료 개발에 힘을 썼다(노동부, 1994). 반면에 미국 과학기술연구소나 질병관리 및 예방센터에서는 혈중 납 분석을 위한 표준 용액을 제조할 때, 소나 돼지에게 납을 경구 투여시킨 후 혈액을 채취하는 생체내 제조방법을 사용하였다(Eller PM 등, 1977; Cox DH 등, 1989). 이렇게 제조된 시료는 엄격한 분석 및 장비를 이용하여 인증된 표준 물질(Certified Reference Materials)로 각 기관에서 사용되고 있다.

저자들에서는 시료의 안정성이 높고, 납 폭로 기전에 알맞는 방법인 생체내 혈중 납 표준물질을 제조하고자 하여 개(Canine)에 체중당 납을 10~80mg로 경구 투여시켰다. 개 혈액의 생리적 측정치는 비중이 1.056, 점도 4.7, 헤마토크리트 45.5%, 헤모글로빈 14.8mg/100ml, 적경 7.3 μ m, 적혈구수가 6×10^6 개/mm³이며 수명이 105~122일로 사람의 생리적 수치와 매우 비슷하다(고광두 등, 1994; 김우권 등, 1992). 이는 개와 사람의 혈액에 대한 조성(matrix)이 유사하여 혈중 납 농도 분석에 있어서 원자흡수 분광기의 온도 프로그램 및 시료의 전처리 단계가 같다.

표준물질의 기능은 실험실내의 검량선이나 표준물질로서 분석능력을 평가하거나 발전시키며, 실험실간이나 실험실 내의 정도관리에 사용코자 하는 데 목적이 있다. 또한 까다로운 미량 분석법에 대한 추적물질로도 사용되어 정확한 농도 분석에 의해 정확한 직업

병 진단이나 치료에 적용하고자 함이다.

이러한 목적에 부합하기 위해 표준물질은 시료 용기 내 및 용기간의 혈중 납 농도가 균질해야 하며, 혈액의 일정 저장기간 동안에도 납 농도가 일정해야 한다. Jacobson et al(1991)은 혈중 농도가 0.25, 1.98 및 3.76mole/L에서 반복 측정에 의한 바이알 내 변이계수(within run CV%)가 각각 3.2%, 1.8% 및 1.4%를 나타냈으며, 바이알간(between run CVs%)은 7.3%, 2.9% 및 2.2%를 나타냈다. 다른 연구자들은 바이알간 변이계수(between run CVs%)가 10~17%를 보였다(Del Rosario AR, 1982; Paschal DC 등, 1981; Wang ST 등, 1985). Wang 등(1985)은 4°C 냉장고에서 10 주간 226~616 μ g/L의 혈중 납 표준시료의 변이계수가 6.3~11.5%로, 표준시료의 안정성을 측정하였다. 본 연구에서도 각각의 농도가 다른 표준시료 A, B 및 C의 용기 내 변이계수가 0.92~7.50%였고, 용기간 변이계수가 각각 1.21%, 2.64%, 1.11%으로써, 용기간의 최대 납 농도 차이가 2.97 μ g/100ml로 시료간의 균질성이 매우 높았다.

저장기간에 대한 안정도는 4°C 냉장고에서 약 한 달간 농도 변화량을 측정하였다(표 5, 표 7). 표준시료 A, B, C 및 혼합시료 D1의 측정범위는 각각 52.88~59.26 μ g/100ml, 37.47~41.68 μ g/100ml, 54.80~60.69 μ g/100ml 및 32.76~33.54 μ g/100ml로 측정값이 모두 95% 신뢰구간 내에 포함되었다. Cox(1989) 등은 인증된 납 표준시료도 각각의 농도가 6.4 ± 1.4 μ g/100ml, 36.2 ± 2.1 μ g/100ml, 54.0 ± 3.1 μ g/100ml일 때 시험관간의 농도범위(intertube range)는 각각 3.8~8.9 μ g/100ml, 32.5~39.5 μ g/100ml, 48.0~60.0 μ g/100ml이었고, 시험관내 농도범위(intratube range)는 표준시료의 농도가 각각 22.2 ± 1.8 μ g/100ml, 38.7 ± 2.0 μ g/100ml, 59.5 ± 3.6 μ g/100ml에 대해 측정범위가 19.0~25.4 μ g/100ml, 35.1~42.2 μ g/100ml, 51.9~66.0 μ g/100ml로 시험관간이나 시험관내 농도가 모두 95% 신뢰구간(Mean \pm 2SD)의 허용범위에 적용되었음을 보였다. 95% 신뢰구간에 포함된 농도범위는 미국 질병관리 및 예방센터의 분석시 추천된 허용범위로 40 μ g Pb/100ml 농도 이하에서는

6 μ g/100ml의 오차를 인정하며, 40 μ g Pb/100ml 이상에서는 농도값의 $\pm 15\%$ 의 분석오차를 인정하는 허용범위 내에 모두 포함되는 것을 알 수 있다(표 6). 이러한 결과는 분석 측정법을 정확히 하고 특히 표준시료로서의 균질성 및 일정기간 동안 시료의 안정성이 매우 높음을 말해주고 있다.

개의 혈액은 60~80ml/kg of body weight의 혈액을 함유한다(김우권 등, 1992). 단일개체의 이 혈액의 양은 정도관리용 표준시료를 만들기 위해 대량생산하는데 어려움이 많아, 여러 개체에서 얻은 시료를 혼합하여 많은 양의 혼합표준시료를 만들 수밖에 없다. 이러한 목적으로 3마리의 개에게 각각 다른 농도의 납(10~80mg of Pb/kg of body weight)을 경구 투여하여, 농도가 다른 A1, B1 및 C1의 생체내 표준시료를 시험관에서 혼합하여 새로운 농도의 혼합 표준시료(D1)를 제조하였으며, 혼합 표준시료의 균질성과 안정성 여부를 검토하였다(표 7). 혼합 표준시료의 날짜간 측정 범위는 32.76~33.54 μ g/100ml이며, 변이계수는 1.2~2.7%를 나타내어 단일 표준시료 A1, B2 및 C1 각각의 농도 변화량과 유사한 시료의 균질성을 나타냈다. 또한 혼합 표준시료(D1)에 있어서도 단일시료와 마찬가지로 혈액을 현미경으로 관찰한 결과 적혈구의 용혈이나 응집은 보이지 않았다.

혼합 표준시료에 대해 4곳의 타 유관기관에 의뢰하여 분석된 측정값을 비교하였다(표 8). 이때 동일하게 제조된 표준시료 V1, V2, V3는 각각의 실험실마다 표준시료간 측정값의 변이계수가 0.6~4.6%를 보였으며, 본 연구소를 포함하여 5개 기관간의 측정 변이계수는 11.9%를 나타내 기관간의 측정변이가 높음을 인식시켰다. 또한 본 연구소의 측정값을 기준으로 할 때 CDC의 허용농도 범위는 25.18~37.18 μ g/100ml 이었으며, 5개 기관의 평균 농도를 대표값으로 선정했을 허용농도 범위는 25.57~37.58 μ g/100ml로, 두 기준값에 대해 모든 기관이 허용범위에 포함되었다.

위와 같은 결과 생체내 제조에 의한 혈중 납 표준시료는 표준시료 내 및 표준시료간 시료의 균질성이 높았으며, 한 달 동안 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 시료의 안정성이

높아 정도관리용 혈중 납 표준시료로 매우 적절하다고 사료되어, 차후 우리나라 전국에 산재하고 있는 특수검진 측정기관들의 생체시료에 대한 정도관리용 납 표준시료로 활용되어 건강진단기관의 내실화 및 표준화 방안에 기여할 수 있을 것이다.

5. 결 론

개 3마리를 이용하여 생체내에 납을 체중 1kg당 10~80mg의 납을 경구 투여하여 각각 다른 농도의 A, B 및 C의 혈중 납 표준시료를 제조하였다. 또한 제2차 납을 경구 투여시켜 농도가 다른 A1, B1, C1의 생체내 표준시료를 만들어 시험관에서 혼합하여 D1의 혼합 표준시료를 제조하였다.

표준시료의 납 농도는 전기로가 부착된 원자흡수 분광기를 사용하여 분석하였으며, 아래와 같이 표준시료로서의 사용될 수 있는 기준 조건에 적합하였다.

1. 표준시료의 납 농도 분석에 사용된 원자흡수 분광기는 Varian 30A와 Hitachi Z-8100으로 두 기종의 기기 감도는 각각 0.46 μ g/L, 0.56 μ g/L이며, 검출한계는 각각 0.34 μ g/L, 0.14 μ g/L이었다. 3일간 같은 농도의 표준시료를 분석한 결과 Varian 30A는 31.11 \pm 1.36 μ g/100ml, Hitachi Z-8100은 33.08 \pm 0.82 μ g/100ml로써, 두 기기간 납 농도 차이는 약 3% 미만이었다.

2. 원자흡수 분광기의 반복 측정(n=10)에 대한 정밀도는 표준시료 A의 농도 56.31 \pm 1.98 μ g/100ml에 대하여 3.52%, B는 40.89 \pm 0.80 μ g/100ml로 1.96%, C는 59.01 \pm 1.38 μ g/100ml로 2.34%를 나타냈다.

3. A, B, C 표준시료의 바이알내 변이계수는 0.92~7.50%였으며, 5개 바이알간 평균 납 농도는 각각 53.86 \pm 0.65 μ g/100ml (C.V.=1.21%), 40.50 \pm 1.07 μ g/100ml (C.V.=2.64%) 및 56.72 \pm 0.63 μ g/100ml (C.V.=1.11%)으로, 용기간의 최대 납 농도 차이는 2.97 μ g/100ml로 매우 높은 시료의 균질성을 보였다.

4. 약 한 달간 표준시료 A, B 및 C의 납 농도 회수율은 각각 89.6~100.4%, 91.6~101.9% 및 90.3~100.0%로 안정성을 나타냈으며, 각각의 평균값은 56.46 \pm 2.

69 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 39.35 \pm 1.89 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 및 57.40 \pm 2.31 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 이며, 농도 범위는 52.88~59.26 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 37.47~41.68 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 54.80~60.69 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 로 측정값이 95% 신뢰구간내에 모두 포함되었다.

5. D1의 혼합 표준시료는 날짜간 측정 범위가 32.76~33.54 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 이고, 변이계수(C.V.%)는 1.2~2.7%로, 단일 시료 A1, B1 및 C1과 마찬가지로 일정기간 동안 시료의 안정성 및 균질성이 매우 높았다.

6. L1, L2, L3, L4의 타 유관기관 및 L5의 본 연구소의 3개의 표준시료간의 혼합 표준시료에 대한 측정값은 각각 25.91 \pm 1.19 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 34.16 \pm 0.22 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 35.68 \pm 0.85 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 30.95 \pm 0.46 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 및 31.18 \pm 0.24 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 으로, 5개 기관의 평균 농도는 31.58 \pm 3.75 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 이었다. 이때 각 기관마다의 표준시료간 변이계수는 0.6~4.6% 범위를 보였으며, 기관간은 11.9%를 나타냈다.

참고문헌

- 고광두 등. 가축해부 생리학. 선진문화사, 서울. 1994. p 113
- 김우권 등. 가축생리학. 아카데미서적, 서울. 1992. 2nded, pp 17-33
- 노동부. 근로자 건강진단 실시기준. 노동부 고시 제92-9, 1992.
- 노동부. 직업병 예방을 위한 연구용역 결과 보고서. 생체 내의 중금속 측정용 표준인증물질 개발. 1994
- 이창업. 수의독성학. 서울대학교출판부, 서울. 1993. pp 133-136
- Anglove JT, Christensen JM. *Comparative study of certified reference materials and quality control materials for the quality assurance of blood lead determination.* *Analst* 1992;117:419-424
- Brodie KG, Routh MW. *Trace analysis of lead in blood, Aluminium and manganese in serum and chromium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry.* *Clinical Biochem* 1984;17:19-26
- Cox DH et al. *Bovine blood lead reference material.* *J Anal Toxi* 1989; 13: 204~207
- Crick J, Flegal AR. *Contaminant lead in blood-collection tubes for trace element studies.* *Clin Chem* 1992; 38(4):600-601
- Davidson MW. *Blood lead measurement takes the direct approach.* *Anal Chem* 1993;65(5):265a-257a
- Del Rosario AR, et al. *A rapid and precise system for lead determination in whole blood.* *Int J Environ Anal Chem* 1982;12:223-231
- Desilva PE. *Determination of lead in plasma and studies on its relationship to lead in erythrocytes.* *Bri J Ind Med* 1981;38:209-217
- Eller PM, Haartz JC. *A study of methods for the determination of lead and cadmium.* *Am Ind Hyg Assoc J* 1977;38:116-124
- Jacobson BE et al. *Improved sample preparation for accurate determination of low concentrations of lead in whole blood by graphite furnace analysis.* *Clin Chem* 1991;37(4):515-519
- Kehoe RA. *The metabolism of lead in man in health and Disease: the normal metabolism of lead.* *J R Inst Public Health Hyg* 1960;24:81-97
- Kehoe RA. *The metabolism of lead in man in health and Disease: the normal metabolism of lead under abnormal conditions.* *J R Inst Public Health Hyg* 1960;24:129-143
- Kepler JF et al. *Interlaboratory evaluation of the reliability of blood lead analyses.* *Am Ind Hyg Assoc J* 1970;412-429
- Lauwerys R et al. *Intercomparison program of lead, mercury, and cadmium analysis in blood, urine, and aqueous solutions.* *Clin Chem* 1975;21(4):551-557
- Legge TM. *Industrial lead poisoning.* *J Hyg* 1901;1:96-108
- Merenger JC et al. *The effects of storage times, temperatures and container types on the occurance of atomic absorption determinations of Cd, Cu, Hg, Pb, and Zn in whole heparinized blood.* *J Anal Toxicol* 1981;5:33-41
- Nackowski SB et al. *Trace metal contamination of evacuated blood collection tubes.* *Am Ind Hyg Assoc J* 1977;38:503-508
- Paschal DC, Bell CJ. *Improved accuracy in the determination of blood lead by electrothermal atomic absorption At Spectrosc* 1981;2:146-150

- Putnam RD. *Review of toxicology of inorganic lead. Am Ind Hyg Assoc J* 1986;47(11):700-703
- Subramanian KS, Meranger JC. *A rapid electrothermal atomic absorption spectrophotometric method for cadmium and lead in human whole blood. Clin Chem* 1981;27(11):1866-1871
- Subramanian KS, Meranger JC, Conner J. *The effect of container material, storage time and temperature on cadmium and lead levels in heparinized human whole blood. J Anal Toxi* 1983;7:15-19
- Subramanian KS. *Determination of trace metals in human blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Prog Analyt Spectrosc* 1986;9:237-334
- Templeton DM. *Quantifying cadmium and lead in whole blood. Clin Chem* 1992;38(10):1927-1929
- Uriano GA et al. *The role of reference materials and reference methods in chemical analysis. CRC. Crit Rev Chem* 1977;6:361-411
- Wang ST, Peter F. *The stability of human blood lead in storage. J Anal Toxi* 1985;9:85-88
-