

원자흡광법을 이용한 요중 연 배설량의 정량*

가톨릭대학 의학부 예방의학 통계학교실

<주임: 조 규 상 교수>

백 남 원 · 윤 복 상 · 정 규 철

—Abstract—

Determination of Lead in Urine by Atomic Absorption Spectrophotometry

Nam Won Paik, Bock Sang Yoon and Kyou Chull Chung

Department of Preventive Medicine and Biostatistics, Catholic Medical College, Seoul, Korea

(Chairman: Prof. Kyu Sang Cho)

Determination of lead in urine is important in industrial hygiene and toxicology. Dithizone method has been principally used for the determination of lead in urine, which gives accurate results in skilful hands but is usually complex and time-consuming.

Atomic absorption spectrophotometry is a new simple method and several procedures have been described. However, the influences of pH and the presence of chelating agents during treatment of lead poisoning are not clear. The purpose of this study was to find out the effect of pH and chelating agents on the determination of lead using Shimadzu atomic absorption/flame spectrophotometer, model AA-610.

The results obtained were as follows:

1. The atomic absorption spectrophotometry(AAS) could be applied without prior acid digestion to specimens in the absence of chelating agents. The absorbance at 2,170 Å, though more sensitive, was more noisy electronically. Therefore, we selected the wavelength of 2,833 Å plus scale expansion.
2. The optimal pH was in the range from 2 to 3.
3. The sensitivity was 0.075 µg/ml/% and detection limit was about 0.2 µg/ml.
4. In the presence of EDTA, lead could not be completely determined without prior acid digestion.
5. On specimens from patients receiving penicillamine therapy, a comparison was made between the values obtained with dithizone method and AAS method with prior acid digestion. The results of comparison showed a very good agreement.

* 본 실험에 이용된 Shimadzu atomic absorption/flame spectrophotometer, model AA-610, Nippon Denshi Kagaku recorder U-125MN 및 Hitachi spectrophotometer, model 101 등은 일본 OTCA(Overseas Technical Cooperation Agency)의 원조에 의한 것임.

머 리 말

요중 연의 농도는 연폭로를 나타내는 중요한 지표의 하나이다. 연의 흡수가 정상 보다 많을 때 나타나는 현상의 하나는 요중 연 배설량의 증가이며 Kehoe¹⁾ (1972)의 보고에 의하면 요중 연 배설량의 정상범위는 20~100 $\mu\text{g}/\text{l}$ (평균치 30 $\mu\text{g}/\text{l}$)이고, 위험한계는 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ 라고 하였다. 우리나라 성인 남자의 요중 연 배설량의 정상치는 $36.6 \pm 16.4 \mu\text{g}/\text{l}$ 이고(오세민²⁾, 1968), 건강한 연작업자에서는 90~160 $\mu\text{g}/\text{l}$, 무중상 연작업자에서는 160~210 $\mu\text{g}/\text{l}$, 그리고 유중상 연작업자에서는 210 $\mu\text{g}/\text{l}$ 이상이였다(정규철³⁾, 1968).

연을 정량하는 데는 여러가지 방법이 이용되고 있으나 지금까지 대부분의 실험실에서는 dithizone 법을 적용하고 있고 미국공중보건협회(USPHS)에서도 이 방법을 채택하고 있으며(Keenan, et al.,⁴⁾ 1963), 본 교실에서도 dithizone 법을 채택하고 있다. 그러나 이 방법을 실시하는데 있어서는 시간이 많이 소비되고 또 복잡하다는 등의 단점이 있다. 최근에는 보다 간편한 방법으로 원자흡광법(atomic absorption spectrophotometry)이 개발되어 적용단계에 이르고 있으나 아직도 미비한 점이 많이 있다.

본 연구는 원자흡광기를 이용하는데 있어서의 몇가지 문제점에 대하여 검토한 것으로 특히 검액의 전처리 과정에서 회화과정을 생략할 수 있는 가능성이 있는지의 여부와 연중독 치료시에 사용되는 chelate 시약인 EDTA가 연 정량에 어떠한 영향을 미칠 것인가 등에 대하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 기 구

- 1) Shimadzu atomic absorption/flame spectrophotometer, model AA-610
- 2) Nippon Denshi Kagaku recorder, U-125MN
- 3) Hitachi spectrophotometer, model 101

2. 원자흡광기의 조작

- 1) 파장 : 2,833 Å
- 2) lamp current: 10 mA
- 3) slit width: 0.1 mm
- 4) air pressure: 1.5 kg/cm²
- 5) air flow: 10 l/min
- 6) acetylene pressure: 0.4 kg/cm²

- 7) acetylene flow: 2.9 l/min
- 8) scale expansion: 10—9.5
- 9) chart speed: 20 mm/min
- 10) response: 2
- 11) AA zero: 3.5—6.5

3. 시 약

모든 초자기구는 35% HNO₃ 용액에 넣고 1일간 방치한 후 증류수로 세척하여 사용했다.

1) 2% (w/v) ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC): 사용할 때마다 조제한다.

2) methyl isobutyl ketone (MIBK):

분액여두에 MIBK와 증류수를 2:1의 비율로 넣고 20분간 혼합한 후 10분간 방치하고 수층은 분리하여 버리고 MIBK층만 취한다.

3) 10% (v/v) triton X-100 용액

4) 1.5M calcium chloride 용액

5) 표준원액

Pb(NO₃)₂ 320 mg을 정확히 평량하여 mess flask에 넣고 0.5% HNO₃ 용액을 가하여 500 ml 표신까지 채운다(분액 1 ml는 Pb 400 μg 에 해당한다).

6) 표준액: 위의 표준원액에 증류수를 가하여 200배로 희석한다(분액 1 ml는 Pb 2 μg 에 해당한다).

7) 3N-HNO₃ 용액

8) C-NH₄OH

9) calcium disodium ethylene diamine tetra-acetate (EDTA)

10) 회화액: C-HNO₃와 C-H₂SO₄를 5:2의 비율로 혼합한다.

11) 소변채취: 용기에 미리 5N-HCl 용액 25 ml를 넣고 24시간 동안 소변을 채취하여 냉장고에 보관한다.

4. 실험 조작

다음 4가지 방법으로 실험하여 결과를 서로 비교 검토하였다.

<실험 1> dithizone 법

USPHS 법(Keenan, et al.,⁴⁾ 1963)을 적용하였으며 기구로는 Hitachi spectrophotometer, model 101을 사용하였다.

<실험 2> 회화과정을 거친 원자흡광법:

Selander와 Cramer⁵⁾ (1968)의 방법을 적용하였다.

<실험 3> 회화과정을 생략한 원자흡광법:

① 3N-HNO₃ 용액과 C-NH₄OH를 사용하여 pH를 2.0~7.0으로 조절한다.

② 표준액 0.0, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 18.0, 24.0, 및

30.0 ml 를 각각 추출용 유리관에 넣고 증류수를 가하여 30 ml 로 한다(이 표준계열의 연농도는 각각 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 및 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 에 해당한다).

③ 검사용 소변 30 ml 를 추출용 유리관에 넣는다.

④ 표준계열과 검사용 소변을 넣은 추출용 유리관에 10% triton X-100용액 1 ml 와 2% APDC 용액 1 ml 를 가하고 진탕한다.

⑤ MIBK 5 ml 를 가하고 20분간 진탕한 후 3,500 g 에서 20분간 원심분리한다.

⑥ MIBK 층을 직접 원자흡광기에 흡수시킨다.

<실험 4> EDTA 의 방해물 방지하기 위한 실험 :

<실험 3>의 ④과정을 거친후 검액 20 ml 에 대하여 1.5 M CaCl_2 용액 0.6 ml 를 추가한다. 그 외의 실험조작은 <실험 3>에서와 같다.

성 적

1. 표준 검량선의 작성

1) dithizone 법에 의하여 파장 520 μm 에서 비색하여 얻은 표준 검량선은 그림 1과 같았다.

2) <실험 3>의 방법에 의하여 원자흡광법으로 파장 2,833 \AA 에서 측정된 표준 검량선은 그림 2와 같았다.

2. 수소이온농도(pH)의 영향

0.667 $\mu\text{g/ml}$ 의 연을 포함한 검액을 사용하여 pH 2~7

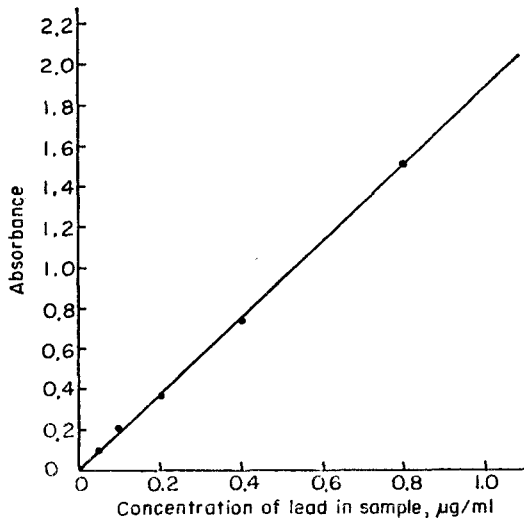


Fig. 1. Standard curve for lead obtained by dithizone method (5ml of dithizone solution was used).

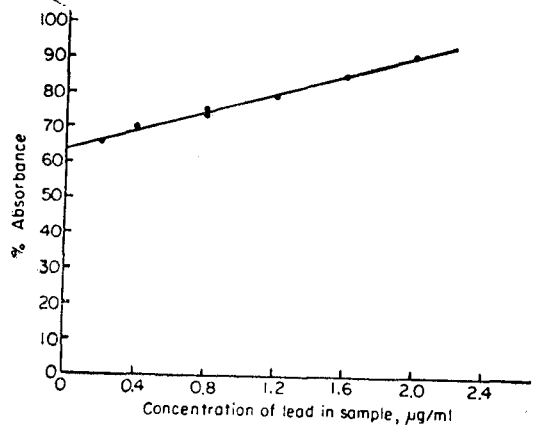


Fig. 2. Standard curve for lead obtained by atomic absorption spectrophotometric method (5ml of MIBK was used).

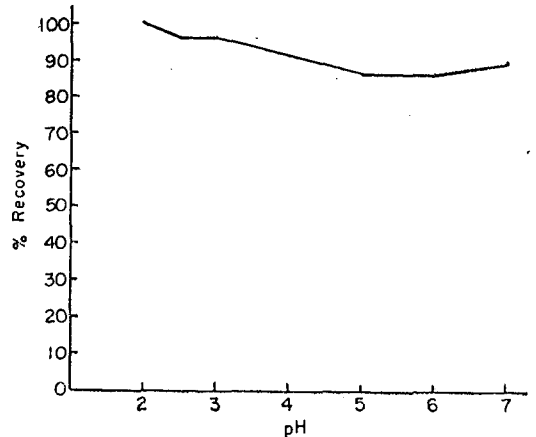


Fig. 3. Effect of pH on the determination of lead in sample without EDTA (Pb concentration of sample was 0.667 $\mu\text{g/ml}$).

의 범위 내에서 <실험 3>의 방법으로 연을 정량한 결과 pH 에 따른 연의 회수율은 그림 3과 같았다.

3. EDTA 를 포함한 검액에서의 수소이온농도에 따른 연의 회수율

0.667 $\mu\text{g/ml}$ 의 연을 포함한 검액을 사용하여 <실험 4>와 같은 방법으로 EDTA 와 CaCl_2 용액을 가하고 pH 2~7의 범위내에서 연의 회수율을 측정된 결과 그림 4와 같은 성적을 얻었다.

4. Dithizone 법과 원자흡광법의 상관관계

Penicillamine 으로 연중독을 치료하고 있는 환자의 소변을 취하여 dithizone 법으로 연을 정량한 성적과 회화

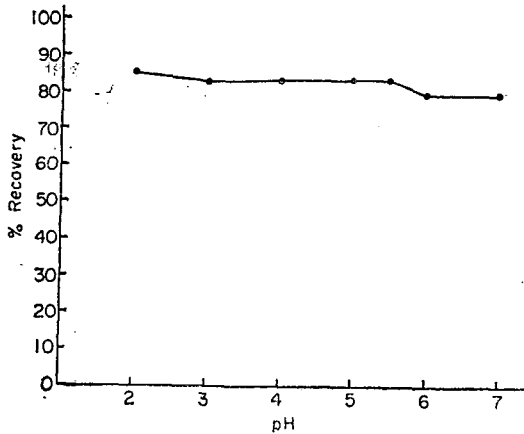


Fig. 4. Effect of pH on the determination of lead in sample with EDTA (Pb concentration of sample was 0.667 $\mu\text{g/ml}$).

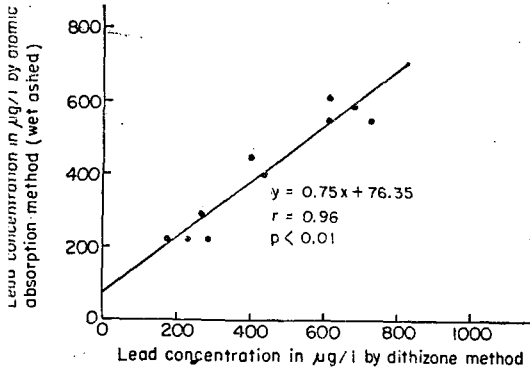


Fig. 5. Comparison of dithizone and atomic absorption methods for determination of lead in urine.

과정을 거친 원자흡광법(실험 2)으로 정량한 성적을 비교하여 상관관계를 본 결과 그림 5와 같았다. 회귀직선의 방정식은

$y=0.75x+76.35$ 였고 여기서 y 는 원자흡광법으로 정량한 요중 연 농도($\mu\text{g/l}$)이고, x 는 dithizone 법으로 정량한 요중 연 농도($\mu\text{g/l}$)를 나타낸다.

고 찰

1. 파장의 선택

원자흡광을 이용한 연의 측정은 2,170 Å, 2,833 Å, 및 4,057.8 Å 등에서 실시할수 있다고 보고되어 있으나 4,057.8 Å 에서는 감도가 매우 낮아서 사용되지 않았고 있으며 주로 2,170 Å 과 2,833 Å 을 사용하고 있는데

2,170 Å 에서 감도가 더 높으므로 많이 이용된다고 한다(武者宗一郎과 下村 滋⁶⁾, 1972).

본 실험에서 관찰한 결과 파장이 2,170 Å 인 경우 감도는 높았으나 안정성이 없었고, 반면 2,833 Å 에서는 감도는 2,170 Å 에서의 $\frac{1}{2}$ 정도 였으나 안정성이 높았다. 그러므로 본 실험에서는 2,833 Å 을 선택하여 모든 실험을 실시하였다.

2. 표준 검량선과 감도

그림 2의 표준 검량선은 눈금을 최대확대율인 10배로 확대하여 만든 것이다. 여기서 감도를 보면 0.075 $\mu\text{g/ml}/\%$ 로서 Selander 와 Cramer⁵⁾ (1968)가 보고한바 있는 0.02 $\mu\text{g/ml}/\%$ 보다 매우 낮았으며 이는 본 실험에서 사용한 원자흡광기의 성능에 의한 것이라고 생각된다. 이러한 낮은 감도를 가진 측정방법으로는 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (즉 200 $\mu\text{g/l}$) 이하의 연을 포함한 검액은 정확히 측정할 수 없고 고농도의 연을 포함한 검액에만 사용될수 있다고 생각된다.

3. pH 의 영향

Selander 와 Cramer⁵⁾ (1968)는 APDC 와 MIBK 로 연을 추출할 때 가장 적당한 pH 의 범위는 2.5~4.5라고 보고하였다.

본 실험에서는 EDTA 를 포함하지 않는 검액의 경우 그림 3에서 보는 바와 같이 pH 2~3이 최적범위로서 96% 이상의 연을 정량할 수 있었고 pH 3 이상에서는 연의 회수율이 점점 감소하기 시작하여 pH 4 이상에서는 요중 연량의 90% 이하가 정량되었다.

그러므로 연을 정량할 때의 검액의 최적 pH 는 2~3임을 알수 있다.

4. EDTA 의 영향

연중독의 치료제로서는 EDTA, BAL 및 penicillamine 등의 chelate 시약이 쓰여지고 있으며 이 chelate 시약은 연과의 결합력이 강하다. 그러므로 이러한 chelate 시약과 결합된 연을 정량하려면 산으로 회화시키는 조작이 필요하다고 알려져 있다. 그런데 Zinterhofer 들⁷⁾ (1971)은 회화시키는 복잡한 과정을 생략하고 EDTA와 결합된 연을 정량할 수 있다고 보고했으며, 본 연구에서도 이에 관심을 가지고 그의 방법을 적용하여 보았다. 그는 과량의 Ca^{++} 을 가하고 pH 를 약 5.5로 조절함으로써 EDTA 와 결합된 연을 100% 분리정량할 수 있다고 하였으나, 본 실험결과에서는 그림 4에서 보는 바와 같이 pH 2~7의 범위내에서 85% 이하의 연만을 검출할 수 있었다.

이것은 EDTA 와 연과의 chelate 생성정수($\text{pK}=18.2$)가 EDTA 와 Ca^{++} 과의 chelate 생성정수($\text{pK}=10.6$) 보

다 크므로 EDTA와 연을 완전히 분리할 수 없기 때문이라고 생각되며 이 문제를 해결하기 위하여는 앞으로 더욱 끊임없는 연구가 이루어져야 할 것이다. 그러므로 chelate 시약을 연중독의 치료제로 사용할 경우, 요중 연을 정량할 때에는 반드시 회화과정이 필요하다고 생각된다.

이를 증명하기 위하여 penicillamine을 치료제로 사용하고 있는 사람들의 소변을 대상으로 dithizone법과 회화과정을 거친 원자흡광법을 사용하여 연을 측정하고 상관관계를 본 결과 그림 5에서 보는 바와 같이 매우 유의한 상관관계를 나타냈다.

5. triton X의 역할

chelate 시약을 사용하지 않는 경우, 회화과정을 생략하고 정량할 때에는 triton X를 사용해야 한다. 이는 소변 중에 세균이 오염되어 있으면 세균에 의하여 연의 분리가 방해되므로 triton X를 첨가하여 세균의 세포막을 파괴하기 위한 것이다.

결 론

원자흡광법을 이용하여 요중 연을 정량할 때 관여하는 여러가지 인자에 대하여 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 파장 2,170 Å 보다 2,833 Å 이 더 편리하였다.
2. 본 원자흡광기의 연에 대한 감도는 0.075 µg/ml/%로서 매우 낮았으므로 요중 연농도 0.2 µg/ml 이하의 소변에는 적용하기 곤란하였다.
3. 연을 분리 추출하는데 가장 적합한 pH는 2~3의 범위였다.
4. 연중독 치료제로서 chelate 시약을 사용하는 경우의 요중 연량을 정량할 때에는 원자흡광법을 쓰더라도

회화과정을 생략할 수 없었다.

5. penicillamine을 사용하는 사람의 요중 연을 회화과정을 거친 원자흡광법과 dithizone법으로 측정한 결과 매우 유의한 상관관계를 보였다.

6. chelate 시약을 사용하지 않을 때는 triton X를 사용함으로써 회화과정을 생략할 수 있었다.

인 용 문 헌

1. Kehoe, R. A., : *Occupational Lead Poisoning*, JOM, 14. 390-396, 1972.
2. 吳世敏, 鉛中毒에 관한 研究, 公衆保健雜誌, 5. 135-138, 1968.
3. 鄭奎澈, 韓國에서의 鉛吸收判定基準에 관한 研究, 最新醫學, 12. 137-150, 1968.
4. Keenan, R. G., Byers, D. H., Saltzman, B. E., and Hyslop, F. L.: *The "USPHS" Method for Determining Lead in Air and in Biological Materials*, Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 24. 481-491 1963.
5. Selander, S. and Cramer, K.: *Determination of Lead in Urine by Atomic Absorption Spectrophotometry*, Brit. J. Industr. Med., 25. 139-143, 1968.
6. 武者宗一郎과 下村 滋, 原子吸光分析, 東京, 共立出版, 1972.
7. Zinterhofer, L. J. M., Jatlow, P. I., and Fappiano, A.: *Atomic Absorption Determination of Lead in Blood and Urine in the Presence of EDTA*, J. Lab. Clin. Med., 78. 664-674, 1971.

