

직업병 검진을 위한  
검사방법의  
실제(3)

# 연 디시존법

## (혈액 및 요의 연측정법)

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

디시존(dithi zone)법에 의해 혈액 및 요중의 연을 측정하는데는 유기물을 분해해야 되기 때문에 회화처리가 필요하고, 연이온의 시료용액으로 만들어 정량조작을 행한다.

연이온은 시안화칼륨을 가한 약알칼리성(pH 8~12)의 용액에서 디시존과 반응하여 착화합물을 만들고, 유기용제층에 추출되어 적색을 띤다. 디시존법은 이 정색반응을 이용하여 연을 정량하는 것으로 추출액중에 과잉의 디시존(녹색)을 남긴 것을 비색하는 혼색법과 과잉의 디시존을 제거하고 비색하는 단색법으로 분리되며, 또 추출용제에 사염화탄소 혹은 클로로포름을 이용하는 방법(하층추출)과 벤젠을 이용하는 방법(상층추출)이 있다.

여기서 기술하는 디시존법은 벤젠을 이용한 단색법으로 연의 추출에 사용하는 분액피펫(separate funnel)이 1개로 끝나 정량조작이 간편한 점을 들 수가 있다.

### II. 기구·시약

#### 1. 기 구

유리제품의 기구류는 반드시 묽은 질산(5~10%)에 넣어 끓이고 잘 세척한 후 증류수로 씻고 사용한다.

폴리에틸렌제 용기류는 가온한 묽은 질산을 가해 흔들고 액을 바꾸어 2~3회 반복한 후 잘 씻고 증류수로 씻고 실온에서 건조시킨다.

주사기(20 ml) 및 주사침(1/1), 시험관(20 ml), 평량병(입구넓은 삼각플라스크, 20ml), 채뇨용기, 시약병, 세척병, 비이커, 메스실린더, 피펫, 메스플라스크, 피펫, 홀피펫(whole pipette), 뷰렛, 분액피펫, kjelgahl(킬달) 플라스크 및 분해대, 분광광도계 또는 광전비색계

#### 2. 시 약

시약은 연분석용 또는 초특급을 사용하고 정제를 필요로 하는 염류는 소정 농도의 용액으로 조제한 후 연을 추출·제거하여 사용한다.

- 1) 증류수
- 2) 혈액응고방지제 (수산암모늄 또는 헤파린)
- 3) 황산 (95%), 질산 (60%), 과염소산 (60%), 염산 (35%),
- 4) 암모니아수 (28%)
- 5) 에틸알코올, 클로로포름, 벤젠
- 6) 티몰블루용액 (지시약)

티몰블루 0.1 g을 에틸알코올 20 ml에 용해하여 증류수 80 ml를 가한다.

- 7) 카바존 용액 (시약정제용)

디-β-나프틸티오카바존 약 10 mg을 클로로포름 100 ml에 녹인다.

- 8) 구연산암모늄용액 (40 g/dl)

구연산암모늄 200 g을 약 300 ml의 증류수에 용해시키고 (가온해도 됨), 티몰블루 용액 2~3 방울을 가한 후, 암모니아수를 혼합하면서 용액이 청색이 되면 그친다. 발열된 용액이 실온으로 되면 증류수를 가해 500 ml 되게 한다.

이 액을 분액피펫에 넣고 카바존 용액 20~30 ml씩을 이용하여 흔들고, 정치, 분류하는 과정을 반복하여 반응금속을 추출한다.

카바존용액은 연 기타 금속이온에 의해 보라색~붉은색으로 변하지만 녹청색 그대로 변하지 않는다면, 그만하고 다음으로 클로로포름 약 20 ml를 이용하여 2~3회 씻고 클로로포름층이 착색되지 않으면 정치하여 이것을 분리한다.

구연산암모늄용액은 시약병에 넣어 보존한다.

- 9) 염산히드로크실아민 (염산 hydroxylamine) 용액 (20 g/dl)

염산히드로크실아민 100 g을 약 300 ml의 물에 녹이고, 티몰블루 용액 2~3 방울을 가한 후 암모니아수를 혼합하면서 가해, 용액이 청색을 띠면 그친다. 발열된 용액이 실온으로 되면, 증류수를 가해서 500 ml되게 한다.

이하 8)의 경우와 같이 카바존 용액을 이용하여 반응금속을 추출·제거하고 클로로포름층을 분리한 염산히드로크실아민용액은 시약병에 넣어 냉암소(냉장고)에 보관하고 3개월 이상 경과한 것은 사용하지 않는다.

- 10) 시안화칼륨 용액 (20 g/dl)

시안화칼륨 50 g을 증류수에 녹여 100 ml로 만들고 8)의 경우와 같이 카바존용액 10~15 ml씩을 사용하여 추출조작을 반복한다(연 이외의 반응금속은 적다).

이 경우 물층에 갈색의 침전을 생성하는 수가 있으므로 하룻 밤 방치하여 클로로포름층 및 침전물을 제거한다.

시안화칼륨용액 (50 g/dl)은 250 ml의 메스실린더에 옮겨, 증류수를 가해 1.5배 용량으로 희석한 후 시약병에 넣어 냉암소(냉장고)에 보존한다.

- 11) 암모니아-시안 혼합액

증류수 950 ml를 시약병에 넣고 시안화칼륨용액 50 ml 및 암모니아수 10 ml를 가해 혼합한다.

- 12) 디시존 용액 (추출용, 1 mg/dl)

디시존 (디페닐티오카바존, Diphenylthiocarbazon) 10 mg을 유리시험관에 넣고 클로로포름 10 ml를 가해 녹인 후 일정량을 시험관에 취해 벤젠으로 100배 용량으로 채운다.

클로로포름용액 (디시존 1 mg/ml)은 냉장고에서 약 1개월간 보존할 수 있지만, 벤젠용액 (디시존 1 mg/dl)은 사용할 때마다 필요량을 만든다.

- 13) 연표준용액 (1 μg/ml)

질산연 [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] 159.8 mg을 정확히 달아, 질산 1 ml를 가한 증류수 약 50 ml에 녹여 메스플라스크에 옮긴 후 증류수를 가해 1,000 ml되게 한다. (연 100 μg/ml)

사용할 때, 5 ml를 메스플라스크에 취해 증류수로 500 ml로 채워 연표준용액으로 한다.

### Ⅲ. 방 법

#### 1. 시료의 채취

- 1) 혈액

정맥혈 10~20 ml를 채혈하여 시험관에 혈액응고방지제 (수산암모늄 10~20 mg, 또는 헤파린 1~2 mg)와 잘 혼합한다.

혈액을 평량병에 옮겨 10 mg까지 평량한 후, kjeldahl 플라스크에 옮기고 병에 남은 혈액은

증류수 5~10 ml씩 3회 씻어서 더한다.

## 2) 요

채뇨병은 연에 의한 오염이 되지 않는 장소에 놓고, 근무시간내의 요 또는 24시간요를 모은다.

연작업자의 1회요를 채취하는 경우는 작업전 및 작업후에 채뇨하여 각각의 연량을 측정하는 것이 좋다.

시료요는 필요에 따라 전용량 및 비중을 측정하여, 50 ml를 취해 kjeldahl 플라스크에 옮긴다.

시료요를 보존하는 경우는 100 ml요에 대해 1 ml의 황산을 가해 둔다.

## 2. 시료의 처리

### 1) 회화 (습식회화)

혈액 또는 요를 취한 kjeldahl 플라스크에 대략 황산 2.5 ml, 과염소산 2.5 ml, 질산 15 ml를 차례로 가해 통풍장치안에서 회화한다. 이때 증류수 50 ml에 위와같이 산류를 가한 공표본을 만들어 시료와 함께 조작한다.

회화에는, 우선, 가스의 불꽃을 약하게 하여 가열하고 내용물이 가볍게 끓을 정도의 상태로 1~2 시간 유지한다. 용액이 황색투명하게 되고, 양이 약 1/2 이하로 농축되면, 이때 불꽃을 강하게 하여 2~3 시간 가열을 계속하고 농축액이 미황색 또는 무색이 되어 황산의 흰 연기를 생성하게 되면 그친다.

만약 농축액이 갈색을 띤 경우에는 질산 5~10 ml를 가하고 다시 불꽃을 약하게 하여 가열을 반복하고 공표본에 대해서도 같은 조작을 행한다.

### 2) 회화액의 처리

회화가 끝난 kjeldahl 플라스크에 증류수 약 15 ml 및 염산 5 ml를 가하고 이것을 5~10 분간 가열하여 용액이 투명하게 되면 꺼낸다. 혈액의 회화액은 황색을 띄고(철염의 착색), 요의 회화액은 무색이다.

용액이 식으면 구연산암모늄 용액 약 5 ml 및 티몰블루 용액 1~2 방울을 가하고 다시 암모니아수를 가하면서 용액이 녹색(혈액시료) 또

는 청색(요시료)을 띠면 그친다.

이것을 다시 액이 약간 끓을 정도의 불에서 약 5분간 가열하고 실온이 될 때까지 방치하여 검액 및 공표본으로 한다.

### 3) 검액의 조제

검액 및 공표본을 50 ml의 separate funnel에 옮기고 kjeldahl 플라스크에 남은 액은 소량의 증류수로 2~3회 씻어, 용액의 전량이 약 50 ml되도록 한다.

### 4) 표준계열액의 조제

50 ml의 separate funnel 4개에 연표준용액을 0, 5, 10, 20 ml를 취하고 구연산암모늄 용액 5 ml 및 티몰블루용액 1~2 방울을 가해 용액이 청색을 띄지 않는 경우는 암모니아수를 가한 후, 증류수로 전량을 50 ml되게 한다.

이것은 연 0 (공표본), 5, 10, 20  $\mu$ g를 함유한 표준계열이 된다.

## 3. 측 정

### 1) 추출조작

separate funnel 내의 각 용액(시료, 공표본, 표준액)에 염산히드록실아민용액 약 5 ml 및 시안화칼륨용액 2.5 ml를 차례로 가하고 염산 또는 암모니아수로 용액의 pH를 약 9.6으로 맞춘 후 10분 이상 방치해 둔다.

여기에, 디시존용액 5 ml를 가하고 마개를 막아 약 1분간 세게 흔든다. 정치하면, 위에 분리된 벤젠층에, 연량에 대응해서 녹~자~ 적색이 보인다. 만약 시료중의 연량이 많아서 디시존이 부족한 경우는 벤젠층이 적색이 되므로 디시존용액을 5 ml씩 추가하여 반복해서 흔들어 준다.

다음에 벨브구멍에 벤젠층이 혼입되지 않도록 조작하여 아래의 물층을 분리하여 버린다. 남은 추출액에는 암모니아-시안 혼합액 약 50 ml를 가하고 딱딱한 마개를 해서 약 30초간 세게 흔들어 준다. 정치하면 위의 벤젠층에 연의 적색이 나타나고 과잉의 디시존은 물층에 녹아 황색을 띤다. 이 물층을 분리하여 버리고 벤젠층의 색을 비색하여 연량이 구해진다.

## 2) 비 색

비색에 분광광도계를 사용하는 경우는  $520m\mu$  근처의 최대흡수파장을 선택하고, 광전비색계의 경우는  $500\sim 530m\mu$ 의 필터를 선택해 둔다.

분액피펫내에 색을 띤 용액은  $10\text{ mm cell}$ 에 취해, 용액이 혼탁해진 경우는 피펫아래 부분에 솜을 막고 작은 funnel에 옮겨 표준계열의 0 (공표본)을 대조로 하여 흡광도를 측정한다.

표준계열로부터 얻어진 용액의 흡광도로 그래프에 검량선을 작성하고 (직선관계의 검량선이 된다). 이에 의해 검액 및 공표본용액의 연량을 구한다.

더우기 추출조작에 디시존용액  $10\text{ ml}$  이상을 사용한 경우는 따로 연량을 증가시킨 표준계열액을 만들어 추출조작을 하고 동일 추출액량의 색을 띤 용액에 대해서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한다.

## 3) 계산

혈액 및 요중의 연농도는 검액중의 연량으로부터 공표본용액중의 연량을 뺀 값을 측정치로 하여 아래 식에 의해 계산된다.

### ① 혈액중 연 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )

$$= \text{측정치 (연 } \mu\text{g)} \times \frac{100}{\text{사용한 혈액량 (g)}}$$

### ② 요중연 ( $\mu\text{g}/\ell$ )

$$= \text{측정치 (연 } \mu\text{g)} \times \frac{1,000}{50 (\text{사용한 요량, ml})}$$

요중 연량은 요비중 또는 크레아티닌양에 의해 농도보정을 하지만, 통일된 농도보정방식은 없고, 요량을 측정하여 일정시간당 배설량으로 표시하는 것도 있다.

미국에서 많이 사용되고 있는 비중보정식은 아래와 같다.

$$\text{요중 연보정농도} = \frac{\text{연 } \mu\text{g}/\ell \times 0.024}{\text{요비중} - 1,000}$$

## IV. 판 정

### 1. 정상치

연의 정상치 범주는 발표자에 따라 일정하지

않지만 일본인의 경우 대개는 혈액중  $5\sim 30\mu\text{g}/100\text{ g}$ , 요중  $5\sim 50\mu\text{g}/\ell$ 이고, 이것은 일상 음식물 및 생활환경으로부터 체내에 흡수되는 연의 level을 표시한 것이라 생각하면 된다.

## 2. 이상치

혈액중 연  $30\mu\text{g}/100\text{ g}$  이상, 또는 요중 연  $50\mu\text{g}/\ell$  이상의 상태가 계속되는 경우에는 어떤 원인에 의해 연의 이상흡수가 있는 것인지 의심해 보는 것이 좋다. 다만, 혈액중 및 요중 연량의 증가가 곧 중독과 결부되지 않는다.

일본에서 연중독 판정기준이 되고 있는 연량은 혈액중에  $60\mu\text{g}/100\text{ g}$  이상, 요중에  $150\mu\text{g}/\ell$  이상이다. 연중독을 의심하는 증상이 있고, 더구나 혈액중 또는 요중 연량이 여기에 해당하는 경우에는 치료를 요한다고 한다.

## V. 주의 사항

1) 연의 측정에 사용한 기구류 및 시약류는 전용의 것을 set로, 특히, 시료중에 외부로부터 연이 혼입되지 않도록 주의한다.

새로운 기구류를 사용하는 경우에는 회화 및 추출조작에서 예비실험을 해 두는 것이 바람직하다.

2) 작업현장의 작업자에서 채뇨하는 경우는 손, 작업복으로부터 연이 혼입되지 않도록 주의하고 채뇨방법지시를 철저히 해둔다.

3) 시료의 회화에는 때때로 도중의 경과를 관찰해 두는 것이 필요하고 불꽃이 센 경우는 용액이 넘치지 않도록 주의한다.

회화소요시간은 가열조건에 따라 다소 다르다.

4) 연의 추출조작에는 혼드는 도중 디시존용액의 정색변화를 주의해서 관찰하고 진동의 세기와 추출소요시간을 확실하게 하는 것이 좋다.

더우기, 디시존은 일광에 의해 분해되기 쉽기 때문에 추출조작은 직사일광을 피한다.

<정정> 2월호 p.8의 우측 5째줄, 13째줄  
p.9의 좌측 아래에서 2째줄  
unber-light → Amberlite 로 고침.