

혈액중 연량의 검사법

지금까지 소개해 온 종합정도관리는 일본의 전국노동위생단체 연합회가 작업환경측정치의 정도관리를 위해 실시하였던 작업환경측정사 교육의 교재내용을 번역정리한 것이다.

1. 머리말

혈중 연량측정법으로서는 혈액시료를 산분해하여 회화액(灰化液)으로부터 유기용매에 킬레이트 추출시켜 flame 원자흡광분석법으로 측정하는 방법과 혈액시료를 적당한 용액으로 희석만 하여 흑연로(黑鉛로) 원자흡광분석법으로 측정하는 방법이 널리 사용되어 왔다.

작업환경관리가 이루어지고 있는 현재는 연폭로가 저감화됨에 따라서 종래 대량폭로로 인한 중독의 조기발견을 목적으로 한 건강진단에서 전환하여 미량폭로로 인한 건강장해를 일으키지 않도록 지속적인 건강관리를 도모하고 있다. 이런 이유로 건강진단항목에 혈액중 연량의 검사나 요중 델타아미노 레블린산량 검사 등이 추가되고 있다.

이 검사는 연작업자의 혈액중 연량 수준이 저하되어 연폭로를 받지않은 작업자의 혈중연량과 근사한 수준에서 측정해야 하는 수가 많기 때문에 당연히 고감도, 고정밀도가 요구된다. 이 때문에 흑연로 원자흡광광도법에 의한 측정이 주류를 이루고 있다. 현재 일상적인 분석으로 flame원자흡광광도법을 사용하고 있는 기관이 어느정도 있는가는 명확치 않으나 여기에서는 흑연로원자흡광광도법을 중심으로 설명한다.

2. 흑연로원자흡광광도법

흑연로원자흡광광도법의 원리는 흑연관을 전기

로 가열하여 그 열에너지로 측정목적 원소를 증발, 기화시켜 원자흡광을 관측하는 것이다. 전기로이므로 흑연관에 공급되는 전력을 조절함에 따라서 흑연관의 온도를 100도 정도에서 3000도의 범위로 설정할 수가 있는데 제어부에 프로그램기능을 갖추고

- (1) 용매를 증발시키는 건조단계(100도전후)
- (2) 중간 온도에서 유기물 등을 분해제거하는 회화단계(500~1500도)
- (3) 목적원소를 기화, 원자화시키는 원자화 단계(1100~3000도)의 가열과정을 거쳐 하나의 측정이 이루어진다.

2-1 흑연로원자흡광광도법에 의한 혈액중 연측정상의 문제점

- (1) 목적원소의 열적특성
- (2) 공존물의 영향
- (3) 혈액시료의 점성
- (4) 흑연관의 소모영향

가) 흑연로의 온도와 연흡수의 정점

원자화 단계에서의 전류치를 26A로 설정하면(설정온도 2000도) 원자화를 위한 가열을 시작해서 흑연관의 온도가 2000도에 도달하는데는 약9초가 걸린다. 연흡수가 정점에 달하는 것은 약2초후이며, 그 시점에서의 흑연관 온도는 약1200도였다. 원자화 전류를 200A에서 305A범위(온도 범위로는 1600도에서 2600도)로 변화시켜 흡수정점을 관찰

하면 흑연관 도달온도와 관계없이 흑연관의 온도가 약 1100도에서 1300도 범위에 도달된 시점에서 연흡수가 정점에 달하는 점을 알았다.

나) 공존물의 영향

같은 혈액시료에서 희석하는 용액의 조성이 달라지면 연흡수 정점의 형상이 달라진다. 혈액을 정제수로 희석한 경우와 0.1N의 질산용액으로 희석한 경우에는 모두 흡수정점에 차이가 없었으나 인산용액으로 희석한 경우에는 흡수정점에 달하는 시간이 늦어졌다. 그러나 감도는 높아졌다.

이것은 정제수나 질산용액으로 희석했을 때는 혈액중 염화물의 영향때문에 연이 기화되기 쉬웠으나 인산을 함유한 용액에서는 염화물의 영향이 제거되었기 때문인 것 같다.

다) 흑연관의 소모로 인한 감도에 미치는 영향

흑연로는 불활성가스속에서 흑연관을 가열하는데 고온 때문에 흑연관의 소모가 빨라져 200회 가열에서 중량이 약4% 감소하였다. 이 소모로 인해 흑연관의 전기저항이 늘어나기 때문에 공급하는 전류치가 일정하면, 흑연관의 온도는 높아진다. 중량이 다른 흑연관을 원자화 전류 260A로 가열했을 때의 흑연관 온도와 연의 흡광도 예를 표1에 나타냈다. 흑연관의 소모에 따라서 질산용액중의 연 흡수감도는 상당히 변화되고 있다.

이에 대하여 혈중연의 흡수감도 변화는 적어졌다. 새로운 흑연관으로 점량선을 측정할 경우와 가열을 반복하고 나서 검량선을 측정할 경우 같은 혈액이라도 정량치에 차이가 생긴다.

2-2 혈액희석법

혈액중 염소이온의 영향을 적게 하기 위해서 간섭억제제인 인산화합물의 첨가(PO_4 이온으로서 1% 첨가)효과를 조사하였다. H_3^- , $(\text{NH}_4) \times \text{Hy}^-$, Na_xHy^- , (단, $X+Y=3$)의 10종류 화합물중 Na_3PO_4 , K_3PO_4 를 뺀 8종류 화합물에 대하여 검토하였다.

그 결과 인산이온으로서의 첨가량이 일정하면 화합물 종류에 관계없이 연의 흡광도는 거의 같

았다. 그래서 용해가 쉽고 연의 blank가 적은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 사용하도록 하였다.

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 첨가로 표준용액과 혈액시료사이의 연의 감도차는 적어졌다. 또 인산이온 첨가로 회화온도를 800도까지 높혀도 감도저하가 나타나지 않았다.

회화온도를 600도로 설정해서 측정하였는데 흑연관 소모가 있어도 회화온도가 800도를 넘지 않기 때문에 회화단계에서의 연의 손실을 우려할 필요는 없다.

혈액시료의 점성때문에 희석배율이 적으면 흑연관으로의 주입이 곤란해지며 더욱이 원자화 후에 혈액의 찌꺼기가 흑연관 중앙에 고이게 된다. 그러므로 혈액시료의 점성을 적게하기 위해서 트리톤을 0.5% 첨가함으로써 5배 희석이라도 쉽게 주입할 수가 있으며 찌꺼기도 없으며 자동주입으로 연속측정을 할 수 있다.

2-3 온도제어방식

전류제어방식으로 원자화 가열을 했을 경우 이를테면, 설정온도 2000도에 도달하는데 약9초 걸리며, 연 흡수의 정점이 나타나는 것은 흑연관의 온도가 약 1200도에 도달한 시점이다. 원자화 전류를 증가시키면 흡수감도가 높아지는 것은 흑연관의 승온속도가 커지기 때문이다. 그리고 흑연관이 소모됨에 따라서 최종온도도 높아지며 승온속도도 커지게 되어 흡수감도가 높아진다.

온도제어방식에 의한 가열방법은 원자화 개시 때는 최대전류를 공급하고 흑연관의 온도를 광온도센서로 모니터하면서 설정온도에 이를 때까지 전류를 다시 작게 하고, 설정온도에 도달하면 소정의 전류치로 Control한다.

이 제어방식에서는 흑연관의 온도는 대단히 빨리 상승하여 2000도에는 약2초에 도달한다. 크롬이나 니켈같이 비점이 높은 원소인 경우에는 흑연로의 최고온도로 설정하여 감도를 비교하면, 온도제어방식이 2배에서 2.5배 높아진다. 연이나 카드뮴처럼 비점이 비교적 낮은 원소에서는 온도 제어방식에서 설정온도를 낮추더라도 충분한 감도를 측정할 수 있기 때문에 흑연관의 수명을 길

게 할 수 있다.

설정온도 2000도에서 두가지 가열방식에 의한 연의 감도를 비교하면 온도제어 방식이 약1.5배 감도가 높아진다.

2-4 연 측정법의 요약

(NH₄)₂HPO₄(1.2%)와 트리톤 Tx-100(0.5%)을 함유한 용액으로 혈액을 희석하고 검량선 측정용 용액도 같은 조성으로 조정함에 의해서

(1) 검량선법으로 신속하게 정량할 수가 있으며, 희석배율을 5배로 측정할 수 있는 점

(2) 그리고 원자화단계의 가열을 온도제어방식으로 함에 따라서 감도가 향상되었기 때문에 연폭로를 받지않은 사람의 혈중연량 수준의 측정까지도 용이해졌다.

(3) 흑연관 소모로 인한 정량치의 변동도 적어졌다.

(4) 흑연로의 온도조건으로서는 건조단계개시시는 85도의 낮은 온도로 설정해 놓고 30초에서 1분에 걸쳐 110도까지 승온시킴에 따라서 혈액시료의 돌비(突沸)가 적어져 재현성이 좋아진다.

2-5 흑연로의 구조에 대하여

현재 시판되는 원자흡광광도계중 background 동시보정이 가능한 장치에는 반드시 흑연로를 구성할 수가 있다. 1975년경에 발매된 흑연로는 어느것이나 미국의 perkin-Elmer사의 HGA-2100형과 유사한 것으로서 모두 전류제어방식을 채택하고 있으며 1980년 이후의 장치에는 광온도제어장치를 부착할 수 있게 되어 있다. 흑연로원자흡광광도법으로 측정조건을 검토할 때 가장 문제가 되는 것은 메이커가 다르면 흑연관 내경이나 재질이 다르기 때문에 다른 측정기관의 측정조건이 전혀 참고가 되지 않다는 점이다.

여기에서 사용경험을 소개하면 1973년경에 사용한 perkin-Elmer사의 HGA-70형은 흑연관의 내경이 8mm이며, 가열방식도 전압제어방식으로 흑연관의 온도상승이 대단히 완만하며 감도도 현재의 장치에 비해 상당히 낮았다. 개량형인

HGA-2000형으로 전류제어방식을 채용하였는데 같은 흑연로를 사용했을 때 감도는 그다지 향상되지 않았다. HGA-2100형으로 흑연로의 구조가 개선되어 흑연관 내경도 6mm로 작아지고 감도는 비약적으로 향상되었다. 그후 1977년에日立 지만원자흡광광도계를 도입했으나 구조적으로 대단히 유지하기 때문에 Cap형 흑연로를 사용해서 충분한 감도, 정도를 얻을 수 없었다. 현재 사용되고 있는日立 Z-7000형은 흑연관이 내경 4mm이며 한층 작아졌다. 같은 메이커라도 개량이나 개조를 해서 흑연로 구조가 변화되어 버렸기 때문에 그때까지 채용된 측정조건이 전혀 참고가 되지 않고 또 처음부터 건조온도, 회화온도, 원자화온도와 혈액시료를 주입하면서 검토해야만 한다.

2-6 Matrix Modification

흑연로원자흡광광도법에 의한 측정에서 간섭 영향을 가장 미치는 물질은 염화물이다. 0.1N 질산용액으로 조정한 연의 시료에 1%염화나트륨을 공존시키면 감도는 1/10 이하로 되어 버린다. 그 원인은 목적원소가 옆에 불안정한 염화물이 되어 비교적 낮은 회화온도에서도 비산돼버리는 경우가 있다.

혈중연 측정에서 인산이온을 첨가하는 것은 연을 옆에 안정한 산화물로 만들어 비산되는 것을 방지하는 효과가 있다고 생각되기 때문이다. 이와같이 적당한 화학물질을 첨가함에 따라서 간섭 영향을 제거하는 일 뿐만 아니라 측정대상원소를 옆에 안정한 화학물로 변환시키든가, 이와 반대로 시료용액에 질산암모니움을 첨가하여 다량으로 공존하는 염화나트륨을 비교적 낮은 회화온도(약 300도)에서 비산되기 쉬운 NaNO₃로 변환시켜 측정대상원소와 분리시키고 그 영향을 적어지게 한다.

이 방법을 Matrix Modification(화학수식법)으로서 보고된 것은 1975년경 이었으며, 그후 3십여제제로서 많은 예가 보고되고 있다. 이 보고에서 기술한 혈중연 측정에 인산이온을 첨가하는

효과는 혈중 카드뮴측정에도 같은 효과가 있다. 그외에 Be, Cr, Mn, Ni, Cu에 대한 염화나트륨

의 간섭을 억제하는데에 EDTA첨가도 효과가 있다고 보고되었다.

혈액중 프로토펴피린량 검사

혈액중 프로토펴피린량 측정은 연폭로로 인한 Hem 대사이상에 대한 지표의 하나로서 오래전 부터 주목되어 왔다. 그런데 흡광광도법에 의한 측정법은 번거롭고 다량의 혈액이 필요하기 때문에 별로 이용되지 않았었다가 1973년 Sassa나 Piomelli에 의해서 20-50 μ l의 혈액으로 측정할 수 있는 형광광도법이 개발되면서 분광형광광도 계가 널리 보급되고 점차 연폭로의 영향모니터링 으로서 산업위생 현장에서 활용하게 되었다. 이 방법은 초산에틸과 혼합용액으로 추출한 후 염산용액으로 역추출해서 형광광도법으로 정량 하는 방법이다.

이 방법은 Piomelli 논문이 "A micro method for free erythrocyte porphyrins : The FEP test"로서 발표된 후 적혈구유리 프로토펴피린량 (FER량)의 측정법으로서 보급되었다.

한편 Lamola가 연중독환자의 혈액중에는 프로 토펴피린 속에 아연과 결합되어 있는 프로토펴피 린이 존재한다는 사실을 형광스펙트르에 의해 증 명하였다. 그리고 Garden이나 Hart에 의해서 아 연 프로토펴피린양의 측정법이 고안되었다.

즉 에탄올이나 아세톤으로 추출하는 방법으로 서 아연프로토펴피린과 프로토펴피린을 동시정 량할 수 있게 되었다.

현재 프로토펴피린 측정법으로서 널리 이용되 고 있는 세가지 방법을 설명한다.

- 1) 초산에틸/초산추출에 의한 방법
- 2) 아세톤추출에 의한 방법
- 3) 에탄올추출법

1. 시약 및 기기

(1) 아연프로토펴피린(ZnP)

(2) 프로토펴피린 IX(PP)

porphyrin products (Logan, Utah), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.)제가 있다. Znp는 피리딘에서, PP는 에탄올에서 보존용액으로 용 해한다.

(3) 기타 시약은 전부 시약특급을 이용한다.

초산에틸, 초산, 염산(1.5N), 아세톤, 에틸알콜 등

(4) 분광형광광도계는 浜松 호트닉스 R-456 형 상당품인의 광전자증배관을 장착하면 600nm 보다 장파장에서도 높은 감도를 얻을 수 있다.

(5) 기록계를 이용하여 형광스펙트르를 기록 하고 정점의 높이로부터 농도를 측정한다.

(6) 믹서-(Vortex mixer 상당품이 편리)

(7) 원심기(3000rpm)

2. 형광스펙트르

아세톤 용액으로 측정한 ZnP와 PP의 표품(標 品)형광스펙트르와 연작업자의 혈액에서 아세톤 용액으로 추출하여 측정한 형광스펙트르 예에 서 연작업자의 혈액중 ZnP양은 117.9 μ g/l, PP양 은 61.0 μ g/l이며, 혈액중 연량은 59.6 μ g/l였다.

ZnP의 최대형광파장은 590nm부근이며, PP양 은 630nm부근과 떨어져 있어서 동시정량이 가능 하였다. 그러나 표품인 스펙트르에서 알 수 있듯 이 630nm 부근에서는 ZnP스펙트르가 겹쳐서 PP양의 측정이 약간 번거로웠다.

勵起파장으로서 ZnP가 415nm이며, PP는