

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

의 간섭을 억제하는데에 EDTA첨가도 효과가 있다고 보고되었다.

혈액중 프로토펀피린량 검사

혈액중 프로토펀피린량 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 프로토펀피린량 (FER량)의 측정법으로서 보급되었다.

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

즉 에탄올이나 아세톤으로 추출하는 방법으로 서 아연프로토펀피린과 프로토펀피린을 동시정 량할 수 있게 되었다.

현재 프로토펀피린 측정법으로서 널리 이용되 고 있는 세가지 방법을 설명한다.

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

1. 시약 및 기기

(1) 아연프로토펀피린(ZnP)

(2) 프로토펀피린 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

405nm으로 형광감도가 최대가 되었다. ZnP와 PP를 동시측정하기 위해서는 여기파장을 중간인 410nm으로 측정하였다.

1.5mol 염산용액으로 측정된 PP형광스펙트럼에서는, ZnP와 PP모두 같은 형광스펙트럼을 나타내는데, 산성용액에서는 ZnP의 피롤환에 결합되어 있는 아연이 떨어져 PP가 되기 때문이다.

3. 추출조작

혈액중 프로토펙피린류를 추출하는 용매로서 아세톤/물, 에틸알콜, 초산에틸/초산용액을 사용한다. 에탄올 및 아세톤 용액으로 추출하는 경우는, 원심기로 혈구부분을 침전시켜 상등액을 직접, 형광스펙트럼의 측정에 사용하나 초산에틸/초산용액으로 추출한 경우는 햄도 추출되기 때문에 추출층이 검은 적색을 띤다. 이 햄은 형광측정시의 여기파장인 400nm부근의 광(光)을 흡수하여 형광감도가 거의 없으므로 1.5mol염산으로 추출하여 형광측정을 한다.

추출조작 순서는 다음과 같다.

1) 10ml 용기에 정제수 0.5ml를 넣고 혈액을 0.1ml넣은 후 저어 용혈시킨다.

2) 추출용매를 5ml 가하여 젓는다.

추출용매로서는 에탄올(99.5%, 아세톤과 정제수(4:1)혼합액 및 초산에틸과 초산(4:1)의 혼합액 중 한가지를 사용한다.

3) 3000rpm에서 10분간 원심한다.

에탄올 및 아세톤 추출의 경우, 상청액을 직접, 형광셀에 넣어 측정한다.

4) 초산에틸추출인 경우는 상청액 전량을 따로 시험관에 옮기고 5ml의 1.5mol 염산을 가하여 세게 젓는다.

5) 약 10분 방치해서 완전히 유기층과 염산층을 분리시키고나서 유기층은 버리고, 염산층을 형광셀에 담아 측정한다.

*아세톤 추출인 경우 혈액을 희석하는 정제수 양을 0.2ml에서 1.0ml의 범위로 변화시키면서 측정된 결과, 0.5ml에서 형광감도가 최대가 되었다. 0.7ml이상에서는 유기층에 색소가 혼합되어

400nm부근의 광을 흡수해 형광감도가 저하한다.

*그리고 초산에틸층에서 염산층으로 옮길 때에 색소를 함유한 유기층을 완전히 제거해 두지 않으면 형광셀에 색소가 흡착되며, 약간의 색소라도 형광감도를 심하게 저하시킨다.

4. 보존용액인 프로토펙피린의 농도 결정법

형광측정을 할 경우에는 반드시 검량선을 측정할 때마다 측정해서 농도와 형광강도의 관계를 조사할 필요가 있다. 이를 위해서 ZnP와 PP보존용액농도를 구해 두어야 하며, 보존용액 농도는 스펙트럼 폭 1nm이하의 분광광도계를 이용해서 1.5N 염산용액으로 보정흡광도를 측정하고 Rimington이 보고한 분자흡광계수로 구해준다.

$$\text{보정흡광도 } E_D = \frac{E_{\text{MAX}} - 2(E_{430} + E_{380})}{1.688}$$

프로토펙피린 분자흡광계수는 $0.275 / \mu\text{mol}$ 이다. 따라서 보존용액중 농도는 $(E_D / 0.275) \mu\text{mol}$ 이 된다. 추출법일 때는 ZnP, PP농도를 같은 방법으로 결정해 둘 필요가 있다. ZnP경우도 염산용액에서는 같으며, $(E_D / 0.275) \times 652 \mu\text{g} / \ell$ 가 된다.

ZnP는 약간 안정성이 떨어지기 때문에 6개월마다 확인해 둘 필요가 있다.

5. 측정결과

참고로 1979년부터 측정해온 결과의 일부를 소개한다.

1) 측정법의 비교

초산에틸과 초산혼합용액으로 추출한 경우 ZnP와 PP는 염산용액에서 같은 스펙트럼이 되는데 정량치는 쌍방을 모두 이용한 것이다. 이 방법에 의한 측정치를 FEP양이라 한다. (단, 이 FEP양은 전혈중 양이며, 적혈구유리프로토펙피린 양으로는 전혈중 양을 헤마토크릿치로 보정하여 구한다. 이 경우 $\mu\text{g} / \text{dl}$ PCV-Packed Cell Volume이라 한다.)

그리고 초산에틸추출과 아세톤 추출의 두가지 방법으로 같은 혈액을 측정하여 그 정량치를 비교하였다. 아세톤 추출법인 경우는 ZnP정량치를 분자량을 고려하여 PP양으로 환산하고 PP양과 합계하여 측정치로 하였다. 그 결과에서는 양자의 측정치 사이의 상관계수가 0.994이며, 회귀계수는 1.03이었다.

2) ZnP양의 정상치

연폭로를 받지 않은 사람의 혈액중 프로토펙피린량을 조사하였다. 전기회사에서 근무하는 연을 취급하지 않은 작업자의 집단을 대상으로 남성 392명, 여성 454명의 혈액중 ZnP양과 PP양을 측정하였다. 빈혈자에서는 ZnP양이 높았으며, 혈액소량(헤모글로빈량)이 10g/l이하인 사람은 전부 ZnP양이 30 μ g/l을 넘었다. 이 때문에 혈액소량이 11g/l이상인 작업자를 대상으로 해서 남녀별로 ZnP양의 히스토그램을 구하면, 어느것이나 대수정규분포(對數正規分布)를 나타내며, 기하평균치는 남성 15.2 μ g/l, 여성 15.3 μ g/l이고, 남녀간에는 유의차(有意差)는 나타나지 않았다. 95%상한치로는 29.1 μ g/l이었다.

그리고 PP양의 평균농도는 남성이 4.2 μ g/l, 여성이 4.5 μ g/l이었다. 이 점에서 연폭로를 받지 않은 사람의 혈액중 프로토펙피린의 약 80%는 아연과 결합되어 있다고 생각된다. 극히 드물게 PP양 쪽이 많은 작업자가 나타나 이들에 대해 연2회, 10년간 추적조사 했는데 ZnP양과 PP양의 비율이 거의 변화되지 않았다.

따라서 FEP양으로서의 정상치 범위는 ZnP와 PP를 합친 약 40 μ g/l이라고 할 수 있다.

3) FEP양과 혈중연량과의 관계

FEP양은 연폭로에 의한 폴피린헴 대사계에 미치는 영향의 지표로서 유효하다고 하며, 혈중연량은 연폭로를 아는 가장 유력한 지표이다. 이 때문에 혈중연량과 FEP양의 관계가 이전부터 검토되어 왔다.

그러나 단순하게 혈중연량과 FEP양의 측정결과를 대비시켜서 상관분석을 하더라도 혈중연량

이 30 μ g/dl이하인 집단에서는 높은 상관이나 나타나지 않는 경우가 있다. 연폭로를 받은후 즉시 FEP양이 증가하는 것은 아니며, 개인차도 있고, 또 연작업에서 이탈되어 폭로를 받지않게 되어 혈중연량이 감소되도 곧바로 FEP양이 저하되지 않기 때문에 혈중연량과 비례하지 않는 것으로 추정된다.

최근 FEP양과 혈중연량을 측정한 몇가지 연작업자 집단에 있어서 각 집단마다 혈중연량과 FEP양과의 관계를 조사한 자료중 최근 조사한 18명의 집단에서는 평균 혈중연량이 54 μ g/dl로 대단히 높고 FEP양의 평균도 216 μ g/dl이었다.

이 집단에서는 혈중연량과 FEP양의 대수치와의 상관계수가 0.88로 높은 상관을 나타냈으나 평균혈중연량 및 평균 FEP양이 모두 30 μ g/dl정도인 25명의 집단에서는 상관계수가 0.45로 겨우 유의하다고 할 정도였다.

6. 결론

혈액중 프로토펙피린류의 측정법으로서 초산에틸/초산추출법으로 FEP양을 구하던 아세톤추출법 및 에탄올 추출법으로 ZnP+PP양을 구하던 측정결과에 차이가 나타나지 않았다.

여기에서 설명한 측정결과는 전부 혈액중의 프로토펙피린량이다. 연폭로 영향을 평가하는 지표로서는 혈구중의 FEP양으로 나타내는 예가 많다. 따라서 헤마토크릿치로 보정하여 평가해야 한다. 물론 혈구중의 양으로서 측정할 수 있는 방법은 없다.

(혈중 아연프로토펙피린 측정의 간편법... 일례)

==에틸알콜추출법에 대하여==

연작업자의 혈중 프로토펙피린량은 초산에틸 및 염산추출-형광분석에 의해서 측정되고 있는데, 이것은 적혈구 유리프로토펙피린(FEP)양으로서 측정되고 있는 것이다. 최근 아연 프로토펙피린을 운운하게 되면서 그 측정이 요구되어

Garder 등에 의해 에틸알콜(에탄올)추출법이 제창되었다. 이 방법에 따르면 1회 추출조작으로 즉시 형광분석이 가능하다. 더구나 아연 프로토포피린(ZPP) 및 프로토포피린(PP)을 따로따로 간단, 신속하게 정량할 수 있다. 그리고 에탄올추출법에서 가장 좋은 조건을 검토함과 동시에 초산 에틸-염산추출법과 비교검토한 것으로 보고하였다.

에탄올추출-형광분석방법 : 진공채혈관을 이용하여 정맥혈을 얻어 그 0.1ml를 정제수 0.5ml를 넣은 원심관에 넣고 각반하여 완전하게 용혈시킨다. 이어서 에탄올(시약특급 99.5% 5ml를 가하여 Vortex mixer에서 1분간 교반시킨후 3000rpm으로 10분간 원심하고 상청액의 형광스펙트르를 측정한다.

표준액. ZPP는 ZPP-1X를, PP는 2NaPP(어느 것이나 Porphyrin product제)를 이용하여 각기 초산+에탄올(1+9)에 녹인 것을 보존용액으로 하고, 사용시에 에탄올로 희석해서 썼다.

형광스펙트르 : 日立 MPF-4 형광분광광도계를 써서 여기파장 415nm, 슬릿 폭은 여기측 20nm, 형광측 10nm, 감도 $\times 10$ 이며, 형광측 550-750nm 범위의 스펙트르를 기록하고 ZPP 및 PP의 정점높이에서 계산하여 측정하였다.

계산 : 혈중 ZPP 및 PP양은 다음식으로 계산하였다.

$$ZPP(\mu\text{g}/\text{dl}) = 55P_{588} / P_{ZPP588}$$

$$PP(\mu\text{g}/\text{dl}) = 55(P_{632} - 0.23 P_{588}) / P_{PP632}$$

P_{588} , P_{632}시료의 588nm, 632nm에서의 정점높이

P_{ZPP} , P_{PP} 표준액 (1 $\mu\text{g}/\text{dl}$)의 588nm, 632nm에서의 정점높이

초산에틸-염산추출방법 : 에탄올 추출법과 초산 에틸-염산추출법을 비교하기 위해 52검체를 Piomelli방법에 준하여 측정하였다. 그리고 이 경우 형광스펙트르는 여기파장을 405nm으로 설정하지만 그 이상은 에탄올법과 같은 조건이다.

결과 : 형광스펙트르. Zpp의 에탄올 표준용액의 형광스펙트르는 그림 1-1의 (1), (2) 곡선과 같이 Zpp와 PP는 따로따로 스펙트르를 나타내며, Zpp는 588nm과 640nm으로, PP는 632nm에서 정점을 나타낸다. 반면 염산용액으로 하면 ZPP, PP는 그림 1-2곡선과 같이 어느것이든 같은 하나의 스펙트르를 나타낸다. 또 Zpp 및 PP의 최대형광파장 (E_m)과 최대여기파장 (E_x)은 표1에 나타난 바와 같다.

표1. 흑연관 온도와 연의 흡광도의 예(원자화 전류 260A)

흑연관	중량 (g)	도달온도 (°C)	승온속도 (도/초)	연흡광도 (20 $\mu\text{g}/\text{l}$)
A	0.99	2250	300	0.059
B	1.01	2100	260	0.052
C	1.02	2000	230	0.049
C'	0.98	2200	290	0.058

이어서 연 작업자의 혈액을 에탄올 추출을 하지 않은 형광스펙트르를 취하면 그림 2에서와 같이 588nm과 632nm에서 정점을 나타내며 E_x 415nm과 E_x 405nm에서는 정점높이의 비가 변한다. 이 점은 혈액중에 아연이 들어있지 않은

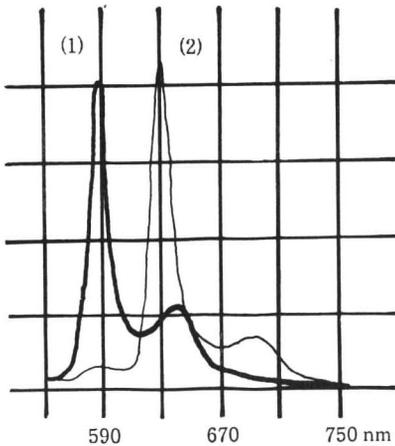
PP가 존재하는 사실을 나타내는 것으로 보인다. 또한 이 혈액을 초산에틸염산추출법으로 추출한 경우 그림 1-2의 스펙트르와 마찬가지로 된다.

에탄올추출법의 추출조건 : 용혈을 위한 정제수

를 0.1ml까지의 범위로 바꾸어 추출액의 에탄올 농도와 추출시료 감도와와의 관계를 조사한 것이 그림3인데, 90.5%(혈액0.1ml에 대하여, 정제수 0.5ml, 에탄올 5ml)인 경우에 ZPP, PP의 어느것에서나 가장 좋은 감도를 얻을 수 있는 사실을 알았다.

회수율, 기지농도의 ZPP, PP의 에틸용액 0.1ml를 취하여 에틸을 휘발시킨 후 혈액을 가하여 첨가실험을 하였는데 그 회수율은 ZPP 89.3%, PP 94.8%이다.

재현성 : 같은 혈액을 5회 추출한 경우의 재현성은 ZPP CV 0.008, PPCV 0.012이었다.



에탄올 추출인 경우
그림 1-1 (1) ZPP 스펙트르
(2) PP 스펙트르

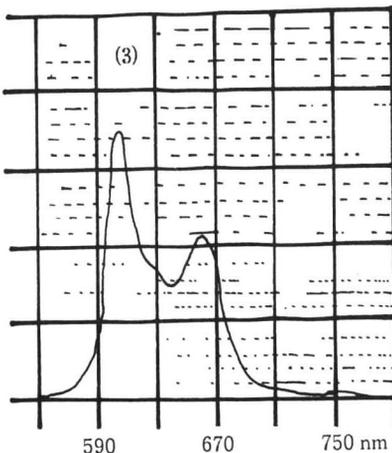


그림 1-2 1.5N 염산용액에 의한 스펙트르 ZPP+PP=FEP

에탄올 추출과 초산에틸-염산추출과의 관계 : 초산에틸-염산추출을 하면, 정점은 하나가 되고 이것을 FEP라고 하면 에탄올 추출의 경우는 0.899 ZPP+PP가, 이 FEP양에 상당하는 답이다.

(0.899는, PP의 분자량/ZPP의 분자량), 연작업자의 혈액, 52검체에 대하여 두가지 방법에 의해서 측정된 FEP양 사이에 그림4에 나타난 바와 같이 상관계수 $r=0.953$, $y=1.02x+0.2$ 라는 높은 상관성이 나타났다. 따라서 에탄올 추출의 ZPP+PP는 초산에틸-염산추출의 FEP와 거의 일치한다고 생각된다.

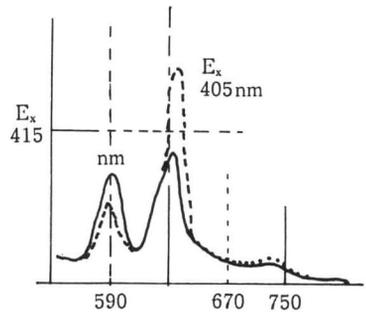


그림 2 혈액을 에탄올 추출해서 측정했을 때의 스펙트르

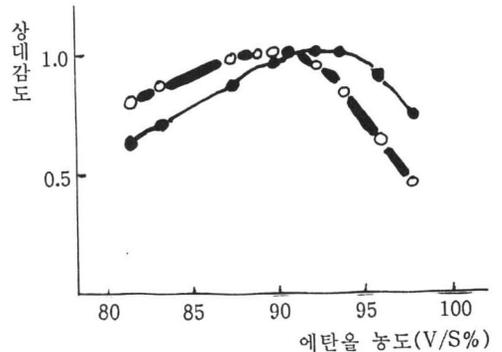


그림 3 추출시료의 감도와 에탄올 농도와의 관계

ZPP양과 혈중연량과의 관계 : 연작업자 99명의 혈중연량과 에탄올 추출법으로 추출한 ZPP양과의 관계를 조사하였는데 그림5에 나타난 바와 같이 상관계수 $r=0.805$ 이었다. 반면 이 방법의

해서 측정된 ZPP와 PP를 맞춘 FEP양과 혈중연량과 사이에는 상관계수 $r=0.782$ 이었다. 그리고 99검체중, 용혈되어 Ht를 측정할 수 없었던 19검체를 뺀 70검체의 에탄올 추출에 의한 ZPP양 및 FEP양과, 혈중 연량과의 관계를 Ht치로 보정하지 않는 경우와 Ht치에 따라서 보정을 했을 때의 쌍방향으로 조사했을 경우 표2에서 나타난 바와 같이 상관계수가 나타났다.

이에 따라서 빈혈자의 경우를 제외하고 Ht치에 따른 보정은 연 작업자의 검진에는 필요성이 적다고 여겨진다.

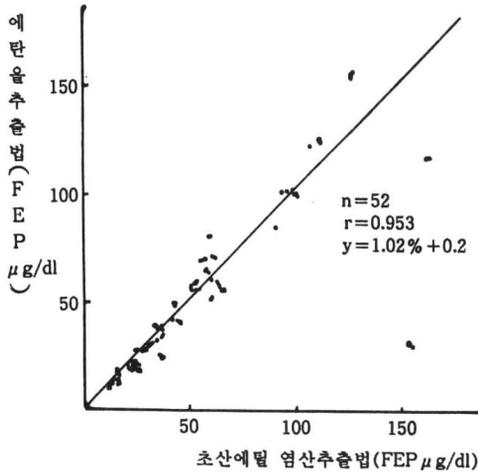


그림 4 에탄올 추출법과 초산에틸염산 추출법에 의한 FEP양의 관계

표 2. 에탄올 추출에 ZPP 및 FEP양과 혈중 연량과의 관계 (n=70)

		r
Ht치로 보정하지 않은 경우	ZPP	0.868
	FEP	0.787
Ht치로 보정한 경우	ZPP	0.879
	FEP	0.815

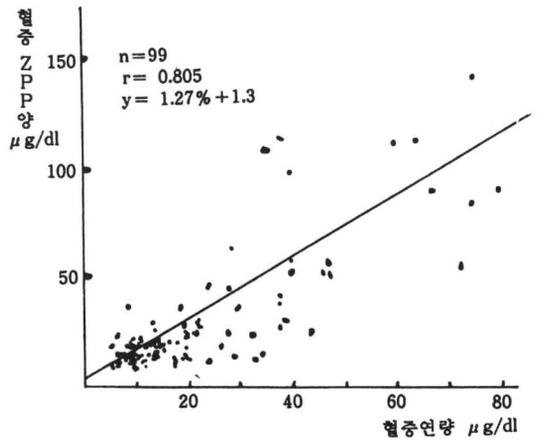


그림 5 혈중ZPP양과 혈중연량과의 관계