

KOSHA GUIDE

H - 21 - 2021

납의 생물학적 노출지표물질 분석에 관한 기술지침

2021. 10.

한국산업안전보건공단

안전보건기술지침의 개요

- 작성자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 김규상
- 1차 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 원용립
- 2차 개정자 : 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원 박정근

- 제 · 개정경과
 - 1998년 10월 KOSHA Code 산업의학분야 기준제정위원회 심의(제정)
 - 2011년 6월 KOSHA Guide 산업의학분야 제정위원회 심의(개정)
 - 2021년 8월 산업의학분야 표준제정위원회 심의(법령 및 규격 최신화)

- 관련규격 및 자료
 - WHO/HPR/OCH, Biological monitoring of chemical exposure in the workplace Guidelines Vol 1. 1996
 - American Conference of Governmental Industrial Hygienists(ACGIH): Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 7th Ed
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 생물학적 노출평가 기준 및 분석방법 연구 III: 납 등 중금속 10종. 연구원 2010-66-882. 2010
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 근로자 건강진단 실무지침: 제1권 특수건강진단의 개요. 2020-산업안전보건연구원-349

- 관련법규 · 규칙 · 고시 등
 - 산업안전보건법 시행규칙 [별표 24] 특수건강진단 · 배치전건강진단 · 수시건강진단의 검사항목(제206조 관련)
 - 고용노동부고시 제2020-61호(특수건강진단기관의 정도관리에 관한 고시)
 - 고용노동부고시 제2020-60호(근로자 건강진단 실시기준)
 - 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원. 「근로자건강진단 실무지침」 제1권 특수건강진단 개요. 2020-산업안전보건연구원-349

- 기술지침의 적용 및 문의

이 기술지침에 대한 의견 또는 문의는 한국산업안전보건공단 홈페이지(<http://kosha.or.kr>) 안전보건기술지침 소관 분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2021년 10월

제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

납의 생물학적 노출지표물질 분석에 관한 기술지침

1. 목적

이 지침은 산업안전보건법(이하 “법”이라고 한다) 제130조(특수건강진단) 및 같은 법 시행규칙(이하 “시행규칙”이라고 한다) 제206조(특수건강진단 등의 검사항목 및 실시 방법 등) 별표 24, 고용노동부고시 제2020-61호(특수건강진단기관의 정도관리에 관한 고시) 및 고용노동부고시 제2020-60호(근로자 건강진단 실시기준)에 따라 납에 노출된 근로자의 생물학적 노출평가와 관련된 생물학적 노출지표물질 분석 방법의 제시를 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 지침은 법, 시행규칙 및 고용노동부고시에 따라 실시하는 근로자 건강진단 중 납에 노출되는 근로자의 생물학적 노출평가에 적용한다.

3. 정의

(1) 이 지침에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다.

- (가) “생물학적 노출평가”란 혈액, 소변 등 생체시료 중 유해물질 자체 또는 유해물질의 대사산물이나 생화학적 변화산물 분석값을 이용한, 유해물질 노출에 의한 체내 흡수정도나 건강영향 가능성 등의 평가를 의미한다.
- (나) “생물학적 노출지표물질”이란 생물학적 노출평가를 실시함에 있어 생체 흡수정도를 반영하는 물질로 유해물질 자체나 그 대사산물, 생화학적 변화물 등을 말한다.
- (다) “생물학적 노출기준값”이란 일주일에 40시간 작업하는 근로자가 고용노동부고시에서 제시하는 작업환경 노출기준 정도의 수준에 노출될 때 혈액 및 소변 중에서 검출되는 생물학적 노출지표물질의 값이다.
- (라) “정밀도(Precision)”란 일정한 물질에 대하여 반복측정·분석을 했을 때 나타나는 자료분석치의 변동의 크기를 나타낸다. 이 경우 같은 조건에서 측정했을 때 일어나는 우연오차(Random error)에 의한 분산(Dispersion)의 정도를 측정값의 변이

계수(Coefficient of variation)로 표시한다.

- (마) “정확도(Accuracy)”란 분석치가 참값에 접근한 정도를 의미한다. 다만, 인증표준물질이 있는 경우는 상대오차로 표시하고, 인증표준물질이 없는 경우는 시료에 첨가한 값으로부터 구한 평균회수율로 표시한다.
- (바) “검출한계(Limit of detection: LOD)”란 공시료 신호값(Blank signal, background signal)과 통계적으로 유의하게 다른 신호값(Signal)을 나타낼 수 있는 최소의 농도를 의미한다. 이 경우 가장 널리 사용하는 공시료 신호값과의 차이가 공시료 신호값 표준편차의 3배인 경우로 한다.
- (2) 그밖에 용어의 뜻은 이 지침에서 특별히 규정하는 경우를 제외하고는 법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 「산업안전보건기준에 관한 규칙」에서 정하는 바에 따른다.

4. 분석개요

전혈과 소변 중 납, 소변 중 델타아미노레불린산, 전혈 중 아연 프로토포르피린을 분석하며, 분석장비는 흑연로 원자흡광광도계(Graphite furnace atomic absorption spectrometer, GF-AAS), 고성능 액체크로마토그래프-형광검출기(High performance liquid chromatograph-fluorescence detector, HPLC-FD), 분광형광광도계(Spectrofluorophotometer)를 사용한다.

5. 분석방법

5.1 혈액 중 납

5.1.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

납은 체내로 흡수된 후 혈액을 통하여 이동하여 대동맥, 간, 신장, 뼈에 축적되며, 전체 체내 축적량의 약 2% 정도가 혈액 속에 존재한다. 혈액 중 납은 최근에 흡수된 납의 양을 나타내며, 95% 이상이 적혈구의 단백질에 결합하여 있어, 이를 납의 특정 흡수 과장

에서 흑연로(Graphite furnace) 원자흡광광도계로 분석한다. 혈액은 대단히 복잡한 매질이므로 원자흡광광도계의 바탕보정이 필요할 뿐 아니라, 공시료에도 일정 농도의 납이 함유되어 있으므로 표준물첨가법(Standard addition method)에 의해 검량선을 작성하여 혈액 중의 납을 분석한다.

(2) 시료의 채취

(가) 시료채취 시기

시료채취 시기는 특별히 제한하지 않는다.

(나) 시료채취 요령

- ① 근로자의 정맥혈을 납이 포함되지 않은 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 또는 헤파린 처리된 튜브와 일회용 주사기 또는 진공채혈관을 이용하여 채취한다.
- ② 채취한 시료 용기를 밀봉하고 채취 후 5일 이전에 분석하며 4 °C(2~8 °C)에서 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리면 시료를 냉동보관용 저온바이알에 옮겨 영하 20 °C 이하에서 보관한다.

5.1.2 흑연로 원자흡광광도계법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동피펫 100 - 1000 μ L, 2000 - 5000 μ L, 100 μ L
- ② 용량플라스크 10 mL 5개, 1000 mL 1개
- ③ 분취기(Dispenser) : 0.4 - 2.0 mL
- ④ 시험관(Dilution tube)
- ⑤ 혈액혼합기
- ⑥ 초음파세척기

(나) 시약

- ① 납(1000 mg/L)

- ② 인산이암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)
- ③ 트리톤 X-100(TRITON X-100)
- ④ 질산 : 특급시약(검사관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑤ 거품억제제(Antifoaming agent)
- ⑥ 탈이온수($18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ 이상)

(다) 주의 사항

- ① 사용하는 모든 초자기구는 20% 질산에 4시간 이상 담가두었다가 탈이온수로 5회 헹구어 사용한다.
- ② 원자흡광광도계는 흑연로 장치가 부착된 중수소(D_2) 램프 보정방식의 기기 또는 지만(Zeeman)보정 방식의 기기를 사용한다. 흑연튜브는 열분해 분획관(Pyrolytic coated partitioned tube)을 사용한다.
- ③ 탈이온수는 초순수제조장치로 제조한 비저항 $18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ 이상의 것을 사용하거나 원자흡광광도계용 탈이온수를 구입하여 사용한다.
- ④ 트리톤 X-100, 암모늄인산염($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), 1000 mg/L Pb 표준용액과 질산은 특급시약을 사용하되 최초 개봉일로부터 3년 이내의 것을 사용하도록 하며, 초과 시는 새로운 시약과 비교실험을 실시하여 오차가 10% 이내일 경우 1년간 연장 사용할 수 있다.
- ⑤ 산을 취급할 때는 보호안경, 장갑, 마스크를 착용 후 후드에서 작업한다.

(2) 시약 조제

(가) 검량선용 표준용액 조제

- ① 납 1000 mg/L 표준시약 $100 \mu\text{L}$ 를 10 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 희석하여 납 $1000 \mu\text{g/dL}$ 표준용액 원액(Stock solution)을 만든다.
- ② 납 $1000 \mu\text{g/dL}$ 표준용액 원액을 <표 1>과 같이 탈이온수로 희석하여 납 10, 30, 50, 70 $\mu\text{g/dL}$ 의 검량선용 표준용액을 만든다.

<표 1> 검량선용 표준용액 조제방법

표준용액 번호	Pb 표준용액 농도	조제법	
	μg/dL	표준용액 원액(mL)	탈이온수
0	0	0	탈이온수
1	10	0.1	10 mL 표선 채움
2	30	0.3	"
3	50	0.5	"
4	70	0.7	"

(검량선에 사용되는 표준물질의 농도는 검체 결과가 검량선 범위에 들어가도록 자유롭게 정할 수 있다)

(나) 원자흡광광도계 자동시료주입부 튜브 세척액(Autosampler rinse solution)

1000 mL 용량플라스크에 질산 0.2 mL를 넣고 탈이온수로 표선을 채운다(장비 제조사의 표준 지침에 따라 세척액을 제조한다).

(다) 매질변형시약(Matrix modifier reagent)의 조제

- ① 1000 mL 용량플라스크에 트리톤 X-100 2 mL, 인산이암모늄 2 g을 넣은 후 탈이온수로 표선을 채운다.
- ② 트리톤 X-100은 계면활성제로 거품을 일으키므로 초음파세척기를 사용하여 용해시키거나 거품억제제를 첨가한다.

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 혈액은 혈액혼합기(Blood mixer)로 3분 정도 잘 섞어준 후 취한다. 혈액혼합기가 없는 경우는 거품이 나지 않게 주의하면서 천천히 튜브를 거꾸로 바로 번갈아 세워가며 내용물이 섞이게 한다.

(나) 검량선용 시료 전처리[표준물 첨가법]

매질변형시약 1.8 mL에 Pb 표준용액 0.1 mL, 정상인 혈액 0.1 mL를 가하여 잘 섞어 표준물 첨가법에 의한 검량선용 시료로 한다(표 2).

<표 2> 표준물 첨가법에 의한 검량선 작성

시료번호	희석액 (mL)	혈액 (mL)	Pb 표준용액 (용액번호)	(mL)	혈액 중 납 농도 ($\mu\text{g/dL}$)
첨가 0	1.8	0.1	0	0.1	x + 0
첨가 1	1.8	0.1	1	0.1	x + 10
첨가 2	1.8	0.1	2	0.1	x + 30
첨가 3	1.8	0.1	3	0.1	x + 50
첨가 4	1.8	0.1	4	0.1	x + 70

(x는 공시료 혈액에 이미 포함되어있는 납의 양으로, 검량선의 x절편 값에 해당한다.)

(다) 시료 전처리

매질변형시약 1.8 mL에 탈이온수 0.1 mL, 시료 혈액 0.1 mL를 가하여 잘 섞어 분석용 검체로 한다.

(4) 흑연로 원자흡광광도계 분석 조건

(가) 방법 선택

- ① 기기모드(Instrument mode) : 흡광도(Absorbance)
- ② 검량선작성모드(Calibration mode) : 표준첨가물(Standard addition)
- ③ 측정모드(Measurement mode) : 피크 높이(Peak height)

(나) 기기 인자(Instrument parameters)

- ① 램프전류(Lamp current) : 5 mA
- ② 슬릿너비(Slit width) : 0.5 nm
- ③ 슬릿높이(Slit height) : Normal
- ④ 파장(Wavelength) : 283.3 nm
- ⑤ 시료주입(Sample introduction) : 시료사전혼합모드(Sampler premixed)
- ⑥ 바탕보정(Background correction) : 켜짐(ON)
중수소(D_2) 또는 지만(Zeeman) 보정

(다) 주입부 인자(Sampler parameter)

시료주입량(Sample volume) : 15 μL

(라) 바탕 보정

매질변형시약(Matrix modifier solution)으로 기기 영점(Instrument zero)을 잡고 측정한다.

(마) 흑연로 조건

흑연로 조건은 사용하고 있는 기기의 매뉴얼을 참고하여 최적 조건을 찾아야 한다(표 3).

<표 3> 혈액 중 납 분석을 위한 원자흡광광도계 흑연로 조건(예시)

처리과정	온도(℃)	시간(s)	아르곤 가스유속(mL/min)
건조	180	25	250
회화1	450	7	250
회화2	600	10	250
원자화	2200	2	0
튜브 열세척	2700	3	250

(예시조건 해당 장비 : Perkin Elmer AAnalyst 800)

(5) 농도계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고 시료의 피크 면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 납의 농도($\mu\text{g/dL}$)를 구한다.

(6) 생물학적 노출기준

- 기준값 : 30 $\mu\text{g/dL}$

(7) 정밀도(예)

	농도($\mu\text{g/dL}$)	변이계수(%) [*]
납	10.0	3.5

	20.0	3.1
	40.0	2.3

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(8) 정확도(예)

	농도(μg/dL)	회수율(%)*
납	10.2	117.2
	28.0	106.0
	53.0	92.3

(9) 검출한계

(가) 검출한계

예) 혈액 중 납 0.85 μg/dL(S/N 비 3)¹⁾

(나) 산출방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준 오차와 기울기를 이용하여 검출한계를 산출한다.

$$LOD = 3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum(Y_{ei} - Y_i)^2}{N-2}}}{b}$$

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값

Y_i : 각 시료량에 대한 반응값

N : 표준용액 시료 수

b : 회귀방정식의 x계수

5.2 소변 중 납

1) 배경 반응값(noise, N)의 3배인 시료 반응값(signal, S)을 나타내는 농도를 검출한계로 함.

5.2.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

납은 체내로 흡수된 후 흡수된 납의 75~80%가 소변으로 배출되며, 소변 중 납은 혈액 중 납과 마찬가지로 최근의 납 노출을 반영하지만, 직업적 노출이 시작된 후 2개월 이후부터 안정적인 값을 나타낸다. 소변 중 납은 납의 특정 흡수 과정에서 흑연로 원자흡광광도계로 분석한다. 소변은 복잡한 매질이므로 원자흡광광도계의 바탕보정이 필요할 뿐 아니라, 공시료에도 일정 농도의 납이 함유되어 있으므로 표준물첨가법(Standard addition method)에 의해 검량선을 작성하여 소변 중의 납을 분석한다.

(2) 시료의 채취

(가) 시료채취 시기

시료채취 시기는 특별히 제한하지 않는다.

(나) 시료채취 요령

- ① 채취 용기는 밀봉이 가능한 용기를 사용하고, 시료는 10 mL 이상 채취한다.
- ② 채취한 시료 용기를 밀봉하고 채취 후 5일 이전에 분석하며 4 ℃(2~8 ℃)에서 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리면 시료를 냉동보관용 저온바이알에 옮겨 영하 20 ℃이하에서 보관한다.

(다) 주의 사항

- ① 시료채취 시의 오염을 막기 위하여 작업 전 또는 작업 후에 작업복을 갈아입은 다음에 시료를 채취하도록 한다.
- ② 시료채취시는 비누로 손을 세척하도록 하며 시료를 채취한 바로 뚜껑을 막아서 가져오도록 한다.
- ③ 소변채취용 용기는 미리 20% 질산에 4시간 이상 담가두었다가 탈이온수로 5회 헹구어 사용한다.

5.2.2 흑연로 원자흡광광도계법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동피펫 100 - 1000 μL
- ② 용량플라스크 : 500 mL 2개, 100 mL 1개, 10 mL 4개, 5 mL 10개
- ③ 분취기(Dispenser) : 0.4 - 2.0 mL
- ④ 시험관
- ⑤ 혈액 혼합기

(나) 시약

- ① 납(표준시약, 1000 mg/L)
- ② 인산일암모늄($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)
- ③ 트리톤 X-100(TRITON X-100)
- ④ 질산 : 특급시약(검사관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ⑤ 탈이온수(18 M Ω /cm 이상)

(다) 주의 사항

- ① 사용하는 모든 초자기구는 20% 질산에 4시간 이상 담가두었다가 탈이온수로 5회 헹구어 사용한다.
- ② 원자흡광광도계는 흑연로 장치가 부착된 중수소(D_2) 램프 보정방식의 기기 또는 지만(Zeeman)보정 방식의 기기를 사용한다. 흑연튜브는 열분해 분획관(Pyrolytic coated partitioned tube)을 사용한다.
- ③ 탈이온수는 초순수제조장치로 제조한 비저항 18 M Ω /cm이상의 것을 사용하거나 원자흡광광도계용 탈이온수를 구입하여 사용한다.
- ④ 트리톤 X-100, 인산일암모늄, 1000 mg/L Pb 표준시약과 질산은 특급시약을 사용하되 최초 개봉일로부터 3년 이내의 것을 사용하도록 하며, 초과 시는 새로운 시약과 비교실험을 실시하여 오차가 10% 이내일 경우, 1년간 연장 사용할 수 있다.
- ⑤ 산을 취급할 때는 보호안경, 장갑, 마스크를 착용 후 후드에서 작업한다.

(2) 시약 조제

(가) 검량선용 표준용액 조제

- ① 납 1000 mg/L 표준시약 1 mL를 2% 질산용액으로 100 mL로 희석하여 납 10000 µg/L 표준용액 원액(Stock solution)을 만든다.
- ② 납 10000 µg/L 표준용액 원액을 <표 4>와 같이 2% 질산용액으로 희석하여 납 100, 200, 300, 400 µg/L의 표준용액을 만든다.

<표 4> 검량선용 표준용액 조제방법

표준용액 번호	Pb 표준용액 농도 (µg/L)	조제법	
		표준용액 원액 (mL)	2% 질산용액
0	0	0	2% 질산용액
1	100	0.1	10 mL 표선 채움
2	200	0.2	"
3	300	0.3	"
4	400	0.4	"

(검량선에 사용되는 표준물질의 농도는 검체 결과가 검량선 범위에 들어가도록 자유롭게 정할 수 있다)

(나) 매질변형시약의 조제

500 mL의 용량플라스크에 약 400 mL의 탈이온수를 넣고 20% 인산일암모늄 25 mL와 진한 질산 1 mL를 가한 후 탈이온수로 표선을 맞춘다.

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 검량선용 소변 전처리[표준물 첨가법]

<표 5>와 같이 매질변형시약 0.8 mL에 Pb 표준용액 0.1 mL, 정상인 소변 0.1 mL를 가하여 잘 섞어 표준물 첨가법에 의한 검량선 작성용 시료로 한다.

<표 5> 표준물 첨가법에 의한 검량선 작성

시료번호	희석액 (mL)	소변 (mL)	Pb 표준용액 (용액번호) (mL)		소변 중 납 농도 ($\mu\text{g/L}$)
첨가 0	0.8	0.1	0	0.1	$x + 0$
첨가 1	0.8	0.1	1	0.1	$x + 100$
첨가 2	0.8	0.1	2	0.1	$x + 200$
첨가 3	0.8	0.1	3	0.1	$x + 300$
첨가 4	0.8	0.1	4	0.1	$x + 400$

(x는 공시료 소변에 이미 포함되어있는 납의 양으로, 검량선의 x절편 값에 해당한다.)

(나) 시료 전처리

- ① 소변은 상온에서 녹이고 혈액혼합기(Blood mixer)로 3분 정도 잘 섞어준 후 취한다. 혈액혼합기가 없는 경우는 거품이 나지 않게 주의하면서 천천히 튜브를 거꾸로 바로 번갈아 세워가며 내용물이 섞이게 한다.
- ② 소변을 <표 5>의 첨가 0과 같이 희석하고, 이 용액을 15 μL 취하여 원자흡광광도계의 흑연로에 주입한다.

(4) 흑연로 원자흡광광도계 분석 조건

(가) 방법 선택

- ① 기기모드(Instrument mode) : 흡광도(Absorbance)
- ② 검량선작성모드(Calibration mode) : 표준첨가물(Standard addition)
- ③ 측정모드(Measurement mode) : 피크 높이(Peak height)

(나) 기기 인자(Instrument parameters)

- ① 램프전류(Lamp current) : 5 mA
- ② 슬릿너비(Slit width) : 0.5 nm
- ③ 슬릿높이(Slit height) : Normal
- ④ 파장(Wavelength) : 283.3 nm
- ⑤ 시료주입(Sample introduction) : 시료사전혼합모드(Sampler premixed)
- ⑥ 바탕보정(Background correction) : 켜(ON)
중수소(D_2) 또는 지만(Zeeman) 보정

(다) 주입부 인자(Sampler parameter)

시료주입량(Sample volume) : 15 μ L

(라) 바탕 보정

매질변형시약(Matrix modifier solution)으로 기기 영점(Instrument zero)을 잡고 측정한다.

(마) 흑연로 조건

흑연로 조건의 예는 <표 6>과 같다. 사용하는 기기의 매뉴얼을 참고하여 최적 조건을 찾는다.

<표 6> 소변 중 중 납 분석을 위한 원자흡광광도계 흑연로 조건(예)

처리과정	온도(°C)	시간(s)	아르곤 가스유속(mL/min)
건조	120	30	250
회화1	500	40	250
회화2	600	10	250
원자화	2300	3	0
튜브 열세척	2700	3	250

(예시조건 해당 장비 : Perkin Elmer AAnalyst 800)

(5) 농도계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고 시료의 피크 면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 납의 농도(μ g/dL)를 구한다.

(6) 생물학적 노출기준

- 기준값 : 150 μ g/L

(7) 정밀도(예)

	농도(μg/dL)	상대표준편차(%)
납	150	15
	450	

(8) 정확도(예)

	농도(μg/dL)	회수율(%)
납	150	108
	450	93

(9) 검출한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 납 15 μg/dL(S/N 비 3)²⁾

(나) 산출방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준 오차와 기울기를 이용하여 검출한계를 산출한다.

$$LOD = 3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum(Y_{ei} - Y_i)^2}{N-2}}}{b}$$

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값

Y_i : 각 시료량에 대한 반응값

N : 표준용액 시료 수

b : 회귀방정식의 x계수

2) 배경 반응값(noise, N)의 3배인 시료 반응값(signal, S)을 나타내는 농도를 검출한계로 함.

5.3 소변 중 델타아미노레불린산(δ -aminolevulinic acid)

5.3.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

납은 체내로 흡수된 후 델타아미노레불린산 탈수효소를 저해하여 혈액 중 델타아미노레불린산이 증가하고, 이는 소변으로 배출된다. 소변 중의 단백질을 20% 삼염화초산으로 침전시켜 제거하고, 델타아미노레불린산을 포름알데히드와 반응시켜 형광발색단을 띤 화합물을 형성시킨 후 액체크로마토그래프에서 델타아미노레불린산 유도체화물을 분리하여 형광검출기로 검출한다.

(2) 시료의 채취

(가) 시료채취 시기

시료채취 시기는 특별히 제한하지 않는다.

(나) 시료채취 요령

- ① 채취 용기는 밀봉이 가능한 용기를 사용하고, 시료는 10 mL 이상 채취한다.
- ② 채취한 시료 용기를 밀봉하고 채취 후 5일 이전에 분석하며 4 °C(2~8 °C)에서 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리면 시료를 냉동보관용 저온바이알에 옮겨 영하 20 °C 이하에서 보관한다.

5.3.2 고성능 액체크로마토그래피 형광검출법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동피펫 10 - 100 μ L, 200 - 1000 μ L, 500 - 2500 μ L
- ② 용량플라스크 100 mL 6개, 10 mL 6개
- ③ 원심분리용 폴리프로필렌 용기 1 mL
- ④ 마개달린 시험관 10 mL
- ⑤ 갈색병 50 mL

(나) 시약

- ① 델타아미노레불린산(δ -Aminolevulinic acid, δ -ALA)
- ② 삼염화초산(Trichloroacetic acid, TCA)
- ③ 아세틸아세톤
- ④ 에탄올
- ⑤ 포름알데히드
- ⑥ 메탄올(HPLC급)
- ⑦ 아세트산 나트륨(Sodium acetate)
- ⑧ 초산 : 특급시약
- ⑨ 탈이온수(18 M Ω /cm 이상)

(2) 시약 조제

(가) 검량선용 표준용액 조제

- ① 델타아미노레불린산 10 mg을 100 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 100 mg/L의 표준용액을 만든다.
- ② 100 mg/L의 표준용액을 20 mL 취하여 100 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 20 mg/L의 표준용액을 만든다. 이를 표준용액 원액으로 한다.
- ③ 표준용액 원액 2.5, 5.0, 7.5 mL를 취하여 10 mL 용량플라스크에서 탈이온수로 희석하여 델타아미노레불린산 5, 10, 15 mg/L의 검량선용 표준용액을 제조한다 (검량선에 사용되는 표준물질의 농도는 검체 결과가 검량선 범위에 들어가도록 자유롭게 정할 수 있다).

(나) 반응시약 조제

- ① 삼염화초산 20 g을 취하여 100 mL 용량플라스크에서 탈이온수로 희석하여 20% 용액을 만든다.
- ② 아세트산나트륨 1.641 g을 10 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 2 M 표준용액을 만든다. 초산 1.2 g(1.14 mL)을 10 mL 용량플라스크에 옮기고 탈이온수로 표선을 채워 2 M 표준용액을 만든다. 2 M 아세트산 나트륨 용액 1.25 mL와 2 M 초산용액 8.25 mL를 취하여 100 mL 용량플라스크에

웁기고 탈이온수로 표선을 채워 pH 3.8의 0.2 M 초산완충용액을 만든다.

- ③ 아세틸아세톤 30 mL, 에탄올 20 mL, 탈이온수 108 mL를 취하여 갈색병에 넣고 층이 갈라지지 않을 때까지 잘 섞는다. 이 용액을 시약 A로 한다.
- ④ 포름알데히드 8.5 g을 취하여 100 mL 용량플라스크에 웁기고 탈이온수로 표선을 채워 8.5%의 포름알데히드 수용액을 만든다. 이 용액을 시약 B로 한다.

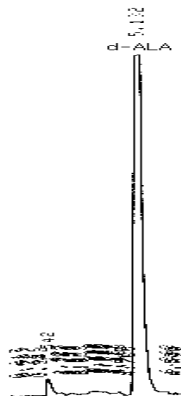
(3) 시료 및 표준용액 전처리

- (가) 소변 100 μ L를 취하여 원심분리용 폴리프로필렌용기에 넣고 와류혼합기에서 혼합하면서 50 μ L의 20% 삼염화초산 용액을 가한다. 내용물을 원심분리기에 서 15,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리한다.
- (나) 검량선용 표준용액 각 10 μ L를 취하여 시험관에 웁기고 탈이온수 240 μ L, 0.2M 초산완충용액 250 μ L, 시약 A 1.25 mL, 시약 B 250 μ L를 가한 후 잘 섞는다.
- (다) 원심분리후 침전이 분리된 용액중 10 μ L를 취하여 시험관에 웁기고 탈이온수 240 μ L, 0.2 M 초산완충용액 250 μ L, 시약 A 1.25 mL, 시약 B 250 μ L를 가한 후 잘 섞는다.
- (라) 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 식히고 나서 HPLC용 검액으로 한다.

(4) 액체 크로마토그래프 분석 조건

- (가) 컬럼 : C₁₈ 컬럼(150 mm x 2.1 mm, 입경 5 μ m)
또는 이와 동등한 수준으로 분리가 가능한 컬럼.
- (나) 이동상 : 탈이온수, 메탄올, 초산 50:50:0.1(v/v/v)
- (다) 유속 : 0.3 mL/분
- (라) 시료 주입량 : 10 μ L
- (마) 검출기 : 형광검출기
 - ① 여기파장(Excitation wavelength) : 373 nm
 - ② 방출파장(Emission wavelength) : 463 nm

(5) 분석 결과 크로마토그램 예



[그림 1] 델타아미노레불린산의 HPLC-FLD 크로마토그램

(6) 농도계산

검량선용 표준용액의 농도를 가로(x)축으로 하고 시료의 피크 면적을 세로(y)축으로 하여 검량선을 작성하고, $y=ax+b$ 의 회귀방정식에 시료의 피크 면적을 대입하여 시료 중 포함된 델타아미노레불린산의 농도(mg/L)를 구한다.

(7) 생물학적 노출기준

- 기준값 : 5 mg/L

(8) 정밀도(예)

	농도(mg/L)	변이계수(%)
델타아미노레불린산	0.01	7.0
	0.5	5.0

(9) 정확도(예)

	농도(mg/L)	회수율(%)
델타아미노레불린산	0.01	87
	0.5	95

(10) 검출한계

(가) 검출한계

예) 소변 중 델타아미노레불린산 3 µg/L (S/N 비 3)³⁾

(나) 산출 방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준 오차와 기울기를 이용하여 검출한계를 산출한다.

$$LOD = 3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum(Y_{ei} - Y_i)^2}{N-2}}}{b}$$

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값

Y_i : 각 시료량에 대한 반응값

N : 표준용액 시료 수

b : 회귀방정식의 x계수

5.4 혈액 중 아연 프로토포르피린(Zinc protoporphyrin)

5.4.1 분석원리 및 시료채취

(1) 분석원리

납은 체내로 흡수된 후 조혈작용의 변화를 일으켜 혈액 내 프로토포르피린

3) 배경 반응값(noise, N)의 3배인 시료 반응값(signal, S)을 나타내는 농도를 검출한계로 함.

(protoporphyrin)을 축적시켜, 혈액 중 적혈구 프로토포르피린(erythrocyte protoporphyrin)과 아연 프로토포르피린(zinc protoporphyrin)을 증가시킨다. 아연 프로토포르피린은 혈액 중 납보다 느리게 변화하므로 납의 만성 영향 및 과거 노출 여부를 평가하는 지표로 사용할 수 있다. 아연 프로토포르피린은 특정 파장에서 형광을 내므로, 고유한 파장의 광을 조사하고 이 물질이 발하는 형광의 강도를 분광형광광도계로 측정하여 분석한다.

(2) 시료의 채취

(가) 시료채취 시기

시료채취 시기는 특별히 제한하지 않는다.

(나) 시료채취 요령

- ① 근로자의 정맥혈을 납이 포함되지 않은 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 또는 헤파린이 처리된 튜브와 일회용 주사기 또는 진공채혈관을 이용하여 채취한다.
- ② 채취한 시료 용기를 밀봉하고 채취 후 5일 이전에 분석하며 4 °C(2~8 °C)에서 보관한다. 단, 분석까지 보관 기간이 5일 이상 걸리면 시료를 냉동보관용 저온바이알에 옮겨 영하 20 °C 이하에서 보관한다.

5.4.2 분광형광광도계법

(1) 기구 및 시약

(가) 기구

- ① 자동피펫 10 - 100 μ L
- ② 용량 플라스크 500 mL, 100 mL, 50 mL, 10 mL
- ③ 마개달린 시험관
- ④ 혈액 혼합기
- ⑤ 와류 혼합기
- ⑥ 원심분리기

(나) 시약

- ① 아연 프로토포르피린(Protoporphyrin IX Zinc(II))
- ② 질산 : 특급 시약(검사 관련 중금속의 함량이 적은 것)
- ③ 에탄올 : 특급시약
- ④ 탈이온수(18 MΩ/cm 이상)

(다) 주의 사항

- ① 사용하는 모든 초자기구는 20% 질산에 4시간 이상 담가두었다가 탈이온수로 5회 헹구어 사용한다.
- ② 원자흡광광도계는 흑연로 장치가 부착된 중수소(D₂) 램프 보정방식의 기기 또는 지만(Zeeman)보정 방식의 기기를 사용한다. 흑연튜브는 열분해 분획관(Pyrolytic coated partitioned tube)을 사용한다.
- ③ 탈이온수는 초순수제조장치로 제조한 비저항 18 MΩ/cm이상의 것을 사용하거나 원자흡광광도계용 탈이온수를 구입하여 사용한다.
- ④ 트리톤 X-100, 인산일암모늄, 1000 mg/L Pb 표준시약과 질산은 특급시약을 사용하되 최초 개봉일로부터 3년 이내의 것을 사용하도록 하며, 초과 시는 새로운 시약과 비교실험을 실시하여 오차가 10% 이내일 경우, 1년간 연장 사용할 수 있다.
- ⑤ 산을 취급할 때는 보호안경, 장갑, 마스크를 착용 후 후드에서 작업한다.

(2) 시약 조제

(가) 검량선용 표준용액 조제

- ① 아연 프로토포르피린 표준시약 0.2 mg을 100 mL 용량 플라스크에 넣고 100% 에탄올로 표선을 맞추어 200 µg/dL 에탄올 용액을 조제한다. 이것을 표준용액 원액(Stock solution)으로 한다.
- ② 아연 프로토포르피린 200 µg/dL 표준용액 원액을 <표 7>과 같이 100% 에탄올로 희석하여 25, 50, 100, 200 µg/dL의 검량선용 표준용액을 만든다.

<표 7> 검량선용 표준용액 조제방법

표준용액 번호	ZPP 표준용액 농도($\mu\text{g}/\text{dL}$)	희석배율	용매
STD 1	25	1/8	100%
STD 2	50	1/4	에탄올
STD 3	100	1/2	
STD 4	200	1/1	

(검량선에 사용되는 표준물질의 농도는 검체 결과가 검량선 범위에 들어가는 범위에서 임의로 조정할 수 있다.)

(3) 시료 및 표준용액 전처리

(가) 혈액은 혈액혼합기(Blood mixer)로 3분 정도 잘 섞어준 후 취한다. 혈액혼합기가 없는 경우는 거품이 나지 않게 주의하면서 천천히 튜브를 거꾸로 바로 번갈아 세워가며 내용물이 섞이게 한다.

(나) 시료 전처리

- ① 산처리를 마친 15 mL 뿔족관(Conical tube)을 준비하여 <표 8>과 같이 시료와 표준물질을 넣는다.
- ② 30초 동안 시료를 혼합한다.
- ③ 3000 rpm 에서 5분간 원심분리한다.
- ④ 상층액만 석영셀에 넣어 흡광도를 측정한다.

<표 8> 시료주입 방법

(단위 : mL)				
순서	물질	공시료	표준물질	시료
1	혈액	-	0.1	0.1
2	탈이온수	0.6	0.5	0.5
3	진한 염산	5.0	5.0	5.0
총 부피		5.6	5.6	5.6

(다) 분석 과정

- ① 석영셀에 탈이온수를 넣어 S/N Ratio를 확인하고 바탕선과 파장을 확인한다.

- ② 석영셀에 100% 에탄올을 넣은 후 Auto zero로 하여 바탕선을 안정화시킨다.
- ③ 탈이온수, 100% 에탄올, 표준물질, 시료 순으로 석영셀에 넣어 흡광도를 측정한다.

(4) 분광형광광도계 분석 조건

- ① 여기파장(Excitation wavelength) : 415 nm
- ② 방출파장(Emission wavelength) : 590 nm

(5) 농도 계산

(가) 표준물질 조제시 희석배수를 입력하므로 출력값에 희석배율이 반영되어 나오며, 이 값에서 공시료값을 빼어 보정한다.

예) 시료 분석값 : 25.4 µg/dL

공시료 값 : 1.4 µg/dL → 최종 결과 : $25.4 - 1.4 = 24.0$ µg/dL

(나) 단, 별도로 추가 희석을 하였다면 이를 계산과정에 반영한다.

(6) 생물학적 노출기준

- 기준값 : 50 µg/dL

(7) 정밀도(예)

	농도(µg/dL)	변이계수(%)*
	29	4.4
아연 프로토포르피린	65	3.2
	172	1.7

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(8) 정확도(예)

	농도(μg/dL)	회수율(%)*
	29	93
아연 프로토포르피린	65	94
	172	99

* 같은 농도의 시료를 6개 분석한 결과로부터 구함.

(9) 검출한계

(가) 검출한계

예) 혈액 중 아연 프로토포르피린 0.15 μg/dL (S/N 비 3)⁴⁾

(나) 산출 방법

검량선에 의한 표준용액의 농도와 면적간의 회귀식을 구하고 이 회귀식의 표준 오차와 기울기를 이용하여 검출한계를 산출한다.

$$LOD = 3 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum(Y_{ei} - Y_i)^2}{N-2}}}{b}$$

Y_{ei} : 회귀식에 의해 구한 각 시료량에 대한 반응값

Y_i : 각 시료량에 대한 반응값

N : 표준용액 시료 수

b : 회귀방정식의 x계수

4) 배경 반응값(noise, N)의 3배인 시료 반응값(signal, S)을 나타내는 농도를 검출한계로 함.