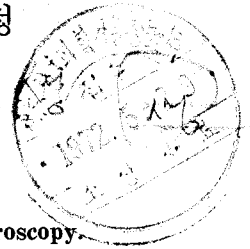


원자흡광분광분석법에 의한 혈청 Zn의 측정

서울대학교 의과대학 생화학교실

채범석 · 석영건 · 박동수



Direct Determination of Serum Zinc by Atomic Absorption Spectroscopy

Bum Suk Tchae, M.D., Young Gunn Suk, M.D. Tong Soo, Park, M.D.

Department of Biochemistry College of Medicine Seoul National University Seoul, Korea

=Abstract=

Zinc is an essential trace element. Previous methods for the determination of zinc in serum have been difficult and reported findings must be treated with caution. The normal range of zinc in serum varies significantly according to different methods and author.

The scope of this work was to establish the normal range of zinc in serum values in healthy Korean persons.

Methods are described for the determination of zinc in serum diluted ten-fold with deionized water using Hitachi Model 207, atomic absorption spectrophotometer. The values of zinc in serum of 23 healthy Korean persons by atomic absorption spectroscopy ranged from 87.6 to 131.2 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ with the mean value 109.1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ and standard deviation 10.86.

In this method, satisfactory result was obtained with regard to the coefficient variation and recoveries of added zinc in the measurements.

아연(Zn)은 생체의 성장과 건강에 있어서 필수요소이다. Zn은 일반적으로 식이중에 충분히 있으나 어떤 원인으로 그 섭취가 제한되면 Zn 결핍증이 생긴다.

가공한 낙화생가루로 사육한 돼지는 parakeratosis 란 결핍증이 되며, 이는 사료에 0.02% Zn CO₃을 섞어준 즉 쉽게 치료되었다고 한다²⁾. 사람에서의 Zn 결핍증은 Prasad³⁾,³⁾등 및 Eminians⁴⁾등이 에집트와 이란의 어떤 지방에서 각각 식이중의 Zn 결핍으로 빈혈, hypogonadism, hepatosplenomegaly, 및 dwarfism 이되었다고 보고하였으며, Sanstead⁵⁾는 또한 Kwashiorkor 와 Zn 결핍증은 어떤 관계가 있다고 하였다.

Zn은 생체내 여러가지 무기질중에서도 양적으로 미량이며, 그 분석방법^{6,7)}에 있어서도 정확성 및 재현성 등에 여러가지 난점이 있다. 생체물질중의 Zn의 측정 방법은 현재 여러가지 방법이 있으나 비색법^{8~12)}은 그 조작이 복잡하고 오염 등에 의한 오차가 심하다. 1955년 A. Walsh¹²⁾등에 의해서 원자흡광분광분석법(atomic absorption spectroscopy, A.A.S.)이 도입되어, 생체내 미량금속의 분석에 관한 연구는 급속하게 발전되었으며 최근 여러 분야에서 Zn의 측정이 용이하게, 또한

정확하게 되었다. A.A.S.에 의한 Zn의 측정법^{14~17)}은 임이 여러가지 보고가 있으나 대부분이 제단백법, 추출법 및 표준첨가법등이며 이들 방법은 그전처리 조작이 힘들고 시간이 걸리며 또한 조작중의 오염의 염려가 있으므로, 저자는 직접희석법으로 혈청 Zn 측정법의 확립과 표준화를 위해서 건강한 한국인의 정상치를 Hitachi Model 207 A.A.S.로 측정하여 보고한다.

실험방법

I. 측정장치 및 조건

원자흡광분광기는 Hitachi Model 207을 사용하였으며 측정조건은 다음표 1와 같다.

Table 1. Operating Conditions (Hitachi Model 207)

Air flow rate: 13 l/min	Wavelength: 213.8 mm
Acetylene rate: 3 l/min	Aspiration rate: 6 ml/min
Slit width: 0.81 mm	Burner: Premix type
Lamp Current: 10 mA.	Recorder: Hitachi QPD 54

II. 시 약

1) Deionized water:

실험에 사용한 물은 모두 deionized water 를 사용하였으며, 증류수를 deionizer 에 통과시켰다.

2) Salt solution

혈청무기질성분과 비슷한 염용액을 표 2 와 같이 만들어 Zn 의 표준액을 희석하는데 사용하였다

Table 2. Salt Solution.

NaCl	5.08 g
KCl	2.86 g
CaCO ₃	0.312 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	0.418 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.09 g
H ₂ SO ₄ Conc	0.67 ml
HCl Conc	8.7 ml
deionized water	100 ml

3) Stock Zn Solution (1 mg/ml Zn)

순도 99.99%의 금속 Zn 을 줄로 잘아 0.5g 을 평량하여 약 4.7 ml Conc HCl 에 녹인후 deionized water 로 500 ml 까지 채운다.

4) Working Zn Solution (0.01 mg/ml Zn)

Stock Zn Solution 을 deionized water 로 1 : 100 으로 희석하여 Standard Curve 를 만드는데 사용한다.

III. Standard Curve 작성

Table 3. Preparation of Standard Curve (Zn)

Test tube	1	2	3	4	5	Bck
0.01 mg/ml Zn	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	0.00
Salt Solution	49.50	49.00	48.50	48.00	47.50	50.00
ug/ml Zn	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.00

표 3 와 같이 각용액을 500 ml volumetric tlarck 에 넣고 염용액으로 채워서 표준곡선을 만들면 이 값은 혈청 1 : 10 으로 희석한때의 Zn 의 값이된다.

IV. 조작 및 계산

미리준비한 시험관에 syringe pipet 로 deionized water 1.80 ml 를 넣고 용혈되지 않은 혈청을 0.2 ml 를 각각 시험관에 넣고 parafilm 으로 막은 다음 잘 섞어서 측정정에 사용한다.

계산은 표 3 과 같이 만든 표준용액을 동시에 측정하

여 표준곡선 에서 계산한다.

실험성적 및 고찰

1) 혈청의 정상치

A.A.S. 으로 측정한 건강인 23 명의 혈청 Zu 의 정상치는 $109.1 \pm 10.86 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($87.6 \sim 131.2$) 였다. 여러 보고자의 혈청 Zu 의 정상치는 표 4 와 같으며, 종래의 화학적 방법과 비교하면 A.A.S. 법이 약 $20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 가량 낮으며 같은 A.A.S. 법에 의한 보고도 연구자에 따라서 또는 보고연대에 따라서 큰 차이가 있다.

Table 4. Normal Ranger of Zinc in Serum According to Different Methods and Authors.

Reference	Year of publiution	Method	No. of person	Serum Zu ug/100ml
Wolff ¹⁸⁾	1956	Dithizon	108	129 ± 14.2
Prasadetal ¹¹⁾	1963	Dithizon	91	102 ± 13
Fuwa ¹⁹⁾	1964	"	4	$210(52 \sim 143)$
Prased et al. ¹⁷⁾	1965	A.A.S.	14	104 ± 14
Davies et al. ²⁰⁾	1968	A.A.S.	30	95 ± 13 (♂) 96 ± 10.5 (♀)
Withers teal ²¹⁾	1968	A.A.S.	25	110 ± 21
Darvson ¹⁶⁾	1969	A.A.S.	10	$98(80 \sim 132)$ ♂ $96(83 \sim 117)$ ♀
Tchai et al.	1971	A.A.S.	23	109.1 ± 10.86

Zn 의 화학적 정량법은 일반적으로 전처리로서 주출 처리가 필요하며 회화후(ashing), 유기용매로 세척하든지 또는 T.C.A. 등으로 침전을 만들어서 단백질이나 방해물질을 제거하는 조작이 필요하다.

이 방법은 일반적으로 시간이 걸리며, 고도의 분석 기술이 필요한 것이다. A.A.S. 법의 장점은 신속성 및 정확성에 있는 것이다. 그 신속성은 예비조작, 기기의 조정, 표준곡선의 작성에 30분정도가 필요하나 검체 자체의 측정에는 불과 수초밖에 걸리지 않는다. 또한 정확성에 있어서는 1 ml 중에 0.1~0.3의 Zn 이 간섭물질의 존재하에서 99% 이상의 정확도를 갖고 있는 것이다

또한 전처리로서 직접희석 법으로 Zn 을 측정하면 단지 deionized water 로 10배 희석하는 것으로 그치며 이 조작도 syringe pipet 나 autodilutor 를 사용하면 보다 더 단시간내에 정확하게 희석되며 회화, 주출등에 의한 또는 시약에 의한 오염이 적어지게 된다.

2) 재현성 및 회수율

같은 혈청으로 10 회 측정하여 그 재현성을 본결과

105.6±2.1 ug/100 ml로서 C.V.는 2.89%였으며 표준 Zn 용액을 첨가하였을 때 그 회수율은 100.28±1.38%였다.

Dithizone 법에서는 95% 이상의 회수율을 얻기 위해서는 상당한 수련을 쌓아야 된다.

결 론

원자흡광분광분석법으로 혈청 Zn 측정법의 확립과 표준화를 위해서 Hitachi Model 207 원자흡광분광기를 사용하여, 혈청을 직접 회석법에의 한정 량법을 검토하였다.

혈청 Zn의 정상치는 109.1±10.86 ug/100 ml(87.6~131.2)이며 회수율(100%) 및 재현성(2.89%)은 대단히 좋았으며 미량금속인 //의 정량에 임상검사로써 사용할 수 있는 방법이라고 생각한다.

REFERENCES

- 1) Tucker, H.F., and Salmon, W.D.: *Parakeretosis or zinc deficiency disease in the pig. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 88, 613-616(1955).
- 2) Prasad, A.S., Miale, A. Jr., Z., Sanstead, H.H. M. Schulert, A.R., and Darby, W.F.: *Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. Arch. Internal Med.* 111, 407-428 (1963).
- 3) Prasad, A.S., Sanstead, H.H., Schulert, A. R., and El Rooby, A.S.: *Urinary excretion of zinc in patients with the syndrome of anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. J. Lab. Clin. Med.* 62, 591-599 (1963).
- 4) Eminians, J., Reinhold, J. G., Kefonry, G.A., Amirhakini, G.H., Sharif, H., Ziai, M., and Kamal, D.: *Zinc nutrition of children in Fars province of Iran. Am. J. Clin. Nutr.* 20, 734-742 (1967).
- 5) Sanstead, H.H., Shukry, A.S., Prasad, A.S. Gabr, M.K., El Hefney, A., Mokhtar, N., and Darby, W.J.: *Kwashiorkor in Egypt. 1. Clinical and biochemical studies with special reference to plasma zinc and serum lactic dehydrogenase. Am. J. Clin. Nutr.* 17, 15-26 (1965).
- 6) Zettner, A.: *Principles and Applications of Atomic Absorption Spectroscopy, Advanc. clin.Chem.* 7:1-62 (1964).
- 7) D. Mikac-Devic: *Methodology of zinc determinations and the role of zinc in biochemical processes, Advanc. clin. Chem.* 13:316, 1970.
- 8) Helwing, H.L., Hoffer, E. M.m Thielen, W.C., Alcocer, A.E., Hotelling, D.R., and Rogers, W. H.: *Modified zinc analysis method and serum and urinary zinc levels in control subjects. Am. J. Clin. Pathol.* 45, 160-165 (1966).
- 9) Kagi, J.H.R., and Vallee, B.L.: *Determination of zinc by direct extraction from urine with diphenylthiocarbazon. Anal. Chem.* 30, 1951-1954 (1958).
- 10) Kahn, A. M., Helwing, H.L., Redeker, A.G., and Reynolds, T.B.: *Urine and serum zinc abnormalities in disease of inver. J. Clin. Pathol.* 44, 426-435 (1965).
- 11) Prasad, A.S., Miale, A. Jr., Farid, Z., Sanstead, H.H., and Schulert, A.R.: *Zinc metabolism in Patients with syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. J. Lab. Clin. Med.* 61, 537-549 (1963).
- 12) Vallee, B.L., and Gibson, J.G.: *An improved dithizone method for the determination of small quantities of zinc in blood and tissue samples. J. Biol. Chem.* 176, 435-443 (1948).
- 13) Walsh, A.: *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. Spectrochim. Acta* 7, 108-117 (1955).
- 14) Girard, M.I.: *Probleme du dosage du cuivre et du zinc par absorption atomique. Clin. Chim. Acta* 20, 243-260 (1968).
- 15) Willis, J.B.: *Atomic absorption spectroscopy. Methods Biochem. Anal.* 11, 1-68 (1963).
- 16) Dawson, J.B., and Walker, B.E.: *Direct Determination of zinc in whole blood, plasma and Urine by Atomic Absorption Spectroscopy, Clin. Chim. Acta* 26, 465-475 (1969).
- 17) Prasad, A.S., Oberleas, D., and Halsted, J.A.: *Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. J. lab. Clin. Med.* 66, 508-

516 (1955).

- 18) Wolff, H.: *Untersuchungen zur pathophysiologie des zinkstoffwechsels.*, *Klin. Wochr.* 34, 409-418 (1956).
- 19) Fuwa, K., Pulido, P., Mckay, R., and Vallee, B.L.: *Determination of zinc in biological materials by stomic absorption spectrophotometry.* *Anal. Chem.* 36, 2407-2411 (1964).
- 20) Davies, I.J., Musa, M., and Dormandy, T.L.: *Measurements of plasma zinc. Part. I. In health and disease.* *J. Clin. Pathol.* 21, 359-365 (1968).
- 21) Withers, A.F.D., Baker, H. Musa, M., and Dormandy, T.L.: *Plasma zinc in psoriasis.* *Lancet* 11, 278-278 (1968).