韓國環境衛生學會誌
Kor. J. Env. Hlth. Soc.
Vol. 2 No. 1 49~51, 1975

分光光度法에 의한 血中一酸化炭素의 測定에 관한 硏究

국립과학수사연구소

鄭 根 鎬

A Study on the Determination of Carbon monoxide in the Blood by Spectrophotometry

Keun Ho Chung

National Institute of Scientific Investigation

=Abstract=

The accidents, homicides and suicides of carbon monoxide poisoning to increase in number every year are required precise, accurate, and rapid method for the determination of carbon monoxide in the blood samples. Here is the basis of this method for the determination of percentage saturation of hemoglobin by carbon monoxide which have found out to be suitable in laboratory as follows: A 0.1ml of blood is mixed with 20ml of 0.1% ammonium hydroxide, and 20mg sodium hydrosulfite is added to convert oxyhemoglobin to reduction hemoglobin. The absorbance is measured at 538nm and 578nm, the measurement was carried out within ten minutes of addition of sodium hydrosulfate.

서 론

대기오염은 인간이 불을 발견한 이후부터 시작되었다고 한다[1].

일산화탄소는 탄소와 탄소질물질의 불완전 연소에 의하여 생성되며 우리나라처럼 난방 및 취사에 연탄이 이용되는 환경에는 일산화탄소에 의한 사고, 살인및 자살사건들이 매년 증가하는 추세에 비추어 당 연구소에서는 보다 정밀하고 정확하며 보다 더 빠른 측정방법이 연구되었으며 그 중 알카리법(Alkali method), 탄닌산법(Tannin acid method), 오산화요드법(Iodine pentoxide method), 살코우스키법(Salkowski method), 루브너법(Rubner method), 편산법(片山法), 염화파라디움법($PdCl_2$法), 반스라이크법(Van-Slyke method), 희석법(Dilution method), 피로탄닌산법(Pyrotannin acid method), 가스크로마토그라프법(Gaschromatography) 및 分光光度法(Spectrophotometry) 등의 실험을 각각 시도하고 비교 연구한 바 제각기 국한된 장단점을 발견했으며, 이중 희석법은 carboxyhemoglobin (CO-Hb)의 농도가 50% 이상일때는 좋은 측정방법이라고 생각되나, 시료가 미량이며 CO-Hb농도가 최소치 사량[3](40%) 이하일 때는 피로탄닌산법 및 희석법은 좋은 실험치를 얻을 수 없었다.

본 법에 응용된 측정원리는 혈액에 $Na_2S_2O_4$를 가하면 Oxyhemoglobin(O_2-Hb)과 메트혈색소(met hemoglobin)는 즉시 hemoglobin(Hb)로 전화되나 CO-Hb는 전화되지 않는다. 이때 Hb와 CO-Hb의 등흡광점에서 흡광도의 변화를 측정하는 것이며 본 방법은 CO-Hb 측정방법 중 가장 좋은 방법으로 생각되어 검토 보고하였다.

실 험 방 법

1. 시약 및 기기

(1) 0.1% NH_4OH

(2) $Na_2S_2O_4$

(3) H · COOH

(4) Conc H_2SO_4

(5) Spectrophotometer QV-50

2. 측정방법

(1) 혈액 0.1ml를 취하여 0.1% NH_4OH 20ml를 가하고 잘 섞은 다음 상층이 맑아지면 $Na_2S_2O_4$ 20mg을 넣고 10회 정도 전도(轉倒)혼합시켜 5분간 방치한 다음 분광광도계를 이용하여 검체관 및 맹검관에 시료및 대조액을 넣고 파장 538nm 및 578nm에서 각각의 흡광도를 측정한다.

(2) 맹검관에 사용한 대조액은 0.1% NH_4OH 20ml에 $Na_2S_2O_4$ 20mg을 넣고 10회 정도 전도혼합시켜 5분간 방치한다.

(3) 비색관은 $Na_2S_2O_4$ 20mg을 가한 후 10분 이내에 흡광도를 측정해야 한다.

3. 표준곡선 작성법

Van kampen법의 측정에 의하여 혈액 0.1ml를 0.1% NH_4OH 20ml에 희석한 후 잘 섞은 다음 상층이 맑아지면 20mg의 $Na_2S_2O_4$를 넣어 10회 정도 전도혼합하여 5분간 방치한 다음 Hb에 대한 등흡광점인 538nm 및 578nm에서 각각 흡광도비(OD^{538}/OD^{578})를 같은 시료를 사용하여 다섯번 구하고 그의 평균 흡광도비 1.10을 구하였다. 또 다른 다섯개의 시험관에는 농황산을 개미산으로 반응시켜 얻은 일산화탄소(CO)가스를 포화시켜 CO-Hb 100%를 만들어 전술한 바와 같은 방법으로 흡광도비를 다섯번 구하여 평균 흡광도비 1.52를 얻었다(Fig. 1).

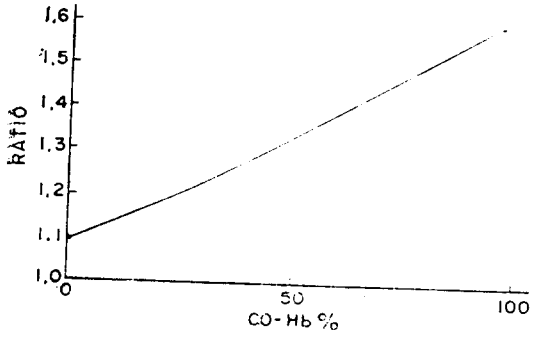

Fig. 1. Calibration curve of CO-Hb (Van Kampen)

실 험 성 적

1. Van kampen 표준곡선 작성법에 의하여 CO-Hb 0% 및 100%를 각각 이용하여 CO-Hb 0%, 20%, 40% 60%, 80%및 100%를 만든 시료의 흡광도비를 구한 실험치는 다음 Table 1과 같다.

Table 1. The ratio of the isobestic points for oxyhemoglobin and carboxy hemoglobin (Van Kampen)

CO-Hb 0% : CO-Hb 100%	CO-Hb%	OD^{538} / OD^{578}
0 : 10	100	1.52
2 : 8	80	1.43
4 : 6	60	1.35
6 : 4	40	1.26
8 : 2	20	1.19
10 : 0	0	1.10

2. 50% CO-Hb을 포함하도록 시료를 만들어 각 파장의 변화에 따른 흡광도를 구하여 그라프를 그리고 같은 시료에 $Na_2S_2O_4$를 넣어 파장의 변화에 따른 흡광도를 구하여 그라프를 그린 결과 O_2-Hb 및 CO-Hb과 Hb 및 CO-Hb의 등흡광점은 538nm 및 578nm에 있는 것을 알수 있었다(Fig. 2).

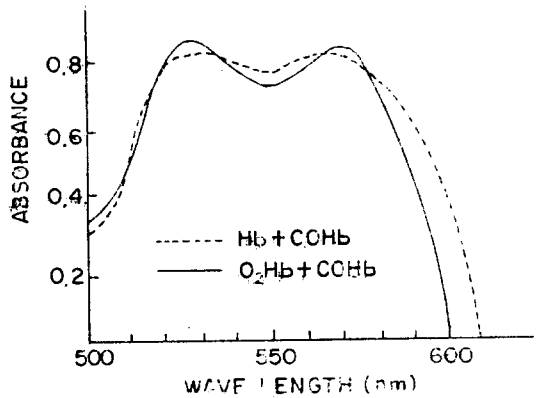

Fig. 2 Spectral absorbance curves of blood containing CO-Hb 50%, before and after treatment with $Na_2S_2O_4$.

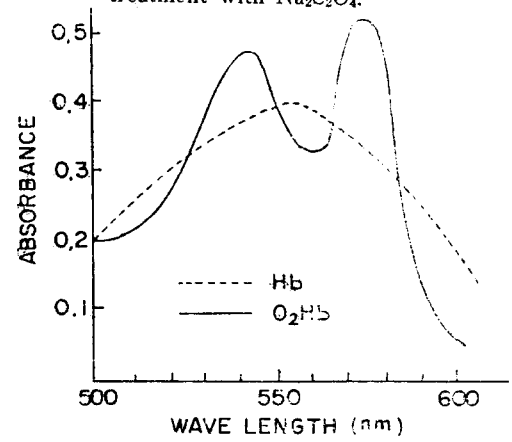

Fig. 3. Spectral absorbance curves of normal blood, before and after treatment with $Na_2S_2O_4$.

3. CO-Hb 0% 시료를 만들어 파장변화에 따른 흡광도를 측정하고 또한 동일 시료에 $Na_2S_2O_4$를 가하여 파장변화에 따른 흡광도를 측정하여 그라프를 그린 것은 다음과 같았다(Fig. 3).

고 찰

1. 해부소견으로 일산화탄소중독사는 비교적 용이하게 판단할 수 있으나, 보다 과학적인 실험실에서의 실험이 필요하며 오늘날 분광광도계는 대부분 실험실에 구비되어 있어 혈액 0.1ml의 시료를 가지고 CO-Hb 농도를 정밀하고 정확하며 빠르게 측정할 수 있다.

2. Fig. 2 및 Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 혈중 CO-Hb 및 혈중 O_2-Hb의 그라프는 두개의 극대점을 나타내나 $Na_2S_2O_4$를 넣으면 혈중 O_2-Hb은 환원되어 극대점이 하나인 그라프가 되는 것을 볼 수 있다.

결 론

1. 본 연구에 의한 분광광도법은 0.1ml혈액으로서 정밀하고 정확한 실험치를 빨리 얻을 수 있음을 알았다.

2. 본 법은 혈액 0.1ml을 0.1% NH_4OH 20ml에 희석하여 잘 섞은 다음 $Na_2S_2O_4$ 20mg을 가하고 10분 동안에 파장 538nm와 578nm에서 흡광도비를 측정하면 혈중일산화탄소(CO-Hb) 농도를 계산할 수 있다.

3. CO-Hb의 농도가 50% 이상일 때는 희석법(Dilution method)이 분광광도법에 비하여 정밀도 및 정확도는 못하나 훨씬 빨리 실험치를 얻을 수 있다.

참 고 문 헌

1) Thomas G. Ayles Worth: *The Air We Breathe, The Water We Drink* p.9~61.
2) 尹基殷, 蔡範錫, 鄭文植 : 分光光度計에 의한 혈중 일산화탄소 측정법에 관한 연구.
3) Sidney Kaye: *Handbook of Emergency Toxicology* p. 134~140.
4) Rovert H. Dreisbach : *Handbook of Poisoning* p. 183~185.
5) 金仁達, 尹德老 : 일산화탄소중독.
6) 鄭根錡, 서울시 대기중의 아황산가스(SO_2) 및 이산화질소(NO_2)에 관한 調査研究.
7) Sobotka, H. & Stewart, C.P.: *Advances in Clinical Chemistry Vol.* 8, 1965.
8) Huefner, G., quoted in L. Heilmeyer: *Spectrophotometry in Medicine, Adam Hilger, London,* 1943.
9) Gonsales, Vance, Helpern and Umberger : *Legal Medicine (Pathology & Toxicology)* p. 959.