

Ion Chromatography에 의한 血液中에서 陽ion의 分析에 관한 研究

朴聲雨 · 金恩浩 · 柳在薰 · 金乙煥*

국립과학수사 연구소 · * 서울보건전문대학

Studies on the Analysis of Cations by Ion Chromatography

Sung Woo Park · Fun Ho Kim

Jae Hwoun Yu · Eul Hwan Kim*

The National Institute of Scientific Investigation

** Seoul Health Junior College*

ABSTRACT

Many studies on the analysis of cations in blood have been reported. However, no suitable method for the pretreatment of blood for the determination of cations by Ion Chromatography.

As a result, pretreatment method that the membrane filtration of plasma a diluted 1 to 100 fold acidified pH 3.5 was found to be the most suitable.

The recoveris of monovalent cations in blood were yield 101%(Na⁺), 102%(NH₄⁺) and 101%(K⁺)

Determinations of divalent cations(Mg and Ca ions) in blood by Ion chromatography were summarized as followed conditions

Separator Column: CS₃, Suppressor Column: CMMS, Eluent concn : 25mM-HCl/2mM-Histidine, Regenerant concn: 40mM-Ba(OH)₂.

I. 서 론

1가 양이온(Na⁺, NH₄⁺, K⁺) 및 2가 양이온(Mg²⁺, Ca²⁺)의 이온들은 알칼리류, 염류, 화공약품류, 폭약류중 특히 사제폭약 및 완구류 기타 독성물질과 육수, 해수, 토양 등에 광범위하게 분포되어 있고 또한 각종사건 및 사고에 관련되므로 생체시료 폭발물질류, 환경오염물질류 등에서 범화학적으로 분석을 필요로 하고 있다.

이들 이온의 화학적 분석방법으로는 Ultraviolet Visible Spectroscopy¹, Atomic Absorption Spec-

trophotometry²⁻⁴, Ion Select Electrode⁵, Colorimetry, EDTA법 등 많은 방법이 이용되고 있으며 특히 除蛋白 生體試料中 前處理方法으로는 Folin-Wu法, Haden法, 과염소산 첨가법⁶, Acetonitrile 添加法⁶, 稀釋法⁶, 한외여과법^{6,7} 등이 있다.

저자들은 보다 간편하고 신속한 分析을 行하기 爲하여 Ion Chromatography⁸⁻¹¹를 이용하며 水溶液中에서 Eluent의 변화 등 양이온의 分析條件에 대한 검토의 血液中에서 陽性이온들이 첨가되지 않는 除蛋白 處理 方法인 Trichloroacetic Acid法, Somogyi-Nelson法, Acetonitrile 添加法, Mem-

brane Filter¹⁵에 의한 전처리 과정의 比較 검토, 試料의 pH변화시 定量方法을 檢討한 結果 Membrane Filter 法으로 Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 이온들을 定量할 수 있는 良好한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 試藥 및 裝置

- (1) 標準溶液의 調劑는 시판 特級試藥을 使用
- (2) Membran Filter : Sm 13200(Satorius Co.)
- (3) Ion Chromatography : Model 2020i (Dionex Co.)

2. 水溶液中에서의 양이온의 分析

(1) 1가 및 2가 양이온의 분리

양이온의 標準溶液은 NaHCO_3 : 3.6526g.

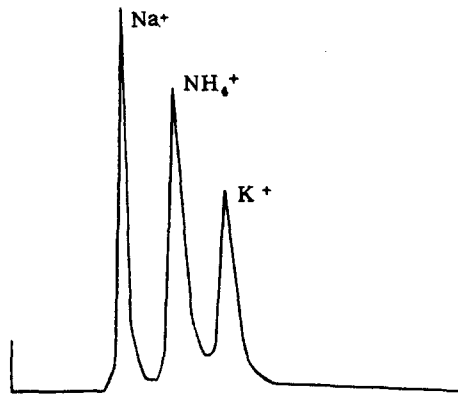


Fig. 1. Ion chromatogram of monovalent cations.

(Na^+ ; 20, NH_4^+ ; 30, K^+ ; 30 ppm)

$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 10.8777g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 6.178g을 탈이온수 100ml에 稀釋하여 10,000($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 용액을 各各 調劑한 다음 Na^+ 이온은 5, 10, 15, 20($\mu\text{g}/\text{ml}$), K^+ 및 NH_4^+ 이온은 5, 10, 20, 30($\mu\text{g}/\text{ml}$) Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이온은 各各 20($\mu\text{g}/\text{ml}$)을 實驗溶液으로 使用하여 Table 1의 Ion Chromatography 分析條件에서 分離實驗한 Chromatogram을 Fig. 1. 2에 나타냈고 또한 各 이온들의 檢量線은 Fig.3에 나타낸 것과 같이 各 Ion들

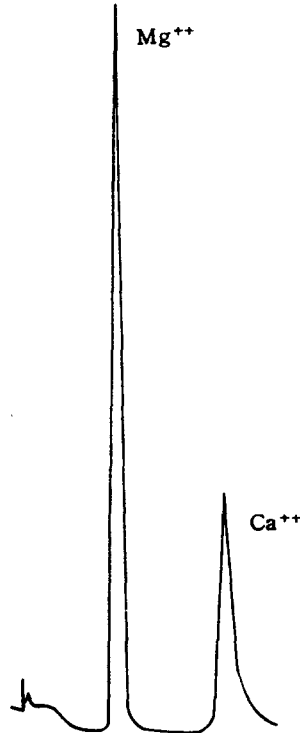


Fig. 2. Ion chromatogram of divalent cations.

(Mg^{2+} ; 20, Ca^{2+} ; 20 ppm)

Table 1. Ion chromatography conditions.

Condition	Ions	Monovalent cations	Divalent cations
System		HPIC	HPIC
Detector		Conductivity	Conductivity
Separator Column		CS ₁	CS ₁
Suppressor Column		CFS-1	CMMS
Eluent Conc.		5mM-HCL	25mM-HCL/2mM-Histidine
Regenerant Conc.		20mM-Ba(OH) ₂	40mM-Ba(OH) ₂
Injection volume (ul)		50	50

의 Correlation Coefficient는 $r=0.99$ 로 良好한 結果를 얻었다.

(2) Eluent 濃度變化에 따른 Elution Time의 變化

Mg^{2+} 과 Ca^{2+} 이온의 $20(\mu g/ml)$ 溶液을 使用하여 Ion Chromatography 溶離液의 濃度를 變化시켜 各 ion들의 적정한 Elution Time과 Sensitivity를 檢討키 爲하여 25mM-HCl 一定濃度에 Histidine의 濃度를 2, 4, 6, 8(mM)로 變化時와 2mM-Histidine의 一定濃度에 HCl의 濃度를 15, 25, 35, 40(mM)로 變化時의 Elution Time과 Sensitivity에 對한 結果를 Table 2에 나타내었다.

3. 血液中에서 陽 ion의 分析

試料로 使用한 新鮮한 人血을 5000rpm에서 원심 분리 후 血漿을 取하여 아래와 같은 除蛋白法에 依하여 처리한 溶液을 試驗溶液으로 하였다.

(1) 血液의 前處理方法

① Trichloroacetic acid法

5%-Trichloroacetic acid 9ml와 혈장 1ml을 Voltex Mixer를 使用 充分히 混合시킨 後 10分間 靜止한 다음 5000 rpm에서 원심분리한 후 上層液을 使用

② Somogyi-Nelson法

혈장 1ml을 증류수 5ml로 희석시킨 다음 0.3N-Ba(OH)₂용액 2ml을 添加後 Voltex Mixer로 混合한 다음 5000 rpm에서 원심분리한 후 上層液을 使用

③ Acetonitrile法

Acetonitrile 1ml에 혈장 1ml을 加한후 Voltex Mixer로 充分히 混合한 다음 5000 rpm에서 원심분리하여 上層液을 使用.

④ Membrane Filter法

혈장 1ml을 脫 ion水로 100倍 稀釋한 다음 IN-H₃PO₄로 pH 3.5로 調整한 후 Membrane Filter를 使用 여과한 여액을 시험용액으로 使用

(2) 혈장중에서 1價 陽 ion 回收率測定

양이온 표준용액으로 Na^+ , NH_4^+ , K^+ 이온이 각각 500, 1000, 2000, 3000($\mu g/ml$)가 되게 調整한 後 上記 標準液 1ml와 혈장 1ml을 各各 取하여 10倍 稀釋한 다음 실험 II-3(1)과 같은 方法으로 前處理을 하여 (100倍 稀釋) 이들 各各의 濃度는 Na^+ 이온 5, 10, 15, 20($\mu g/ml$) NH_4^+ 및 K^+ 이온 5, 10, 20, 30($\mu g/ml$)로 調整된 시험용액을 실험 II-2의 Ion Chromatography 分析條件 中 溶離液

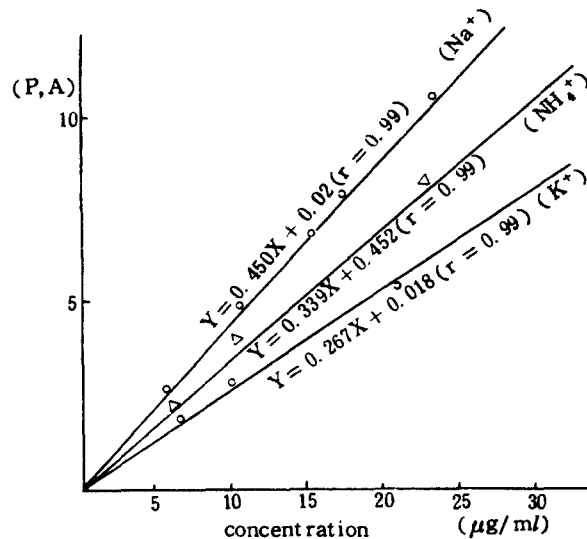


Fig. 3. Calibration curve of monovalent cations in aqueous solution by ion chromatography.

Table 2. Variation of elution time and sensitivity with eluent concentration.

Histidine concn. (mM)	25 mM-HCl constant				HCl concn. (mM)	2 mM-Histidine constant			
	Mg		Ca			Mg ⁺⁺		Ca ⁺⁺	
	Elution Time	Peak Area	Elution Time	Peak Area		Elution Time	Peak Area	Elution Time	Peak Area
2	10.1	5.7	19.5	4.5	15	13.9	6.6	27.8	4.9
4	6.0	5.0	11.0	4.4	25	10.1	5.7	19.5	4.5
6	4.6	4.1	8.0	4.3	35	8.7	5.5	16.4	4.4
8	3.8	3.9	6.4	4.1	40	7.5	5.3	14.0	4.1

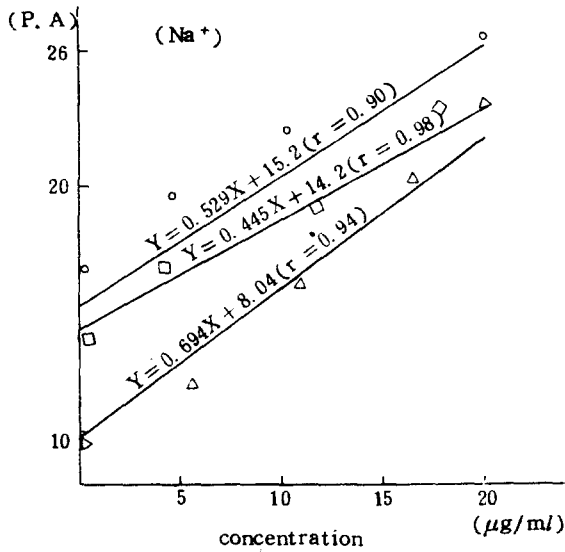


Fig. 4. Calibration curve of sodium ion in plasma.

- ; Trichloroacetic Acid 법
- △ ; Somogyi-Nelson 법
- ; Membrane Filter 법

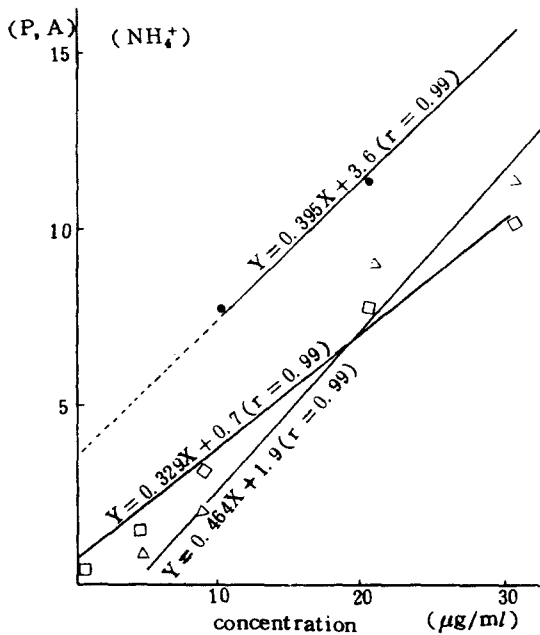


Fig. 5. Calibration curve of ammonium ion in plasma.

- ; Trichloroacetic Acid 법
- △ ; Somogyi-Nelson 법
- ; Membrane Filter 법

5mM-HCl에서 분석한 결과 Table 3에 각 前處理方法에 對한 回收率을 나타 내었고 또한 各 이온別 前處理方法에 따른 檢量線은 Fig.4,5,6에 나타 내 었다.

(3) pH 變化에 따른 양이온의 濃度變化

血液을 5000 rpm에서 원심분리한 다음 혈장을 取 하여 脫이온수로 100倍 稀釋한 다음 이 용액을 IN-H₃PO₄ 溶液으로 pH를 5.5, 4.5, 3.5, 2.5로 조절 한 후 Membrane Filter로 前處理를 하여 實驗 II-2 Ion Chromatographv 分析條件中 5mM HCl 溶離液에서 分析한 結果 Table 4에 各各의 pH別 含量을 나타내었다.

Table 3. Recovery of monovalent cations in plasma (%)

Pretreat-ment Ions	Trichloro-acetic Acid	Somogyi-Nelson	Membrane Filter
Na ⁺	103	65	101
NH ₄ ⁺	86	79	102
K ⁺	63	56	101

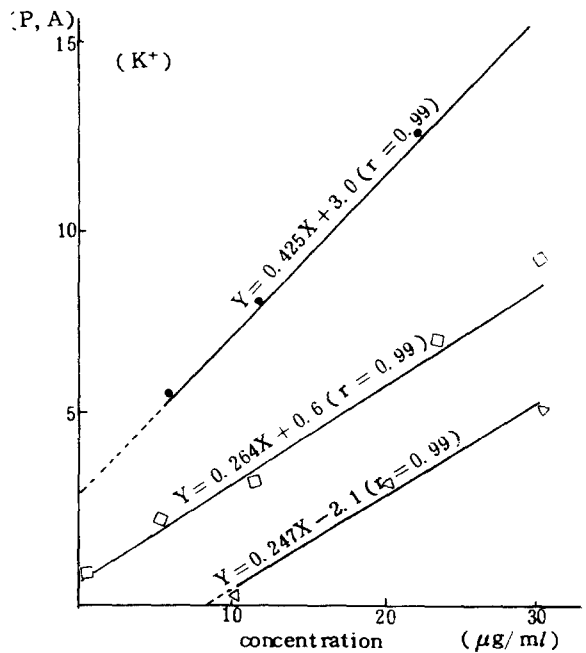


Fig. 6. Calibration curve of potassium ion in plasma

- ; Trichloroacetic Acid 법
- △ ; Somogyi-Nelson 법
- ; Membrane Filter 법

Table 4. Variation of cations concentration in plasma with pH. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

pH	Ions	Na^+	NH_4^+	K^+
7.4		2830	61	210
5.5		3090	64	220
4.5		3090	71	220
3.5		3150	63	230
2.5		3080	56	220

III. 結果 및 考察

1. 水溶液中에서 陽이온의 分離

Ion Chromatography에 의한 水溶液中에서 1價 陽이온 (Na^+ , NH_4^+ , K^+)은 Fig. 1에서와 같이 5mM-HCl 溶離液에서 Na^+ : 4.5分 NH_4^+ : 6.5分 K^+ : 8.6分으로 分離가 良好하였고 Fig. 3에서 보는 바와 같이 1價 陽이온(Na^+ , NH_4^+ , K^+)의 檢量線의 Correlation Coefficient 값은 $r=0.99$ 로 excellent linearity를 나타내었다.

2. Eluent 濃度變化에 따른 2價 陽이온의 Eluent Time 變化

2價 陽이온(Mg^{2+} , Ca^{2+})의 分析條件을 各各의 溶離液別로 試驗한 結果 Fig. 2에서 보는 바와 같이 25mM-HCl/2mM-Histidine 溶離液에서 Mg^{2+} : 10分, Ca^{2+} : 19.5分으로 分離條件이 가장 良好하였고 또한 Eluent濃度를 變化시킨 實驗結果 Table 2 및 Fig. 7에서 보는 바와 같이 Mg^{2+} , Ca^{2+} 이온은 Histidine과 HCl의 濃도가 增加할수록 Elution Time이 빨라지며 또한 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 의 Elution Time의 비율은 Histidine의 濃도가 增加할수록 1.93, 1.83, 1.74, 1.68로 減少하고 또한 HCl의 濃도가 增加할수록 2.00, 1.93, 1.88, 1.86로 減少하였다.

이와같은 傾向은 Diaminopropionic Acid HCl을 溶離液으로 使用할때와 같았다. 感度의 變化는 Table 2 및 Fig. 8에서 보는 바와 같이 Mg^{2+} , Ca^{2+} 이온은 濃도가 增加할수록 感度は 減少하였고 感度가 良好한 15mM-HCl/2mM-Histidine 溶離液에서는 Elution Time이 Mg^{2+} : 13.9分, Ca^{2+} : 27.8分이고 25mM-HCl/2mM-Histidine 溶離液에서는 Mg^{2+} : 10.1分, Ca^{2+} : 19.5分으로 前者는 Elution

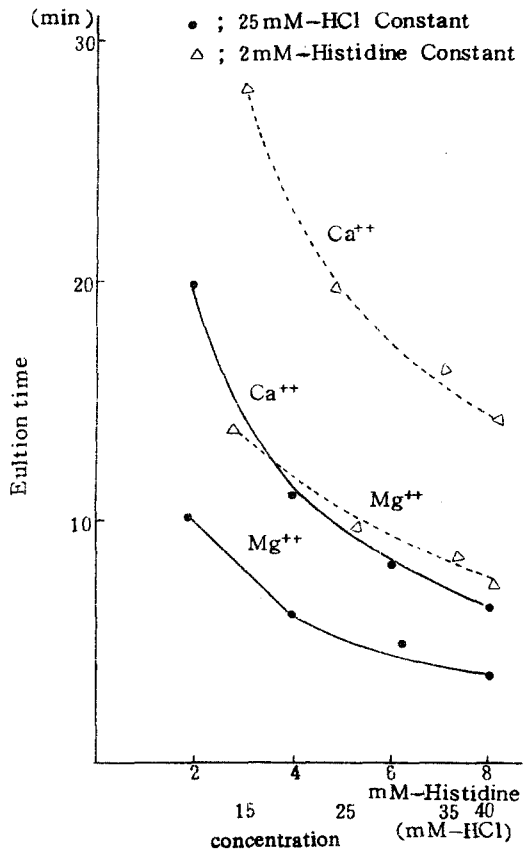


Fig. 7. Variation of elution time with eluent concentration.

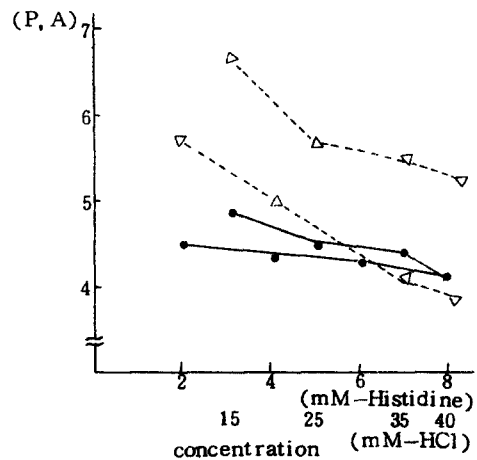


Fig. 8. Variation of sensitivity with eluent concentration (Δ : Mg^{2+} , \circ : Ca^{2+})

time이 너무 길므로 25mM-HCl / 2mM-Histidine을
擇하여 實驗하였다.

3. pH 變化에 따른 陽이온의 含量變化

Table 4 및 Fig. 9에서 보는 바와 같이 Na⁺와 K⁺
이온은 pH 3.5에서 가장 많이 檢出되었고 NH₄⁺
이온은 pH 4.5에서 가장 많이 檢出되었다.

이와같은 結果는 Na⁺이온과 K⁺이온이 pH 7.35~
7.45에서 혈장중의 90%가 遊離形이므로¹⁶⁾ pH 3.5
로 變化시켰을 때 遊離形과 結合形을 同時에 定量
한 結果로서 pH 3.5에서는 혈장중에 含有된 Na⁺
이온과 K⁺이온의 總량을 定量할 수 있다.

4. 血液中에서 陽이온의 回收變 測定

實驗 II-3-(2)에서와 같이 血液에 1價 陽이온
標準溶液을 含量別로 첨가하여 實驗 II-3-(1)과
같이 前處理를 한 후 回收率을 測定한 結果 Ace-
tonitrile첨가법은 除蛋白 效果가 적었고 Trichloro-
acetic Acid法, Somogyi-Nelson法, Membrane
Filter法에 對한 回收率은 Table 3, 檢量線은
Fig.4,5,6, Ion Chromatogram은 Fig. 10에 나타낸
結果를 檢討해 보면 Ion Chromatogram의 分離는
Fig. 10에서 보는 바와 같이 血液의 前處理 方法中
Trichloroacetic Acid法의 分離效果가 적어지는데
이는 pH의 영향인 것으로 思料되며 Membrane Fil-
ter法은 分離가 良好하였다.

Ion Chromatogram의 1價 陽이온의 感度는 Fig.
4,5,6에서 보는 바와 같이 혈장중에 Na⁺:20(μ
g/ml), NH₄⁺ 및 K⁺:30(μ g/ml) 첨가된 시료중
에서 Ion Chromatogram의 感度는 Somogyi-Nelson法
에서 Na⁺, NH₄⁺이온의 peak Area가 23.1, 11.6으로
良好하였으나 K⁺이온은 5.13으로 저하되었고
Membrane Filter法은 Na⁺, NH₄⁺, K⁺이온의 peak
Area가 19.0, 10.4, 8.5로 3種 이온을 동시 분리 정
량하는 조건으로 良好하였다.

1價 陽이온의 回收率은 Table 2와 Fig. 4,5,6에
서 보는 바와 같이 Na⁺이온은 Trichloroacetic Acid
法에서 103%, Membrane Filter法은 分離效果가
저하되며 NH₄⁺, K⁺이온은 Membrane Filter法에서
는 102%, 101%로 良好하였다.

이상과 같은 結果를 綜合해 보면 Membrane Fil-
ter法이 分離能 感度 및 回收率이 良好하며 이 方法
에 의한 혈장중에서 1價 陽이온 3種을 同時에 定量

한 結果 Na⁺이온의 含量은 3147 μ g/ml, NH₄⁺이온
은 63 μ g/ml K⁺이온은 228 μ g/ml이었다.

이들의 含量은 新谷英晴⁶⁾의 보고에는 Na⁺:3156
 μ g/ml, K⁺:152 μ g/ml이고 C. Anderson¹⁷⁾의 보

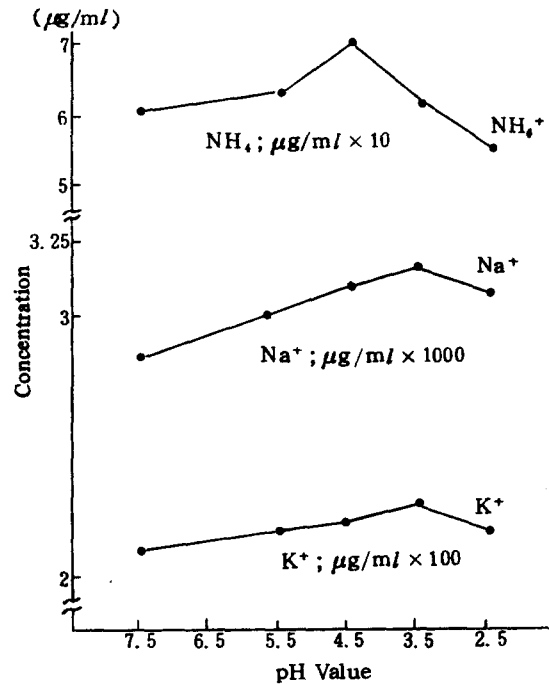


Fig. 9. Variation of concentration in plasma
with pH value

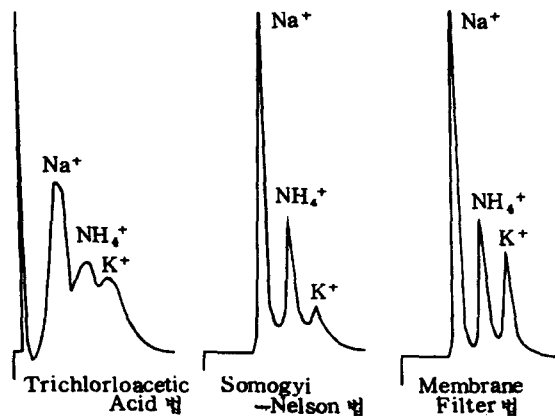


Fig. 10. Ion chromatogram of add monova-
lent cation in plasma by preparation
method

Na⁺: 20 μ g/ml NH₄⁺: μ g/ml
K⁺: 30 μ g/ml

고에는 Na^+ : 3450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, NH_4^+ : 288 $\mu\text{g}/\text{ml}$, K^+ : 625.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 한국생화학 편저 실험 생화학에서는 Na^+ : 3000~3500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, K^+ : 140~220 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 Membrane Filter법에 의한 함량과 일치 하였다.

IV. 結 果

1. 수용액중에서 양이온의分離는 1價 양이온(Na^+ , NH_4^+ , K^+)은 5mM-HCl 溶離液에서 Na^+ : 4.5分, NH_4^+ : 6.5分, K^+ : 8.6分으로 分離가 良好하였고 Correlation Coefficient $r=0.99$ 로 excellent Linearity를 나타내었으며 2價 양이온(Ca^{2+} , Mg^{2+})은 25mM-HCl/2mM-Histidine 용리액에서 Elution Time이 Mg^{2+} : 10.1分 Ca^{2+} : 19.5分으로 분리 및 감도가 良好하였다.

2. 血液中에서 양이온의 회수율을 측정한 결과 전처리 방법중 Membrane Filter법에 의한 회수율은 Na^+ : 101%, NH_4^+ : 102%, K^+ : 101%로 양호하였고 혈장중에서의 함량은 Na^+ : 3147 $\mu\text{g}/\text{ml}$, NH_4^+ : 63 $\mu\text{g}/\text{ml}$, K^+ : 228 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

3. 혈장을 $\text{IN}\cdot\text{H}_3\text{PO}_4$ 로서 pH 3.5로 조절한 경우 Na^+ 과 K^+ 이온이 가장 많이 검출되었고 pH 4.5에서 NH_4^+ 이온이 가장 많이 검출되었다.

참 고 문 헌

1) 丹羽政治等 : 人體成分의 サンプル링(批出

液) 3. 1972.

- 2) 鈴木等 : 原子吸光分析의 實際, 化學의 領域 100號, 1973.
- 3) 鼓原喜入郎 : 新醫療 10(10) 13, 1983.
- 4) Standard Methods 221, 230~231, 1981.
- 5) 石井暢 : 臨床病理 16, 659, 1963.
- 6) 新谷英晴等 : Bunseki Kagaku Vol. 33, 347-350, 1984.
- 7) 濱田昭等 : 最新裁判化學, 39, 1983.
- 8) D.C. Bogen et al : Ion Chromatogram. Anal Environ. pollut Vol. 2, 319-328, 1979.
- 9) Wolfgang Fichte et al. : Maschinenschaden 55(2), 81-83, 1982.
- 10) M.A. Fulmer et al. : Ion Chromatogram. Anal Environ. pollut, 381-400, 1979.
- 11) M. Legrand et al. : Anal. Chim. Acta 156, 181-192, 1984.
- 12) Munehiko Mizobuch, et al. : Zenkoku Kogaiken Kaishi, (7)2, 62-67, 1982.
- 13) Takahido Mizobuchi et al. : Nara-Ken Eisi Kenkyusho Nenpo 15, 52-55, 1981.
- 14) D.F. Pensentadler et al. : 53(7), 859A-860A, 862A, 864A, 866A, 868A, 1981.
- 15) Annual Report of N.I.S.I., 18, 246-253(1986)
- 16) 石井暢芽, "實驗動物とヒトの血液", 臨床化學檢査値集, 307-310, 1981.
- 17) C Anderson : Clin Chem. 22, 1424, 1976.