

# Ion Chromatography에 의한 血液中에서 양이온의 분석에 관한 연구

朴 成 雨 · 金 乙 煥\*

國立科學 搜查研究所  
\*서울 保健專門大學

## A Study on the Analysis of Cation in Blood by Ion Chromatography

Sung Woo Park · Eul Hwan Kim\*

*The National Institute of Scientific Investigation*  
\**Seoul Health Junior College*

### ABSTRACT

There are many pretreatment and detection methods for divalent cations in blood. But our purpose was to study the pretreatment of blood for the determination of cations by Ion Chromatography. We compared with recovery of  $Mg^{++}$ , and  $Ca^{++}$  contained in plasma according to four pretreatment methods, that is, add of trichloroacetic acid and perchloric acid, dilution with distilled water and membrane filter method.

As a result, add of trichloroacetic acid was found to be the most suitable method for good recovery of  $Mg^{++}$ (98.0%) and  $Ca^{++}$ (96.0%) in plasma, and the  $Mg^{++}$  and  $Ca^{++}$  contents in plasma was 20 and 102 ( $\mu g/ml$ )

### I. 서 론

$Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Sr^{++}$ , 및  $Ba^{++}$ 은 1가 양이온과 같이 알칼리 염류 화공약품류 특히 사제폭약류 육수, 해수, 토양 및 기타 독성물질 등에 광범위하게 분포되어 있고 또한 각종 사건과 사고에 관련되므로 생체시료 폭발물질 등에서 법화학적으로 분석을 필요로 하고 있다. 이들 이온의 분석은 한국환경위생학회지<sup>1)</sup>에 소개한 바와 같이 여러가지 분

석방법<sup>1-5)</sup>들이 이용되고 있고 또한 Ion Chromatography(I.C)에 의한 2가 양이온의 분석방법으로 HPIC-CS<sub>3</sub> Column으로 25mM-HCl/2mM-Histidine·HCl용리액에서  $Mg^{++}$ :10.1분  $Ca^{++}$ :19.5분 이었으나 HPIC-CS Column으로 2mM-HCl/2mM-m, phenylenecliamine·2HCl용리액을 사용하여 보다 신속히  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Sr^{++}$  및  $Ba^{++}$ 을 분석하고자 하였으며 이 조건에서는  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$ 의 분석조건시 용리액만을 변화시킨 것이며 또한 혈액의 전처리방법에 의하여도 검

토하였다. 그러므로 저자는 I.C.<sup>7-13)</sup>를 이용하여 혈액중에서 보다 간편하고 신속한 분석을 행하기 위하여 목적이온들이 첨가되지 않은 단백질제거법인 Green Wald법<sup>14)</sup>, Neuberg법<sup>20)</sup>, Dilution법<sup>15)</sup>, Membrane filter법<sup>1,16,17)</sup>에 의한 전처리 방법들을 비교검토한 결과 혈액중에 함유된 Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>의 전처리 방법으로 Green Wald법이 가장 양호하였고 혈장의 시료중에서 Mg<sup>++</sup>의 함량은 20 µg/ml Ca<sup>++</sup>의 함량은 102 µg/ml이 검출되었기에 보고하고자 한다.

## II. 실험

### 1. 시약 및 장치

- 1) 표준용액의 조제는 시판 특급시약을 사용
- 2) Membrane filter : Sm 13200(Satorius Co.)
- 3) Ion Chromatography : Model 2000 ; (Dionex Co.)

### 2. 수용액중에서 Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>의 분리

Table 1의 I.C분석 조건에서 Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup> 및 Ba<sup>++</sup>을 분리한 결과 Fig. 1과 같이 분리 및 감도가 양호하였고 각 이온들의 검량선은 Fig.

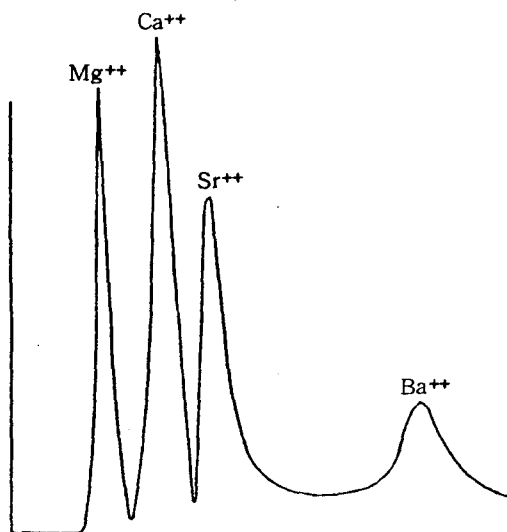


Fig. 1. Ion chromatogram of divalent cation.

[Mg : 4, Ca : 10, Sr : 16, Ba : 20 (µg/ml)]

2와 같이 Collection Coefficient가  $r=0.99$ 로 양호하였으며 이때 Detection limit는 Mg<sup>++</sup> : 0.2, Ca<sup>++</sup> : 0.5, Sr<sup>++</sup> : 1 및 Ba<sup>++</sup> : 4 (µg/ml)였다.

I.C.에 의한 양이온의 분석시 Regenerant의 종류로서는 Tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH), Barium hydroxide (Ba(OH)<sub>2</sub>), Potassium hydroxide 등이 이용되고 Cation Micromembrane Suppressor에서 용리액과 Regenerant의 이온교환 반응은 Fig. 3과 같고 이온교환 반응은

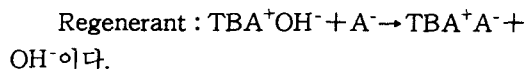
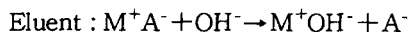


Table 1. Ion chromatography condition

|                   |   |
|-------------------|---|
| Column            | HPIC-CSI                                |
| Detector          | Conductivity                            |
| Eluent            | 2m M-HCl/2m M-m. phenylene diamine 2HCl |
| Eluent flow rate  | 2.0mL/min                               |
| Regenerant        | 20mM-Ba(OH) <sub>2</sub>                |
| Suppressor column | CMMS                                    |
| Attenuator        | 7                                       |
| Injection volume  | 50 uL                                   |

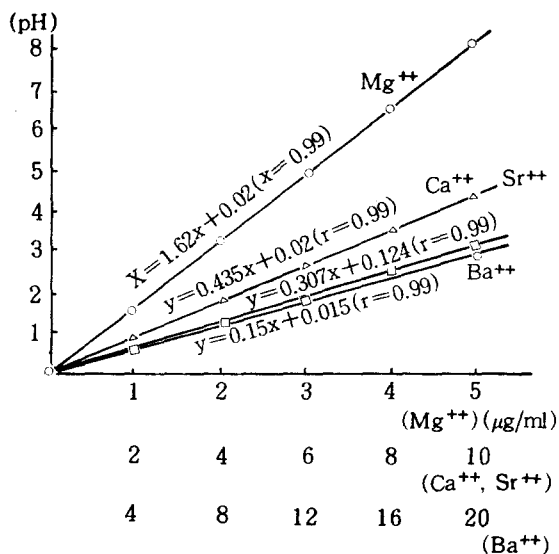


Fig. 2. Calibration curve of divalent cations in aqueous solution by Ion Chromatography.

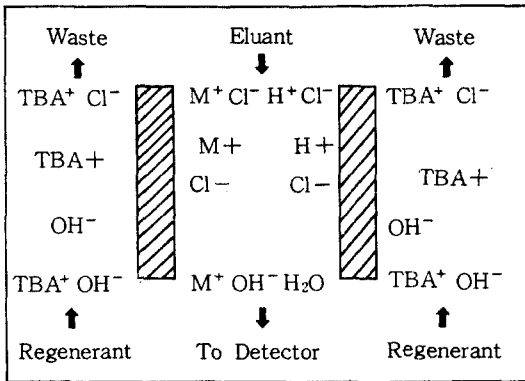


Fig. 3. Mechanism of suppression in the CMMS.

이와같이 Eluent에 함유된 Anion이 Regenerant에 의해 제거되며 이때 균질한 이온용액에 의해 전기전도도가 일정하게 유지되고 Sample에 함유된 이온종에 따라 변화된 전기전도도의 차이에 의해 검출되므로 Regenerant인 TBAOH를 사용할때 Ba(OH)<sub>2</sub>보다 농도 또는 Flow rate를 높여 주어야 한다. 그러나 Ba(OH)<sub>2</sub>는 공기중의 CO<sub>2</sub>와 반응하여 물불용분인 BaCO<sub>3</sub>로 침전되어 Suppressor의 기능을 저하시키는 원인이 되나 HCl 산성용액으로 BaCO<sub>3</sub>을 용해시켜 제거하면 쉽게 재생할 수 있기 때문에 본 실험에서는 Ba(OH)<sub>2</sub> 6.3094g을 1l에 용해한 후 즉시 Millipore (0.22us)로 여과한 후 N<sub>2</sub> gas로 공기와 접촉되지 않은 상태로 하여 일정하게 유속을 유지시켰다.

### 3. 혈액중에서 Mg<sup>++</sup> 및 Ca<sup>++</sup>의 분석

시료로 사용된 혈액은 응고 방지제인 Citrate dextrose가 첨가된 신선한 혈액을 5,000rpm에서 원심분리 하여 혈장을 분리한 후 아래와 같은 단백질을 제거법에 의하여 전처리한 용액을 시험용액

으로 사용하였다.

#### 1) 혈장의 전처리 방법

##### (1) Green Wald법

혈장 1ml에 5%-Trichloroacetic acid 9ml을 넣은 후 Voltex mixer를 사용 충분히 혼합시킨 후 10분간 정치 한 다음 5,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 사용하였다.

##### (2) Neuberg법

혈장 1ml에 3/4 M-HClO<sub>4</sub>용액 4ml을 넣은 후 Voltex mixer를 사용 충분히 혼합시킨 후 10분간 정치한 다음 5,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 사용하였다.

##### (3) Dilution법

혈장 1ml을 탈이온수로 10배 희석한 다음 1N-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 pH 3.5로 조절한후 Membrane filter(0.22us)를 사용 여과한 여액을 시험용액으로 사용하였다.

##### (4) Membrane filter법

혈장 1ml을 탈이온수로 10배 희석한 다음 1N-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 pH 3.5로 조절한 후 Membrane filter로 여과한 여액을 시험용액으로 사용하였다.

#### 2) 혈장 중에서 Mg<sup>++</sup> 및 Ca<sup>++</sup>의 회수율 측정

혈장 1ml을 10ml Mass flask에 취하고 표준용액 Mg<sup>++</sup> : 100 및 Ca<sup>++</sup> : 200(μg/ml)을 각각 1, 2, 3, 4 (ml)를 첨가 후 탈이온수로 10배 희석하여 실험 II-3-1)와 같은 4가지 방법으로 전처리를 하였다. 이때 Mg<sup>++</sup>의 농도는 1, 2, 3, 4 (μg/ml), Ca<sup>++</sup> 이온의 농도는 2, 4, 6 및 8(μg/ml)이 되게 한 후 실험 II-2)의 Ion Chromatography분석 조건중 2mM HCl/2mM-m phenylenediamine · 2HCl용액을 사용 분석한 결과 Table 2에 각 전처리 방법에 대한 회수율을 나타내었고 또한 각 이온별 전

Table 2. Recovery of cations in plasma

| Add (μg/ml) | Mg <sup>++</sup> |                   |            | Add (μg/ml) | Ca <sup>++</sup> |                   |            |
|-------------|------------------|-------------------|------------|-------------|------------------|-------------------|------------|
|             | TCA              | HClO <sub>4</sub> | Dilution   |             | TCA              | HClO <sub>4</sub> | Dilution   |
| 1           | 98.7             | 55.6              | 101.9      | 2           | 95.4             | 92                | 98.4       |
| 2           | 95.7             | 49.4              | 92.6       | 4           | 96.6             | 90.8              | 98.7       |
| 3           | 98.9             | 51.5              | 94.7       | 6           | 95.0             | 91.2              | 96.9       |
| 4           | 98.8             | 51.7              | 95.7       | 8           | 97.1             | 91.4              | 97.1       |
| Mean        | 98.0 ± 1.5       | 52.1 ± 2.5        | 96.2 ± 3.9 | Mean        | 96.0 ± 0.9       | 91.4 ± 0.5        | 97.8 ± 0.9 |

처리 방법에 따른 검량선은 Fig. 4 및 Fig. 5에 나타내었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 수용액중에서 $Mg^{++}$ , $Ca^{++}$ , $Sr^{++}$ 및 $Ba^{++}$ 의 분리

I.C의 용리액은 Suppressor의 Regenerant와 밀접한 관계가 있으므로 Detector로 이용된 Conductivity는 Suppressor에서 용리액과 Sample에 함유된 음이온이 교환되어 균형이 이루어져야 하며 Cation Membrane Suppressor의 Maximum Suppression Capacity는  $200 \mu\text{eq}/\text{min}$ 이며 이것은

Dynamic Suppressor를 사용하는 것보다 8~10배 음이온 제거능력이 더 높으며 이 Capacity는 다음과 같은 식으로 표현될 수 있다.<sup>19)</sup>

$$\mu\text{eq}/\text{min} = [\text{Eluent concen } (\mu\text{eq}/\text{min})] [\text{Eluent flow rate}(\text{ml}/\text{min})]$$

또한 Suppressor에서 용리액과 Regenerant와의 관계는

$$5[\text{Eluent Concen}(\mu\text{eq}/\text{min})] [\text{Eluent flow rate}(\text{ml}/\text{min})] = [\text{Regenerant Concen}(\mu\text{eq}/\text{min})] [\text{Regenerant Concen } (\text{ml}/\text{min})]$$

으로 이온교환 균형이 되어야 한다.

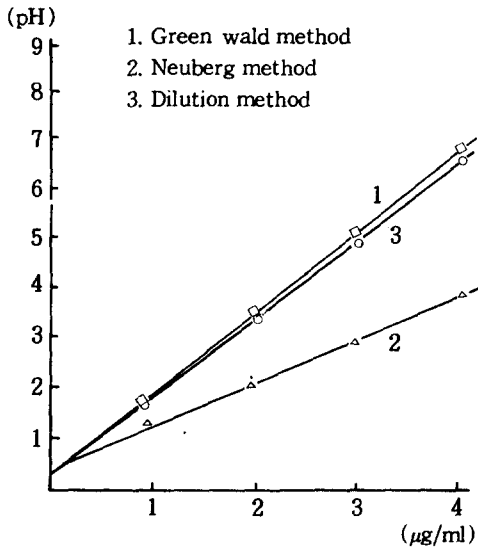


Fig. 4. Calibration curve of  $Mg^{++}$  in plasma.

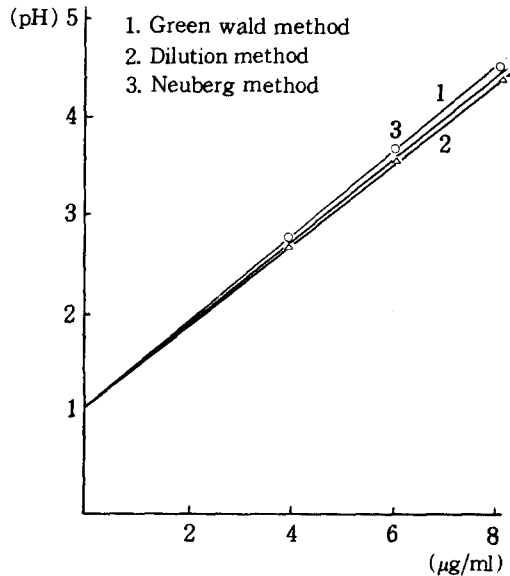


Fig. 5. Calibration curve of  $Ca^{++}$  in plasma.

Table 3. Compare with the Ion Chromatography conditions

| Column | Eluent                                | Eluent flow rate (ml/min) | Regemerant $Ba(OH)_2$ (mM) | Retention time(min) |           |           |           |
|--------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
|        |                                       |                           |                            | $Mg^{++}$           | $Ca^{++}$ | $Sr^{++}$ | $Ba^{++}$ |
| CS1    | 2mM-HCl/2mM-m-Phenylene diamine. 2HCl | 2.0                       | 20                         | 2.9                 | 5         | 6.6       | 13.6      |
| CS1    | 25mM-HCl/2mM-Histidime HCl            | 1.0                       | 40                         | 6.05                | 11.07     | .         | .         |
| CS3    | 25mM-HCl/2mM-Hisidine HCl             | 1.0                       | 40                         | 10.1                | 19.9      | .         | .         |

Table 3과 같이 한국환경위생학회지<sup>1)</sup>에 소개한 HPIC-CS<sub>3</sub> Column에 사용되는 용리액인 25mM-HCl/2mM-Histidine-HCl을 HPIC-CS<sub>3</sub> Column에 사용할시 Flow-rate 1.0ml/min에서 Conductivity가 안정되나 이때 Elution time은 Mg<sup>++</sup>: 6.05분, Ca<sup>++</sup>: 11.07분이었다. 그러나 HPIC-CS<sub>3</sub> Column에서 2mM-HCl/2mM-m-phenylenediamine-2HCl을 용리액으로 사용할시 Flow rate 2.0ml/min에서 Mg<sup>++</sup>: 2.9분 Ca<sup>++</sup>: 5.0분 Sr<sup>++</sup>: 6.6분 Ba<sup>++</sup>: 13.6분으로 짧은 시간에 4가지 이온을 동시에 정량할 수 있었다.

## 2. 혈장중에서 Mg<sup>++</sup> 및 Ca<sup>++</sup>이온의 회수율 측정

실험 II-3-2)에서와 같이 혈장에 Mg<sup>++</sup> 및 Ca<sup>++</sup>의 표준용액을 1~8 µg/ml 첨가하여 실험 II-3-1)와 같이 전처리를 한 후 2mM-HCl/2mM-m-phenylene diamine-2HCl 용리액에서 각 전처리 방법에 대한 Ion Chromatogram은 Fig. 6에 나타내었고 또한 회수율을 측정한 결과 Membrane Filter법은 한국환경위생학회지<sup>1)</sup>에 소개한 바와 같이 Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>의 회수율은 양호하나 Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>이온의 회수율은 일정치 않고 Neuberg법은 Table 2 및 Fig. 4, 5에서 보는 바와 같이 Ca<sup>++</sup>이온의 경우 회수율이 91.4% Mg<sup>++</sup>이온의 경우 52.1%였으나 혈청 회석법은 Table 2 및 Fig. 4, 5

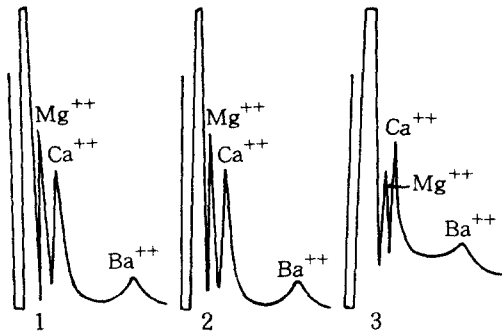


Fig. 6. Ion Chromatograms of added Mg<sup>++</sup>: 2, Ca<sup>++</sup>: 4(µg/ml) in plasma by pretreatment.

1. Gree Wald Method
2. Dilution Method
3. Neuberg Method

에서 보는 바와 같이 Mg<sup>++</sup>: 96.2% 및 Ca<sup>++</sup>: 97.8%로 양호한 편이나 단백질이 제거되지 않아 Column을 오염시킬 우려가 있었고 또한 세척에 문제가 있다. 그러나 Green Wald법은 Mg<sup>++</sup>: 98% 및 Ca<sup>++</sup>: 96%로 회수율이 양호하였으며 이때 혈장 중에 함유된 Mg<sup>++</sup>은 20 µg/ml 및 Ca<sup>++</sup>은 102 µg/ml이었으며 이들의 함량은 新谷英晴<sup>18)</sup>의 보고에 Mg<sup>++</sup> 20 및 Ca<sup>++</sup>이 110(µg/ml)이고 C-Anderson의 보고<sup>14)</sup>에는 Mg<sup>++</sup> 19.45 및 Ca<sup>++</sup> 92.18(µg/ml) 한국 생화학 편저 실험생화학에는 Ca<sup>++</sup>: 90~110 µg/ml로서 Green Wald법에 의한 전처리 방법에 의해 I.C로 정량한 결과와 거의 일치하였다.

## IV. 결 론

1. I.C에서 HPIC-CS<sub>3</sub> Column을 사용 Mg<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>이온을 분석할 때 용리액 2 mM-HCl/2mM-m-phenylenediamine-2HCl으로 Flow rate 2.0ml/min에서 Mg<sup>++</sup>: 2.9, Ca<sup>++</sup>: 5.0, Sr<sup>++</sup>: 6.6, Ba<sup>++</sup>: 13.6(분)으로 분리가 양호하였다.

2. I.C에 의한 혈장 중에서 Mg<sup>++</sup> 및 Ca<sup>++</sup>의 분석은 전처리 방법중 Green Wald법에서 Mg<sup>++</sup>: 98.0 및 Ca<sup>++</sup>: 96.1(%)로 양호하였으며 이 방법에 의한 혈장중 Mg<sup>++</sup> 및 Ca<sup>++</sup>의 함량은 20 및 102 µg/ml이었다.

## 参 考 文 献

- 1) 韓國環境衛生學會誌 第16卷 第2號.
- 2) 丹羽正治等: 人體成分의 サンプル링(挑出液) 3, 1972.
- 3) 鈴木等: 原子吸米分析의 實際, 化學의 領域 100 號.
- 4) 鼓原喜八郎: 新醫療 10(10), 13, 1983.
- 5) Standard Methods 221, 230~231, 1981.
- 6) 石井暢: 臨床病理 16, 659, 1963.
- 7) D.C.Bogen et al: Ion Chromatogram, Anal Environ. pollut. Vol. 2, 319~328, 1979.
- 8) Wolfgang Fichte et al: Maschinenschaden

- 55(2) 81~83, 1982.
- 9) M.A. Fulmer et al : Ion Chromatogram. Anal Environ pollut 381~400, 1979.
  - 10) M.Legrand et al : Anal. Chem, Acto 156, 181~192, 1984.
  - 11) Munehiko, Mizobuch. et al : Zenkoku Kogai-ken Kakshi 7(2), 67~71, 1982.
  - 12) Takahido Mizobuchi et al : Nara-Ken Eisi Kenkyusho Nenpo 15, 52~55, 1981.
  - 13) D.F.Pensentadler et al : 53(7) 859A~860A, 862A, 864A, 866A, 868A, 1981.
  - 14) 臨床醫化學 : 吉川春壽.
  - 15) C. Anderson : Clin. Chem. 22 : 1424, 1976.
  - 16) Annual Report of N.I.S.I., Vol. 18, 246~254, 1986.
  - 17) Annual Report of N.I.S.I., Vol. 19, 251~262, 1987.
  - 18) 新谷英晴等 : Bunsek : Kagaku, Vol. 33, 347~351, 1984.
  - 19) Michael E. Potts et al : Journal of Chromatographic Science, Vol. 26, July 315~319, 1988.
  - 20) Laboratory Methods in Clinical Chemistry : 49~51, 1976.