ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 9, No. 4, 1996
Printed in the Republic of Korea

=단 신=

혈액 중에서 Methemoglobin의 분포에 관하여

서배석* · 김남이† · 박성우
*가톨릭대학교 의과대학 화학과
국립과학수사연구소 법과학부

(1996. 9. 18. 접수)

The Distribution of Methemoglobin in the Blood

Baeseck Seo*, Namyee Kim† and Sungwoo Park
**Department of Chemistry, Catholic University Medical College , Seoul, 135 Korea*
National Institute of Scientific Investigation, Seoul, 158-097 Korea

(Received Sept. 18, 1996)

1. 서 론

혈액 중 헤모글로빈은 산소헤모글로빈(O_2Hb), 환원헤모글로빈(RHb), 일산화탄소헤모글로빈(COHb), 메트헤모글로빈(MetHb)의 4가지 종류가 있고, 이 중 COHb는 일산화탄소의 중독으로 인하여 사망 여부를 판단하는 데 중요하다. 헤모글로빈의 헴(heme)에 있는 철(Iron)은 ferrous state(Fe^{2+})로서, 산소 또는 일산화탄소 등과 가역적으로 결합을 한다. 그러나 이들은 종종 어떤 화학적 작용에 의해 산화되어 ferric state(Fe^{3+})로 되어 산소 또는 일산화탄소 등과 더 이상 결합을 하지 않는 MetHb으로 변화한다.[1,2] MetHb은 자연적으로 순환하고 있는 헤모글로빈량의 약 3% 정도가 혈기조건에서 매일 생성되며[3], 그외 생성요인으로는 병적, 즉 유전적 원인에 기인하는 것, aniline 등 MetHb 형성독에 기인하는 것, 산화물에 기인하는 것, 열에 기인하는 것[4,5] 등으로 알려져 있으며, 또한 소사와 자동차 배기 가스에 의한 중독에서도 상당량의 MetHb이 생성된다는 보고가 있다.[6]

그 예로 1978년 Schwerd & Schulz 등이 화재 발생시 NO_X 등의 질소 산화물들이 생성되므로 이 때문에 상당량의 MetHb이 생성된다는 보고를 하였다.[4]

혈액 중의 MetHb의 측정법은 크게 가스크로마토그래프법과 분광광도법으로 대별되며, 가스크로마토그래프법[6]에서는 환원제 첨가 전후에 혈액의 O_2 또는 CO와의 결합능력의 차이로부터 불활성 Hb의 양을 구하는 방법이고, 분광광도법[7~10]은 산성상태의 MetHb이 630nm에서, 알칼리성 상태의 MetHb은 820nm에서 각각 최대 흡광도를 나타내는데, cyanide salt의 첨가 후에 최대 흡광도가 소실되는 원리를 이용하여 MetHb의 양을 측정하는 방법이다.

본 연구에서는 MetHb의 측정법인 CO-Oximeter법[11]과 SATO's Method[6]를 비교하였으며, 또한 우리나라 화재사에서 MetHb의 농도 분포를 조사하였기에 보고하고자 한다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

1) 혈 액

중앙 적십자혈액원에서 구입한 항응고제가 함유된 신선한 혈액을 일산화탄소 가스로 약 20분 동안 bubbling에 의해서 완전히 포화시킨 후 질소 가스로 헤모글로빈과 결합하지 않고 잔류하는 일산화탄소 가스를,

bubbling에 의해 제거시킨 혈액을 100% COHb 혈액으로 사용하였고, COHb 포화 방법과 동일하게 산소가스로 포화시킨 혈액을 100% O_2Hb 혈액으로 사용하였다. 이 두 혈액을 각 농도별로 혼합하여 10~60% 정도의 COHb 표준 혈액을 제조하여 사용하였다. 또한 소사체의 혈액은 화재사로 인하여 국립과학수사연구소에 부검 의뢰된 혈액으로 시험하였다.

2) 시 약

희석제로 10% octyl polyethoxy ethanol을 사용하였고, potassium ferricyanide, ammonium phosphate, sodium cyanide는 Aldrich사 제품을 사용하였다. 4%(W/V) potassium ferricyanide 용액은 갈색병에 보관하여 1개월까지만 사용하였고, sodium cyanide는 5%(W/V) 용액으로 만들어 사용하였다.

3) 기 기

CO-Oximeter는 Instrumentation Laboratory의 IL 282를 사용하였고, Ultraviolet Visible Spectrophotometer는 Shimadzu UV 2100을 사용하였다.

2.2. 실험방법

1) CO-Oximeter법[11]

혈액을 직접 CO-Oximeter의 cell에 흡입시켜서 COHb와 MetHb을 측정한다. 이 때 10% 이상의 MetHb을 나타내는 혈액에서는 ±10%의 상대오차를 나타내므로, 50% 이상의 MetHb을 나타내는 혈액은 O_2Hb%+COHb%+MetHb%의 총합이 100을 초과할 수 있다. 이런 경우 MetHb%=100%−O_2Hb%로 계산하는 것이 보다 정확하다는 보고에 기준하여 MetHb을 측정했다.

2) Ultraviolet Visible Spectrophotometer법(SATO's Method)[6]

혈액 0.2mL를 증류수 6mL로 희석, 균질화한 다음 5분간 방치한 후 0.1M 인산 완충용액(pH 6.8) 4mL를 가하여 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상층액만 취한다. 4개의 UV/Vis cell(A, B, C, D)에 A, B에는 증류수 0.5mL를, C, D에는 4% potassium ferricyanide 용액 0.5mL를 주입한 후 A와 C에는 40mM 인산 완충용액(pH 6.9) 3mL를, B와 D에는 위의 원심분리한 혈액 상층액을 3mL 가하여 혼합한다. A를 reference로 사용하여 B를 630nm에서 그 흡수값(A_1)을 측정하고, D는 10분간 방치한 다음 C를 reference로 하여 630nm에서 그 흡수값(A_2)을 측정한다. 4개의 모든 cell에 5%의 sodium cyanide 용액을 30uL 첨가한 다음 교반하여 2분간 방치 후 A와 C를 reference로 하여 B(A_3), D(A_4)를 630nm에서 그 흡광도를 측정한다.

이 경우 MetHb%는 아래 식과 같이 구하였다.

$$\text{MetHb} = \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_4} \times 100$$

1) 소사체에서의 MetHb 농도 측정

국립과학수사연구소에서 의뢰된 60여건의 소사체들의 혈액에서 COHb와 MetHb를 CO-Oximeter로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

MetHb 측정을 위한 SATO's Method와 CO-Oximeter법의 비교

혈중 MetHb의 농도를 구하기 위하여 CO-Oximeter와 UV/Vis(SATO's Method)를 이용하였다.

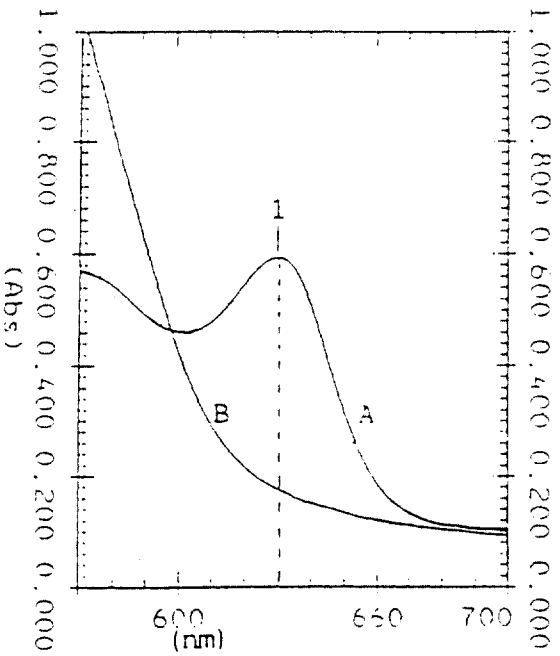

Fig. 1. Comparison of the spectra of MetHb(A) and CN-MetHb(B) at 630nm

CO-Oximeter의 원리는 국과수연보에 이미 기재하였으며, SATO's Method는 산성 상태의 MetHb은 630nm에서 최대 흡광도를 가지나, cyanide salt의 첨가로 인하여 CN-MetHb의 생성으로 그 흡광도가 소실되는 원리에 기초한 것으로 *Fig.* 1에서 보듯이 potassium ferricyanide 첨가에 의해 생성된 MetHb은 630nm에서 최대 흡광도(A곡선)를 나타내나, 5% sodium cyanide 30uL 첨가 후엔 그 흡광도가 사라짐을 볼 수 있다(B곡선).

이는 SATO 등에 의해 보고된 방법이다. 또 1)과 2)에서와 같은 방법으로 MetHb 농도의 CO-Oximeter법과 SATO's Method에서의 상관관계를 보았는 바, *Fig.* 2에서와 같이 그 상관계수가 0.9595로 양호한 결과를 보였다.

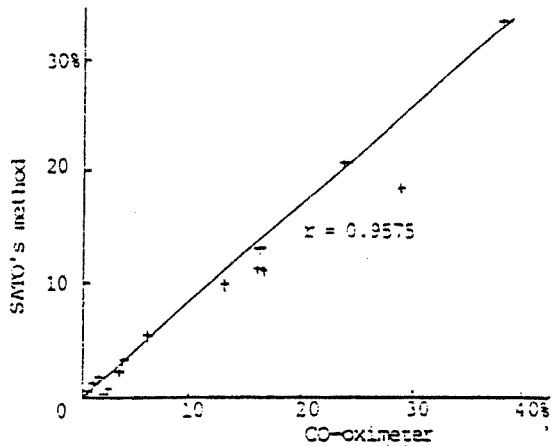

Fig. 2. Comparison of the SATO's Method with the CO-Oximeter for the determination of MetHb% in blood.

Table 1. Concentration of COHb and MetHb in the blood from dead burn victims

run	COHb(%)	MetHb(%)	run	COHb(%)	MetHb(%)
1	58	1.0	31	62	2.0
2	54	1.2	32	73	1.3
3	28	0.5	33	40	1.5
4	80	2.0	34	21	1.0
5	79	0.5	35	72	0.8
6	36	0.3	36	54	21.0
7	77	1.3	37	83	4.2
8	86	0.9	38	80	3.0
9	88	3.6	39	78	0.1
10	37	23.1	40	80	2.7
11	52	1.0	41	74	2.2
12	76	2.2	42	61	13.8
13	58	3.9	43	67	10.5
14	57	25.2	44	66	1.0
15	34	4.9	45	49	22.1
16	80	0.3	46	71	0.6
17	92	0.2	47	22	2.2
18	83	0.4	48	56	8.3
19	40	13.3	49	42	7.5
20	86	1.0	50	49	0.9
21	28	1.0	51	38	3.0
22	53	0.9	52	50	2.0
23	36	0.9	53	44	2.3
24	15	1.2	54	79	0.4
25	66	2.0	55	75	1.0
26	73	12.8	56	89	0.2
27	58	3.7	57	74	1.1
28	30	6.4	58	72	2.1
29	78	0	59	73	6.5
30	50	33.4	60	67	0.2

소사체에서의 MetHb 농도

Table 1에서 보듯이 60여건의 소사체들의 COHb의 농도 분포는 작게는 15.1%에서 최고 89%까지 검출되었으나 대부분 50~80% 정도를 나타냈다. 또한 MetHb의 농도 분포는 대부분 10% 이하를 나타냈고, 10% 이상을 보인 것은 단 9건으로 전체의 13%를 차지했다.

Table 1은 화재사의 경우 혈액의 MetHb 생성률이 높지 않음을 시사한다. 이는 화재로 인해 상대적으로 COHb가 높아지기 때문으로 사료되어진다.

또한, 화재 발생시 화재 현장의 조건, 즉 연소물질의 종류에 따라 크게 좌우되는 것으로 사료되며, 만일 질소 등이 함유된 합성섬유 등이 많이 있는 장소에서 화재가 발생했을 경우는 이들의 산화물에 기인하여 높은 MetHb이 형성될 것이다.

4. 결 론

본 실험에서는 MetHb의 측정법으로 CO-Oximeter법과 SATO's Method법을 비교 검토하여 그 상관관계가 0.9575로 양호함을 보였으며, 또한 화재로 인한 소사체의 경우에서 MetHb을 측정해 본 결과 대부분(약 87%)의 소사체에서 MetHb은 10%를 넘지 않았으며, 단지 13%만이 10% 이상의 MetHb을 나타냈다. 또한 이 때 COHb의 농도 분포는 15~89%로 검출되었으나, 거의 대부분이(77%) 50% 이상의 COHb을 나타냈다.

Reference

1. P. L. Williams and J. L. Burson. Industrial Toxicology , Lifetime Learning Publications, New York, pp. 67(1985).
2. Lehninger, Principles of Biochemistry , Worth Publishers Inc., New York, pp. 272(1982).
3. Florkin and Stotz, Comprehensive Biochemistry , Elsvier Publishing Co., New York, V19, B2, pp. 377(1982).
4. Masae Okada and Takeo Okada *et al.* *日本醫誌*, **40**(2), 124(1986).
5. H. Kosaka and I. Tyuma, *Environmental Health Perspectives,* **73**, 147(1987).
6. Keizo Sato, *日本醫誌*, **37**(2), 133(1983).
7. C. C. Winterbourn, "Biochemistry International", *Academic, Australia,* **7**(1), pp. 1-8, 1983.
8. Junko Shigezane, *Japan. J, Legal Medicine,* **39**(1), 1(1985).
9. F. L. Rodkey and J. D. O'neal, *Biochemical Medicine,* **91**, 261(1974).
10. O. S. Andersen, B. N. Pedersen and J. Rem, *Clinica Chimica Acta.,* **42**, 85(1972).
11. S. W. Park *et al.*, *Annual Report of the National Institute of Scientific Investigation,* **23**, 273(1991)

Abstract : We performed a comparative study of analysis methods of Methemoglobin with a CO-Oximeter and an UV/Vis(SATO's Methd). The correlation coefficient of two method for the MetHb% determinations was estimated to be 0.9575. The concentrations of MetHb on most of the dead burn victims(87%) were shown below 10%. The concentrations of COHb were rang between 15% and 85%.

Key words : Methemoglobin, Carboxyhemoglobin, CO-oximeter.