

당뇨병 환자의 혈당치 측정을 위한 다층 젤라틴 필름을 이용한 진단막의 제조에 관한 기초연구

권 석 기 · 음 성 진

홍익대학교 과학기술대학 공업화학과
(1997년 10월 25일 접수, 1997년 12월 26일 채택)

Basic Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes by Using Multi-Layered Gelatin Films to Measure Blood Glucose Level of Diabetics

Suk-Ky Kwon and Sung-Jin Eum

Dept. of Ind. Chemistry, Hongik University, Seoul 121-791, Korea
(Received October 25, 1997, Accepted December 26, 1997)

요 약 : 혈중 글루코오스의 농도를 측정하기 위한 진단막의 제조를 위해 다층 젤라틴 필름이 사용되었다. 혈당치를 얻기 위해 glucose dehydrogenase와 diaphorase를 이용하여 다층 젤라틴 필름을 통과하는 글루코오스의 확산속도를 측정하였다. 글루코오스의 최대 확산속도에 미치는 코팅의 간격거리, 효소의 양, 필름의 두께, 그리고 외부 온도의 영향에 대해 조사하였다.

Abstract : Multi-layered gelatin films were used for the preparation of diagnostic membranes to measure blood glucose concentration. Diffusion rates of glucose through multi-layer gelatin films were monitored to obtain blood-glucose level by using glucose dehydrogenase and diaphorase. The effects of coating edge distance, enzyme quantities, film thickness, and outside temperature on the maximum diffusion rates of glucose were examined

1. 서 론

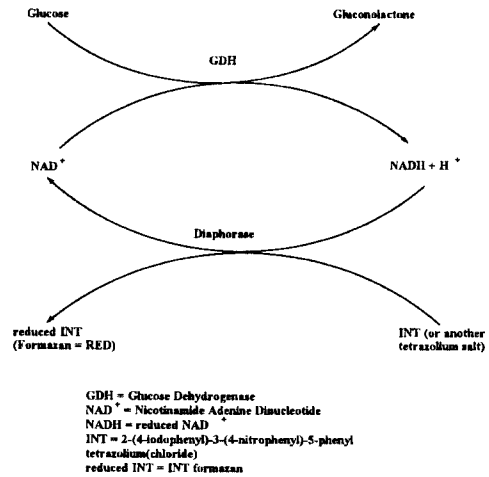
당뇨병은 오래전부터 단순히 소변에 당이 섞여 나오는 병으로 인식되어 왔으나 실제적으로 사람의 피속에 글루코오스의 농도가 비정상적으로 높음에 따라 여러 가지 합병증을 유발시키는 심각한 질병을 말한다[1]. 세계 여러곳에서 당뇨병의 원인에 대해 연구하고 있지만 그 직접적인 원인에 대해서는 확실하게 밝혀져 있지 않다[2-3]. 다만 환경적인 요인과 또한 유전적인 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 왔다[1]. 1921년에 인슐린이 발견됨에 따라 많은 당뇨병 환자들이 인슐린에 의해 병이 호전되거나 또는 정상적인 생활을 되찾았다[4]. 인

슐린은 우선 신체 내부의 장기중 하나인 췌장에서 만들어 지며, 인슐린의 역할은 피 속의 글루코오스를 세포속으로 이동하도록 하는 것이다[5]. 만일 인슐린이 부족하거나 또는 구조가 변형된 인슐린이 생성되어 지면 혈액 속의 글루코오스가 세포속으로 이동하지 못하므로 혈액 속의 당의 농도가 높아지게 되는 것이다. 혈당치를 정상으로 낮추기 위해 인슐린을 사용해야 하는지의 여부에 따라, 당뇨병은 Type I과 Type II로 분류된다[6]. Type I의 당뇨병 환자는 췌장에 문제가 있어 인슐린이 전혀 생산되지 않거나 또는 아주 변형된 인슐린을 생산하기 때문에 외부에서 인슐린을 투여해야 한다[4-6]. 그러나 Type II의 당뇨병 환자는 정상적인 인슐린을 부

족하지만 상당히 가지고 있기 때문에 운동과 적당한 식사 등에 의한 혈당량 조절이 가능하게 된다 [6]. 이리므로 당뇨병은 초기에 발견할수록 혈당치의 조절이 용이해지고 또한 합병증을 막을 수 있다. 따라서 당뇨병을 초기진단하기 위해 많은 연구가 이루어 지고 있다. 당뇨병 환자들 뿐만 아니라 일반인들의 혈중 당의 농도를 측정하기 위한 자가진단 기구가 여러해 동안 발전해 왔다. 당뇨병의 유무는 사실 소변 속의 당의 유무와는 관계가 없고 다만 혈중 글루코오스의 농도를 가지고 결정된다[6]. 초기 당뇨병 진단용 분리막으로는 종이와 종이 사용되어 왔으나 종이를 사용할 경우 여러 가지 문제점이 나타났다[7]. 최근에는 혈당 측정을 위해 종이 대신 합성고분자를 이용한 진단막의 개발이 활발히 전개되어 왔다[8-12]. 특히 우레탄 고분자는 진단막의 좋은 재료로 알려져 있으며[13-15], 특별히 우레탄을 이용한 진단막중 pore size가 작은 진단 분리막을 통해 피 속의 글루코오스 농도를 측정하는데 사용되고 있다[16]. 그러나 이러한 합성고분자를 이용한 진단막에도 여러 가지 문제점이 대두되므로 천연고분자를 이용한 진단막의 제조가 많이 시도되고 있다[10-12]. 특별히 이러한 진단기구 시스템에서 중요한 것이 피속의 글루코오스 농도를 분석하는 방법인데, 여기에는 산화효소를 이용한 방법과 환원효소를 이용한 방법이 있다[17]. 산화효소를 이용한 방법을 위해서는 글루코오스를 산화시키는 효소인 glucose oxidase(GOD)와 또한 다른 종류의 효소인 peroxidase(POD)를 이용해 글루코오스와 반응시켜 H₂O₂를 얻고, 얻어진 H₂O₂가 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)의 색을 변화시키는 정도를 가지고 글루코오스의 농도를 얻었다[17]. 그러나 이러한 산화효소를 이용한 분석방법은 공급되는 산소의 양과 같은 외부의 조건에 너무 영향을 많이 받기 때문에 여러 가지 문제점을 야기시켜 왔다.

따라서 본 연구에서는 종래의 산화효소를 이용한 방법을 지양하고, Scheme 1과 같은 환원효소를 이용한 방법을 사용하였다[17].

또한 이러한 환원효소 시스템을 이용한 진단막을 제조하기 위해 이러한 효소와 염료를 함유한 젤라틴 필름을 다층 코팅하였다. 다음의 Figure 1에서는 글루코오스의 확산속도를 측정하기 위해 만들어진 다층 젤라틴 필름의 단면도를 보여주고 있다. 첫 번째 INT층은 glucose의 농도를 INT가 Formazan의 바뀌는 정도로 나타내기 위한 dye를 포함한 젤라틴 층이고, 두 번째 enzyme층은 glucose 및 다른 물질과의 반응을 촉진시키는 효소를 함유한 젤라틴



Scheme 1. Analysis methods of reductive enzymes.

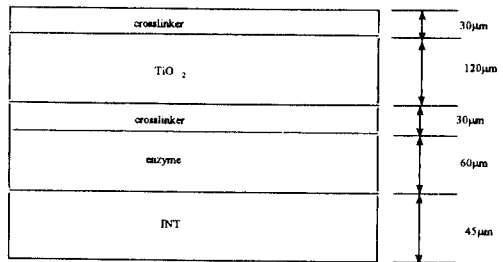


Fig. 1. Multi-layered gelatin films.

층이고, 세 번째 crosslinker층은 젤라틴의 crosslinker인 water-soluble carbodiimide를 함유한 단층이다. 이 세층을 먼저 코팅한 후에, 그 위에 색 차단제인 TiO₂를 함유한 젤라틴 층과 마지막 crosslinker층을 코팅해 최종 젤라틴 진단 필름을 얻는다.

본 연구에서는 젤라틴을 이용한 진단막이 제 기능을 발휘할 수 있는 가를 조사하기 위해 필름을 코팅할 때 나타나는 조건에 따른 영향, 사용되는 환원효소들의 양에 따른 변화, 코팅두께에 따른 확산 속도의 영향, 그리고 또한 측정시 외부온도에 따라 받는 영향들에 대해서 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약

젤라틴, TiO₂, plasma, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino

propyl)-carbodiimide(EDAC), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES), glucose dehydrogenase(GDH), diaphorase, β -nicotinamide adinine dinucleotide(NAD), 2-(p-iodophenyl)-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride(INT)등은 Sigma로부터 구입하여 정제 없이 사용하였다. 또한 Silwet 7600은 Union Carbide로부터 구입해 정제 없이 사용하였다.

2.2. 장치

Enzyme, TiO_2 , INT, polymer solution 등을 교반하는 데는 Talboys에서 제작한 T-Line mechanical stirrer를 사용하였다. 얻어진 용액의 점도는 Brookfield 점도계로 측정하였다. Gelatin 필름을 코팅하는 데는 21cm Cascade Head를 장착한 Bayer SVBM Coater를 사용하였다. 코팅된 필름이 plasma glucose와 반응한 뒤 변하는 색변화는 UV/VIS Spectrometer를 통해 분석하였다.

2.3. 코팅용 젤라틴용액의 제조

2.3.1. Indicator와 Enzyme Layer용 용액의 제조

Indicator와 enzyme layer를 코팅하기 위해서는 세 가지 용액이 필요하다. 첫 번째는 indicator용액으로 물 92.75g에 INT 3g, 젤라틴 4g에 Silwet 7600 0.05g을 잘 섞어 만든다.

두 번째는 enzyme용액으로 물 88.87g에 Silwet 7600 0.07g, MES buffer 3.90g, diaphorase 0.03g (100U/g), GDH 1.06g(280U/g), 젤라틴(pH 6) 6g, 그리고 NAD 0.07g을 잘 교반하여 만든다. 세 번째 용액은 crosslinker용액으로 물 99g에 Silwet 7600 0.1g, MES buffer 0.2g, 그리고 EDAC 0.7g을 넣어 잘 섞어 만든다. 모든 용액은 코팅 전 반드시 탈기시켜 사용한다.

2.3.2. TiO_2 Layer용 용액의 제조

TiO_2 layer를 코팅하는 데는 두 가지 용액이 필요하다. 즉 TiO_2 용액과 crosslinker용액이다. 먼저 TiO_2 용액은 물 81.9g에 Silwet 7600 0.1g, 젤라틴 6g에 TiO_2 12g을 넣어 잘 섞어 만든다. Crosslinker 용액은 물 94.28g에 Silwet 7600 0.12g에 MES 0.2g, 그리고 EDAC 5.4g를 넣고 잘 교반하여 만든다. 이 용액들도 코팅 전에 반드시 탈기시켜 사용한다.

2.4. 젤라틴 필름의 코팅

위에서 설명한 indicator용액, enzyme 용액, 그리

고 crosslinker 용액을 각각 SVBM Cascade Coater의 용기에 담은 뒤 배출되는 코팅액의 두께를 각각 indicator 45 μ m, enzyme 60 μ m, 그리고 crosslinker 30 μ m로 고정시킨다. 코팅바탕으로 사용되는 PET 필름을 수직으로 회전시키면서 SVBM Coater용기 속의 코팅액들을 동시에 3단층으로 배출한다. 이때 각 코팅액들이 섞이지 않는 것을 세밀히 관찰한다. 액체의 상태가 좋은 조건에서 PET 필름을 흐르는 액체의 단층에 접촉시키면서 코팅시킨다. 코팅된 필름은 건조오븐을 통과시켜 건조시킨다.

TiO_2 용액과 crosslinker용액을 coater에 부착된 용기에 담고, 두께를 TiO_2 120 μ m와 crosslinker 30 μ m로 고정시킨다. 앞에서 건조된 필름을 부착하고 이미 코팅된 젤라틴 필름 위에 코팅시키고 역시 건조오븐을 통과시키며 건조한다. 얻어진 필름을 빛과 반응하지 않도록 밀폐하여 보관한다.

2.5. 젤라틴 필름의 Diffusion Rate Test

Cascade coater에서 코팅된 젤라틴 필름의 확산속도를 측정하기 위해서는 먼저 글루코오즈 기준용액을 만들어야 한다. Plasma용액 100ml에 각각 글루코오즈 5mg, 10mg, 20mg, 50mg, 100mg, 200mg, 400mg, 그리고 600mg을 넣어 잘 교반시킨다. 또한 필름의 확산속도를 측정하기 위해 코팅된 PET 필름을 1cmx1cm 크기로 잘라 플라즈마와 반응할 수 있는 가운데 구멍이 달린 Diffusion cell을 만든다. 이 Diffusion cell의 외곽은 열처리를 해서 plasma가 외부로 흘러나가는 것을 막는다. Diffusion cell속으로 여러 가지 글루코오즈 농도의 plasma용액을 넣은 후 각각의 최대확산속도(Dt/sec)를 구한다. Dt는 시간에 따른 Formazan(reduced INT)의 농도의 식에서 나타난 기울기를 표시한다. Dt를 구하기 위해서는 시간에 따른 Formazan의 농도의 변화를 500 nm의 absorbance를 가지고 구한다. 얻어진 농도의 변화를 시간에 따른 기울기를 구해 이것을 시간별로 그려보면 glucose의 농도에 따라 잘 구분이 됨을 알 수 있다. 특별히 20초 때의 값을 구해 plot하면 glucose의 농도와 Dt/sec의 값이 일직선으로 잘 일치함을 알 수 있다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Coating Thickness에 따른 Variability Test

SVBM Coater에 operator-side의 edge거리를 2.5cm, 7.5cm, 12.5cm, 17.5cm로 변화시키면서 TiO_2 layer

의 두께를 변화시켰을 때 transmission density가 어떻게 나타나는가를 알아보았다.

TiO₂ layer는 80μm, 120μm, 80μm씩 두 번 즉 160μm의 두께로 코팅하였다. Figure 2에서 볼 수 있는 것 처럼 두께가 2.5cm에서 17.5cm로 변함에 따라 아무런 변화가 없음을 알 수 있었다. 다만 두께가 두꺼워 짐에 따라 transmission이 감소하였고,

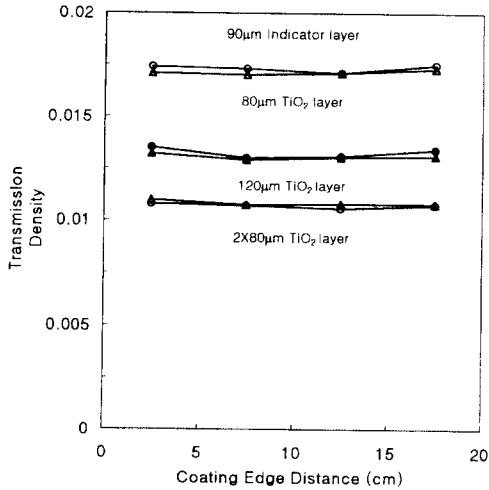


Fig. 2. Coated-film thickness variability.

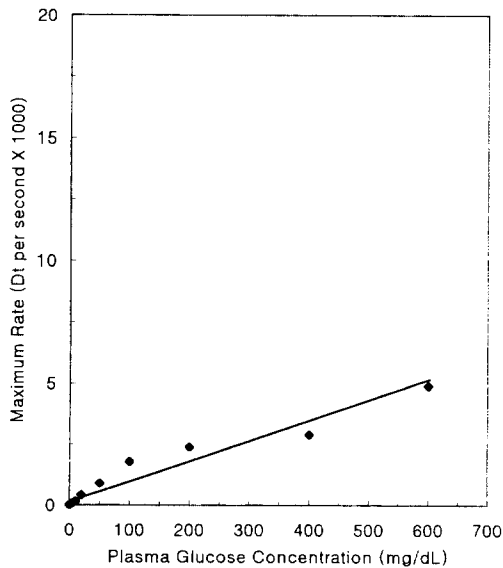


Fig. 3. Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration (70U/g GDH; 200U/g diaphorase).

두 번 반복 실험하였을 때도 큰 오차를 보이지 않았다.

3.2. Enzyme양의 변화에 따른 실험

GDH의 양과 diaphorase의 양을 변화시켰을 때 plasma glucose의 농도와 maximum rate의 관계를 알아보았다. Figure 3에서 볼 수 있는 것 같이 GDH 70U/g와 diaphorase 200U/g를 사용할 경우 plasma glucose가 0mg/dL에서 600mg/dL로 변할 경우, 글루코우즈의 확산속도와 직선이 너무 완만한 것을 볼 수 있었다. 또한 다소 직선과 일치하지 않음도 알 수 있었다.

Figure 4에서는 GDH 140U/g와 diaphorase 200U/g를 사용하였을 경우 plasma glucose의 농도와 확산 최대 속도와의 관계를 나타내었다. Figure 3의 경우 보다 다소 가파른 직선을 나타내었으나 200mg/dL 이상에서는 다소 정상 직선에서 벗어나 있음을 볼 수 있었다.

Figure 5에서는 GDH 280U/g와 diaphorase 200U/g를 사용할 경우 글루코우즈의 농도와 확산속도와의 관계를 보여주는데, 이 경우도 200mg/dL 이상에서 불규칙적인 결과를 보여주고 있다

Figure 6과 7에서는 GDH 280U/g와 diaphorase 100U/g를 사용하였을 경우 plasma glucose와 maximum rate간의 관계를 나타내었다. Figure 6의 경우 글

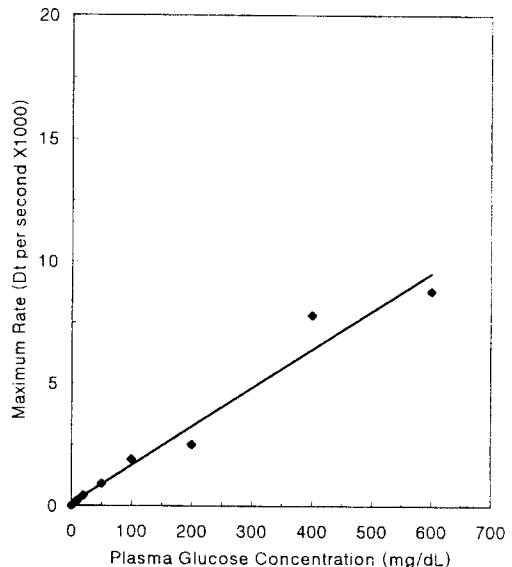


Fig. 4 Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration (140U/g GDH; 200U/g diaphorase).

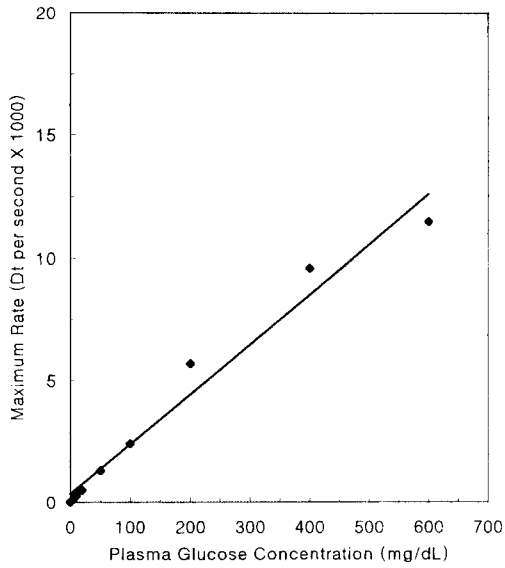


Fig. 5. Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration (280U/g GDH; 200U/g diaphorase).

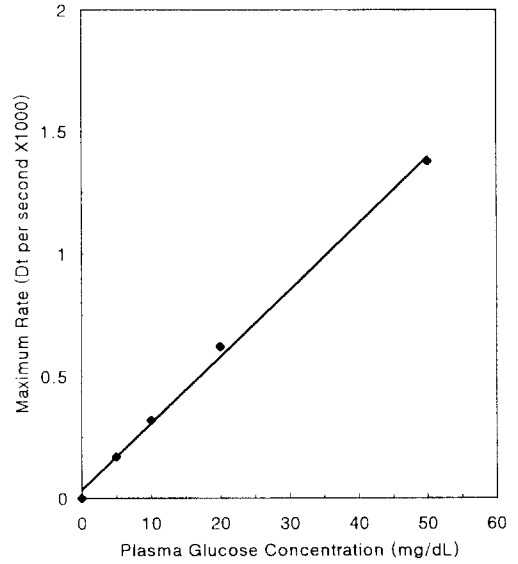


Fig. 7. Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration (280U/g GDH; 100U/g diaphorase).

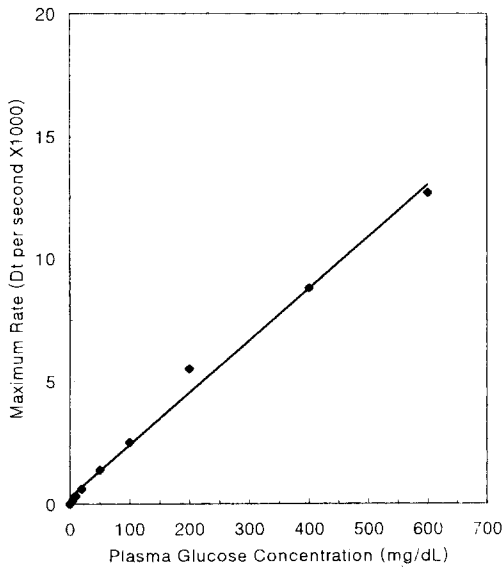


Fig. 6. Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration (280U/g GDH; 100U/g diaphorase).

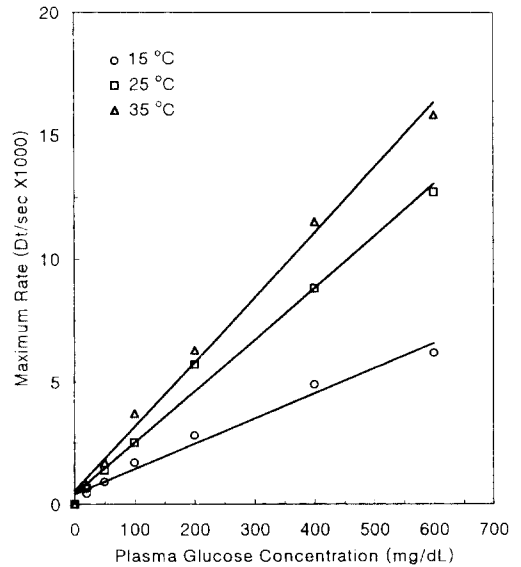


Fig. 8. Uncorrected relationship between maximum rate and plasma glucose concentration at various temperatures (280U/g GDH; 100U/g diaphorase).

루코우즈 농도가 0mg/dL에서 600mg/dL 까지 변화했을 경우를 보여주는데 200mg/dL이상에서는 다소 직선에서 벗어나는 경우도 보여주지만 그중 가장

좋은 농도와 속도사이의 직선관계를 보여주고 있다. 더욱이 Figure 7에서는 0mg/dL에서 50mg/dL

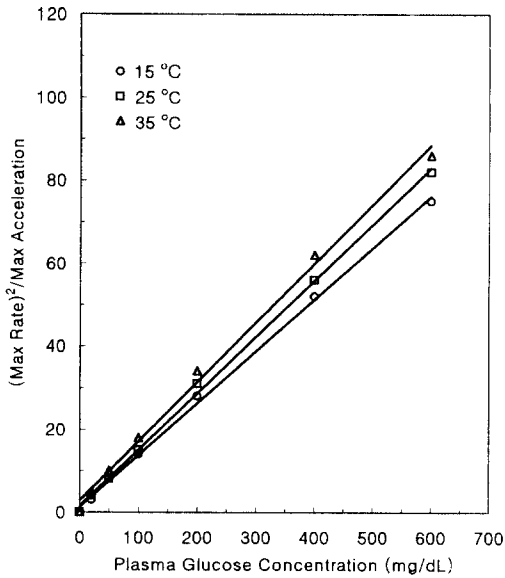


Fig. 9. Corrected relationship between plasma glucose concentration and dose-response at various temperatures(280U/g GDH; 100U/g diaphorase).

까지의 관계를 자세히 보여주고 있는데, 이 경우 농도와 확산 최대속도가 직선상의 관계를 잘 나타내고 있음을 알 수 있었다.

3.3. 온도에 따른 확산속도의 영향

Diffusion 실험을 15°C, 25°C, 35°C에서 각각 실시하였다. Figure 8에서는 세개의 온도에서 나타나는 plasma glucose의 농도와 maximum rate와의 관계를 보여주고 있다. 온도가 변화에 따라 다소 큰 차이로 최대속도가 변하는 것을 알 수 있었다. 그러므로 maximum rate를 제공한 후 최대가속으로 나눌 경우, plasma glucose의 농도와의 관계가 어떻게 변하는 가를 Figure 9에서 보여주고 있다. 아직도 온도가 15°C에서 35°C로 변하는 동안 조금은 기울기가 서로 다르게 나타나고 있지만 앞의 경우보다는 훨씬 온도에 덜 민감하게 나타남을 알 수 있었다.

4. 결론

다층 젤라틴 필름을 이용한 글루코오스의 확산속도 측정의 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) Coating thickness는 확산속도에 영향을 미치

지 않았다. 그러나 다만 두께가 두꺼워짐에 따라 transmission이 감소하였다.

- (2) Enzyme의 농도를 변화시켰을 때의 확산속도는 GDH 280U/g와 diaphorase 100U/g에서 최대속도가 나타남을 알았다. 또한 0mg/dL에서 600mg/dL의 농도범위에서 직선상의 관계를 잘 만족하고 있음을 알았다.
- (3) 온도가 변함에 따라 다소 큰 차이로 확산속도가 변함을 알았다. 다만 최대속도의 제공을 최대가속으로 나눈 값으로 보정할 경우 온도에 훨씬 덜 민감하게 나타남을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 1997년도 홍익대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. K. S. Lee, "Modern Disease Digest", Kuckminilbosa, Seoul (1992).
2. W. S. Hong, "Oriental Treatment for Modern Disease", Hyoseone, Seoul (1993).
3. D. W. Jung, "Health control for Modern People", Ohchon, Seoul (1993).
4. J. M. Kim, "Diabetes", Ohsung, Seoul (1993).
5. S. W. Kim, "Life Guide for Diabetes Control", Hyoseong, Seoul (1993).
6. J. K. Park, "Human Life Science", SNU Publishes, Seoul (1993).
7. B. H. Lee and S. K. Hong, "Physiology", Bajae Publishers, Seoul (1966).
8. S. Kwon, *Polymer(Korea)*, 18, 1055 (1994).
9. S. Kwon, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, 5, 975, (1994).
10. R. E. Kesting, "Synthetic Polymeric Membranes", McGraw-Hill, New York (1971).
11. M. Gordon, "Polymer Membranes", Springer-Verlag, New York (1985).
12. N. Jain and R. Wagner, "Introduction to Biological Membranes", Wiley, New York (1985).
13. D. Lyman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 146(1), 113, (1968).
14. Proceedings of the SPI, "Polyurethanes 89",

- The Society of the Plastic Industry, SPI, New York (1989).
15. M. Szycher, "High Performance Biomaterials", Technomic, Lancaster (1989).
16. J. D. Andrade (Ed.), "Surface and Interfacial Aspect of Biomedical Polymers", Vol 1, Plenum, New York (1985).
17. H. U. Bergmeyer, "Methods of Enzymatic Analysis", VCH, Weinheim (1981).