

## 개에 있어서 약물에 의한 당뇨병의 유발과 혈당제어의 감시에 관한 연구

### I. 세 가지 Fructosamine 측정법의 비교 실험

이창우<sup>1</sup> · 최희인 · 김본원  
서울대학교 수의과대학

## Drug-Induced Diabetes Mellitus and Monitoring Hyperglycemic Control in Dogs

### I. Comparison of Three Methods of Measuring Fructosamine

Chang-Woo Lee, Hee-In Choi and Bonn-Won Kim  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

**ABSTRACT :** The diagnosis of canine diabetes mellitus is generally made by measuring serum fructosamine levels. The Rosental's end point, Tas and El Din's kinetic, and Johnson and colleagues' kinetic techniques were compared for the measuring serum fructosamine levels. In the Rosental's end point method, within-run and between-run coefficient of variability (CV) were 2.4~3.5% and 6.8~8.5%, respectively, and in the Tas and El Din's kinetic method, within-run and between-run CV were 1.3~3.0% and 3.4~3.9%, respectively. In the Johnson and colleagues' kinetic method, within-run and between-run CV were 0~1.8% and 3.1~6.8%, respectively. Hyperlipidemia induced by oral administration of 3 ml of corn oil per kilogram body weight did not affect serum fructosamine concentration significantly in the Johnson and colleagues' kinetic method. Johnson and colleagues' kinetic method is most reliable and consistent on the basis of comparison study.

**Key words :** fructosamine, measure, within-run, between-run

## 서 론

개와 고양이의 내분비성 질병 중에서 가장 발생률이 높은 것은 진성당뇨병이다<sup>33</sup>. 진성당뇨병은 췌장 세포에 의한 인슐린 분비의 결핍 또는 말초조직에서 인슐린 작용의 장애에 의해 발생하는 복합적인 대사성 질병으로서 탄수화물, 지질 및 단백질 대사의 이상이 고혈당증, 고지혈증, 케톤혈증, 당뇨, 케톤뇨, 대사성 산증 등을 초래하는 질병이다<sup>34</sup>. 진성당뇨병은 병태생리학적 기전과  $\beta$ 세포에 영향을 주는 병인성 변화에 따라 Type I과 Type II로 분류하며<sup>34</sup> 개<sup>33</sup>와 고양이<sup>25</sup>에서 이 두 가지 형이 모두 발생한다. Type I은  $\beta$ 세포의 점진적인 파괴와 인슐린 분비기능의 점진적이고 완벽

한 소실에 의해 발생하며<sup>13,35</sup> 인슐린 결핍으로 인해 케톤증이 흔히 동반된다<sup>33,34</sup>. Type I은 개에서 가장 빈발하는 형으로서 인간의 인슐린 의존성 당뇨병(insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)에 해당되며, 인슐린 투여가 요구된다<sup>34</sup>. Type II는 인슐린 내성 과/또는  $\beta$ 세포 기능장애에 의해 발생하며, 인슐린 분비의 양은 다양하고, 분비되는 인슐린만으로는 인슐린 내성을 극복하기에 부족하기 때문에 발생한다<sup>27,36</sup>. Type II에서는 인슐린이 분비되기 때문에 케톤증은 발생하지 않는 경향을 나타낸다<sup>34</sup>. Type II는 인간의 인슐린 비의존성 당뇨병(noninsulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)에 해당되며, 경구혈당강하제와 식이요법으로 치료가 가능하다<sup>34</sup>. 개에 있어서는 Type I 중에서 인슐린 분비가 갑자기 감소하여 당뇨병으로 진단되었을 때부터 인슐린 투여가 필요한 IDDM과 세포의 파괴가 서서히 이루어져서 초기에 고혈당증의 정도가 미미하고, 소량의 인슐린으로 제어가 가능한 NIDDM

\*이 연구는 서울대학교 발전기금 포항제철 학술연구비의 지원을 받아 수행되었음.

<sup>1</sup>Corresponding author.

으로 세분하며, *Type II*는 인슐린 내성의 정도와  $\beta$ 세포의 기능상태에 따라 IDDM과 NIDDM으로 세분한다. 그리고 진성당뇨병이 아니면서 인슐린 내성을 나타내는 다른 질병에 의해 속발성 당뇨병이 발생하기도 한다<sup>33</sup>.

당뇨병의 치료의 목표는 당뇨병의 형에 따라 약간씩 차이가 나지만 인슐린 또는 경구혈당강하제의 투여, 식이요법, 운동 등에 의해 고혈당증과 당뇨에 속발되는 증상들을 제거하고, 혈당량 파동을 최소화하며, 혈당량을 정상치에 가깝게 제어하는 것이다<sup>33,34</sup>. 일단 동물이 당뇨병 진단을 받아 치료가 시작되면 평생 당뇨병 관리를 해야 되기 때문에 매일 동물병원에서 진료 받을 수는 없다. 그래서 최소 1주일간 입원하여 개체에 적합한 임시 치료계획을 수립하고, 퇴원하여 처방대로 자가치료를 하게 된다. 그 이후 주 1회씩 정기적으로 환축의 혈당량 제어를 평가해서 치료계획을 새우기까지 약 1개월이 소요된다. 이렇게 치료계획이 수립되면 처방대로 자가치료를 하면서 매일 3회씩 당뇨 배설 상태를 자가 확인하고, 2~4개월 간격으로 신체검사, 혈당량 검사 등을 하여 처방대로 자가치료를 잘 하였는지와 치료 반응이 좋았는지를 판단받고, 치료 계획을 다시 조정하게 되며, 이런 과정은 평생 지속되는 것이다<sup>33</sup>.

2~4개월만에 다시 내원했을 때 지난 2~4개월간 처방대로 자가치료를 잘 하였는지와 치료반응이 좋았는지를 판단하는 기존의 방법은 축주의 병력을 청취하고, 신체검사를 하며, 자가치료 기간의 당뇨 배설 상태를 검토하고, 혈당량을 측정하는 것이었다. 그러나 병력청취는 축주의 주관적 판단에 의존하는 것이고, 신체검사는 특이적인 것이 아니며, 당뇨 배설상태의 확인은 축주가 철저하게 하지 못하는 경우가 많다. 그리고 혈당량은 일내변동과 내원하기 전 수시간 이내의 인슐린 투여에 의해 좌우되며, 채혈 당시의 스트레스와 몇 가지 호르몬 분비 상태, 즉 glucagon, catecholamines, glucocorticoids, growth hormone 등의 분비에 영향을 많이 받기 때문에<sup>11,43</sup> 채혈 당시의 포도당 대사를 반영할 뿐이지 장기간의 누적된 혈당 제어의 성공 여부를 반영하지 못한다.

과거 몇 주간의 혈당 제어의 성공 여부를 판단하는데 있어서, 위에 설명한 문제들을 해소할 수 있는 판단 기준으로써 사람 당뇨병 환자에 대해서는 혈액내의 hemoglobin A<sub>1c</sub><sup>8,9,10,12,14,15</sup>와 혈청 fructosamine<sup>1,2,5,7,15,19,38,39,40,44</sup> 등의 몇 가지 glycated protein을 측정하고 있다. glycated protein들은 혈액내에서 당과 단백질이 비효소적

으로 결합하여 생성되는 것으로서, 이것들이 생성되는 정도는 장시간에 걸친 누적된 평균 혈당량에 정비례하고<sup>22,34,43</sup>, 일시적인 혈당량 변화와는 상관관계가 미약한데<sup>2,5,24</sup>, 이것은 혈액 단백질들이 장시간에 걸쳐서 혈당에 노출되면서 비효소적인 기전에 의해 서서히, 그리고 지속적으로 생성되는 것이기 때문이다. 또한 이러한 현상은 혈액내 glycated protein의 농도가 식후성 고혈당증이나 일시적인 glucagon, catecholamines, glucocorticoids, growth hormone 등의 분비에 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다.

당뇨병 개에 대해서도 혈청 glycosylated albumin<sup>30,45</sup>, 혈청 fructosamine<sup>6,17,18,22,37</sup>, hemoglobin A<sub>1</sub> 또는 hemoglobin A<sub>1c</sub><sup>16,31,41</sup>를 측정하여 과거의 누적 평균혈당량을 평가하려는 시도가 이루어졌다. Fructosamine은 1-amino-1-deoxyfructose의 통칭으로서 Johnson 등<sup>19</sup>에 의해 그 측정법이 처음 개발되었다. Johnson 등<sup>19</sup>이 개발한 측정원리는 fructosamine이 알카리 환경에서 nitroblue tetrazolium(NBT)을 환원하여 formazan 색소를 생성하는 것이다. 그 후 Tas와 El Din<sup>42</sup>은 formazan의 용해도를 증가시키고, 지혈증의 영향을 배제하기 위해 세제를 시약에 첨가하는 개량법을 개발하였다. 이 두 가지 방법은 kinetic형 측정법이기 때문에 반복적인 정확한 timing이 필수적이고, 따라서 다수의 검체를 수동식으로 측정하기에는 불편하다. 한편 Rosenthal<sup>38</sup>은 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride(INT)를 기질로 사용하는 end point형 측정법을 개발하였는데 end point형 측정법은 반복적인 정확한 timing이 필요하지 않기 때문에 수동식으로 측정하기 편리한 장점이 있다. 이 연구에서 저자들은 fructosamine의 세 가지 측정방법에 대한 검토를 하여 수의학 분야에서 이용하기에 적합한 측정방법을 선택하고 당뇨병의 진단과 당혈중 제어의 감시에 이용하기 위해 이 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

실험실 조건에 맞는 측정법을 선택하기 위해 아래와 같이 세 가지 측정법을 비교 실험하였다.

### End point형 측정법(Rosenthal<sup>38</sup>)

기질로써 INT를 사용한 Rosenthal<sup>38</sup>의 방법은 end point형 측정이기 때문에 kinetic형처럼 정확한 timing을 요구하지 않는 점이 수동식으로 측정하기에 편리해서 제일 먼저 검토의 대상으로 하였다. 이 방법의 시약과

기본적인 절차는 아래와 같이 하였다.

**시약**

**Tetrazolium 발색시약:** Carbonate 완충액(pH 10.35, 0.1 mol/L)에 INT를 0.57 mmol/L로 용해하여 사용하였다.

**시료 전처리 시약:** 0.4 N NaOH 용액을 사용하였다.

**표준용액:** Bovine serum albumin을 생리적식염수에 4%(W/V)로 용해한 후 이 용액에 1-deoxy-1-morpholino-fructose(DMF)를 2 mmol/L가 되도록 용해하여 사용하였다.

**Carbonate 완충액:** pH 10.35, 0.1 mol/L

**정지액:** 1 N HCl

**절차**

혈청(시료) 또는 표준액 500 µl을 전처리 시약 50 µl와 혼합한 후 실온에서 30분간 정치한 다음 Fig 1과 같은 절차에 의해 측정하였다.

$$\text{Fructosamine 농도(DMF로서)} = 2 \times \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}}$$

이 측정 방법의 동시재현성을 조사하기 위해 fructosamine 농도가 각각 1.87, 2.14 및 2.16 mmol/L인 3개의 pooled serum에 대해 각각 7~8회씩 측정하여 변이계수를 산출하였다.

이 방법으로 측정할 때 EDTA 처리 혈장을 시료로 사용하여도 재현성이 좋은지 확인하기 위해 4개의 EDTA 처리 혈장에 대해 fructosamine 농도를 각각 2회 측정하여 t-검정을 실시하였다.

혈청을 사용했을 때에는 동시재현성이 양호하였으나 혈장을 사용할 때 반복간 현저한 차이가 나타나는 원인을 규명하기 위해 혈청 맹검과 EDTA-처리혈장 맹검에 정지액을 첨가한 후 변화를 육안으로 관찰하였다.

혈청과 달리 EDTA-처리혈장에서만 맹검에서 혼탁이 발생하는 원인을 규명하기 위해 혈장을 56°C의 항온수조에서 5분간 가온한 후 원심분리하여 얻은 상청

Serum or Standard solution	
Prepared sample	20 µl
Tetrazolium solution	1 ml
Mix and stand at room temperature for 15 minutes	
Stopping solution	2 ml
Measure absorbance at 500 nm within 30 minutes.	

**Fig 1.** Procedure for measuring fructosamine by end point type method of Rosenthal<sup>38</sup>.

액에 정지액을 첨가하여 변화를 관찰하였다.

혈청 시료를 사용할 때 이 방법의 일차재현성을 조사하기 위해 fructosamine 농도가 각각 1.96~2.30 mmol/L인 4개의 혈청에 대해 6회 반복측정하여 변이계수를 산출하였다.

**Kinetic형 측정법(Tas와 El Din<sup>42</sup>)**

이 방법의 시약과 기본적인 절차는 아래와 같이 하였다.

**시약**

**Tetrazolium 발색시약:** Carbonate 완충액(pH 10.3, 0.1 mol/L)에 NBT를 0.5 mmol/L의 농도로 용해하여 사용하였다.

**세제용액:** Carbonate 완충액(pH 10.3, 0.1 mol/L)에 Nonidet-40을 최종농도가 30 ml/L이 되도록 첨가하여 사용하였다.

**표준액:** Dihydroxyacetone(DHA) 300 또는 600 µmol/L 용액을 사용하였다.

**절차**

혈청 또는 표준용액 120 µl에 tetrazolium 용액과 세제용액을 각각 1.2 ml씩 혼합한 후 37°C에서 반응시키면서 반응시작 후 정확하게 10분과 15분에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig 2).

Fructosamine 농도(DHA로서)

$$= \text{표준액농도} \times \frac{\Delta \text{시료 } 525 \text{ nm}/5 \text{분}}{\Delta \text{표준액 } 525 \text{ nm}/5 \text{분}} - \text{urate의 영향}$$

이 방법에 있어서 ascorbic acid와 glutathione이 formazan 색소 생성에 미치는 경시적인 영향을 조사하기 위해 2.0 mg/dl의 ascorbic acid 용액, 0.9 mmol/L의 glutathione 용액 및 2 mmol/L의 DMF용액 120 µl씩을 각각 NBT 발색시약 1.2 ml, Nonidet 세제용액 1.2 ml과 혼합한 후, 37°C에서 반응시키면서, 1분 간격으로 30분간 흡광도의 변화를 조사하였다.

표준물질인 DHA의 linearity를 조사하기 위해 300, 600, 900 및 1200 µmol/L 용액을 제조하여 525 nm에

Serum or Standard solution	120 µl
Tetrazolium solution	1.2 ml
Detergent solution	1.2 ml

Keep temperature of cuvette holder at 37°C constantly.

Measure absorbance exactly 10 and 15 minutes after start of reaction at 525 nm.

**Fig 2.** Procedure for measuring fructosamine by kinetic type method of Tas and El Din<sup>42</sup>.

서 흡광도를 조사하였다.

이 측정법의 동시재현성을 파악하기 위해 3개의 혈청에 대해 1회 3반복씩 3~4회 측정하여 변이계수를 조사하였다. 또한 일차재현성을 파악하기 위해 fructosamine 농도가 DHA로서 각각 511, 582 및 601  $\mu\text{mol/L}$ 인 3개의 혈청에 대해 10회 반복 측정하여 변이계수를 조사하였다.

이 방법으로 측정할 때 uric acid의 영향을 조사하기 위해 100, 200 및 300  $\mu\text{mol/L}$ 의 uric acid용액을 만든 후 혈청 대신 각 농도의 uric acid 용액을 취하여 반응을 시켜서 흡광도를 측정하였다.

세제를 첨가한 NBT 용액으로 fructosamine을 측정할 때 나타나는 uric acid의 영향을 제거하기 위해 첨가해야 할 uricase의 양을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 즉, 시약을 아래와 같이 네 가지로 준비하여 4개의 시험관 각각에 한 가지씩의 시약을 2.5 ml씩 취하고, 600  $\mu\text{mol/L}$ 의 uric acid 100  $\mu\text{l}$ 씩을 각각의 시험관에 첨가한 후 37°C, 525 nm에서 흡광도의 변화를 1분 간격으로 15분간 측정하였다. 그리고 이 실험에서부터는 세제로서 Nonidet-40 대신에 Igepal을 Nonidet-40과 같은 농도로 희석하여 사용하였다.

Component	Reagent			
	1	2	3	4
NBT 0.5 mmol	1 Vol	1 Vol	1 Vol	1 Vol
Carbonate buffer				1 Vol
Igepal	1 Vol	1 Vol	1 Vol	
Uricase*	2.4	28.8		

\*: (final conc. in U/L).

세제를 사용할 때 발생하는 uric acid의 fructosamine 활성이 Rosenthal<sup>38,39</sup>의 NaOH 전처리 방법에 의해 제거되는지 확인하기 위해 200 mole의 uric acid 용액을 0.4N NaOH와 10:1로 혼합하여 30분간 전처리한 후, 세제를 함유하는 NBT용액과 혼합한 다음 37°C에서 2분 간격으로 흡광도의 변화를 조사하였다.

### Kinetic형 측정법(Johnson 등<sup>19</sup>)

NBT를 기질로 사용한 Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법의 시약과 기본적인 절차는 아래와 같이 하였다.

#### 시약

**Tetrazolium 발색시약:** Carbonate buffer(0.1 mol/L, pH 10.35)에 NBT를 0.25 mol/L의 농도로 용해하여 사용하였다. Johnson 등<sup>19</sup>은 pH 10.8 완충액을 사용하였으나 이 실험에서는 완충액의 pH를 낮추면 시료 중 ascorbic acid에 의한 흡광도의 증가 정도를 감소시킬

Serum or Standard solution	250 $\mu\text{l}$
Tetrazolium solution	2.5 ml

Keep temperature of cuvette holder at 37°C constantly.

Measure absorbance exactly 10 and 15 minutes after start of reaction at 525 nm.

**Fig 3.** Procedure for measuring fructosamine by kinetic type method of Johnson et al<sup>37</sup>.

수 있기 때문에<sup>3</sup> 10.35로 개량하여 사용하였다.

**표준액:** DMF 표준액은 Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형 측정법에서와 동일하게 제조하여 사용하였다.

#### 절차

혈청 또는 표준용액 250  $\mu\text{l}$ 에 tetrazolium 용액 2.5 ml를 혼합한 후 37°C에서 반응시키면서 반응시작 후 정확하게 10분과 15분에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig 3).

Fructosamine 농도(DMF로서)

$$= \text{표준액의 농도} \times \frac{\Delta \text{시료 } 525 \text{ nm}/5\text{분}}{\Delta \text{표준액 } 525 \text{ nm}/5\text{분}}$$

Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정을 할 때 표준액으로 사용되는 DMF용액의 직선성을 조사하기 위해 2, 4 및 6 mmol/L의 DMF 표준액을 제조하여 각 표준액에 대해 37°C에서 반응시작 후 10분과 15분에 흡광도를 측정하여 5분간의 흡광도 변화를 측정하였으며, 이 실험을 3회 반복하여 평균치를 plot하여 직선성을 조사하였다.

이 측정법의 동시재현성을 조사하기 위해 3개의 혈청에 대해 37°C에서 반응 시작 후 10분과 15분 사이의 흡광도 변화를 1회 3반복씩 3회 측정하여 변이계수를 조사하였다. 또한 일차재현성을 조사하기 위해 fructosamine 농도가 DMF로서 각각 1.90~2.37 mmol/L인 3개의 혈청에 대해 10회 반복측정하여 변이계수를 계산하였다.

지방혈증이 이 측정법에 미치는 영향을 조사하기 위해 12시간 절식한 9두의 개에 체중 kg당 옥수수 식용유 3 ml씩을 경구투여하고, 투여 전과 투여 후 2시간에 혈액을 채취하여 각각 혈청을 분리한 후 혈청 중의 fructosamine 농도를 측정하여, 식용유 투여 전과 후의 fructosamine 농도를 t-검정을 하여 비교하였다.

## 결 과

Fructosamine 농도가 DMF로서 각각 1.87, 2.14 및 2.16 mmol/L인 3개의 pooled serum에 대해 Rosenthal<sup>38</sup>

**Table 1.** Within-run imprecision when serum fructosamine was measured by end point type method of Rosenthal<sup>38</sup>

Concentration* of fructosamine	Serum samples		
	1	2	3
Mean ± SD	1.87 ± 0.07	2.14 ± 0.04	2.16 ± 0.06
No. of test	8	7	8
CV(%)	3.5	2.4	2.7

\*Unit: mmol/L.

**Table 2.** Between-run variation when fructosamine in EDTA-plasma was measured by end point type method of Rosenthal<sup>38</sup> (unit: mmol/L)

Plasma sample	Run 1	Run 2
1	2.28	1.87
2	2.23	1.96
3	2.36	1.25
4	2.07	0.80
Mean ± SD	2.24 ± 0.12	1.47 ± 0.55*

\*Significantly different between run (p<0.05).

의 end point형 측정법으로 각각 7~8회씩 fructosamine 값을 측정한 결과 변이계수가 2.4~3.5%로서 동시재현성이 양호하였다(Table 1).

시료로서 혈청 대신 혈장을 사용할 수 있는지 조사하기 위해 4개의 EDTA 처리 혈장에 대해 Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형 측정법으로 fructosamine 농도를 각각 2회씩 측정하여 t-검정을 한 결과 각 회의 평균치간에 5% 수준에서 유의성이 있는 차이를 나타내었다(Table 2).

이 방법으로 fructosamine을 측정하면 혈장을 시료로 사용할 때 반복간 현저한 차이가 나타나는 원인을 규명하기 위해 혈청 멩검과 EDTA-처리혈장 멩검에 정지액을 첨가하였더니 혈청 멩검에서는 혼탁이 발생하지 않고 EDTA-처리혈장 멩검에서만 혼탁이 발생하였다. 따라서 혈장시료를 사용할 때 반복간 측정치에 차이가 나는 것은 반복할 때마다 반응온도와 같은 미세한 조건의 차이에 의해 혼탁이 생기는 정도에 차이가 나기 때문인 것으로 생각된다. Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형으로 측정할 때 혈청과 달리 EDTA-처리 혈장에서만 멩검 cuvette에 혼탁이 발생하는 원인을 규명하기 위해 EDTA-처리 혈장을 56°C에서 5분간 가온한 후 원심분리하여 얻은 상청액에 정지액을 첨가한 결과 혼탁이 발생하지 않았다. 따라서 혈장시료를 사용할 때 발생하는 혼탁은 fibrinogen이 정지액 중의 산에 의해 응고되기 때문인 것으로 판단되었다.

혈청 시료를 사용할 때 Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형 측

**Table 3.** Between-run imprecision when serum fructosamine was measured by end point type method of Rosenthal<sup>38</sup>

Concentration* of fructosamine	Serum samples			
	1	2	3	4
Mean ± SD	1.96	2.20	2.25	2.30
	± 0.16	± 0.15	± 0.19	± 0.16
No. of test	6	6	6	6
CV(%)	8.1	6.8	8.5	6.9

\*Unit: mmol/L.

정법의 일차재현성을 조사하기 위해 fructosamine 농도가 DMF로서 각각 1.96~2.30 mmol/L인 4개의 혈청에 대해 6회 반복측정한 결과 변이계수가 6.8~8.5%로서 비교적 높은 편이었다(Table 3).

Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형 측정법에 있어서 동시재현성보다 일차재현성의 변이계수가 높은 원인을 파악하기 위해 반응이 끝난 시험관을 관찰한 결과 정지액을 가했을 때 혼탁한 부유 입자가 발견되는데 이것은 혈장을 사용했을 때 보이는 우유빛의 혼탁과는 차이가 있었다. 작은 입자가 많을 경우가 큰 입자가 적을 경우보다 흡광도가 높아지는 경향을 보였다. 그리고 같은 시료를 사용하여도 반복에 따라 혼탁한 부유물질이 생기는 양상에 차이가 있었는데 이러한 현상이 일차재현성의 변이계수를 증가시키는 요인으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 INT를 기질로 사용하고 정지액을 첨가하는 Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형 측정법은 일차재현성이 나빠서 문제가 있는 것으로 생각된다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>의 kinetic형 측정법에 있어서 ascorbic acid와 glutathione이 formazan 색소 생성에 미치는 경시적인 영향을 조사하기 위해 2.0 mg/dl의 ascorbic acid 용액, 0.9 mmol/L의 glutathione 용액 및 2 mmol/L의 DMF용액 120 µl씩을 각각 NBT 발색시약 1.2 ml 및 Nonidet 세제용액 1.2 ml과 혼합한 후, 37°C에서 반응시키면서 1분 간격으로 30분간 분광광도계로 525 nm에서 흡광도의 변화를 조사한 결과는 Fig 4와 같았다. DMF는 반응 시작 후 지속적으로 직선형으로 흡광도를 증가시켰다. Ascorbic acid는 반응 시작 후 5분까지는 비교적 빠른 속도로 흡광도를 증가시켰지만 그 후에는 반응 속도가 급격히 감소했고, 10분 이후에는 반응속도가 아주 완만하였다. Glutathione은 반응 시작 후 지속적으로 직선형으로 흡광도를 증가시켰지만 반응속도는 DMF에 비해 훨씬 느렸다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>의 kinetic형 측정법에 있어서 표준물

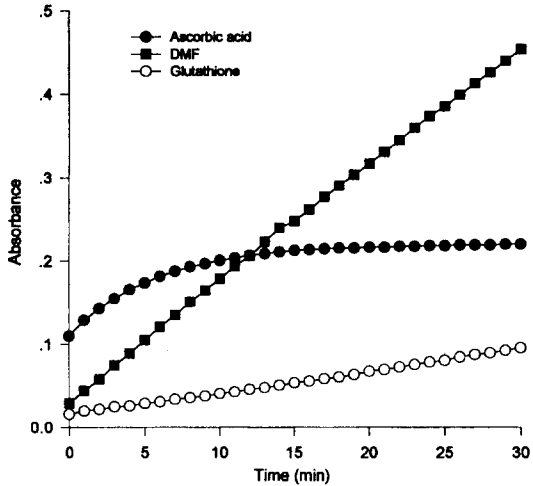


Fig 4. Influence of 2 mg/dl ascorbic acid, 0.9 mmol glutathione and 2 mmol DMF on formazan color formation with time.

질인 DHA 용액의 흡광도는 900 μmol/L까지는 직선성을 나타내었으나 그 이상의 농도에서는 직선성을 나타내지 않아서 900 μmol/L를 초과하는 시료는 희석할 필요가 인정되었다(Fig 5).

Tas와 El Din<sup>42</sup>의 kinetic형 측정법에 의한 동시재현성을 조사하기 위해 3개의 혈청에 대해 1회 3반복씩 3~4회 측정하여 계산한 변이계수가 1.3~3.0%이었다 (Table 4).

Fructosamine 농도가 DHA로서 각각 511, 582, 601 μmol/L인 3개의 혈청에 대해 10회 반복 측정하여 Tas와 El Din<sup>42</sup>의 측정법의 일차재현성을 조사한 결과 변이계수는 3.4~3.9%이었다(Table 5).

이 방법에서 혈청내 uric acid가 흡광도를 증가시키는 정도를 파악하기 위해 100, 200, 300 μmol/L의 uric acid 용액을 만든 후 혈청 대신 각 농도의 uric acid용액을 취하여 반응을 시킨 결과 100, 200 및 300

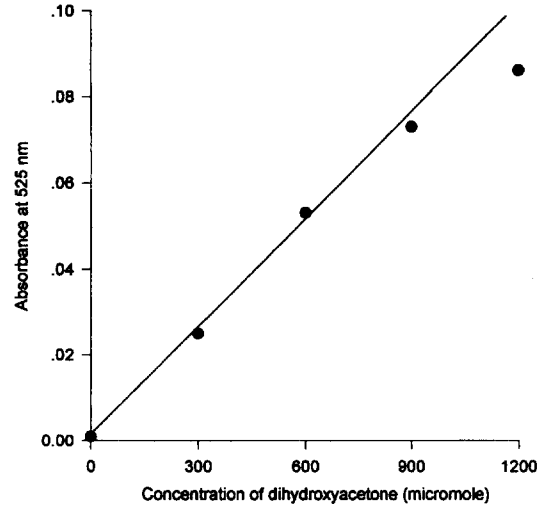


Fig 5. Linearity of dihydroxyacetone.

μmol/L의 uric acid용액은 각각 DHA로서 142, 239 및 315 mol에 해당하는 fructosamine activity를 나타내었다(Fig. 6).

Tas와 El Din<sup>42</sup>의 방법으로 fructosamine을 측정할 때 나타나는 uric acid의 영향을 시약에 uricase를 첨가하여 제거하려고 할 때 첨가해야 할 양을 파악하기 위해 네 가지의 시약, 즉 NBT에 세제와 uricase(최종농도 2.4 U/L)를 첨가한 시약1, NBT에 세제와 uricase(최종농도 28.8 U/L)를 첨가한 시약2, NBT에 세제만 첨가한 시약3 및 NBT에 아무것도 첨가하지 않은 시약4를 제조하였으며, 각각의 시약 2.5 ml씩을 각각의 시험관에 취한 후 600 mol/L의 uric acid 100 μl씩을 첨가한 후 37°C, 525 nm에서 흡광도의 변화를 1분 간격으로 15분간 측정한 결과는 Fig. 7과 같았다. NBT에 아무것도 첨가하지 않은 시약4는 흡광도를 전혀 증가시키지 않았으나 세제만 첨가한 시약3은 흡광도를 신속히 증가시켜서 세제가 uricase에 의한 흡광도 증가

Table 4. Within-run imprecision when serum fructosamine was measured by kinetic method of Tas and El Din<sup>42</sup> (unit: μmol/L)

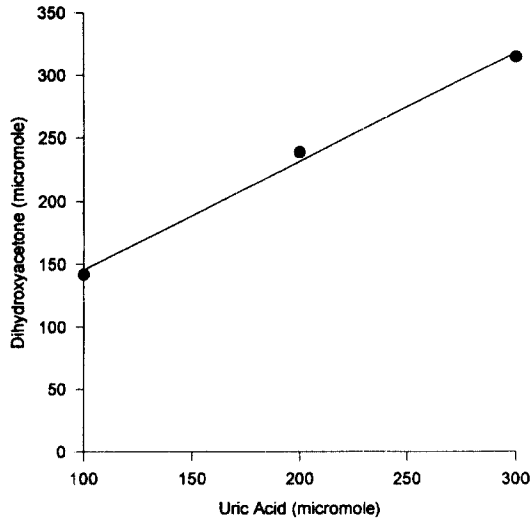
Samples	Values	Round 1	Round 2	Round 3	Round 4
1	Mean ± SD*	577 ± 10.2	517 ± 7.5	462 ± 5.9	
	CV (%)	1.8	1.5	1.3	
2	Mean ± SD*	471 ± 14.3	514 ± 14	518 ± 15	477 ± 6.9
	CV (%)	3.0	2.7	2.9	1.5
3	Mean ± SD*	462 ± 5.9	518 ± 15	493 ± 12.7	
	CV (%)	1.3	2.9	2.6	

\*: Each sample was tested 3 times.

**Table 5.** Between-run imprecision when serum fructosamine was measured by kinetic method of Tas and El Din<sup>42</sup>

Concentration* of fructosamine	Serum samples		
	1	2	3
Mean ± SD	511 ± 18	582 ± 19	601 ± 23
No. of test	10	10	10
CV (%)	3.4	3.4	3.9

\*Unit: μmol/L.

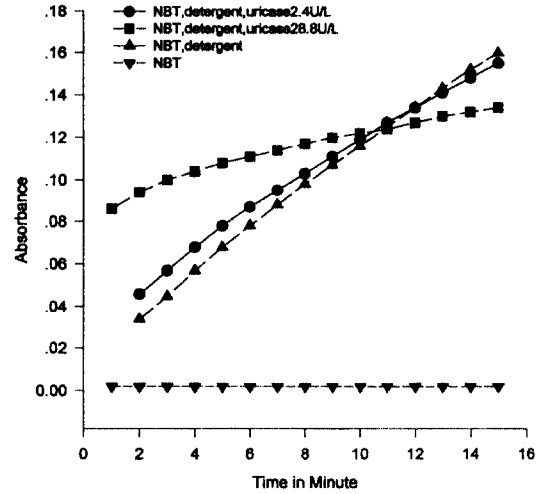


**Fig 6.** Fructosamine activity (as dihydroxyacetone) of uric acid when detergent is added in reagent.

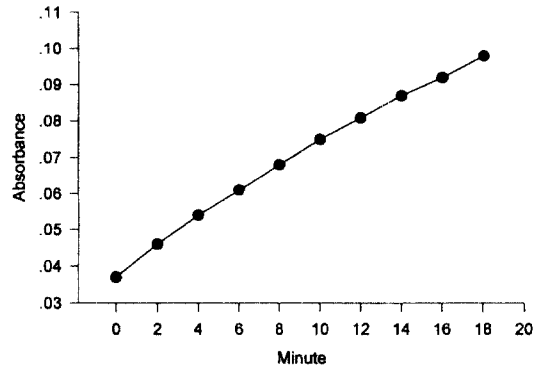
의 원인임을 제시하였다. NBT에 세제와 uricase 2.4 U/L를 첨가한 시약1은 시간이 경과할수록 흡광도의 증가속도가 감소했으나 그 감소폭이 아주 미미하였다. NBT에 세제와 uricase 28.8 U/L를 첨가한 시약2는 흡광도의 증가속도가 시약1보다 훨씬 감소했으나, 흡광도의 증가를 완벽하게 방지하지는 못했다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>의 측정방법에서 세제를 사용할 때 uric acid가 흡광도를 증가시키는 문제가 NaOH를 이용한 시료의 전처리에 의해 제거되는지 확인하기 위해 200 μmol/L의 uric acid용액을 0.4N NaOH와 10 : 1로 혼합하여 30분간 전처리하여 시약과 혼합한 다음 흡광도의 변화를 조사한 결과 흡광도는 uric acid에 의해 지속적으로 증가하였으며 NaOH 전처리는 전혀 효과가 없었다(Fig 8).

Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정을 할 때 표준액으로 사용되는 DMF용액의 직선성을 조사하기 위해 2, 4 및 6 mmol/L의 DMF 표준액을 제조하여 각 표준액에



**Fig 7.** Effects of detergent and uricase on formazan formation by uric acid.



**Fig 8.** Increase of absorbance when uric acid was treated with NaOH and then reacted with NBT solution containing detergent.

대해 37°C에서 반응 시작 후 10분과 15분에 흡광도를 측정하여 5분간의 흡광도 변화를 측정하였으며, 이 실험을 3회 반복하여 평균치를 plot한 결과 흡광도의 변화는 Fig 9와 같이 이 실험의 한계인 6 mmol/L까지 직선성을 나타내었다.

Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법의 동시재현성을 조사하기 위해 3개의 혈청에 대해 37°C에서 반응 시작 후 10분과 15분 사이의 흡광도 변화를 1회 3반복씩 3회 측정하여 조사한 변이계수는 0~1.8%이었다(Table 6).

혈청 시료를 사용할 때 Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법의 일차재현성을 조사하기 위해 fructosamine 농도가 각각 1.90~2.37 mmol인 3개의 개 혈청에 대해 10회 반복측정한 결과 변이계수가 3.1~6.8%이었다(Table 7).

지방혈증이 Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측법에 미치는

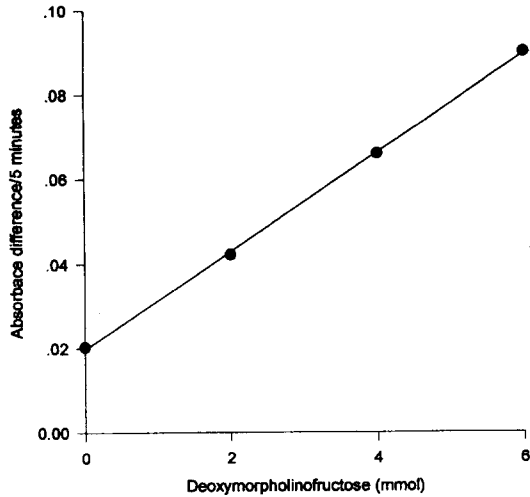


Fig 9. Standard plot. Fructosamine standards were measured by Johnson's kinetic method.

Table 6. Within-run imprecision when absorbance difference between 10 and 15 minutes after start of the reaction was measured by kinetic method of Johnson *et al.*<sup>19</sup>

Samples	Values	Round 1	Round 2	Round 3
1	Mean $\pm$ SD*	0.0763	0.0903	0.0877
		$\pm 0.0006$	$\pm 0.0006$	$\pm 0.0015$
	CV (%)	0.8	0.6	1.3
2	Mean $\pm$ SD*	0.0587	0.0583	0.0577
		$\pm 0.0006$	$\pm 0.0006$	$\pm 0.0006$
	CV (%)	1.0	1.0	1.0
3	Mean $\pm$ SD*	0.0573	0.0643	0.0640
		$\pm 0.0006$	$\pm 0.0012$	$\pm 0$
	CV (%)	1.0	1.8	0

\*: Each serum was tested 3 times.

Table 7. Between-run imprecision when serum fructosamine was measured by kinetic method of Johnson *et al.*<sup>19</sup>

Concentration* of fructosamine	Serum samples		
	1	2	3
Mean $\pm$ SD	2.37 $\pm$ 0.16	1.90 $\pm$ 0.09	1.91 $\pm$ 0.05
No. of test	10	10	10
CV (%)	6.8	4.7	3.1

\*Unit: mmol/L.

영향을 조사하기 위해 9두의 개에 식용유를 경구투여하여 지방혈증을 유발하기 전과 후의 혈청을 수확하여 fructosamine의 농도를 측정 후 t-검정으로 비교한 결과 식용유 투여 전후의 성적에 통계적인 유의차가 없었으며, 투여 후 fructosamine 농도가 투여 전에

Table 8. Comparison of serum fructosamine concentration measured by kinetic method of Johnson *et al.*<sup>19</sup> before and after oral administration of 3 ml of corn oil per kilogram body weight in nine dogs (unit: mmol/L)

	Pre-treatment	Post-treatment
Mean $\pm$ SD	1.65 $\pm$ 0.43	1.57 $\pm$ 0.47
No. of test	9	9

비해 약간 낮은 편이었다(Table 8).

## 고 찰

Fructosamine은 1-amino-1-deoxyfructose의 통칭이다. Fructosamine은 당과 단백질의 비효소적 반응에 의해 생성되는 ketoamine이다. 당뇨병 환자의 체내에서는 정상인에 비해 알부민 및 다른 혈장단백질의 glycation이 증가한다. 그렇기 때문에 fructosamine은 장기간에 걸친 혈당량의 평균치를 추정하는데 이용된다.<sup>26</sup>

혈청 fructosamine의 측정 방법은 Johnson 등<sup>19</sup>에 의해 처음 개발된 후 여러 연구자에 의해 개량되었다.

Rosenthal은 INT를 기질로 사용하여 혈청 fructosamine을 측정하는 end point형 측정법을 개발하였다.<sup>38,39</sup> End point형 측정법은 절차상 정확한 timing을 요구하지 않기 때문에 수동식으로 측정해야 하는 실험실에서 이용하기 편리하다는 장점이 있다. 혈청을 시료로 사용할 때 Rosenthal<sup>38</sup>의 방법의 동시재현성은 변이계수가 2.4~3.5%로서 양호한 편이었다.

그러나 EDTA-혈장을 시료로 사용하여 측정하면 반복간에 유의차를 나타내었고, 그 이유는 end point형 측정을 하기 위해 정지액으로서 첨가하는 산에 의해 혈장 중의 fibrinogen이 응고하기 때문인 것을 알 수 있었다. Rosenthal<sup>39</sup>은 혈청, EDTA-혈장, heparin-혈장을 모두 시료로 사용할 수 있다고 하였으나, end point법으로 측정하기 위해서는 산을 첨가해야 하기 때문에 혈장을 사용하는 것이 불가능한 것으로 판단되었다.

혈청 시료를 사용할 때 Rosenthal<sup>38</sup>의 end point형 측정법의 일차재현성을 조사한 결과 변이계수가 6.8~8.5%로서 나쁜 편이었다. 그 원인은 정지액을 가했을 때 혈장을 사용할 때에는 상이한 혼탁한 부유 입자가 발견되었고, 측정할 때마다 부유물질이 생기는 양상이 다르기 때문인 것으로 생각된다. Cuvette holder의 반응온도를 매번 일정하게 유지하기 위해 thermostatic circulator를 사용했는데도 실온의 변화에 따라 반응조건의 미세한 차이가 나타나는 것이 문제인 것으로



생각되며, 산성 정지액을 사용하는 end point법으로는 이 문제를 해결할 방법이 없는 것으로 생각된다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>은 NBT를 기질로 사용하는 Johnson 등<sup>19</sup>의 측정법을 개량하였는데, 이 개량법의 주안점은 NBT가 혈청 중의 fructosamine에 의해 환원되면서 생성되는 formazan 색소의 용해성을 세제를 첨가하여 증가시킴으로써 formazan 색소의 불완전 용해로 인한 오차와 고지혈증으로 인한 오차를 최소화하는 것이다. 이 방법은 혈청 시료에 대해 Rosenthal<sup>38,39</sup>의 측정법에서와 같은 NaOH 전처리를 하지 않기 때문에 혈청내 fructosamine 이외의 환원물질의 영향이 반응 시작 전에 제거되지 않는다. 그 대신 이 방법에서는 fructosamine 이외의 환원물질이 반응 시작 후 10분까지 급속히 formazan을 생성하고 그 이후에는 반응속도가 늦어진다는데 착안하여 반응 시작 후 10분과 15분에 흡광도를 측정하여 fructosamine 값을 측정하는 것이 특징이다.

혈청내에 있는 fructosamine 이외의 환원물질 중 fructosamine 측정에 영향을 미치는 주요 물질은 ascorbic acid와 glutathione으로 알려져있다<sup>38,39</sup>. Tas와 El Din<sup>42</sup>의 방법으로 측정할 때 혈청 중에 있는 ascorbic acid와 glutathione이 formazan 색소 생성에 미치는 경시적인 영향을 조사하기 위해 2.0 mg/dl의 ascorbic acid 용액, 0.9 mmol/L의 glutathione 용액 및 2 mmol/L의 DMF 표준액을 각각 혈청 시료 대신 사용하여 반응을 시키면서 흡광도의 변화를 조사했다. 그 결과 DMF표준액은 반응 시작 후 지속적으로 직선형으로 흡광도를 증가시켰다. Ascorbic acid는 반응 시작 후 5분까지는 비교적 빠른 속도로 흡광도를 증가시켰지만 그 후에는 반응 속도가 급격히 감소했고, 10분 이후에는 ascorbic acid에 의한 흡광도의 증가가 아주 완만하였다. Glutathione은 반응 시작 후 지속적으로 직선형으로 흡광도를 증가시켰지만 반응속도는 DMF에 비해 훨씬 느렸다. Lee 등<sup>28</sup>이 암캐와 수캐의 직시시 혈장 ascorbic acid 농도는 각각 0.717~0.093 및 0.809~0.099 mg/dl이고 사료 섭취 후 2시간의 혈장 ascorbic acid 농도는 각각 0.781~0.097 및 0.858~0.114 mg/dl이라고 보고한 것을 고려하면 이 방법에서 반응 시작 후 10분터 흡광도를 측정함으로써 혈청내 ascorbic acid에 의한 영향은 충분히 제거할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 Maede<sup>29</sup> 등이 개의 혈장 glutathione 농도가 0.83~0.38 mol/L라고 보고한 것을 고려하면 혈청내 glutathione의 영향은 전혀 문제가 안 될 것으로 사료된다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>의 kinetic형 측정법에 의한 동시재현성은 변이계수가 1.3~3.0%로서 양호하였으며, 일차재

현성도 변이계수가 3.4~3.9%로서 양호하였다. 이 방법의 동시재현성과 일차재현성이 양호한 이유는 산성 정지액을 사용하지 않아서 혼탁한 부유물이 생성되지 않기 때문인 것으로 생각된다.

이 방법에서 혈청내 uric acid가 흡광도를 증가시키는 정도를 파악하기 위해 100, 200, 300 μmol/L의 uric acid 용액을 만든 후 혈청 대신 각 농도의 uric acid용액을 취하여 반응을 시킨 결과 100, 200, 300 μmol/L의 uric acid용액은 각각 DHA로서 142, 239, 315 μmol/L에 해당하는 fructosamine activity를 나타내었다. Kaneko<sup>21</sup>가 개의 혈청 urate 농도가 0~119 μmol/L라고 한 것을 고려하면 이 방법으로 측정할 때 어떤 방법으로 든 urate의 영향을 제거하지 않으면 안될 것으로 생각된다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>은 세제를 첨가하여 fructosamine을 측정할 때 나타나는 uric acid의 영향을 제거하기 위해 혈청내의 uric acid의 농도를 측정 후 산술적으로 교정하는 방법을 제안하고 있지만 이 방법은 uric acid를 별도로 측정하는 노력과 비용이 추가된다. Kruse-Jarres 등<sup>26</sup>과 Baker 등<sup>4</sup>은 세제를 첨가할 때 uric acid에 의해 발생하는 문제를 해결하기 위해 시약에 uricase를 첨가하여 해결하였다. 저자는 이 문제를 uricase를 첨가하여 제거하기 위해 필요한 uricase의 양을 확인하기 위해 세제를 함유하고, uricase의 최종농도가 2.4 U/L 또는 28.8 U/L인 NBT 발색시약을 제조하여 발색시약 2.5 ml에 600 μmol/L인 uric acid 용액 100 μl를 첨가하여 37°C에서 흡광도의 변화를 관찰하였는데 uricase의 농도가 28.8 U/L일 때도 uric acid의 영향이 완벽하게 제거되지 않아서, 충분한 양의 uricase를 사용하려면 상당히 많은 비용이 들 것으로 생각되었다.

Rosenthal<sup>38,39</sup>이 NaOH로 혈청을 전처리해서 fructosamine 이외의 환원물질의 영향을 제거할 수 있었던 것을 고려하여 uric acid용액을 NaOH로 전처리한 다음 이것을 시료로 사용하여 반응을 조사하였는데 NaOH는 uric acid의 영향을 제거하는데 효과가 없었다.

Tas와 El Din<sup>42</sup>, Kruse-Jarres 등<sup>26</sup> 및 Baker 등<sup>4</sup>이 NBT 용액에 세제를 첨가한 최대의 이유는 고지혈증으로 인한 오차를 감소시키는 것이다. 그런데 Kallner<sup>20</sup>는 세제를 첨가한 방법과 첨가하지 않은 방법으로 혈청 fructosamine 농도를 측정하여 비교한 결과 두 방법의 상관관계가 0.977로서 아주 좋기 때문에 NBT 발색시약에 구태어 세제를 첨가하고, 그 때문에 uricase를 또 첨가해야 할 충분한 근거가 없다고 하였다. 그리고 Johnson 등<sup>19</sup>은 초기 흡광도가 2.0을 초과할 정도의 고지혈증이 아니면 fructosamine 측정을 간섭하지 않는

다고 하였다. 저자들은 지방혈증이 Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법에 미치는 영향을 조사하기 위해 9두의 개에 식용유를 경구투여하여 지방혈증을 유발하고, 지방혈증 유발 전과 후의 혈청에 대해 fructosamine 농도를 측정된 결과 식용유 투여 후의 fructosamine 농도가 투여 전에 비해 약간 낮은 편이었지만 통계적인 유의차가 없었다. 이 결과와 Johnson 등<sup>19</sup>과 Kallner<sup>20</sup>의 보고를 종합하면 구태어 NBT 발색시약에 세제를 첨가할 필요가 없을 것으로 판단된다.

Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법으로 혈청 fructosamine 농도를 측정할 때 동시재현성은 변이계수가 0~1.8%로서 양호하였으며, 일차재현성은 변이계수가 3.1~6.8%로서 Tas와 El Din<sup>42</sup>의 kinetic형 측정법보다 약간 높은 편이지만 비교적 양호한 편이었다. Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법의 검량선이 원점을 통과하지 않았는데 이것은 표준액으로서 4% bovine serum albumin 용액에 DMF를 용해하여 사용하였고, bovine serum albumin이 fructosamine과 같이 NBT를 환원시키는 작용이 있기 때문이다. Johnson 등<sup>19</sup>은 이 영향이 실질적으로 유의성이 없다는 이유로 무시하고 있는데 그것은 혈청 치료도 albumin을 함유하고 있기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 재현성과 경제성을 고려하면 Johnson 등<sup>19</sup>의 kinetic형 측정법이 수의학 분야에서 사용하기 제일 좋을 것으로 판단되었다.

## 결 론

실험실 조건에 적합한 fructosamine 측정방법을 선택하기 위해 세 가지 측정방법을 비교하였다.

INT를 기질로 사용하는 end point형 측정법은 동시재현성을 나타내는 변이계수가 2.4~3.5%로서 양호하였으나 일차재현성을 나타내는 변이계수가 6.8~8.5%로서 좋지 않았다. 그리고 혈청 대신 혈장을 시료로 사용할 경우 정지액 중의 산에 의해 fibrinogen이 응고하면서 혼탁한 부유물을 생성하여 시료로서 적합하지 못했다.

NBT를 기질로 사용하고 발색시약에 세제를 첨가하는 kinetic형 측정법은 혈청을 시료로 사용할 때 동시재현성을 나타내는 변이계수가 1.3~3.0%이고, 일차재현성을 나타내는 변이계수가 3.4~3.9%로서 양호하였다. 이 방법을 사용할 때 나타나는 uric acid의 영향은 발색시약에 uricase를 최종농도가 28.8 U/L가 되도록 첨가하여도 완벽히 제거되지 않았다.

NBT를 기질로 사용하고 발색시약에 세제를 첨가하

지 않는 kinetic형 측정법은 혈청을 시료로 사용할 때 동시재현성을 나타내는 변이계수가 0~1.8%이고, 일차재현성을 나타내는 변이계수가 3.1~6.8%이었다. 이 방법을 사용할 때 고지혈증의 영향을 파악하기 위해 절식한 9두의 개에 옥수수 식용유 3 ml/kg을 경구투여하고, 투여 전과 투여 후에 혈청을 채취하여 fructosamine 농도를 측정된 결과 투여 전과 후의 평균값이 각각 1.65 mmol/L와 1.57 mmol/L로서 통계적인 유의차는 없었다.

따라서 NBT를 기질로 사용하고 발색시약에 세제를 첨가하지 않는 kinetic형 측정법이 경제성 및 재현성을 고려할 때 무난할 것으로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

1. Baker JR, Johnson RN, Scott DJ. Serum fructosamine concentrations in patients with type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus during changes in management. *Br Med J* 1984; 288: 1484-1486.
2. Baker JR, Metcalf PA, Holdaway IM, Johnson RN. Serum fructosamine concentration as measure of blood glucose control in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Br Med J* 1985; 290: 352-355.
3. Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, et al. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin Chem* 1985; 31: 1550-1554.
4. Baker J, Metcalf P, Scragg R, Johnson R. Fructosamine test-plus, a modified fructosamine assay evaluated. *Clin Chem* 1991; 37: 552-556.
5. Baker JR, O'Connor JP, Metcalf PA, et al. Clinical usefulness of estimation of serum fructosamine concentration as a screening test for diabetes mellitus. *Br Med J* 1983; 287: 863-867.
6. Bergamini PF, Boari A, Impala A. Determination of fructosamine in dogs: reference values and observations on animals with diabetes mellitus. *Veterinaria Cremona* 1992; 6: 67-70.
7. Boye N, Ingerslev J. Rapid and inexpensive micro-determination of serum fructosamine results in diabetics, uraemics, diabetics with uraemia and healthy subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 779-783.
8. Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of protein: Relevance to diabetes. *Am J Med* 1981; 70: 325-330.
9. Bunn HF, Haney DN, Kamin S, et al. The biosynthesis of human hemoglobin A1c. *J Clin Invest* 1976; 57: 1652-1659.
10. Duncan BB, Heiss G. Nonenzymatic glycosylation of proteins-A new tool for assessment of cumulative hyperglycemia in epidemiologic studies, past and future. *J Epidemiol* 1984; 120: 169-189.

11. Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA. Plasma carbohydrates. In: Veterinary Laboratory Medicine, 3rd ed. Ames: Iowa State University Press. 1995: 122-129.
12. Dunn PJ, Cole RA, Soeldner RE, *et al.* Temporal relationship of glycosylated haemoglobin concentrations to glucose control in diabetics. *Diabetologia* 1979; 17: 213-220.
13. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986; 314: 1360-1368.
14. Goldstein DE, Parker KM, England JD, *et al.* Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements. *Diabetes* 1982; 31 suppl 3: 70-78.
15. Hindle EJ, Rostron GM, Clark SA, *et al.* Serum fructosamine and glycated haemoglobin measurements in diabetic control. *Arch Dis Child* 1986; 61: 113-117.
16. Hooghuis H, Rodriguez M, Castano M. Ion-exchange microchroma tography and thiobarbituric acid colorimetry for the measurement of canine glycated hemoglobins. *Vet Clin Pathol* 1994; 23: 110-116.
17. Jensen AL. Various protein and albumin corrections of the serum fructosamine concentration in the diagnosis of canine diabetes mellitus. *Vet Res Commun* 1993; 17: 13-23.
18. Jensen AL. Serum fructosamine as a screening test for diabetes mellitus in non-healthy middle-aged to older dogs. *Zentralbl Veterinarmed B* 1994; 41: 480-484.
19. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosyl-protein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 127: 87-95.
20. Kallner A. Influence of triglycerides and urate on methods for determination of fructosamine. *Clin Chim Acta* 1992; 207: 99-106.
21. Kaneko JJ. Appendix VIII. In: Clinical biochemistry of domestic animals, 4th ed. edited by Kaneko JJ, San Diego: Academic Press Inc. 1989: 896-897.
22. Kawamoto M, Kaneko JJ, Heusner AA, *et al.* Relation of fructosamine to serum protein, albumin, and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs. *Am J Vet Res* 1992; 53: 851-855.
23. Kennedy L, Mehl TD, Elder E, *et al.* Nonenzymatic glycosylation of serum and plasma proteins. *Diabetes* 1982; 31 suppl 3: 52-56.
24. Kennedy AL, Merimec TJ. Glycosylated serum protein and hemoglobin A1 levels to measure control of glycemia. *Annals Internal Med* 1981; 95: 56-58.
25. Kirk CA, *et al.* Diagnosis of naturally acquired type I and II diabetes mellitus in cats. *Am J Vet Res* 1993; 54: 463-467.
26. Kruse-Jarres JD, Jauausch J, Lehmann P. A new colorimetric method for the determination of fructosamine. *Lab Med* 1989; 13: 245-253.
27. Leahy JL. Natural history of  $\beta$ -cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care* 1990; 13: 992-1010.
28. Lee AH, Spano JS, Swaim SF, *et al.* Evaluation of plasma and buffy coat ascorbic acid concentrations in dogs before and after a 24-hour fast. *Am J Vet Res* 1986; 47: 2000-2003.
29. Myede Y, Kasai N, Taniguchi N. Hereditary high concentration of glutathione in canine erythrocytes associated with high accumulation of glutamate, glutamine, and aspartate. *Blood* 1983; 59: 883-889.
30. Mahaffey EA, Buonanno AM, Cronelius LM. Glycosylated albumin and serum protein in diabetic dogs. *Am J Vet Res* 1984; 45: 2126-2128.
31. Mahaffey EA and Cornelius CM. Glycosylated hemoglobin in diabetic and nondiabetic dogs. *JAVMA* 1982; 180: 635-637.
32. Mayer TK, Freedman ZR. Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 147-184.
33. Nelson RW. Diabetes mellitus. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1995: 1510-1537.
34. Nelson RW, Feldman EC. Diseases of the endocrine pancreas. In: Handbook of Small Animal Practice. edited by Morgan RV. New York: Churchill Livingstone. 1988: 527-535.
35. Palmer JP, McCulloch DK. Prediction and prevention of IDDM. *Diabetes* 1991; 40: 943-947.
36. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
37. Reusch CE, Liehs MR, Hoyer M, Vochezer R. Fructosamine. A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 177-182.
38. Rosenthal MA. Single color reading method for determining fructosamine. European Patent Publication No. 0215170A1, 1987: 1-12.
39. Rosenthal MA, Olenick LJ. Evaluation of a single-color reading method for determining fructosamine. *Clin Chem* 1988; 34: 360-363.
40. San-Gil F, Schier GM, Gan IET. Improved estimation of fructosamine, as a measure of glycated serum protein, with the Technicon RA-1000 analyzer. *Clin Chem* 1985; 31: 2005-2006.
41. Smith JE, Wood PA, Moore K. Evaluation of a colorimetric method for canine glycosylated hemoglobin. *Am J Vet Res* 1982; 43: 700-701.
42. Tas S, El Din RRZ. Automated fructosamine assay with improved accuracy used to quantify nonenzymatic glycation of serum proteins in diabetes mellitus and

- chronic renal failure. *Clin Chem* 1990; 36: 1825-1830.
43. Turnwald GH, Willard MD. Endocrine, metabolic, and lipid disorders. In: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. edited by Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH. Philadelphia: WB Saunders. 1986: 154-188.
44. Winocour PH, *et al.* Relative clinical usefulness of glycosylated serum albumin and fructosamine during short-term changes in glycemic control of IDDM. *Diabetes Care* 1989; 12: 665-672.
45. Wood PA, Smith JE. Glycosylated hemoglobin and canine diabetes mellitus. *JAVMA* 1980; 176: 1267-1268.