

당뇨병 진단을 위한 젤라틴 진단막에 관한 연구(1) 온도와 습도가 글루코우즈의 확산 조절에 미치는 영향

권 석 기 · 이 병 철

홍익대학교 과학기술대학 화학시스템공학과
(1999년 1월 21일 접수, 1999년 3월 20일 채택)

Studies on the Multi-Layered Gelatin Diagnostics Membranes for Diabetes(1): Effects of Temperature and Humidity on the Diffusion-Controlled Rates of Glucose

Suk-Ky Kwon and Byung-Chul Lee

Dept. of Chemical System Engineering, Hongik University, Seoul 121-791, Korea

(Received January 21 1999, Accepted March 20, 1999)

요 약 : 당뇨병 환자의 혈당치 측정을 위하여 다층 젤라틴 필름으로 만들어진 진단막을 제조하였다. 플라즈마와 혈액 속의 글루코우즈의 농도 변화에 따른 최대확산속도를 측정하였다. 여러 가지 온도에서 3일, 2주, 4주간 보관 후 온도가 글루코우즈의 확산속도에 미치는 영향을 조사하였다. 다층 젤라틴 진단막의 안정성을 상대습도 80%에서 측정하였다.

Abstract : Diagnostic membranes by using multi-layered gelatin films were prepared to measure blood glucose level of diabetics. Maximum diffusion rates through multi-layered gelatin film were measured at various concentration of glucose in plasma or blood. The effects of storage temperatures on the diffusion rates of glucose were studied after storage of 3 days, 2 weeks and 4 weeks at various temperatures. The stabilities of diagnostic membranes with multi-layered gelatin films were examined at RH 80%.

1. 서 론

당뇨병은 오랫동안 다소 몸이 비대한 사람이거나 식사를 많이 하는 사람들에게 흔히 나타나는 단순한 병으로 알려져 왔으나, 최근에 들어서는 아주 심각한 만성적 병임이 밝혀졌고 이에 따라 당뇨병에 관한 진단과 그리고 치료에 대한 연구가 아주 활발하게 이루어져 왔다[1-3]. 인슐린에 대해 정확히 알려지지 않았던 1921년 이전에는 많은 사람들이 당뇨병으로 인해 죽어갔다[2]. 의학적으로 당뇨병이란 사람의 피 속의 글루코우즈가 세포 속으로 들어가게 하는 효소인 인슐린이 제대로 작용하지 못하여 혈중 글루코우즈의 농도가 정상인보다 아주 높은데서 생기는 질병을 말하지만, 실제적으로 이 병이 생기는 원인에 대해서는

아직도 확실히 밝혀지고 있지 않다. 인슐린은 인체내의 체장에서 만들어지는 효소인데 이 양이 적당하지 못하거나 또는 변형된 모양을 가지면 역할을 제대로 하지 못해 혈액 속의 당의 농도가 비정상적으로 높아지게 되는 것이다[1-2].

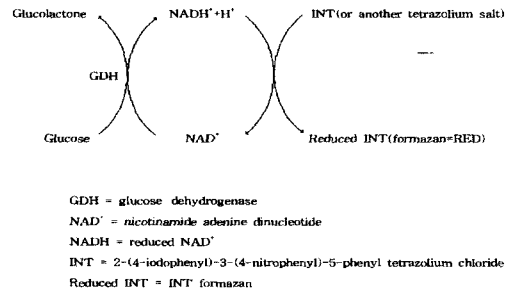
당뇨병은 인슐린의 의존도에 따라 Type I 과 Type II로 분류된다[2, 3]. Type I 의 당뇨병 환자는 제대로 작용할 수 있는 인슐린이 거의 없거나 아주 적으므로 외부에서 인슐린을 투여해야한다[3-5]. 그러나 Type II 의 당뇨병 환자는 어느 정도의 정상 인슐린을 가지고 있기 때문에 식사조절과 적당한 운동 등에 의해 핏속의 글루코우즈의 농도를 정상적으로 유지할 수 있다[2, 4]. 실제적으로 당뇨병이 우리 몸에 위협하게 나타나는 것은 당뇨병으로 인한 합병증이 심한 경우

에 더욱 심각하다[3]. 그러므로 가능하면 빨리 초기에 당뇨병을 발견하는 것이 매우 중요하다. 당뇨병에 대해 정확히 알려지기 전에는 그저 사람의 소변에 당이 심하게 나타나는지 또는 몸이 말라가는지, 또는 물을 자주 찾는지 등에 의해 외견적으로 당뇨병을 진단해 왔다. 그러나 점차 당뇨병을 정확히 진단하기 위해서는 혈중 글루코우즈의 농도를 정확히 알아야 된다는 것을 알아냈다. 왜냐하면 당뇨병의 유무는 오로지 혈당치가 어떠한 기간동안 어떻게 변하는가에 결정적으로 달려있기 때문이다[1, 2, 4]. 이러한 필요에 따라 혈당치를 측정하기 위한 진단기구에 대한 연구가 아주 활발히 전개되어왔다[5, 6].

일반적으로 당뇨병을 측정하기 위한 진단기구는 피를 흡수하거나 또는 피를 통과시키는 진단막을 이용한다[7]. 이러한 진단막의 내부에는 글루코우즈와 반응하는 효소들과 염료들이 들어 있어 반응에 따라 변하는 색의 정도에 따라 글루코우즈의 농도를 측정하는 것이 일반적이다[8]. 다만 이러한 진단 시스템에서는 어떠한 화학적 메카니즘을 이용하는 것이 중요하다. 보통 가장 많이 사용되어지는 분석방법으로는 glucose oxidase(GOD)와 peroxidase(POD)를 이용한 산화효소법인데 이 방법은 외부의 산소공급이 혈당치에 매우 크게 작용을 하므로 여러 가지 환경에서 혈당치가 쉽게 변하는 단점을 갖고 있다[9, 10].

진단막의 재료로는 얼마전까지만해도 종이 가 많이 사용되어 왔다. 최근에는 합성고분자를 이용한 진단막의 개발이 활발하게 전개되어 왔다[11-13]. 다만 이러한 진단 분리막의 바탕 재질로 사용되는 합성고분자의 경우 대부분 너무 소수성을 가지고 있기 때문에 혈당을 측정할 경우 혈액 속의 적혈구의 농도 또는 피가 응고하는 정도에 영향을 받는 경우가 있다. 그러나 친수성을 가진 천연고분자를 이용하면 이러한 단점을 넘어설 수 있다[14-15]. 본 연구에서는 종래의 산화효소를 이용한 방법을 지향하고 Scheme 1과 같은 환원 효소를 이용한 방법을 사용했다.

본 연구에서는 기존의 소수성 고분자 막을 지양하고 친수성이 좋은 젤라틴 필름을 이용한 새로운 진단막을 설계하고자 하며 또한 이러한 필름을 다층으로 코팅해 이러한 진단막을 통해 확산되는 글루코우즈의 확산속도를 측정함으로써 피 속의 글루코우즈의 농도를 알아내고자 한다[16]. Fig. 1에서는 환원효소를 이용한 분석 시스템을 위한 다층 젤라틴 필름의 단면도를 보여주고 있다. 첫번째 층은 INT를 함유한 젤라틴 층으로 글루코우즈와 효소들이 반응함에 따라 혈당치를 연다. 두번째 층은 glucose dehydrogenase (GDH)와 diaphorase과 같은 효소를 함유한 젤라틴



Scheme 1. Analytical method of reductive enzyme chemistry.

층으로 글루코우즈가 직접 효소와 반응하는 곳이다. 세번째 층은 젤라틴의 팽윤정도를 조절하고 진단막의 강도를 증가시키는 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino propyl)-carbodiimide(EDAC)와 같은 crosslinker를 함유한 젤라틴 층이다. 네번째 층은 TiO₂를 함유한 층으로 주로 배경색을 차단하는데 중요하게 사용된다. 다섯번째 층은 글루코우즈의 확산속도를 조절하기 위해 polyurethane과 같은 고분자를 함유한 plasticizer 층이며 마지막 맨 위층은 EDAC를 함유한 또 다른 crosslinker층으로 구성되어 있다.

본 연구에서는 Fig. 1에서 보여지는 다층 젤라틴 막을 이용해 온도와 습도 같은 환경적 요인들이 어떠한 정도로 글루코우즈의 확산속도에 영향을 미치며 이것을 통해 외부 환경조건이 변함에 따라 혈당치가 어떻게 다르게 얻을 수 있는지에 대해 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약

(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)(MES), EDAC, gelatin(20% type B, 75 Bloom), bovine serum albumin(BSA), TiO₂, plasma(혈장), polyethyleneimine(PEI)(Mw 50,000), GDH, diaphorase, β-nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), 2-(p-iodophenyl)-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride (INT)등은 Sigma로부터 구입하여 정제 없이 사용하였다. Poly(ethylterephthalate)(PET)와 Polyurethane dispersion(WMD) 등은 Bayer로부터 구입해 사용하였고 계면활성제로 사용된 Silwet 7600은 Union Carbide로부터 구입해 정제 없이 사용하였다.

2.2. 장치

코팅된 필름이 플라즈마 글리코우즈와 반응한 뒤

변하는 색변화는 Shimadzu사의 UV-2101PC 자외선/가시광선 분광기를 사용하여 분석하였다. 젤라틴 필름은 코팅하는데 21cm Cascade Head를 장착한 Bayer SVBM coater가 사용되었다. 얻어진 용액의 점도는 Brookfield 점도계를 이용해 측정하였다. 젤라틴 용액은 사용하기 전에 working hood 내에서 aspirator를 이용한 감압을 통해 탈기시킨 후 이용하였다. 용액을 제조하는 데는 Talboys에서 제작한 T-Line mechanical stirrer를 사용하여 교반하였다.

2.3. 코팅용 젤라틴 용액의 제조

2.3.1. First Pass 용액의 제조

젤라틴을 적당한 양의 35℃ 물에 넣고 잘 저어주어 균일하게 만든 다음 각종 필요한 시약, 그리고 buffer 등을 넣어준다. 필요한 양만큼의 Silwet 7600을 넣어준 다음 원하는 pH로 조절한다. 용액을 균일하게 저어준 후 탈기시켜 코팅에 사용하였다[16]. 다음의

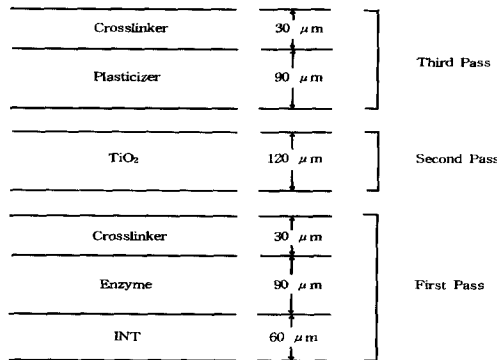


Fig. 1. A Gelatin film with multi-layers.

Table 1은 first pass에 사용된 three layer의 각각에 대한 함량을 표시하였다.

2.3.2. Second Pass 용액의 제조

먼저 TiO₂ 6 g을 물 5.66 g, PEI 30% 용액 6.29 g, 그리고 Na phosphate 0.05 g과 함께 잘 섞어 pH를 6.4로 고정시켜 TiO₂ submix 용액을 만들었다. 만들어진 TiO₂ submix에 다시 물 81.25 g을 Silwet 7600 6.10 g, WMD polyurethane dispersion 2.00 g, 그리고 젤라틴 6.00 g을 넣어 잘 교반시킨다. 얻어진 용액을 탈기시켜 바로 코팅기에서 사용하였다. Table 2는 second pass 용액의 조성을 나타내고 있다.

2.3.3. Third Pass 용액의 제조

Third Pass는 두개의 층으로 물 93.90 g, Silwet 7600 0.1 g, WMD polyurethane dispersion 2 g, 그리고 gelatin 4 g으로 잘 섞어 만들었다. 두번째 층은 crosslinker층으로 물 94.28 g에 silwet 7600 0.12 g, MES buffer 0.2 g 그리고 EDAC 5.4 g으로 잘 교반하여 만들었다. 만들어진 용액은 사용 전에 반드시 탈기시켜 사용하였다. Table 3은 third pass 용액을 구성하는 두 젤라틴 층 속의 성분과 함량을 표시하고 있다.

2.4. Gelatin Film의 제조

먼저 first pass에 사용될 세 가지 젤라틴 용액들을 SVBM Cascade coater에 부착된 용기에 담았다. 코팅될 용액의 wet-thickness를 indicator layer 60 μm, enzyme layer 90 μm, crosslinker layer 30 μm로 고정시킨 후 코팅하였다. 코팅된 film은 건조 오븐을 통과시켜 최종 건조시켰다. 두번째로 사용되어질 TiO₂

Table 1. Various concentrations of reagents in first pass solutions

| Indicator Layer | | Enzyme Layer | | Crosslinker Layer | |
|-----------------|------------------|----------------|------------------|-------------------|------------------|
| Reagents | Concentration(%) | Reagents | Concentration(%) | Reagents | Concentration(%) |
| Water | 96.23 | Water | 85.55 | Water | 99.03 |
| INT | 3.24 | Silwet7600 | 0.06 | Silwet7600 | 0.07 |
| Gelatin | 5.00 | MES(0.5M, pH6) | 3.90 | MES | 0.20 |
| Silwet7600 | 0.03 | BSA | 2.00 | EDAC | 0.70 |
| | | Diaphorase | 0.05(150U/g) | | |
| | | GDH | 1.52(400U/g) | | |
| | | Gelatin(pH6) | 6.00 | | |
| | | NAD | 0.07 | | |
| | | NaCl | 0.85 | | |

용액을 용기에 담고 두께는 120 μm 로 고정시킨 후 이미 코팅된 film위로 두번째 용액을 코팅시켰다. 역시 코팅된 gelatin film을 바로 건조시켰다. 마지막으로 third pass에 사용되어질 두 가지 용액을 용기에 담고 plasticizer layer 90 μm , 그리고 crosslinker layer 30 μm 로 고정시켜 미리 코팅된 film위로 코팅시켰다. 코팅된 film은 충분히 건조오븐에서 건조시킨 후 밀폐된 공간에서 보관하였다.

2.5 젤라틴 필름의 확산속도 시험

Cascade coater에서 코팅되어 보관된 젤라틴 필름의 확산속도를 구하기 위해서는 필름을 1cm×1cm 크기로 잘라 타원형의 샘플 흡입용 플라스틱과 열처리하여 흡광도 측정용 diffusion cell을 만들었다. 플라즈마 또는 혈액 100 ml에 각각 5 mg, 10 mg, 20 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg, 600 mg의 글루코오스를 넣어 잘 교반시켰다. 얻어진 각각의 용액을 diffusion cell과 반응시켜 시간에 따른 formazan의 농도의 변화를 흡광도 500 μm 에서 구하였다. 각각의 시간에서 formazan의 농도의 변화를 이미 얻어진 계산식에 의해 최대 확산속도(Dt/sec)를 구하였다[16]. 여러 가지 농도에서의 Dt/sec를 그래프로 그린 후 기울기를 구해 상대적인 dose-response slope (DRS)를 얻어내었다.

2.6. 환경변화에 따른 확산속도 안정성 실험

2.6.1. 온도 변화에 따른 안정성 시험

젤라틴 필름을 코팅한 후 얻어진 테스트용 샘플을 온도가 조절되는 환경시험실에서 보관하였다. 보관하는 온도는 5 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$ 이며 각각의 온도에서 3일간 보관한 후 글루코오스 기준 용액을

Table 2. Various concentrations of reagents in second pass solutions.

| TiO ₂ Submix | | TiO ₂ Gelatin Layer | |
|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Reagents | Submix Concentration (%) | Reagents | Submix Concentration (%) |
| Water | 31.44 | Water | 81.25 |
| TiO ₂ | 33.33 | Silwet 7600 | 0.10 |
| PEI(30%) | 1.61 | WMD | 2.00 |
| Na Phosphate | 0.28 | Gelatin | 6.00 |
| | | TiO ₂ Submix (pH 6.4) | 12.00 |

Table 3. Various concentrations of reagents in third pass solutions

| Plasticizer Layer | | Crosslinker Layer | |
|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| Reagents | Submix Concentration (%) | Reagents | Submix Concentration (%) |
| Water | 93.90 | Water | 94.28 |
| Silwet 7600 | 0.10 | Silwet 7600 | 0.12 |
| WMD | 2.00 | MES | 0.20 |
| Gelatin | 4.00 | EDAC | 5.40 |

가지고 확산속도를 측정하였다. 또한 5 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2주 또는 4주씩 보관한 후 같은 방법으로 확산속도를 측정하였다.

2.6.2. 습도변화에 대한 안정성 실험

얻어진 테스트용 젤라틴 필름은 상대습도 80%로 고정된 환경시험실에서 8시간, 16시간, 24시간 보관한 후 각각의 샘플에 대해 글루코오스 기준용액을 가지고 확산속도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 글루코오스 농도에 따른 확산속도의 영향

Plasma에 녹아있는 글루코오스의 양을 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg으로 변화시키면서 얻어진 최대 확산속도(Dt/sec)를 각각의 농도에 대해 얻어진 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보여지는 것 같이 농도와 최대 확산속도는 직선으로 잘 비례함을 알 수 있다.

또한 혈액에 녹아있는 글루코오스의 농도(mg/dL)의 변화에 따른 최대 확산속도의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3은 혈액 속에 녹아있는 글루코오스의 농도의 변화에 대해서도 최대 확산속도가 직선에 비례함을 잘 보여주고 있다. Fig. 2와 Fig. 3에서의 각각의 기울기를 비교하여 보면 plasma와 혈액에서의 글루코오스의 농도 변화와 확산속도가 큰 차이 없음을 나타냄을 알았다.

3.2. 온도 변화에 따른 확산속도의 영향

젤라틴 필름을 각각 다른 온도 (5 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$)에 3일간 보관한 후 글루코오스 기준 용액과 반응시킨 후 얻어진 결과를 Fig. 3에서 나타내었다. Fig. 4는 농도 변화에 따른 농도와 확산속도와의

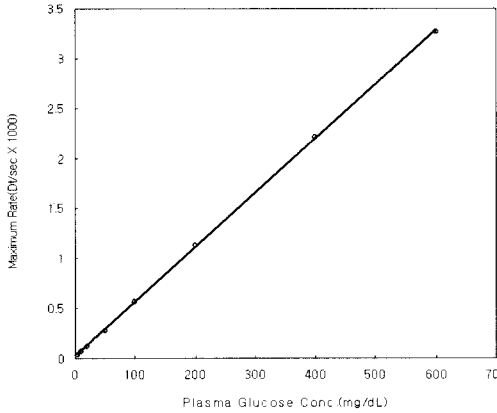


Fig. 2. Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration.

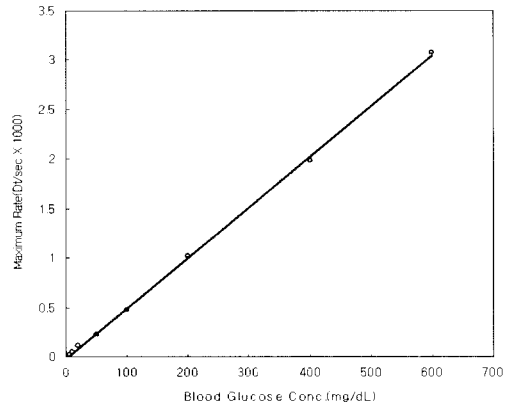


Fig. 3. Relationship between maximum rate and blood glucose concentration.

관계 직선의 기울기 변화를 각각의 온도에 따라 나타내었다. Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 온도가 25°C가 될 때까지는 DRS가 다소 증가하다가 다시 50°C, 70°C에서는 감소함을 알 수 있다. 다만 그 차이가 오차 영역 내에 드는 것을 알 수 있어 젤라틴 필름에 의한 글루코우즈의 농도 측정은 어느 정도의 온도에서는 다소 일정함을 알 수 있다. 또한 Fig. 5에서는 5°C, 25°C, 50°C에서 2주와 4주간 보관하였을 때의 결과를 나타내고 있다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼 온도 변화를 기간이 2주와 4주처럼 다소 길어도 DRS의 값은 오차 영역 내에 들어가므로 역시 온도가 변화하여도 글루코우즈의 농도를 어느 영역 내에서 얻어 낼 수 있음을 알 수 있다.

3.3. 습도 변화에 따른 확산속도의 영향

얻어진 젤라틴 필름을 상대습도 80%로 조절된 환경실험실에서 8시간, 16시간, 24시간 보관한 후 얻어진 DRS의 결과를 Fig. 6에서 나타내었다. Fig. 6에서 알 수 있는 것 같이 상대 습도 80%에서의 보존시간이 증가함에 따라 DRS가 상당히 감소함을 알 수 있었다. 이것은 공기중의 수분이 젤라틴들을 다소 팽윤시켜 원래의 플라즈마의 속도보다 다소 느리게 작용한 것으로 보여진다.

4. 결 론

다층 젤라틴 필름을 이용한 글루코우즈의 확산속도를 여러 가지 환경변화에 따라 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

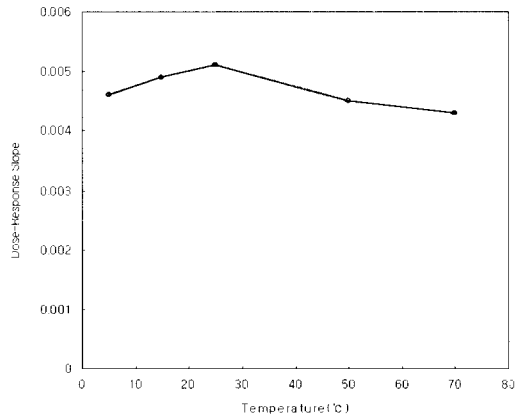


Fig. 4. Dose-response slope for 3 days at various temperatures.

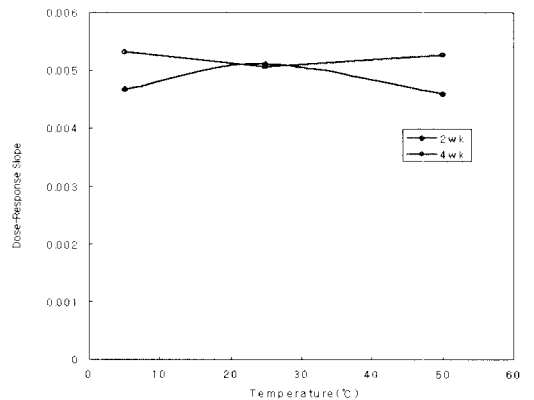


Fig. 5. Values of dose-response slope at various temperature for 2 wks and 4 wks.

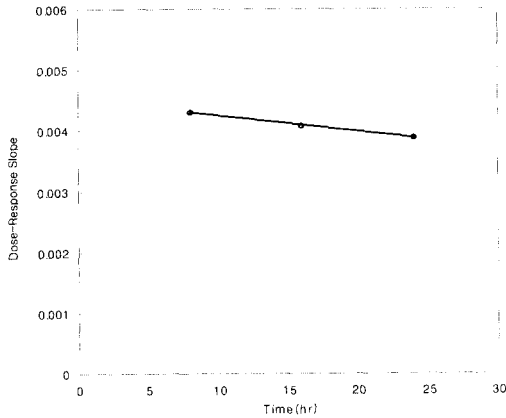


Fig. 6. Relationship between dose-response slope and time at 80% RH.

(1) 플라즈마와 혈액에 각각 녹아있는 여러 가지 농도의 글루코우즈와 젤라틴 필름을 반응 시킨 결과 농도와 확산속도가 직선으로 비례함을 알 수 있었다.

(2) 온도를 5°C, 15°C, 25°C, 50°C, 70°C로 변화시키면서 젤라틴 필름을 각각 3일, 2주, 4주간 보관한 후 확산속도를 측정된 결과 온도의 변화에 크게 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다.

(3) 얻어진 젤라틴 필름을 상대습도 80%에서 8시간, 16시간, 24시간 보관한 후 확산속도를 측정된 결과 시간이 증가함에 따라 확산속도가 다소 감소함을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 1998년도 홍익대학교 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. M. Kim, "Diabetes", Ohsung, Seoul (1993).
2. S. W. Kim, "Life Guide for Diabetes Control", Hyoseong, Seoul (1993).
3. K. S. Lee, "Modern Disease Digest", Kuckminibosa, Seoul (1993).
4. W. S. Hong, "Oriental Treatment for Modern Disease", Hyoseong, Seoul (1993).
5. D. W. Jung, "Health Control for Modern People", Ohchon, Seoul (1993).
6. J. K. Park, "Human life Science", SNU Publishes, Seoul (1993).
7. D. H. Kang "Physiology", Shinkwang, Seoul (1988).
8. R. P. Buck, "Biosensor Technology", Marcel Dekker, New York (1990).
9. H. V. Bergmeyer, "Methods of Enzymatic Analysis", VCH, Weinheim (1981).
10. D. T. Plummer, "An Introduction to Practical Biochemistry", McGraw-Hill, London (1978).
11. R. E. Kesting, "Synthetic Polymeric Membranes", Wiley-Interscience, New York (1985).
12. M. Gordon, "Polymer Membranes", Springer-Verlag, New York (1985).
13. M. Jain R, Wagner, "Introduction to Biological Membranes", Wiley, New York (1980).
14. S. Kwon, *Polymer (Korea)*, **18**, 6, (1994).
15. S. Kwon, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, **5**, 6, (1994).
16. S. Kwon and S. Eum, *Membrane Journal*, **8**, 1, (1998).