

당뇨병 진단을 위한 다층 젤라틴 진단막에 관한 연구(2) : 혈액속의 첨가물이 글루코우즈의 확산조절 속도에 미치는 영향

권 석 기

홍익대학교 과학기술대학 화학시스템공학과
(1999년 11월 2일 접수, 1999년 12월 5일 채택)

Studies on the Multi-Layered Gelatin Diagnostic Membranes for Diabetes(2): Effects of Interferents in Blood on the Diffusion-Controlled Rates of Glucose

Suk-Ky Kwon

Dept. of Chemical System Engineering, Hongik University, Seoul 121-791, Korea
(Received November 2, 1999, Accepted December 5, 1999)

요 약 : 글루코우즈 용액의 농도를 측정하기 위해 다층 젤라틴 필름으로 형성된 진단막을 제조하였다. 글루코우즈의 최대 확산 속도가 글루코우즈의 농도가 증가함에 따라 직선적으로 증가함을 알 수 있었다. 혈액속에 존재할 가능성이 있는 화합물들 글루코우즈와 환원효소들의 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 대부분의 화합물들이 글루코우즈의 최대 확산 속도에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

Abstract : Diagnostic membranes which were made of multi-layered gelatin films were prepared to measure the concentration of glucose in solution. It was found that the maximum diffusion rate of glucose had a linear relationship toward the glucose concentration. The effects of possible interferents in human blood on the reaction between glucose and reductive enzymes were examined. As a result, most of the interferents did not affect seriously on the maximum diffusion rate of glucose.

1. 서 론

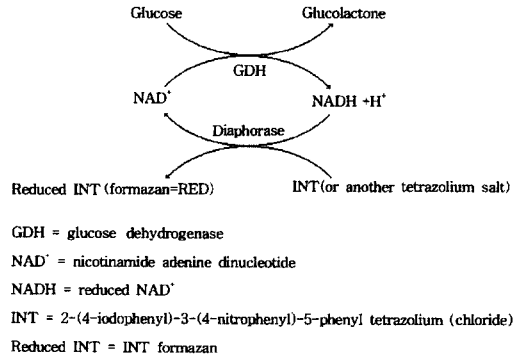
당뇨병은 의학적으로 사람의 혈액속에 글루코우즈의 농도가 정상인보다 지속적으로 높은 상태를 말하며, 당뇨병의 주된 원인은 인체내의 인슐린이 매우 부족하거나, 또는 정상적인 작용을 못하게 됨에 있는 것으로 밝혀졌다[1-3]. 체내의 인슐린 부족에 대한 원인에 대해서는 아직도 정확하게 밝혀지고 있지는 않지만 일반적으로 유전적인 요소와 환경적인 요소 등에 많은 영향을 받을 수 있다고 알려져 있다[4]. 당뇨병에 대해 잘 알려져 있지 않던 시절에는 당뇨병 자체가 위험한 결과를 초래시키는 것으로 알았으나 많은 연구에 의해 당뇨병의 합병증이 심각하게 생명을 위협

하는 것으로 나타났다[3,4]. 1921년부터는 적당량의 인슐린을 필요한 때에 투여함으로써 당뇨병 환자의 혈당을 조절할 수 있게 되었다[5]. 그러기 위해서는 혈액속의 글루코우즈의 농도를 정확하게 알아야 하며 이것을 통해 정확한 인슐린을 투여하게 된다. 만일 과다의 인슐린이 투여되면 혈당치가 너무 낮아지게 되고 매우 위험한 상태에 이르게 된다[6].

혈액속의 글루코우즈의 농도를 측정하기 위한 자가 진단 기구에 관한 연구가 매우 활발히 전개되어 왔다[7]. 이러한 자가 진단 기구에 사용되는 화학 시스템에는 대체로 산화환을 이용한 분석방법과 환원을 이용한 분석방법으로 크게 분류할 수 있다[8]. 최근까지는 산화환을 이용한 방법들이 많이 이용되었으나 이 방

법은 흡입되는 산소의 양에 효소들이 너무 예민하게 반응하기 때문에 점차로 환원효소를 이용하는 방법들이 많이 이용된다[9]. 실제적으로 본 연구에서는 glucose dehydrogenase(GDH)와 diaphorase를 이용한 환원 분석방법을 통해 용액속의 글루코오스의 농도를 측정하였다[10]. Scheme 1에서는 이러한 환원효소들과 색을 나타내는 물질을 이용하는 전체적인 구도를 나타내고 있다[11].

본 연구에서는 다층 젤라틴 진단막이 실제적으로 혈액과 반응시켰을 때 정확한 글루코오스의 농도를 얻을 수 있는지에 대해 조사하였다. 특별히 인체의 혈액 속에 들어 있을 수 있는 acetoaminophen, ibuprofen, ephedrine 등과 같은 여러 가지 화학물질들이 이러한 분석시스템에 어떠한 영향을 주는지에 대해 집중적으로 조사하였다. 또한 이러한 분석시스템을 이용한 진단막을 제조하기 위해서는 진단막의 재질을 잘 선택해야 한다. 최근에는 이러한 진단막의 재료로 폴리우레탄과 같은 합성고분자가 많이 이용되어 왔다[12]. 그러나 이러한 합성고분자는 소수성이 너무 커서 피속의 글루코오스가 진단막에 흡수되거나 통과하는데에 어려움이 있었다[13]. 천연 고분자인 젤라틴은 친수성이 높고, 취급이 쉬우며, 코팅이 아주 잘 되는 장점이 있으므로 다층막의 재료로 아주 적합하다고 알려져 있다[14]. 그러므로 본 연구에서는 이러한 젤라틴을 다층으로 코팅한 후 혈액을 떨어뜨려 글루코오스가 젤라틴 다층막을 통과하는 확산속도의 차이에 의해 혈액속의 글루코오스의 농도를 얻고자 하였다[15]. Fig. 1에서는 젤라틴 다층 필름의 단면도를 보여주고 있으며 다층 젤라틴 필름 진단막은 Cascade coater에서 각각 따로 세 번 코팅하여 얻었다. 첫 번째 코팅은 first pass로 나타내었는데 맨 밑에는 INT를 함유한 dye layer 이고, 그 다음은 GDH와 diaphorase를 함유한 enzyme layer이고 마지막 층은 젤라틴의 강도를 높여주는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(EDAC)를 함유한 crosslinker layer이다. Second pass는 배경색을 차단하는 TiO₂를 함유한 젤라틴으로 구성되어 있는 층으로 되어있다. 마지막 third pass는 두 층으로 구성되어 있는데 첫 번째 층은 우레탄 고분자를 이용해 글루코오스의 확산 속도를 다소 감소시키며 또한 진단막의 강도를 조절해주는 plasticizer layer이며, 마지막은 역시 EDAC를 함유하는 crosslinker layer이다. 이러한 다층을 코팅하는 데는 각 층에 들어가는 계면활성제의 양이 매우 중요하다[16]. 이렇게 얻어진 다층 젤라틴 진단막은 실제적으로 혈액속의 글루코오스와 반응시켜 얻어진 값을 이미 정해진 계산식에 의해 최대확산속도를 구하고 이에 따라



Scheme 1. Analysis method of reductive enzymes.

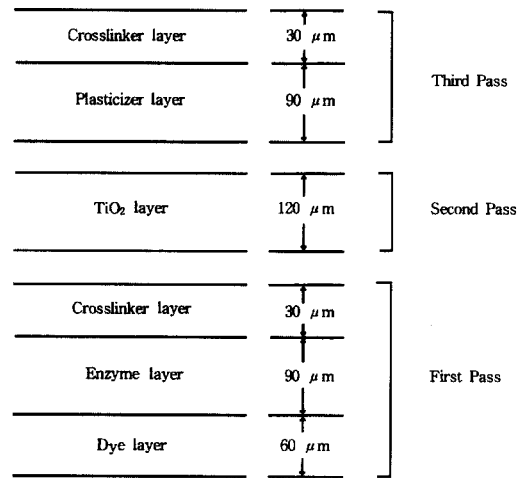


Fig. 1. Multi-layered gelatin films with enzymes and dyes.

글루코오스의 농도를 환산해 필요한 값을 얻어낸다[17].

본 연구에서는 다층 젤라틴을 이용해 얻은 진단막을 몇 가지 중요한 사실을 조사하고자 하였다. 먼저 젤라틴 진단막에 플라즈마에 녹인 여러 가지 농도의 글루코오스와 반응시켜 각각의 농도에 따른 최대확산속도(Dt/sec)의 표준 직선을 얻어내었다. 이러한 직선을 통해 실제적으로 혈액속에 녹아있는 글루코오스의 농도를 얻었다. 또한 인체의 혈액속에 존재할 수 있는 여러 가지 화학물질을 여러 가지 농도로 플라즈마에 녹여 진단막과 반응시켜 표준용액과의 차이를 통해 이 진단막이 인간의 실제 혈액과 반응했을 때 어떠한 오차를 얻을 수 있었는지에 대해 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약

Acetaminophen, ibuprofen, cholesterol, bilirubin, creatinine, uric acid(UA), ephedrine, tolbutamide (TA), pentoxifylline, triglyceride는 Sigma로부터 구입하여 정제없이 사용하였다. TiO₂, ascorbic acid(AA) sodium acetylsalicylate(SA) 등은 Aldrich로부터 구입하여 정제없이 사용하였다. 젤라틴 Type B(75 Bloom), (2-[N-Morpholine] ethanesulfonic acid)(MES), EDAC, bovine serum albumin(BSA), polyethyleneimine(PEI) (Mw 50,000), GDH, diaphorase, β -nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), INT, 플라즈마 등은 Sigma로부터 구입하여 필요한 농도를 미리 제조한 후 사용하였다. Poly(ethylterephthalate)(PET)와 polyurethane dispersion(WMD) 등은 Bayer로부터 구입하여 PET는 corona에 의해 표면처리 한 후 사용하였다. Silwet 7600은 Union Carbide로부터 구입해 정제 없이 사용하였다.

2.2. 장치

글루코우즈의 농도에 따라 변하는 INT의 색변환 정도는 Shimadzu사의 UV-2101PC 자외선/가시광선 흡광분석기를 사용하여 분석하였다. 젤라틴 용액의 점도를 측정하는 데는 Brookfield 점도계를 사용하였다. 젤라틴 필름을 코팅하는 데는 21 cm coating head를 장착한 Bayer SVBM coater가 사용되었다. 교반용으로 Tolboys에서 제작된 T-line mechanical stirrer를 사용하였다.

2.3. 코팅용 젤라틴 용액의 제조

젤라틴 용액의 제조는 앞에 발표된 문헌과 같은 방법으로 제조되었다[18].

2.4. 젤라틴 필름의 제조

다층 젤라틴을 제조하는 방법은 앞에 발표된 문헌과 같은 방법으로 제조되었다[18].

2.5. 젤라틴 필름의 기본 확산속도 시험

플라즈마 100 mL 용액에 글루코우즈를 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg을 넣고 기준 용액들을 만든 다음 제조된 젤라틴 필름에 떨어뜨려 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이렇게 얻어진 값들을 이미 얻어진 계산식에 의해 최대 확산 속도를 구하였다[18].

Table 1. Various concentrations of interferents in plasma for blood glucose tests

Concentration(mg/dL)	Kinds of Interferents
0.001, 0.002, 0.005, 0.01	Acetaminophen
5, 10, 15, 20	Creatinine, Bilirubin, UA, AA
10, 20, 30, 40, 50	Ibuprofen, Potassium, Ephedrine, TA
20, 40, 60, 80	Cholesterol, Pentoxifylline, SA
1000, 2500, 5000, 7500	Triglycerides, BSA

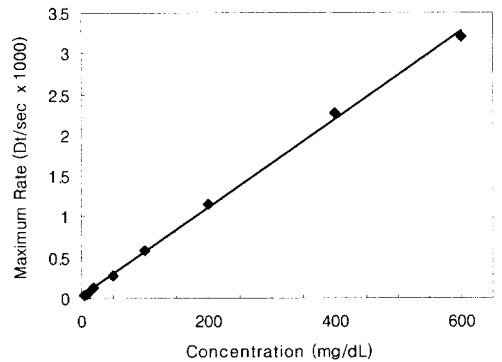


Fig. 2. Relationship between maximum rate and plasma glucose concentration.

2.6. 혈액속의 여러 가지 화합물에 의한 장애시험

다층 젤라틴 필름으로 만든 진단막에 글루코우즈 100 mg을 플라즈마 100 mL에 녹여 만든 기준 용액(control)과 반응시켜 최대 확산 속도(Dt/sec)를 구하였다. 그런 다음 Table 1에 나타난 농도처럼 각종 화합물을 플라즈마에 녹여 시험용 용액들을 각각 만들었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 다층 젤라틴에 확산되는 글루코우즈의 농도가 최대 확산속도에 미치는 영향

제조된 다층 젤라틴 분리막을 통과하는 글루코우즈의 최대 확산 속도와 글루코우즈 농도와의 관계를 조사하였다. Fig. 2에서는 플라즈마에 녹여 있는 글루코우즈의 농도를 증가시키에 따라 얻어지는 최대 확산속도를 구한 직선을 나타내고 있다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼 글루코우즈의 농도와 확산 속도가 직선

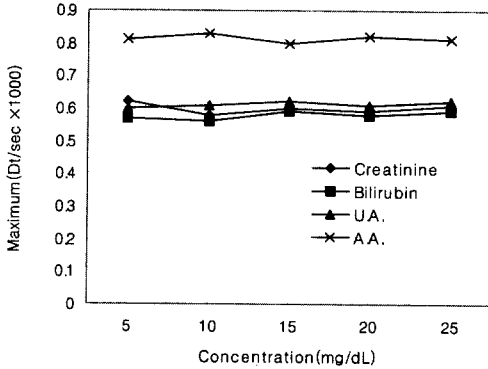


Fig. 3. Relationship between maximum rate of glucose and interferents series I.

으로 잘 비례하고 있음을 알 수 있다. 특별히 글루코 우즈의 농도가 100 mg/dL인 용액을 기준용액으로 설정한 결과 최대 확산속도의 절대치가 0.59임을 알 수 있었다.

3.2. 혈액속의 화합물이 확산속도의 결과에 미치는 영향

3.2.1 화합물 시리즈 I

혈액속에 가능한 농도가 5 mg/dL에서 25 mg/dL인 creatinine, bilirubin, UA, AA 등이 글루코우즈의 확산속도에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3은 위의 네 가지 화합물의 농도에서의 결과를 보여 주고 있다. Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 AA의 값은 기준용액에 비해 다소 높은 값을 보여주고 있으나 다른 세 가지 화합물은 확산속도에 큰 영향을 나타내지 않고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과에 대한 정확한 원인은 밝혀지고 있지 않지만 이러한 화합물들이 환원효소의 작용에 영향을 주고 또는 INT의 반응속도를 다소 증가시키는 것으로 추측되어 진다.

3.2.2. 화합물 시리즈 II

화합물 시리즈II에서는 혈액속의 농도가 10 mg/dL에서 50 mg/dL까지 존재할 가능성 있는 화합물 4가지를 조사하였다. Fig. 4에서는 화합물들의 변하는 농도와 글루코우즈의 확산속도와와의 관계를 나타내고 있다. Fig. 4에서 보여지는 것처럼 세 가지 화합물은 기준용액(I)과 비교해 큰 차이가 없지만 TA에 경우 다소 확산속도의 절대치가 낮게 나타남을 알 수 있다. 앞의 시리즈 I과 같은 이유일 것으로 추측된다.

3.2.3 화합물 시리즈 III

혈액속의 농도가 80 mg/dL일 것으로 보여지는 화

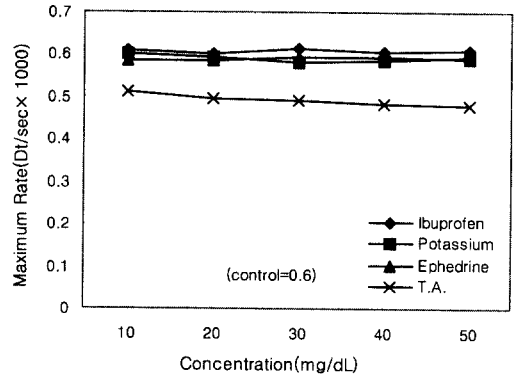


Fig. 4. Relationship between maximum rate of glucose and interferents series II.

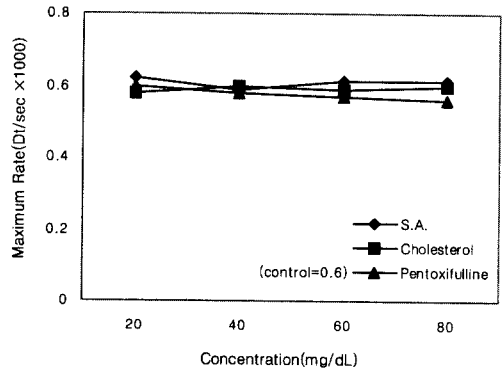


Fig. 5. Relationship between maximum rate of glucose and interferents series III.

합물 세 가지를 시리즈III으로 분류하여 조사하였다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼 세 가지 화합물 모두 기준용액과 비교해 큰 차이가 없음을 보여주고 있다.

3.2.4 화합물 시리즈 IV

혈액속에 가장 많이 존재하는 화합물의 시리즈를 IV그룹으로 분류하였다. 최소 1000 mg/dL에서 최대 7500 mg/dL까지에서의 농도에서의 확산속도가 받는 영향을 조사하였다. Fig. 6는 BSA와 triglyceride의 농도가 글루코우즈의 최대 확산 속도에 미치는 영향을 보여주고 있다. Fig. 6에서 볼 수 있는 것처럼 triglyceride와 BSA 모두 기준용액에 비해 다소 낮은 확산 속도를 나타냄을 알 수 있다. 이러한 두 화합물이 낮은 값을 나타내는 이유 또한 앞에서 언급된 것과 같은 것으로 추측되어지며 이에 대한 연구가 더욱 진행되어져야 할 것으로 여겨진다.

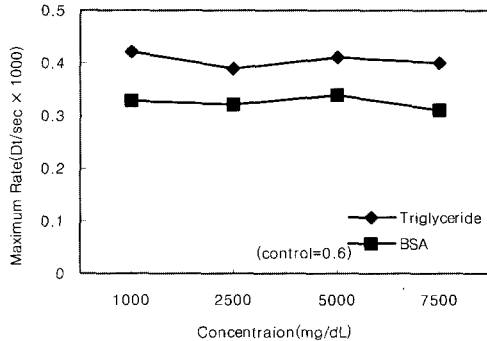


Fig. 6. Relationship between maximum rate of glucose and interferences series IV.

4. 결 론

다층 젤라틴 필름을 이용하여 글루코오스의 확산속도를 측정하는데 있어 혈액속에 존재가 가능한 여러 가지 화합물들의 농도를 변화시키며 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 플라즈마에 녹아있는 글루코오스의 농도를 증가 시킴에 따라 젤라틴 필름을 통과하여 얻어지는 글루코오스의 최대확산 속도가 직선적으로 증가함을 알 수 있었다.
- (2) 화합물의 농도를 5 mg/dL에서 25 mg/dL로 변화시키며 조사한 결과 AA만이 다소 낮은 확산 속도치를 나타내고 나머지 creatinine, bilirubin, UA 등은 기준용액과 거의 같은 속도치를 나타내었다.
- (3) 혈액속의 농도가 10 mg/dL에서 50 mg/dL까지의 화합물 네가지와 확산 속도와의 관계를 조사한 결과 TA만이 낮은 값을 나타내고 ibuprofen, potassium, ephedrine 등은 확산속도에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.
- (4) Pentoxifylline, cholesterol, SA 등은 농도 20 mg/dL까지에서 글루코오스의 최대확산 속도치에 큰 영향을 미치지 않음을 나타내었다.
- (5) Triglyceride와 BSA는 다소 혈액속에 높은 농도인 1000 mg/dL에서 7500 mg/dL까지에서 기준용액보다 다소 낮은 확산 속도치를 나타내었다.

감 사

본 연구는 1999년도 홍익대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. M. Kim, "Diabetes ; Diagnostics and Control," Ohsung, Seoul, (1997).
2. Home Health Management Research Institute, "Diabetes", Kunyoung, Seoul (1992).
3. J. Kim, "Diabetes", Ohsung, Seoul (1993).
4. W. S. Hong, "Oriental Treatment for Modern Disease," Hyoseong, Seoul (1993).
5. S. W. Kim, "Life Guide for Diabetes Control", Hyoseong, Seoul (1993).
6. D. W. Jung, "Health Control for Modern People", Ohchon, Seoul (1993).
7. K. S. Lee, "Modern Disease Digest", Kuckminil-bosa, Seoul (1992).
8. R. P. Buck, "Biosensor Technology", Marcel Dekker, New York (1990).
9. D. H. Kang, "Physiology", Shinkwang, Seoul (1988).
10. H. V. Bergmeyer, "Methods of Enzymatic Analysis", VCH, Weinheim (1981).
11. D. T. Plummer, "An Introduction to Practical Biochemistry", McGraw-Hill, London (1978).
12. R. E. Kesting, "Synthetic Polymeric Membranes", Wiley-Interscience, New York (1985).
13. M. Gordon, "Polymer Membranes", Springer-Verlag, New York (1985).
14. M. Jain R, Wagner, "Introduction to Biological Membranes", Wiley, New York (1980).
15. S. Kwon, *Polymer (Korea)*, **18**, 6 (1994).
16. S. Kwon, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, **5**, 6 (1994).
17. S. Kwon and S. Eum, *Membrane J.*, **8**, 1 (1998).
18. S. Kwon and B. Lee, *Membrane J.*, **9**, 2 (1999).