

논문 2001-10-6-01

## 총헤모글로빈 농도를 비침습적으로 측정하기 위한 400-2500nm 대역의 흡수 스펙트럼 분석

전계진\*, 김연주\*, 김수진\*, 김홍식\*, 윤길원\*

### Spectral Analysis for Non-Invasive Total Hemoglobin Measurement in the Region from 400 to 2500nm

Kye Jin Jeon\*, Yoen-Joo Kim\*, Su Jin Kim\*, Hong Sig Kim\*, and Gilwon Yoon\*

#### 요 약

혈중 헤모글로빈 농도를 비침습적으로 측정하기 위하여 가시광선부터 근적외선 영역인 400~2500 nm 영역에서 주요 혈중 성분들의 스펙트럼의 분석에 관하여 연구하였다. 근적외선 영역에서는 물이 주 흡수 성분이 되는데 특정성분의 농도 변화에 따라 물의 상대적인 흡수변화가 수반되므로 (water displacement effect) 특정성분의 농도 변화에 따른 물의 농도변화를 고려해줌으로써 보정된 스펙트럼을 얻었고 이로부터 각 흡수 peak을 정확히 얻어내었고 농도변화에 따른 선형적인 증가를 보여주었다. 비침습적으로 헤모글로빈 측정을 위한 조직의 산란효과와 타 성분의 영향을 고려하여 파장대역의 선정하였다.

#### Abstract

Absorption spectra of blood components have been measured for the purpose of predicting the total hemoglobin concentration. We obtained absorption spectra of major blood components from the visible to near-infrared of 400~2500nm region. In the near-infrared, water is the main absorbing constituent. The amount of water in the sample cell varies depending on the volume of solute concentration(water displacement). We acquired water-compensated spectra by considering the variation of water volume depending on the variation of analyte concentration. Those spectra show inherent absorption peaks of analytes and linearity with respect to concentration. We selected wavelengths for non-invasive measurement of hemoglobin concentration considering the scattering effect of tissue and the interference of other blood components.

## 1. 서 론

인간의 혈액은 기본적으로 혈장과 혈구(적혈구, 백혈구, 혈소판)로 이루어져있다. 산소는 인간의 몸에 있는 각각의 세포의 기능이 정상적으로 유지되기 위해서 필수적이다. 산소량이 감소되면 조직의 세포 내 에너지 대사가 제한되고 장

시간 동안 산소가 공급되지 않을 경우 인체의 활동을 정지시킬 수도 있다. 이처럼 중요한 산소의 공급을 책임지고 있는 것이 적혈구속에 포함된 헤모글로빈이다. 이 적혈구 내 헤모글로빈의 총량은 임상학적으로 중요한 수치로 지금까지는 채혈을 한 후 화학적으로 분석하는 방법을 사용하고 있다. 임상병리 실험실에서는 헤모글로빈 농도를 hemoglobincyanide 방법을 이용하고 있다<sup>(1)</sup>. 여기서 혈액을 potassium ferricyanide 와 potassium cyanide 수용액에 희석한다. 540nm에서 흡수를 측정하여 기준용액의 흡수값과 비교하여 농도를 산출해 낸다. 또 다른 한 예로 CIBA-Corning Model 2500 CO-oximeter

\* 삼성종합기술원 메디컬응용팀 (Medical Application Team, Samsung Advanced Institute of Technology)

<접수일자 : 2001년 3월 30일>

는 특별한 지시약을 사용하지 않고 가시 광선과 근적외선에서 7개의 파장을 이용하여 헤모글로빈의 농도를 결정하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 이 모든 경우에 혈액을 채취해야하고 후자의 경우는 초음파를 이용하여 적혈구를 용혈시켜서 쓰는 방식이기 때문에 비채혈 진단의 필요성이 요구되거나 자주 측정이 필요한 경우에는 새로운 접근 방식이 이루어져야한다.

비침습적으로 헤모글로빈의 농도를 측정한 S. Zang 등은 575 ~ 1100 nm 영역에서 반사광을 측정하여 partial least-squares regression 분석법을 이용하였는데 사람간의 오차가 크다는 문제점이 있는데 이는 가시광선 영역에서 생체조직의 산란특성이 크기 때문이다<sup>(2)</sup>.

본 논문에서는 비침습적으로 헤모글로빈 농도를 측정하기 위한 혈중 성분의 스펙트럼 분석과 적절한 파장선정에 관하여 연구하였다. 가시광선부터 근적외선 영역인 400 ~ 2500nm 영역에서 혈중 주요 성분인 헤모글로빈, 글루코즈, 알부민, 감마-글로불린, 트리아세틴의 흡수 스펙트럼을 얻었다. 근적외선 영역에서는 물의 흡수가 주 흡수 성분이 되는데 특정 성분의 농도변화에 따라 샘플 셀 내의 물의 상대적인 볼륨이 변화하여 발생하는 water displacement effect가 있다. 그러므로, 특정 성분의 농도 변화에 따른 물의 농도변화를 고려해줌으로써 보정된 스펙트럼을 얻었고 이로부터 각 흡수 peak를 확인하였으며 농도에 따른 선형성을 가짐을 보여주었다. 비침습적으로 헤모글로빈 측정을 위한 조직의 산란 효과와 타 성분의 영향을 고려하여 파장대역을 선정하였다.

## 2. 실험 방법

헤모글로빈 수용액은 병원 환자 10명의 혈액으로부터 얻어냈다<sup>(3)</sup>. 혈액은 EDTA를 함유하고 있는 vacutainer tube (Becton Dickinson Vacutainer System, Rutherford, NJ 07070, USA)에 채취하였다. 4 °C, 3000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 plasma를 없애고 혈구만 분리한 후 saline (0.9 % NaCl)으로 3번 씻어내는 과정을 거쳐서 EDTA와 혈장 단백질을 처음 농도의 0.1% 이하로 줄였다. 적혈구를 씻어낸 후 얻어진 최종 pellet에 원하는 농도의 헤마토크릿(Hct) 값을 갖도록 0.9%

saline으로 적당량 조절하였다. 적혈구를 용혈시키기 위해 액체질소와 37°C water bath를 이용하여 얼렸다 녹였다를 3회 반복하였다. 3000 rpm, 4 °C에서 10분 동안 원심 분리하여 아래 쪽 부분의 1/6은 산란 입자를 포함하고 있으므로 버리고 윗 부분만 분주하였다. 이러한 과정을 거쳐 얻어진 시료를 화학반응을 이용하는 방식으로 농도를 측정하여, 이 값을 농도의 reference로 이용하였다. 또한 혈액의 주요성분인 물, 알부민, 감마-글로불린, 트리아세틴의 흡수 스펙트럼을 생리학적인 농도 범위에서 측정하였다.

흡수 스펙트럼은 400 ~ 2500nm 영역에서 Cary 5E 분광기 (Varian, Melbourne, Australia)를 이용하여 얻었다. 800nm까지는 R928 PMT를 이용하여 1nm 간격으로 측정하고, 800~2500nm는 PbS로 2nm 간격으로 측정하였다. 0.2mm와 0.5mm의 detachable window cell (Hellma, Rijswijk, Netherlands)을 이용해 측정되어졌다. 특히 근적외선 영역에서는 물의 흡수도가 온도에 따라 변하기 때문에 시료의 온도를 37°C로 일정하게 하여 측정하였다.

## 3. 실험 결과

헤모글로빈 수용액은 가시광선 영역을 제외하고는 농도에 따라 흡수스펙트럼을 거의 구분할 수 없다(그림1). 가시광선 영역의 경우 혈액색에 의한 흡수가 매우 크고 또한 연조직에 의한 산란 효과도 크기 때문에 비침습적 측정에 이용하는데 어려움이 많다. 근적외선 영역에서 각 혈중 성분의 흡수 peak를 분석하고 다른 성분의 영향을 최소화하는 파장을 선택하는 것에 관한 연구는 헤모글로빈 농도측정 뿐만 아니라 혈당, 혈중 콜레스테롤 농도측정에도 응용의 가능성을 갖고 있다.

그림 2의 경우는 헤모글로빈의 각 농도에서 측정된 스펙트럼에 용매인 물의 스펙트럼을 빼준 경우이다. 물의 흡수가 큰 영역에서는 음의 값이 되거나 농도에 따라 서로 교차하는 부분도 존재한다. 근적외선 영역에서는 물이 주 흡수 성분이 되는데 특정성분의 농도 변화에 따라 물의 상대적인 흡수변화가 수반된다 (water displacement effect). 따라서 농도변화에 따른 스펙트럼은 물

의 변화에 묻혀 버리게 되고 흡수 peak을 찾아 내기가 어렵다.

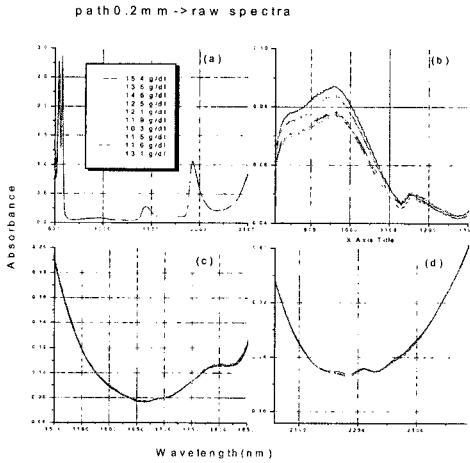


그림 1. 농도에 따른 헤모글로빈 수용액의 흡수 스펙트럼. (a)400~2500 nm의 전체 spectrum, (b) 800~1300 nm, (c) 1500~1850 nm, (d) 2100~2500 nm.

Fig. 1. Absorption spectra of hemoglobin solutions for various concentration in the wavelength region of (a) 400~2500nm, (b) 800~1300 nm, (c) 1500~1850 nm, and (d) 2100~2500 nm.

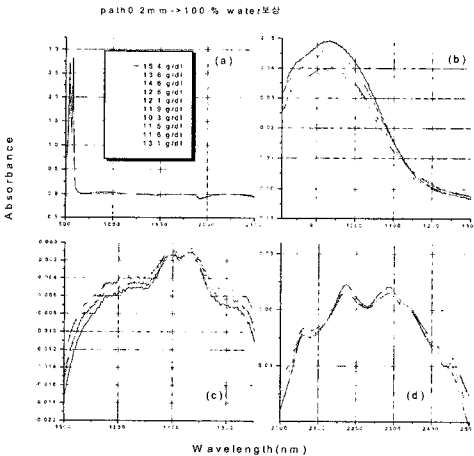


그림 2. 헤모글로빈의 스펙트럼으로부터 물의 스펙트럼을 빼 결과 (a)400~2500 nm의 전체 spectrum, (b) 800~1300 nm, (c) 1500~1850 nm, (d) 2100~2500 nm.

Fig. 2. Water-subtracted spectra of hemoglobin solutions in the wavelength region of (a) 400 ~ 2500nm, (b) 800~1300 nm, (c) 1500~1850 nm, and (d) 2100~2500 nm.

그러므로, 용질의 농도증가에 따라 용질이 차지하는 부피의 변화를 고려해야한다.  $x(g)$ 의 solute가 물에 녹아  $\alpha x(ml)$ 이 되고 물  $V_w(ml)$ 와 합하여 total volume  $V(ml)$ 이 된다면, 측정되는 흡수스펙트럼은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$A = C_w \epsilon_w l + C_x \epsilon_x l$$

$$= \epsilon_w \frac{M_w}{\alpha x + V_w} l + \epsilon_x \frac{x}{\alpha x + V_w} l \quad (1)$$

여기서,  $C_w, C_x$ 는 각각 물과 solute의 농도이고,  $\epsilon_w, \epsilon_x$ 는 물과 solute의 extinction coefficient이고,  $M_w$ 는 물의 질량이다.  $\alpha x + V_w = V$ 의 조건에 의해

$$A = \epsilon_w \frac{M_w}{V} l + \epsilon_x \frac{x}{V} l$$

$$= \rho_w \epsilon_w l + (\epsilon_x - \rho_w \epsilon_w \alpha) x l / V \quad (2)$$

여기서  $\rho_w$ 는 물의 밀도이다. 만일 baseline drift가 없다면 측정되는 스펙트럼은 analyte의 농도에 선형적으로 증가한다. 본 실험에서 사용된 분광기의 baseline drift는  $\pm 0.4 \times 10^{-3}$  A.U.(absorbance unit)정도이며 이 정도의 spectral noise는 헤모글로빈 농도를 측정하는데 충분하다. 측정된 스펙트럼에서 물의 스펙트럼을 빼면,

$$A - \epsilon_w \rho_w l = \frac{\epsilon_x - \epsilon_w \rho_w \alpha}{V} x l \quad (3)$$

흡수도는 solute의 농도에 비례하지만 물의 흡수가 큰 부분에서는 정확한 solute의 흡수 스펙트럼을 알 수 없다.

water의 영향을 완전히 제거하기 위해서 정확한 portion인  $M_w/V$ 을 다음과 같이 빼어 주어야 한다.

$$A - (M_w/V)A_w = \epsilon_x (x/V) l \quad (4)$$

여기서,  $A_w$ 는 물의 흡수를 나타낸다. 식(4)는 analyte의 농도에 비례하는 형태이며 analyte의 정보만을 갖고 있다. 그러나 물의 portion이 온도의 함수이고 측정상의 오차로 인해 정확하게 측정하기가 어렵다. 측정된 스펙트럼에 대해  $\alpha'$ 의 기여도에 의한 물의 portion을 빼주면, 아래 식과 같게 된다.

$$A - (M_w'/V)A_w = \{\epsilon_x + \rho_w \epsilon_w (\alpha' - \alpha)\} x l / V \quad (5)$$

그림 3은 식 (5)에서 물의 밀도가 1이고,  $\alpha' = 1$ 이라고 가정했을 때 얻어지는 헤모글로빈의 스펙트럼이다. 즉, 1g의 헤모글로빈이 물 속에 녹으면 1ml의 부피를 차지한다고 가정할 때이다. 그림에서 보는 바와 같이 농도에 따라 흡수 스펙트럼이 선형적으로 정렬되며 흡수도가 음의 값이 나오거나 서로 교차하는 부분도 없다. 1600nm 이상에서 측정된 흡수 peak은 1690, 1740, 2056, 2170, 2290, 2350nm 이다. 이는 기존의 측정치와 일치함을 확인할 수 있었다 [4]. 이 흡수 peak 들은 농도변화에 따른 선형적인 증가를 보여주었다.

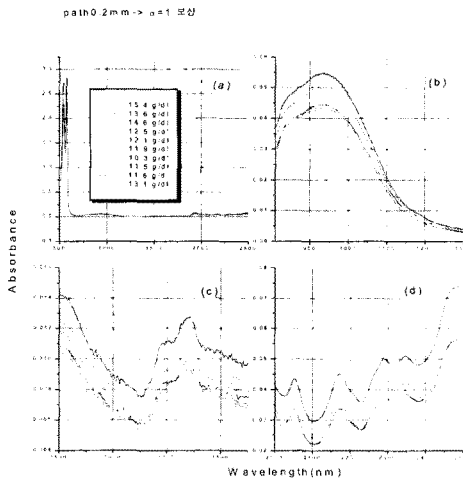


그림 3. 헤모글로빈의 농도에 따른 물 portion의 변화를 고려하여 빼준 결과. (a)400~2500 nm의 전체 spectrum, (b) 800~1300 nm, (c) 1500~1850 nm, (d) 2100~2500 nm.

Fig. 3. Water portion compensated spectra of hemoglobin solutions in the wavelength region of (a) 400~2500nm, (b) 800~1300 nm, (c) 1500~1850 nm, and (d) 2100~2500 nm.

그림4는 각 혈중 성분의 흡수스펙트럼을  $\alpha' = 1$ 이라 가정하고 물의 스펙트럼을 보정하였다. 1600nm 대역과 2000nm 대역의 흡수는 단백질이 공통적으로 가지는 흡수 대역이기 때문에 혈중 단백질 모두에서 나타나는 흡수 peak 이다.

### 4. 결 론

400~2500 nm 영역에서 주요 혈중 성분들

의 스펙트럼을 분석하였다. 근적외선 영역에서는 물의 높은 흡수도로 생기는 샘플 셀내의 water displacement effect 보정하여 각 성분의 스펙트럼을 얻었다.

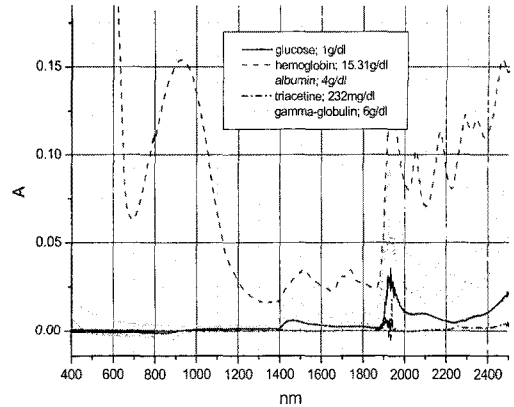


그림 4. 물의 portion을 고려하여 얻어진 글루코즈, 헤모글로빈, 알부민, 감마-글로불린, 트리아세틴의 흡수 스펙트럼.

Fig. 4. Absorption spectra of glucose, hemoglobin, albumin,  $\gamma$ -globulin, and triacetin with compensation of water portion.

근적외선 대역의 헤모글로빈 흡수 peak은 935, 1690, 1740, 2056, 2170, 2290, 2350nm이다. 600nm 이하의 파장에서는 생체조직의 흡수와 산란이 너무 크고, 600 ~ 800 nm 영역에서는 헤모글로빈이 산화 환원에 따라 흡수도의 차이가 매우 커서 총헤모글로빈의 측정에는 부적절하다. 또한 1440 nm와 1900 nm 대역의 물 흡수 peak을 포함하는 것은 인체의 투과 깊이에 제약을 받으므로 피하여야 한다. 1600 ~ 1800 nm의 영역은 유기화합물이 공통적으로 가지는 CH의 stretching mode의 overtone band이며 2100~2400 nm는 CH와 CCH, OCH의 combination band로 알려져 있다. 그림 5에서와 같이 파장이 1400 nm 이상의 경우 글루코즈, 알부민, 감마-글로불린, 트리아세틴 성분 모두의 흡수대역으로 나타난다. 따라서 헤모글로빈을 비침습적으로 측정하기 위해서는 산화와 환원 등 헤모글로빈의 상태에 따라 흡수도가 차이가 적고, 타성분의 영향이 작으며, 혈액이 있는 곳까지 충분히 깊이 빛이 투과할 수 있고, 조직의 산란효과가 작은 흡수 대역은 800 ~ 1300 nm

대역이 적절할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 근적외선 흡수 스펙트럼을 분석함으로써 총헤모글로빈을 비침습적으로 측정하기 위한 최적 파장 선정에 대한 연구를 하였다. 비침습적으로 총헤모글로빈을 측정하기 위해서는 향후 스펙트럼으로부터 농도를 계산하는 알고리즘, 광학계 개발 등에 관한 지속적인 연구가 필요하다.

### Acknowledgement

본 연구의 일부는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어 졌습니다. (HMP-99-E-11-4)

### 5. 참고 문헌

[1] A.L. Latner and M.K. Schwartz, *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 23, Academic press(1983),200-219.

[2] S. Zang, B. R. Soller, S. Kaur, K. Perras, and T.J. Vander Salm, "Investigation of Noninvasive in vivo Blood Hematocrit Measurement using NIR Reflectance Spectroscopy and Partial Least-squares Regression", *Applied Spectroscopy*, Vol. 54(2), pp. 294-299, 2000

[3] J. T. Kuenstner, K.H. Norris and W. F. McCarthy, "Measurement of Hemoglobin in Unlysed Blood by Near-Infrared Spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, Vol. 48(4), pp.484-488, 1994.

[4] J. T. Kuenstner and K.H. Norris, "Spectroscopy of human hemoglobin in the near infrared region 1000 to 2500nm", *J. Near Infrared Spectroscopy*, Vol. 2, pp.59-65, 1994.

---

### 著 者 紹 介

---



#### 전 계 진

1997년 2월 연세대학교 물리학과에서 광학전공으로 박사학위를 취득.

1997년부터 현재까지 삼성중합기술원 메디컬응용팀에서 재직.

주요 연구 분야는 Biomedical Optics, Application of Spectroscopy to Optical Diagnostics 임.



#### 김 수 진

1999년 2월 경북대학교 센서공학과에서 석사학위 취득. 이후 현재까지 삼성중합기술원 메디컬응용팀 재직하며 분광학적 진단기술을 이용한 기기개발 연구를 하고 있음.

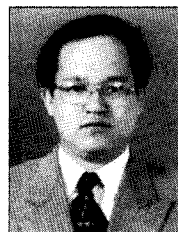


#### 김 연 주

1996년 2월 서울대학교 화학과에서 생화학 전공으로 석사학위를 취득.

1996년부터 현재까지 삼성중합기술원 메디컬응용팀에서 재직.

연구 분야는 Bio & Clinical Chemistry, Chemometrics, Spectroscopy 임.



#### 김 홍 식

1994년 2월 청주대학교 물리광학과에서 양자광학전공으로 석사 취득.

1994년부터 현재까지 삼성중합기술원 메디컬응용팀에서 재직.

주요 관심 분야는 Biomedical Optics & Spectroscopy 임.



### 윤길원

1988년 5월 University of Texas at Austin에서 전자공학에서 박사학위 취득.

경력으로는 프랑스의 국립보건의학 연구(INSERM), 미국의 Utah Laser Institute 에서 근무.

1992년 4월부터 삼성그룹 연구소에서 의공학 개발 담당.