

휴대용 근적외선 분광분석기를 이용한 비침투 혈당 측정

강나루 · 우영아 · 차봉수* · 이현철* · 김효진#

동덕여자대학교 약학과, *연세대학교 의학과

(Received August 13, 2002; Revised September 30, 2002)

Non-invasive Blood Glucose Measurement by a Portable Near Infrared (NIR) System

Naroo Kang, Young-Ah Woo, Bong-Soo Cha*, Hyun-Chul Lee* and Hyo-Jin Kim#

College of Pharmacy, Dongduk Womens University

*Department of Medicine, Yonsei University

Abstract — The purpose of this study is to develop a non-invasive blood glucose measurement method by a portable near infrared (NIR) system which was newly integrated by our lab. The portable NIR system includes a tungsten halogen lamp, a specialized reflectance fiber optic probe and a photo diode array type InGaAs detector, which was developed by a microchip technology based on the lithography. Reflectance NIR spectra of different parts of human body (finger tip, earlobe, and inner lip) were recorded by using a fiber optic probe. The spectra were collected over the spectral range 1100 ~1740 nm. Partial least squares regression (PLSR) was applied for the calibration and validation for the determination of blood glucose. The calibration model from earlobe spectra presented better results, showing good correlation with a glucose oxidase method which is a mostly used standard method. This model predicted the glucose concentration for validation set with a SEP of 33 mg/dL. This study indicated the feasibility for non-invasive monitoring of blood glucose by a portable near infrared system.

Keywords □ NIR, blood glucose, non-invasive, PLSR

현재 우리 나라 전체 인구 4,800만 명 중 5%인 240만 명 정도가 당뇨병환자인 것으로 추정되고 있다. 사회 경제적인 발전과 더불어 과식, 운동부족, 스트레스 증가 등으로 인하여 당뇨병 인구는 계속 증가될 추세이다. 당뇨병자들은 합병증 발생률을 줄이기 위해 혈당의 조절이 필수적이고, 이를 위해, 혈당을 하루 4회에서 8회 정도로 자주 측정해야 한다. 현재까지 사용되는 자가 측정법으로 뇨당을 측정하거나 간이 혈당 측정기를 이용하는 방법이 있다. 전자는 직접 혈액을 검사하지 않기 때문에 오차가 커서 많이 사용되지 않고, 후자는 손끝의 혈액을 채취하는 방법으로 가장 많이 사용되지만 불편할 뿐만 아니라 통증을 수반하기 때문에 하루 평균 2회 정도의 측정에 그치고 있다. 이로 인해 당뇨 환자의 대부분이 저혈당으로 인한 쇼크, 케토시스, 혈당조절 실패로 인한 시력감퇴나, 당뇨병의 합병증 유발의 위험을 안고 있다. 최근에 사용되고 있는 자가혈당 측정기는 측정원리

에 따라 크게 두 가지로 분류할 수 있는데 광학적 방법과 전기 화학적 방법이 그것이다. 두 가지 방법 모두 glucose oxidase와 glucose의 반응을 이용한 것이다. 광학적 방법은 반응 생성물질이 특정 파장의 빛에서 변색하는 것을 이용하는 것이고, 전기 화학적 방법은 반응에서 발생하는 전자를 측정하는 방법이다. 최근에 통증을 최소화시키고 보다 간편하게 측정하기 위한 방법으로 피부의 침투를 최소화 시켜 통증을 없앤 장비들이 개발되어 시판되고 있다. 그러나 아직 임상에서 실용화되지 않고 있다. 이번 연구는 이러한 기존의 혈당 측정기의 문제점을 해결하고 당뇨 환자들이 보다 간편하게 혈당을 측정할 수 있도록 근적외선 분광분석법(NIRS; Near infrared spectroscopy)을 이용한 새로운 무채혈 혈당 측정법을 개발하기 위해 수행되었다. 근적외선을 피부에 조사시켜 채혈없이 무통증으로 정확한 혈당을 측정하는 것이 근적외선 분광분석법을 이용한 혈당 측정법의 목표이다. 형광광도법, 편광측정법, Raman 분광분석법등의 빛을 이용해 glucose를 측정하는 다양한 방법들이 여러 분야에서 연구되고 있다.¹⁻⁴⁾ Glucose 외에도 다른 인체 내 성분을 이러한 방법으로 측정할 사례들이 소개되고 있는 점과 계량분석의 발달 및 다양한

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4305 (팩스) 02-943-9578
(E-mail) hyojkim@dongduk.ac.kr

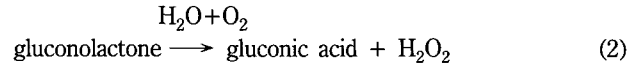
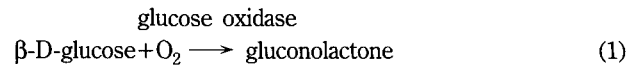
분석장비 개발 측면에서 그 가능성을 확인할 수 있다.⁵⁻⁷⁾ 또 최근 들어 시판되는 무통 자가혈당 측정기와 오차를 비교하기 위하여 이를 이용한 실험이 병행되었다. 본 연구에서는 직접 개발한 마이크로칩 기술을 이용한 PDA(photo diode array) 형태의 휴대용 근적외선 분광분석기를 이용해 인간의 피부표면에 직접 광섬유를 갖다 대어 빛을 조사하여, 빛의 흡광도와 혈당의 상관성을 부분 최소 제곱법(partial least squares)을 이용하여 그 정확성을 검증하고자 하였다.

실험방법

혈액 내 glucose 측정

ITT(Insulin Tolerance Test) 실시 당뇨환자 23명을 대상으로 혈당을 측정하였다. 15명의 여성 환자와 8명의 남성 환자에 대해 실시되었다. 실험 대상군은 Table I과 같다. ITT는 공복상태에서 insulin을 투여해서 일정시간동안 혈당변화 추이를 보는 실험으로 체내 insulin의 내성을 알 수 있다. 측정 전 날 밤부터 음식과, 약물 모두 복용하지 않은 상태에서 insulin 투여 직전부터, insulin 투여 15분까지 정맥으로부터 3분 간격으로, 총 6회 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 즉시 원심 분리시킨 후 혈당 측정기에 혈장만을 주입해서 혈당을 측정하였다. 기존 방법에서는 혈당 측정을 위하여 glucose oxidase법을 이용한 Glucose

analyzer 2(Beckman Instruments, Inc., USA)를 이용하였다. Glucose oxidase 법은 glucose가 glucose 산화효소에 의해 분해되는 과정으로 아래 식과 같다.



생성된 H₂O₂가 peroxide에 의하여 diethylaniline 및 4-aminoantipyrine과 산화적으로 축합하여 quinone을 생성하고, 이 물질을 505 nm에서 비색정량함으로써 혈당을 측정한다.

시판 자가 혈당측정기를 이용한 측정

최근에 시판되는 자가 혈당측정기 중 T사의 제품 F를 이용하여 실험하였다. 이 기기는 전기 화학적인 방법을 이용하며, 무통증 간이 혈당측정기로 피부의 인쪽에 침을 약간만 침투시켜 거의 통증을 느낄 수 없고 0.3 μl의 소량 혈액으로도 측정이 가능하다. 혈액이 나오면 기구에 스트립을 끼워 넣은 후 침을 침투시켜 혈액이 나온 부위에 스트립 끝을 직접 가져가 혈액을 묻히면 스트립의 물질과 혈액이 반응하여 혈당을 측정하게 된다. 일단 피부 밖으로 혈액이 나오면 측정시간은 10초 정도이다. 이 때 혈액은 모세혈관으로부터 얻어지며 모세혈관은 정맥보다 혈당치가 높다.⁸⁾ 이 방법은 glucose가 glucose oxidase와 반응하는 과정에서 발생한 전자를 전자전달 매개체를 이용하여 전극으로 전달하여 흐르는 전류를 측정하는 원리이다. 각 실험간의 시간차를 줄이기 위해 측정은 거의 동시에 이루어졌다. 근적외선 분광분석법을 이용한 측정방법과 같은 방식으로 진행되었고, 누워있는 환자의 아래 팔 부분의 피부에 침을 침투시켜 측정하였다.

NIRS를 이용한 측정

근적외선 분광분석기는 NearIRSTA HN1100(SpectronTech Co., Ltd, Korea)을 사용하였다. Tungsten-halogen lamp 광원과 lithography 방식의 microchip 기술로 제작된 PDA 형태의 InGaAs 검출기를 사용하였다. 이 spectrometer는 휴대용으로 충전하여 6시간 동안 전원 없이 작동이 가능하다. 320×100×255(w×h×d) 크기로 운반이 용이하다. 인체 피부를 측정하는데 끝이 Y자 형태의 두 갈래로 나뉜 광섬유 반사프로브를 이용하였다. Fig. 1에서 보듯이 프로브의 끝은 각각 광원, 검출기, 측정부위와 연결된다. 광원에서 나온 빛이 프로브의 한 끝으로 이동해 측정 부위에 도달한 후 흡수되고 나머지 빛이 검출기와 연결된 프로브의 끝으로 돌아 들어가 검출기에 도달하면 검출기에서 흡수된 빛을 산출하여 spectrum으로 보여준다. 검출기 온도는 30°C로 설정하고 scan number를 30으로 하여 1100~1750 nm의 파장

Table I - Experiment subjects

Gender	Age	Height (cm)	Weight (kg)
F	60	152.6	71.0
F	53	155.5	73.9
F	61	151.2	56.0
F	62	155.2	71.0
F	44	165.8	51.0
F	20	166.6	69.0
F	67	153.1	63.0
F	60	150.0	51.0
F	46	158.3	59.0
F	72	153.2	67.0
F	44	167.0	75.0
F	65	152.4	57.0
F	66	159.0	61.0
F	19	170.5	41.0
F	45	158.0	50.0
M	54	174.5	69.0
M	66	164.4	64.0
M	60	161.3	61.5
M	60	166.2	67.0
M	49	169.7	67.8
M	23	172.7	59.0
M	57	162.3	64.5
M	58	180.7	75.0
Mean	53	161.7	62.8

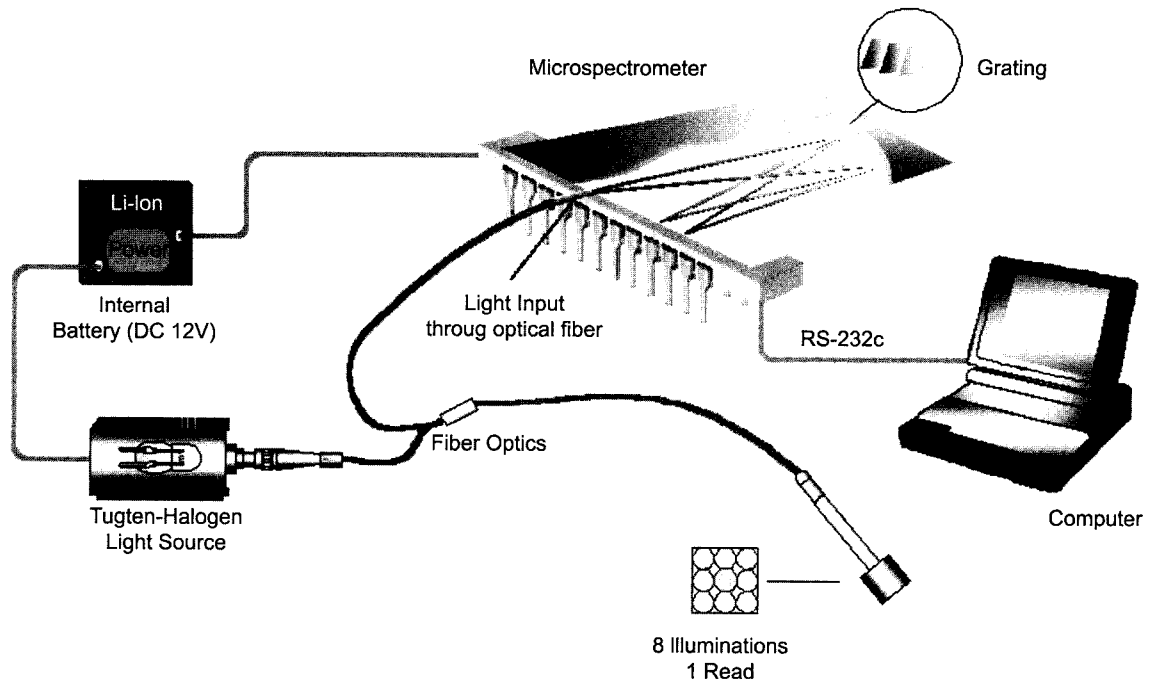


Fig. 1 - Schematic diagram of NearIRSTA HN1100.

범에서 한 개의 스펙트럼을 얻기 위해 한 개 검체를 30번 측정하여 평균스펙트럼을 얻었다. 스펙트럼당 2 nm 간격으로 326 data points를 수집하도록 설정하였다. Reflection 프로브를 이용하여 집게손가락 끝부분, 컷볼, 입술 안쪽 점막부위에 프로브 끝을 직접 접촉시켜 측정하였다. 90% alumina를 측정해 reference spectrum으로 하여 인체 측정 직전에 측정하고 손가락 끝부분, 컷볼, 아랫 입술 안쪽 순서로 연속하여 측정하였다. 다음 회 측정을 위해 probe 끝을 에탄올로 닦아주었다. 매 측정 시 alumina reference의 intensity를 52,000으로 일정하게 맞추었다. 측정 시기는 혈액채취와 거의 동시에 이루어졌고 1인 당 투여전과 9분 후 또는 15분 후에, 혹은 9분 후와 15분 후에 모두, 각각 부위별로 측정하였다. 따라서, 1인 당 6개 혹은 9개의 스펙트럼을 얻을 수 있었다. 측정에 필요한 준비 및 측정에 소요되는 시간은 1개 스펙트럼 당 10초 이내로 시간차를 최소화하였다. 근적외선 분광분석의 측정은 ChemoHN1100(SpectronTech Co., Ltd, Korea)를 이용하여 기록하였다.

실험 결과 및 고찰

근적외분광 스펙트럼을 이용한 혈당 측정 모델의 개발

각 부위별로 얻은 spectrum data를 부분최소제곱법(Partial least square regression)을 실시하여 분석하였다. 부분최소제곱법은 여러 분야에서 널리 쓰이는 다변량 분석법의 하나로 분광 분석을 통해 얻은 스펙트럼 정보와 분석물의 농도 자료에 대해

각각 인자분석을 실시하고 이들간의 상관관계를 포함한 모델을 얻고 이에 대해서 회귀분석을 실시하는 분석법이다.⁹⁻¹¹⁾ 부분최소제곱법의 기본원리는 스펙트럼 정보 matrix(A)와 농도 정보 matrix(C)에 대해 각각 인자분석을 실시하여 각각의 score(S, U)를 얻은 후, 두 score 사이의 관계식을 도출해 내는 것이다. 도출된 관계식을 모델로 하여 회귀분석을 실시한다. 스펙트럼의 특정부분이 아니라 스펙트럼 전체를 대상으로 하며 분석대상 외에 다른 물질들이 많이 섞인 복잡한 화합물을 분석하는데 유용하다. 또, 여러 구성성분들의 농도를 한꺼번에 추정할 수도 있다. Glucose analyzer 2(Beckman Instruments, Inc., USA)를 이용하여 혈장으로부터 얻은 혈당치를 기준농도로 하여 검량식을 작성하였다. 각 부위별로 59개의 스펙트럼을 얻어 이중 컷볼과 손가락에서 얻은 데이터 분석 시 각각 1개, 2개의 스펙트럼을 outlier로 판명해 제거하였다. 이렇게 하여 얻은 스펙트럼은 6 대 4의 비율로 소프트웨어 자체에서 랜덤하게 선택하여 calibration set과 validation set의 두 개의 set으로 나누어졌다. Calibration set은 스펙트럼과 기지의 glucose 농도를 이용하여 흡수 스펙트럼과 glucose 양과의 수학적 관계식 또는 모델을 추정하는데 사용된다. Validation set은 모델을 작성하는데 참여하지 않은 시료 스펙트럼 데이터로 구성되어 있으며, calibration set으로부터 얻은 추정 모델에 스펙트럼 정보를 적용시켜 glucose의 양을 예측해서 모델을 검증하는데 사용된다. Calibration set으로 손가락 부분 분석 시 33개, 컷볼 부분 분석 시 35개, 입술 안쪽 부분 분석 시 35개를 사용하였고 나머지는 모델을 검증하

는데 사용하였다. Calibration set의 오차는 SEC(Standard Error of Calibration)로, validation set의 오차는 SEP(Standard Error of Prediction)로 나타내었고 그 식은 아래와 같다. 모든 데이터 처리는 ChemoHN1100(SpectronTech Co., Ltd, Korea)을 이용하였다.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_{pred,i} - c_{ref,i})^2}{n - k}}$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (c_{pred,i} - c_{ref,i})^2}{p}}$$

- n : number of calibration set
- k : number of PLS factor
- p : number of validation set
- $c_{pred,i}$: predicted concentration of ith sample
- $c_{ref,i}$: reference concentration of ith sample

Table II - Comparison of reference blood glucose concentration value and measurement results using Semi-invasive method ('F')

No.	Reference (mg/dL)	F (mg/dL)	No.	Reference (mg/dL)	F (mg/dL)
1	117	135	27	140	137
2	131	156	28	228	246
3	94	126	29	123	121
4	98	145	30	205	203
5	146	183	31	106	115
6	178	218	32	195	203
7	90	159	33	172	181
8	143	178	34	181	171
9	215	241	35	131	128
10	150	189	36	89	160
11	147	152	37	175	193
12	123	145	38	137	157
13	95	92	39	108	165
14	201	213	40	104	134
15	138	154	41	119	119
16	165	229	42	106	123
17	112	133	43	86	115
18	250	283	44	181	191
19	243	316	45	147	155
20	235	304	46	167	176
21	158	171	47	148	160
22	176	174	48	107	103
23	140	162	49	225	140
24	167	175	50	204	226
25	113	162	51	159	236
26	135	173			

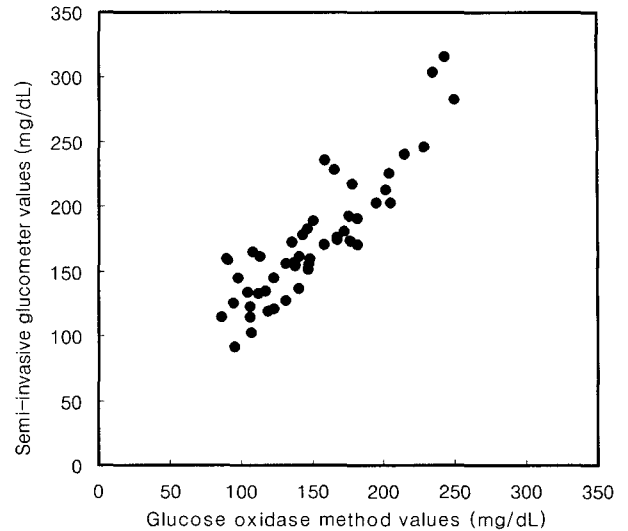


Fig. 2 - Scatter plot showing correlation between reference values by glucose oxidase method and the values from semi-invasive glucometer ('F').

시판 자가 혈당 측정기의 상관성 비교

자가 혈당 측정기 'F'(T사)를 이용하여 얻은 50개의 데이터를 glucose oxidase 법을 이용하여 측정된 결과를 기준으로 하여 비교하였다. 그 값은 Table II와 같다. 상관성은 SEP와 상관계수를 계산하여 비교하였다. SEP는 33 mg/dL, 상관계수(R^2)는 0.778이었다. Fig. 2은 상관관계를 보여주는 그래프이다.

근적외분광분석법에 의한 혈당 측정 모델의 적용 및 평가

NIRS를 이용하여 얻은 평균 스펙트럼은 Fig. 3와 같다. NIR 영역의 스펙트럼은 infrared 영역에서 나타나는 CH, NH, OH 결합 진동의 배음(overtone)이나 결합음(combination band)로서 infrared 영역보다 약하고 broad한 signal을 나타낸다. Fig.

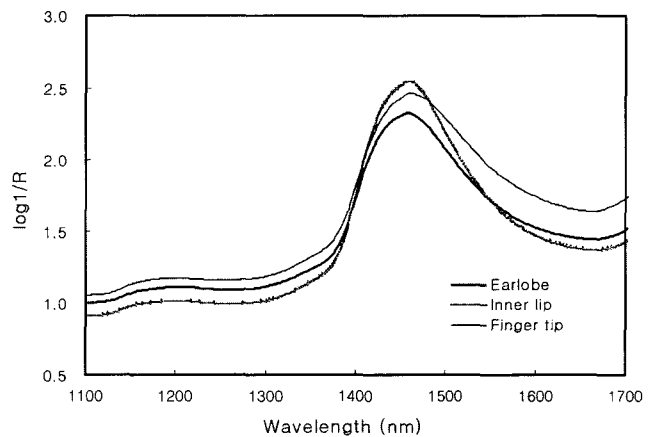


Fig. 3 - *In vivo* reflection spectra of different positions of human body.

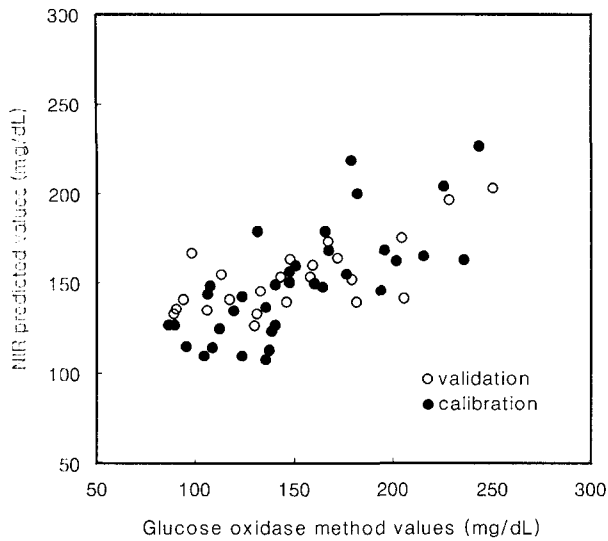


Fig. 4 - Scatter plot showing correlation between reference values by glucose oxidase method and NIR predicted values.

4의 스펙트럼에서 1450 nm에서 보이는 크고 broad한 peak는 피부 수분의 OH기에 의한 것으로 측정부위의 복잡한 성분들에 의한 signal들은 overlap되어 있는 상태이다. 그러나 각 부위별로 다른 양상을 보여주고 있는데, 각 부위의 각질화에 의한 산란 효과나 지방 및 수분의 함량차등에 의한 것으로 본다.^{12,13)} 손가락에 비해 입술 안쪽이나 귓볼은 각질층의 두께가 얇다. 입술 안쪽은 점막임을 고려해야 하고 귓볼과 마찬가지로 측정시 흔들림이 있다. 이러한 영향들을 제거하고 overlap되어있는 signal을 밝히기 위해 스펙트럼의 다양한 전처리 기법을 사용하는데 여기에서는 미분법 및 MSC (Multiplicative scatter correction)를 사용하였다. MSC법은 평균 스펙트럼을 먼저 구하고 각 스펙트럼마다 평균 스펙트럼과의 관계식을 구하고 얻어진 관계식의 기울기로 스펙트럼을 나눈 후 절편을 빼주어 산란효과를 제거해주는 기법이다.¹⁴⁾ 미분법은 주로 1차와 2차 미분이 사용되는데 각 스펙트럼의 상수항을 빼서 절편오차를 보정(1차 미분)하고, 1차 미분의 상수항을 제거해 기울기 오차를 보정(2차 미분)하는 방법이다.¹⁵⁾ 각 측정부위별로 PLSR을 실시하여 데이터를 분석한 결과 귓볼을 이용했을 때 SEP가 가장 작았다. 그 중 2차 미분한 스펙트럼으로부터 얻은 결과가 33 mg/dL로 가장 작은 SEP를 나타내었다.

손가락과 입술 안쪽은 각각 40, 42 mg/dL로 SEP가 크고 상관계수도 0.2이하로 상관성이 없다고 판별되었다. 모델링 결과와 그 모델의 검증결과를 Table III에 나타내었다. 귓볼이 다른 부위에 비해 더 좋은 결과가 나온 것은 그 부위의 각질층이 적을 뿐만 아니라 개인차도 적은 것이 주된 원인이다. 그 외에 입술안쪽의 점막에 의한 영향도 없고, 손가락에 비해 피부 표면 수분의 영향도 작다. 2차 미분한 귓볼 스펙트럼을 이용하여 얻은 SEP는 33 mg/dL로 시판되는 자가 혈당 측정기의 SEP와 같은 값이다. Fig. 4에서 2차 미분한 귓볼 스펙트럼으로부터 얻은 모델을 이용하여 근적외선 분광분석법을 이용한 측정 결과와 glucose oxidase 법을 이용한 측정 결과의 상관성을 그래프로 나타내었다.

결론

새로 개발한 휴대용 NIR 분광분석기로 혈당을 측정할 결과 시판되고 있는 자가혈당측정기와 같은 오차를 나타내었다. 시판용 자가혈당 측정기와 비교하여 상관계수가 낮게 나왔는데 이것은 기준값에 대해 시판용 자가혈당 측정기의 혈당 측정치가 휴대용 NIR 분광 분석기보다 더 넓은 범위에 걸친 결과를 나타내기 때문이다. 이번 연구를 통해 새로 개발한 휴대용 NIR 분광분석기를 이용한 비침투 혈당 측정기의 개발 가능성을 확인할 수 있었다. 앞으로 측정부위에 대한 조직학적인 연구 및 측정부위별로 재현성 있는 결과를 얻기 위한 측정 방법의 연구가 진행되어야 할 것이다. 그밖에 분광학적 측정에 영향을 줄 수 있는 피부온도의 차이, 측정 조직의 개인차 등을 보정하기 위한 연구를 통해서 더 개선된 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

혈당 측정에 도움을 주신 세브란스 병원의 내분비내과 당뇨병 센터의 이금아 선생님, 김하동 선생님께 감사드립니다. 또한 이 실험은 한국 산업 기술 평가원의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Table III - Calibration models for non-invasive blood glucose measurement

Section	Wavelength (nm)	Range (Mean) (mg/dL)	Pretreatment	Factor	Calibration	Validation
					SEC (mg/dL)	SEP (mg/dL)
Earlobe	1100-1740	86-250 (150)	First derivative	4	30	33
Inner lip	1100-1740	86-250 (150)	MSC	8	34	40
Finger tip	1100-1740	86-250 (150)	Second derivatives	6	42	42

문헌

- 1) S. Mansouri, J. S. Schultz : A miniature optical sensing of glucose using phase modulation fluorimetry. *Biotechnology* **2**, 885 (1984).
- 2) M. J. McShane, S. Rastegar, G. L. Cote : Probe design for implantable fluorescence based sensor. *Proc. SPIE* **3599**, 93 (1999).
- 3) G. L. Cote, B. D. Cameron : Noninvasive polarimetric measurement of glucose in cell culture media. *J. Biomed. Opt.* **275** (1997).
- 4) O. S. Khalil : Spectroscopy and clinical aspects of noninvasive glucose measurements. *Clin. Chem.* **45**, 165 (1999).
- 5) K. Martin : In vivo measurements of water in skin by near-infrared reflectance. *Appl. Spectrosc.* **52**, 1001 (1998).
- 6) S. Tsuchikawa, K. Hayashi and S. Tsutsumi : Nondestructive measurement of the subsurface structure of biological material having cellular structure by using near-infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **50**, 1117 (1996).
- 7) D. M. H., M. R. Robinson, G. W. Koepp, E. V. Thomas and R. P. Eaton : Reagentless near-infrared determination of glucose in whole blood using multivariate calibration. *Appl. Spectrosc.* **46**, 1575 (1992).
- 8) I. R. Kupke, B. Kather and S. Zeugner : On the composition of capillary and venous blood serum. *Clin. Chem. Acta* **112**, 177 (1981).
- 9) H. Martens, T. Nase : Multivariate calibration. John Wiley & Sons, New York (1989)
- 10) P. Bhandare, Y. Menddelson, R. A. Peura, G. Janatsch, J. D. Kruse-jarres, R. Marbach and H. M. Heise : Multivariate determination of glucose in whole blood using partial least-square and artificial neural networks based on mid-infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **47**, 1214 (1993).
- 11) M. R. Riely, M. A. Arnold and D. W. Murhammer : Matrix enhanced calibration procedure for multivariate calibration models with near infrared spectra. *Appl. Spectrosc.* **52**, 1339 (1998).
- 12) A. Bittner, S. Thomaßen and H. M. Heise : In vivo measurements of skin tissue by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Mikrochim. Acta* **14**(Suppl.), 429 (1977).
- 13) K. Martin : In vivo measurements of water in skin by near infrared reflectance. *Appl. Spectrosc.* **52**, 1001 (1998).
- 14) A. Candolf, R. De Maeschlick, D. Joun-Rimboud and DL Massart : The influence of data pre-processing in the pattern recognition of excipients near-infrared spectra. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**(1), 115 (1999)
- 15) D. W. Hopkins : Derivatives of spectroscopy. *Near infrared analysis* **2**(1), 1 (2001).