

## 혈당측정을 위한 폴리우레탄 진단막의 제조에 관한 연구(5) : 온도와 습도가 글루코우즈의 농도 측정에 미치는 영향

권 석 기<sup>†</sup> · 박 인 희 · 윤 도 영

홍익대학교 과학기술대학 화학시스템공학과

(2007년 1월 22일 접수, 2007년 2월 21일 채택)

### Studies on the Preparation of Polyurethane Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (5) : Effects of Temperature and Humidity on the Measurements of Glucose Concentration

Suk-Ky Kwon<sup>†</sup>, In-Hee Park, and Do-Young Yoon

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

(Received January 22, 2007, Accepted February 21, 2007)

**요약:** 당뇨병 환자의 혈당치 측정을 위하여 폴리우레탄으로 만들어진 진단막을 제조하였다. 플라즈마와 혈액속의 글루코우즈의 농도를 변화시켜가며 활성화된 폴리우레탄 진단막을 가지고 680 nm에서의 최종흡광도를 측정하였다. 여러 가지 보관온도에서 3일, 1주, 3주, 5주간 보관 후 온도가 글루코우즈의 농도 측정에 미치는 영향을 조사하였다. 우레탄 진단막의 안정성을 상대습도 80%에서 측정하였다.

**Abstract:** Polyurethane diagnostic membranes were prepared to measure blood glucose level of diabetics. Final absorbances at 680 nm through activated polyurethane membranes were measured at various concentration of glucose in plasma or blood. The effects of storage temperatures on the measurements of glucose concentration were studied after storage of 3 days, 1 week, 3 weeks, and 5 weeks at various temperatures. The stabilities of polyurethane diagnostic membranes were examined at RH 80%.

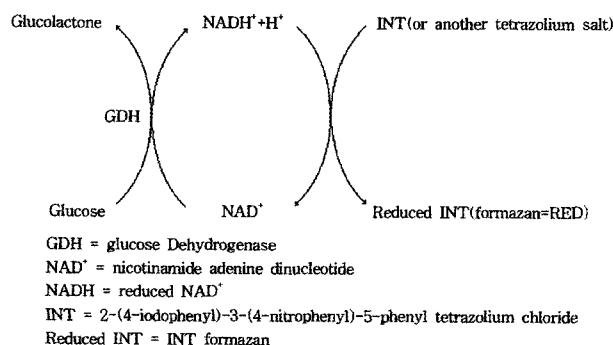
**Keywords:** Polyurethane, membranes, diabetics, glucose

### 1. 서 론

오래전부터 당뇨병은 식사를 너무 많이 하거나 몸이 비만인 사람들에게 나타나는 단순한 병으로 알려져오고 있었다[1,2]. 그러나 최근에 들어 당뇨병은 선천적 또는 후천적 이유로 인해 사람의 혈액 속의 글루코우즈의 농도가 비정상적으로 높은 상태를 갖는 심각한 만성적인 질병으로 밝혀졌다[3,4]. 특히 당뇨병이 생기는 원인들로는 유전적인 요소와 환경적인 요소 즉 생활습관에 따른 여러 가지 요소들에 의해 영향을 받는다고 알려졌다[5].

<sup>†</sup>주저자(e-mail : smchurch@hongik.ac.kr)

1921년 인슐린이 인체 내의 체장에서 만들어지는 효소로서 피 속의 글루코우즈를 세포로 이동시키는 유일한 호르몬이라는 사실이 발견된 이후 많은 사람들이 인슐린에 의한 치료 등에 의해 당뇨병으로부터 오는 심각한 합병증을 예방하게 되었다[6]. 당뇨병은 인슐린의 존도에 따라 성인당뇨병과 유아당뇨병으로 나누어진다. 성인당뇨란 30대 이상의 성인에게 나타나며 어느 정도의 정상 인슐린을 갖고 있어 식사조절과 적당한 운동에 의해 혈당치를 정상적으로 유지할 수 있는 상태를 말한다[7,8]. 그러나 유아당뇨란 청소년 및 유아들에게 많이 나타나는 질병으로 제대로 작용할 수 있는 정상 인슐린이 거의 없거나 또는 변형되어 외부에서 인슐린을 꼭



Scheme 1. Analytical method of reductive enzyme chemistry.

투여해야 하는 상태를 말한다[9]. 어느 경우에나 혈당치를 정상적으로 유지해야만 당뇨병으로 인한 합병증을 막을 수 있다. 그러므로 혈당치를 유지하기 위해서나 당뇨병을 초기 진단하기 위해서는 인체 내의 혈당치를 정확하게 측정하는 것이 매우 중요하다[10]. 특히 유아 당뇨의 경우 정확한 인슐린의 양을 인체 내에 투여하기 위해서는 혈당치를 정확히 알아야만 한다[11,12].

혈액 속의 글루코우즈의 농도를 측정하기 위한 기구들이 오래전부터 많은 관심 가운데 개발되어 왔다[13]. 특별히 당뇨병환자가 스스로 혈당치를 측정할 수 있는 이동식 자가 진단 기구에 대한 연구는 매우 활발히 전개되어 왔다[13,14]. 이러한 혈당 측정용 진단 기구에는 혈액을 흡수하거나 또는 통과시키는 진단막의 역할이 매우 중요하다[15]. 진단막의 내부에는 글루코우즈와 반응하는 효소들과 염료들이 들어있어 그들과의 반응에 따라 변하는 색의 정도에 따라 글루코우즈의 농도를 측정하게 된다[16,17].

혈당을 측정하는 진단 시스템은 사용되는 효소에 따라 분석방법들이 달라지게 되는데 크게는 산화효소 분석방법과 환원효소 분석방법으로 나눌 수 있다[18]. 보통 가장 편리하게 사용되는 산화효소 분석으로는 glucose oxidase (GOD)와 peroxidase (POD)를 이용하는 방법이 있으나 외부의 산소공급이 혈당치에 크게 영향을 미치는 단점을 가지고 있다[18,19]. 최근 들어서는 환원효소를 이용하는 분석법이 더 활발히 사용되고 있는데, Scheme 1에 나타나 있는 glucose dehydrogenase (GDH)와 diaphorase과 같은 효소들을 이용한 분석법이 가장 대표적이라 할 수 있다[19].

자가 진단기의 진단막으로는 다양한 재료들이 사용되어 왔으나 최근 들어서는 합성 고분자를 이용한 진단막에 관한 연구가 활발히 전개되어 왔다[20]. 합성 고분

First Dip	TiO <sub>2</sub> Solution
Second Dip	Indicator Solution
Third Dip	Enzyme Solution
Fourth Dip	Polymer Solution
Fifth Dip	Crosslinking Solution

Fig. 1. Activation order for polyurethane membranes.

자의 경우 표면처리가 용이하고 미세기공의 조절이 가능하며 대량생산이 가능하다는 장점이 있다[20,21]. 특히 폴리우레탄을 이용한 분리막의 경우 다양한 장점을 가지고 있어 진단막으로의 활용이 매우 용이하다고 알려져 있다[21].

폴리우레탄 진단막을 혈당치 측정에 사용하기 위해서는 여러 가지 단계의 활성화를 거쳐야 한다[22]. 그 첫 번째로는 색이 투명하게 나타나기 위해 TiO<sub>2</sub>를 첨가하는 단계이고, 두 번째로는 지시약을 첨가하는 단계이고, 세 번째는 효소를 첨가하는 단계이고, 네 번째는 색이 균일하게 퍼지고 단일하게 나타내기 위한 고분자를 첨가시키는 단계이며, 마지막으로는 첨가된 시약들이 잘 내재해 있도록 경화제를 첨가하는 단계로 나눌 수 있다[22]. Fig. 1에서는 위의 단계들을 순서에 맞게 나타내고 있다.

피 속의 글루코우즈의 농도를 측정하기 위해 사용되는 진단막이 장기간 정확한 결과를 나타내기 위해서는 여러 가지 환경에서 받을 수 있는 영향을 조사할 필요가 있다. 특별히 우레탄 진단막에서 사용된 효소 시스템들은 온도와 습도에 의해 영향을 받을 수 있기에 여러 가지 온도와 습도에서 보관한 후 혈당을 측정하는 것이 매우 중요하다고 본다. 그러므로 온도의 경우 낮은 온도인 5°C로부터 높은 온도인 75°C까지 3일에서 5주간 보관하고, 습도의 경우 높은 상대습도 80%에서 10시간에서 25시간 보관하여 각각의 경우에서 환경이 진단막의 혈당측정에 보여주는 영향을 알아내고자 한다.

본 연구에서는 0.3 μm 정도 되는 미세기공을 보유한 폴리우레탄 분리막을 각종 효소 및 용액들을 이용해 활성화시켜 글루코우즈 측정용 진단막을 제조하였다. 제조된 진단막과 여러 농도의 글루코우즈 용액과 반응시켜 글루코우즈 농도에 따른 기본 직선을 얻었다. 제조된 진단막이 각종 온도에서 장기간 보관한 후 보관 온

도가 진단막의 혈당 측정에 어떤 영향을 주는가를 조사하였다. 또한 습도와 같은 환경적인 요인들이 글루코우즈 농도 측정에 어떻게 작용하는지에 대해 조사하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

2-(*p*-iodophenyl)-3-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloide (INT), methanol, sodium phosphate, polyethyleneimine (PEI), diaphorase, glucose, dehydrogenase (GDH), PIPES (Na salt), NAD (Sigma Type V-C), Triton X-100, bovine serum albumine (BSA), Olin 10 G, poly (vinyl alcohol), plasma (혈장), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC) 등은 Sigma로부터 구입해 정제 없이 사용하였다. TiO<sub>2</sub> (325 mesh size, anatase)는 Aldrich에서 구입해 정제 없이 사용하였다. 사용된 폴리우레탄 MOV분리막은 Baeyer에서 직접 구입해 사용하였다.

### 2.2. 장치

Enzyme, TiO<sub>2</sub>, INT, polymer solution 등을 교반하는데는 Talboys에서 제작한 T-Line mechanical stirrer을 사용하였다. 얻어진 용액의 점도는 Brookfield 점도계로 측정하였다. 글루코오즈의 농도에 따라 INT의 색 변환 정도는 Shimadzu사의 UV-2101PC 자외선/가시광선 흡광 분석기를 사용하여 분석하였다. 항온조는 Johnson JS-WBP-170P 모델을 사용하였다.

### 2.3. 폴리우레탄 진단막의 제조

#### 2.3.1. Dip 용액의 제조

폴리우레탄 분리막을 활성화시키기 위해서는 5가지 dip용액들이 필요하다(Fig. 1.) TiO<sub>2</sub> dip, indicator dip, enzyme dip, polymer dip, 그리고 crosslinking dip 용액들의 조성들을 Table 1에서 나타내었다.

#### 2.3.2. 진단막의 제조 및 측정 시험

Polyurethane MOV 분리막을 우선 TiO<sub>2</sub> dip에 담근 후 꺼내어 건조 오븐에서 건조시킨다. 그 다음 INT를 함유한 incator dip에 담근 후 건조 오븐에서 건조시킨다. 같은 방법으로 우레탄 분리막을 다섯 가지 dip를 통해 차례차례 활성화 시킨다. 활성화된 우레탄 진단막을 1 cm × 1 cm 크기로 잘라 가로 직경 0.5 cm, 세로 직

경 0.8 cm, 두께 0.2 cm인 타원형의 샘플 흡입용 플라스틱(PE) 2장 사이에 넣고 높은 온도에서 열처리한 후 노출된 부분을 절제하여 측정용 샘플을 제조하였다. 플라즈마 또는 혈액 100 mL에 각 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg의 글루코오즈를 넣어 잘 교반시켰다.

얻어진 측정용 샘플에 각각의 용액 한 방울씩을 떨어뜨려 반응시켜 매순간 생성하는 formazan의 농도의 변화를 680 nm에서의 흡광도를 통해 얻어내었다[12]. Formazan의 농도는 처음 10초간 급격히 증가하다가 40 초 이후에 최대치를 형성한 후 최종 평형값을 갖는 것으로 나타냈다. 그래서 안정적으로 60초에서의 흡광도를 통해 형성된 formazan의 농도를 시간으로 나눈 값을 K/S로 정의하고 이 값을 통해 각각 글루코우즈의 농도를 표시하였다. 최종적으로 여러 가지 농도에서의 그래프를 그려 기울기를 통해 글루코우즈와 K/S와의 관계를 얻어내었다[12].

#### 2.4. 환경변화에 따른 안정성 실험

##### 2.4.1. 온도 변화에 따른 안정성 시험

폴리우레탄 진단막으로 통해 얻어진 측정용 샘플을 온도가 조절되는 환경시험소에서 보관하였다. 보관되는 온도는 5, 15, 25, 50, 75°C이며 각각의 온도에서 3일간 보관한 후 글루코오즈 기준 용액을 가지고 INT의 색 변화에 따른 680 nm에서의 흡광도를 얻고, 이에 따른 K/S결과에 따라 K/S와 농도와의 관계를 얻어내었다. 5, 25, 50°C에서 1주, 3주 또는 5주씩 보관한 후 같은 방법으로 측정하였다.

##### 2.4.2. 습도 변화에 따른 안정성 시험

얻어진 테스트용 폴리우레탄 진단막을 상대습도 80%로 고정된 환경 실험실에서 10, 15, 20, 25시간 보관한 후 각각의 샘플에 대해 글루코오즈 기준용액을 가지고 INT의 색변화에 따른 680 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 얻어진 흡광도에 따라 K/S치를 얻어내고 습도 변화에 따른 K/S와 농도와의 기울기 값을 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. K/S에 미치는 글루코오즈 농도의 영향

플라즈마에 녹아 있는 글루코오즈의 양을 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg/dL으로 변화시키면서 얻어진 K/S (680 nm)의 측정치를 각각의 농도에 대해 얻어

**Table 1.** Various Concentrations of Reagents in Activation Dips

Component	Stock conc.	Weight added (g)	Final weight (%)	Final conc.	Enzyme activity
<i>TiO<sub>2</sub> Dip</i>					
TiO <sub>2</sub> submix		60.00			
TiO <sub>2</sub> (2020)	50.00%		10.00		
Polyethylenimine (30%)	8.00%		0.48	0.069 mM	
Na phosphate	0.40%		0.08	5.798 mM	
Water	41.60%				
Water		240.00	89.44		
Totals		300.00	100.00		
<i>Indicator Dip</i>					
INT HCL		7.59	5.06	100.1 mM	
Methanol		92.40	61.60	19.23 M	
Water		50.01	33.34		
Totals		150.00	100.00		
<i>Enzyme Dip</i>					
Diaphorase	110 U/mg	0.76	0.51	557 U/g	177 U/g
GDH	50.3 U/mg	1.98	1.32	664 U/g	238 U/g
PIPES (Na salt)		15.40	10.27	299.9 mM	
NAD (Siama type V-C)		1.50	1.00	15.074 mM	
BSA (fraction V)		0.75	0.50		
Triton X-100		1.50	1.00		
Water		128.11	85.41		
Totals		150.00	100.00		
<i>Polymer Dip</i>					
Gelatin (ZKN 707)	10.00%	10.00	0.50		
Olin 10 G	5.00%	20.00	0.50	5.202 mM	
poly(vinyl) alcohol	5.00%	20.00	0.50	0.056 mM	
Water		150.00	98.50		
Totals		200.00	100.00		
<i>Crosslinking Dip</i>					
EDAC		0.30	0.20	10.433 mM	
Olin 10 G	5.00%	1.50	0.05	0.520 mM	
Water		148.20	99.75		
Totals		150.00	100.00		

진 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보여지는 것과 같이 농도와 K/S와의 관계가 직선식으로 나타나는 것을 볼 수 있다.

또한 혈액에 녹아있는 글루코오즈의 농도(mg/dL)의 변화에 따른 K/S와 농도와의 관계식을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2는 혈액 속에 녹아있는 글루코오즈의 농도와 K/S측정치와의 관계도 직선식으로 나타남을 잘 보여주고 있다. Fig. 2에서의 각각의 결과를 비교하여 보면 플라즈마와 혈액에서의 글루코오즈의 농도변화와 K/S의 기울기 값(Dose-Response Slope: DRS)은 큰 차이가 없고 혈액에서 얻은 절편치가 플라즈마에서 얻은

절편치보다 다소 위에 있음을 알 수 있다.

### 3.2. 온도변화에 따른 K/S 측정치의 영향

폴리우레탄 진단막을 각각 다른 온도(5, 15, 25, 50, 75°C)에 3일간 보관한 후 글루코오즈 기준용액과 반응시킨 후 얻어진 결과를 Fig. 3에서 나타내었다. Fig. 3은 농도 변화에 따른 글루코오즈의 농도와 K/S의 측정치와의 DRS변화를 각각의 온도에 따라 나타내었다. Fig. 3에서 5°C에서 25°C까지는 변화가 없다가 50°C에서 볼 수 있는 것처럼 온도가 75°C의 경우 DRS가 다소 많이 낮아짐을 알 수 있다. 그러나 그 차이가 크지 않

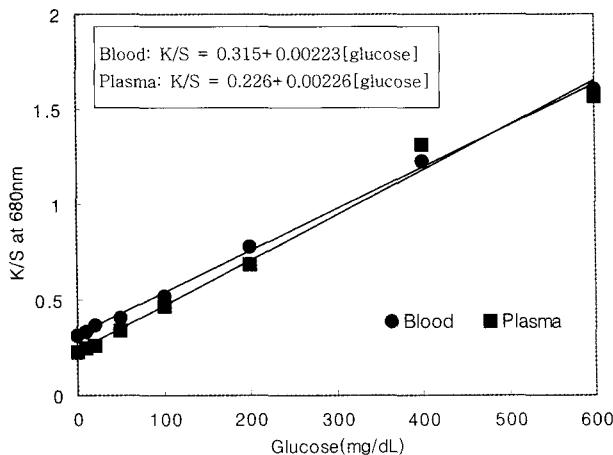


Fig. 2. Relationship between K/S values and plasma or blood glucose concentration.

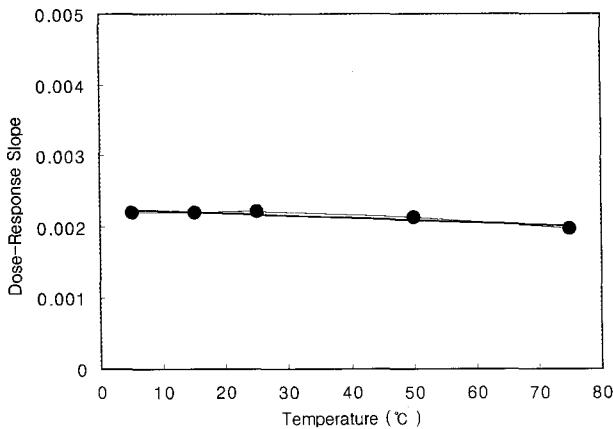


Fig. 3. Dose-Response slope for 3 days at various temperatures.

아 폴리우레탄 진단막을 이용한 글루코오즈의 측정은 보관온도에 따라 큰 변화가 없음을 알 수 있다. 또한 Fig. 4에서는 5, 25, 30°C에서 1주, 3주, 5주간 보관하였을 때의 결과를 나타내고 있다. Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 보관기간이 3주나 4주처럼 다소 길어도 세온도에서의 DRS값은 오차 영역 내에 들어가므로 5, 25, 50°C에서의 장기간 보관 후에도 폴리우레탄 진단막을 통한 글루코오즈의 농도측정에는 큰 문제가 없음을 알 수 있다.

### 3.3. 습도 변화에 따른 K/S측정치의 영향

얻어진 폴리우레탄 진단막을 상대습도 80%로 조절된 환경실험실에서 10, 15, 20, 25시간 보관한 후 얻어진 DRS의 결과를 Fig. 5에서 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것과 같이 상대습도 80%에서의 보존시간이

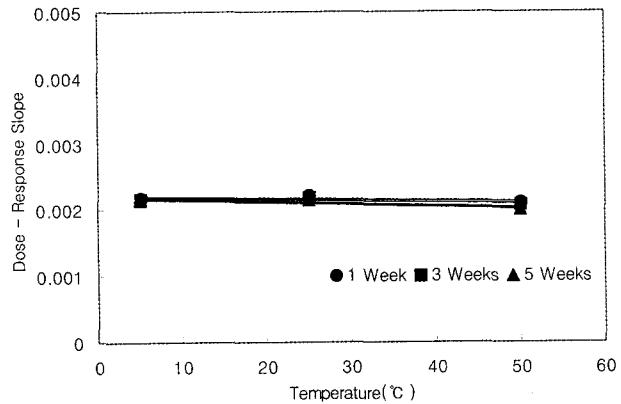


Fig. 4. Values of dose-response slope at various temperature for 1 week, 3 weeks and 5 weeks.

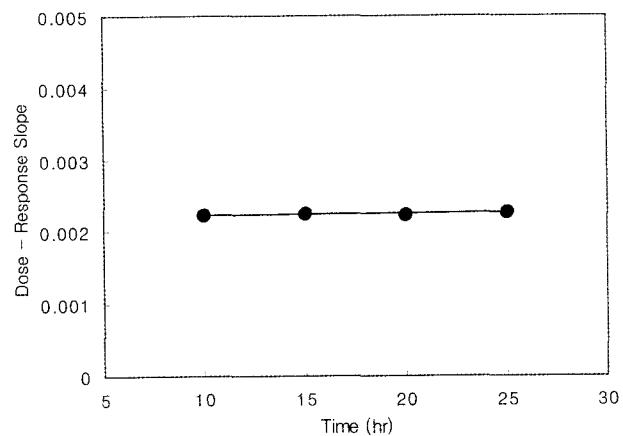


Fig. 5. Relationship between dose-response slope and time at 80% RH.

증가해도 DRS가 그다지 감소하지 않음을 알 수 있었다. 이것은 공기 중의 수분이 글루코오즈의 측정 페카니즘에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

## 4. 결론

폴리우레탄 진단막을 이용한 글루코오즈의 농도를 측정하기 위해 여러 가지 환경변화에 따른 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 폴리우레탄 진단막을 이용해 플라즈마와 혈액에 각각 녹아있는 여러 가지 농도의 글루코오즈와 반응시킨 결과 농도와 680 nm에서 얻어진 K/S측정치의 관계가 직선으로 비례함을 알 수 있었다.

(2) 폴리우레탄 진단막을 5, 15, 25, 50, 75°C의 여러 가지 온도에서 3일, 1주, 3주, 5주간 보관한 후 K/S측정치(680 nm)를 얻은 결과 온도의 변화에 따라 DRS가 5,

15, 25°C에서는 크게 변하지 않다가 50°C에서는 다소 낮아지고, 75°C에서 다소 많이 낮아짐을 알 수 있었다.

(3) 폴리우레탄 진단막을 상대습도 80%에서 10, 15, 20, 25시간 보관한 후 각각의 농도의 글루코오즈와 반응시켜 K/S를 얻어낸 결과 시간이 증가해도 DRS가 크게 변하지 않음을 알 수 있었다.

### 감 사

본 연구는 2006년도 홍익대학교 학술 연구 진흥비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. S. Kwon, "Studies on the Multi-Layered Gelatin Diagnostic Membranes for Diabetes (2): Effects of Interferents in Blood on the Diffusion-Controlled Rates of Glucose", *Membrane J.*, **9**, 4 (1999).
2. S. Kwon, "Studies on the Polyurethane Diagnostic Membrane for Diabetes (2): Effects of Additives in Membrane Formulations for the Measurement of Urine Glucose", *Polymer (Korea)*, **18**, 6 (1994).
3. S. Kwon, "Basic Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes by Using Multi-Layered Gelatin Films to Measure Blood Glucose Level of Diabetics", *Membrane J.*, **8**, 1 (1998).
4. Home Health Management Research Institute "Diabetes", Kumyoung, Seoul (1992).
5. W. S. Hong, "Oriental Treatment for Modern Disease", Hyoseong, Seoul (1993).
6. K. S. Lee, "Modern Disease Digest", Kuckminilbo-sa, Seoul (1992).
7. S. Kim, "Life Guide for Diabetes Control", Hyoseong, Seoul (1993).
8. D. W. Jung, "Health Control for Modern People", Ohchon, Seoul (1993).
9. J. M. Kim, "Diabetes : Diagnostics and Control", Ohsung, Seoul (1997).
10. S. Kwon, *Hongik Industrial Technology*, **13** (2003).
11. D. H. Kang, "Physiology", Shin Kwang, Seoul (1988).
12. S. Kwon, "Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (1): Model Experiments by Using Microporous Polyurethane Membranes", *Hongik Industrial Technology*, **12** (2002).
13. M. Jain and R. Wagner, "Introduction to Biological Membranes", Wiley, New York (1980).
14. S. Kwon, "A Study on the Preparation of Polyurethane Diagnostic Membrane for Urine Glucose Test", *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, **5**, 6 (1994).
15. S. Kwon and B. Lee, "Studies on the Multi-Layered Gelatin Diagnostics Membranes for Diabetes (1): Effects of Temperature and Humidity on the Diffusion-Controlled Rates of Glucose", *Membrane J.*, **9**, 2 (1999).
16. R. P. Back, "Biosensor Technology", Marcel Dekker, New York (1990).
17. S. Kwon, "Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (3): Effects of Hematocrit on the Measurements of Glucose Concentration", *Hongik Industrial Technology*, **14** (2004).
18. H. V. Bergmeyer, "Methods of Enzymatic Analysis", VCH, Weinheim (1981).
19. D. T. Plummer, "An Introduction to Practical Biochemistry", McGraw-Hill, London (1978).
20. R. E. Kesting, "Synthetic Polymeric Membranes", Wiley-Interscience, New York (1985).
21. M. Gordon, "Polymer Membranes", Springer-Verlag, New York (1985).
22. S. Kwon, "Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (4): Effects of Additives in Blood on the Measurements of Glucose Concentration", *Hongik Industrial Technology*, **15** (2005).