

혈당측정을 위한 폴리우레탄 진단막의 제조(6) : 헤마토크릿이 글루코우즈의 농도 측정에 미치는 영향

권 석 기[†]

홍익대학교 과학기술대학 바이오화학공학과

(2010년 8월 9일 접수, 2010년 9월 2일 수정, 2010년 9월 3일 채택)

Preparation of Polyurethane Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (6) : Effects of Hematocrit on Measurements of Glucose Concentration

Suk-Ky Kwon[†]

Department of Biological and Chemical Engineering, Hongik University, Seoul 121-791, Korea

(Received August 9, 2010, Revised September 2, 2010, Accepted September 3, 2010)

요 약: 당뇨병 환자의 혈당치 측정을 위하여 폴리우레탄으로 만들어진 진단막을 제조하였다. 혈액 속의 글루코우즈의 농도를 변화시켜가며 폴리우레탄 진단막을 가지고 680 nm에서의 최종흡광도를 측정하였다. 시간에 따른 흡광도 변화량(K/S)의 최종 결과치가 글루코우즈의 농도가 증가함에 따라 직선적으로 증가하였다. 헤마토크릿이 글루코우즈의 농도 측정에 미치는 영향을 조사하였다. 낮은 헤마토크릿에서는 글루코우즈의 농도와 K/S와의 기울기 값(Dose-Response Slope : DRS)이 플라즈마와 비교해 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 높은 헤마토크릿(40% 이상)에서는 상당히 감소함을 알 수 있었다.

Abstract: Polyurethane diagnostic membranes were prepared to measure blood glucose level of diagnostics. Final absorbances at 680 nm through activated polyurethane membranes were measured at various concentration of glucose in blood. The end-point results of varying absorbance values as time (K/S) was found to have a linear relationship toward the blood glucose concentration. The effects of hematocrit on the glucose concentration measurements were examined. In low hematocrit, dose-response slope (DRS) values between glucose concentration and K/S values did not show the big differences compared to those in plasma. However, in high hematocrit (more than 40%) DRS values were considerably decreased.

Keywords: polyurethane, membranes, diabetics, glucose, hematocrit

1. 서 론

오랫동안 사람들은 당뇨병을 그다지 심각한 질병으로 여기지 않고 그저 나이를 먹으면 나타나는 노인병 중의 하나라고 여겨왔다[1,2]. 그러나 최근 들어 식생활습관과 생활환경이 급격히 변화함에 따라 점점 당뇨병 환자가 심각하게 늘어가는 추세에 있다[3]. 당뇨병은 췌장에서 생산되는 인슐린의 분비가 정상적이지 못하거나, 분비된 인슐린이 정상적인 역할을 못하게 됨에 따라 생

기는 질병이다[4]. 당뇨병이 생기는 가장 주된 요인으로서는 유전적 요인이라고 알려져 왔으나 최근 들어서는 환경적 요인이 크게 작용하는 것으로 추정되고 있다[5]. 1921년 인슐린이 인체 내의 췌장에서 만들어지는 효소이며 혈액 속의 글루코우즈를 세포 속으로 이동시키는 유일한 호르몬이라는 사실이 발견되었고 그로 인해 많은 사람들이 인슐린 투여에 따른 치료 등으로 당뇨병으로부터 오는 심각한 합병증을 예방하게 되었다[6]. 당뇨병은 크게 제1형의 인슐린 의존형, 제2형의 인슐린 비의존형, 그리고 제1.5형의 인슐린 요구형으로 나눌 수 있다[7]. 제1형의 경우 유아당뇨병으로 알려져 있고 인

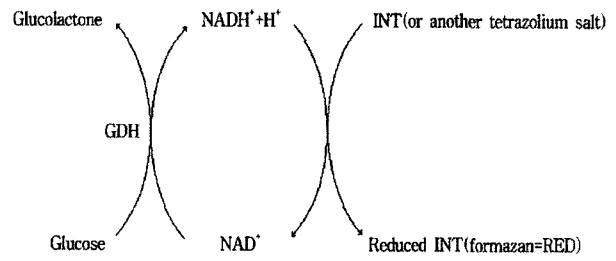
[†]주저자(e-mail: smchurch@hongik.ac.kr)

술린의 투여가 절대적이며 철저한 관리가 요구된다[8]. 제2형은 성인당뇨병으로 주로 알려져 있으며 철저한 식생활 조절과 운동으로 적당한 혈당치를 유지할 수 있는 질병이다[9]. 제1.5형의 경우 적절한 식사와 운동이외에 경구혈당강하제 또는 인슐린투여가 필요한 형태이다[10].

당뇨병에 대해 어느 정도 알고 있는 사람들은 당뇨병 환자에게는 그 고유의 증상인 다갈증이 있어 물을 자주 마시며, 소변을 자주 보고, 체중이 감소하고, 손발이 저리다는 자각증상들이 나타난다는 사실을 알고 있다. 그러나 이와 같은 증상들은 높은 혈당치가 지속적으로 유지될 때 나타나는 것으로 실제로 병의 초기 단계나 비교적 가벼운 상태에서는 거의 나타나지 않는다[2,3]. 그러므로 당뇨병을 진단하기 위해서는 혈액검사를 통해 진단하는 것만이 정확하다는 것을 인식해야 한다. 혈액을 통해 당뇨병을 진단하는 방법으로 단기적 진단법과 장기적 진단법으로 나누어 볼 수 있는데 단기 진단의 경우, 자가혈당 진단 기구를 이용해 혈당을 측정하는 방법으로 공복 시 혈당이 110 mg/dL 이상이거나 식후 2시간 후 200 mg/dL 이상이면 당뇨병으로 간주된다[11]. 장기 진단의 경우 HbA_{1c}검사나 글루코알부민검사, 그리고 1.5AG검사 등을 들 수 있으며 그 정확도가 매우 높고 장기간 혈당의 역사를 알 수 있는 장점이 있다[11].

당뇨병은 예방과 진단 그리고 관리가 모두 중요한 질병중의 하나다. 이러한 것들은 주로 혈당을 규칙적으로 측정함으로써 가능해진다[12]. 그러므로 당뇨병 환자는 자기의 혈당을 스스로 측정하기 위해 자가혈당 측정기기를 사용하는 것이 필수적이다[13]. 자가혈당 측정기기에는 여러 가지가 시판되고 있으나 그 기본적인 측정방법은 대체로 비슷하고 주로 혈액 속의 글루코오스와 효소들이 반응하여 색이 변하도록 유도해 그 변하는 정도에 따라 혈당을 측정한다[14]. 사용되는 효소에 의해 크게 산화효소법과 환원효소법으로 나누어진다. 산화효소법의 경우 외부의 영향에 민감하기 때문에 최근 들어서는 환원효소를 이용한 측정법을 많이 사용하고 있다[15]. Fig. 1에서는 glucose dehydrogenase (GDH)와 diaphorase를 이용한 환원효소법에 대한 개요를 나타내고 있다[16].

자가혈당 측정기기에 사용되는 진단막의 경우 다양한 재료들이 사용되어 왔다. 초기에는 천연고분자를 이용한 진단막을 주로 사용하였으나 최근 들어서는 합성고분자를 이용한 진단막에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[17,18]. 폴리우레탄을 이용한 진단막의 경



GDH = glucose Dehydrogenase
 NAD⁺ = nicotinamide adenine dinucleotide
 NADH = reduced NAD⁺
 INT = 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride
 Reduced INT = INT formazan

Fig. 1. Analytical method of reductive enzyme chemistry.

Table 1. Activation Process for Diagnostic Membrane

5th step	Crosslinker dip
4th step	Polymer dip
3rd step	Enzyme dip
2nd step	Indicator dip
1st step	TiO ₂ dip

우 표면처리가 용이하고 적당한 미세기공을 가지고 있어 혈당측정을 위한 진단막의 사용에 많은 장점이 있다고 알려져 있다[19].

폴리우레탄 분리막을 혈당치 측정에 사용할 수 있는 진단막으로 만들기 위해서는 여러 단계의 활성화를 거쳐야 한다[20]. Table 1에서 활성화의 여러 단계를 보여주고 있다. 그림에서 볼 수 있는 것처럼 첫 번째는 색을 투명하게 나타내기 위해 TiO₂ 첨가단계를 거쳐야 하고, 두 번째는 색을 나타내는 지시약 첨가단계이고, 세 번째는 글루코오스와 반응하는 효소 첨가단계이고 네 번째는 색이 균일하게 퍼지는 것을 도와주는 고분자 첨가단계이고, 마지막 단계는 이미 첨가된 시약들이 진단막 내부에 잘 정착하도록 도와주는 경화제 첨가단계이다[21].

앞에서 발표된 논문들은 먼저 0.3 μm 정도의 미세기공을 보유한 폴리우레탄 분리막의 제조 과정과 기본적인 측정 메카니즘에 대해 기술하였고[20], 그 다음에는 혈당을 측정하는데 가장 중요한 여러 가지 요인들인 온도와 습도의 영향들에 대해 조사하였고[21,22], 또한 혈

액 속에 있는 첨가물들이 혈당측정에 미치는 영향에 대해 조사하였다[23]. 본 연구에서는 혈중 글루코우즈 농도 측정에 크게 영향을 줄 수 있는 혈액중의 혈구용적물인 헤마토크릿에 관해 특별히 집중적으로 연구하였다. 헤마토크릿이 0%인 플라즈마로부터 헤마토크릿 70%까지 점차로 증가시켜가며 글루코우즈의 농도의 변화에 따른 680 nm에서의 최종 흡광도를 측정하였다. 얻어진 흡광도를 통해 시간에 따른 K/S 결과치를 얻어 헤마토크릿이 혈당측정에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약

2-(p-Iodophenyl)-3-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride (INT), methanol, sodium phosphate, polyethylene imine (PEI), diaphorase, glucose dehydrogenase (GDH), PIPES (Na salt), NAD (Sigma Type V-C), Triton X-100, bovine serum albumine (BSA), Olin 10G, poly(vinyl alcohol), plasma (혈장), 1-ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC) 등은 Sigma로부터 구입해 정제 없이 사용하였다. TiO₂ (325 mesh size, anatase), ascorbic acid (AA), sodium acetylsalicylate (SA) 등은 Aldrich에서 구입해 정제없이 사용하였다. 폴리우레탄 MOV 분리막과 poly(ethyltere phthalate) (PET) 는 Bayer에서 구입하였고, 특별히 PET는 플라즈마에 의해 표면처리한 후 사용하였다.

2.2. 장치

Enzyme, TiO₂, INT, polymer solution 등을 교반하는 데는 Talboys에서 제작한 T-Line mechanical stirrer를 사용하였다. 얻어진 용액의 점도는 Brookfield점도계로 측정하였다. 글루코우즈의 농도에 따라 INT의 색 변환 정도는 Shimadzu사의 UV-2101PC 자외선/가시광선 흡광 분석기를 사용하여 분석하였다. 온도를 일정하게 유지하는 항온조는 Johnson JS-WBP-170P 모델을 사용하였다.

2.3. 폴리우레탄 진단막의 제조

2.3.1. 활성화 용액의 제조

폴리우레탄 진단막을 활성화시키기 위해서는 5가지 용액들이 필요하다[21]. TiO₂ dip, Indicator dip, Enzyme dip, Polymer dip, 그리고 Crosslinking dip 용액들의 조

성들은 이미 발표된 논문에서 수록된 방법대로 진행하였다[22].

2.3.2. 진단막의 제조 및 측정시험

폴리우레탄 MOV 분리막을 활성화시킨 후 측정용 샘플을 위해 제조시키는 방법은 이미 발표된 논문에서 수록된 방법대로 진행하였다[22]. 플라즈마 또는 혈액 100 mL에 각 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg의 글루코우즈를 넣어 잘 교반시켰다. 그리고 얻어진 측정용 샘플에 각각의 용액 한 방울씩 떨어트려 반응시켜 매순간 생성하는 formazan의 농도 변화를 680 nm에서의 흡광도를 통해 얻어내었다. 실험결과를 통해 글루코우즈와 K/S와의 관계를 얻어내는 방법은 이미 발표된 논문에서 수록된 방법대로 진행하였다[22].

2.4. 헤마토크릿의 영향에 관한 실험

구입한 혈액은 원심분리기를 이용해 혈액 속 혈구와 플라즈마를 분리한다. 그 후 분리해서 얻은 응고된 혈구와 플라즈마를 알맞은 비율로 혼합하여 헤마토크릿 20, 40, 60, 70%인 혈액을 각각 만든다. 각각의 혈액 100 mL에 글루코우즈 100, 200, 400, 600 mg을 넣어 측정용 기준용액을 얻는다. 활성화된 폴리우레탄 진단막에 이미 만들어진 다양한 헤마토크릿과 여러 가지 글루코우즈 농도를 가진 시험용 혈액 등을 반응시켜 680 nm에서의 흡광도를 얻어 각각의 K/S를 구하고 얻어진 글루코우즈 농도와 K/S 값의 직선상에서의 기울기 값인 Dose Response Slope (DRS)를 각각 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 플라즈마 속의 글루코우즈 농도에 따른 K/S의 영향

혈액 속에 있는 혈구용적물인 헤마토크릿의 영향을 알아보기 위해서 글루코우즈가 녹아 있는 플라즈마 용액을 기준용액으로 설정하였다. 글루코우즈의 농도와 680 nm에서의 흡광도와와의 관계를 기준으로 알아보기 위해 플라즈마에 녹아있는 글루코우즈의 양을 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600 mg/dL으로 변화시키면서 얻어진 K/S (680 nm)의 측정치와 글루코우즈 농도에 대한 관계를 얻어 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼 400 mg/dL 이상의 높은 글루코우즈의 농도에서의 K/S의 값이 다소 직선보다 낮게 나타나지만 전반적으로 글루코우즈의 농도와 K/S의 값과의 관계가

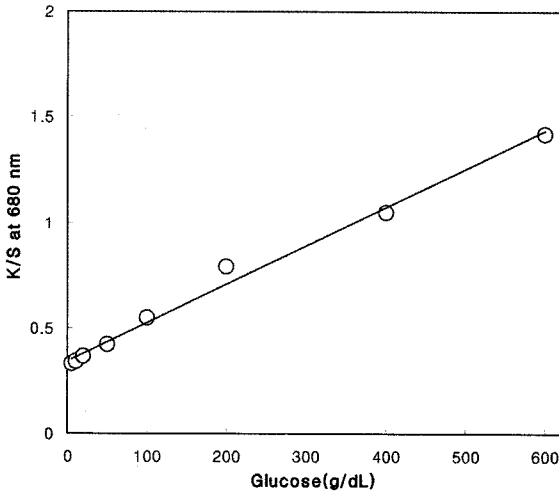


Fig. 2. Relationship between K/S values and plasma glucose concentration.

직선적으로 나타나는 것을 알 수 있었다.

3.2. 헤마토크릿 20%와 40%가 K/S의 측정치에 미치는 영향

정상적인 남성의 헤마토크릿은 40%에서 50%이고 정상적인 여성의 경우 35%에서 45% 정도로 알려져 있다. 본 실험에서 헤마토크릿 20%와 40%를 가진 혈액을 이용해 다양한 글루코우즈의 농도를 이용해 농도와 K/S 측정값과의 관계를 조사하였다. 얻어진 K/S의 최종 결과치와 농도와의 관계를 Fig. 3에서 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 헤마토크릿 20%의 혈액에서의 글루코우즈의 농도와 K/S와의 직선 기울기가 플라스마에서의 직선 기울기와 비교해 볼 때 크게 감소하지 않았다. 헤마토크릿 40%의 혈액의 경우 직선 기울기가 플라스마에서의 기울기에 비해 다소 감소하였지만 혈당 측정에 크게 영향을 줄 정도는 아닌 것으로 나타났다.

3.3. 헤마토크릿 60%와 70%가 K/S 측정치에 미치는 영향

정상적인 사람이 가지는 헤마토크릿보다 높은 헤마토크릿을 갖는 혈액에서의 글루코우즈의 농도와 K/S 측정치와의 관계를 조사하기 위해 헤마토크릿 60%와 70%에 이르는 혈액을 이용하였다. 높은 헤마토크릿을 가진 혈액에 여러 가지 농도의 글루코우즈를 녹여 만든 용액을 680 nm에서 흡광도를 조사하여 혈중 글루코우즈의 농도와 K/S의 측정치를 Fig. 4에 나타내었다. Fig.

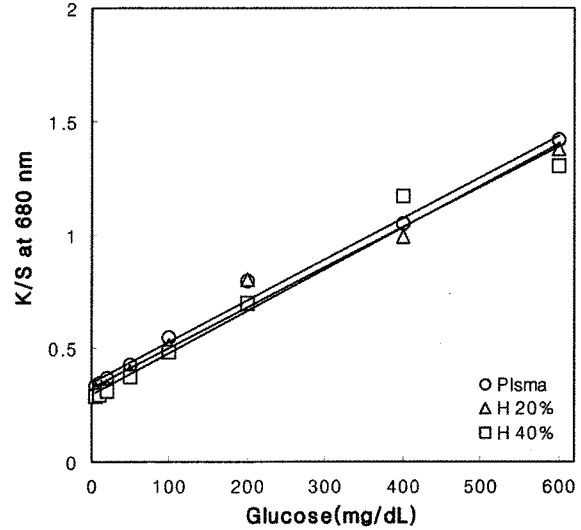


Fig. 3. K/S values with Hematocrit 20 and 40%.

4에서 볼 수 있는 것처럼 60%와 70%와 같은 높은 헤마토크릿에서의 dose-response slope (DRS)는 플라스마에서 얻어진 DRS에 비해 매우 완만한 값이 얻어진 것을 알 수 있었다.

3.4. 높은 글루코우즈의 농도에서의 헤마토크릿의 영향

높은 헤마토크릿을 가진 혈액에서 글루코우즈의 농도와 K/S 측정치와의 관계를 보다 자세히 알아보기 위해 글루코우즈의 농도가 높은 용액을 이용하였다. 먼저 헤마토크릿 0%인 플라스마로부터 헤마토크릿 20, 40, 60, 70%인 각각의 용액 100 mL에 글루코우즈 100, 200, 400, 600 mg을 넣어 기준용액을 만들고 그 용액을 가지고 우레탄 진단막을 통해 얻어진 680 nm에서의 K/S 결과치를 Fig. 5에서 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼 글루코우즈의 농도 100 mg/dL에서는 헤마토크릿이 높아짐에 따라 큰 차이를 보이지 않는다. 글루코우즈의 농도가 다소 높아진 200 mg/dL의 경우 낮은 헤마토크릿에서는 기준 값을 별로 벗어나지 않지만 60%와 70%와 같은 높은 헤마토크릿에서는 K/S의 측정치가 다소 줄어드는 것을 알 수 있었다. 글루코우즈의 농도가 매우 높은 400 mg/dL와 600 mg/dL에서는 헤마토크릿의 영향을 더 많이 받는 것을 발견할 수 있었다. 이것은 일반적으로 적혈구 세포들이 글루코우즈가 확산하는 것을 막을 수 있는데, 특히 높은 헤마토크릿에서는 용액 내의 많은 적혈구가 글루코우즈의 침투를 막아 효소와 반응하는 양을 줄여주기 때문에 높은 헤마토크릿에서는 낮은 흡광도를 나타내는 것으로 볼

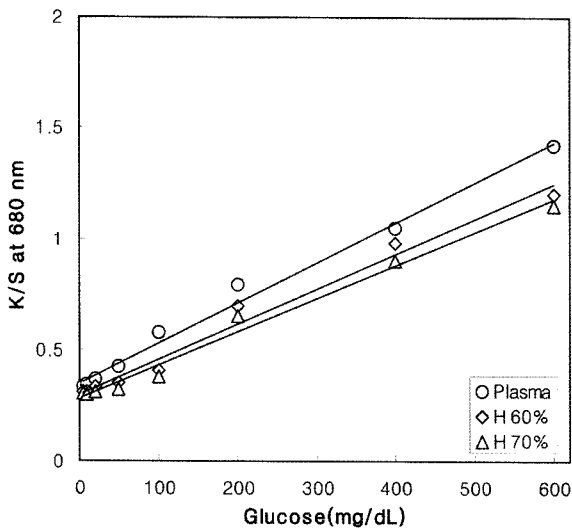


Fig. 4. K/S values with Hematocrit 60 and 70%.

수 있다.

4. 결 론

폴리우레탄 진단막을 이용한 글루코우즈의 농도를 측정하기 위해 기본 실험을 수행하고 또 헤마토크릿이 혈당 측정에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 폴리우레탄 진단막을 이용해 플라즈마에 녹아있는 여러 가지 농도의 글루코우즈와 반응시킨 결과 농도와 680 nm에서 얻어진 K/S 측정 결과치와의 관계가 직선적으로 비례함을 알 수 있었다.
- 2) 20%의 낮은 헤마토크릿을 가진 혈액에서는 플라즈마와 비교해 농도와 K/S 결과치가 크게 감소하지 않았음을 알 수 있었다.
- 3) 헤마토크릿 40%에서는 글루코우즈의 농도와 K/S 결과치로부터 얻은 DRS가 다소 완만해지는 것을 알 수 있었다.
- 4) 60%와 70% 같은 높은 헤마토크릿에서는 적혈구가 글루코우즈의 침투에 크게 영향을 미쳐 DRS가 크게 완만해지는 것을 볼 수 있었다.

감 사

본 연구는 2010년도 홍익대학교 학술 연구 진흥비에 의하여 연구되었기에 감사드립니다.

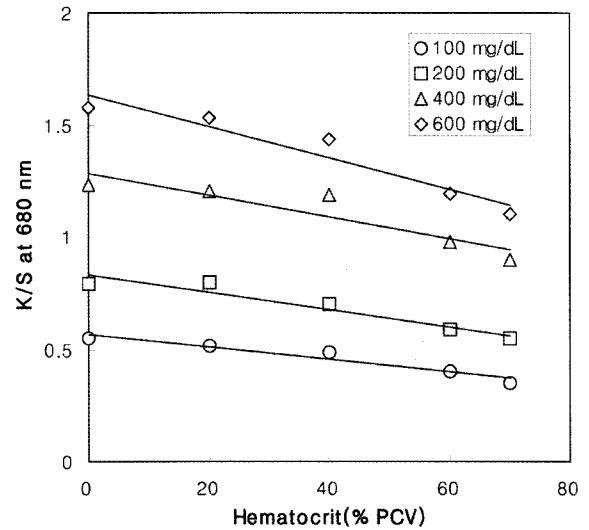


Fig. 5. Relationship between K/S values and hematocrit.

참 고 문 헌

1. T. Asano, "Diabetic Food and Life Style", Shufu-To-Seikatsusha Co., Tokyo (2005).
2. T. Asano and T. Norioka, "Diabetes", Nihon Bungeisha, Tokyo (2000).
3. S. Kim, "Life Guide for Diabetes Control", Hyoseong, Seoul (1993).
4. K. Lee, "Modern Disease Digest", Kuckminilbosa, Seoul (1992).
5. S. Kwon and B. Lee, "Studies on the Multi-Layered Gelatin Diagnostic Membranes for Diabetes (1): Effects of Temperature and Humidity on the Diffusion-Controlled Rates of Glucose", *Membrane Journal*, **9**, 2 (1992).
6. Home Health Management Research Institute, "Diabetes", Kumyoung, Seoul (1992).
7. S. Kwon and J. Yu, "The Preparation of Polyacrylonitrile Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (3) : Effects of Storage Environments on the Measurements of Glucose Concentration", *Membrane Journal*, **19**, 3 (2009).
8. S. Kwon, I. Park, and D. Yoon, "The Preparation of Polyacrylonitrile Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (1): Effects of Temperature and Humidity on the Measurements of

- Glucose Concentration”, *Membrane Journal*, **17**, 4 (2007).
9. J. Kim, “Diabetes: Diagnostics and Control”, Ohsung, Seoul (1997).
 10. 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).
 11. K. Huh, “Diabetic Health”, D and C Media, Seoul (2006).
 12. S. Kwon and M. Choi, “The Preparation of Polyacrylonitrile Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (2) : Effects of Blood constituents on the Measurements of Glucose Concentration”, *Membrane Journal*, **18**, 4 (2008).
 13. 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 Journal*, **9**, 4 (1999).
 14. R. P. Back, “Biosensor Technology”, Marcel Dekker, New York (1990).
 15. S. Kwon, “Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (2): Effects of Temperature on the Measurements of Glucose Concentration”, *Hongik Industrial Technology*, **13**, (2003).
 16. S. Kwon, “Basic Studies on the Preparation of Diagnostic Membranes by Using Multi-Layered Gelatin Films to Measure Blood Glucose Level of Diabetics”, *Membrane Journal*, **8**, 1 (1998).
 17. R. E. Kesting, “Synthetic Polymeric Membranes”, Wiley-Interscience, New York (1985).
 18. M. Gordon, “Polymer Membranes”, Springer-Verlag, New York (1985).
 19. S. Kwon, “A Study on the Preparation of Polyurethane Diagnostic Membrane for Urine Glucose Test”, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, **5**, 6 (1994).
 20. S. Kwon, “Studies on the preparation of Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (1) : Model Experiments by Using Microporous Polyurethane Membrane”, *Hongik Industrial Technology*, **12**, (2002).
 21. 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).
 22. S. Kwon, I. Park, and D. Yoon, “Studies on the Preparation of Polyurethane Diagnostic Membranes for Blood Glucose Measurements (5) : Effects of Temperature and Humidity on the Measurements of Glucose Concentration”, *Membrane Journal*, **17**, 1 (2007).
 23. 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).