

전혈의 SPECTRUM 측정과 분석

김연주, 김홍식, 김종원¹, 윤길원, 김원기
삼성생명과학연구소 임상공학센터
삼성의료원 임상병리과¹

Analysis and Measurement of the Spectrum of Whole Blood

Y.J.Kim, H.S.Kim, J.W.Kim¹, K.W.Yoon, W.K.Kim
Biomedical Engineering Research Center, Samsung Biomedical Research Institute
Department of Clinical Pathology, Samsung Medical Center¹

ABSTRACT

The spectra of whole blood EDTA samples from two people were generated using a CARY 5E (UV-VIS-NIR) spectrophotometer from 400 to 1000nm which contain visible and NIR region. Only the data between 400 and 800nm were used to analyze the components of blood. Using the same spectrophotometer, the spectra of Water, normal saline, plasma were generated. These spectra were subtracted from each blood sample, and then the first derivative of each of the subtracted data was taken to minimize baseline variations and indicated the wavelength-shift of peak and valley. Normalization and division between two blood samples were used to correlate the quantity ratio of specific components with feature of spectra. Samples were controlled at 30°C, 37°C, ambient temperature.

서론

혈액내의 성분을 분석할때, 주로 화학적인 방법의 존재왔는데, 이는 침습적인 방법으로 혈액을 채취한후, 화학적인 처리나 효소를 이용한다. 비침습적인 방법을 이용한 혈액내의 성분 분석이 의학분야에서 특히 새로운 관심으로 대두되고 있다[

1]. 이러한 방법에는 분광학을 이용하는데, 어떤 성분에 특징적인 파장에서 흡수 또는 산란도의 변화를 통계적 처리를 통해 농도를 알아 낼 수 있다. 분광학을 이용하면 화학적 처리를 거치지 않아 처리 속도가 빨라지고, 효소를 이용하는데 비해 비용이 적게 들고 체혈시 따르는 두려움을 줄일 수 있다[2]. 관심을 가지는 파장 영역은 700nm에서 2500nm까지의 근적외선 영역인데, 이 영역은 중적외선에 비해 혈액의 주성분인 물에 의한 영향이 적으며, Penetration Depth가 깊다. 반면 가시광선 영역은 혈색소 등 여러 간섭 물질에 흡수도를 나타내므로 혈액내 미량으로 존재하는 성분의 농도 결정에 적합하지 않다[1-2].

본 연구에서는 두 가지 혈액 표본을 이용하여, 혈액 내의 다른 성분에 비해 비교적 다량 존재하는 Hemoglobin의 Spectrum을 분석하고자 한다. 헤모글로빈의 다른 요소들에 의한 영향을 줄이기 위해 물, 식염수, 혈장의 Spectra를 혈액 Spectra에서 제거 하였다. 이를 SUBTRACTION 방법이라고 한다. 본 연구에서는 Hemoglobin에 흡수도를 보이는 가시광선과 근적외선 일부를 포함하는 400nm에서 1000nm를 이용한다. 그리고 물을 주성분으로 하는 혈액의 온도에 따른 영향을 살펴보기 위해 상온, 30, 37°C에서 실험을 수행하였다 [1,3,4,8].

본론

모든 Spectra는 CARY 5E(Varian, Australia)

전혈의 Spectrum 측정과 분석

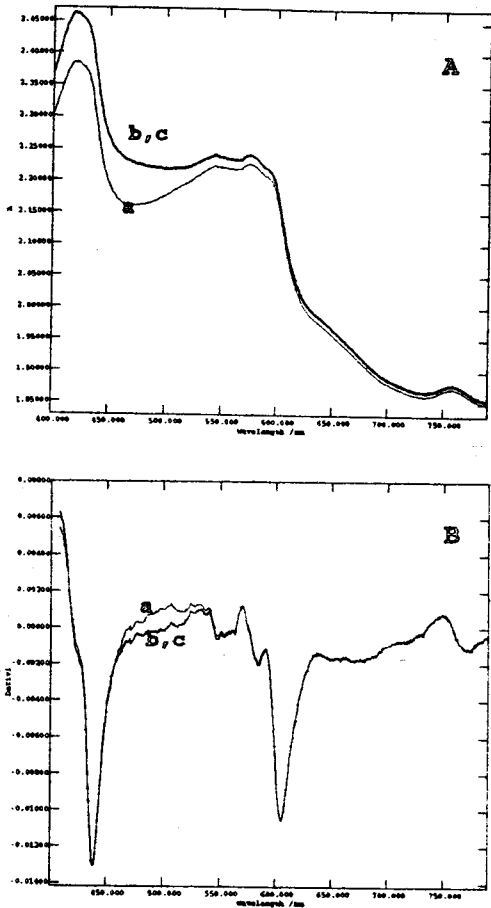


Fig.1 Background에 따른 subtracted blood data의 변화 A.혈액 표본 1에서 a.혈장,b.식염수,c.물을 뺀 data,B.일차 미분 값의 smoothing한 data

분광계를 통해 얻어진다. 광원은 visible(QI)lamp로, detector는 UV-VIS용으로는 R928 PMtube를 쓴다. NIR detector는 PbS photo cell을 사용한다. 이 분광계는 800nm에서 detector를 변화시키기 때문에 이 파장에서 spectrum의 불연속성이 나타난다. 가시광선과 근적외선에서 독립적인 mode를 이용하여 spectral bandwidth와 energy를 조절한다. data interval은 1, 2nm averaging time은 0.1, 1s 이다. 각각 3, 30번의 averaging 횟수에 해당한다. 대부분의 경우에 각 표본에 대하여 3 번씩 data를 모았다. 그렇지 않은 경우도 존재한다. 모든 경우에 기계에서 표본을 제거하지 않은 채 연속적으로 spectra를 모았다[5]. subtraction에 이용되는 spectra는 물, 식염수, 혈장으로부터 얻어진다. 두 개의 전혈은 EDTA를 항응고제로 포함하며, 각각의 혈액에 대해 채혈후 20분 내에 원심분리하여 혈장을 얻어내었다. 표본

의 온도는 water bath(30°C), incubator(37°C), 상온에서 30 분에서 한 시간 방치하여 조절하였다. spectrum을 재는 동안 기계내에서의 온도 조절은 이루어지지 않았다. Spectrosil Far UV quartz(Starna)로 만들어진 0.5mm pathlength의 slide방식의 cell을 이용하였다. cell은 pathlength를 형성하는 홈이 패인 window와 평평한 window로 구성된다. 이 cell은 분리가 되며, 짧은 pathlength와 큰 창을 갖고 있어 혈액과 같은 점액성 물질을 다루는데 좋다. 전혈의 경우는 각 온도에서 두번씩 채취하여 반복적인 data를 얻었다. 모아진 spectra들은 동일 표본에 대해서는 평균 spectra를 구하였다. 각 온도 별로 blood spectra에서 물, 식염수, 혈장을 뺀 subtracted data를 얻는다. subtraction에 이용되는 혈장 spectra는 각 blood에서 얻은 것을 이용한다.

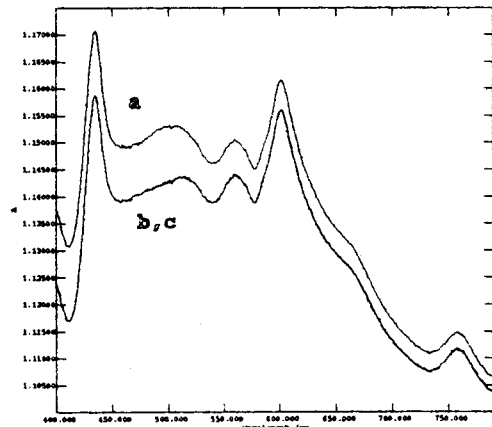


Fig.2 Division of subtracted blood data 혈액 표본1을 표본2로 나눈 값:a.혈장,b.식염수,c.물,30°C

subtracted data는 두 가지 측면에서 분석되어진다. 분석은 400nm에서 800nm까지의 영역에서 이루어 졌다. 첫째, 온도와 subtraction에 이용되는 back ground에 따른 혈액의 골과 마루의 shift 정도를 보았다. baseline variation을 최소화 하고 peak와 valley 분석을 위해 일차 미분 값을 구했다[1,5]. 일차 미분값은 noise를 줄이기위해 smoothing을 수행하였다(Savitsky Goley algorithm). 둘째, 실험에 이용된 두 혈액 사이의 차이를 알아보기 위해 division과 normalization을 이용하였다. division은 한 표본을 나머지 표본의 spectra로 나누어 보았다. normalization은 두

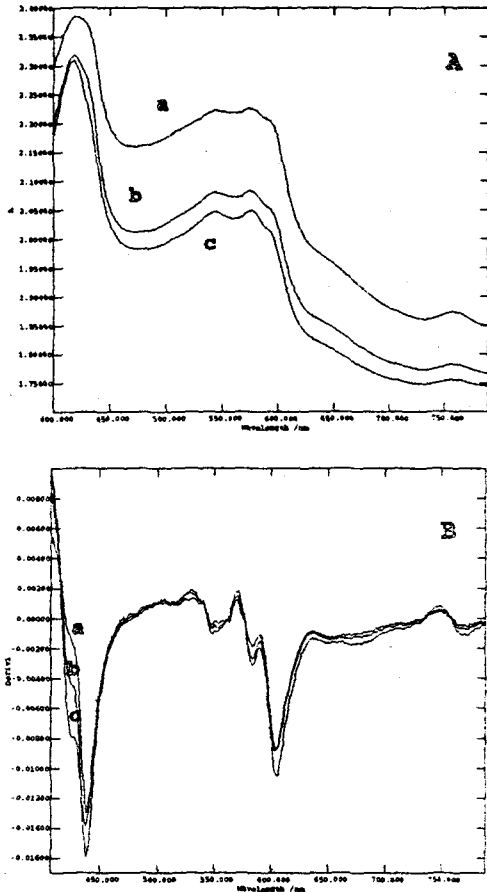


Fig.3 온도에 따른 subtracted blood data의 변화 A.subtracted data,B.A의 일차 미분값(a.30℃,b.37℃,c.ambient temperature)

혈액의 high peak absorbance를 동일하게 만들어 spectrum을 관찰한다.

결론

Subtracted data의 일차 미분 값을 비교해 보았을 때 물이나 식염수 spectra를 제거한 혈액의 경우는 거의 동일한 peak와 valley의 분포를 나타낸다. 혈장을 뺀 data와는 차이를 보이는데, 그림에서 보이는 것처럼 첫 번째 골에 해당하는 부분이 서로 다른 값을 나타낸다. 혈장을 뺀 data에 비해 red-shift를 한다. Division에 의한 혈액 사이의 차를 비교하는 방법은 양을 아는 두 성분의 division factor를 계산하여 그 값을 기준으로 spectrum을 분석한다. 이때 혈액은 여러 성분이

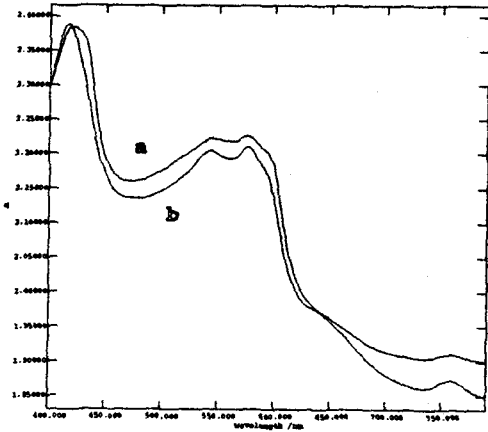


Fig.4 Normalization of subtracted blood data A.blood 1,B.normalized blood 2;표본 2를 표본 1의 high peak을 기준으로 표준화

복합적으로 섞여 있으므로 한 성분에 대한 linear한 변화를 나타내지 않을 지도 모른다. 그러므로 다양하고 많은 혈액 표본 측정에 의한 분석이 필요하다. 통계적인 비례 값을 알아내는 것이 중요하다. normalization에 의해 두 혈액간에 차이가 나는 부분을 알아 낼 수도 있다.

앞으로 혈액의 spectrum을 측정하는데 필요한 여러 조건을 set-up해야 하며[1], 화학 분석에 의한 값과 spectral data사이의 양적인 상관 관계를 알아내야 한다[5-7].

참고문헌

[1]K.H.Norris,"Possible Medical Applications of NIR",in Making Light Work(Ed. by I.A. Cowe)VCH,Weinheim,pp.596-602(1992)
 [2] G.Domjan et al."Rapid analysis of whole blood and blood serum using near infrared spectroscopy",J.Near Infrared Spectrosc.,Vol. 2,67-78(1995)
 [3] Rosenthal RD., "Method for providing custom calibration for near infrared instruments for measurement of blood glucose",US Patent No.5,068,536(1991)
 [4] H.M.Heise et al., "Noninvasive Blood Glucose Sensors Based on Near-Infrared Spectroscopy",Artificial Organs,Vol.18,No.6,4

39-446(1994)

[5] Fredric M. Ham et al., "Multivariate Determination of Glucose Using NIR Spectra of Human Blood Serum", IEEE, 818-819(1994)

[6] David M. Haaland et al., "Reagentless Near-Infrared Determination of Glucose in Whole Blood Using Multivariate Calibration", Applied spectroscopy, Vol.46, No.10, 1575-1578 (1992)

[7] Hoeil Chung et al., "Simultaneous Measurement of Glucose and Glutamine in aqueous Solutions by Near Infrared Spectroscopy", Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.50, 109-125(1995)

[8] E. Peuchant et al., "Determination of Serum Cholesterol by Near-Infrared Reflectance Spectrometry", Anal. Chem., Vol.59, 1816-1819(1987)