

세 가지 방식의 근적외선 분광분석기를 이용한 글루코오스 수용액의 측정

백주현 · 강나루 · 우영아 · 김효진[#]

동덕여자대학교 약학대학

(Received November 17, 2003; Revised December 23, 2003)

Aqueous Glucose Solution Measurement by Three Types NIR Spectrometer

Ju-Hyun Baek, Naroo Kang, Young-Ah Woo and Hyo-Jin Kim[#]

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — A method is described for measuring clinically relevant levels of glucose in a pH 7.4 phosphate buffer by near-infrared (NIR) absorption spectroscopy. Three types of NIR spectrometer, dispersive type, photo-diode array (PDA) type, and fourier transform (FT) type spectrometer were used and the performance was compared. Spectra were collected with a cuvette cell or quartz liquid fiber of 1 mm or 2 mm optical pathlength as transmittance method. Glucose absorption band appeared at second overtone, first overtone, and combination region for all systems. By use of the multivariate technique of partial least squares (PLS) regression, glucose concentrations can be determined with a 16, 44, and 9.1 mg/d l standard error of prediction for dispersive type, photo-diode array type, and fourier transform type system, respectively. Sensitivity of spectrometer was evaluated by absorbance for the difference of 10 mg/d l glucose. Three absorption bands, second overtone, first overtone, and combination region were suited to three types systems, dispersive type, photo-diode array type, and fourier transform type systems, respectively. This investigation showed that three types NIR spectrometer were proper method for identification and quantitative analysis of glucose and possible for noninvasive blood glucose monitoring.

Keywords □ glucose solution, NIR spectrometer, PLSR

생체내에서 주요한 에너지원인 글루코오스의 분자식은 $C_6H_{12}O_6$ 이다. 이 구조와 관련하여 가시/근적외선 영역에서의 빛과의 상호작용을 보면, 400~1000 nm 영역에 걸쳐서는 C-H와 O-H 결합의 굽힘과 신축 방식의 진동이 일어 난다. 2000~2500 nm 영역에서는 신축과 굽힘 방식의 비선형적 조합이 일어나고, 1500~1800 nm에서는 C-H 결합의 신축 방식의 1차 배음이 나타난다. 800~1200 nm 영역에서는 2차 배음과 고차의 조합이 일어나고, 이들은 기술한 순차로 상호작용의 강도가 증가된다.⁷⁾ 이러한 글루코오스의 분자 진동에 따라 흡수된 피크의 확인 및 정량에 대한 연구는 아래와 같다.

Arnold 등²⁾의 연구에서는 Dull 등이 밝혀낸 1538~1786 nm의 약한 세 개의 피크를 FT-NIR spectrometer를 이용한 고농도의 글루코오스 수용액 실험을 통해 밝혀내고, 2083~2381 nm에서 조금 더 강한 글루코오스의 피크를 확인하였으며, 2273 nm에서

물의 영향을 가장 적게 받는 글루코오스의 피크를 확인 하였다. Markquard 등³⁾은 혈장내에서 FT-NIR spectrometer를 이용하여 4300, 4400, 4700 cm^{-1} (2326, 2273, 2128 nm)의 글루코오스 피크를 확인하였다. Pan 등⁴⁾은 단백질과 트리글리세라이드로 이루어진 모형 매질에서 FT-IR spectrometer를 이용하여 4750, 4400, 4300 cm^{-1} (2105, 2273, 2326 nm)의 피크를 확인하였다. Muller 등⁵⁾은 PDA type의 NIR spectrometer를 이용하여 800~1350 nm에서 비침투적인 혈당 측정을 통해 1.02~1.88 mmol/l (18~34 mg/dl)의 RMSPE와 0.997의 상관성을 갖는 결과를 얻었다.

분산 근적외선 분광분석기는 광원에서 조사된 빛이 시료를 통과한 후 단색화 장치(monochromator)를 지나면서 좁은 띠의 단일 파장만이 선택되어 지고, 연속 적외선 주파수 스펙트럼으로 변한다. 흡탈형의 경우, 기기는 시료를 통과한 복사세기를 바탕 시료를 통과한 복사세기로 나눈 값으로 흡광도를 정한다. 곁살형은 회전 살 토막 틀(beam chopper)을 통해 빛을 번갈아가며 시료와 기준 셀을 지나가도록 한다. 매 초당 여러 번 시료와 기준 시료의 에너지를 비교함으로써 시간 및 파장에 따라 광원의 세기와 검출기 감응의 편차를 보정한다. 이렇게 단색화 장치를

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

통해 좁은 띠의 단일 파장으로 측정되어진 데이터를 종합하여 전체 파장의 스펙트럼으로 나타내는 분산 근적외선 분광분석기는 일반적인 분광기의 형태이다.¹⁰⁾

배열 광다이오드 방식의 근적외선 분광분석기는 검출기로 배열 광다이오드를 채택하여 분산 근적외선 분광기처럼 좁은 띠의 단일파장을 선택하여 조사되는 것이 아니라, 백색광이 시료를 통과하게 된다. 시료를 통과한 빛은 다색화 장치(polychromator)로 들어가며, 이곳에서 빛을 구성하는 각각의 성분 파장으로 분산된 빛이 배열 광다이오드 쪽으로 향한다. 즉, 서로 다른 파장의 빛이 각각의 다이오드를 두드리며, 분리능은 다이오드간의 간격과 다색화 장치의 분산력에 의해 결정된다. 따라서 전체 스펙트럼을 일시에 얻을 수 있고, 마이크로칩 등의 기술로 소형화가 가능하기 때문에 운반이 가능한 장점이 있다.

일시에 전체 스펙트럼을 얻을 수 있는 또 다른 근적외선 분광분석기인 푸리에 변환 근적외선 분광분석기는 간섭계(interferometer)를 이용하여, 광원으로부터 조사되어진 복사선을 살분할기(beamsplitter)를 쪼이면, 일부는 투과하여 검출기로 향하고, 일부는 고정 거울과 이동 거울에 의해 반사가 일어난다. 반사되어진 빛은 앞의 과정을 반복하면서, 고정 거울과 이동 거울 사이의 위상차를 이용해 보강 또는 상쇄 간섭이 일어나고, 그것으로부터 얻어진 간섭도를 푸리에 변환하여 스펙트럼으로 나타내게 된다. 주어진 분리능에서 신호대 잡음비를 개선시킬 뿐만 아니라, 보다 좋은 주파수 정확도, 속도 및 내장된 자료의 처리능력을 갖는 장점을 지녔다.^{8,9)}

본 연구에서는 인체내에 존재 가능한 글루코오스의 농도 범위 내에서 조제된 시료를 세 가지 형태의 근적외선 분광분석기를 이용하여 측정하고, 다변량 분석법을 통해 정량 하였다. 고농도의 글루코오스 용액을 조제하여 세가지 형태의 기기로 측정하여 각각에서 측정되어 지는 글루코오스의 피크를 확인, 비교 하고, 특이적으로 나타나는 피크의 흡광도를 시료의 10 mg/dl 당 흡광도로 나타내어 글루코오스에 대한 기기의 성능을 평가하고자 하였다. 글루코오스는 pH 7.4의 인산완충용액에 용해 시켜 인체 내의 체액과 동일한 산성도를 갖도록 하였고, 투과의 표준값은 물에 대한 영향을 제거 하기위해 pH 7.4의 인산완충용액을 이용하여 측정하였으며, 다시 공기를 표준값으로 하여 측정, 비교하고자 하였다.

실 험

시료

pH 7.4 인산완충용액을 만들기 위한 수산화 나트륨(NaOH, Sodium oxide powder), 인산이수소칼륨(KH₂PO₄, Potassium phosphate monobasic), 보존제인 아지드화 나트륨(NaN₃, sodium azide), 글루코오스(C₆H₁₂O₆, D(+)-Glucose, anhydrous) 파우더

는 SIGMA-ALDRICH KOREA LTD에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 글루코오스 파우더는 실험 하루 전에 105°C, 4시간 동안 오븐에서 건조 시킨 후, 실리카겔을 건조제로 사용하여 실온의 테스케이터에 넣어 방냉시켜 준비하였다. 인산완충용액은 증류수를 초순수 제조장치(UHQ PS MODEL, ELGA, USA)를 이용하여 얻어진 초순수를 사용하여 조제하였고, pH meter(model DP-215M, (주)동우메디칼시스템, Korea)를 이용하여 산도를 측정하였다. pH 7.4로 조제된 인산 완충용액에 0.1% 아지드화 나트륨을 넣고, 글루코오스의 calibration 모델링을 위해 혈액내의 글루코오스 농도가 0~660 mg/dl가 되도록 하는 17개의 시료를 조제하였다. 피크 확인을 위해 글루코오스의 혈액내의 농도가 20000, 40000 mg/dl되는 시료도 조제하였다. 균질한 용액을 얻기 위해 40°C 이하의 약한 열을 가하여 완전히 명료한 액이 되도록 하였다.

기기

분산 근적외선 분광분석기, Dispersive(scanning) type NIR spectrometer - 세 가지 방식의 근적외선 분광분석기의 성능을 비교, 평가하기 위해 사용된 분산 근적외선 분광분석기는 NIRSystem model 6500 spectrometer(FossNIRSystems Inc., Silver Spring, MD)를 사용하였다. 50 W의 텅스텐 할로젠 램프와 회절격자를 지닌 단색화장치로 되어있다. 측정 파장은 400~2500 nm 로 가시광선과 근적외선 영역을 포함하여 측정하였다. Silicon/PbS를 검출기로 이용하였고, 정보는 2 nm 간격으로 측정, 수집하였다. 시료는 1 mm optical pathlength를 지닌 큐벳 셀에 담아 투과 방식으로 측정하였다. 각 시료의 스펙트럼은 30회 반복 측정한 것을 평균하여 한 개의 스펙트럼으로 나타내도록 설정하였다. 모든 스펙트럼은 공기, 또는, pH 7.4의 인산완충용액의 투과 표준값과 관련하여 log(1/T)로써 기록되었다. 스펙트럼은 같은 농도의 시료를 2회씩 측정하여 38개의 스펙트럼을 얻었고, 이는 NSAS(Foss NIRSystems Inc., Silver Spring, MD)를 이용하여 기록하였다. 수집된 스펙트럼은 Unscrambler v7.5(CAMO ASA, Norway)의 PLS1법과 WinISI II(FossNIRSystems/TECATOR, Infrasoft international, LLC.)의 PLSR 법에 의하여 분석되었다.

배열 광다이오드 근적외선 분광분석기, Photodiode array (PDA) type NIR spectrometer - 자체 개발한 휴대용 분광분석기인 HN2200(SpectronTech co., Ltd. Korea)이 세 가지 방식의 근적외선 분광분석기의 성능을 비교, 평가 하기위해 사용된 배열 광다이오드 방식의 근적외선 분광분석기로 사용되었다. 광원으로는 20 W의 텅스텐 할로젠 램프를 사용하고, InGaAs photodiode-array를 검출기로 채택하고 있다. 1100~2200 nm의 영역에서 측정되고, 2 nm 간격으로 정보를 수집할 수 있도록 설정되어있다. 휴대가 가능하도록 7.6 kg의 중량에 2.5시간을 충전하면, 6시간 사용이 가능한 DC 12 V 배터리가 내장되어 있다.

시료는 2 mm optical pathlength의 큐벳 셀에 담아 FHSA-TTL Filter/Cuvette-Holder(Avantes Co., Ltd, The Netherlands) 로 고정하여 측정하였다. 투과 방식으로 측정하기 위해 광섬유로 이루어진 팻취 파이버(microParts, Germany) 를 이용하였다. 모든 스펙트럼은 공기, 또는, pH 7.4의 인산완충용액의 투과 표준값과 관련하여 $\log(1/T)$ 로써 기록되었다. 측정은 같은 농도의 시료를 2회 측정하여 총 38개의 스펙트럼을 수집하였다. 각각의 투과 스펙트럼은 7회 반복 측정하여 그것을 평균하여 하나의 스펙트럼으로 나타내도록 하였다. 스펙트럼은 ChemoHN2200 소프트웨어(SpectronTech Co., Ltd, Korea)로 기록하였으며, 이 소프트웨어 내의 PLSR 법과 Unscrambler v7.5(CAMO ASA, Norway)의 PLS1법으로 분석하였다.

푸리에 변환 근적외선 분광분석기, Fourier Transform(FT) NIR spectrometer - 세 가지 방식의 spectrometer 중 푸리에 변환 근적외선 분광분석기는 VECTOR 22/N(Bruker optics Inc., Germany)을 사용하여 측정하였다. 광원으로 텅스텐 할로겐 램프를 사용하고, Pbs/InGaAs 를 검출기로 사용하였다. 12000~4000 cm^{-1} 의 영역에서 측정되고, 4 cm^{-1} 간격으로 정보를 수집할 수 있도록 설정되어 있다. 시료는 바이알에 담아 프루브 팁 부분이 석영으로 되어 있는 Quartz liquid probe(IN 236E1, Bruker optics Inc., Germany)를 직접 시료에 담겨 투과 방식으로 측정하였다. 프루브는 팁의 옆 부분에 홈이 파여 있고, 발광부와 광섬유로 연결되어 있는 홈의 아래에서 빛이 조사되면, 홈에 들어온 시료를 통과하여 수광부와 연결되어 있는 홈의 윗부분으로 신호를 보내게 된다. 홈의 거리가 optical pathlength가 되고, 이 실험에서는 optical pathlength가 1 mm인 프루브를 사용하여 측정하였다. 모든 스펙트럼은 공기, 또는, pH 7.4의 인산완충용액의 투과 표준값과 관련하여 $\log(1/T)$ 로써 기록되었다. 같은 농도의 시료를 2회 측정하여 총 38개의 스펙트럼을 얻었으며, 이는 16회 반복 측정하여 평균한 것을 하나의 스펙트럼으로 나타내도록 설정하여 측정하였다. 스펙트럼의 수집은 OPUS ver. 4.0 (brukerOptik GmbH, Germany)으로 행해졌고, OPUS ver. 4.0 (brukerOptik GmbH, Germany)의 PLSR 법 및 Unscrambler v7.5(CAMO ASA, Norway)의 PLS1법을 분석에 이용하였다.

결과 및 고찰

글루코오스 피크 확인

C-H 결합에 의한 2차 배음대에서의 글루코오스 피크의 확인 - 공기를 투과의 표준값으로 한 경우의 흡수 스펙트럼은 C-H에 의해서 2차 배음대에서 흡수가 일어나고, 이는 2차 미분한 스펙트럼의 1200 nm 부근에서 작은 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었다. 확인된 피크는 피크의 확인을 위해 20000, 40000 mg/dl 농도의 시료 뿐만 아니라, 검량 모델을 세우기 위한 0~660 mg/

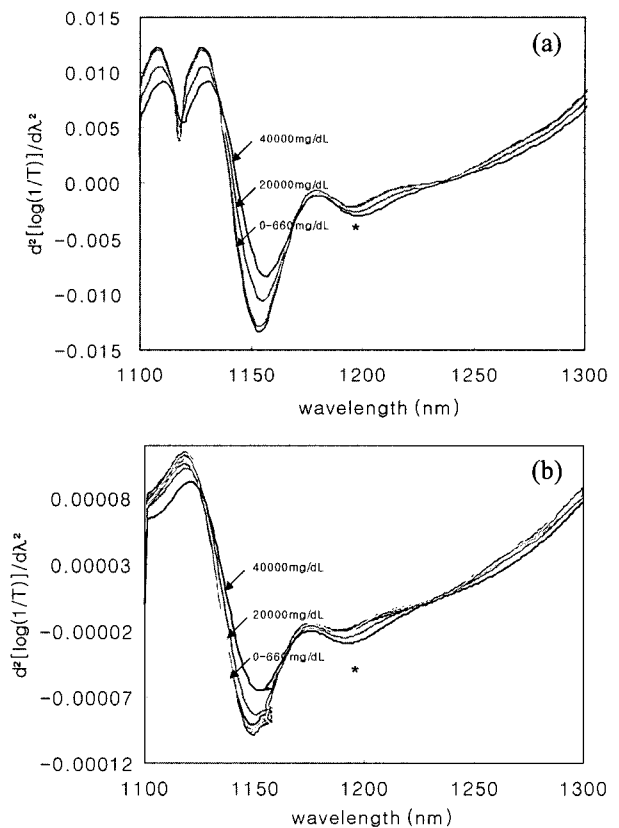


Fig. 1 - Spectra of glucose in phosphate buffer between 1100 nm and 1300 nm by (a) Dispersive type, (b) PDA type spectrometer. Air is used to standard material for transmittance (* glucose absorption band).

dl 농도의 시료에서도 확인되었다. 이후 영역의 피크에서처럼 두 그룹의 시료들간에 확연한 흡광도 차이는 나지 않았고, 농도가 높을수록 피크가 오른쪽으로 이동되는 것을 확인 할 수 있었다. 분산 방식, 배열 광다이오드 방식, 푸리에 변환 방식의 2차 미분하여 나타난 스펙트럼 모두에서 피크가 확인 되었으나, 피크가 너무 작은 푸리에 변환 방식을 제외하고, Fig. 1(a), (b)에 나타내었다.

물에 대한 영향을 배제하기 위해 용매로 사용된 pH 7.4의 인산완충용액을 투과의 표준값으로 하여 2차 미분한 스펙트럼은 Fig. 2(a), (b)에 나타내었다. Fig. 2(a)는 분산방식의 근적외선 분광분석기의 2차 미분 스펙트럼으로 공기를 투과의 표준물질로 하여 측정한 스펙트럼보다 1200 nm에서 10 nm 정도 이동된 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었다. 배열 광다이오드 방식의 근적외선 분광분석기의 스펙트럼은 Fig. 2(b)에 나타내었고, 공기를 투과의 표준물질로 하여 측정한 스펙트럼과 같이 1200 nm 부근에서 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었다. pH 7.4의 인산완충용액을 투과의 표준값으로 하여 물에 대한 흡광도를 배제시킨 효과로 공기를 투과의 표준물질로 하여 측정한 실험 결과보다 전반적으로 낮은 흡광도를 나타내었으며, 따라서 20000,

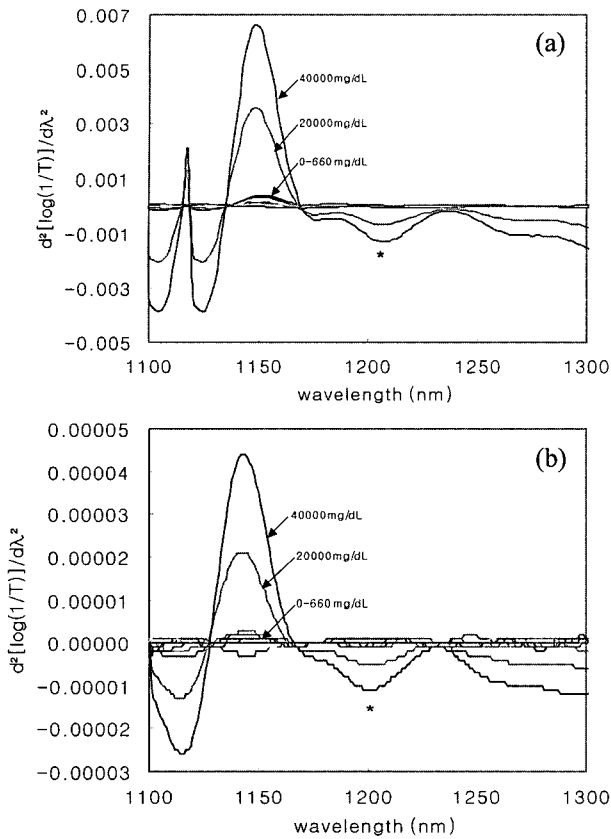


Fig. 2 – Spectra of glucose in phosphate buffer between 1100 nm and 1300 nm by (a) Dispersive type, (b) PDA type-NIR spectrometer. A pH 7.4 phosphate buffer was used as standard material for transmittance (* glucose absorption band).

40000 mg/dL의 고농도의 시료에서만 글루코오스의 피크를 확인할 수 있었다. 푸리에 변환 방식의 분광분석기의 2차 미분한 스펙트럼도 1200 nm 부근에서 고농도의 시료에 한해 작은 글루코오스의 피크가 확인되었다.

C-H 결합에 의한 1차 배음대에서의 글루코오스 피크 확인 – 공기를 투과한 표준값으로 하여 C-H 결합에 의한 1차 배음대에서의 흡수 스펙트럼을 2차로 하여 나타낸 스펙트럼은 분산 방식, 배열 광다이오드 방식, 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기 순으로 Fig. 3(a), (b), (c)에 나타내었다. 각각의 기기에서는 1690 nm 부근에서 글루코오스에 의한 피크가 확인 되었으며, 정확하게 분산방식은 1690 nm, 광다이오드 방식은 1686 nm, 푸리에 변환 방식은 1690 nm에서 확인되었다. 이는 근적외선의 특성 상 앞의 2차 배음대의 피크보다 큰 흡광도를 갖는다. Fig. 3(a)의 분산방식의 근적외선 분광분석기는 검량 모델을 위한 0~660 mg/dL 농도의 시료에서도 20000, 40000 mg/dL의 고농도 시료에서 확인된 1689 nm 지점에서 피크를 확인할 수 있었고, 두 그룹의 피크의 흡광도는 현저한 차이를 보였다. 배열 광다이오드 방식의 근적외선 분광분석기는 Fig. 3(b)에 나타낸 것처럼 0~660 mg/

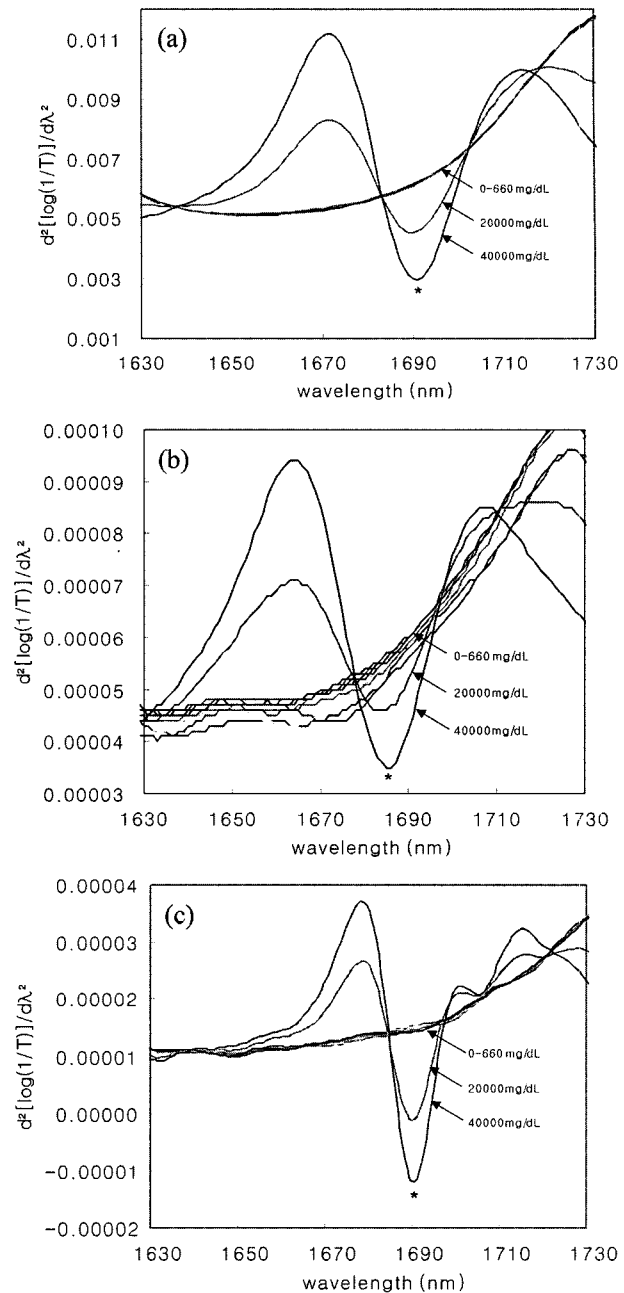


Fig. 3 – Spectra of glucose in phosphate buffer between 1630 nm and 1730 nm by (a) Dispersive type, (b) PDA type, (c) FT type-NIR spectrometer. Air was used as standard material for transmittance (* glucose absorption band).

dL 농도의 시료에서도 약간의 피크가 확인 되나 고농도의 피크에서보다 왼쪽으로 이동되어 나타났으며, 두 그룹 모두 저농도에서 고농도로 갈수록 오른쪽으로 이동되면서 더 샤프한 피크를 나타내었다. 이 방식도 저농도 그룹과 고농도 그룹 사이에 현저한 흡광도의 차이를 보이지만, 분산 방식보다는 작은 차이를 보였다. 푸리에 변환 방식은 고농도의 시료에서만 1690 nm에서 뚜렷한 글루코오스 피크를 보이고, 0~600 mg/dL 농도 시료에서의 피

크는 거의 나타나지 않음을 Fig. 3(c)의 2차 미분하여 얻은 스펙트럼에서 알 수 있다.

투과도의 표준물질로 pH 7.4 인산 완충용액을 사용한 실험에서는 분산 방식의 근적외선 분광분석기는 얻어진 스펙트럼을 2차 미분하여 나타낸 Fig. 4(a)에서 처럼, 1692 nm에서 공기를 투과도의 표준물질로 하여 측정할 실험에서보다 더 샤프한 글루코오스

의 피크를 확인 할 수 있었다. 이는 20000, 40000 mg/dl 농도의 시료에서 확인 되었고, 0~600 mg/dl 농도의 시료에서는 불규칙적으로 나타나는 것으로 피크보다는 잡음에 가까웠다. Fig. 4(b)는 배열 광다이오드 근적외선 분광분석기에서 얻은 스펙트럼을 2차 미분하여 얻은 스펙트럼으로 고농도의 시료의 측정으로부터 1688 nm에서 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었다. 저농도의 시료 또한 분산방식의 근적외선 분광분석기와 같이 글루코오스의 피크라 하기에는 너무 미약하고, 불규칙한 형태로 나타났다. 푸리에 변환 근적외선 분광분석기에서 고농도의 시료는 Fig. 4(c)에 나타낸 것처럼, 2차 미분한 스펙트럼의 1690 nm에서 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었고, 저농도의 시료는 너무 작은 흡광도로 거의 직선의 형태로 나타나 확인이 불가능했다.

C-H 결합과 C-H 결합의 조합대에서 글루코오스 피크의 확인 - 조합대인 2000~2500 nm 영역에서의 글루코오스의 확인은 기기의 측정 가능 파장의 범위가 배열 광다이오드 방식의 근적외선 분광분석기는 1100~2200 nm이기 때문에 이 범위에서는 확인이 불가능하여, Fig. 5, 6에 분산방식의 근적외선 분광분석기 및 푸리에 변환 근적외선 분광분석기의 공기 또는 pH 7.4의 인산완충용액을 투과도의 표준물질로 하여 측정할 스펙트럼을 2차 미분하

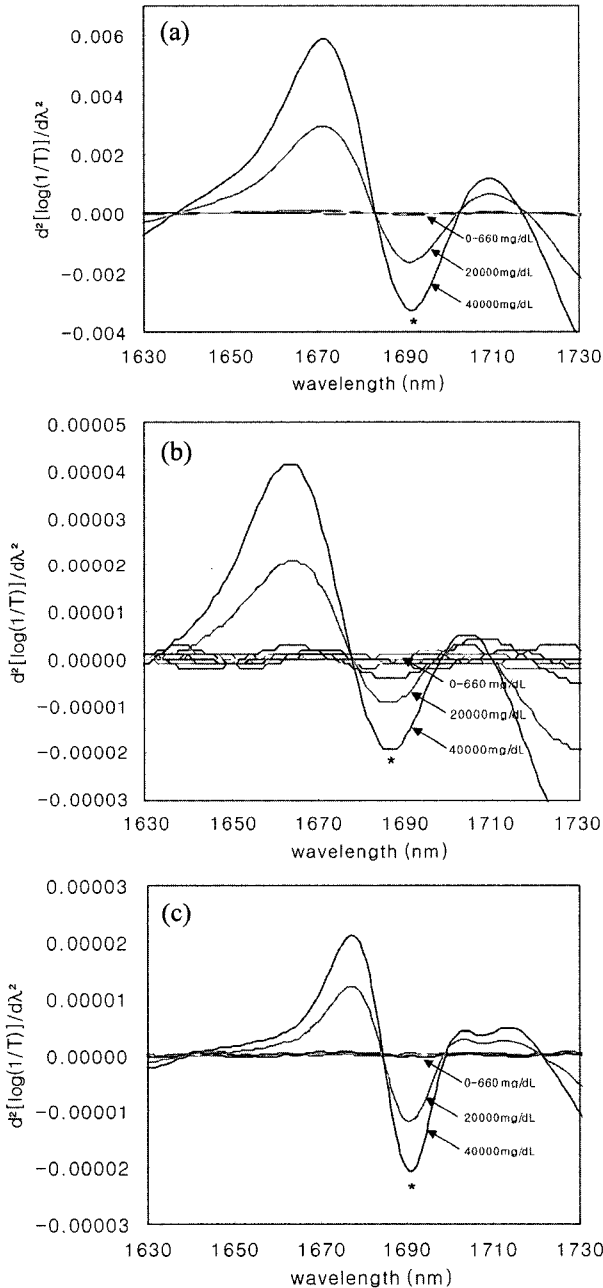


Fig. 4 - Spectra of glucose in phosphate buffer between 1630 nm and 1730 nm by (a) Dispersive type, (b) PDA type, (c) FT type-NIR spectrometer. A pH 7.4 phosphate buffer was used as standard material for transmittance (* glucose absorption band).

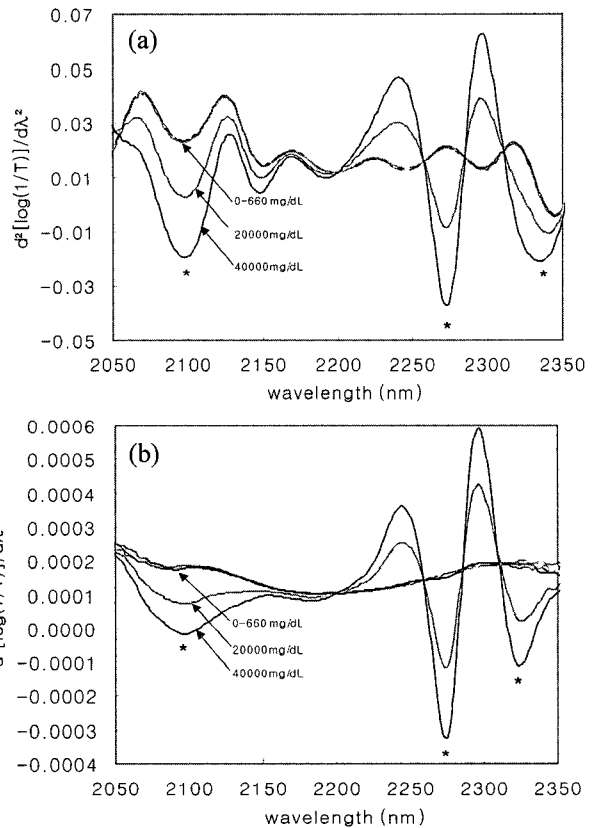


Fig. 5 - Spectra of glucose in phosphate buffer between 2050 nm and 2350 nm by (a) Dispersive type, (b) FT type-NIR spectrometer. Air was used as standard material for transmittance (* glucose absorption band).

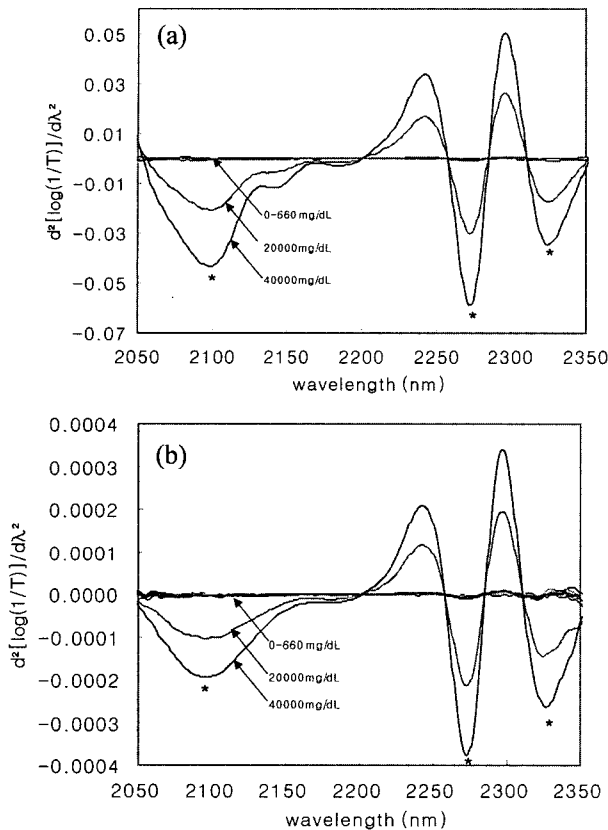


Fig. 6 – Spectra of glucose in phosphate buffer between 2050 nm and 2350 nm by (a) Dispersive type, (b) FT type-NIR spectrometer. A pH 7.4 phosphate buffer was used as standard material for transmittance (* glucose absorption band).

여 나타내었다.

투과의 표준값을 공기로 하여 측정된 분산방식의 근적외선 분광분석기는 고농도의 시료를 측정한 스펙트럼을 전처리를 하지 않은 상태에서는 2274 nm에서 하나의 피크만 확인 되었으나, 2차 미분하여 나타낸 Fig. 5(a)를 보면, 2098 nm, 2274 nm, 2328 nm의 세개의 피크가 확인 되었다. 그 중 2274 nm의 피크는 가장 크고 뚜렷하게 보이는 피크이다. 푸리에 변환방식의 근적외

선 분광분석기의 경우, 전처리를 하지 않은 20000, 40000 mg/dl의 고농도 스펙트럼에서는 2276 nm의 피크만 확인 되었으나, 2차 미분한 고농도의 스펙트럼인 Fig. 5(b)에서는 2100 nm, 2276 nm, 2323 nm의 세가지 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었다. 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기의 경우, 분산방식의 것보다 저농도 그룹과 고농도 그룹의 흡광도가 확연히 차이가 났으며, 역시 2276 nm에서 가장 크고 또렷한 글루코오스의 피크를 확인 할 수 있었다.

pH 7.4 인산완충용액을 투과의 표준물질로 하여 측정한 실험에서는 분산 방식의 근적외선 분광분석기의 경우, 고농도의 스펙트럼에서 전처리를 하지 않은 스펙트럼은 2120 nm, 2276 nm, 2326 nm에서 세 개의 피크가 확인되었다. Fig. 6(a)는 2차 미분을 한 스펙트럼으로 고농도의 스펙트럼에서 2102 nm, 2274 nm, 2322 nm의 세개의 피크를 확인할 수 있었다. 공기를 투과의 표준물질로 하여 측정한 위의 결과와 같이 2274 nm에서 가장 크고 또렷한 피크를 확인 할 수 있었다. 푸리에 변환 근적외선 분광분석기의 경우, 전처리를 하지 않은 고농도의 스펙트럼에서 2125 nm, 2276 nm, 2325 nm의 세가지 피크 확인이 가능했고, Fig. 6(b)에 나타낸 고농도의 2차 미분 스펙트럼에서는 2100 nm, 2325 nm의 피크와 가장 크고 또렷한 피크인 2276 nm의 세 가지 피크를 확인 할 수 있다. 세 피크 모두 공기를 투과의 표준물질로 하여 측정했던 실험과 비슷한 흡광도를 갖거나, 2273 nm 부근의 피크는 오히려 더 큰 흡광도를 갖는 것으로 보아, 이들의 피크 영역은 물에 대한 영향을 덜 받는 영역임을 알 수 있었다.

글루코오스의 정량성 확인

시료는 0~660 mg/dl, 20000 mg/dl, 40000 mg/dl의 농도로 조계하여 측정하였으나 20000 mg/dl와 40000 mg/dl 농도의 시료는 피크를 확인하는 데 사용하고, 인체 혈액 내에 존재 가능한 0~660 mg/dl의 농도만으로 얻어진 스펙트럼 정보와 함께 다변량 분석법으로 검량 모델을 만들었다. 검량 모델을 만드는데 사용된 다변량 분석법으로는 부분 최소 제곱 회귀분석법(PLSR, partial least squares regression)을 사용하였다. 필요에 따라, 다

Table I – Multivariate calibration and validation result of glucose in phosphate buffer by using three types spectrometer, dispersive type, PDA type, and FT type spectrometer

	Reference	Wavelength (nm)	Pretreatment	Factor	Calibration		Validation	
					SEC	R	SEP	R
Dispersive	Air	400~2500	Raw	3	14	0.998	19	0.996
	Buffer	400~2500	Raw	3	17	0.996	16	0.998
PDA	Air	1100~2150	Basic offset	8	27	0.994	57	0.965
	Buffer	1100~1700	Raw	7	32	0.989	44	0.974
FT	Air	1333~1836	Raw	5	5.8	0.999	11	0.998
	Buffer	2173~2355	Raw	6	5.4	1.000	9.1	0.999

분산 보정(MSC, multiplicative scatter correction), 1, 2차 미분, 등의 전처리법을 사용하였으며, 전과장 또는 글루코오스의 특징적인 피크가 확인되는 영역의 과장의 부분만을 선택하여 모델링한 결과를 Table I에 나타내었다.

공기를 투과외 표준값으로 한 측정 - 분산 근적외선 분광분석기, 배열 광다이오드 근적외선 분광분석기, 푸리에 변환 근적외선 분광분석기로 측정된 스펙트럼의 모델링 결과 앞의 기술 순서대로 standard errors of calibration(SEC) 값은 14, 27, 5.8로 나타났고, standard errors of prediction(SEP) 값은 19, 57, 11으로 나타났다. 검량모델에 대한 R값은 분산 근적외선 분광분석기, 배열 광 다이오드 근적외선 분광분석기, 푸리에 변환 근적외선 분광분석기 순으로 0.998, 0.994, 0.999로 얻어 졌고, 검량 모델에 대한 추정값의 R 값은 0.996, 0.965, 0.998로 나타났다.

pH 7.4 인산 완충용액을 투과외 표준값으로 한 측정 - 분산 근적외선 분광분석기, 배열 광다이오드 근적외선 분광분석기, 푸리에 변환 근적외선 분광분석기로 측정된 스펙트럼의 모델링 결과 앞의 기술 순서대로 SEC 값은 17, 32, 5.4으로 나타났고, SEP 값은 16, 44, 9.1으로 나타났다. 검량모델에 대한 R값은 분산 근적외선 분광분석기, 배열 광다이오드 근적외선 분광분석기, 푸리에 변환 근적외선 분광분석기 순으로 0.998, 0.989, 1.000으로 얻어 졌고, 검량모델에 대한 추정값의 R 값은 0.998, 0.974, 0.999로 나타났다. 두 가지 투과외 표준 물질의 측정에 대한 모델링 결과 pH 7.4 인산완충용액을 투과외 표준값으로 하였을 때, 검량모델에 대한 오차율이 더 작았고, 더 좋은 상관성을 가지는 것을 알 수 있다.

기기별 수행 평가

글루코오스의 측정에 대한 기기별 수행 평가를 위해, 2차 배음대, 1차 배음대, 조합대에서 나타나는 40000 mg/dl 시료의 피크 흡광도를 시료 10 mg/dl에 대한 값으로 나타내어 각각의 기기별로 비교한 것을 Table II에 나타내었다. 공기를 투과외 표준 물질로 하여 측정한 실험에서는 람버트-비어의 법칙을 적용하여, pathlength에 대한 것을 감안하더라도 2차 배음대에서는 분산 방식과 배열 광다이오드 방식의 근적외선 분광분석기가 좋은 감도를 나타냈고, 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기는 앞의

두 방식의 기기와 많은 차이를 보이며, 좋지 않은 감도를 얻었다. 1차 배음대에서는 배열 광다이오드 방식, 분산 방식, 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기의 순으로 좋은 감도를 얻었다. 조합대에서는 세 피크 영역 모두 분산방식의 근적외선 분광분석기가 푸리에 변환방식의 근적외선 분광분석기보다 좋은 감도를 얻을 수 있었다.

pH 7.4의 인산 완충용액을 투과외 표준 물질로 하여 측정한 실험에서 2차 배음대에서는 분산 방식, 배열 광다이오드 방식, 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기의 순으로 좋은 감도를 얻었고, 1차 배음대에서는 배열 광다이오드 방식, 분산방식, 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기의 순으로 좋은 감도를 얻었다. 조합대에서 2100 nm 부근의 피크에서는 분산방식의 근적외선 분광분석기가, 나머지 두 피크에서는 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기가 더 좋은 감도를 나타내었다. 이들의 결과는 이후의 글루코오스 시료 및 혈당 측정을 위한 실험을 설계할 때, 2차 배음대 영역을 이용한 실험이라면, 분산방식의 근적외선 분광분석기를, 1차 배음대 영역을 이용한 실험에서는 배열 광다이오드방식의 근적외선 분광분석기를, 그리고, 조합대를 적용한 실험에서는 푸리에 변환방식의 근적외선 분광분석기를 적용하는 것이 적합함을 보여준다. 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기의 경우, 조합대가 배음대보다, 공기를 투과외 표준물질로 한 실험에서 보다 인산완충용액을 투과외 표준물질로 한 실험에서 더 좋은 결과를 얻은 것으로 보아 물에 대한 영향이 배제된 환경에서 더 좋은 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

결 론

분산 방식, 배열 광다이오드 방식, 푸리에 변환 방식의 세 가지 형태의 근적외선 분광분석기를 이용하여, 생체내의 글루코오스보다 비교적 간섭 물질이 적은 pH 7.4의 인산완충용액에 용해시킨 글루코오스 수용액을 측정하였고, 물에 대한 영향을 제거하기위해 투과외 표준 물질로 pH 7.4의 완충용액을 사용하여 수행하였다. 각각의 기기마다 고농도의 글루코오스 피크가 2차 배음대, 1차 배음대, 조합대에서 확인이 가능하였다. 부분 최소 제곱 회귀분석법을 이용한 다변량 분석에서 푸리에 변환 방식의 근

Table II - Sensitivity of spectrometer by absorbance for the difference of 10 mg/dl glucose

Reference	Type	mAU/10 mg/dl			Pathlength (mm)		
		2nd overtone	1st overtone	Combination			
Air	Dispersive	18.1	77.0	367.6	257.1	326.5	1
	PDA	32.8	161.8	-	-	-	2
	FT	6.2	65.3	349.4	247.2	312.9	1
Phosphate buffer	Dispersive	-1.2	9.2	40.4	9.5	2.6	1
	PDA	-2.1	19.9	-	-	-	2
	FT	-0.8	7.6	34.7	10.2	4.5	1

적외선 분광분석기가 가장 좋은 결과를 얻었고, 모든 방식의 기기에서 0.9 이상의 좋은 상관성을 얻을 수 있었다. 두 가지 투과 표준물질을 적용하여 시도한 실험에서는 대부분의 분광분석기에서 인산 완충용액을 표준물질로 하여 측정된 결과가 공기를 표준물질로 하여 측정된 결과 보다 개선된 것을 알 수 있었다. 기기의 성능을 평가하기 위해 특징적인 피크의 흡광도를 글루코오스 10 mg/dl에 대한 흡광도로 나타내었고, 두 가지 표준물질을 사용한 실험 모두에서 2차 배음대, 1차 배음대, 조합대에서 각각 분산방식의 근적외선 분광분석기, 배열 광다이오드방식의 근적외선 분광분석기, 푸리에 변환 방식의 근적외선 분광분석기가 좋은 감도를 가짐을 알 수 있었다. 이들의 결과는 *in vivo* 실험에서보다 단순한 매질로 간섭물질이 적기 때문에 좋은 오차값과 상관성을 나타낸다. 측정에 영향을 미치는 혈액 내 성분과 같은 생체 물질에 대한 보다 깊은 연구를 통해 적절한 표준물질이 구비가 된다면, 비침투적 방법의 혈당 측정의 정확성과 재현성 면에서 많은 기여를 할 것으로 보여진다.

참고문헌

- 1) Heise, H. M. : Applications of Near-Infrared Spectroscopy in Medical Sciences. *Near-Infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications*, pp. 289-333 (2002).
- 2) Mark, A. Arnold, Gary, W. Small : Determination of Physical levels of glucose in an aqueous matrix with digital filtered fourier transform near-infrared spectra, *Analytical Chemistry* **62**(14), 1457 (1990).
- 3) Lois, A. Marquardt and Mark A. Arnold, Gary, W. Small : Near-infrared spectroscopic measurement of glucose in a protein matrix, *Anal. Chem.* **65**, 3271 (1993).
- 4) Shengtian Pan, Hoeil Chung and Mark A. Arnold, Gary W. Small : Near-infrared spectroscopic measurement of physiological glucose levels in variable matrices of protein and triglycerides, *Anal. Chem.* **68**, 1124 (1996).
- 5) Muller, U. A., Mertes, B., Fischbacher, C., Jagement, K. U. and Danzer, K. : Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy : methods for improving the reliability of the calibration models, *Int. J. Artif. Organs* **20**, 285 (1997).
- 6) Christopher, S. McNulty, Ganapati Mauze : Applications of wavelet analysis for determining glucose concentration of aqueous solution using nir spectroscopy (1998).
- 7) Jonathan, T. Olesberg : Noninvasive blood glucose monitoring in the 2.0~2.5 μm wavelength range.
- 8) Fourier Transform-Infrared Spectroscopy, Part 1: Instrumentation, *Journal of Chemical Education*, **63**, A5-A10 (1986).
- 9) Fourier Transform-Infrared Spectroscopy, Part 2: Advantages of FT-IR, *Journal of Chemical Education*, **64**, A269-A271 (1987).
- 10) Daniel C. Harris, Chapter 21 : Spectrophotometers, *Quantitative chemical analysis* (1996).
- 11) Jussi Tenhunen, Harri Kopola and Risto Myllyla : Non-invasive glucose measurement based on selective near infrared absorbance absorption; requirements on instrumentation and spectral range. *Measurement* **24**, 173 (1998).
- 12) David C. Klonoff : Noninvasive blood glucose monitoring. **16**, 43(3) (1998).
- 13) Heise, H. M. : Glucose, *In vivo* assay of. *Encyclopedia of analytical chemistry*, pp. 56-83 (2000).
- 14) Small, G. W., Arnold, M. A. and Marquardt, L. A. : Strategies for coupling digital filtering with partial least squares regression: application to the determination of glucose in plasma by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* **15**, 65(22) 3279 (1993).
- 15) Kohl, M., Essenpreis, M. and Cope, M. : The influence of glucose concentration upon the transport of light in tissue-simulating phantom. *Phys. Med. Biol.* **40**(7), 1267 (1995).
- 16) Mattu, M. J., Small, G. W. and Arnold, M. A. : Determination of glucose in a biological matrix by multivariate analysis of multiple band-pass-filtered Fourier transform near-infrared interferograms. *Anal. Chem.* **69**(22), 4695 (1997).
- 17) Shaw, R. A., Kotowich, S., Leroux, M. and Mantsch, H. H. : Multianalyte serum analysis using mid-infrared spectroscopy, *Ann. Clin. Biochem.* **35**(Pt5), 624 (1998).
- 18) Hall, J. W. and Pollard, A. : Near-infrared spectrophotometry: a new dimension in clinical chemistry. *Clin. Chem.* **38**(9), 1623 (1992).
- 19) Chung, H., Arnold, M. A., Rhiel, M. and Murhammer, D. W. : Simultaneous measurement of glucose and glutamine in aqueous solution by near infrared spectroscopy. *Appl. Biotechnol.* **50**(2), 109 (1995).
- 20) Ham, F. M., Cohen, G. M., Kostanic, I. and Gooch, B. R. : Multivariate determination of glucose concentration from optimally filtered frequency-wrapped NIR spectra of human blood serum. *Physiol. Meas.* **17**(1), 1 (1996).
- 21) Ham, F. M., Kostanic, I. N., Cohen, G. M. and Gooch, B. R. : Determination of glucose concentration in an aqueous matrix from NIR spectra using optima time-domain filtering and partial least-squares regression. *IEEE Trans Biomed. Eng.* **44**(6), 475 (1997).
- 22) Yeh, S. J., Hanna, C. F. and Khalil, O. S. : Monitoring blood glucose change in cutaneous tissue by temperature-modulated localized reflectance measurements. *Clinical Chem.* **49**(6 Pt 1), 924 (2003).
- 23) Cohen, O., Fine, I., Monashkin, E. and Karasik, A. : Glucose correlation with light scattering patterns-a novel method for non-invasive glucose measurements. *Diabetes Technol. Ther.* **5**(1), 11 (2003).