Journal of the Korean Chemical Society
2015, *Vol. 59, No. 1*
Printed in the Republic of Korea
http://dx.doi.org/10.5012/jkcs.2015.59.1.88

단신 (Notes)

종이기반의 microfluidics를 이용한 눈물 내 글루코오스 측정 연구

김현재[†] · 정신영[‡] · 노혜란[‡,§,*]
[†]연세대학교 화공생명공학과
[‡]서울과학기술대학교 안경광학과
[§]서울과학기술대학교 의공학-바이오소재(융합협동 프로그램)
(접수 2014. 11. 20; 게재확정 2014. 12. 1)

Quantitative Determination of Tear Glucose Using Paper Based Microfluidic Devices

Hyun-Jae Kim[†], Shinyoung Jeong[‡], and Hyeran Noh[‡,§,*]
[†]*Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul, 120-749, Korea.*
[‡]*Department of Optometry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea.*
[§]*Convergence Institute of Biomedical Eng. & Biomaterials, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea.* [*]*E-mail: hrnoh@seoultech.ac.kr*
(Received November 20, 2014; Accepted December 1, 2014)

주제어: 눈물 당, 종이 마이크로플루이딕, 당뇨, 당뇨병성 망막변증

Key words: Tear glucose, Paper based microfluidics, Diabetes, Diabetic retinopathy

서 론

2010년 기준 우리나라의 65세 이상 노인인구는 11.0%에 이르러 고령화 사회에 있으며, 2018년에는 전체인구 대비 노인인구가 14.3%로 증가하여 고령사회로 진입, 2026년에는 초 고령 사회로 진입할 것으로 예견되고 있다.[1] 고령화 사회의 증가는 전 세계적인 추세인데 이에 따른 노인질병 중 당뇨 유병 율 또한 급속하게 증가하고 있다. 2000년 대비 당뇨 유병 율 증가 폭이 2040년까지 300% 이상 증가할 것이며 중국, 인도 등 아시아 국가에서는 350% 이상 증가할 것으로 전망되고 있다.[2] 당뇨병은 유병기간이 길어질수록 각종 합병증이 유발되어 초기 진단이 절실함에도 불구하고, 급격한 유병 율 상승에 비해 일반인들은 당뇨에 대해 위기의식을 느끼지 않아 조기 발견이 어려우며 이 경우 초기 관리를 받지 못해 중장기 당뇨 환자로 발전하기 쉽다. 당뇨병을 확인하는 방법으로는 임상증상, 요당, 혈당, 당화단백 측정과 같은 여러 검사법들이 시도되어 왔으나 아직은 표준화, 간편성, 정확성 및 질병특이성 등을 모두 만족시킬 수 있는 당뇨 검사법은 확립되지 않은 상태이다.[3,4]

최근 개발된 종이를 기반으로 하는 질병 진단기기는 세계보건기구의 현장현시 질병진단기기 요건에 잘 부합되는 신개념 기술이다.[5] 이 종이기반의 마이크로플루이딕 질병진단 매체는 기존의 마이크로플루이딕 기기의 소량의 용액을 정교하게 분류하고 이용할 수 있는 장점을 단순한 종이에 응용시킨 기술이다. 기존의 Lab on a chip에 많이 사용되는 PDMS기술에 비해 저렴한 가격과 사용의 편리성에 더해 정확하고 신속한 진단을 할 수 있는 이점이 있다. 또한 텔레메디슨에 적용될 수 있어 많은 관심과 연구가 진행되고 있다.[6,7]

세계보건기구(WHO)에 따르면, 당뇨를 포함하는 질병진단 기기의 현장현시 사용을 위해서는 빠르고 정확하며 사용자의 사용이 편리해야 한다고 명시되어 있다.[5] 기존의 침습적인 검사 방법은 수집과정에서 발생하는 불편이 있고 환자의 사용법 준수가 어려우며 지속적인 모니터링이 힘들기 때문에 주기적인 진단으로 사용하기에는 무리가 있다.

당뇨의 조기진단 및 모니터링을 위해 눈물, 땀, 소변 등을 이용한 비 침습적인 글루코오스 농도 검사 방법이 연구되고 있으나 비용과 사용편리성 등의 이유로 임상에서 성공적으로 사용되기에는 아직 무리가 있다.[3,4] 따라서 비침습적이고 경제적인 현장현시 진단방법의 개발이 필요하다. 여러 체액 중 눈물의 경우 누액 내 글루코오스 농도와 혈액 내 글루코오스 농도의 유기적인 관련성이 꾸준히 제기되어 왔으며 채집의 편리성 때문에 다른 체액보다 사용자의 이용이 용이한 장점이 있다.

본 연구에서는 종이 microfluidics 기술을 이용하여 비침습적이며 경제적이고 간편한 글루코오스 측정용 현장현시 질병진단매체를 제작하고 눈물당 농도를 측정하여 혈당과 비교하여 그 상관관계를 고찰하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료

본 연구에서 사용된 시약은 Sigma사(U.S.A)에서 제조된 글루코오스, glucose oxidase, horseradish peroxidase (HRP), N,N-Diethyl-p-phenylenediamine (DEPDA), 1-chloro-4-naphthol (4CN)을 사용하였다. Phosphate buffered saline (PBS)은 AMRESCO사(U.S.A)의 1X PBS tablet (100 ml)을 사용하였다.

종이 매체 제작

종이기반의 마이크로플루이딕 매체 제작은 Noh등의 논문을 바탕으로 약간의 수정을 하여 제작하였다.[8] 간단히 설명하자면, chromatography paper에 Clewin (PhoeniX Software)으로 마이크로 채널을 디자인하였으며, Xerox Phaser 8560을 이용하여 paraffin wax ink로 출력하였다. 프린트된 종이를 핫플레이트에 (80 °C, 1분) 위치하여 왁스가 종이 내부로 스며 친수성과 소수성 채널이 생기도록 고안하였다. 본 연구에 사용된 종이매체 채널의 폭은 750 μm, 측정지역의 지름은 1300 μm이다. 친수성 채널의 끝에는 글루코오스 농도를 색 변화를 측정할 수 있도록 글루코오스 옥시다아제, horseradish peroxidase (HRP), N,N-Diethyl-p-phenylenediamine (DEPDA), 1-chloro-4-naphthol (4CN)을 묻혀 눈물 내 당의 정도에 따른 색 변화를 유도하였다.[8]

글루코오스 정량

Glucose oxidase 100 U/mL, 촉매인 HRP 5 U/mL을 각각 1:1 비율로 섞은 용액과 H_2O_2의 생산 농도에 따라 색 변화를 나타내는 DEPDA 10 mM과 4CN 10 mM을 1:2 비율로 섞은 용액을 종이에 각각 2 μL, 1 μL 떨어트려 건조시킨 후 글루코오스 또는 눈물 2 μL를 detective zone과 반응시켜 색 변화를 관찰하였다.

이미지 촬영 및 해석

사진 촬영은 스마트 폰(Galaxy S2)의 카메라를 이용하여 같은 각도 및 거리에서 촬영하였으며, 촬영시의 태양광이 제한된 실내에서 조도와 휘도 조건을 통일하였다. 종이의 이미지를 Photoshop의 gray scale로 전환하여 흰색을 0, 검은색을 100 기준으로 하였으며, 원래 종이의 농도 기준은 25이다.

임상 실험

실험에 참가한 인원은 총 11명이며, 안 질환과 당뇨가 없는 20대 남녀(각각 A~J로 명명)에 대하여 혈액과 누액을 채취하여 실험하였다. 식후 공복 8시간을 유지하였으며, 임상적용기간 동안 흡연과 음주를 금하였다. 본 연구는 헬싱키 선언(The Declaration of Helsinki)을 준수하여 이에 따라 진행되었다.

본 임상실험에서는 체내 글루코오스 증가에 따른 눈물 내 글루코오스의 증가여부를 측정하기 위해 글루코오스 캔디로 대신하여 포도당을 섭취하게 하였다. 3 g부터 15 g까지 3 g씩 증가시키며 총 5번에 걸쳐 섭취하도록 하였고 각각의 경우를 15분 단위로 60분까지 측정하였다. 글루코오스는 전체 캔디 질량의 90%에 해당한다.

결과 및 고찰

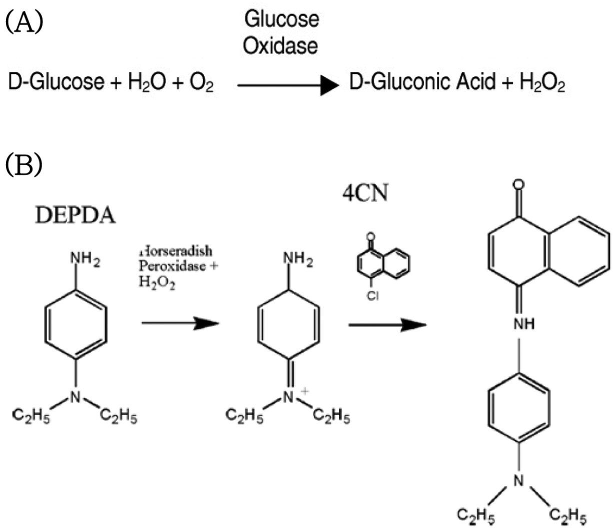
글루코오스 정량 반응

Scheme 1은 글루코오스를 정량화하는 DEPDA, HRP와 4CN의 염색반응 메커니즘을 나타낸 것이다. Glucose와 Glucose oxidase의 반응부산물인 H_2O_2와 DEPDA와 4CN의 반응 정도에 따른 색의 농도를 통해 샘플 내의 글루코오스 양을 정량하였다.[8]

Fig. 1은 종이기반의 마이크로플루이딕 매체를 이용한 글루코오스 정량 전후의 이미지이다. 글루코오스가 염색시약(DEPDA, 4CN)과 반응 후의 색 변화가 육안으로 관찰된다.

글루코오스 정량 평가

Fig. 2는 글루코오스(1~10 mM)의 정량 표준곡선이다.



***Scheme* 1.** Colorimetric analysis of glucose concentration.

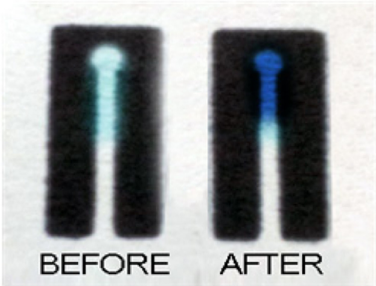


***Figure* 1.** Before and after images of paper based microfluidics detecting tear glucose.

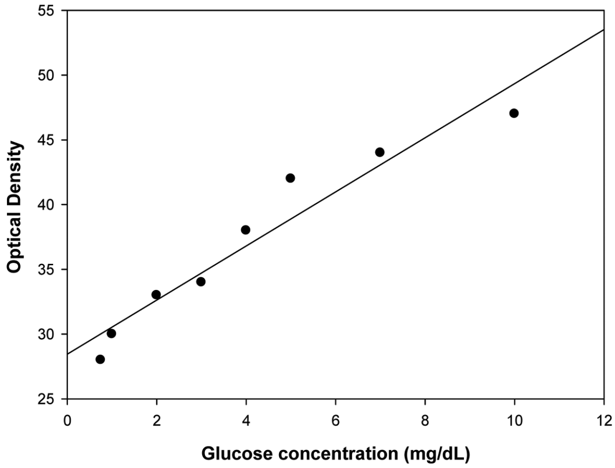


***Figure* 2.** Standard curve of glucose using paper based microfluidics.

저농도(2 mM 미만)와 고농도에서 고루 글루코오스 농도에 따른 선형 분포를 나타내었다(r=0.97).

눈물과 혈액 내 글루코오스 농도 비교

Fig. 3은 글루코오스 캔디 12 g을 섭취 후 시간에 따른 혈액과 눈물 내 글루코오스의 상대적 농도변화를 나타낸 그래프이다. 글루코오스 캔디 섭취전의 혈당과 눈물당의 농도를 기준으로 상대값을 표기하였다. 혈당과 눈물당 모두 당 섭취 전 97.00 ± 1.27 mg/dL(혈당), 5.39 ± 1.51 mg/dL (눈물당)을 기준으로 섭취 후 30분에서 가장 높은 수치를 보였으며 60분 후 섭취 전과 비슷한 최저 치를 나타났다.

기존 연구에 의하면 일반적으로 눈물당이 혈당보다 10배 낮은 농도로 존재하며, 눈물 내 글루코오스의 양은 50~100 μM로 피실험자마다 차이가 있는 것으로 알려져 있어[9] 본 논문에서는 상대적 당 농도변화를 계산하여 여러 변수를 제하고 시간에 따른 당 농도 변화를 측정하고자 하였다. 실험결과 절대적인 눈물당 농도의 계산 값이(5.39 ± 1.51 mg/dL) 정상인의 눈물 내 당 농도의 범위 내에 있어 paper based microfluidic으로 눈물당의 정량분석이 가능함

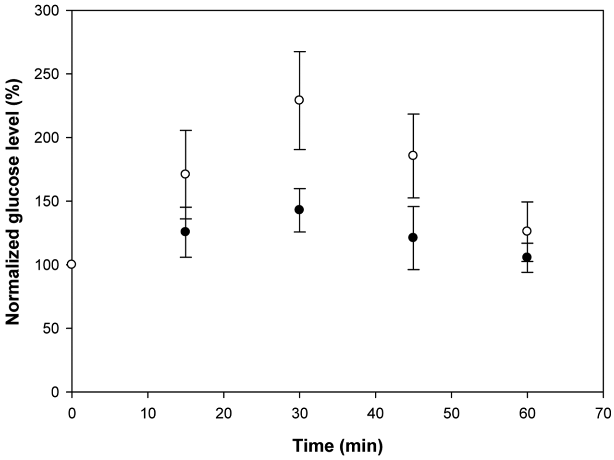


***Figure* 3.** Normalized glucose level as a function of time at 12 g of glucose intake (open circles: glucose level in tear, closed circles: glucose level in blood).

을 확인하였다. 또한 *Fig*. 3에 나타난 바와 같이 글루코오스 캔디 섭취에 의한 혈당과 눈물당은 같은 분해 속도를 가지는 것으로 나타났다. Yan et al.은 platinum/iridium (Pt/Ir)을 이용한 글루코오스 센서로 동물 모델의 혈당과 눈물당의 변화를 전기화학적인 방법으로 측정하여 토끼의 눈물당과 혈당이 선형의 관계를 가지는 것을 보고하였다.[10] 이는 혈당의 농도 변화와 눈물당의 농도변화 추세가 비슷한 본 연구의 임상실험 결과와 일치한다.

눈물당의 경우 표준편차가 큰 폭으로 나타나는데, 이는 피실험자 개개인의 글루코오스 섭취 후 최대값에 도달하는 시간적인 차이의 폭이 크고 눈물당의 개인차가 혈당의 개인차보다 크기 때문인 것으로 사료된다.

Fig. 4는 글루코오스 캔디를 3 g부터 15 g까지 섭취하고 15분부터 10분 단위로 60분까지 글루코오스 농도를 종이 마이크로플루이딕 매체와 일반 혈당 기로 측정한 그래프이다. 시간이 지남에 따라 혈당과 눈물당의 농도가 모두 증가하며 섭취한 글루코오스 양에 따라 체액 내 상대적인 당 농도도 증가함을 알 수 있다.

초기 눈물 당에 관한 연구로 Lewis는 환자의 혈당과 눈물당을 임상적으로 비교한 결과 그 상관관계가 있으나 통계적으로 유효하지 않았다.[11] 이후 눈물 글루코오스의 변형체인 글루코사미노글리칸(glycosaminoglycans)의 눈물 내 농도를 측정해 당뇨병에 의한 안 질환을 이해하고자 하였다.[12] 임상실험 외의 다양한 방법으로 눈물 글루코오스 농도를 정확하고 간편하게 측정하려는 시도를 하고 있는데 그 중, 형광발색에 의한 방법이나,[13] 이온화질량분석법,[14] 모세관 전기영동법등[15]이 있으나 이는 실험장비가 필요하여 아직까지는 현장현시 질병진단 방법으로 적용되기에는 무리가 있다.

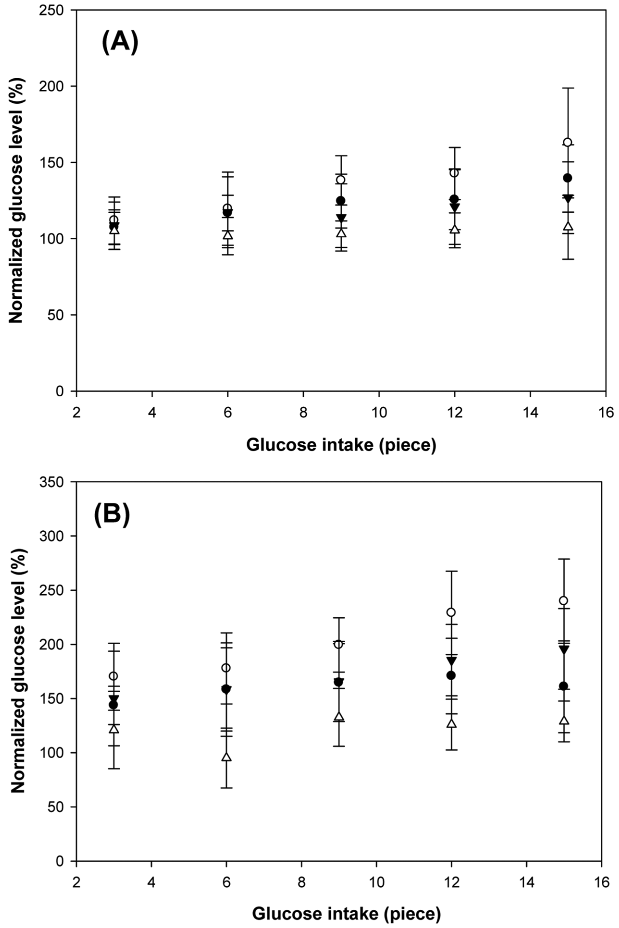


***Figure* 4.** Normalized glucose level in blood (A) and tear (B) as increasing amount of glucose intake (triangle: 15 min., closed circle: 30 min., closed inverse triangle: 45 min., open circle: 60 min.).

눈물을 이용한 현장현시 질병진단을 위해서는 사용이 간편하며, 신속, 정확한 정보를 편리하게 제공해야 한다. 눈물은 소량 채취하게 되므로 마이크로 리터의 소량으로 검출할 수 있도록 민감한 정량이 가능해야 하는데 *Fig*. 4에 나타난 바와 같이 종이 마이크로플루이딕 매체로 다양한 질량의 글루코오스 섭취 후 그 양에 따라 혈당농도가 변함과 마찬가지로 눈물당의 농도가 변화함을 알 수 있었다. 또한, 여러 농도에서 눈물당도 혈당과 마찬가지로 시간이 지남에 따라 당 농도가 감소하며, 당이 분해되는 농도변화의 패턴이 비슷하다는 것을 알 수 있다.

Fig. 5는 글루코오스 캔디를 1 g부터 15 g까지 섭취하고 30분 후의 혈액과 눈물내의 상대적인 글루코오스 농도를 비교한 그래프이다. 섭취한 글루코오스 양이 증가할수록 혈당과 눈물당 모두 증가하는 양상을 보였다. 눈물당의 경우 최대 250% 증가(15 g 섭취 시)하였고 같은 양의 글루코오스를 섭취하였을 때 혈당은 160% 증가하여 눈물당이 당 섭취 후 체내 당 변화에 혈당보다 민감하게 증가됨을 알 수 있었다.

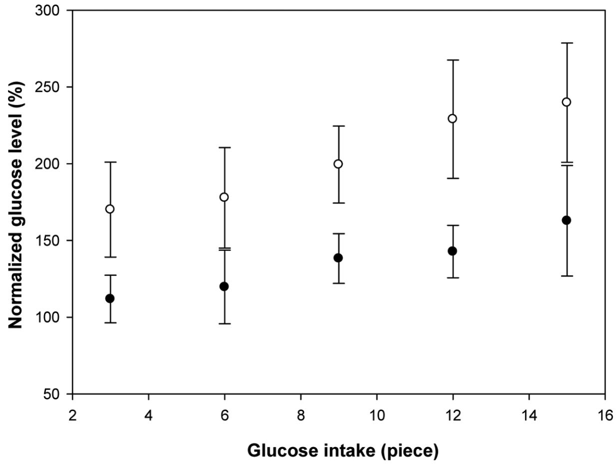


***Figure* 5.** Normalized glucose level in blood and tear after 30 min of glucose intake (open circles: tear, closed circles: blood).

체내 당 농도가 기준치보다 높고 일정하게 지속되는 당뇨환자에게는 여러 합병증이 유발될 수 있는데 빈번하게 일어나는 합병증 중 하나인 당뇨 망막변증은 특히 장기 당뇨 환자 중 50% 정도에서 발견이 된다고 알려져 있다. 이는 미세망막혈관의 파괴로 일어나며 삼출물의 유출과 신생혈관증식으로 시력장애 등을 유발시키는데 이로 인한 실명은 매우 드물게 나타나지만, 색 분별에 장애가 생기고, 시력감퇴가 일어난다는 연구 조사가 있다.[9] 망막혈관내의 당 농도를 측정하기는 사실상 어려워 망막에 미치는 당의 영향을 이해하기는 쉽지가 않은 실정이다. 본 연구 결과 섭취한 글루코오스에 의한 혈액의 당 농도 변화보다 눈물내의 당 변화가 민감하게 증가하는 것으로 나타나 각막과 인접하는 체액의 당 변화가 혈액 내 변화보다 2배 가까이 민감함을 알 수 있다.

결 론

본 연구는 종이를 이용한 마이크로플루이딕 매체로 눈물당을 측정할 수 있는 현장현시 진단 테스트지를 개발하고 임상적으로 혈당과 눈물당의 농도 변화를 비교하였다. 그 결과, 종이-마이크로플루이딕 매체로 눈물 내 글루코오스 농도 측정이 가능함을 나타내었다. 또한 글루코오스 섭취 후 눈물당과 혈당의 증감 패턴이 비슷하여 서로 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 눈물 글루코오스 농도의 상대 값(%)이 혈액 글루코오스 농도의 상대 값(%)보다 높다는 것으로 미루어 보아, 눈물당 농도 변화가 혈당의 경우보다 민감하게 반응하는 것으로 유추할 수 있다. 본

연구 결과로 종이-마이크로플루이딕 진단 테스트지가 눈물을 이용하여 정확하고 빠르며 비 침습적인 현장현시 진단 매체로 적용될 수 있음을 보였다. 향후 눈물 내 당 농도 측정뿐 아니라 콜레스테롤이나 단백질 등과 같은 다른 질병인자 측정에도 적용시킬 수 있어 다방면으로 응용이 가능하다.

Acknowledgments. 본 연구는 한국연구재단 과제(2012002809)와 방사선기술개발사업으로 연구지원한(NRF-2013M2A2A9043274)으로 연구되었습니다.

REFERENCES

1. Kwang, T. J.; Chun, K. J.; Won, B. H. *J. Ergon. Soc. Korea* **2013**, *32*, 557.
2. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. *Am. Diabetes Assoc.* **2004**, *27*, 1047.
3. Jeong, M. Y. *Korean Clin. Diabetes* **2010**, *11*, 4.
4. Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M. R.; Weigl, B. H. *Nature* **2006**, *442*, 412.
5. Yager, P.; Domingo, G. J.; Gerdes, *J. Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 107.
6. Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Carrilho, E.; Thomas III, S. W.; Sindi, H.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem*. **2008**, *80*, 3699.
7. Pelton, R. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 925.
8. Noh, H.; Phillips, S. T. *Anal. Chem*. **2010**, *82*, 8071.
9. Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. *J. Fluores.* **2003**, *13*, 371.
10. Yan, Q. Y.; Peng, B.; Gang, Su.; Cohan, B. E.; Major, T. C.; Meyerhoff, M. E. *Anal. Chem*. **2011**, *83*, 8341.
11. Lewis, J. G.; Stephens, P. J. *Brit. J. Ophthal.* **1958**, *42*, 754.
12. Moschos, M. M.; Rouvas, A. A.; Papadimitriou, S.; Kotsolis, A.; Sitaras, N.; Apostolopoulos, M. *Clin. Ophthalmol.* **2008**, *2*, 581.
13. Park, J.; Kricka, L. J. *Anal. Bioanal. Chem*. **2014**, *406*, 5631.
14. Taormina, C. R.; Baca, J. T.; Finegold, D. N.; Asher, S. A.; Grabowski, J. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 332.
15. Wang, Z.; Haasch, R. T.; Lee, T. U. *Langmuir* **2005**, *21*, 1153.