

## 수식헤모글로빈의 메트헤모글로빈(MetHb)함량을 낮추기 위한 연구

강명수, 장현성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《의학부문 과학자, 기술자들은 과학연구사업에서 주체를 철저히 세워 우리 나라의 구체적실정에 맞는 가치있는 과학기술적문제를 많이 연구해내야 합니다.》(《김정일선집》 제11권 증보판 83페이지)

우리는 수식헤모글로빈(수식Hb)제조과정에 생기는 MetHb함량을 낮추기 위한 연구를 하였다.

MetHb는 O<sub>2</sub>과의 결합능력이 전혀 없으므로 산소운반기능을 수행하지 못하며 따라서 수식Hb제제의 MetHb함량을 낮추는것은 산소운반제제의 효과성을 높이는데서 중요한 의의를 가진다.

지금까지는 N<sub>2</sub>속에서 수식하는 방법과 환원제법이 알려져있다.[5]

론문에서는 수식Hb의 제조과정에 생기는 용액상태의 Hb와 수식Hb, 건조수식Hb의 MetHb함량에 미치는 NaHCO<sub>3</sub>처리의 영향에 대하여 고찰하였다.

### 재료와 방법

연구재료로는 건조혈장생산과정에 나오는 사람적혈구농후액을 썼다.

NaHCO<sub>3</sub>, 비타민 C, NaOH, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, KCN, NaIO<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>, NaHSO<sub>3</sub> 등 실험에 리용한 모든 시약들은 분석순이었다.

실험기구로는 가시선분광광도계(《VIS-7220D》), 소형원심분리기(《T23》), 극동기(《MF-314》), 랭동진공건조기(《LGJ-10》), 휴대용pH미터(《ATC》), 투석기(《SUREFLUX-130G》), 송액뿔프를 리용하였다.

수식Hb는 이미 알려진 방법[2]을 일부 변경시켜 다음과 같이 제조하였다.

우선 적혈구농후액에 0.85% 생리적식염수를 2배(v/v)되게 넣고 랭각원심세척조작(4~6°C, 3 500r/min)을 5번 반복하는 방법으로 적혈구를 세척하였다. 다음 세척적혈구농후액체적의 2배되게 각이한 농도의 NaHCO<sub>3</sub>용액이나 비타민 C용액(대조구인 경우 증류수)을 넣고 4~6°C에서 30min동안 놓아두었다가 극동고(-20°C)에서 24h동안 얼굴처리하고 녹이는 방법으로 적혈구를 용혈시켰다. 이어 용혈액체적의 1.6배되게 증류수를 넣고 pH를 6.7로 맞춘 다음 3 500r/min에서 40min동안 원심하여 상청액을 분리하였다. 이 Hb용액의 pH를 9.0으로 맞춘 다음 Hb와 사카로즈알데히드물질량비가 1 : 2되도록 사카로즈알데히드를 넣고 4~6°C에서 24h동안 놓아두었다. 여기에 Hb와 히드록시에틸전분(HES)의 질량비가 1 : 1.17되게 HES알데히

드(약 11만)를 넣고 다시 pH 9.0으로 맞춘 다음 4~6°C에서 4h동안 놓아두었다. 다음 이 수식Hb용액에 NaBH<sub>4</sub>을 최종농도가 0.7g/L되게 넣고 4~6°C에서 24h동안 놓아두었다. 이어 투석기를 가지고 증류수를 투석액으로 하여 수식Hb용액을 Hb농도가 3~4g/dL될 때까지 농축한 다음 포도당을 최종농도가 5%되게 넣었다. 평균 기공크기가 0.22  $\mu$ m인 질산섬유소려과막을 써서 무균여과하여 나온 수식Hb용액을 건조병에 1mL씩 분주하여 랭동진공건조하였다.

시료의 Hb, MetHb함량은 시안화MetHb법[3]으로 정량하였다.

랭동진공건조조건은 다음과 같다: 건조온도 -70°C, 진공도 8Pa, 건조시간 12h.

## 결과 및 고찰

### 1) Hb와 수식Hb의 MetHb함량에 미치는 염기성pH조절제처리의 영향

수식Hb의 제조과정에 MetHb함량이 높아지는 주요원인은 용혈, 수식조작때의 용액pH 때문이라고 볼수 있다. 일반적으로 용혈액의 pH가 7.1~7.3보다 낮으면 MetHb함량이 높아지고 수식때에 Hb용액의 pH가 7.7이상으로 높으면 Hb가 변성될 가능성이 크다.[5] 그러나 현재 적혈구용혈을 위해 쓰고있는 증류수의 pH는 7.1이하이고 완충작용이 없으므로 수식Hb 제조과정에 그 pH변화범위가 넓어져 Hb가 쉽게 Met화되고 변성될수 있으며 이를 방지하기 위해서는 완충작용이 있는 pH조절제로 pH를 조절해야 한다. 이로부터 우리는 수식Hb의 제조과정에 세척적혈구농후액의 용혈단계에서 증류수(대조구)대신에 최종pH가 7.7되게 혈액완충작용이 있는 염기성pH조절제인 NaHCO<sub>3</sub>용액과 센 알카리로서 혈액완충작용이 없는 염기성pH조절제인 NaOH용액으로 처리하여 얻은 Hb와 수식Hb의 MetHb함량을 대조구와 비교검토하였다.(표 1)

표 1. Hb와 수식Hb의 MetHb함량에 미치는 염기성pH조절제처리의 영향

구분	MetHb함량/%	
	Hb	수식Hb
대조구	11.72±0.62	17.51± 0.89
시험구 1(0.67% NaHCO <sub>3</sub> (pH 7.7))	2.87±0.12	6.12** ±0.30
시험구 2(NaOH(pH 7.7))	1.45*±0.08	13.43±0.70

\*  $p<0.05$ (시험구 1과 비교), \*\*  $p<0.05$ (시험구 2와 비교), 시험구 2에서는 pH조절을 1mol/L NaOH로 하였다.

으며 Hb에서는 NaOH(pH 7.7)의 효과가, 수식Hb인 경우에는 반대로 NaHCO<sub>3</sub>(pH 7.7)의 효과가 더 컸다.( $p<0.05$ ) 이 실험결과는 염기성pH조절제처리가 Hb와 수식Hb의 MetHb함량을 현저히 낮추며 수식Hb의 MetHb함량을 낮추는데서 pH조절 및 완충작용을 동시에 나타내는 NaHCO<sub>3</sub>의 효과가 NaOH보다 더 크다는것을 보여준다.( $p<0.05$ )

### 2) Hb와 수식Hb의 MetHb함량에 미치는 NaHCO<sub>3</sub>처리농도의 영향

수식Hb의 제조과정에 세척적혈구농후액의 용혈단계에서 증류수(대조구)대신에 각이한 농도의 NaHCO<sub>3</sub>용액으로 처리하여 얻은 Hb와 수식Hb의 MetHb함량을 대조구와 비교검토한 결과는 표 2와 같다.

표 1에서 보는바와 같이 NaHCO<sub>3</sub>용액과 NaOH용액으로 처리하여 얻은 Hb와 수식Hb의 MetHb함량이 모두 낮아졌는데 Hb에서는 대조구에 비해 각각 75.5, 87.6%, 수식Hb인 경우에는 대조구에 비해 각각 65.0, 23.3% 낮아졌다. 염기성pH조절제처리효과가 수식Hb보다 Hb에서 더 컸

표 2에서 보는바와 같이 대부분의 시험구들에서  $\text{NaHCO}_3$ 의 농도가 높아짐에 따라 Hb와 수식Hb의 MetHb 함량이 대조구에 비해 유의성있게 낮아졌다. 다만 시험구 1에서 수식Hb는 대조구에 비해, 시험구 2에서 Hb는 시험구 1에 비해, 시험구 4에서 Hb와 수식Hb는 시험구 3에 비해 MetHb 함량에서 유의한 차이가 없었다. ( $p>0.05$ )

이 실험결과를 통해서 수식Hb의 제조과정에 생기는 Hb와 수식Hb의 MetHb 함량을 현저히 낮추는  $\text{NaHCO}_3$  처리용액의 합리적인 농도가 0.67%라는 것을 알 수 있다.



그림. 수식Hb용액  
1-대조구, 2-시험구 3

대조구와 시험구 3에 해당하는 수식Hb용액들을 사진기로 찍은 결과는 그림과 같다.

그림에서 보는바와 같이 대조구의 수식Hb용액은 MetHb가 많이 포함(MetHb 17.51%)되었기 때문에 보다 검은색(실지로는 검붉은색)을, 시험구 3의 수식Hb용액(MetHb 6.12%)은 채색(실지로는 Hb에 고유한 붉은색)을 띤다. 이것은  $\text{NaHCO}_3$  처리결과 수식Hb의 MetHb 함량이 실지 현저히 낮아졌다는 것을 확증해준다.

### 3) $\text{NaHCO}_3$ 과 비타민 C의 효과비교

수식Hb의 제조과정에 생기는 Hb와 수식Hb의 MetHb 함량에 미치는  $\text{NaHCO}_3$  pH조절제와 비타민 C 환원제의 처리효과를 비교검토한 결과는 표 3과 같다.

표 3.  $\text{NaHCO}_3$ 과 비타민 C의 효과비교

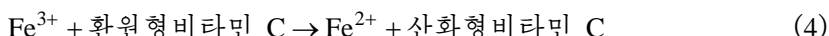
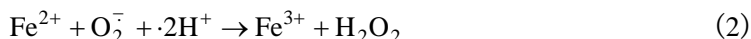
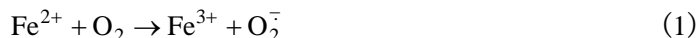
구분	MetHb/%	
	Hb	수식Hb
대조구	11.72±0.62	17.51±0.89
시험구 1(0.001% 비타민 C, pH 7.2)	13.46*±0.71	17.58*±0.91
시험구 2(0.01% 비타민 C, pH 7.2)	6.54±0.30	11.42±0.57
시험구 3(0.1% 비타민 C, pH 6.8)	4.85±0.22	8.34±0.39
시험구 4(1% 비타민 C, pH 5.2)	16.35±0.85	28.15±1.43
비교구(0.67% $\text{NaHCO}_3$ , pH 7.7)	2.87**±0.12	6.12**±0.30

\*  $p>0.05$ (대조구와 비교), \*\*  $p<0.05$ (시험구 3과 비교)

표 3에서 보는바와 같이 대부분의 시험구들에서 비타민 C의 농도가 높아짐에 따라 Hb와 수식Hb의 MetHb 함량이 대조구에 비하여 유의성있게 낮아졌으나 시험구 4에서는 반대로 높아졌다. 다만 시험구 1에서 Hb와 수식Hb의 MetHb 함량은 대조구에 비하여 MetHb 함량에서 유의한 차이가 없었다. ( $p>0.05$ )

이 실험결과는 비타민 C의 농도가 높아짐에 따라 Hb와 수식Hb용액의 pH가 산성쪽으로 변화되며 0.01~0.1%의 비타민 C 용액처리가 Hb와 수식Hb의 MetHb 함량을 현저히 낮추는데 이때 비타민 C 처리용액의 합리적인 농도는 0.1% 근방이라는 것을 보여준다.

시험구 4에서 대조구에 비해 MetHb함량이 현저히 높아진것은 산성조건에서 과잉의 비타민 C가 Hb와 수식Hb에 결합된  $Fe^{3+}$ 과 반응하여  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ 과 같은 유리라디칼들을 연쇄적으로 발생시키는 작용을 하기때문이라고 볼수 있다. 즉



이 연쇄반응은 환원형비타민 C가 모두 산화형으로 이행할 때까지 계속 진행되며 결국 Hb와 수식Hb의 자체산화과정이 촉진되어 MetHb함량이 높아지게 된다.

한편 0.67%  $NaHCO_3$ 용액(비교구)과 0.1% 비타민 C용액(시험구 3)의 처리효과를 비교하면  $NaHCO_3$ 용액의 효과가 비타민 C용액보다 더 크다는것을 알수 있다. ( $p < 0.05$ )

#### 4) 건조수식Hb의 MetHb함량에 미치는 $NaHCO_3$ 처리의 영향

건조수식Hb의 MetHb함량에 미치는  $NaHCO_3$ 처리의 영향을 증류수를 대조로 하여 비교 검토한 결과는 표 4와 같다.

표 4. 건조수식Hb의 MetHb함량에 미치는  $NaHCO_3$ 처리의 영향

구분	건조수식Hb의 MetHb함량/%
대조구	20.32±1.04
시험구(0.67% $NaHCO_3$ )	7.10±0.33

표 4에서 보는바와 같이 0.67%  $NaHCO_3$ 용액으로 처리하여 제조한 건조수식Hb의 MetHb함량은 7.1%로서 대조구에 비해 13.2% 낮았다.

또한 표 2의 실험자료와 대비해보면 랭동진공건조과정에 수식Hb용액의 MetHb함량이 대조구에서는 2.8%, 시험구에서는 약 1% 높아졌

다는것을 알수 있다.

일반적으로 대용혈액으로 쓰는 건조수식Hb는 MetHb함량을 10%이하, 좋기는 5%이하로 낮출것을 요구한다.[4]

실지 선행연구결과에 의하면 10%이하의 MetHb가 포함되어있는 PEG(폴리에틸렌글리콜)-Hb제품으로 6% PEG-Hb대용혈액제제를 만들어 30%의 교환수혈을 진행하였을 때 조직에 산소를 충분히 보장하였지만 10%이상의 MetHb가 포함되어있는 제품으로 6% PEG-Hb대용혈액제제를 만들어 쓴 경우에는 PEG-Hb의 산소운반능력이 떨어져 조직에 산소를 충분히 보장하지 못하였다.[1]

이런 측면에서 볼 때 수식Hb의 제조과정에 세척적혈구농후액의 용혈단계에서 증류수 대신에  $NaHCO_3$ 용액을 처리하는것은 건조수식Hb의 MetHb함량을 허용기준까지 손쉽게 낮출수 있는 효과적인 방법이라는것을 보여준다.

### 맺 는 말

수식Hb의 MetHb함량을 낮추는  $NaHCO_3$ 과 비타민 C처리용액의 합리적인 농도는 각각 0.67, 0.1%이며 그 조건에서  $NaHCO_3$ 용액의 효과가 비타민 C용액보다 더 크다.

수식Hb의 제조과정에 세척적혈구농후액을 최종농도가 0.67%되게 2배 체적의  $NaHCO_3$ 용액으로 처리하면 건조수식Hb의 MetHb함량을 대조구(증류수)에 비해 13.2% 낮춘다.

## 참 고 문 헌

- [1] R. Liuberg et al.; Immuno. Biotech., 26, 2, 133, 1998.
- [2] M. W. Robert et al.; Blood Substitutes, Elsevier, 30~180, 2006.
- [3] 岩下雄二; 化学工学, 54, 6, 437, 1990.
- [4] 路秀玲; 生物工程学报, 22, 1, 7, 2006.
- [5] 上田努; 公開特許公報 207853, 2011.

주체 103(2014)년 5월 5일 원고접수

## **Research on Lowering Methemoglobin Content of Modified Hemoglobin**

*Kang Myong Su, Jang Hyon Song*

The optimal concentration of  $\text{NaHCO}_3$  and vitamin C is respectively 0.67, 0.1% in lowering methemoglobin content of modified hemoglobin and the effect of  $\text{NaHCO}_3$  is better than the one of vitamin C.

And also methemoglobin content of modified and lyophilized hemoglobin in 0.67%  $\text{NaHCO}_3$  group as a haemolytic solution is 13.2% lower than control group(a distilled water) during modifying and lyophilizing a hemoglobin.

Key words: modified hemoglobin, methemoglobin