

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
G01N 35/10

(45) 공고일자 2005년03월15일
(11) 등록번호 10-0475634
(24) 등록일자 2005년02월28일

(21) 출원번호 10-2001-0084331
(22) 출원일자 2001년12월24일

(65) 공개번호 10-2003-0054204
(43) 공개일자 2003년07월02일

(73) 특허권자 주식회사 아이센스
서울 노원구 월계동 465-14

(72) 발명자 최강
중국길림성연길시신흥가명회위19조

김주용
경기도수원시팔달구우만동528-6

김문환
경기도부천시오정구고강본동363동원아파트마동501호

엄정희
서울특별시성북구장위3동174-29

남학현
서울 강북구 번3동 133-1 한양아파트 101동 206호

차근식
서울특별시 서대문구 홍은동 9-78

(74) 대리인 한인열
이원희

심사관 : 신원혜

(54) 일정 소량의 시료를 빠르게 도입할 수 있는 시료도입부를구비한 바이오 센서

요약

본 발명은 혈액시료를 전처리 과정 없이 빠르고 정확하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비한 전기화학형 바이오 센서에 관한 것으로서, 상기 시료도입부는 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖고 있다. 상기한 구조의 시료도입부를 구비한 본 발명의 바이오 센서는 작업전극, 보조전극 또는 기준전극이 같은 기관 위에 형성된 평면형 바이오 센서, 또는 보조전극을 상부기관에 형성하여 작업전극과 마주보도록 제작한 대면형 바이오 센서, 또는 상기 평면형 및 대면형이 차등식으로 신호를 처리하도록 구현한 차등식 바이오 센서에 모두 적용될 수 있다. 본 발명의 바이오 센서는 1 μl 이하의 극소량 임상 시료도 전처리 과정 없이 일정하게 도입할 수 있으며, 도입된 시료에 대한 측정을 5 초 이내에 끝낼 수 있는 장점을 가지며, 재현성 및 신뢰성이 우수하며, 구조가 지극히 단순하여 저렴하게 대량 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다.

대표도

도 2

색인어

시료도입부, 돌출부, 통기부, 통로부, 바이오 센서

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1은 본 발명에 따른 시료도입부의 바람직한 일예를 도시한 도면이고,
- 도 2는 본 발명의 평면형 바이오센서의 분해사시도이고,
- 도 3은 본 발명의 대면형 바이오센서의 분해사시도이고,
- 도 4는 본 발명의 차등식 평면형 바이오센서의 분해사시도이고,
- 도 5는 본 발명의 차등식 대면형 바이오센서의 분해사시도이고,
- 도 6은 본 발명인 대면형 바이오센서의 방해물질에 의한 영향 측정도이고,
- 도 7은 본 발명인 대면형 바이오센서의 글루코오스 표준용액에 대한 검정곡선이고,
- 도 8은 본 발명인 대면형 바이오센서의 글루코오스 표준용액에 대한 정압전류법 동적 감응 곡선이다.

<도면의 주요 부분에 관한 부호의 설명>

- 100: 시료도입부 101: 시료도입 통로부
- 102: 통기부 103: 돌출부
- 104: 작동전극 105: 보조전극 또는 기준전극
- 106: 전극연결부 200, 200': 중간기관
- 300: 상부기관 400: 하부기관

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

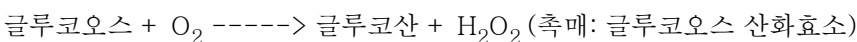
본 발명은 혈액시료를 전처리 과정 없이 빠르고 정확하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비한 바이오센서에 관한 것으로서, 상기 시료도입부는 통기부와 시료도입 통로부가 교차 형성되고, 통기부와 시료도입 통로부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는다. 본 발명에 따른 바이오센서는 유사한 형태를 갖춘 기존의 바이오센서들 보다 소량의 시료를 편리하고 신속하며 정확하게 주입할 수 있음은 물론, 5 초 이내의 빠른 시간에 재현성 있고 정확한 측정을 할 수 있다는 장점을 지니고 있다.

최근 당뇨병을 진단하고 예방하는데 있어서 혈액내의 글루코오스 양을 주기적으로 측정해야 할 필요성이 증대되고 있다. 종래 혈액 내 글루코오스 양을 측정하는 기기로는 스트립형 측정기가 있으며, 작동원리는 비색 방법(colorimetric method) 또는 전기화학적 방법(electrochemical method)에 기초하고 있다.

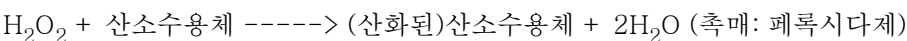
비색 방법은 하기 반응식 1의 글루코오스 산화 효소-비색반응에 의존한다.

반응식 1

i) 글루코오스 산화효소 촉매반응:



ii) 페록시다제 촉매반응:

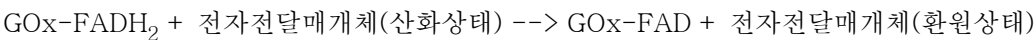
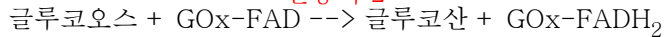


상기 반응을 보다 상세히 기술하면, 혈액 시료내의 글루코오스는 산소 존재하에 글루코오스 산화효소의 촉매반응에 의해 산화되어 글루코산(gluconic acid) 및 과산화수소(hydrogen peroxide)를 생성하고, 생성된 과산화수소는 페록시다제의 촉매반응에 의해서 산소수용체(발색체)에 산소분자를 전달하며, 그 결과 산화된 발색체는 발색하고, 발

색 강도를 측정하여 혈액 시료의 글루코오스를 정량한다. 그러나, 상기 비색방법은 혈액 시료의 운반, 전처리, 시료의 양, 반응시간 및 발색개시시간 등에 의해서 발색의 강도가 변화될 수 있으므로 이들을 정확히 조절하여야 할 뿐 아니라, 혈액응고 또는 요소산(uric acid), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 빌리루빈(bilirubin) 등의 방해물질에 의해서 발색반응이 방해받을 수 있다는 문제점을 갖고 있다. 또한 수반되는 광도측정법은 분석 시료의 저농도와 고농도에서 정확성 및 정밀도가 저하되는 원리적 한계를 가지고 있어, 상기 비색방법은 정확한 수치 측정에는 부적합하다고 알려져 있다.

상기 비색방법에 의한 문제점을 해결하기 위하여 높은 선택성과 감도를 가지며 시료가 혼탁하더라도 시료를 별도 전처리 없이 사용 가능하며 단시간 내에 정확한 측정이 가능한 전기화학적 원리에 기초한 전기화학적 바이오센서가 도입되었다. 전기화학적 바이오센서의 전기화학적 원리를 하기 반응식 2를 참고하여 설명하도록 한다. 전기화학적 바이오센서는 전자전달매개체로서 페로센(ferrocene), 페로센 유도체, 퀴논(quinones), 퀴논 유도체, 유기 전도성 염(organic conducting salt), 또는 비오로젠(viologen) 등을 사용하며, 전자전달매개체로 산소를 이용하는 종래의 비색 방법에 의한 바이오센서와 대비된다.

반응식 2



상기 반응식 2에서, GOx는 글루코오스 산화효소를 나타내고, GO_x-FAD 및 GO_x-FADH₂는 각각 글루코오스 산화효소의 활성부위인 FAD(flavin adeninedi nucleotide)의 산화상태 및 환원상태를 나타낸다. 글루코오스 산화효소의 촉매작용에 의해서 글루코오스는 글루코산으로 산화된다. 이때 글루코오스 산화효소의 활성 부위인 FAD가 환원되어 FADH₂로 된다. 환원된 FADH₂는 전자전달매개체와의 산화환원반응을 하여 FADH₂는 FAD로 산화되고, 전자전달매개체는 환원된다. 환원상태의 전자전달매개체는 전극표면까지 확산되는데, 이때 전극표면에서 환원상태의 전자전달매개체의 산화전위를 인가하여 생성되는 전류를 측정하여 혈중 글루코오스의 농도를 측정하게 된다.

따라서, 전기화학적 바이오센서는 종래의 비색 방법에 의한 바이오센서와는 달리 산소에 의한 영향을 줄일 수 있고, 시료가 혼탁하더라도 시료를 별도 전처리 없이 사용 가능하다는 장점을 갖는다.

상기 전기화학적 바이오센서는 전자전달매개체 및 산화효소가 고착된작업전극, 보조전극 및/또는 기준전극이 형성된 기판 및 시료도입부가 구비된 기판을 포함하며, 이들은 크게 작업전극, 보조전극 또는 기준전극이 같은 기판 위에 형성된 평면형 바이오센서, 또는 보조전극을 상부기판에 형성하여 작업전극과 마주보도록 제작한 대면형 바이오센서, 또는 상기 평면형 및 대면형이 차등식으로 신호를 처리하도록 구형한 차등식 바이오센서로 분류된다.

종래 시료도입부의 예로는 크게 i자형 및 -자형 구조로 분류할 수 있다.

i자형 구조의 시료도입부는, 모세관을 형성하기 위하여, 일직선의 시료 도입 통로 끝 부분에 구멍이 뚫린 구조를 갖는다. 그러나 이러한 i자형 구조의 시료도입부는 시료 도입 통로를 통하여 주입된 시료의 점도에 따라 종종 통로 끝 부분에 있는 원형의 구멍을 완전히 채우지 못하거나 넘치는 현상이 자주 발생하여 주입되는 시료의 양이 변화될 수 있다는 단점을 갖는다.

-자형 구조의 시료도입부는 센서의 옆측면에서 다른 옆측면까지 일직선의 통로를 형성한 구조를 갖는다. 이러한 -자형 구조의 시료도입부는 옆측면에서 시료의 도입이 이루어져 시료 도입이 불편하다는 단점을 갖는다.

따라서, 본 발명의 첫번째 관점은 혈액시료를 전처리 과정 없이 편리하고 빠르게, 그리고 일정하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서를 제공하는 것이다.

한편, 페로센(ferrocene), 페로센 유도체, 퀴논(quinones), 퀴논 유도체, 유기 전도성 염(organic conducting salt), 또는 비오로젠(viologen) 등을 전자전달매개체로 이용하는 종래의 전기화학적 바이오센서는 혈액내 방해물질인 아스코르브산, 아세트아미노펜 및 요소산의 산화전위(약 0.3V)와 비슷한 전위(통상 0.5V의 전위를 사용)에서 산화되므로, 혈액 내 방해물질에 의한 영향을 완전히 제거하지는 못한다는 단점을 갖고 있다. 또한, 전술한 전자전달매개체의 대부분은 혈액내의 전극활성 물질과 반응한다는 단점이 있다.

따라서, 본 발명의 두번째 관점은 상기한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 바이오센서를 제공하는 것이며, 이것은 형식전위(formal potential)가 낮은(통상, -0.2 ~ 0.2V의 형식 전위를 갖는) 전자전달매개체를 작업 전극에 고정함으로써 해결될 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 혈액시료를 전처리 과정 없이 빠르고 일정하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 아스코르브산, 아세토아미노펜 및 요산 등과 같은 혈액내 방해물질 그리고 혈액내의 전극 활성 물질의 영향을 최소화한 바이오센서를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 혈액시료를 전처리 과정 없이 빠르고 일정하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서에 관한 것이다. 본 명세서에서, "교차 형성되어 있다"라 함은 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 일직선으로 배열되어 있는 것이 아니라 한점에서 만나는 구조로 되어 있음을 의미한다.

도 1은 시료도입부의 바람직한 일 예를 도시한 것으로서, 기관(200) 내부에 형성된 상기 시료도입부(100)는 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 T자형(수직)으로 교차 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 돌출부(103)가 형성된 구조를 갖고 있으며, 이들은 다른 상부기관(또는 커버)(300)에 의해서 외부로의 노출이 차단된 구조를 갖는다.

본 명세서에서 "시료도입 통로부(101)"라 함은 시료와 접촉하여 센서 내부로 시료를 도입하기 위한 통로를 말하며, "통기부(102)"라 함은 공기가 통과할 수 있는 통로를 말하며, 시료가 시료도입 통로부로 유입될 때, 시료도입부 내에 존재하는 공기는 통기부를 통해 배출된다. 이러한 통기부(102)는 모세관 현상에 의한 시료 도입을 가능케 한다.

한편, 상기한 돌출부(103)는 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에서 약간의 여유 공간을 제공함으로써 시료도입 통로부(101)가 끼어지는 구석부위(또는 교차점 부위)에서 발생할 수 있는 에어포켓 현상을 최소화하는 역할을 수행한다. 시료도입 통로부(101)가 끼어지는 구석부위(또는 교차점 부위)는 전극과 접촉하는 부분으로서, 이곳에 에어포켓 현상이 발생하면 정확한 측정이 불가능한 문제점을 안게된다.

상기 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)의 너비의 비는 시료의 빠른 도입을 가능케하기 위해 1/2 이하, 바람직하게는 1/5 ~ 1/2, 가장 바람직하게는 1/5 ~ 1/2의 범위인 것이 바람직하다. 1/2 이하로 조정함으로써, 시료의 양을 감소시킬 수 있을 뿐 아니라, 시료가 빠른 속도로 통기부로 이동함으로써 시료의 빠른 도입을 가능하게 한다. 상기 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 이루는 각도(ϕ)는 도 1에 도시한 바와 같이 90°를 이루는 것이 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 45 ~ 135°, 바람직하게는 60 ~ 120°, 가장 바람직하게는 75 ~ 105°의 범위 내에서 적절히 조절될 수 있다.

시료도입 통로부(101)의 전체부피는 0.1 ~ 3.0 μl , 바람직하게는 0.1 ~ 1.0 μl , 가장 바람직하게는 0.3 ~ 0.7 μl 의 범위 내에서 조절되는 것이다. 0.1 μl 미만일 경우, 시료의 도입량이 너무 소량이라서 센서의 오차범위에 의해 영향을 받아 정확한 측정을 담보할 수 없는 문제점이 있으며, 3.0 μl 를 초과할 경우에는 과도한 혈액 채취로 인한 문제점이 있다. 본 발명의 구체적인 예에 따르면, 0.54 μl 의 시료량을 사용하여도 정확한 측정이 가능하였다.

돌출부(102)의 형성 태양은, 도 1에 도시한 바와 같이, 시료도입 통로부의 연장선상에 형성될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 시료도입 통로부(101) 및 통기부(102)와 동일한 각도를 이루며 형성될 수도 있다.

상기한 구조의 시료도입부(100)의 작용 원리를 설명하면 다음과 같다. 먼저 시료도입 통로부(101)의 말단 부분을 시료와 접촉시키면, 모세관 현상에 의해 시료가 시료도입 통로부(101)로 도입된다. 시료도입 통로부(101)를 모두 채운 시료는 돌출부(103)로 공급되고, 다시 통기부(102)로 공급된다. 여기서, 시료도입 통로부(101)의 너비에 비해 통기부(102)의 너비가 1/2 이하로 조정됨으로써 빠른 시료도입이 가능해진다. 또한 돌출부를 추가로 설치함으로써 시료도입 통로부와 통기부가 교차하는 부위에서의 에어포켓 현상을 방지할 수 있게 된다. 본 발명의 구체예에 따르면, 시료도입부의 전체 부피가 약 0.54 μl 일 때, 시료의 충만에 걸리는 시간은, 시료의 점도, 혈액내에 존재하는 적혈구의 농도 등에 의해 차이가 있을 수 있으나, 약 0.5 초 내에 시료도입부가 혈액으로 충만하였다.

상기한 구조의 시료도입부(100)를 구비한 기관(200)은 폴리에스테르, 폴리비닐클로라이드(polyvinyl chloride) 및 폴리 카보네이트(polycarbonate) 등의 유기 고분자 재료에 프레스를 이용한 성형을 통해 형성할 수 있으며, 바람직하게는 상기 유기 고분자 재료로 만들어진 양면 테이프에 프레스 금형을 이용하여 형성할 수 있다.

상기한 구조를 갖는 시료 도입부는 다양한 형태의 바이오센서에 도입될 수 있다. 그 예로는 작업전극, 보조전극 또는 기준전극이 같은 기관 위에 형성된 평면형 바이오센서, 또는 보조전극을 상부기관에 형성하여 작업전극과 마주보도록 제작한 대면형 바이오센서, 또는 상기 평면형 및 대면형이 차등식으로 신호를 처리하도록 구현한 차등식 바이오센서를 들 수 있다.

도 2는 상기한 구조의 시료도입부가 구비된 평면형 바이오센서의 바람직한 일 예를 도시한 분해사시도로서, 상기 평면형 바이오센서는 전자전달 매개체 및 산화효소가 고착된 작동전극(104) 및 보조전극(105)이 형성된 하부기관(400); 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 T자형으로 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 돌출부(103)가 형성된 구조를 갖는 시료도입부(100)가 구비된 중간기관(200); 및 상기 시료도입부가 외부로 노출되는 것을 방지하기 위한 상부기관(또는 커버)(300)이 순차 적층된 구조를 갖는다. 여기서, 시료 도입부(100)의 구조는 상기에 언급한 바와 같이, T자형 구조에 한정되는 것이 아니며, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 교차 형성되면 족하다. 돌출부(103)의 구조 또한 상기에 언급한 바와 같이 변화될 수 있다.

상기한 평면형 바이오 센서를 제조하는 방법을 기술하면 다음과 같다. 먼저 하부 기관(400)의 상부에 탄소 또는 금속 도체 재질을 스트립의 길이 방향으로 대칭형의 전극(작동전극(104) 및 보조전극(105))을 인쇄 또는 증착한다. 이와 같이 구성된 하부기관(400) 위에, 상기한 구조의 시료도입부(100)를 구비한 중간기관(200)을 수백 마이크로미터 정도의 높이로 전극의 전기적 연결부위를 제외한 모두 부분에 접촉시킨다. 상기 중간기관(200)의 재질은 절연성

을 갖는 물질이면 특별히 제한되지 아니하나, 가공성 및 성형성 등을 고려할 때 절연성 고분자가 바람직하다. 또한 하부기관(400)과 상부기관(300)의 접촉은 접촉제 또는 양면 테이프를 이용하여 용이하게 성취될 수 있다. 그 후, 노출된 전극 위해 전자전달매개체 및 산화효소를 분산(dispensing)시켜 고착시키고, 중간기관(200) 위에 상부기관(또는 커버)(300)을 접촉제 또는 양면 테이프 등을 이용하여 중간기관(200)의 상부에 압착 조립함으로써 평면형 바이오센서를 제작할 수 있다.

도 3은 상기한 구조의 시료도입부가 구비된 대면형 바이오센서의 바람직한 일 예를 도시한 분해사시도로서, 상기 대면형 바이오센서는 전자전달 매개체 및 산화효소가 코팅된 작동전극(104) 및 전극연결부(106)가 형성된 하부기관(400); 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 Γ 자형으로 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 돌출부(103)가 형성된 구조를 갖는 시료도입부(100)가 구비된 중간기관(200); 및 기준전극 겸 보조전극(105) 및 전극연결부(106)가 아래에 형성된 상부기관(300)을 순차 적층한 구조를 갖는다. 다만, 여기서, 시료도입부(100)의 구조는 상기에 언급한 바와 같이, Γ 자형 구조에 한정되는 것이 아니며, 상기에 언급한 바와 같이, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 교차 형성되면 족하고, 돌출부(103)의 구조 또한 상기에 언급한 바와 같이 변화될 수 있다.

상기한 대면형 바이오센서의 제조방법은 평면형 전극과 동일한 방법으로 제조할 수 있으며, 그 제조는 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

도 4는 상기한 구조의 시료도입부가 구비된 차등식 평면형 바이오센서의 바람직한 일 예를 도시한 분해사시도로서, 상기 차등식 평면형 바이오센서는 양면에 작동전극(104) 및 보조전극 겸 기준전극(105)이 형성된 제1 중간기관(200'); 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 Γ 자형으로 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 돌출부(103)가 형성된 구조를 갖는 시료도입부(100)가 구비된 제2 중간기관(200)이 제1 중간기관(200')의 양면에 적층되고, 상기 시료도입부가 외부로 노출되는 것을 방지하기 위한 2 개의 상부기관(또는 커버)(300)이 제2 중간기관(200)에 각각 적층된 구조를 갖는다. 다만, 여기서, 시료도입부(100)의 구조는 상기에 언급한 바와 같이, Γ 자형 구조에 한정되는 것이 아니며, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 교차 형성되면 족하고, 돌출부(103)의 구조 또한 상기에 언급한 바와 같이 변화될 수 있다.

도 5는 상기한 구조의 시료도입부가 구비된 차등식 대면형 바이오센서의 바람직한 일 예를 도시한 분해사시도로서, 상기 차등식 대면형 바이오센서는 양면에 작동전극(104) 및 전극연결부(106)가 형성된 제1 중간기관(200'); 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 Γ 자형으로 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 돌출부(103)가 형성된 구조를 갖는 시료도입부(100)가 구비된 제2 중간기관(200)이 상기 제1 중간기관(200')의 양면에 적층되고, 기준전극 겸 보조전극(105) 및 전극연결부(106)가 형성된 2개의 상부기관(또는 커버)(300)이 제2 중간기관(200)에 각각 적층된 구조를 갖는다. 다만, 여기서, 시료도입부(100)의 구조는 상기에 언급한 바와 같이, Γ 자형 구조에 한정되는 것이 아니며, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 교차 형성되면 족하고, 돌출부(103)의 구조 또한 상기에 언급한 바와 같이 변화될 수 있다.

바이오센서의 하부 기관 및 상부기관의 재질은 세라믹, 유리판 또는 고분자 재료를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 폴리에스테르, 폴리비닐클로라이드(polyvinyl chloride) 및 폴리카보네이트(polycarbonate) 등의 유기 고분자 재료를 사용할 수 있다.

상기 기준전극, 작동전극 및 보조전극의 재료는 도전성 물질이면 특별히 제한되지 아니한다. 도전성 물질의 예로는 은, 에폭시, 팔라듐, 구리, 금, 백금, 이리듐, 은/염화은, 탄소 및 특정한 산화-환원쌍 또는 기타 첨가제가 보강된 변형된 탄소 등을 들 수 있다. 상기 기준, 보조 및 작동전극은 도전성 물질을 기관상에 스크린프린팅, 물리적 증기착상 또는 에칭하거나, 도체 테이프의 부착 등에 의해 형성될 수 있다.

상기한 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 전기화학적 바이오센서는 (1) 혈액시료를 모세관 현상으로 빠르게 빨아들일 때 교차점 부위에 돌출부를 만들어 약간의 여유 공간을 둠으로써 시료도입 통로부가 꺾어지는 구석부위에서 발생할 수 있는 에어포켓 현상을 최소화 할 수 있으며, (2) 전체 시료 통로의 윗부분이 상부 기관(또는 커버)으로 덮여 있음으로 인해 센서를 측정하는 기구물에 장착하거나 탈착할 때 도입된 시료가 누출되어 손에 묻는 일이 줄어들어 위생적이며, 측정시간 동안 시료 증발에 의한 농도의 변화를 최소화 할 수 있다. 그리고 (3) 상기 구조의 시료도입부의 또 다른 장점은 모세관을 형성하기 위하여 일직선의 시료 도입 통로 끝 부분에 구멍이 뚫린 상부기관을 사용하여 제작한 i 자형 구조의 시료도입부를 사용하는 방법에 비하여 주입되는 시료의 양이 정확하다. 그 이유는 i 자형 구조의 시료도입 통로를 통하여 주입된 시료는 점도에 따라 종종 통로 끝 부분에 있는 원형의 구멍을 완전히 채우지 못하거나 넘치는 현상이 자주 발생한다. 반면 본 발명에서 제시하는 형태의 시료도입부에서는 시료가 다 차거나 못차는 현상이 거의 발생하지 않으며, 재현성 및 신뢰성을 모두 갖춘 시료의 도입이 가능하다. 마지막으로 (4) 본 발명에서 제시하는 형태의 시료도입부(1)는 센서의 끝 부분에서 시료를 도입할 수 있도록 고안된 것이어서, 센서의 측면에서 시료를 주입하도록 만든 Γ 자형 통로에 비하여 시료를 도입하기에 훨씬 편리하다는 장점을 갖는다.

작동 전극에 고정되는 전자전달매개체의 예로는 종래에 널리 사용되어 온 페로센(ferrocene), 페로센 유도체, 퀴논(quinones), 퀴논 유도체, 유기 전도성 염(organic conducting salt), 또는 비올로겐(viologen)을 배제하는 것은 아니나, 바람직하게는 헥사아민루세늄(III)클로라이드(hexaammineruthenium(III)chloride), 포타슘페리시아나이드(potassium ferricyanide), 포타슘페로시아나이드(potassium ferrocyanide), 디메틸페로센(dimethylferrocene (DMF)), 페리시니움(ferricinium), 페로센노카르복실산(ferrocene monocarboxylic acid (FCOOH)), 7,7,8,8-테트라시아노퀴노디메탄(7,7,8,8-tetracyanoquinone- dimethane (TCNQ)), 테트라티아풀발렌 (tetrathiafulvalene(TTF)), 니켈로센(nickelocene(Nc)), N-메틸아시디니움(N-methyl acidinium(NMA+)), 테트라티아테트라센(tetrathiatetracene(TTT)), N-메틸페나지니움(N-methylphenazinium (NMP+)), 히드로퀴논(hydroquinone), 3-디메틸아미노벤조산(3-dimethylaminobenzoic acid(MBTHDMAB)), 3-메틸-2-벤조티오조리논히드라존 (3-methyl-2-benzothiozolinone hydrazone), 2-메톡시-4-아릴페놀(2-methoxy-4-allylphenol), 4-아미노안티피린(4-aminoantipyrin(AAP)), 디메틸아닐린(dimethylaniline), 4-아미노안티피린(4-aminoantipyrine), 4-메톡시나프톨(4-methoxynaphthol), 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)), 2,2-아지노-디-[3-에틸-벤즈티아졸린 술포네이트] (2,2-azino- di-[3-ethyl-

benzthiazoline sulfonate], o-디아니지딘(o-dianisidine), o-톨루이딘(o-toluidine), 2,4-디클로로페놀(2,4-dichlorophenol), 4-아미노페나논(4-amino phenazone), 벤지딘(benzidine), 프루시안 블루(prussian blue) 등의 혼합 전자가 화합물을 들 수 있다. 가장 바람직하게는 헥사아민루세늄(III)클로라이드이다. 후자의 경우, (1) 수용액 속에서 산화-환원상태가 안정하며 가역적이고, (2) 환원된 전자전달매개체는 산소와 반응하지 않으며, (3) 전자전달 매개체의 형성전위가 충분히 낮아(약 -0.2 ~ 0.2V 이하), 혈액 내의 방해물질에 의한 영향을 최소화할 수 있으며, (4) 환원된 전자전달매개체의 산화가 pH에 민감하지 않고, (5) 전기화학적 방해물질인 아스코르브산, 아세토아민노펜 및 요산과 반응하지 않는다는 특성을 갖는다.

본 발명은 혈당 측정 바이오센서를 실시예로 설명하지만, 글루코오스의 적용과 동일하게 특정효소를 도입함으로써 다양한 대물질, 예를들면 콜레스테롤(cholesterol), 락테이트(lactate), 크레아티닌(creatinine), 단백질, 과산화수소, 알코올, 아미노산, 효소, 예를 들면 GPT(glutamate pyruvate transaminase), GOT(glutamate oxaloacetate transaminase) 등의 생체시료와 환경시료, 농·공업시료 또는 식품시료중의 다양한 유기물 또는 무기물 농도도 또한 동일한 방법으로 정량할 수 있다. 따라서, 본 발명은 작동전극에 코팅되는 효소의 종류를 달리함으로써 다양한 대물질의 정량에 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 콜레스테롤 산화효소, 락테이트 산화효소, 글루타메이트 산화효소, 과산화수소 산화효소 및 알코올 산화효소 등을 사용하여 콜레스테롤, 락테이트, 글루타메이트, 과산화수소 및 알코올의 정량을 수행할 수 있다.

이하 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 평면형 바이오센서의 제작

폴리에스터 하부기관 상에 도전성 탄소반죽(conducting carbon paste)을 거울상 대칭형으로 스크린프린팅하여, 두 개의 전극(작동전극 및 보조전극(또는 기준전극))을 형성하였다. 두 전극 사이의 간격은 0.125 mm로 하였다. 그 후, 140℃에서 5분간 열처리를 하였다.

폴리에스터 재질의 양면 테이프에 프레스 금형하여, 시료도입 통로구, 통기구 및 돌출부를 갖는 시료도입구를 형성시켰다. 시료도입 통로구와 통기구는 T자 형태를 이루도록 하였으며, 그 비는 1/2로 조정하였다. 돌출부는 시료도입 통로구의 연장선상에서 형성되도록 하였다. 또한 시료도입부의 전체부피, 즉 시료도입 통로부, 통기부 및 돌출부의 총 부피는 0.54 μl 가 되도록 하였다.

중간기관으로 작용하는, 상기한 구조의 시료도입구를 구비하는 폴리에스터 재질의 양면 테이프를 상기 폴리에스터 하부기관의 사이에 넣고 압착하여 대면형 바이오센서용 전지의 골격을 형성시켰다. 그 후, 노출된 시료통로 부위의 전극들 위에 용액의 총부피를 1 ml로 할 때 헥사아민루세늄(III) 클로라이드 0.015 mg, 분산제(Carboxymethylcellulose: CMC) 0.015 mg, 계면활성제(상품명: Triton X-100) 0.01 mg 및 글루코오스 산화효소 40 mg이 혼합된 수용액을 떨어뜨린 후 45℃에서 30분간 건조시켜 평면형 바이오센서용 전극을 형성시켰다.

효소 혼합물이 건조된 후 중간기관의 윗면을 상부기관으로 압착하여 도 2에 도시한 평면형 바이오센서를 제작하였다.

<실시예 2> 대면형 바이오센서의 제작

도 3에서와 같은 형태의 작동전극과 전기연결부를 탄소반죽으로 스크린프린팅한 후 140℃에서 5분간 열처리한다. 그 후 전기연결부의 끝 부분에 은반죽을 중간기관 전극의 두께가 되도록 스크린프린팅하여 회로연결부를 완성한다. 상부기관 전극은 탄소반죽으로 기준전극 겸 보조전극을 스크린프린팅하여 하부기관 전극 제작시와 마찬가지로 조건에서 열처리한다. 기준전극 겸 보조전극의 끝 부분은 은반죽으로 회로연결부를 형성하여 대면형 바이오센서의 상부기관 전극을 제작하였다.

폴리에스터 재질의 양면 테이프에 도 3에 도시된 모양의 시료 도입 통로부, 통기부 및 돌출부를 포함하는 중간기관을 프레스 금형으로 제작하였다. 시료 도입 통로부와 통기부의 너비 비는 4:1가 되도록 조절하였다. 이렇게 형성된 시료도입부의 전체 부피는 0.54 μl 가 되도록 제작되었다.

바이오센서를 완성하기 위하여 전극이 인쇄된 하부기관 위에 중간기관을 압착하여 조립하였다. 다음 노출된 시료통로 부위의 전극들 위에 용액의 총부피를 1 ml로 할 때 헥사아민루세늄(III) 클로라이드 0.015 mg, 분산제(Carboxymethylcellulose: CMC) 0.015 mg, 계면활성제(상품명: Triton X-100) 0.01 mg 및 글루코오스 산화효소 40 mg이 혼합된 수용액을 떨어뜨린 후 45℃에서 30분간 건조시켰다.

효소 혼합물이 건조된 후 중간기관의 윗면을 상부기관 전극으로 회로연결부가 잘 연결되도록 압착하여 대면형 바이오센서를 제작하였다.

<실시예 3> 차등식 평면형 글루코오스 센서 제작

실시예 1에서와 동일한 방법으로 포타슘 페리시아나이드 및 글루코오스 산화효소가 혼합된 용액이 작동전극 위에 고정된 평면형 글루코오스 센서를 제작한 후, 도 4에 도시된 바와 같이, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 하부기관 배면에 포타슘 페리시아나이드와 글루코오스 산화효소 대신 소량의 소혈청단백질(bovin serum albumin: BSA)을 차등작동전극에 고정한 후 상부기관을 압착하여 차등식 평면형 글루코오스 센서를 완성하였다.

<실시예 4> 차등식 대면형 글루코오스 센서 제작

실시에 2에서와 동일한 방법으로 포타슘 페리시아나이드 및 글루코오스 산화효소가 혼합된 용액이 작동 전극 위에 고정된 대면형 글루코오스 센서를 제작한 후, 도 5에 도시된 바와 같이, 실시예 2에서와 동일한 방법으로 하부기판 배면에 포타슘 페리시아나이드와 글루코오스 산화효소 대신 소량의 소혈청단백질(bovin serum albumin: BSA)이 고정된 후 상부기판 전극을 압착하여 차동작동전극이 구비된 차등식 대면형 글루코오스 센서를 완성하였다.

이하 본 발명에 의한 바이오센서의 특성을 실험하였다.

<실험예 1> 대면형 글루코오스 센서에서의 방해물질에 의한 영향 검증

도 6는 실시예 2에 의해 제작된 대면형 글루코오스 센서에서의 글루코오스, 아스코르브산, 아세트아민노펜, 요산과 같은 방해물질 및 완충용액에 대한 영향을 측정된 결과이다. 도 5에서 볼 수 있듯이, 글루코오스 180 mg/dL를 PBS 완충용액(PBS Buffer pH 7.4)에 녹인 용액에 대한 측정결과(a 직선)와 방해 물질에 대한 영향을 알아보기 위해 각각 글루코오스 180 mg/dL에 아스코르브산 570 μM(b 직선), 아세트아민노펜 660 μM(c 직선), 요산 916 μM(d 직선)을 포함하는 용액에 대한 측정결과에 큰 차이가 없다. 이 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 기준전극(Ag/AgCl) 대비 인가전위 0.2 V에서는 전기화학적 바이오센서에 대한 방해물질들의 작용이 미미함을 알 수 있다.

<실험예 2> 대면형 글루코오스 센서의 글루코오스 표준용액에 대한 검증

실시에 2에 의해 제작된 대면형 글루코오스 센서를 이용하여 글루코오스 표준용액에 대한 검정테스트를 수행하였고, 결과를 도 7에 도시하였다. 각각의 글루코오스 농도가 0, 50, 150, 300, 450 및 600 mg/dL인 표준용액에서 각 농도 당 10회씩 기준전극 대비 인가전위 0.2 V에서 전류값을 측정하였다. 센서도입부에 적용된 시료의 양은 0.54 μl이며, 시료가 도입부를 채우는데 걸리는 시간은 약 1/5 초 이내이다. 측정은 시료가 시료도입부를 채운 후 2초의 반응시간을 주고, 다음 0.2 V의 전압을 3초간 가하여 5초에서의 전류 값을 읽는다. 도 8는 정압전류법 측정의 동적 감응 곡선이다. 각각의 곡선들은 글루코오스 0 mg/dL(a 곡선), 50 mg/dL(b 곡선), 150 mg/dL(c 곡선), 300 mg/dL(d 곡선), 450 mg/dL(e 곡선) 및 600 mg/dL(f 곡선)을 나타낸 것이다. 이와 같이 본 발명에서 제안한 센서는 빠른 시간에 정전류(steady state current)에 도달하여 측정에 대한 결과가 신속하고 정확할 수 있음을 보여주는 것이다.

본 발명의 바이오센서에서 얻을 수 있는 감응 기울기는 0.093[μA/(mg/dL)]이고, 선형성은 0.997으로 탁월한 직선성 감응을 보여주었다.

<실험예 3> i형과 一형의 비교

실시에 2에서 제작된 본 발명의 대면형 바이오 센서와, 현재 상용화되어 있는 i형 센서(KDK사 제품, 일본) 및 一형 센서(Therasense사 제품, 미국)를 취하고 있으며, 적은 양의 시료를 필요로 하는 一형 센서(Therasense사 제품, 미국)를 실시예 2에 의해 제작된 대면형 글루코오스 센서와 비교하였다.

표 1은 시료 주입량 비교에 대한 것이다. 시료는 혈액을 사용하였다.

결과에서 보듯 i형 一형에 비해 비교적 정확한 양의 시료 주입을 확인하였다.

표 1.

	i형 센서	一형 센서	본 발명의 대면형 센서
주입량의 평균(μl)	2.92	0.32	0.53
주입량의 표준편차	0.40	0.20	0.10
변동계수(%)	17.2	37.6	13.9

(n=10)

상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 대면형 센서는 소량의 혈액시료를 도입하더라도 정확한 측정을 담보할 수 있으며, 또한 시료도입의 표준편차가 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다.

더 나아가, 본 발명의 대면형 바이오센서와, i형 센서 및 一형 센서를 이용하여 시료가 주입된 후 측정을 시작하는데, 소요되는 시간(이하 "작동시간")을 10 회 반복 테스트하였으며, 이때, 시료로는 혈액을 이용하였고, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2.

	i형 센서	一형 센서	본 발명의 대면형 센서
평균(sec)	1.7	3.6	0.6

(n=10)

상기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 대면형 센서는 i형이나 一형에 비해 평균작동시간이 현저히 짧은 것을 알 수 있었다. 이는 다른 혈당센서에 표시되어 있는 측정시간이 작동시간을 배제하고 표기되어 있는 것과는 달리 측정시간과 작동시간을 더한 실제측정시간 간의 차이가 거의 없음을 의미한다. 따라서, 본 발명의 센서는 짧은 시간

내에 측정할 수 있음으로 해서 사용자의 편의를 최대한 보장할 수 있으며, 측정 도중 환자의 움직임에 의해 발생할 수 있는 측정의 오차를 최대한 배제할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부를 구비하고, 빠르고 정확한 시료 주입을 위한 바이오센서에 관한 것으로서, 이러한 시료도입부는 평면형, 대면형 및 차등식으로 구현될 수 있다. 본 발명에 의한 바이오센서는 구조가 단순하고 제조가 용이하며, 0.5 ~ 1.0 μl 의 소량 시료를 전처리 과정이 필요 없이 일정하게 도입할 수 있으며, 전극간의 재현성이 뛰어나며, 측정시간이 5 초 이내로 대단히 빠르고, 저렴하게 대량 생산 할 수 있는 장점이 있을 뿐 아니라, 가정이나 병원에서 환자 스스로가 혈중 글루코오스 양을 혈액내의 방해물질에 영향을 받지 않고 정확하게 측정할 수 있는 매우 유용한 바이오센서이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서.

청구항 2.
삭제

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입 통로부와 통기부의 너비의 비는 1/5 ~ 1/2인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입부의 전체부피가 0.1 ~ 3.0 μl 인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입부의 전체부피가 0.1 ~ 1.0 μl 인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입부의 전체부피가 0.3 ~ 0.7 μl 인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입 통로부와 통기부가 이루는 각도(ϕ)가 45 ~ 135°인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입 통로부와 통기부가 이루는 각도(ϕ)가 75 ~ 105°인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 상기 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 이루는 각도(ϕ)가 90°인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서가 전자전달 매개체 및 산화효소가 고착된 작동전극 및 보조전극이 형성된 하부기관; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 중간기관; 및 상기 시료도입부가 외부로 노출되는 것을 방지하기 위한 상부기관(또는 커버)이 순차 적층된 구조를 갖는 평면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 11.

제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서가 전자전달 매개체 및 산화효소가 코팅된 작동전극 및 전극연결부가 형성된 하부기관; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된

구조를 갖는 시료도입부가 구비된 중간기판; 및 기준전극 겸 보조전극 및 전극연결부가 아래에 형성된 상부기판이 순차 적층된 구조를 갖는 대면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서가 양면에 작동전극 및 보조전극 겸 기준전극이 형성된 제 1 중간기판; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 제 2 중간기판이 제 1 중간기판의 양면에 적층되고, 상기 시료도입부가 외부로 노출되는 것을 방지하기 위한 2개의 상부기판(또는 커버)이 제 2 중간기판에 각각 적층된 구조를 갖는 차등식 평면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 13.

제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서가 양면에 작동전극 및 전극연결부가 형성된 제 1 중간기판; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 돌출부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 제 2 중간기판이 상기 제 1 중간기판의 양면에 적층되고, 기준전극 겸 보조전극 및 전극연결부가 형성된 2개의 상부기판(또는 커버)이 제 2 중간기판에 각각 적층된 구조를 갖는 차등식 대면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 14.

제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서에 사용되는 전자전달매개체가 헥사아민루세늄(III)클로라이드, 포타슘페리시아나이드, 포타슘페로시아나이드, 디메틸페로센, 페리시니움, 페로센모노카르복실산, 7,7,8,8-테트라시아노퀴노디메탄, 테트라티아푸바렌, 니케로센, N-메틸아시디니움, 테트라티아테트라센, N-메틸페나지니움, 히드로퀴논, 3-디메틸아미노벤조산, 3-메틸-2-벤조티오조리논히드라존, 2-메톡시-4-아릴페놀, 4-아미노안티피린, 디메틸아닐린, 4-아미노안티피렌, 4-메톡시나프톨, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, 2,2-아지노-디-[3-에틸-벤즈티아졸린술포네이트], o-디아지딘, o-톨루이딘, 2,4-디클로로페놀, 4-아미노페나존, 벤지딘, 프루시안 블루의 혼합전자가 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택된 전자전달매개체인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 15.

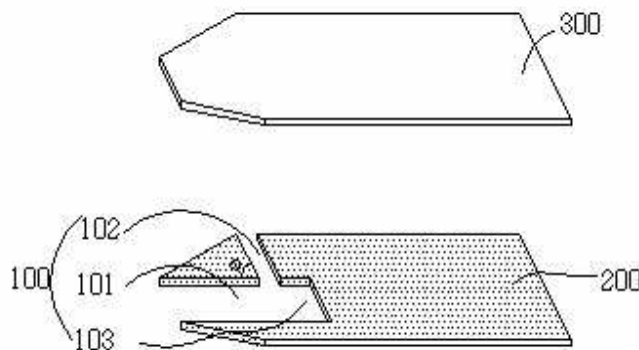
제 14 항에 있어서, 상기 전자전달매개체가 헥사아민루세늄(III)클로라이드인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 16.

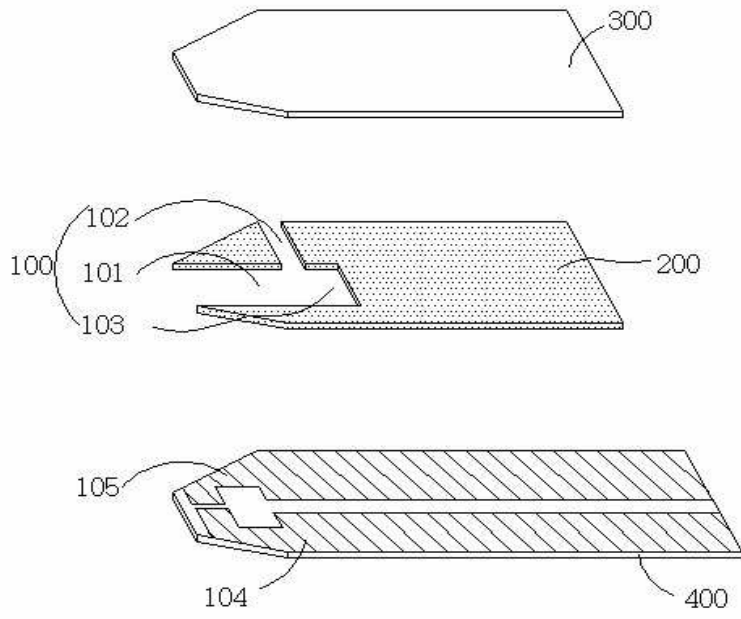
제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서에 사용되는 산화효소가 글루코오스 산화효소, 락테이트 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 글루타메이트 산화효소, 과산화수소 산화효소 및 알코올 산화효소로 구성된 그룹으로부터 선택된 산화효소인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

도면

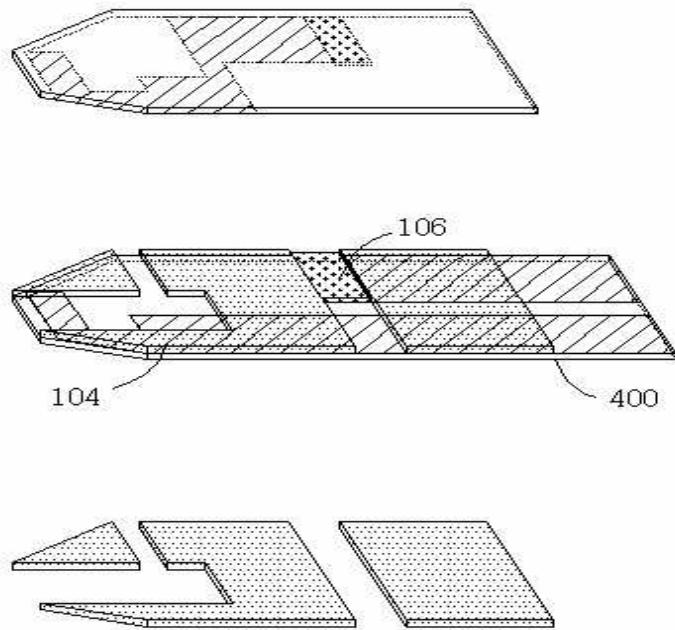
도면1



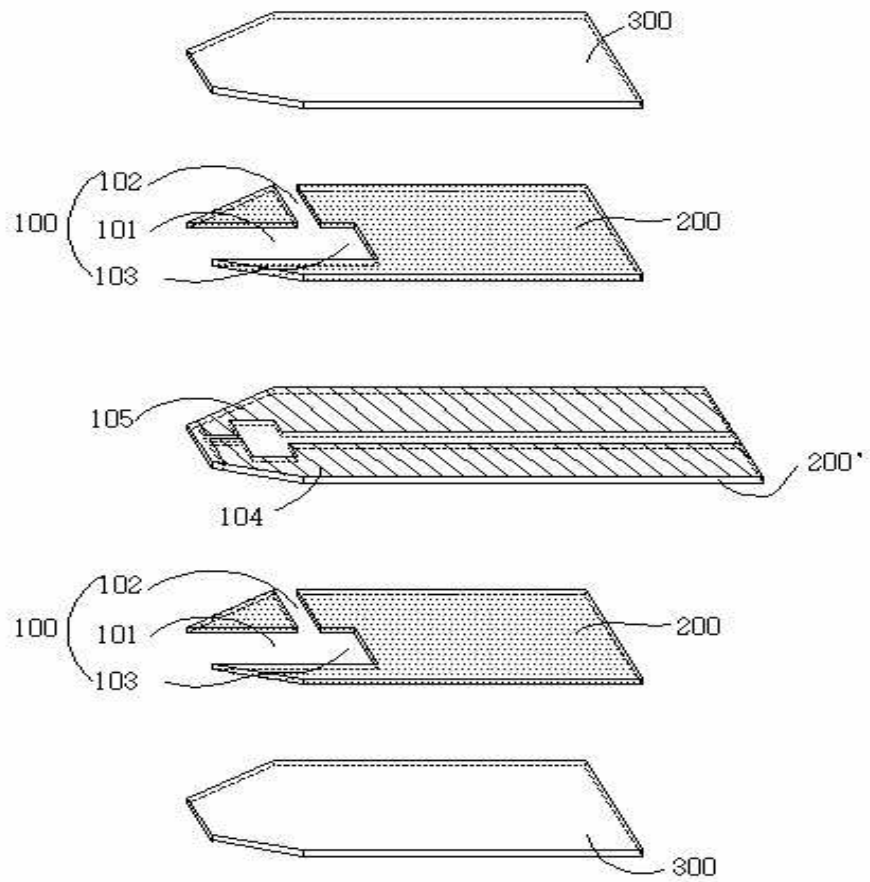
도면2



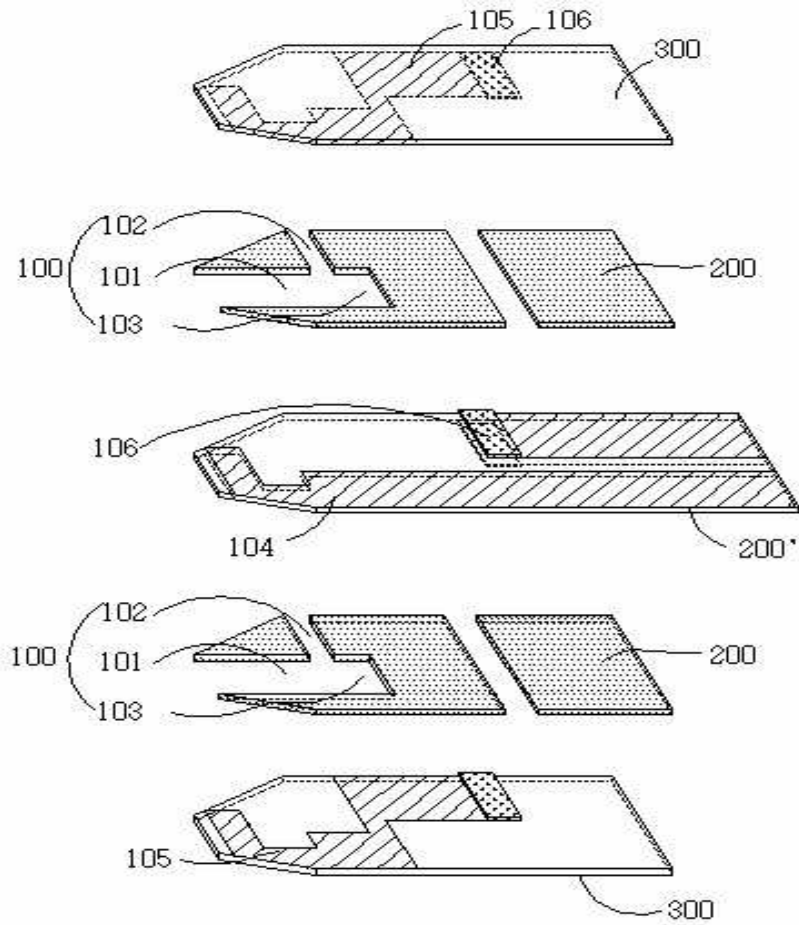
도면3



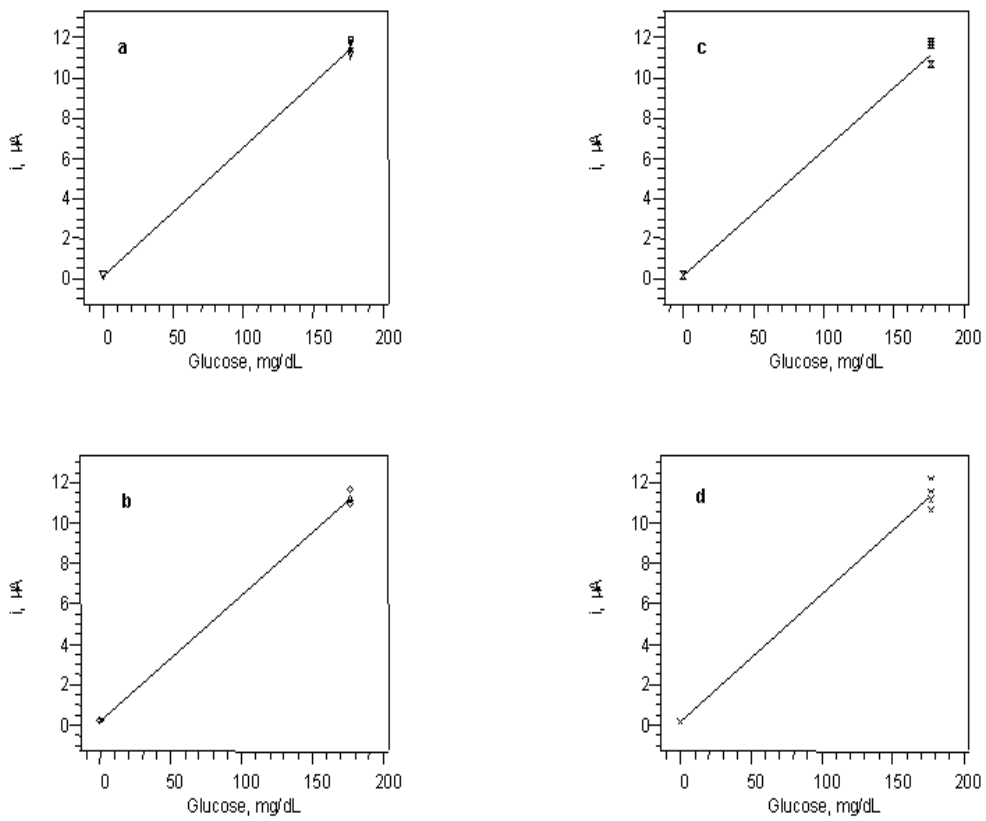
도면4



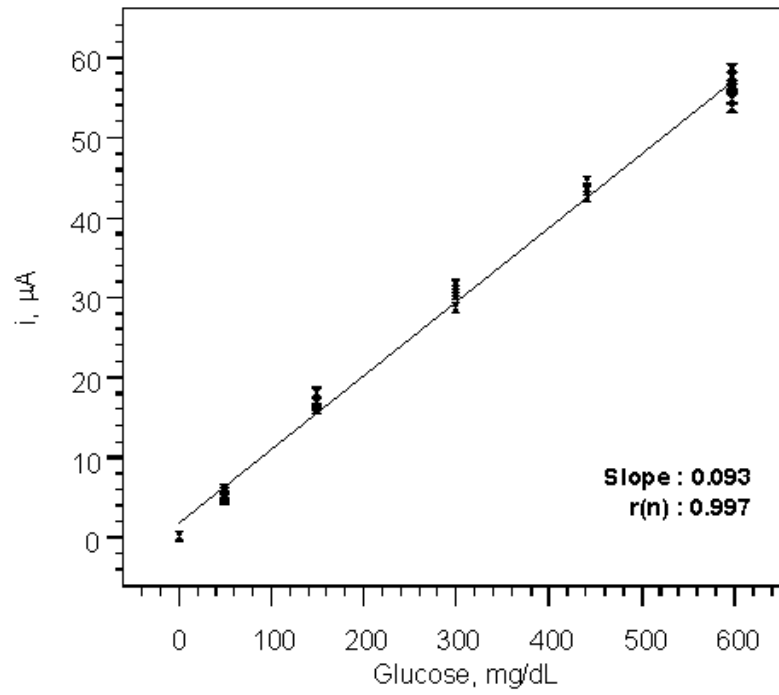
도면5



도면6



도면7



도면8

