



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월23일
(11) 등록번호 10-2268024
(24) 등록일자 2021년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/523 (2013.01)
G01N 33/6827 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0120891
(22) 출원일자 2019년09월30일
심사청구일자 2019년09월30일
(65) 공개번호 10-2021-0038137
(43) 공개일자 2021년04월07일
(56) 선행기술조사문헌
CN103278648 A*
JP3955911 B2*
KR1020130088623 A*
US05187104 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 청도제약
강원도 춘천시 소양강로 32, 202호(후평동, 하이테크벤처타운)
(72) 발명자
김성진
서울특별시 성북구 북악산로5길 12
슬데 아베제 아베바예후
강원도 춘천시 충열로 30, 102동 402호
김현아
강원도 춘천시 동면 삭주로 231, 104동 1307호
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 3 항

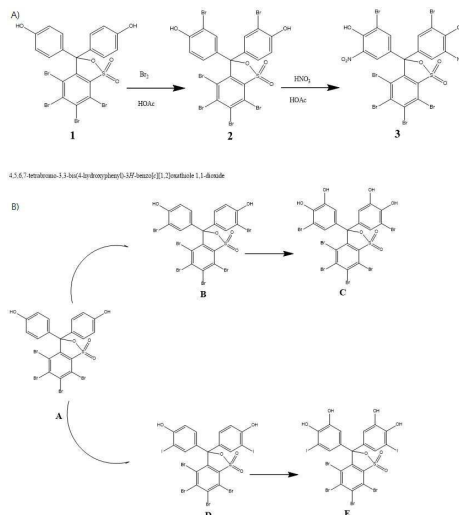
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **높은 민감도를 가진 소변 내 미세알부민 검출 시험 스트립**

(57) 요약

본 발명은 소변 내 미세알부민 검출 시험 스트립에 관한 것으로, 합성 알부민 지시제, 완충액, 계면활성제 및 고분자(증감제)를 함유함으로써 높은 민감도를 가진 소변 내 미세알부민 검출 시험 스트립에 관한 것이다. 본 발명에 의한 알부민 검출 시험 스트립은 합성 알부민 지시제를 통해 무색에서 푸른색으로 색 변화 관찰이 뚜렷한 정확성을 가지고, 20mg/L 이하의 농도까지 미세알부민뇨 검출이 가능하게 검출한계를 향상(높은 민감도)시켰다. 또한, 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립은 합성 알부민 지시제에 계면활성제, 폴리머를 추가함으로써 1,2차 공정이 단일 공정으로 통합되어 저렴한 가격과 공정 편의성이 향상되며, 용해도와 혼합성을 증가시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

에탄올 100 중량부를 기준으로, 시트르산(citric acid) 20~40 중량부를 서서히 혼합하고, 시트르산삼나트륨(trisodium citrate) 10~30 중량부를 혼합하여 완충액을 제조하는 단계 (a);

상기 단계 (a)의 완충액에 계면활성제 0.1~2 중량부, 증감제 4~6 중량부 및 알부민 지시제 2~3 중량부를 혼합하여 함침 용액을 제조하는 단계 (b); 및

상기 단계 (b)의 함침 용액에, 시험지(paper)를 함침시킨 후, 오븐에서 건조하는 단계 (c); 를 포함하며,

상기 계면활성제는, 트리톤 X-100(Triton X-100)이고,

상기 증감제는, 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)이고,

상기 알부민 지시제는, 5',5''-다이니트로-3',3'',3,4,5,6,-헥사브로모페놀설포프탈레인(5', 5''-dinitro-3', 3'', 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfonephthalein)인 것을 특징으로 하는 소변 내 알부민 검출 시험 기재의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 검출 시험 기재는,

종이 또는 부직포 또는 스폰지인 것을 특징으로 하는 소변 내 알부민 검출 시험 기재의 제조방법.

청구항 8

제1항에서 제조한 소변 내 알부민 검출 시험 기재를 절단 후, PVC 시트 지지대 상에 부착하는 것을 특징으로 하는 소변 내 알부민 검출 시험 스트립의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 소변 내 미세알부민 검출 시험 스트립에 관한 것으로, 알부민 지시제, 완충액, 계면활성제 및 고분자(증감제)를 함유함으로써 높은 민감도를 가진 소변 내 미세알부민 검출 시험 스트립에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 알부민(Albumin)은 전체 단백질의 절반 이상을 구성하며 가장 많은 양을 차지하는 혈장 단백질이다. 알부민은 혈관속에서 체액이 머물게 하여 체액의 유출을 막고 빌리루빈, 지방산, 코티솔, 티록신과 같은 다양한 화합물과 셀폰아마이드와 바르비투르산염과 같은 약물을 전달하는 중요한 역할을 한다. 알부민의 부족은 장액과 부종의 비정상적 축적을 나타내며 삼투압 기능 저하로 체액의 운반이 제한된다. 따라서 혈청 알부민 결핍 여부를 검사하는 것은 임상적으로 중요하다.

[0004] 정상적인 인체의 소변 알부민은 일반적으로 20mg/L 이하인데, 소변 내 알부민 범위 20 - 200 mg/L, 크레아티닌 범위 30-300mg/L의 비정상적 배출 비율을 나타낼 경우, '미세 알부민뇨'를 의미하게 된다. 미세 알부민뇨는 내피세포 기능 장애, 심혈관 이환률의 징표로 신장, 순환계 및 중추신경계에 영향을 미치는 여러가지 병리학적 질환을 진단하는데 매우 중요하다. 신장질환의 높은 위험성을 가지고 있는 환자들의 미세 알부민뇨는 고혈압과 당뇨를 나타낸다. 이러한 신장 질환과 손상의 증상은 신부전으로 이어질 수 있다. 또한, 미세 알부민뇨는 일반적으로 당뇨병성 신장 병증 환자들의 전초 증상으로 판단된다.

[0005] 소변 내 미세 알부민을 검출하는 방법은 미세 알부민과 지시제의 복합체 형성 반응을 통한 색 변화로 측정하는 비색법을 기초로 다양한 방법으로 측정될 수 있다. 시험 스트립, 면역 형광법, 효소 면역 분석법, 방사성 면역 검정법 및 면역성 측정법 등의 방법이 있으며, 그 중 가장 간단한 방법이 소변 내에서 미세 알부민과 지시제의 결합으로 색이 변화하는 시험 스트립(딤스틱 건식 화학법)이다. 시험 스트립은 미세 알부민과 반응하는 시약을 지시체에 함침시킨 후, 건조 후 제조하는 방법으로 생산되며, 지시제로는 2-(4'-하이드록시아조벤젠) 벤조산(2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid, HABA), 브로모크레졸 그린(Bromocresol green), 브로모크레졸 블루(Bromocresol Blue), 브로모펜 블루(bromophen blue, BPB), 테트라브로모페놀 블루(Tetrabromophenol Blue, TBPB), 비스(3',3''-디아이오도-4',4''-다이하이드록시-5',5''-다이니트로페닐)-3,4,5,6-테트라브로모설포프탈레인(bis(3',3''-diiodo-4'-4''-dihydroxy-5',5''-dinitrophenyl)-3,4,5,6-tetrabromosulfonphthalein, DIDNTB) 등이 있다.

[0006] 하지만 기존의 알칼리성 트리페닐 메탄 유도체 지시제를 사용한 방법에서는 색발현(정확성)과 20mg/L 이하의 미세 알부민은 검출되지 않는 검출한계 면에서 문제가 있어 뇨 중의 미량 단백질(미세알부민뇨) 약 10~30mg/L에 의한 색상의 작은 변화를 검사하는 것이 불가능하였다. 그러므로 비교적 색상변화가 뚜렷하면서, 당뇨병 신장 병증 환자의 조기 진단, 신부전 예측 면에서 낮은 검출한계(높은 민감성)의 미세알부민뇨를 검출할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2015-7027368호(공개일자: 2014.03.11)는 소변 알부민 및 소변 크레아티닌에 대한 신속 검사에 관한 것으로, 소변 샘플 중의 알부민과 크레아티닌을 측정하기 위한 면역크로마토그래피 시스템 및 시험 카세트로부터 시그널을 검출하고, 알부민 농도, 크레아티닌 농도, 및 알부민-크레아티닌 비에 대한 결과를 계산하고 표시하는 판독기에 대해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 합성 알부민 지시제, 완충액, 트리톤 X-100(Triton X-100) 및 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)을 함유하여 검출한계가 향상된 미세알부민 검출 시험 스트립을 제조하였다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 완충액에 계면활성제, 증감제 및 알부민 지시제를 첨가하여 함침액을 제조한 후, 시험지를 함침시키고 건조시켜 제조하는 알부민 검출 시험 기재의 제조 방법에 있어서, 상기 완충액은, 에탄올, 시트르산(citric acid), 시트르산삼나트륨(trisodium citrate)를 혼합하여 제조한 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 알부민 검출 시험 기재의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 완충액은, 바람직하게 에탄올 100 중량부를 기준으로, 시트르산(citric acid) 20~40 중량부를 서서히 혼합하고, 시트르산삼나트륨(trisodium citrate) 10~30 중량부를 혼합하여 제조한 것을 사용하는 것이 좋다.
- [0013] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 계면활성제는, 바람직하게 트리톤엑스-100(tritonx-100)인 것이 좋다.
- [0014] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 증감제는, 바람직하게 폴리프로필렌글리콜(polypropylene glycol)인 것이 좋다.
- [0015] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 알부민 검출 시험 기재의 제조방법은, 바람직하게 에탄올 100 중량부를 기준으로, 시트르산(citric acid) 20~40 중량부를 서서히 혼합하고, 시트르산삼나트륨(trisodium citrate) 10~30 중량부를 혼합하여 완충액을 제조하는 단계 (a); 상기 단계 (a)의 완충액에 트리톤 X-100(Triton X-100) 0.1~2 중량부, 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol) 4~6 중량부 및 알부민 지시제 2~3 중량부를 혼합하여 함침 용액을 제조하는 단계 (b); 및 상기 단계 (b)의 함침 용액에, 시험지(paper)를 함침시킨 후, 오븐에서 건조하는 단계 (c); 를 포함하는 것이 좋다.
- [0016] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 알부민 지시제는, 바람직하게 5',5''-다이니트로-3',3'',3,4,5,6,-헥사브로모페놀설포프탈레인(5', 5''-dinitro-3', 3'', 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfonephthalein)인 것이 좋다.
- [0017] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 검출 기재는, 바람직하게 종이 또는 부직포 또는 스폰지 인 것이 좋다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기에서 제조한 소변 내 알부민 검출 시험 기재를 절단 후, PVC 시트 지지대 상에 부착하는 것을 특징으로 하는 소변 내 알부민 검출 시험 스트립의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 의한 알부민 검출 시험 스트립은 알부민 지시제를 통해 무색에서 푸른색으로 색 변화 관찰이 뚜렷한 정확성을 가지고, 20mg/L 이하의 농도까지 미세알부민뇨 검출이 가능하게 검출한계를 향상(높은 민감도)시켰다.
- [0021] 또한, 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립은 알부민 지시제에 계면활성제, 폴리머를 추가함으로써 1,2차 공정이 단일 공정으로 통합되어 저렴한 가격과 공정 편의성이 향상되며, 용해도와 혼합성을 증가시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1의 A)는 3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3,4,5,6-tetrabromophenolsulfonephthalein)으로부터 본 발명의 알부민 지시제로의 화학반응과정을 나타낸 것이고, 도 1의 B)는 3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3,4,5,6-tetrabromophenolsulfonephthalein)으로부터 일반적인 브롬 치환 반응과정(A~C) 및 DIDNTB으로의 화학반응과정(A~E)을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립을 나타낸 그림으로, 1은 알부민 검출 시험 검사지, 2는 지지대, 3은 알부민 검출 시약이 함침되어 있는 종이를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 알부민 지시제(화합물 3)의 단일 공정 제조를 통한 시험 스트립[1]의 경우]과 알부민 지시제(화합물 3)의 1,2차 공정 제조를 통한 시험 스트립[2]의 경우] 및 DIDNTB[3]의 경우]의 검출 테스트를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 미세알부민뇨는 소변 내 알부민 범위 20 - 200 mg/L, 크레아티닌 범위 30-300mg/L의 비정상적 배출 비율을 나타낼 경우를 의미하는 것으로, 내피세포 기능 장애, 심혈관 이환물의 징표로 신장, 순환계 및 중추신경계에 영향을 미치는 여러가지 병리학적 질환을 진단하는데 매우 중요하다. 하지만 기존의 알칼리성 트리페닐 메탄 유도체 지시제를 사용한 방법에서는 색 발현의 정확성과 20mg/L 이하의 미세 알부민은 검출되지 않는 검출한계 면에서 문제가 있어 뇨 중의 미량 단백질(미세알부민뇨) 약 10-30mg/L에 의한 색상의 작은 변화를 검사하는 것이 불가

능하였다.

- [0025] 이에 본 발명에서는 저렴하고 편리하게 소변 검출이 가능한 시험 스트립(건식 화학법)을 사용하고, 알부민 지시제를 첨가하여 알부민이 존재하는 경우 색변화가 나타나게 하는 반정량적 딥스틱 시험 방법을 개발함으로써, 정확하고 편리하게 1분 내 빠른 측정이 가능한 알부민 시험 스트립을 제조하였다.
- [0026] 구체적으로 본 발명은 완충액에 계면활성제, 증감제 및 알부민 지시제를 첨가하여 함침액을 제조한 후, 시험지를 함침시키고 건조시켜 제조하는 알부민 검출 시험 기재의 제조방법에 있어서, 상기 완충액은, 에탄올, 시트르산(citric acid), 시트르산삼나트륨(trisodium citrate)를 혼합하여 제조한 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 알부민 검출 시험지의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0027] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 완충액은 에탄올 100 중량부를 기준으로, 시트르산(citric acid) 20~40 중량부를 서서히 혼합하고, 시트르산삼나트륨(trisodium citrate) 10~30 중량부를 혼합하여 제조한 것을 사용하는 것이 좋다.
- [0028] 본 발명의 알부민 검출 시험 기재의 제조방법을 구체적으로 설명하자면, 에탄올 100 중량부를 기준으로, 시트르산(citric acid) 20~40 중량부를 서서히 혼합하고, 시트르산삼나트륨(trisodium citrate) 10~30 중량부를 혼합하여 완충액을 제조하는 단계 (a); 상기 단계 (a)의 완충액에 트리톤 X-100(Triton X-100) 0.1~2 중량부, 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol) 4~6 중량부 및 알부민 지시제 2~3 중량부를 혼합하여 함침 용액을 제조하는 단계 (b); 및 상기 단계 (b)의 함침 용액에, 시험지(paper)를 함침시킨 후, 오븐에서 건조하는 단계 (c);를 포함하는 것을 특징으로 하는 소변 내 알부민 검출 시험 기재의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 소변 내 알부민 검출 시험 기재를 절단 후, PVC 시트 지지대 상에 부착하여 제조하는 것을 특징으로 하는 소변 내 알부민 검출 시험 스트립의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명에서는 알부민 검출 시험 스트립(건식 시험 스트립)을 제조하기 위해 완충액(버퍼 용액), 계면활성제, 고분자(증감제) 및 알부민 지시제를 용매에 용해시킨 후, 상기 용액에 종이를 함침시켜 시험 스트립을 제조하였다. 이를 통해 모든 물질이 방출되지 않고, 종이에 포함되어, 지시제가 반응물과 반응하는 최적의 상태를 유지할 수 있으며, 본 발명에서 개발한 버퍼 용액을 사용함으로써, 미세 알부민도 검출 가능한 것이다.
- [0031] 본 발명에서 '완충액 (버퍼 용액)'은 지시제의 반응을 위한 일정한 pH 환경을 제공하여 지시제 반응이 소변의 pH에 영향을 받지 않게 도와주는 역할을 한다. 완충제의 종류와 농도에 따라 pH 환경이 달라지기 때문에 지시제가 작용하여 반응할 수 있는 적절한 pH는 중요하다. 알부민 검출을 위한 지시제의 발색은 pH 1.5~4.5에서 적합하다고 알려져 있다. 바람직하게는 pH 2.0~3.0이 적합하며, pH2.5가 가장 적합하다.
- [0032] 용액 내의 전자 공여성(electron donating)하여 활성화시키고 pH 낮추는 완충제로는 바람직하게 시트르산(citric acid), 말론산(malonic acid), 설포살리실산(sulfosalicylic acid) 및 인산(phosphoric acid) 등이 있는데, 본 발명에서는 용매 100 중량부를 기준으로 시트르산(citric acid) 20~40 중량부, 시트르산삼나트륨(Trisodium citrate)는 10~30 중량부를 혼합하여 완충액을 제조함으로써 미세 알부민 함량에서도 발색이 적절함을 확인할 수 있었다.
- [0033] 본 발명에서 '계면활성제'는 색 지시제의 색상 변화를 균일하게 유지하는 역할을 한다. 또한, 계면활성제는 지시제의 색 형성을 안정화하여 반응성을 높이고 정확도를 향상시킨다. 계면활성제의 농도와 종류를 변화하여 양성적, 음성적 색 변화를 확인하여 시험스트립의 첨가제 영향을 확인하였다. 계면활성제로 주로 사용되는 시약으로는 일 예로 황산 도데실 나트륨(Sodium dodecyl sulfate, SDS), 트리톤 X-100(Triton X-100), 도데실벤젠설포산(Dodecylbenzenesulfonic acid, DBS), 다이옥틸설포숙시네이트(Dioctylsulfosuccinate), 글리세롤(Glycerol) 등이 있다. 본 발명에서는 알부민 시험 스트립의 색 발색 형성을 위해 계면활성제로 트리톤 X-100(Triton X-100)이 적합함을 확인하였고, 0.1~2.0 중량부로 사용하였다.
- [0034] 본 발명에서 증감제는 유효기간 동안 색발현과 음성 색상을 유지하여 안정성을 높이는 물질을 지칭하는 것으로 색 형성 동역학과 알부민 지시제와의 반응성을 향상시키고, 200~25,000 분자량을 갖는 중합체를 의미한다. 주로 사용되는 증감제(고분자)로는 바람직하게 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), 폴리카보네이트(polycarbonate) 및 폴리비닐 에테르(polyvinyl ether) 등이 있으며, 더 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 또는 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)이 주로 사용될 수 있다. 증감제의 농도는 특별히 제한이 없지만 바람직하게 3~10 중량부, 더 바람직하게는 4~6 중량부 사용하는 것이 좋다.

- [0035] 본 발명에서 고분자(중감제)는 수용성, 비수용성 폴리프로필렌 글리콜 모두 유용하며, 폴리프로필렌 글리콜은 400~10,000의 분자량이 바람직하며 1,000~2,000이 가장 좋다. 본 발명의 실시예에서는 평균 분자량 400인 수용화성 폴리프로필렌글리콜이 유용한 것으로 결정되어 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol) 4~6 중량부를 사용하였다. 이를 통해 색 반응 범위를 증가시키고, 알부민과 반응 동역학을 향상시켰다. 결론적으로 본 발명의 알부민 시험 검출 스트립은 합성 알부민 지시제와 폴리프로필렌 글리콜을 포함하여 민감도와 반응 속도를 향상시키고 소변에서의 알부민과의 반응도(resolution)을 향상시킨 것이다.
- [0036] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 알부민 지시제는, 5',5''-다이니트로-3',3'',3,4,5,6,-헥사브로모페놀설포프탈레인(5', 5"-dinitro-3', 3", 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfonephthalein)을 사용하는 것이 좋다.
- [0037] 상기 5',5''-다이니트로-3',3'',3,4,5,6,-헥사브로모페놀설포프탈레인(5', 5"-dinitro-3', 3", 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfonephthalein)는 바람직하게 하기의 과정을 통해 제조될 수 있다.
- [0038] 아세트산(HOAc) 100 중량부에 3, 4, 5, 6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3, 4, 5, 6-tetrabromophenolsulfonephthalein)을 9~11 중량부로 넣은 용액을 상온, 불활성 기체 대기 조건하에서 제조하는 단계 (가); 상기 단계 (가) 후, 상기 제조한 용액에 아세트산 20 중량부에 브로민(bromine) 4~5 중량부 넣은 용액을 10분 동안 드롭(drop) 처리한 후 48시간 교반하는 단계 (나); 상기 단계 (나) 후, 상기에서 교반한 혼합물에서 분리된 고체를 여과 수집한 후, 아세트산(HOAc)으로 세척하고 진공 건조시켜 3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설포-프탈레인(3', 3", 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfone- phthalein)를 제조하는 단계 (다); 상기 단계 (다) 후, 상기에서 제조한 3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설포-프탈레인을 끓는 아세트산으로부터 재결정화하여 담황색 분말의 화합물을 얻는 단계 (라); 상기 단계 (라) 후, 무수아세토니트릴(CH₃CN) 100 중량부에 상기 단계 (라)의 화합물 5~6 중량부로 넣은 용액을 상온, 불활성 기체 대기 조건하에서 제조하는 단계 (마); 상기 단계 (마) 후, 상기 제조한 용액을 아세트산 촉매 처리한 후, 처리한 용액 100 중량부에 질산나트륨(nitric acid nitrite) 90% 용액 0~1 중량부를 드롭(drop) 처리한 후, 96시간 교반하는 단계 (바); 상기 단계 (바) 후, 상기에서 교반한 혼합물에서 분리된 고체를 여과 수집한 후, 아세토니트릴(CH₃CN)으로 세척하고, 진공 건조하는 단계 (사);를 포함하여 수득한 어포드 5',5''-다이니트로-3',3'',3,4,5,6,-헥사브로모페놀설포프탈레인(afford 5', 5"-dinitro-3', 3", 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfonephthalein)의 순수 황색분말로 수득할 수 있다.
- [0039] 한편, 하기의 실험에 의하면, 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립은 농도에 따라 밝은 하늘색에서 진한 하늘색으로 변하는 것으로 나타나, 미세 알부민 검출이 가능함을 확인할 수 있었다. 이는 기존 공정에서의 시험검사지의 문제를 해결한 것이다. 기존 시험검사지는 음성 색상이 진한 노란색이어서 알부민과 옥타할로설포프탈레인(octahalosulfophthalein) 지시제가 만나면 샘플 내 알부민 농도에 따라 황색에서 황녹색 내지 녹색으로 바뀌었다. 그러나 이러한 착색은 가장 흔히 시험되는 체액(황색 뇨)일 경우, 뇨 중의 미세알부민 약 10~30mg/L에 의한 색상의 작은 변화를 검사하는 것이 불가능했고, 민감성이 떨어졌다는 문제가 있었다. 하지만, 본 발명에서는 이와 같은 문제를 해결하였다.
- [0040] 본 발명에서는 DIDNTB의 화학반응과 일반적인 브롬 치환 반응과 비교하여, 아세토니트릴(CH₃CN)을 이용한 니트로화반응이라는 점에서 차별화된다. 상기 니트로화 반응의 원리에 대해 상세하게 설명하자면, 4'와 4''의 위치에 있는 하이드록시기에 인접한 니트로 또는 니트로소 그룹이 전하 분산을 통해 하이드록시기 반응성과 공명 안정성을 향상시키고, 4'와 4''의 위치에 산도를 증가시켜 pKa를 감소시킴으로써 알부민 지시제의 민감도를 향상시키게 된다. 이를 통해 본 발명의 알부민 지시제는 소변 알부민 반응 민감도를 향상시키고, 낮은 농도의 알부민에서 하늘색에서 파란색으로의 변화를 가져올 수 있어 미세알부민 검출이 가능하게 된 것이다.
- [0041] 또한, 본 발명의 알부민 시험 검출 스트립은 완충액, 트리톤 X-100(Triton X-100), 불수용성 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)을 단일 공정으로 혼합함으로써, 분리되어 있던 1,2차 공정이 단일 공정으로 통합되어 저렴한 가격과 공정 편의성이 향상되며, 용해도와 혼합성을 증가시킨다는 효과도 얻을 수 있었다.
- [0042] 한편, 본 발명에 있어서 '기재'는 본 발명의 지시제가 로딩되는 객체를 지칭하는 것으로, 일 예로는 종이, 부직포, 스폰지 등이 있다. 본 발명의 기재는 알부민이 함유된 샘플과 접촉하면 샘플 중 알부민을 검출하여 시각적으로 보여주게 된다.
- [0043] 이하, 본 발명에 대해 하기 실시예 및 실험예에서 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 모두 포함한다.
- [0045] **[실시예 1: 소변 검사지용 합성 알부민 지시제 제조]**

- [0046] 본 실시예에서는 소변 검사지용 합성 알부민 지시제를 하기와 같이 제조하였다.
- [0047] 먼저 3, 4, 5, 6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3, 4, 5, 6-tetrabromophenolsulfonephthalein (화합물 1) 7.5mmol (10.06 g)/아세트산(HOAc) 100ml 용액을 상온, 불활성 기체 대기 조건하에서 제조하였다. 제조한 용액에 브로민(bromine) 15mmol(4.8g)/ 아세트산(HOAc) 20ml 용액을 10분동안 드롭(drop) 처리 한 후 48시간 교반하였다. 상기 반응 혼합물에서 분리된 고체를 여과 수집한 후, 아세트산(HOAc)으로 세척 후 진공 건조시켜 3',3'',3,4,5,6-헥사브로모페놀설포-프탈레인(3', 3'', 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfone- phthalein) (화합물 2)를 만들었다. 이후, 끓는 아세트산(boiling HOAc)로부터 재결정화하여 담황색 분말의 순수한 화합물 2(5.79g, 683%)를 얻었다. 화합물 2의 분광학적 결과는 다음과 같았다; ¹H NMR (DMSO-d₆), 7.11(d, J = 8.7Hz, 2H), 7.31(dd, J₁ = 8.7Hz, J₂= 2.4 Hz, 2H), 7.59(d, J = 2.4Hz, 2H), 8.03 (s, 2H). IR (KBr) cm⁻¹ 1192, 1227, 1295, 1340, 1360, 1416, 1497, 1605, 1703, 3435.
- [0048] 상기 화합물 2/무수아세토니트릴(CH₃CN) 100ml 용액을 상온, 불활성 기체 대기 조건하에서 제조하였다. 제조한 용액을 아세트산(HOAc)의 촉매로 처리하였다. 처리한 용액에 질산나트륨(nitric acid nitrite) (0.56g, 48mmol) 90% 용액을 드롭(drop) 처리한 후, 96시간(4일간) 교반하였다. 상기 반응 혼합물에서 분리된 고체를 여과 수집한 후, 아세토니트릴(CH₃CN)으로 세척하고, 진공 건조하여 5',5''-다이니트로-3',3'',3,4,5,6,-헥사브로모페놀설포프탈레인(5', 5''-dinitro-3', 3'', 3, 4, 5, 6-hexabromophenolsulfonephthalein) (4.03g, 64%, 녹는 점 267~269°C)의 순수 황색분말 화합물 3을 제조하였다.
- [0050] 화합물 1인 3, 4, 5, 6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3, 4, 5, 6-tetrabromophenolsulfonephthalein)로부터 본 발명의 알부민 지시제로의 화학반응과정(화합물 1~3)에 대해서 도 1의 A)에 나타냈다. 비교를 위해 도 1의 B)에 3, 4, 5, 6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3, 4, 5, 6-tetrabromophenolsulfonephthalein)로부터 일반적인 브롬 치환 반응과정(A-C)과 DIDNTB으로의 화학반응과정(A-E)을 나타냈다.
- [0051] 도 1의 B)에서 화합물 B와 C는 브롬 치환 반응인데, 3',3'',3,4,5,5',5'' 또는 6 위치에 원하는 화합물을 얻기 위해 할로젠(halogens), 알킬 그룹(alkyl groups) 또는 프로톤(protons, H)로 치환될 수도 있다. 이와 비교하여 도 1의 A)은 본 발명의 알부민 지시제로의 화학반응 과정으로, 화합물 2와 3은 니트로화 반응이다. 이반응의 원리에 대해 설명하면, 4'와 4''의 위치에 있는 하이드록시기에 인접한 니트로 또는 니트로소 그룹이 전하 분산을 통해 하이드록시기 반응성과 공명 안정성을 향상시키고, 4'와 4''의 위치에 산도를 증가시켜 pKa를 감소시킴으로써 알부민 지시제의 민감도를 향상시키게 된다. 이를 통해 본 발명의 알부민 지시제는 소변 알부민 반응 민감도를 향상시킬 수 있고, 낮은 농도의 알부민에서 하늘색에서 파란색으로의 변화를 가져올 수 있는 것이다.
- [0052] 한편, 비교를 위한 DIDNTB의 화학반응과정(도 1의 B)에서, 화합물 A-E)은, 화합물 A를 아세트산 하에 아이오딘 모노클로라이드(iodine monochloride, ICl)과 반응하여 화합물 D인 3,4,5,6-테트라브로모페놀설포프탈레인(3,4,5,6-tetrabromophenolsulfonephthalein)을 생성하여 화합물 E를 얻은 후, 추가공정을 거쳐 DIDNTB를 얻게 된다.
- [0054] 이상 종합하면, 본 발명의 알부민 지시제는 DIDNTB의 화학반응과 일반적인 브롬 치환 반응과 비교하여, 아세토니트릴(CH₃CN)을 이용한 니트로화반응을 통해 알부민 지시제의 반응 민감도가 향상되어 낮은 농도의 알부민을 검출해 낼 수 있는 효과를 얻게 된 것이다.
- [0056] **[실시예 2: 상기 실시예 1의 소변 검사지용 알부민 지시제를 이용한 알부민 검출 시험 스트립 제조 공정]**
- [0057] 본 실시예에서는 상기 실시예 1의 소변 검사지용 알부민 지시제(화합물 3), 완충액, 계면활성제, 고분자(증감제)를 왓만(whatman) 시험 종이에 함침시켜 시험지를 제조한 후, 이를 이용한 알부민 검출 시험 스트립(건식 시험 스트립)을 제조하였다.
- [0059] **1) 시험지 제조**
- [0060] 에탄올 100 중량부에 시트르산(citric acid) 28 중량부를 서서히 혼합하고, 시트르산삼나트륨(trisodium citrate) 21 중량부를 혼합하여 완충액(buffer solution, loaning solution이라고도 함)을 제조하였다. 상기 용액에 계면활성제 트리톤 X-100(Triton X-100) 1 중량부를 혼합하여 용해도를 향상시키고, 고분자(증감제) 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)을 5 중량부와, 상기에서 합성한 알부민 지시제(화합물 3)을 2.5 중량부 혼합하여 단일 함침 용액을 제조하였다. 단일 함침 용액을 제조한 후, 왓만지(whatman paper)를 화합물질

이 충분히 흡수될 수 있도록 함침시킨 후, 60℃ 오븐에 30분간 건조하여 시험지를 제조하였다.

[0062] 2) 시험스트립 제조

[0063] 상기와 같이, 시험지를 제조한 후, 적절한 크기로 절단하고 긴 막대형태인 PVC 시트 지지대 상에 부착하여 시험 스트립을 제조하였다. 여기에 사용되는 막대 형태의 PVC 지지대는 비반응성으로 소변의 어떤 성분과도 반응이 일어나지 않는 물질이다. 이를 이용한 알부민 검출 시험 스트립은 도 2와 같이 밝은 하늘색(20mg/L이하)에서 진한 하늘색(200mg/L)으로 변하는 것으로 나타났다. 시험스트립 및 이의 구성을 도 3과 같이 나타났다.

[0065] [실험예 1: 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립 테스트]

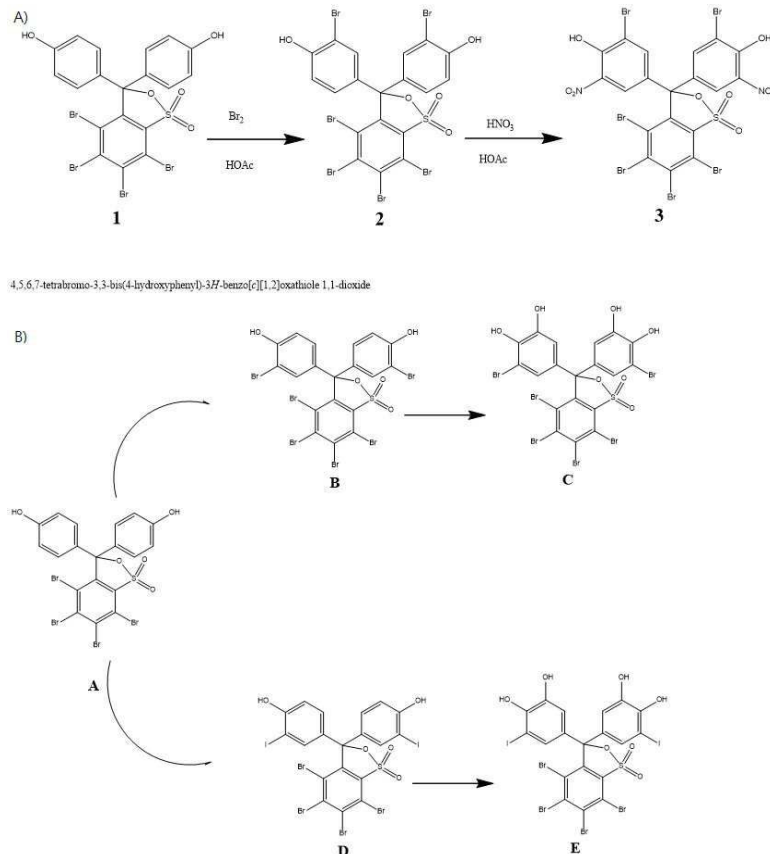
[0066] 본 실험예에서는 본 발명의 알부민 지시제(화합물 3)을 이용한 알부민 검출 시험 스트립의 검출 효능을 테스트 하였다. 검출 효능 비교를 위해 실험에서 사용한 DIDNTB는 비스(3',3''-다이오도-4',4''-다이하이드록시-5',5''-다이니트로페닐)-3,4,5,6-테트라브로모설포프탈레인(bis(3, ' ,3"-diiodo-4'-4"-dihydroxy-5',5"-dinitrophenyl)-3,4,5,6-tetrabromosulfonphthalein)으로, Cas Number 11NOVO49(bought from UKChern, UK)를 사용하였다.

[0067] 도 4와 같이, 본 발명의 알부민 지시제(화합물 3)을 이용하여 단일 공정으로 제조한 알부민 검출 시험 스트립은 농도에 따라 밝은 하늘색에서 진한 하늘색으로 변하는 것으로 나타나 미세 알부민 검출이 가능함을 확인할 수 있었다. 기존 DIDNTB의 경우, 음성 색상이 진한 노란색이어서 알부민과 지시제가 만날 때, 황색에서 황색 내지 녹색으로 바뀌는 문제로 인해 미세 알부민 검출이 어려운 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 이와 같이 본 발명의 알부민 검출 시험 스트립은, 완충액, 트리톤 X-100(Triton X-100), 불수용성 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)을 단일공정으로 혼합함으로써, 저렴한 가격과 공정 편의성이 향상되었으며, 용해도와 혼합성을 증가시켰다. 이를 통해 본 발명의 알부민 검출 시험스트립은 기존 연구에서 검출 가능한 알부민 농도 미만의 미세알부민(20mg/L 이하)을 정확하고 분명하게 검출할 수 있다.

도면

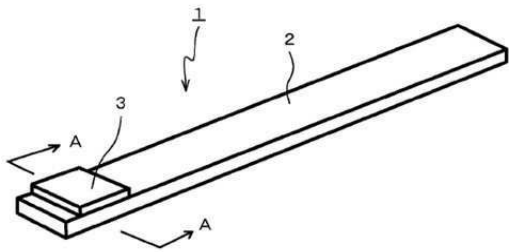
도면1



도면2



도면3



도면4

농도 순서 (mg/L) <20 / 50 / 100 / 150 / 200	
1)	
2)	
3)	