

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> G01N 33/53	(45) 공고일자 1999년08월 16일	(11) 등록번호 10-0215552
(21) 출원번호 10-1997-0037395	(24) 등록일자 1999년05월24일	(65) 공개번호 특 1999-0015344
(22) 출원일자 1997년08월05일	(43) 공개일자 1999년03월05일	

(73) 특허권자	주식회사녹십자 허일섭 경기도 용인시 기흥읍 구갈리 227번지한국과학기술연구원 박원훈 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1
(72) 발명자	최명자 서울특별시 동작구 신대방 2동 삼성보라매오피스타워 1902호 최정은 서울특별시 서초구 잠원동 58-22 한신 17차아파트 332동 104호 박종세 서울특별시 서초구 잠원동 한신강변아파트 3동 704호 박호균 서울특별시 송파구 방이동 올림픽선수촌아파트311동 204호
(74) 대리인	박장원

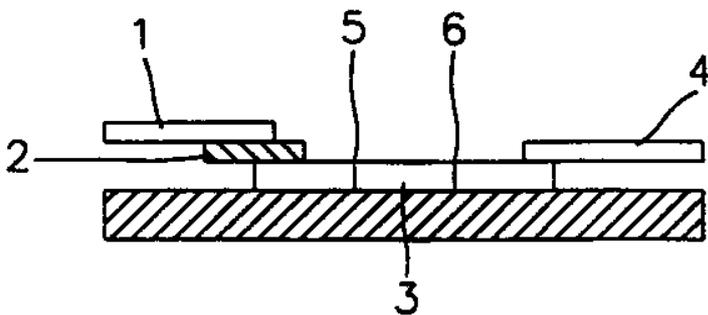
심사관 : 김호석

(54) 측석 마약검출지 및 그것의 제조 방법

요약

본 발명은 검출하고자 하는 시료가 가해지는, 맥스트란으로 처리된 시료 멤브레인; 상기 시료 멤브레인과 길이방향으로 겹치도록 연결되며, 검출하고자 하는 마약의 항체와 착색미립자를 결합시킨 마약항체-착색미립자가 일시적으로 고정되어있는 유리섬유 멤브레인; 상기 유리섬유 멤브레인과 길이방향으로 겹치도록 연결되며, 검출하고자 하는 마약에 단백질을 접합시킨 마약-단백질 접합체와 상기 마약의 제2항체가 서로 다른 위치에 영구적으로 고정되어 있는 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인; 및 상기 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 길이방향으로 겹치도록 연결되는 반응액 흡수 멤브레인으로 이루어지는, 측석마약 검출지 및 그것을 제조하는 방법에 관한 발명이다. 본 발명에 의해 보다 짧은 시간에 마약 검출 결과를 얻을 수 있고, 검출 결과 판정이 용이하며, 마약에 대한 민감성이 향상된 마약 검출지가 제공된다.

대표도



명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 마약 검출지의 조립 측면도이다.

도 2는 본 발명에 따른 마약 검출지의 평면도이다.

도 3은 마약검출지의 조립 모형도이다.



항체-착색미립자와 반응하여 복합체를 형성하여 이동하게 되며, 이 복합체가 폴리에스테르지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인의 마약-단백질 접합체가 영구적으로 결합된 부위에 도달하면, 마약-착색미립자 접합체의 마약과 마약-단백질 접합체의 마약이 착색미립자와 결합되어 있는 항체에 경쟁반응을 나타낸다. 그 결과 마약-단백질이 고정된 부위에서는 착색미립자에 의한 색깔이 나타나지 않고, 제2항체가 고정되어 있는 부위에서만 착색미립자에 의한 색깔이 나타나게 된다.

한편, 시료속에 검출하고자 하는 약물이나 고 대사산물이 없는 경우에는 마약항체-착색미립자가 멤브레인을 따라 이동하면서 일부는 마약-단백질 접합체와 결합하고, 일부는 제2항체와 결합하게 되어, 마약-단백질 접합체가 고정된 부위와 제2항체가 고정된 부위 모두에서 착색미립자에 의한 색깔이 나타나게 된다.

본 발명의 검출지에서, 시료 멤브레인으로는 텍스트란을 함유하는 용액으로 처리된 셀룰로오스 멤브레인을 사용할 수 있다. 텍스트란을 함유하는 용액으로 처리된 시료 멤브레인을 사용하면 결과선의 색깔이 뚜렷해져 검출 결과를 판정하기가 수월해진다.

본 발명의 검출지에서 착색미립자로는 이 분야에서 사용되는 다양한 착색미립자를 사용할 수 있는데, 이중 콜로이달 골드나 바람직하며, 직경 30-50 nm인 것이 특히 바람직하다. 콜로이달 골드는 HAuCl<sub>4</sub>를 트리소듐시트레이트로 환원시켜 제조할 수 있으며, 시판 제품을 구입하여 사용할 수도 있다. 콜로이달 골드는 다른 착색미립자, 예를 들어 착색라텍스미립자들보다 크기가 작아 멤브레인에서의 이동성이 향상될 뿐 아니라 결과선이 잘 형성되어 마약 검출이 용이하다.

본 발명의 검출지에서, 마약 검출 판정 멤브레인으로, 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인을 사용하며, 포어 크기가 8-12 $\mu$ m인 폴리에스테르 지지나이트로셀룰로오스 멤브레인이 바람직하다. 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인을 사용함으로써 시료의 이동속도를 빠르게 할 수 있어 보다 빠른 시간내에 검사 결과를 얻을 수 있을 뿐 아니라, 마약에 대한 민감성을 향상시킬 수 있다.

마약-단백질 접합체의 단백질로 오보알부민을 사용하는 경우, 다른 단백질, 예를 들어 키홀림펩테모시아닌이나 소혈청알부민을 사용할 때와 비교하여 민감도를 10배 이상 향상시킬 수 있으므로 바람직하다.

제2항원은, 마약항체-착색미립자에 사용되는 마약항체를 얻은 동물과 다른 동물로부터 얻은 마약항체 자체에 대한 항체를 의미한다.

본 발명의 마약 검출지는, 몰핀, 대마초, 필로폰 등 다양한 종류의 마약 검출에 응용될 수 있다.

본 발명에 따른 마약 검출지의 제조방법은 다음과 같다.

텍스트란을 함유하는 용액으로 패드를 처리하여 시료 멤브레인을 제조하고; 검출하고자 하는 마약의 항체와 착색미립자를 결합시킨 마약항체-착색미립자를 유리섬유 멤브레인에 일시적으로 고정되도록 처리하고; 검출하고자 하는 마약에 단백질을 접합시킨 마약-단백질 접합체와 상기 마약의 제2항원을 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인의 다른 위치에 영구 고정되도록 처리하고; 상기 시료멤브레인, 상기 유리섬유 멤브레인, 상기 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스멤브레인과 반응액 흡수 멤브레인을 순서대로 서로 길이방향으로 겹치도록 조립하는 것으로 이루어진다.

본 발명의 마약 검출지 제조방법에서, 항원-항체 반응성을 향상시키기 위하여 시료 멤브레인을 텍스트란을 함유한 용액으로 처리한다. 이와 같이 처리함으로써, 결과선의 색깔이 뚜렷해져 검출 결과를 인식하기 수월해진다.

본 발명에 따른 제조방법에서, 마약항체-착색미립자가 일시적으로 고정되어 있는 유리섬유 멤브레인의 제조방법은 다음과 같다.

먼저, 반응 특이성과 반응성이 우수한 마약항체를 얻기 위하여, 예를 들어 J. Choi, Arch. Pharm. Res., 20(1), 46-52 (1997)에 기재된 방법에 따라, 마약-단백질 접합체를 리간드로 사용한 면역친화성 크로마토그래피를 수행하여 마약항체를 얻는다.

이 때 면역친화성 크로마토그래피의 리간드로, 마약 면역원을 위해 사용된 단백질과는 다른 종류의 단백질을 사용함으로써, 특이성이 높은 마약항체를 얻을 수 있다.

얻어진 마약항체를 적정량의 착색 미립자와 혼합하여 반응시켜 마약항체-착색미립자를 제조한다. 제조된 마약항체-착색미립자를 유리섬유 멤브레인의 일정한 위치에 처리한다.

본 발명을 실시예에 따라 상세히 기술하면 다음과 같으며, 이 예로서 발명의 범위를 제한하지는 않는다.

#### [실시예 1. 필로폰항체의 분리정제]

한국특허출원 93-20973에 기재된 방법에 따라 면역원을 준비하였다.

즉, 필로폰에 소혈청알부민을 결합시키기 위해, 필로폰을 N-4-(브로모부틸)프탈이미드로 활성화시킨 후 하이드라진 수화물과 반응시켜 활성화된 N-4-아미노부틸 필로폰(필로폰-NH<sub>2</sub>)을 합성하였다. 활성화된 필로폰-NH<sub>2</sub> 12 mg에 소혈청알부민 4.8mg과, 증류수 0.68 mg에 녹인 양쪽기능성 커플링 시약인 EDAC 72.9 mg을 가한 후, 상온에서 3시간 교반하여 필로폰-소혈청알부민을 제조하였다. 이것을 0.01M 인산완충액(PBS, pH 7.4)에서 4시간 투석한 후, Sephacryl S-200 크로마토그래피(용출용매:10mM PBS, pH7.4)를 통해 중합된 접합물을 제거하였다.

필로폰-키홀림펩테모시아닌을 얻기 위해, 소혈청알부민 대신 키홀림펩테모시아닌을 사용하여 동일한 과정을 수행하였다.

면역원 100  $\mu$ g을 Freund's 완전 보조액 1 ml과 잘 유화시켜 토끼 (Albino Rabbit, 암컷, 3-5kg)의 등피 4곳에 1차 피하 주사하였다. 3주 후에 20  $\mu$ g의 면역원을 Freund's 불완전 보조액 1 ml과 잘 유화시켜 2차 피하 주사한 후 2주 간격으로 같은 용량의 면역원을 2회 더 주사하였다. 표지항원 필로폰-홀스래디쉬퍼옥시데이즈(HRP)를 사용하여 ELISA에 의한 항체 희석곡선으로 측정된 항체 역가 희석 배수가 5,000-10,000 정

도일 때 체혈하였다.

면역원이 필로폰-소혈청알부민 접합체인 경우는 필로폰-기혈림펫헤모시아닌 접합체나 필로폰-오브알부민을 리간드로 사용하여 면역친화성 크로마토 그래피를 수행하여 면역항체를 분리하였다.

면역원이 필로폰-기혈림펫헤모시아닌 접합체인 경우는 필로폰-소혈청알부민접합체나 필로폰-오브알부민을 리간드를 사용하여 면역친화성 크로마토그래피를 수행하여 면역항체를 분리하였다.

필로폰 항혈청을 3종류의 리간드(필로폰-기혈림 펫헤모시아닌, 필로폰-오브알부민, 필로폰-소혈청알부민)을 사용하여 시아노겐브로마이드 세파로스 레진과 반응시켜 면역친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 면역친화성결럼을 1M Tris-C1, pH8.0 완충액으로 세척한 후 여기에 필로폰 항혈청을 가해 4:에서 18시간 반응시킨후 0.5M NaCl을 함유한 0.1M tris-C1, pH 8.3 완충액으로 세척했다. 그후 0.1M 트리에틸아민, pH 11.5로 면역항체를 정제해 내고, 이것을 1M phosphate 완충액, 마6.8로 중화시켰다. 이를 PBS로 투석하고 농축시켰다.

[실시에 2. 필로폰항체-콜로이달골드가 고정된 유리섬유 멤브레인의 제조]

11n $\mu$ 의 콜로이달골드(미립자 크기:30-50 nm)를 pH 9.(j)인로 맞추고, 여기에실시에 1에서 얻은 필로폰 항체를 항체 농도가 8 $\mu$ g항체/111 $\mu$ l. 콜로이달골드가 되도록조금씩 가했다. 실온에서 30분간 흔들며 반응시킨 후, 10% 소혈청알부민을 1% 농도가 되도록 가한 후, 다시 또 30분 반응시켰다.12,000rpm에서 10분간 원심분리하여상등액을 버리고, 다시 2 $\mu$ l 봉산 완충액을 가하여 콜로이달 골드를 세척하고, 마지막 세척 후 2 $\mu$ l 봉산완충액 (pH 7.2)에 현탁시킨 후 소혈청알부민을 1%가 되도록가했다. 콜로이달골드-항체의 농도를 530nm에서 흡광도가 1.0이 되도록 희석한 후유리 섬유 멤브레인에 5(n)를 처리하고 동결건조시켰다.

[실시에 3. 필로폰-단백질 접합체가 고정된 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰]

로오스 멤브레인의 제조

4-아미노부틸유도체화한 필로폰 20 l당에, 증류수에 녹인 오브알부민 20 mg과 1-에틸-3-(3-메틸아미노프로필)카르보디이미드 148 l당을 가하고 4. C에서 하룻밤 반응시킨 후 투석하여 필로폰-오브알부민 접합체를 얻었다.

단백질로 오브알부민 대신 소혈청알부민과 기혈림펫헤모시아닌을 각각 사용하여 필로폰-소혈청알부민 접합체와 필로폰-기혈림펫헤모시아닌 접합체를 얻었다.

폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로스 멤브레인(포어 크기:8-12 $\mu$ )에 필로폰-단백질 접합체(300  $\mu$ g/111  $\mu$ l)를 처리하여 결과선을 만들고(12  $\mu$ g/20cm), 제2항체(토끼면역글로브린 항혈청. 그러나 마약항체의 동물원에 따라 달라질 수 있음)로 실험관리선을처리하여 건조시켰다.

[실시에 4. 시료 멤브레인 제조]

3 $\mu$ l 셀룰로오스 멤브레인을 3-10% 덱스트란, 1% 소혈청알부민, 서당을 함유하는 50mM 봉산완충액(pH 7.2)로 처리하고 건조시켰다.

[실시에 5. 반응액 흡수 멤브레인]

반응액 흡수 멤브레인으로는 17 Chro 셀룰로오스 멤브레인을 사용하였다.

[실시에 6. 점출지 제조]

도 1과 도 3에 예시된 바와 같이, 두꺼운 플라스틱 접착패드 위에 셀룰로오스시료 멤브레인, 유리섬유 멤브레인, 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인, 셀룰로오스 반응액 흡수 멤브레인을 그 순서로 길이방향으로 서로 겹치도록 조립하여 검출지를 만든 후 이것을 5 $\mu$ l 간격으로 세로로 절단하여 도 2와 같은 스트림을 제조하였다.

[실시에 7. 마약 검출실험 (마약 양성시료)]

실시에 6에서 제조된 마약 검출지의 시료 멤브레인에 필로폰 양성시료 5방울(약 150 $\mu$ l)를 떨어뜨리고 5분 이내 결과를 관찰하였다. 필로폰-제2항체가 영구 고정된 위치('실험관리선'이라 함)에 적색이 나타났으며, 필로폰-단백질 접합체가 영구고정된 위치 ('결과선'이라 함)에는 적색이 나타나지 않았다. 이때 마약의 검출강도는 마약-오브알부민 접합체를 사용한 경우 1ppm이었으며 마약-기혈림펫헤모시아닌 또는 마약-소혈청알부민 접합체를 사용한 경우 10ppm이었다.

나. 마약 음성 뇨 경우

마약 음성시료를 사용하여 앞의 실험을 수행한 결과 적색선이 결과선과 실험관리선에 모두 나타났다. 이때 시료 멤브레인에 덱스트란을 처리한 경우 결과선의색깔이 강해져서 판정이 용이해진다.

### 발명의 효과

본 발명에 의해 보다 짧은 시간에 마약 검출 결과를 얻을 수 있고, 검출 결과 판정이 용이하며, 마약에 대한 민감성이 향상된 마약 검출지가 제공된다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

검출하고자 하는 시료가 가해지는, 덱스트란으로 처리된 시료 멤브레인; 상기 시료 멤브레인과 길이방향으로 겹치도록 연결되며, 검출하고자 하는 마약의 항체와 착색미립자를 결합시킨 마약항체-착색미립자가 일시적으로 고정되어 있는 유리섬유 멤브레인;상기 유리섬유 멤브레인과 길이방향으로 겹치도록

연결되며, 검출하고자 하는 마약에 단백질을 접합시킨 마약-단백질·접합체와 상기 마약의 제2항체가 서로 다른 위치에 영구적으로 고정되어 있는 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인; 및 상기 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 길이방향으로 겹치도록 연결되는 반응액 흡수 멤브레인으로 이루어지는, 즉석 마약 검출지.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 마약항체-착색미립자가 마약항체-콜로이드알골드 미립자인 마약 검출지.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 콜로이드알골드 미립자의 크기가 30-50nm인 마약 검출지.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인의 포어 크기가 8-12 $\mu$ m인 마약 검출지.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 마약이 필로폰인 마약 검출지.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 마약-단백질 접합체가 마약-오브알부민인 마약 검출지.

#### 청구항 7

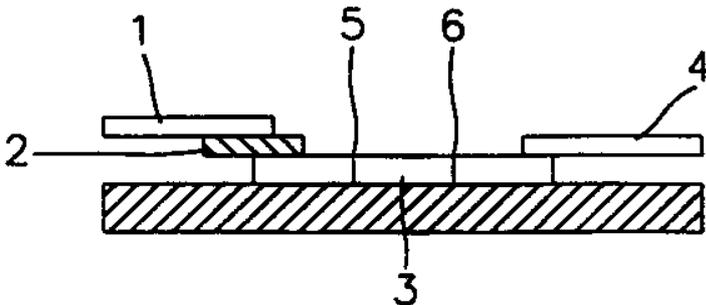
덱스트란을 함유하는 용액으로 패드를 처리하여 시료 멤브레인을 제조하고; 검출하고자 하는 마약의 항체와 착색미립자를 결합시킨 마약항체-착색미립자를 유리성유 멤브레인에 일시적으로 고정되도록 처리하고; 검출하고자 하는 마약에 단백질을 접합시킨 마약-단백질·접합체와 상기 마약의 제2항원을 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스 멤브레인의 다른 위치에 영구 고정되도록 처리하고; 상기 시료멤브레인, 상기 유리성유 멤브레인, 상기 폴리에스테르 지지 나이트로셀룰로오스멤브레인과 반응액 흡수 멤브레인을 순서대로 서로 길이방향으로 겹치도록 조립하는 것으로 이루어지는, 마약 검출지 제조방법.

#### 청구항 8

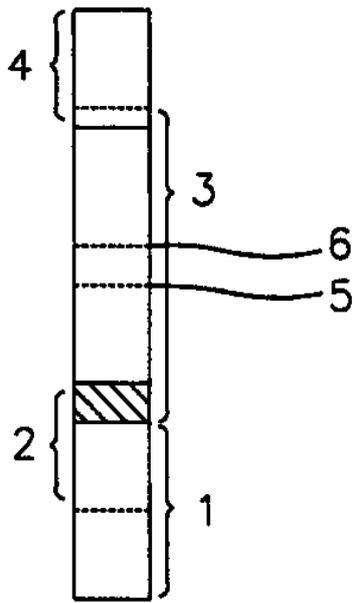
제 7 항에 있어서, 상기 덱스트란의 분자량이 80,000-200,000 달톤 범위이고, 상기 덱스트란을 함유하는 용액이 덱스트란을 3-10% 함유하는 제조방법.

### 도면

#### 도면1



도면2



도면3

