

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) . Int. Cl.⁸*C12Q 1/25 (2006.01)*

(45) 공고일자

2006년02월24일

(11) 등록번호

10-0554649

(24) 등록일자

2006년02월16일

(21) 출원번호

10-2003-0036804

(65) 공개번호

10-2004-0105429

(22) 출원일자

2003년06월09일

(43) 공개일자

2004년12월16일

(73) 특허권자

주식회사 아이센스
 서울 노원구 월계동 465-14

(72) 발명자

최강
 중국길립성연길시신흥가명휘위19조

유재현
 서울특별시 성동구 하왕십리2동999-117

김문환
 경기도부천시오정구고강본동363동원아파트마동501호

김주용
 경기도수원시팔달구우만동528-6

엄정희
 서울특별시 성북구 장위3동174-29

남학현
 서울 강북구 번3동 133-1 한양아파트 101동 206호

차근식
 서울특별시 서대문구 홍은동 9-78

(74) 대리인

이원희

심사관 : 장제환

(54) 전기화학적 바이오센서

요약

본 발명은 바이오센서에서 적혈구용적률(hematocrit)의 양에 따른 측정오차를 획기적으로 감소할 수 있는 감응막 조성을 및 이를 포함한 바이오 센서에 관한 것으로서, 구체적으로 효소, 전자전달매개체, 수용성 고분자, 지방산 및 4차 암모늄 염을 포함한 감응막 조성을; 및 상기 조성을 이루어진 감응막과 혈액시료를 전처리 과정 없이 빠르고 정확하게 도입할 수

있는 시료도입부를 구비한 바이오센서에 관한 것이다. 본 발명의 바이오 센서는 감응막 조성물을 포함하므로서, 바이온센서에서 적혈구용적률의 양에 따른 측정오차를 감소시킬 수 있으며, 새로운 시료도입부를 구비하므로서 수 마이크로 리터 이내의 소량시료를 사용하는 다양한 형태의 전기화학 바이오센서에 쉽게 적용할 수 있다.

대표도

도 3

색인어

바이오센서, 적혈구용적률, 감응막 조성물, 시료도입부, 여분공간부.

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 시료도입부의 바람직한 일례를 도시한 도면이고,

도 2는 본 발명에 따른 바람직한 일례를 도시한 대면형 바이오센서의 분해사시도이고,

도 3은 본 발명의 시료도입부가 도입되고 시료의 유동성을 감지하는 전극이 구비된 대면형 바이오센서의 분해사시도이고,

도 4는 본 발명에서 대면형 바이오센서의 방해물질에 의한 영향 측정도이고,

도 5는 본 발명에서 대면형 바이오센서의 포도당 표준용액에 대한 검정곡선이고,

도 6은 본 발명에서 대면형 바이오센서의 포도당 표준용액에 대한 정압전류법 동적 감응 곡선이고,

도 7은 본 발명의 대면형 바이오센서에서 시료 유동성과 적혈구용적률 사이의 관계를 도시한 곡선이다.

<도면의 주요 부분에 관한 부호의 설명>

100: 시료도입부 101: 시료도입 통로부

102: 통기부 103: 여분공간부

104: 작동전극 105: 보조전극 또는 기준전극

106: 전극연결부 107: 유동 감지 전극

108: 바이오센서 확인전극 200: 중간기판

300: 상부기판 301: 시료확인창

400: 하부기판

발명의 상세한 설명

발명의 목적

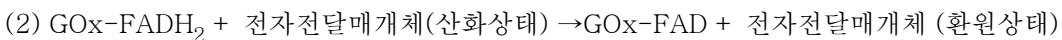
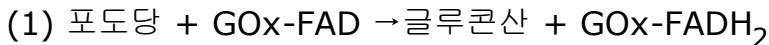
발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 바이오센서용 감응막 조성물 및 이를 포함한 전기화학적 바이오센서에 관한 것으로, 구체적으로 적혈구용적률(hematocrit)의 양에 따른 측정오차를 획기적으로 감소 할 수 있는 바이오센서용 감응막 조성물 및 이를 포함한 전기화학적 바이오센서에 관한 것이다.

최근 당뇨병을 진단하고 예방하는데 있어서 혈액내의 포도당(혈당: blood glucose)의 양을 주기적으로 측정해야 할 필요성이 증대되고 있다. 이러한 혈당 측정은 손에 절 수 있는 휴대용 계측기를 이용하여 손쉽게 측정할 수 있으며, 구체적으로 각자가 스트립 형태의 바이오 센서를 사용하여 손쉽게 측정할 수 있다. 이러한 혈당 측정을 위한 바이오 센서의 작동원리는 비색 방법 또는 전기화학적 방법에 기초하고 있다.

이 중 전기화학적 방법은 하기 반응식 1에 의해 설명되어지며, 가장 큰 특징으로 전자전달 매개체를 사용하는 것이다. 상기 전자전달매개체로는 폐로센(ferrocene), 폐로센 유도체; 퀴논(quinones), 퀴논 유도체; 전이금속함유 유기 및 무기물(헥사아민 루테늄, 오스뮴 함유 고분자, 포타슘 폐리시아나이드 등); 및 유기 전도성 염(organic conducting salt), 비오로겐(viologen)과 같은 전자전달 유기물 등을 사용한다.

반응식 1



(상기 식에서, GOx는 당산화효소(Glucose oxidase)를 나타내고, GO_X-FAD 및 GO_X-FADH₂는 각각 당산화효소의 활성 부위인 FAD(flavin adenine dinucleotide)의 산화상태 및 환원상태를 나타낸다.)

상기 반응식 1에서 보는 바와 같이, (1) 먼저 혈액내의 포도당은 당산화효소의 촉매작용에 의해 글루콘산으로 산화되게 된다. 이때 당산화효소의 활성 부위인 FAD가 환원되어 FADH₂로 된다. (2) 그 후 환원된 FADH₂는 전자전달매개체와의 산화환원반응을 통하여 FADH₂는 FAD로 산화되고, 전자전달매개체는 환원되게 된다. 이렇게 형성된 환원상태의 전자전달 매개체는 전극표면까지 확산되는데, 이때 작동 전극표면에서 환원상태의 전자전달매개체의 산화전위를 인가하여 생성되는 전류를 측정하여 혈당의 농도를 측정하게 된다.

상기와 같은 전기화학적 방법을 작동원리로 하는 바이오 센서를 전기화학적 바이오센서라 한다. 이러한 전기화학적 바이오센서는 종래의 비색 방법에 의한 바이오센서와는 달리 산소에 의한 영향을 줄일 수 있고, 시료가 혼탁하더라도 시료를 별도 전처리 없이 사용 가능하다는 장점을 갖는다.

이러한 전기화학적 바이오센서는 혈당 양을 감시하고 제어하는데 일반적으로 편리하게 사용되지만, 센서의 정확성은 혈액 시료에 존재하는 산화되기 쉬운 아스코르브산(ascorbic acid), 아세토아미노펜(acetaminophene) 및 요산(uric acid)과 같은 다양한 방해 종들에 의해 큰 영향을 받는다. 이외에 다른 심각한 오차는 적혈구용적률에 의해 유발된다. 일회용 바이오 센서 스트립을 사용하여 그들의 혈당 수준을 규칙적으로 측정하는 사람들에게 있어서, 적혈구용적률 수준에 큰 영향을 받는 바이오센서는 그 측정 결과에 있어서 틀린 판단을 가져오게 되고, 이러한 결과로 인해 심지어는 사용하는 사람들의 생명에 대한 위험을 초래할 수 있다.

종래, 바이오센서에서 이러한 적혈구용적률로부터 영향을 감소시키는 방법으로는 추가적으로 적혈구를 분리하거나; 시약 층위에 적혈구를 제거하는 층을 도포하는 방법(JP 1134461, JP 2000338076 및 US 5658444); 규소충진물(silica filler)을 포함하여 스크린 인쇄가 가능한 시약/혈구분리 일체형 기능을 갖는 감응막을 사용하는 방법(US 6241862 B1); 그리고 적용전위를 두번 인가하여(the double excitation potentials) 나온 결과를 수학적으로 처리(chemometric method)하는 교정 방법(WO 01/57510 A2)과 같은 몇 가지 방법들이 제안되어왔다. 그러나 상기 방법들은 그 제조 과정에서 여분의 단계나 그 시약 계층을 인쇄하는 데 있어서 시약의 큰 손실을 가져올 수 있으며, 작동 전극 위에 시약 혼합물을 간단히 도포하기에는 어려움이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 혈액의 적혈구용적률 차에 의한 의존 성향을 획기적으로 감소시킬 수 있는 감응막 조성물에 관한 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 혈액의 적혈구용적률차에 의한 의존 성향을 획기적으로 감소시킬 수 있으며, 혈액시료를 전처리 과정 없이 빠르고 일정하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비한 전기화학적 바이오센서를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 효소, 전자전달 매개체, 수용성 고분자, 지방산 및 4차 암모늄 염을 포함한 감응막 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 감응막 조성물을 함유한 바이오 센서를 제공한다.

즉, 본 발명의 감응막 조성물은 적혈구용적률(hematocrit)의 양에 따른 측정오차를 획기적으로 감소 할 수 있다.

또한, 본 발명의 바이오 센서는 일정 소량의 시료를 빠르게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비하여 극소량 임상 시료도 전처리 과정없이 일정하게 도입할 수 있으며, 재현성 및 신뢰성이 우수하며, 구조가 단순하여 저렴하게 대량 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 효소, 전자전달 매개체, 수용성 고분자, 지방산 및 4차 암모늄 염을 포함한 감응막 조성물을 제공하는 것으로, 상기 감응막 조성물은 아스코르브산, 아세토아미노펜 및 요산 등과 같은 혈액내 방해물질에 따른 신호 크기 변화의 영향을 감소시키며, 또한 적혈구용적률 효과를 획기적으로 감소시킨다.

상기 효소는 상기 반응식 1에 나타낸 바와 같이, 측정하고자 하는 다양한 대사물질과 반응하여 환원되는 것으로, 이후 환원된 효소와 전자전달매개체와 반응하여 대사물질을 정량하게 된다. 본 발명은 혈당 측정 바이오센서를 실시예로 설명하지만, 혈당 검사의 적용과 동일하게 특정효소가 알맞은 전자전달 매개체를 도입함으로서 다양한 대사물질, 예를 들면 콜레스테롤, 락테이트, 크레아티닌, 단백질, 과산화수소, 알코올, 아미노산, GPT(glutamate pyruvate transaminase), GOT (glutamate oxaloacetate transmianse)과 같은 효소 등의 생체 시료, 환경시료, 농업공업 시료 또는 식품 시료 중의 다양한 유기물 또는 무기물 농도도 또한 동일한 방법으로 정량할 수 있다. 따라서, 본 발명은 감응막 조성물에 포함되는 효소의 종류를 달리함으로써 다양한 대사물질의 정량에 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 혈당 산화효소, 락테이트 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 글루타메이트 산화효소, 호스래디쉬(horseradish) 페옥시다아제, 알코올 산화효소 등을 사용해서 콜레스테롤, 락테이트, 글루타메이트, 과산화수소 및 알콜의 정량을 수행할 수 있다. 바람직하게는 혈당 산화효소, 글루코오즈 탈수소화 효소, 콜레스테롤 산화효소, 콜레스테롤 에스테르화 효소, 락테이트 산화효소, 아스코빅산 산화효소(ascorbic acid oxidase), 알코올 산화효소, 알코올 탈수소화효소, 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase) 및 당탈수소화효소로 이루어진 그룹 중에서 선택된 산화효소를 사용한다.

본 발명의 실시예에 따르면, 혈당 측정 바이오센서에서 사용되는 효소는 당산화효소 또는 당탈수소화효소를 사용한다.

전자전달매개체는 대사물질과 반응하여 환원된 효소와 산화환원반응하여 환원되게 되며, 이렇게 형성된 환원상태의 전자전달매개체는 전극표면까지 확산되므로서 전극표면에 산화전위를 인가시켜 전류를 발생시키는 역할을 수행한다. 종래에 사용된 페로센(ferrocene), 페로센 유도체, 퀴논(quinones), 퀴논 유도체, 유기 전도성 염(organic conducting salt) 또는 비오로겐(viologen)을 배제하는 것은 아니라, 바람직하게는 헥사아민루세늄(III)클로라이드(hexaammineruthenium(III) chloride), 포타슘페리시아나이드(potassium ferricyanide), 포타슘페로시아나이드(potassium ferrocyanide), 디메틸페로센(dimethylferrocene(DMF)), 페리시니움(ferricinium), 페로센모노카르복실산(ferocene monocarboxylic acid (FCOOH)), 7,7,8,8,-테트라시아노퀴노디메탄(7,7,8,8-tetracyanoquino-dimethane(TCNQ)), 테트라티아풀발렌(tetrathia fulvalene(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-벤조티오조리논하드라존(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone), 2-메톡시-4-아릴페놀(2-methoxy-4-allylphenol), 4-아미노안티피린(4-aminoantipyrin(AAP)), 디메틸아닐린(dimethylaniline), 4-아미노안티피렌(4-aminoantipyrene), 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) 및 프루시안 블루(prussian blue)로 이루어진 혼합 전자가 화합물 중 선택된 것을 사용한다.

본 발명에서 가장 바람직한 전자전달매개체는 헥사아민루세늄(III)클로라이드로, 상기 전자전달매개체의 경우, (1) 수용액 속에서 산화-환원상태가 안정하며 가역적이고, (2) 환원된 전자전달매개체는 산소와 반응하지 않으며, (3) 전자전달 매개체의 형식전위가 충분히 낮아, 혈액 내의 아스코르브산(ascorbic acid), 아세토아미노펜(acetaminophene) 및 요산(uric acid)과 같은 다양한 방해 종들에 의한 영향을 최소화할 수 있으며, (4) 환원된 전자전달매개체의 산화가 pH에 민감하지 않고, (5) 전기화학적 방해물질인 아스코르브산, 아세토아민노펜 및 요산과 반응하지 않는다는 특성을 갖는다.

수용성 고분자는 감응막 조성물의 고분자 지지체로서 효소의 안정화 및 분산(dispersing)을 돋는 역할을 수행한다. 본 발명에서 PBS 완충용액에 녹이기 전의 고체상태의 감응막 조성물에 대해 0.1~10 중량% 함유하며, 또한 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone; PVP), 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol; PVA), 폴리플루오로솔폰에이트(perfluoro sulfonate), 하이드록시에틸 셀룰로오즈(hydroxyethyl cellulose; HEC), 하이드록시프로필 셀룰로오즈(hydroxypropyl cellulose; HPC), 카르복시메틸 셀룰로오즈(carboxy methyl cellulose; CMC), 셀룰로오즈 아세테이트(cellulose acetate) 또는 폴리아미드(polyamide)을 사용하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 PVP와 HPC를 사용한다.

또한, 본 발명의 감응막 조성물은 적혈구용적률(hematocrit)의 양에 따른 측정오차를 획기적으로 감소시킬 수 있는 물질을 함유한다.

먼저, 지방산은 감응막 조성물에 첨가되므로서, 적혈구용적률 수준 의존 성향을 감소시키는 역할을 수행하며, 또한 고농도 영역에서 바이오센서의 선형 동적 영역(linear dynamic range)을 줄이는 경향을 나타낸다. 상기 지방산은 물 또는 물에 섞이는 용액에 녹여서 조성물에 첨가하고, 고체상태의 조성물에 대해서 0.1~20 중량%를 첨가한다. 이때, 상기 지방산이 0.1 중량% 미만으로 첨가되면 지방산 첨가에 따른 바이오센서의 적혈구용적률 의존 성향을 효과적으로 감소시키지 못하며, 상기 지방산이 20 중량%를 초과하여 과량 첨가되면 조성물 내에서 지방산이 용해되지 않는 문제가 있어 바람직하지 않다. 본 발명에서 지방산은 $C_4 \sim C_{20}$ 의 탄소사슬을 갖는 지방산 또는 그의 지방산염을 사용하며, 바람직하게는 $C_6 \sim C_{12}$ 로 이루어진 알킬탄소사슬을 갖는 지방산 또는 그의 지방산염을 사용한다. 이러한 지방산들로는 포화지방산, 카프로산, 햅타노산, 카프릴산, 노나노산, 카프르산, 언데카노산, 라우르산, 트리디케노산, 마이리스티산, 웬타디케노산, 팔미트산, 햅타디케노산, 스테아르산, 논아데케노산 및 아라키드 산을 포함한다.

또한, 지방산과 함께 4차 암모늄 염이 감응막 조성물에 첨가되므로서, 적혈구용적률 의존 성향을 줄일 수 있다. 바람직하게는 에실트리메틸 암모니움(ecyltrimethylammonium), 마이리스틸트리메틸암모니움(myristyltrimethylammonium), 세틸트리메틸 암모니움(cetyltrimethylammonium), 옥타데실트리메틸 암모니움(octadecyltrimethylammonium) 및 테트라헥실 암모니움(tetrahexylammonium) 등의 할로겐화물 화합물과 같은 사차 암모니뮴(quaternary ammonium salt)을 사용한다. 본 발명에서는 그 적혈구용적률 의존 성향 감소 효과 발휘를 고려하여 고체상태의 감응막 조성물에 대하여 0.1~30 중량% 첨가한다.

또한, 본 발명은 전기화학적 바이오센서를 제공한다. 구체적으로 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부를 구비하고, 작동전극 위에 본 발명의 감응막 조성물이 코팅된 감응막 층을 구비한 전기화학적 바이오센서를 제공한다.

본 발명의 전기화학적 바이오센서는 표면에 스크린 프린팅 방법이나 증착하는 방법으로 형성된 도전성 물질(탄소 또는 금 속 반죽, 금속 증착 그리고 전도성 고분자)이 포함된 고분자 필름의 하부 기판과 덮개; 양면에 접착력을 가진 중간층에 의해 분리된 하부 기판과 덮개사이에 둘러싸여있는 그자 형태의 시료 도입부; 및 적혈구용적률 수준의 의존 성향을 근본적으로 감소하는 감응막 층을 포함한다.

또한, 전기화학적 바이오센서의 전극 시스템은 같은 하부기판이나 하부기판과 덮개 기판 양쪽 모두에 형성될 수 있다. 즉 (1) 하나의 작동전극과 하나의 보조전극(또는 기준전극)은 같은 하부 기판위에 형성되고, (2) 작동전극과 보조 전극은 각각 하부 기판과 덮개 기판에 형성되고 마주보는 형태로 배열된다(대면형 전극; 참고 : E. K. Bauman et al., *Analytical Chemistry*, vol 37, p 1378, 1965; K. B. Oldham in "Microelectrodes: Theory and Applications," Kluwer Academic Publishers, 1991.).

특히, 본 발명에서는 상기 전극 외에 추가로 또 다른 하나의 전극을 형성할 수 있는데, 이를 유동 감지 전극이라 한다. 상기 유동 감지 전극은 작동 전극의 뒤에 배치하여 하부 기판에서 전혈시료의 유동성을 측정하기 위한 것이다. 적혈구용적률은 전혈의 유동성과 피의 전기 전도성을 변화시키므로, 바이오센서의 길고 가느다란 모세관 통로를 통해 혈액이 시료도입부를 채우는 시간은 혈액내의 적혈구용적률에 비례하여 변화한다. 이러한 혈액 시료의 유동성 변화는 유동 감지 전극을 사용하여 감지하므로, 실제 혈액내의 혈당 측정에서 적혈구용적률에 의한 오차를 정정하는데 사용할 수 있다.

그자 형태의 시료 도입부는 바이오센서 스트립 끝으로부터 빠르고 정확하고 편리한 혈액시료의 도입을 가능하게 한다. 이러한 시료 도입부는 시료 도입 통로부, 통기부, 그리고 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 형성된 구조를 구비한다. 본 명세서에서, "교차형성 되어 있다"라 함은 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 일직선으로 배열되어 있는 것이 아니라 한 점에서 교차하는 구조로 되어있음을 의미한다. 이러한 여분공간부는 측정하는 동안 일정하고 정확한 시료양을 통로내에 채울 수 있도록 만들어 주며 통기부를 통해서 과량의 시료를 방출하는데 도움을 준다. 또한 유동성 감지 전극을 배치하는 장소로 이용되기도 한다.

또한 본 발명에서 제시된 감응막은 감응막 조성물을 작동전극 위에 간단히 도포함으로 형성될 수 있다. 이때 감응막 조성물의 양은 300~500 nl가 바람직하다. 사용된 감응막 조성물은 효소, 전자전달 매개체, 수용성 고분자, 지방산 및 4차 암모늄 염을 포함하는 것으로, 아스코르브산, 아세토아미노펜 및 요산 등과 같은 혈액내 방해물질에 따른 신호크기 변화의 영향을 감소시키며, 또한 적혈구용적률 효과를 획기적으로 감소시켜 측정에 대한 재현성 및 신뢰성을 향상시킨다.

추가로, 본 발명의 바이오 센서는 상부기판의 일정 부분을 통해 하부 기판의 유동성 감지전극이 보일 수 있도록 시료 확인창을 구비한다. 상기 시료 확인창은 시료 충만여부를 확인하기 위한 것이다.

이하 첨부된 도면을 통하여 더욱 구체적으로 기술한다.

도 1은 시료도입부의 바람직한 일예를 도시한 것으로서, 기판(200) 내부에 형성된 상기 시료도입부(100)는 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 그자형(수직)으로 교차 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 여분공간부(103)가 형성된 구조를 갖고 있으며, 이들은 하부 기판(400)과 다른 상부기판(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 여분공간부(103)는 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에서 약간의 여유 공간을 제공함으로써 시료도입 통로부(101)가 꺾어지는 구석 부위(또는 교차점 부위)에서 발생할 수 있는 기포형성 현상을 최소화하는 역할을 수행한다. 시료도입 통로부(101)가 꺾어지는 구석부위(또는 교차점 부위)는 전극과 접촉하는 부분으로서, 이곳에 기포형성 현상이 발생하면 정확한 측정이 어려운 문제점이 있게 된다.

상기 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)의 너비의 비는 시료의 빠른 도입을 가능하게 하기 위해 1/2 이하, 가장 바람직하게는 1/5 ~ 1/2의 범위인 것이 바람직하다. 1/2 이하로 조정함으로써, 정확한 시료의 양을 보장 할 수 있을 뿐 아니라, 시료가 빠른 속도로 통기부로 이동함으로써 시료의 빠른 도입을 가능하게 한다. 반면, 상기 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)의 너비의 비가 1/2를 초과하게 되면 시료의 도입속도가 느릴 뿐만 아니라, 정확한 시료의 양을 보장하기 어려워 바람직하지 않다.

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.

도 1에서 보는 것처럼 여분공간부(103)는 시료도입부(101)로부터의 전달지점 뒤로 확장한다. 그리고 기포가 차지 않는 정확한 시료 양을 보장하기 위해, 여분공간부(103)를 포함하는 시료도입 통로부(101)는 친수성 처리가 요구된다.

시료도입부(100)의 전체 부피는 0.1~3.0 $\mu\ell$, 바람직하게는 0.1~1.0 $\mu\ell$, 가장 바람직하게는 0.3~0.7 $\mu\ell$ 의 범위 내에서 조절되는 것이다. 이때, 상기 시료도입부(100)의 전체 부피가 0.1 $\mu\ell$ 미만이면 센서의 오차범위에 의해 영향을 받아 정확

한 측정을 담보할 수 없는 문제점이 있으며, 상기 시료도입부(100)의 전체 부피가 $3.0 \mu\text{l}$ 를 초과하게 되면 과도한 혈액 채취가 필요한 문제점이 있어 바람직하지 않다. 본 발명의 구체적인 예에 따르면, $0.5 \mu\text{l}$ 의 시료 량을 사용하는 것이 바람직하였다.

상기한 구조의 시료도입부(100)를 구비한 기판(200)은 폴리에스테르, 폴리비닐클로라이드(polyvinyl chloride) 및 폴리카보네이트(polycarbonate) 등의 유기 고분자 재료에 프레스를 이용한 성형을 통해 형성할 수 있으며, 바람직하게는 상기 유기 고분자 재료로 만들어진 양면테이프에 프레스 금형을 이용하여 형성할 수 있으며, 또는 도 1에서 보는 것과 같이 도안에 따라 접착층을 스크린 프린팅 함으로써 형성 될 수 있다.

여분공간부(102)의 형성은, 도 1에 도시한 바와 같이, 시료 도입 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 주요한 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 여분공간부(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 여분공간부를 추가로 설치함으로써 시료도입 통로부와 통기부가 교차하는 부위에서의 에어포켓 현상을 방지할 수 있게 된다. 본 발명의 구체예에 따르면, 시료도입부의 전체 부피가 약 $0.5 \mu\text{l}$ 일 때, 시료 충만에 걸리는 시간은, 적혈구용적률, 시료 보관상태 그리고 사용된 혈액 응고 방지제의 형태에 따라 차이가 있을 수 있으나, 약 200~2000 ms 내에 시료도입부가 혈액으로 충만되었다. 보통 신선한 혈액 시료를 사용 시 적혈구용적률 수준의 영향에 따라 시료 도입부의 전체 부피인 약 $0.5 \mu\text{l}$ 를 충만 하는데 걸리는 시간은 약 200~800 ms 이다.

상기한 구조를 갖는 시료 도입부(100)는 다양한 형태의 바이오센서에 도입될 수 있다. 그 예로는 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 구현한 차등식 바이오센서를 들 수 있다.

도 2은 상기한 조성의 감응막을 갖추고 시료도입부가 구비된 대면형 바이오센서의 바람직한 일예를 도시한 분해사시도로서, 상기 대면형 바이오센서는 전자전달 매개체 및 산화효소가 코팅된 작동전극(104) 및 전극연결부(106)가 형성된 하부기판(400); 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 그자형으로 형성되고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 여분공간부(103)가 형성된 구조를 갖는 시료도입부(100)가 구비된 중간기판(200); 및 기준전극 겸 보조전극(105) 및 전극연결부(106)가 아래에 형성된 상부기판(300)을 순차 적층한 구조를 갖는다. 다만, 여기서, 시료 도입부(100)의 구조는 상기에 언급한 바와 같이, 그자형 구조에 한정되는 것이 아니며, 상기에 언급한 바와 같이, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 교차 형성되면 족하고, 여분공간부(103)의 구조 또한 상기에 언급한 바와 같이 변화될 수 있다.

상기한 대면형 바이오센서를 제조하는 방법을 기술하면 다음과 같다. 먼저 하부기판(400)의 상부에 탄소 또는 금속 도체 재질을 스트립의 길이 방향으로 전극(작동전극(104) 및 전극연결부(106))을 인쇄 또는 증착한다. 그리고 상부기판(또는 커버)(300)의 하부에 탄소 또는 금속 도체 재질을 스트립의 길이 방향으로 전극(기준전극 겸 보조전극(105) 및 전극연결부(106))을 인쇄 또는 증착한다. 이와 같이 구성된 하부기판(400)위에, 상기한 구조의 시료 도입부(100)를 구비한 중간기판(200)을 수백 마이크로미터 정도의 높이로 전극의 전기적 연결부위를 제외한 모두 부분에 접착시킨다. 상기 중간기판(200)의 재질은 절연성을 갖는 물질이면 특별히 제한되지 아니하나, 가공성 및 성형성 등을 고려할 때 절연성 고분자가 바람직하다. 또한 하부기판(400)과 상부기판(300)의 접착은 접착제 또는 양면테이프를 이용하여 용이하게 성취될 수 있다. 그 후, 노출된 전극 위에 전자전달매개체 및 산화효소를 분산(dispersing)시켜 고착시키고, 중간기판(200) 위에 상부기판(또는 커버)(300)을 접착제 또는 양면테이프 등을 이용하여 중간기판(200)의 상부에 압착 조립함으로써 대면형 바이오센서를 제작할 수 있다.

즉 시료도입부(100)를 가진 대면형 전극의 제작은 같은 시료도입부를 가지는 평면형 전극에서와 같은 방법으로 완성할 수 있다.

도 3은 상기한 조성의 감응막을 갖추고 시료도입부가 구비된 대면형 바이오센서의 바람직한 일예를 도시한 분해사시도로서, 상기 대면형 바이오센서는 유동성 감지 전극(107), 전자전달 매개체 및 산화효소가 코팅된 작동전극(104), 바이오센서 확인 전극(108) 및 전극연결부(106)가 형성된 하부기판(400); 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 그자형으로 형성되

고, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 만나는 지점에 여분공간부(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, 시료 도입부(100)의 구조는 상기에 언급한 바와 같이, 그자형 구조에 한정되는 것이 아니며, 시료도입 통로부(101)와 통기부(102)가 교차 형성되면 족하고, 여분공간부(103)의 구조 또한 상기에 언급한 바와 같이 변화될 수 있다.

상기한 대면형 바이오센서를 제조하는 방법을 기술하면 다음과 같다. 먼저 하부기관(400)의 상부에 탄소 또는 금속 도체 재질을 스트립의 길이 방향으로 전극(작동 전극(104), 유동성 감지 전극(107), 전극연결부(106) 및 바이오센서 확인 전극(108))을 인쇄 또는 증착한다.

그리고 상부기관(또는 커버)(300)의 하부에 탄소 또는 금속 도체 재질의 전극(기준전극 겸 보조전극(105) 및 전극연결부(106))을 인쇄 또는 증착한다. 여기서 주목할 점은 시료 충만 여부를 확인하기 위해 상부기관(또는 커버)(300)의 일정 부분을 통해 하부 기관의 유동성 감지전극이 보일 수 있도록 구비된 시료 확인창(viewing window; 301)과 스트립의 상표 마크부분을 제외하고 탄소 또는 금속 도체 재질로 기준전극 겸 보조전극(105)을 형성하고 다음으로 전극연결부(106)를 인쇄 또는 증착 했다는 점이다. 이와 같이 구성된 하부기관(400)위에, 상기한 구조의 시료 도입부(100)를 구비한 중간기관(200)을 수백 마이크로미터 정도의 높이로 전극의 전기적 연결부위를 제외한 모두 부분에 접착시킨다. 상기 중간기관(200)의 재질은 절연성을 갖는 물질이면 특별히 제한되지 아니하나, 가공성 및 성형성 등을 고려할 때 절연성 고분자가 바람직하다. 또한 하부기관(400)과 상부기관(300)의 접착은 접착제 또는 양면테이프를 이용하여 용이하게 성취될 수 있다. 그 후, 노출된 전극 위에 전자전달매개체 및 산화효소를 분산(dispersing)시켜 고착시키고, 중간기관(200) 위에 상부 기관(또는 커버)(300)을 접착제 또는 양면테이프 등을 이용하여 중간기관(200)의 상부에 압착 조립함으로써 대면형 바이오센서를 제작할 수 있다.

본 발명의 시료도입부(100)는 도에서 보는 것과 같이 형성될 수 있으며, 여기서 시료 통로부(101), 통기부(102), 여분공간부(103)가 같은 선상에 형성되어 있는한 만족할 수 있다. 또한 여분공간부(103)의 형성은, 도 1에 도시한 바와 같이, 시료 도입 통로부의 연장선상에 형성될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 시료도입 통로부(101) 및 통기부(102)와 동일한 각도를 이루며 형성될 수도 있다.

시료 유동성은 여분공간부(103) 또는 통기부(102) 어느 한쪽에 위치할 수 있는 유동성 감지 전극(107)과 시료 입구근처의 첫 번째 만나는 지점의 전극사이에서 시료가 채워지는 속도 작용으로서 결정되어진다.

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 예폭시, 팔라듐, 구리, 금, 백금, 아리듐, 은/염화은, 탄소 및 특정한 산화-환원쌍 또는 기타 침가제가 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.

위의 언급한 시료도입부(100)가 구비된 바이오센서 다음과 같은 여러 가지 장점을 가지고 있다. (1) 혈액시료를 모세관 현상으로 빠르게 빨아들일 때 교차점 부위에 여분공간부를 만들어 약간의 여유 공간을 둘으로써 시료도입 통로부가 꺾어지는 구석부위에서 발생할 수 있는 기포형성 현상을 최소화 할 수 있으며, (2) 시료 도입부(100)가 가느다란 입구와 통기부에 의해 잘 에워싸여 있고, 전체 시료 통로의 윗부분이 상부 기관(또는 커버)으로 덮여있음으로 인해 센서를 측정하는 기구 물에 장착하거나 탈착할 때 도입된 시료가 누출되어 손에 묻는 일이 줄어들어 위생적이며, 측정시간 동안 시료 증발에 의한 농도의 변화를 최소화 하여 분석적인 재현성을 향상시킬 수 있다. 그리고 (3) 시료통로부와 통기부가 개략적으로 수직인 형태로 이어지는 시료도입부를 가진 바이오센서들은 예정되어진 양의 혈액 시료의 빠른 도입이 가능하고 바이오센서의 정확성과 신뢰도 그리고 재현성을 향상 시킬 수 있다. (4) 마지막으로 본 발명에서 제시하는 형태의 시료 도입부(100)는 센서의 끝 부분에서 시료를 도입할 수 있도록 고안된 것이어서, 채혈부위에서 측정할 혈액과 쉽게 접촉할 수 있으므로 시료도입이 훨씬 편리하다는 장점을 갖는다.

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

<실시예 1> 지방산을 사용하지 않는 감응막 시약의 준비

헥사아민루세늄(III)클로라이드 30 mg(41.6 중량%)와 분산제인 1 mg(1.4 중량%)의 카르복시 메틸 셀룰로오즈(carboxy methyl cellulose), 계면활성제(상품명: Triton X-100) 1 mg(1.4 중량%)그리고 당산화효소 40 mg(55.6 중량%)을 포함하는 혼합물을 pH 6.4 인 1ml PBS 완충용액에 녹이고, 용액 내에 남아있는 미립자들은 걸러서 제거하였다. 이러한 시약용액은 공기압축 분배기(EFD XL100)의 주사기내에 보관하였다.

<실시예 2> 지방산을 사용하는 감응막 시약의 준비

헥사아민루세늄(III)클로라이드 30 mg(23.6 중량%) 와 분산제인 카르복시 메틸 셀룰로오즈(carboxy methyl cellulose) 1 mg(0.8 중량%), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone; PVP) 5 mg(4 중량%), 계면활성제(상품명: Triton X-100) 1 mg(0.8 중량%), 지방산으로 라우르산(lauric acid) 20 mg(15.7 중량%), 브롬화미리스틸트리메틸암모니움(myristyltrimethylammonium bromide) 30 mg(23.6 중량%) 그리고 당산화효소 40 mg(31.5 중량%)을 포함하는 혼합물을 pH 6.4 인 1ml PBS 완충용액에 녹이고, 용액 내에 남아있는 미립자들은 걸러서 제거하였다. 이러한 시약용액은 공기압축 분배기(EFD XL100)의 주사기내에 보관하였다.

<실시예 3> 2 전극계 대면형 바이오센서의 제작

도 2에서와 같은 형태의 작동전극과 전기연결부를 탄소반죽으로 스크린 프린팅한 후 140°C에서 5분간 열처리하였다. 그 후 전기연결부의 끝부분에 은반죽을 중간기판 전극의 두께가 되도록 스크린 프린팅하여 회로연결부를 완성하였다. 상부기판 전극을 탄소반죽으로 기준전극 겸 보조전극으로 스크린 프린팅하여 하부기판 전극 제작시와 동일한 조건에서 열처리하였다. 기준전극 겸 보조전극의 끝 부분을 은반죽으로 회로연결부를 형성시켜 대면형 바이오센서의 상부기판 전극으로 제작하였다.

폴리에스터 재질의 양면테이프에 도 2에 도시된 모양의 시료 도입 통로부, 통기부 및 여분공간부를 포함하는 중간기판을 프레스 금형으로 제작하였다. 시료 도입 통로부와 통기부의 너비 비는 2:1이 되도록 조절하였다. 이렇게 형성된 시료도입부의 전체 부피는 0.5 μl 가 되도록 제작되었다.

도 2에서 보는 것과 같이 바이오센서를 완성하기 위하여 전극이 인쇄된 하부기판 위에 중간기판을 압착하여 조립하였다. 다음 노출된 시료통로 부위의 작동 전극 위에 실시예 1 또는 2에서의 시약 용액을 도포한 후 45°C에서 30분간 건조시켰다. 효소 혼합물이 건조된 후 중간기판의 윗면을 상부기판 전극으로 회로연결부가 잘 연결되도록 압착하여 대면형 바이오센서를 제작하였다.

<실시예 4> 유동성 감지전극을 가진 바이오센서 제작

도 3에서와 같이 덮개 면 거의 모든 부분을 프린트하여 보조전극을 형성한 것 이외에, 실시예 3에서 기술된 것과 동일한 방식으로 유동성 감지전극을 가진 대면형 혈당 센서를 제작하였다. 유동성 감지전극의 끝부분은 시료도입 부분의 여분공간부에 위치한다.

도 3에서 보는 것과 같이 바이오센서를 완성하기 위하여 전극이 인쇄된 하부기판 위에 중간기판을 압착하여 조립하였다. 다음 노출된 시료통로 부위의 작동 전극 위에 실시예 1 또는 2에서의 시약 용액을 도포한 후 45°C에서 30분간 건조시켰다. 마지막으로 효소 혼합물이 건조된 후 중간기판의 윗면을 상부기판 전극으로 회로연결부가 잘 연결되도록 압착하여 대면형 바이오센서를 제작하였다.

<실험예 1> 대면형 글루코오스 센서에서의 방해물질에 의한 영향 검증

실시예 3에 의해 제작된 평균값 0.5 μl 시료도입부를 가진 대면형 글루코오스 센서에서의 글루코오스, 아스코르브산, 아세토아민노펜 및 요산과 같은 방해물질 및 완충용액에 대한 영향을 측정하였다.

구체적으로, (a) 글루코오스 177 mg/dL를 PBS 완충용액(PBS Buffer pH 7.4)에 녹인 용액, 방해 물질인 (b) 글루코오스 177 mg/dL + 아세토아민노펜 660 μM , (c) 글루코오스 177 mg/dL + 아스코르브산 570 μM , (d) 글루코오스 177 mg/dL + 요산 916 μM 을 포함하는 각각의 용액에 대한 감응 전류를 측정하였다. 이때, 전체 감응 전류는 기준전극 대비 인가전위 + 0.2 V 전위를 작동전극에 걸고 5초 후에 대시간전류법의 감응을 읽어서 측정하였다. 결과는 도 4에 나타내었다.

도 4에서 볼 수 있듯이, 글루코오스 177 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 177 mg/dL에 아세토아민노펜 660 μM(b 직선), 아스코르브산 570 μM(c 직선), 요산 916 μM(d 직선)을 포함하는 용액에 대한 측정결과는 큰 차이가 없었다. 이러한 결과로부터, 기준전극(Ag/AgCl) 대비 인가전위 0.2 V에서는 전기화학적 바이오센서에 대한 방해물질들의 작용이 미미함을 알 수 있다.

<실험 예 2> 대면형 글루코오스 센서의 글루코오스 표준용액에 대한 검정

실시예 3에 의해 제작된 대면형 글루코오스 센서를 이용하여 글루코오스 표준용액에 대한 검정테스트를 수행하였다.

구체적으로, 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. 이때, 센서도입부에 적용된 시료의 양은 0.5 μl이며, 시료가 도입부를 채우는데 걸리는 시간은 약 200 ms 이내였다. 측정은 시료가 시료도입부를 채운 후 2초의 반응시간을 주고, 다음 0.2 V의 전압을 3초간 가하여 5초에서의 전류 값을 읽었다. 결과는 도 5에 나타내었다.

도 6는 정압전류법 측정의 동적 감응 곡선으로서, 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. 도 6에서 보는 바와 같이, 본 발명의 바이오 센서는 빠른 시간에 정전류(steady state current)에 도달하여 측정에 대한 결과가 신속하고 정확할 수 있음을 보여준다.

또한, 본 발명의 바이오 센서에서 얻을 수 있는 감응 기울기는 0.093[μA/(mg/dL)]이고, 선형성은 0.997으로, 본 발명의 바이오센서가 탁월한 직선성 감응을 보여주었다(도 5 참조).

<실험 예 3> 혈액 유동성 측정과 적혈구용적률 성향 보정

실시예 4에 의해 제작된 유동성 감지 전극이 구비된 대면형 글루코오스 센서를 이용하여 혈액 유동성 측정과 적혈구용적률 성향 보정 테스트를 수행하였다. 구체적으로, 200 mV의 전위를 작동전극과 유동성 감지 전극에 인가하였다. 시료도입부를 통해 혈액시료가 도입되면 순간 전류의 흐름이 감지되고 유동시간 측정이 시작된다. 시료가 여분공간부에 접촉함과 동시에, 두 번째 순간전류가 감지되고, 첫번째와 두번째 순간전류 사이의 시간 간격이 기록된다. 이러한 시료도입시간과 적혈구용적률 사이의 상관관계를 도 7에 나타내었다. 실험은 180 mg/dL 혈당과 다양한 양의 적혈구용적률 수준을 포함하는 플루오르화 소디움(sodium fluoride)으로 처리된 전혈을 사용해서 실시하였다.

실험 결과, 하기 수학식 1과 같은 관계식(fitting equation)을 얻을 수 있었다.

수학식 1

$$Y = -72.23 + 0.58691X - 0.00084073 X^2 - 1.1211 \times 10^{-6} X^3 + 5.7521 \times 10^{-9} X^4$$

$$- 9.1172 \times 10^{-12} X^5$$

(상기식에서, Y 는 유동성 감지전극을 사용해서 측정되어진 시료 충만시간 X로부터 얻은 추정된 적혈구용적률 수준이다.)

하기 표 1은 시료 충만 시간의 속도로부터 추정되어진 적혈구용적률 수준을 보여준다.

[표 1]

실시예 4에 의해 제작된 바이오센서의 시료 충만 시간으로부터 추정되어진 적혈구용적률 수준

준비된 시료의 적혈구용적률 (%)	속도 (ms)	추정된 적혈구용적률 (%)
30 %	326	30.3 %
35 %	352	32.8 %
40 %	530	41.8 %

45 %	634	44.0 %
50 %	1129	50.1 %
55 %	1791	54.7 %

독립적인 실험으로 보정 곡선은 다양한 적혈구용적률 수준에서 전혈을 사용해 얻어졌고 그리고 적혈구용적률 수준과 감응 기울기 사이의 상관관계는 표 2에 공식화되었다.

[표 2]
서로 다른 적혈구용적률 수준에서 보정 곡선

적혈구용적률	관계식 ($y = \text{전류 } \mu\text{A}; X = \text{혈당}$)
30 %	$y = 0.035934 x - 1.7228$
35 %	$y = 0.030559 x - 1.31815$
40 %	$y = 0.025831 x - 1.0137$
45 %	$y = 0.021752 x - 0.80945$
50 %	$y = 0.018322 x - 0.7054$
55 %	$y = 0.015539 x - 0.70155$

이와 같은 방식으로 유도된 수정항은 40% 적혈구용적률 수준을 가지는 전혈에 대해 측정되어진 혈당 수준을 재보정하는데 이용되고, 결과적으로 이러한 보정을 거친 바이오센서들은 적혈구용적률에 영향을 받지 않고 혈당 농도의 측정을 할 수 있다. 즉, 측정기는 처음 시료도입 속도를 읽고 혈액시료내의 적혈구용적률을 결정한다. 그리고 표에서 일치하는 보정곡선을 찾아서 측정되어진 전류 값으로부터 보정된 혈당 수준을 결정하게 된다.

표 3은 이와 같은 방식으로 실행한 실험의 결과를 보여준다.

[표 3]
전혈에서 혈당 농도; 시료 도입 속도는 유동성 감지전극으로 측정하였고, 전혈의 혈당 수준을 계산하기 위해 표 2의 보정 곡선을 이용함

적혈구용적률 %	혈당 YSI 2300 (mg/dL)	적혈구용적률 영향을 보정한 혈당치 (mg/dL)
30 %	111	117
	202	186
	381	392
35 %	138	141
	200	207
	276	277
40 %	107	112
	196	195
	266	264
45 %	103	105
	190	189
	367	363
50 %	102	107
	142	143
	253	256
55 %	125	144
	241	240
	332	331

유동성 감지 전극은 또한 혈액시료의 비정상적인 유동성을 구별해내었다. 이런 현상은 너무 낮거나 높은 적혈구용적률 수준을 가진 시료거나 공기 방울 형성으로 인한 혈액 시료의 잘못된 도입 등에서 발생할 수 있다. 측정시 이러한 경우는 측정 장치에서 프로그램에 의해 경고 메시지나 오류코드가 나타내게 한다.

<실험 예 4> 시약 총에 함유된 지방산에 의한 감소된 적혈구용적률 방해작용

실시예 4에 의해 바이오센서 스트립을 제작하였다. 헤파린(heparin; 혈액응고 방지제)으로 처리한 전혈시료는 혈장과 적혈구용적률로 원심분리기를 이용하여 분리하고 20, 40, 60 %의 세가지 다른 적혈구용적률 수준의 혈액시료를 얻기 위해 다시 섞었다. 혈당 측정에 대한 적혈구용적률의 영향은 실시예 1과 2에서 준비된 시약총을 사용한 바이오센서를 사용하여, 세 가지 다른 혈당 농도에서 평가되었다. 그 결과는 표 4 및 표 5에 나열하였다.

[표 4]

혈당 측정에서 실시예 1의 감응막 시약총을 사용한 바이오센서에서 관측된 적혈구용적률 영향

시료	1			2			3		
적혈구용적률 수준	20	40	60	20	40	60	20	40	60
YSI 혈당 수준 (mg/dL)	137	126	113	264	238	228	389	377	339
실시예 1의 시약을 사용한 바이오센서	175	125	88	365	231	146	544	369	114
40 % 적혈구용적률 수준의 성향 % 관계	29	0	-22	42	0	-34	43	0	-66

40 % 적혈구용적률 결과에 비해 벗어난 정도 = {(본 발명 바이오센서에 의한 혈당 수준/ YSI 장비에 의한 혈당 수준)/(40 % 적혈구용적률에서 본 발명 바이오센서에 의한 혈당 수준/40 % 적혈구용적률에서 YSI 장비에 의한 혈당 수준)-1} ×100

[표 5]

혈당 측정에서 실시예 2의 감응막 시약 조성을 사용한 바이오센서에서 측정된 적혈구용적률의 영향성

시료	1			2			3		
적혈구용적률 수준	20	40	60	20	40	60	20	40	60
YSI 혈당 수준 (mg/dL)	120	111	107	212	199	191	435	398	374
실시예 2의 시약을 사용한 바이오센서	133	114	99	241	201	185	423	382	334
40 % 적혈구용적률 수준의 성향 % 관계	8	0	-10	13	0	-4	1	0	-7

실험결과, 실시예 2에 의해 준비된 시약을 사용한 바이오센서는 실질적으로 적혈구용적률 영향이 뚜렷이 감소되고 임상학적 허용 범위 내에 있는 40 % 적혈구용적률 수준에 대한 상대오차를 보임을 분명히 알 수 있다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 바이오센서 스트립에서 적혈구용적률(혈액내의 적혈구용적률의 비의 양)에 따른 측정오차를 획기적으로 감소시킨 감응막 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서 제시된 시약조성을 사용하여 혈액내 방해물질과 혈액내의 전극활성 물질, 또한 적혈구용적률에 따른 신호크기 변화의 영향을 획기적으로 감소시킨 바이오센서를 제작하였다.

또한 본 발명은 전기화학적 바이오센서에 있어서, 상기 감응막 조성물으로 이루어진 감응막 총 및 전처리 과정 없이 빠르고 일정하게 도입할 수 있는 시료도입부를 구비하고, 추가로 전혈시료의 유동성을 측정할 수 있는 유동 감지 전극을 구비한 전기화학적 바이오센서를 제공하였다. 이에 따라서 본 발명에 의한 바이오센서는 구조가 단순하고 제조가 용이하며, $0.3 \sim 0.7 \mu\text{l}$ 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 방해물질과 적혈구용적률에 영향을 받지 않고 정확하게 측정할 수 있어 매우 유용하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

산화성 효소, 전자전달 매개체, 수용성 고분자, 지방산 및 4차 암모늄 염을 포함한 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 산화성 효소가 혈당 산화효소, 글루코오즈 탈수소화 효소, 콜레스테롤 산화효소, 콜레스테롤 에스테르화 효소, 락테이트 산화효소, 아스코빅산 산화효소, 알코올 산화효소, 알코올 탈수소화 효소, 빌리루빈 산화효소 및 당탈수소화효소로 이루어진 그룹 중에서 선택된 산화효소인 것을 특징으로 하는 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 전자전달 매개체가 헥사아민루세늄(III)클로라이드, 포타슘페리시아나이드, 포타슘페로시아나이드, 디메틸페로센, 페리시니움, 페로센모노카르복실산, 7,7,8,8,-테트라시아노퀴노디메탄, 테트라티아풀발렌, 니켈로센, 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-벤즈티아졸린 술포네이트], o-디아니지딘, o-톨루이딘, 2,4-디클로로페놀, 4-아미노페나논, 벤지딘 및 프루시안 블루로 이루어진 그룹 중 선택된 것을 특징으로 하는 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 수용성 고분자가 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 폴리플루오로술폰에이트, 하이드록시에틸 셀룰로오즈, 하이드록시프로필 셀룰로오즈, 카르복시메틸 셀룰로오즈, 셀룰로오즈 아세테이트 및 폴리아미드로 이루어진 그룹 중 선택된 것을 특징으로 하는 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 지방산이 $C_4 \sim C_{20}$ 의 지방산 또는 지방산염이며, 고체상태의 조성물에 대하여 0.1~20 중량% 포함되는 것을 특징으로 하는 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 지방산이 포화지방산, 카프로산, 햅타노산, 카프릴산, 노나노산, 카프르산, 언데카노산, 라우르산, 트리디케노산, 마이리스티산, 웬타디케노산, 팔미트산, 햅타디케노산, 스테아르산, 논아데케노산 및 아라키드 산으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 4차 암모늄 염이 도데실트리메틸암모니움, 에실트리메틸 암모니움, 마이리스틸트리메틸암모니움, 세틸트리메틸 암모니움, 옥타데실트리메틸 암모니움 및 테트라헥실 암모니움등의 할로겐 화합물으로 이루어진 그룹 중 선택된 것을 특징으로 하고, 고체상태의 조성물에 대하여 0.1~30 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오센서용 감응막 조성물.

청구항 8.

전기화학적 바이오센서에 있어서, 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부를 구비하고, 작동전극 위에 청구항 1의 감응막 조성물이 코팅된 감응막 층을 구비한 전기화학적 바이오센서.

청구항 9.

제 8항에 있어서, 여분공간부에 추가로 전극을 배치하여 하부 기판에서 전혈시료의 유동성을 측정할 수 있는 유동 감지 전극을 구비한 바이오센서.

청구항 10.

제 8항에 있어서, 상기 시료도입 통로부와 통기부의 너비의 비가 1/2 이하인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 11.

제 8항에 있어서, 상기 시료도입부의 전체부피가 0.1~3.0 $\mu\ell$ 인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 12.

삭제

청구항 13.

제 8항에 있어서, 상기 바이오센서가 감응막 조성물이 코팅된 작동전극 및 보조전극이 형성된 하부기판; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 중간기판; 및 상기 시료도입부가 외부로 노출되는 것을 방지하기 위한 상부기판(또는 커버)이 순차 적층된 구조를 갖는 평면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 14.

제 8항에 있어서, 상기 바이오센서가 감응막 조성물이 코팅된 작동전극 및 전극연결부가 형성된 하부기판; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 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 15.

제 8항에 있어서, 상기 바이오센서가 양면에 작동전극 및 보조전극 겸 기준전극이 형성된 제1중간기판; 시료도입 통로부와 통기부가 교차 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 제2중간기판이 제1중간기판의 양면에 적층되고, 상기 시료도입부가 외부로 노출되는 것을 방지하기 위한 2개의 상부기판(또는 커버)이 제2중간기판에 각각 적층된 구조를 갖는 차등식 평면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 16.

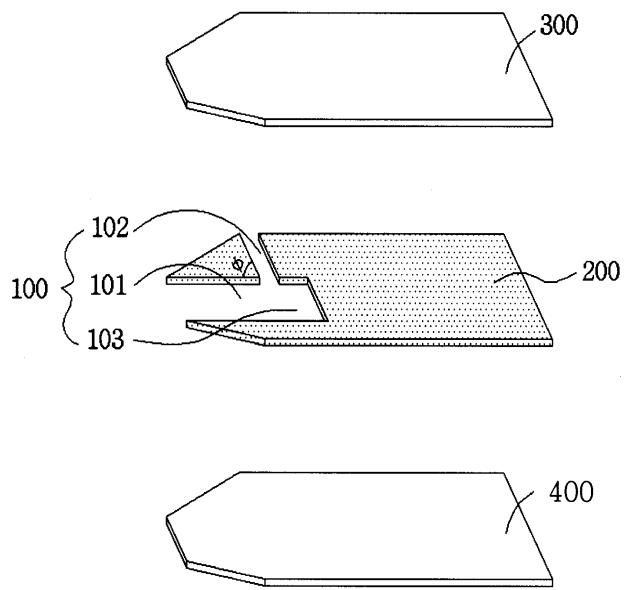
제 8항에 있어서, 상기 바이오센서가 양면에 작동전극 및 전극연결부가 형성된 제1중간기판; 시료도입 통로부와 통기부가 그자형으로 형성되고, 시료도입 통로부와 통기부가 만나는 지점에 여분공간부가 형성된 구조를 갖는 시료도입부가 구비된 제2중간기판이 상기 제1중간기판의 양면에 적층되고, 기준전극 겸 보조전극 및 전극연결부가 형성된 2개의 상부기판(또는 커버)이 제2중간기판에 각각 적층된 구조를 갖는 차등식 대면형 바이오센서인 것을 특징으로 하는 바이오센서.

청구항 17.

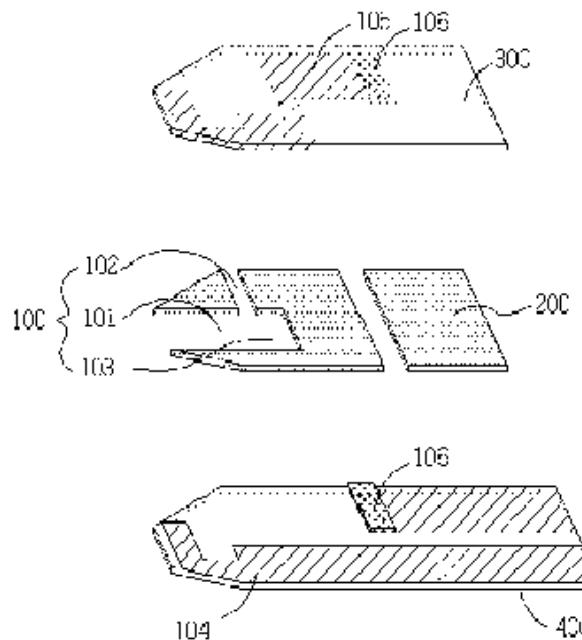
제 13항 내지 제 16항 가운데 어느 한 항에 있어서, 상부기판 일정부분을 통해 하부 기판의 유동성 감지전극이 보일 수 있도록 시료 충만 여부를 확인하기 위한 시료 확인창을 추가로 구비하는 것을 특징으로 하는 바이오센서.

도면

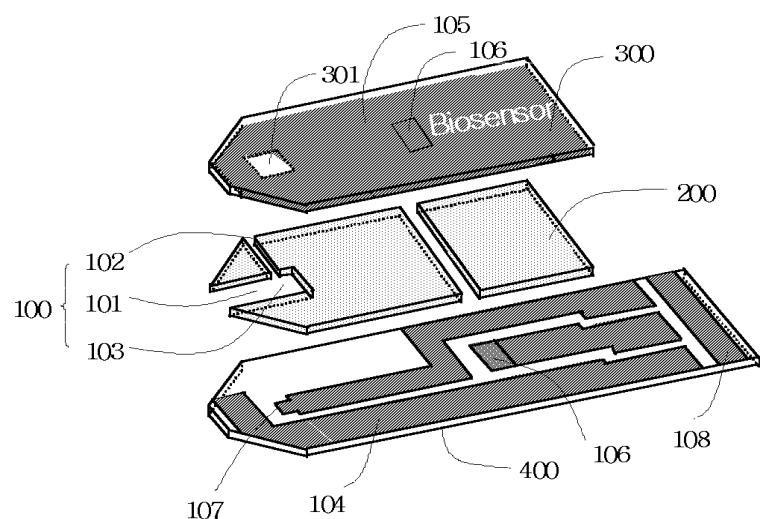
도면1



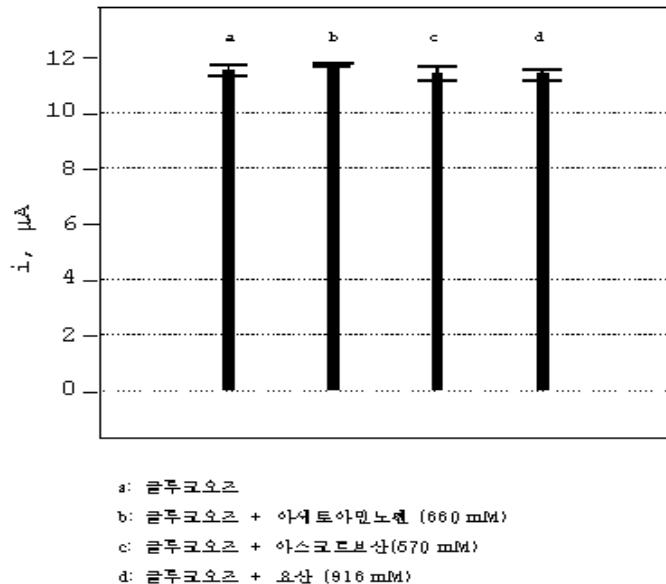
도면2



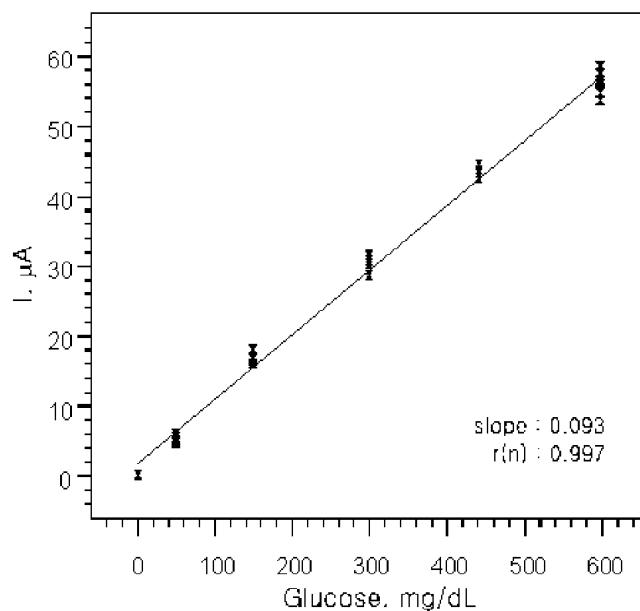
도면3



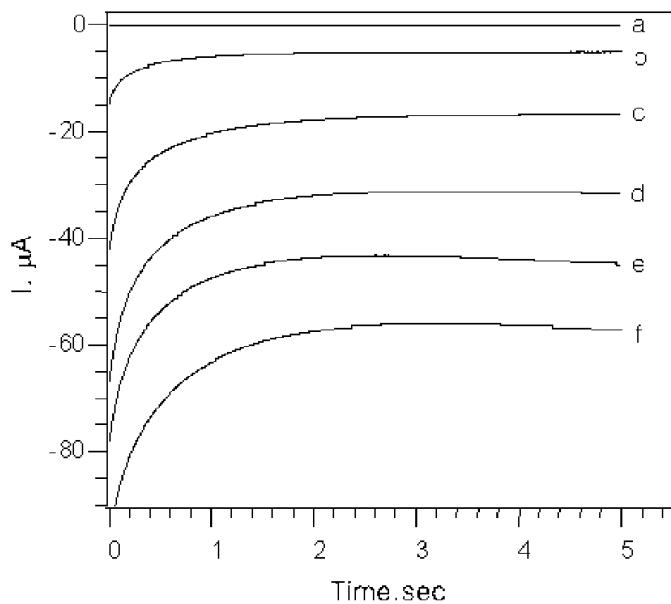
도면4



도면5



도면6



도면7

