



- (51) 국제특허분류:  
G01N 27/327 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)  
G01N 33/66 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/009775
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 1일 (01.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2015-0123704 2015년 9월 1일 (01.09.2015) KR  
10-2016-0111539 2016년 8월 31일 (31.08.2016) KR
- (71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 46241 부산시 금정구 부산대학로 63 번길 2 (장전동, 부산대학교), Busan (KR).
- (72) 발명자: 심윤보 (SHIM, Yoon-Bo); 47515 부산시 연제구 거제천로 233, 110 동 806 호, Busan (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1 차 601 호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

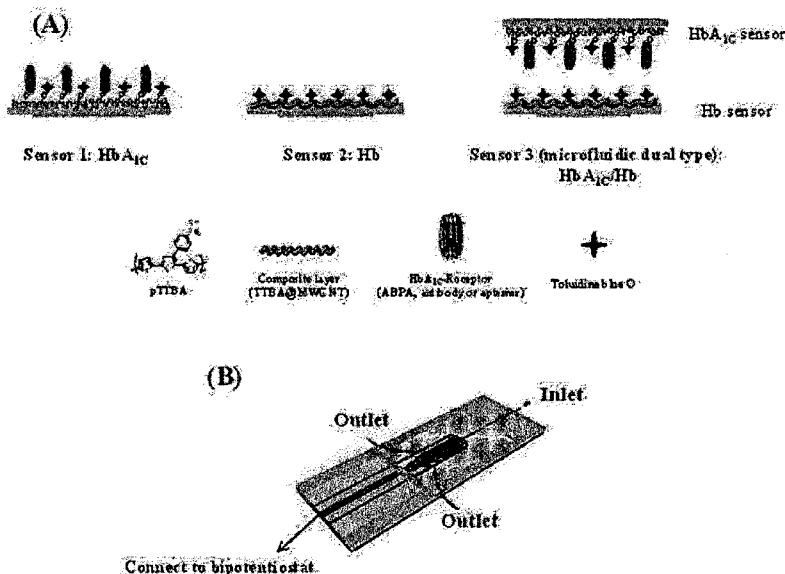
## 공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ONE-TIME-USE AMPEROMETRIC DETECTION METHOD FOR SIMULTANEOUSLY MEASURING HEMOGLOBIN AND GLYCATED HEMOGLOBIN

(54) 발명의 명칭 : 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 일회용 전류식 검출방법

## [도1]



(57) Abstract: The present invention relates to a one-time-use amperometric detection method for simultaneously detecting hemoglobin and glycated hemoglobin, the method being capable of simply and safely detecting with a high sensitivity total hemoglobin and glycated hemoglobin, which are present in the blood. The concentrations of hemoglobin and glycated hemoglobin in a blood sample can be rapidly and precisely measured since an amperometric method is used instead of a measurement method such as high-performance liquid chromatography (HPLC) or impedance method, which has been conventionally used, and diabetes can be effectively diagnosed by an on-site one-time-use amperometric analysis method since the concentrations of hemoglobin and glycated hemoglobin can be simultaneously measured, so as to obtain the ratio thereof without a step of isolating the two materials.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 본 발명은 혈액 중에 존재하는 총 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈을 간단하면서도 높은 민감도로 안전하게 검출할 수 있는 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 일회용 동시 검출 전류식 검출방법에 관한 것으로서, 종래 사용해 오던 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 또는 임피던스 방법 등의 측정방법 대신 전류법을 사용함으로써, 혈액 시료 내의 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 농도를 빠르고 정확하게 측정할 수 있고, 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈의 분리단계를 거치지 않고 동시에 두 물질의 농도를 측정하여 그 비율을 구할 수 있어, 현장 즉시형의 일회용 전류식 분석 방법으로 당뇨병을 효과적으로 진단할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 일회용 전류식 검출방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 혈액 중에 존재하는 총 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈을 간단하면서도 높은 민감도로 안전하게 검출할 수 있는 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서 및 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 당뇨병은 체내에 흡수된 포도당을 제대로 사용하지 못하는 부적절한 탄수화물 대사로 인하여 발생하며, 혈액 내에 과다한 혈당을 가지게 되어 다양한 합병증을 유발할 수 있는 질환이다.
- [3] 당뇨병을 진단하는 방법으로는 요당측정, 혈중 포도당 측정 등 여러 가지가 있지만, 요당측정은 신뢰할 수 없으며, 혈중 포도당은 식사, 운동 등 여러 요인의 영향을 받아 부정확하다. 따라서, 당뇨병을 관리하고 치료하기 위해서는, 3개월 간의 평균 혈당치가 중요시 되고 있으므로, 혈액 중 당화 헤모글로빈(HbA<sub>1c</sub>)을 측정하는 것이 효과적이다.
- [4] 성인의 헤모글로빈은 97%의 헤모글로빈 A, 2.5%의 헤모글로빈 A2 및 0.5%의 헤모글로빈 F의 세 종류로 구성되어 있다. 이중 헤모글로빈 A는 141개의 아미노산을 가진 두 개의 알파체인과 146개의 아미노산을 가진 두 개의 베타체인으로 이루어진 네 개의 폴리펩타이드 구조이다. 헤모글로빈 A를 크로마토그래피법으로 분석해 보면 약 95%의 일반적인 헤모글로빈과 약 5 내지 6% 정도의 미량 당화 헤모글로빈으로 구성되며, 이들 당화 헤모글로빈을 통칭하여 헤모글로빈 A1라고 한다. 이러한, 헤모글로빈 A1의 80%는 베타사슬 N-말단의 발린 잔기에 포도당이 결합된 형태로 헤모글로빈 A1a, 헤모글로빈 A1b, 헤모글로빈 A1c 등이 알려져 있다.
- [5] 단백질의 아미노기에 당 잔기가 비효소적인 반응으로 결합하는 것을 당화 과정이라 하며, 이 반응은 매우 점진적인 비가역적인 반응이다. 당화 헤모글로빈은 헤모글로빈과 혈중 포도당의 결합에 의해 형성되고, 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈의 비율은 적혈구와 혈중 포도당의 노출 정도에 의해 결정된다. 구체적으로, 당화 과정에서는 헤모글로빈 A의 발린 잔기에 포도당이 결합하여 헤모글로빈 A1c 전구물질을 형성하게 되며, 이는 재배열 반응을 통해 안정적인 케토아민 결합을 가진 헤모글로빈 A1c가 된다. 이때 혈액 내의 포도당 수치가 높아지면 포도당과 헤모글로빈의 접촉빈도가 높아지고, 당화 헤모글로빈의 비율도 증가하게 된다. 따라서 당화 헤모글로빈의 비율로써 혈액 내 포도당 수치의 정확한 정량이 가능하다. 또한, 적혈구의 수명은 60 내지

120일 정도이므로 비교적 긴 기간 동안 혈중 포도당 농도변화를 모니터링 할 수 있다.

- [6] 혈액 내의 당화 헤모글로빈을 측정하기 위한 다양한 측정법이 개발되어 왔다. 현재 상업적으로 응용되고 있는 방법으로는 이온교환 크로마토그래피법, 친화성 크로마토그래피법, 전기영동법, 복합착색법 등이 있다. 그러나, 이러한 방법들은 다량의 혈액 (정맥혈), 혈액의 전처리/분석을 위한 고가 장비들 (초고속 원심분리기, 고성능 액체 크로마토그래피) 및 분석을 위한 많은 시간이 요구된다. 당화 헤모글로빈의 측정은 통상 병원에서 전문 인력이 수행하는 방법으로 당뇨병자들이 주기적으로 병원을 방문해서 당화 헤모글로빈의 수치를 검사해야 하는 번거로움과 사회적 비용이 발생한다.
- [7] 따라서, 상기 지적된 문제점을 극복하기 위해 전위차 분석법을 이용한 당화 헤모글로빈의 측정용 센서에 대한 개발이 진행 중에 있으나, 아직까지 전류법을 이용하여 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈을 높은 민감도로 검출하면서 동시 측정 검출 방법에 대해서는 전무한 상황이다.

### **발명의 상세한 설명**

#### **기술적 과제**

- [8] 이에, 본 발명의 목적은 시간대-전류법을 이용한 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서를 이용하여 일반인들도 가정에서 신속성 및 정확성이 구비된 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈을 검출할 수 있는 일회용의 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 검출 전류식 검출방법을 제공하는 데에 있다.

#### **과제 해결 수단**

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 당화 헤모글로빈 검출용 제1센서 및 헤모글로빈 검출용 제2센서를 포함하며, 상기 제1센서는, 전극; 상기 전극 표면에 코팅된 금나노입자층; 상기 금나노입자층 상에 전착된 전도성 고분자 층; 및 상기 전도성 고분자 층 상에 공유결합된 당화 헤모글로빈의 수용체와 유기전자전달 매개체를 포함하고, 상기 제2센서는, 전극; 상기 전극 표면에 전착된 전도성 고분자 복합층; 및 상기 전도성 고분자 복합층 상에 공유결합된 유기전자전달 매개체를 포함하며, 상기 전도성 고분자 복합층은 전도성 고분자와 전극 촉매 물질로 이루어진 것이고, 상기 제1센서와 제2센서를 대향하여 배치한 듀얼 타입의 센서로 형성된 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서를 제공한다.
- [10] 또한 본 발명은 당화헤모글로빈을 검출하는 제1센서를 제작하는 단계; 헤모글로빈을 검출하는 제2센서를 제작하는 단계; 및 상기 당화헤모글로빈을 검출하는 제1센서와 헤모글로빈을 검출하는 제2센서를 대향하여 배치한 듀얼 타입의 센서를 제작하는 단계를 포함하며, 상기 제1센서를 제작하는 단계는,

전극 표면 상에 금나노입자 층을 코팅하는 단계, 상기 금나노입자 층 상에 전도성 단량체를 첨가하고, 전해중합하여 전도성 고분자 층을 전착시키는 단계, 상기 전도성 고분자 층의 작용기를 활성화시키는 단계, 및 상기 작용기가 활성화된 전도성 고분자 층 상에 당화 헤모글로빈의 수용체인 당화 헤모글로빈의 수용체와 유기전자전달 매개체를 공유결합시키는 단계를 포함하고, 상기 제2센서를 제작하는 단계는, 전극 표면 상에 전도성 단량체와 전극 촉매물질의 혼합물을 첨가하고, 전해중합하여 전도성 고분자 복합층을 전착시키는 단계, 상기 전도성 고분자 복합층의 작용기를 활성화시키는 단계, 및 상기 작용기가 활성화된 전도성 고분자 복합층 상에 유기전자전달 매개체를 공유결합시키는 단계를 포함하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서의 제조방법을 제공한다.

- [11] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 혈액 시료를 용혈시키거나 과산화수소를 처리하는 단계; 및 상기 용혈시키거나 과산화수소를 처리된 혈액 시료를 청구항 1에 따른 듀얼 타입의 센서 표면에 도입하여 과산화수소의 촉매 환원전류 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류를 분석하는 단계를 포함하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [12] 본 발명은, 종래 사용해 오던 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 또는 임피던스 방법 등의 측정방법 대신 전류법을 사용함으로써, 혈액 시료 내의 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 농도를 빠르고 정확하게 측정할 수 있고, 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈의 분리단계를 거치지 않고 동시에 두 물질의 농도를 측정하여 그 비율을 구할 수 있어, 현장 즉시형의 일회용 전류식 분석방법으로 당뇨병을 효과적으로 진단할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [13] 도 1(A)는 당화 헤모글로빈(제1센서), 헤모글로빈(제2센서), 및 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 듀얼센서(제3센서) 제작 과정이며, 도 1(B)는 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈의 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서의 모식도이다.
- [14] 도 2(A)는 AuNPs/SPCE 상의 TTBA의 전해중합을 기록한 CV, 도 2(B)는 APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE에 대해 기록한 CV, 도 2(C)는 APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE 층 상에서 HbA<sub>1c</sub>의 캡처에 의한 과산화수소의 촉매적 환원전류에 대한 CV, 도 2(D)는 항체/TBO/pTTBA@MWCNT/SPCE 층 상에서 HbA<sub>1c</sub>의 캡처에 의한 전자전달 매개체의 촉매 환원전류 변화에 대해 기록한 CV, 도 2(E)는 주사속도에 따른 TBO의 산화/환원 전류 변화에 대한 선형곡선을 나타낸 도면이다.
- [15] 도 3(A) 및 도 3(B)는 pTTBA/AuNPs, 및 APBA/pTTBA/AuNPs의 표면에 대한 N1s 및 B1s 피크에서 각각의 ESCA 분석 결과를 나타낸 것이며, 도 3(C)는

pTTBA/AuNPs 상에 APBA를 고정화 시 주파수 변화(실선)와, APBA/pTTBA/AuNPs 상에 HbA<sub>1c</sub>을 고정화 시 주파수 변화(점선)를 나타낸 도면이다.

- [16] 도 4(A)는 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 온도 효과, 도 4(B)는 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 pH 효과, 도 4(C)는 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 과산화수소 농도 효과, 및 도 4(D)는 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 적용 전위 효과를 나타낸 도면이다.
- [17] 도 5(A)는 보론산 유도체가 개질된 제1센서를 이용한 HbA<sub>1c</sub>의 선형 검량선을, 삽입도는 대시간 전류 반응을 나타낸 것이고, 도 5(B)는 항체/TBO가 개질된 경우의 HbA<sub>1c</sub>의 선형 검량선을 나타낸 것이며, 도 5(C)는 보론산 유도체가 개질된 제1센서를 이용하여 임피던스 분석을 통한 HbA<sub>1c</sub>의 선형 검량선을 나이키스트 선도(Nyquist plot)로 나타낸 도면이다.
- [18] 도 6(A)는 시린지 필터(Syringe Filter)를 통해 분리된 혈장을 제거한 시료를 보론산 유도체가 개질된 제1센서를 이용한 전류식 분석 시의 당화 헤모글로빈 검출 검량선을 나타낸 것이고, 도 6(B)는 보론산 유도체가 개질된 제1센서를 이용하여 임피던스 분석을 통해 전처리하지 않은 전혈과 전처리한 시료의 나이키스트 선도(Nyquist plot)를 나타낸 것이고, 도 6(C)는 전처리한 시료에서 임피던스 분석 결과와 전류식 분석 결과를 비교한 것이다.
- [19] 도 7(A)는 TBO/pTTBA@MWCNT/SPCE 전극의 제2센서 (헤모글로빈 센서부)를 이용하여 순환주사전압법으로 Hb의 전류 반응을 나타내 것이고, 도 7(B)는 상기 제2센서를 이용한 Hb의 선형 검량선을, 삽입도는 대시간 전류 반응을 나타낸 것이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [21] 본 발명은 당화 헤모글로빈 검출용 제1센서 및 헤모글로빈 검출용 제2센서를 포함하며, 상기 제1센서는, 전극; 상기 전극 표면 상에 코팅된 금나노입자층; 상기 금나노입자층 상에 전착된 전도성 고분자 층; 및 상기 전도성 고분자 층 상에 공유결합된 당화 헤모글로빈의 수용체와 유기전자전달 매개체를 포함하고, 상기 제2센서는, 전극; 상기 전극 표면 상에 전착된 전도성 고분자 복합층; 및 상기 전도성 고분자 복합층 상에 공유결합된 유기전자전달 매개체를 포함하며, 상기 전도성 고분자 복합층은 전도성 고분자와 전극 촉매 물질로 이루어진 것이고, 상기 제1센서와 제2센서를 대향하여 배치한 듀얼 타입의 센서로 형성된 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이드크 듀얼 타입 센서를 제공한다.
- [22] 이때, 상기 전극은 스크린 프린트 카본 전극을 사용할 수 있지만, 전기화학을 기반으로 하는 센서 역할을 할 수 있는 전극이라면 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [23] 상기 전도성 고분자는 p-2,2':5,5"-터티오 펜-3'-p-벤조산(p-TTBA), p-5,2':5,2"-터티오 펜-3'-카르복실산(p-TTCA) 및 p-2,5-디-(2-티에닐)-1H-피롤-P-벤조산(p-DTPBA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [24] 상기 당화 헤모글로빈의 수용체는 보론산 유도체, 항체, 또는 압타머 중에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [25] 상기 보론산 유도체는 당화 헤모글로빈과의 시스-다이올 결합에 의해 당화 헤모글로빈을 검출하는 당화 헤모글로빈의 수용체로서, 아미노-페닐보론산(APBA), 페닐 보로닉산(PBA), 티에닐 보로닉산(TBA) 및 메틸 보로닉산(MBA)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며,  $-B(OH)_2$  치환기를 가지는 것이라면 이에 제한되는 것은 아니다.
- [26] 상기 압타머(Aptamer)는 표적분자에 대해 특이적으로 결합하는 분자 인식 물질로서 항체와 비교할 때 표적분자에 대해 높은 친화성과 특이성을 가지기 때문에 유기전자전달 매개체와 복합체로 이루어져 당화 헤모글로빈에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [27] 구체적으로, 상기 압타머는 서열목록 1로 표시되는 염기서열(5'-AAA CCT GGT GTC TGG TGG GGG GGG GGC AGG CGG CGA GGA TTG CGG CGC TGC TAC ACA AAC AGA AGG AA-3')일 수 있다.
- [28] 상기 유기전자전달 매개체는 메틸렌 블루(methylene blue, MB) 또는 톨루이딘 블루(toluidine blue O, TBO)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [29] 상기 유기전자전달 매개체는 항체 및 압타머와의 복합체를 형성하여 당화 헤모글로빈의 수용체로 사용할 수 있고, 상기 유기전자전달 매개체 단독으로 전도성 고분자 복합층에 공유결합하여 제작된 센서는 혈액 시료중의 총 헤모글로빈을 검출할 수 있다. 따라서 상기 제1센서 및 제2센서가 결합된 듀얼 타입의 센서를 기반으로 측정된 총 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈의 분리단계를 거치지 않고 동시에 두 물질의 농도를 측정하여 총 헤모글로빈에 대한 당화 헤모글로빈의 비율을 검출할 수 있다.
- [30] 상기 전극 촉매 물질은 탄소나노튜브(CNT), 산화그래핀(GO), 산화그래핀 환원물(rGO) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [31] 또한 본 발명은 당화헤모글로빈을 검출하는 제1센서를 제작하는 단계; 헤모글로빈을 검출하는 제2센서를 제작하는 단계; 및 상기 당화헤모글로빈을 검출하는 제1센서와 헤모글로빈을 검출하는 제2센서를 대향하여 배치한 듀얼 타입의 센서를 제작하는 단계를 포함하며, 상기 제1센서를 제작하는 단계는, 전극 표면 상에 금나노입자 층을 코팅하는 단계, 상기 금나노입자 층 상에 전도성 단량체를 첨가하고, 전해중합하여 전도성 고분자 층을 전착시키는 단계, 상기 전도성 고분자 층의 작용기를 활성화시키는 단계, 및 상기 작용기가 활성화된 전도성 고분자 층 상에 당화 헤모글로빈의 수용체인 당화

헤모글로빈의 수용체와 유기전자전달 매개체를 공유결합시키는 단계를 포함하고, 상기 제2센서를 제작하는 단계는, 전극 표면 상에 전도성 단량체와 전극 촉매물질의 혼합물을 첨가하고, 전해중합하여 전도성 고분자 복합층을 전착시키는 단계, 상기 전도성 고분자 복합층의 작용기를 활성화시키는 단계, 및 상기 작용기가 활성화된 전도성 고분자 복합층 상에 유기전자전달 매개체를 공유결합시키는 단계를 포함하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서의 제조방법 제공한다.

- [32] 상기 전도성 단량체는 2,2':5',5"-터티오펜-3'-p-벤조산(TTBA), 5,2':5,2"-터티오펜-3'-카르복실산(TTCA) 및 2,5-디-(2-티에닐)-1H-피롤-P-벤조산(DTPBA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [33] 상기 전도성 단량체는 우수한 전기전도도를 갖고 다양한 응용이 가능하며, 열적 안정성과 화학적 안정성이 우수하므로, 전도성 단량체를 통한 전도성 고분자 합성 시 센서의 성능 내지는 수명을 향상시킬 수 있는 장점이 있다.
- [34] 상기 제1센서를 제조하는 과정에서, 금나노입자층 상에 형성된 전도성 고분자 층의 평균 두께는 민감도와 응답시간을 높이기 위한 중요한 요소이며, 상기 전도성 고분자 복합층의 평균 두께는 100 내지 300 nm일 수 있다.
- [35] 상기 전도성 고분자 층의 평균 두께가 100 nm보다 얇을 경우 수용체의 결합 사이트의 결핍과 같은 문제점이 발생할 수 있으며, 또한 상기 전도성 고분자 층의 평균 두께가 300 nm보다 두꺼운 경우 전도성 저하로 인한 민감도 및 응답시간의 감소와 같은 문제점을 야기할 수 있는 바, 제1센서 및 제2센서에 이용되는 전도성 고분자 층 내지 전도성 고분자 복합층은 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈을 쉽게 흡착할 수 있게 하는 역할을 수행하므로 200 nm의 평균 두께를 가지는 전도성 전도성 고분자 층 내지 고분자 복합층을 합성하는 것이 보다 바람직하다.
- [36] 상기 작용기는 카르복시기이며, 카르복시기를 활성화 시키는 방법은, 1-에틸-3-[3-(디메틸아미노)프로필]칼보다이미드 하이드로클로라이드 용액에 N-하이드록시석신이미드의 혼합물을 함유한 인산완충용액(Phosphate Buffered Saline:PBS)에 담구어 전도성 단량체의 카르복시기를 활성화시킬 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 혈액 시료를 용혈시키거나 과산화수소를 처리하는 단계; 및 상기 용혈시키거나 과산화수소를 처리된 혈액 시료를 청구항 1에 따른 듀얼 타입의 센서 표면에 도입하여 과산화수소의 촉매 환원전류 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류를 분석하는 단계를 포함하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법을 제공한다.
- [38] 상기 혈액 시료는, 인체로부터 배출된 혈액을 필터 또는 원심분리를 통해 혈장이 분리된 적혈구를 용혈 시키거나, 전혈(Whole blood)을 용혈(Hemolysis)시킬 수 있으나, 시린지 필터(Syringe Filter)를 통해 분리된 혈장을 제거한 후 남은

적혈구를 용혈 버퍼 (lysis buffer)를 이용하여 용혈 시키는 방법, 또는 보다 간단하게 전혈을 바로 용혈 버퍼를 이용하여 용혈 시킬 수 있는 방법이 있다.

[39] 상기 방법들은 기존의 원심분리를 통해 혈장을 분리한 적혈구 용혈 시키는 방법보다 복잡한 과정 없이도 간단히 인체로부터 배출된 혈액을 처리 할 수 있어 보다 바람직하며, 과산화수소를 이용한 간단한 전처리 과정을 통해 혈액 내 다른 당화 단백질 등에 의한 방해효과를 방지할 수 있으며, 신속하게 당화 헤모글로빈을 현장에서 분석을 할 수 있다.

[40] 상기 인체로부터 분리된 혈액 시료에 과산화수소를 처리 시 필요한 과산화수소의 농도는 2.0 내지 4.0 mM일 수 있으며, 2.0 mM에서 4.0 mM까지 과산화수소 농도가 점점 증가하면 점차적으로 피크 전류도 증가하는 바, 3.0 mM에서 안정된 상태에 도달 분리된 혈액 시료의 전처리시 필요한 과산화수소의 농도는 3.0 mM인 것이 보다 바람직하다.

[41] 상기 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류 분석은 pH 7.0 내지 7.4 일 수 있으며, pH 7.0 이하 또는 pH 7.4 이상인 경우에는 당화 헤모글로빈의 활성 감소와 같은 문제점이 발생할 수 있는 바, 상기 pH 7.4에서 최대 전류 반응이 일어나므로 pH 7.4를 유지하는 것이 보다 바람직하다.

[42] 상기 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류 분석은 25 내지 35°C의 온도일 수 있으며, 25°C 이하인 경우에는 당화 헤모글로빈과 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체간의 전자전달 속도 저하와 같은 문제점이 있고, 35°C 이상의 온도에서는 당화 헤모글로빈의 열적 변성으로 인해 피크 전류가 감소하는 문제점이 발생하는 바, 바람직하게는 30°C의 온도를 유지하는 것이 보다 바람직하다.

[43] 상기 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류 분석은 -0.50 V 내지 -0.3 V의 적용 전위에서 실행할 수 있으며, 적용 전위가 -0.3 V까지 감소하면 피크 전류가 증가하며 최대 반응이 -0.45 V에서 일어나기 때문에 -0.45 V 적용 전위에서 실행하는 것이 높은 민감도로 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈을 동시에 검출할 수 있다.

[44] 상기 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류 분석은 시간대-전류법으로 분석할 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 형태

[45] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] <실시예 1> 개질 전극 제작

[48] 1. 제1센서의 개질 전극 제작

[49] (1) 전극 표면 상에 금나노입자층의 코팅(AuNPs/SPCE)

[50] 0.001% 염화금산(HAuClO<sub>4</sub>)을 함유한 0.5M 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)용액을 1.5 V 전위에서

- 0.4V 전위로 일정속도 전위 훑음법(linear sweep voltammetry; 이하 'LSV')을 이용하여 스크린 프린트 카본 전극(SPCE) 상에 전기증착시켜 금나노입자(AuNPs)층을 코팅시켰다. 이때, 상기 전기증착 조건은 하기와 같다:
- [51] 증착시간 60초, 주사속도 0.1 V/s, 증착전위 -0.6V, 3회 전위 주사.
- [52] (2) AuNPs/SPCE 상에 전도성 고분자 층의 형성(pTTBA/AuNPs/SPCE)
- [53] 종래 알려진 방법(Biosens. Bioelectron. 2003, 18, 773-780, Biomaterials, 2010, 31, 7827-7835)에 따라 상기 AuNPs/SPCE 전극 상에 전해중합을 통해 pTTBA의 전도성 고분자 복합층을 형성시켰다. 보다 상세하게는, AuNPs/SPCE 전극을 먼저 TTBA가 함유된 용액 중에 침지시켰다. 이때, 상기 용액은 디(프로필렌글리콜)메틸에스테르와 트리(프로필렌글리콜) 메틸에스테르가 1:1 중량비로 혼합된 용액을 사용하였다. 그 후, 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에서, 0.1 V/s의 주사속도로 -0.1 V에서 1.1 V까지(Ag/AgCl) 3회 전위 주사를 함으로써 AuNPs/SPCE 전극 상에 pTTBA 전착시켜 pTTBA/AuNPs/SPCE 전극을 준비하였다.
- [54] (3) 전도성 고분자 층의 카르복실기 활성화 과정
- [55] 상기 pTTBA/AuNPs/SPCE를 10.0 mM의 1-에틸-3-[3-(디메틸아미노)프로필]칼보다이미드 (1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride; EDC) 및 10.0 mM의 N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS) 혼합물을 함유한 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에 12시간 동안 담구어 pTTBA의 카르복시기를 활성화시킨 후 인산완충용액으로 세정하였다.
- [56] (4) 활성화된 카르복실기와 보론산 유도체와의 공유결합을 통한 제1센서 개질 전극 제작
- [57] 보론산 유도체를 이용한 제1센서의 제작은, pTTBA/AuNPs/SPCE 전극을 40°C 온도조건에서 12시간 동안 10.0 mM의 3-아미노페닐보로닉산(3-aminophenylboronic acid; APBA) 용액에서 반응시켜 제1센서 개질 전극을 제작하였다.
- [58] 또한, pTTBA/AuNPs/SPCE 전극 상에 TBO와 항체(Abcam, UK; ab31152) 또는 5'-AAA CCT GGT GTC TGG TGG GGG GGG GGC AGG CGG CGA GGA TTG CGG CGC TGC TAC ACA AAC AGA AGG AA-3'의 염기서열을 갖는 압타머를 동시에 공유 결합시켜 제1센서의 개질 전극을 제작하였다.
- [59] 최종적으로, TTBA의 카르복시기와 보론산 유도체, 항체/TBO의 아민기, 또는 압타머/TBO의 아민기 간의 공유결합을 통한 개질 전극(APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE, 압타머-TBO/AuNPs/SPCE, 항체-TBO/AuNPs/SPCE)을 준비하였다.
- [60]
- [61] 2. 제2센서의 개질 전극 제작
- [62] (1) 전극 표면 상에 탄소나노튜브와 전도성 고분자 단량체의 혼합물의 코팅

- [63] 다중벽 탄소나노튜브(MWCNT)를 계면활성제(0.5 % triton X 100) 용액에 분산시켰고, 전도성 고분자 단량체인 TTBA는 아세트나이트릴 용액에 용해시켜 각각의 용액을 준비하였다. 상기 두 용액을 혼합하여 탄소나노튜브와 전도성 고분자 단량체(TTBA@MWCNT) 혼합 용액을 준비하였고, 상기 혼합 용액을 SPCE 위에 코팅하였다.
- [64] (2) TTBA@MWCNT 전극 상에 전도성 고분자 복합층의 형성
- [65] TTBA@MWCNT/SPCE가 코팅된 전극을 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에서 0.1 V/s의 주사속도로 -0.1에서 1.1V까지(Ag/AgCl) 3회 전위 주사를 함으로써 제2센서 제작을 위한 탄소나노튜브와 전도성 고분자(pTTBA@MWCNT/SPCE)의 복합층이 형성되었다.
- [66] (3) 전도성 고분자 층의 카르복실기 활성화 과정
- [67] pTTBA@MWCNT/SPCE 전극을, 10.0 mM의 1-에틸-3-[3-(디메틸아미노)프로필]칼보다이미드 (1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride; EDC) 및 10.0 mM의 N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS) 혼합물을 함유한 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에 12시간 동안 담구어 pTTBA의 카르복시기를 활성화시킨 후 인산완충용액으로 세정하였다.
- [68] (4) 활성화된 카르복실기와 TBO와의 공유결합을 통한 제2센서 개질 전극 제작
- [69] pTTBA@MWCNT/SPCE 전극 상에 TBO를 공유결합 시켜 제2센서 개질 전극을 제작(TBO/pTTBA@MWCNT/SPCE)하였다.
- [70]
- [71] 3. 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입의 센서 제작
- [72] 상기 준비된 제1센서 및 제2센서를 대향하여 배치함으로써 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입의 센서를 제작하였다.
- [73]
- [74] **<실시예 2> 전기화학적 분석**
- [75] 1. 전기화학적 분석 방법
- [76] 전기화학적 분석은 일체형 SPCE를 사용하여 3전극셀 반응계에서 수행되었다. 즉, 개질 된 SPCE가 작동전극(면적: 0.07 cm<sup>2</sup>)을 이루었고, 표준전극으로 Ag/AgCl 및 반대전극으로 카본을 각각 사용하였다. SPCE는 스크린 프린터(BANDO industrial, Korea)를 이용하여 폴리스티렌계 필름 상에 프린트 되었다.
- [77] 순환 전압전류(cyclic voltammogram; 이하 'CV')는 Potentiostat/Galvanostat(모델: KST-P2, Kosentech)를 이용하여 측정하였으며, LSV는 Kosentech Model PT-1를 이용하여 측정하였고, 전류분석은 EG & G PAR Model PAR 273A를 이용하여 측정하였다. 모든 전기화학적 측정은 0.1M의 인산완충용액(pH 7.4)에서 수행되었다.

- [78] 미세 진동 저울 분석(Quartz Crystal Microbalance analysis; 이하 'QCM')은 SEIKO EG&G 모델 QCA 917 및 PAR 모델 263A potentiostat/galvanostat로 수행하였으며, QCM 분석을 위하여 Au 작동전극(면적:  $0.196 \text{ cm}^2$ ; 9 MHz; AT-cut quartz crystal)을 이용하였다. 임피던스 분석은 계단 당 5포인트의 샘플링 속도에서 100 kHz에서 50 mHz까지 개방전압에서 EG&G Princeton Applied Research PARSTAT 2263을 이용하여 측정하였다(AC 진폭: 10 mV). X선 광전자 분광 분석(X-ray photoelectron spectroscopy analysis; 이하 'XPS')은 VG Scientific Escalab 250 XPS 분광계[단색화된 Al K $\alpha$  광원 (KBSI Busan, Korea)]를 이용하여 수행하였다.
- [79]
- [80] 2. 전기화학적 분석 결과
- [81] (1) APBA 개질 pTTBA의 전기화학적 특성
- [82] 도 2(A)를 참조하면, AuNPs/SPCE 상의 TTBA의 전해중합을 기록한 CV를 나타낸 것으로서, pTTBA 층은 단량체가 적어진 AuNPs/SPCE 표면의 양극 전해중합을 통해 형성되었다. -0.2 V에서 1.0 V의 제1 양극 주사에서 약 0.7 V에서의 산화피크는 단량체 산화를 통한 고분자 형성을 의미하며, AuNPs의 다른 산화환원 피크는 0.57 V/0.15 V에서 관찰되었다. 전해중합 후, APBA 또는 항체-TBO (또는 압타머-TBO)는 pTTBA/AuNP/SPCE 층에 각각 고정되었다.
- [83] 도 2(B)를 참조하면, APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE에 대해 기록한 CV를 나타낸 것으로서, APBA가 없는 pTTBA/AuNPs/SPCE의 CV에서는 어떠한 산화환원 피크도 관찰되지 않았지만, APBA가 개질된 경우에는 0.076 V/0.107 V에서 한쌍의 산화환원 피크가 관찰되었다. 도 2(C)는 HbA<sub>1c</sub>의 캡처에 의한 과산화수소 농도에 따른 촉매적 환원전류 변화에 대해 기록한 CV를 나타낸 것이고, APBA 상에 캡처된 HbA<sub>1c</sub>의 헴기에 의한 산화환원 공정에 의해 -0.34 V/-0.16 V에서 한쌍의 산화환원 피크가 나타났다. 이때 과산화수소 농도를 1 mM에서 5 mM로 증가시킬 경우 -0.34 V에서 환원전류가 증가하는 것을 확인하였다.
- [84] 도 2(D)를 참조하면, 항체-TBO/pTTBA/AuNPs/SPCE층 상에서 항체에 HbA<sub>1c</sub>의 캡처에 의한 TBO의 환원전류 변화에 대해 기록한 CV를 나타낸 것이다. 유기전자전달 매개체인 TBO의 산화환원 피크는 -0.31 V/-0.26 V에서 관찰되었다. 항체에 결합된 HbA<sub>1c</sub>의 농도가 증가함에 따라 TBO의 환원전류 크기가 증가하는 확인하였다. 이러한 결과로부터, APBA 또는 항체-TBO가 pTTBA/AuNP/SPCE 층에 성공적으로 고정되었음을 알 수 있다.
- [85] 또한, TBO/pTTBA@MWCNT/SPCE층 상에서 주사 속도 변화에 대한 TBO의 환원 전류 크기의 변화에 대해 측정한 결과를 도 2(E)에 나타내었다. 주사 속도 증가에 따라 TBO의 산화/환원 전류 크기와 비례하며, 이는 전극의 흡착종에 의한 현상임을 알 수 있다. Laviron 식을 이용한 TBO의 전자전달 속도  $k_s$  값은  $2.17 \text{ sec}^{-1}$ 이었다.
- [86] 따라서, 상기 두 가지 타입의 제1 센서에 결합된 당화 헤모글로빈의 농도에 의해 과산화수소의 촉매적 환원전류 또는 TBO의 환원전류 크기가 증가하는 것을 알

수 있다. 이들 제1센서에 결합된 당화 헤모글로빈의 농도에 따른 전류 변화 분석을 통해 HbA<sub>1c</sub> 검출이 가능함을 확인하였다.

[87] (2) APBA 개질 전극에서의 XPS 및 QCM 분석 결과

[88] APBA 개질 pTTBA 층에서의 화학적 결합을 규명하기 위하여, pTTBA/AuNPs 및 APBA/pTTBA/AuNPs의 표면에 대한 N1s(도 3(A) 참조) 및 B1s(도 3(B) 참조) 피크에서 ESCA 분석을 수행한 결과, N1s 스펙트럼에서는 APBA 고정 후 399.4 eV 근처에서 분명한 피크가 나타난 반면, pTTBA/AuNPs 층은 분자 내에 질소 원자가 존재하지 않아 어떠한 피크도 나타나지 않았다. 또한, B1s 스펙트럼은 191.2 eV에서 피크가 나타났으며, C-B 결합에 대응한다. 이러한 결과로부터 APBA는 pTTBA 층에 성공적으로 고정화 되었음을 알 수 있다.

[89] 도 3(C)를 참조하면, pTTBA/AuNPs 상에 APBA를 고정화 시 주파수 변화(실선)와, APBA/pTTBA/AuNPs 상에 HbA<sub>1c</sub>을 고정화 시 주파수 변화(점선)를 나타낸 것으로서, pTTBA/AuNPs 상에 APBA를 고정화 시킨 경우에는 느린 APBA 고정화로 인하여 약 2시간 정도 되어야 안정한 상태가 되며, 총 주파수 변화( $\Delta f$ )는 78.4 Hz이고, 86.17 ng의 질량 증가에 대응하며, APBA의 표면 범주는  $2.86 \times 10^{-9}$  mol/cm<sup>2</sup>으로 산출되었다. 그러나, APBA를 갖는 탐침을 이용한 주파수 변화는 1.0% HbA<sub>1c</sub>를 함유한 용액에서 HbA<sub>1c</sub>-APBA 간의 상호작용에 의해 제빠르게 일어났다. 즉, 약 20분 후 103.11 Hz의 주파수 변화를 나타내면서 안정한 상태를 유지하였다. 이러한 주파수 변화는 113.34 ng의 질량 변화를 나타내며, HbA<sub>1c</sub> 표면 범주는  $1.03 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup>으로 산출되었다. 도 3(C)를 참조하면, HbA<sub>1c</sub>-APBA 간의 상호작용을 위한 시간이 매우 짧아 HbA<sub>1c</sub> 검출에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[90] (3) HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석

[91] APBA 또는 항체-TBO가 개질된 센서를 이용한 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 최적 조건 규명을 위하여, AuNPs가 코팅된 SPCE 위에 전도성 고분자인 TTBA를 전기화학적인 방법을 이용하여 전착시키고, 카르복시기를 가지는 TTBA에 아민기를 가지는 당화 헤모글로빈의 수용체인 APBA 또는 항체-TBO를 공유결합 시켜 제1센서를 각각 제작하였고, 상기 각 센서에 결합된 당화 헤모글로빈에 의한 과산화수소 촉매의 환원전류 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류를 시간대-전류법으로 모니터링하여 당화 헤모글로빈의 농도를 정량 분석하여 온도, pH, 과산화수소 농도 및 적용 전위를 변화시켜 조사하였다.

[92] APBA 또는 항체-TBO가 개질된 센서를 이용한 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 최적 조건 규명을 위하여, AuNPs가 코팅된 SPCE 위에 전도성 고분자인 TTBA를 전기화학적인 방법을 이용하여 전착시키고, 카르복시기를 가지는 TTBA에 아민기를 가지는 당화 헤모글로빈의 수용체인 APBA 또는 항체-TBO를 공유결합 시켜 제작된 제1센서 및 pTTBA@MWCNT/SPCE 전극 상에 TBO를 공유결합 시켜 제작된 제2센서를 각각 제작하였고, 상기 각 센서에 결합된 당화 헤모글로빈에 의한 과산화수소 촉매의 환원전류 또는 유기전자전달 매개체의

환원전류를 시간대-전류법으로 모니터링하여 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 농도를 정량 분석하여 온도, pH, 과산화수소 농도 및 적용 전위를 변화시켜 조사하였다.

- [93] 도 4(A)를 참조하면, HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 온도 효과를 나타낸 것으로서, 10°C에서 30°C까지는 온도가 올라가면 점차적으로 피크 전류도 증가하였으나, 35°C 이상의 온도에서는 당화 헤모글로빈(HbA<sub>1c</sub>)의 열적 변성으로 인해 피크 전류가 감소하였기 때문에, 최적 온도를 30°C로 정하였다.
- [94] 도 4(B)를 참조하면, 당화 헤모글로빈(HbA<sub>1c</sub>)의 전류식 분석을 위한 pH 효과를 나타낸 것으로서, pH 5.8에서 7.4까지는 pH가 증가하면 점차적으로 피크 전류도 증가하였으나, pH 7.4에서 최대 전류 반응이 관찰되었기 때문에, 최적 pH를 생체 pH인 7.4로 정하였다.
- [95] 도 4(C)를 참조하면, HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 위한 과산화수소 농도 효과를 나타낸 것으로서, 과산화수소 농도를 1.0 mM에서 5.0 mM까지 과산화수소 농도가 점점 증가하면 점차적으로 피크 전류도 증가하였으며, 3.0 mM에서 안정된 상태에 도달하였기 때문에, 최적 과산화수소 농도를 3.0 mM로 정하였다.
- [96] 도 4(D)를 참조하면, 당화 헤모글로빈(HbA<sub>1c</sub>)의 전류식 분석을 위한 적용 전위 효과를 나타낸 것으로서, 적용 전위가 -0.3 V까지 감소하면 피크 전류가 증가하였고, 최대 반응이 -0.45 V에서 관찰되었기 때문에, 최적 적용 전위를 -0.45 V로 정하였다.
- [97] 앞서 규명된 최적 분석 조건 하에서 APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE 또는 항체-TBO/pTTBA/AuNPs/SPCE를 이용하여 HbA<sub>1c</sub>의 전류식 분석을 수행하였다. 즉, APBA/pTTBA/AuNP/SPCE 또는 항체-TBO/pTTBA/AuNPs/SPCE를 다양한 농도의 HbA<sub>1c</sub> 함유 용액 중에서 2분 동안 반응시킨 후, 0.1 M의 인산완충용액으로 세정하였다. 이때, 보론산 유도체가 개질된 제1센서를 이용한 과산화수소의 환원에 대한 전류 분석은 3.0 mM의 과산화수소가 함유된 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에서 기록되었고, 항체-TBO가 개질된 센서의 경우, TBO의 환원전류 분석은 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에서 기록되었다.
- [98] 도 5(A) 및 도 5(B)를 참조하면, 보론산 유도체 또는 항체-TBO가 개질된 두 가지 타입의 제1센서를 이용하여 HbA<sub>1c</sub>의 선형 검량선을, 삽입도는 대시간 전류 반응을 나타낸 것으로서, 포획된 HbA<sub>1c</sub>의 농도가 증가할수록 과산화수소 또는 전자전달 매개체의 환원전류가 특이적으로 HbA<sub>1c</sub>에 의해 촉진되어 촉매적 환원전류가 증가하였다. HbA<sub>1c</sub> 검출을 위한 전기화학적 촉매적 반응은 0.1 내지 1.5%에서 선형으로 나타났으며, HbA<sub>1c</sub> 검출한계는  $0.052 \pm 0.02\%$ 로 확인되었다. 반면, 항체-TBO가 개질된 제1센서의 경우 2.5 내지 12%에서 선형으로 나타났다. 이들 제1센서는 4°C에서 한달동안 HbA<sub>1c</sub>의 검출 반응 효과를 92% 이상 유지할 수 있었다.
- [99] 결론적으로, 당화 헤모글로빈의 측정하여 검출하는 제1센서의 감응에 영향을 미치는 과산화수소 농도는 3.0 mM, 온도는 30 °C, pH는 7.4, 측정 전압은 -0.45

V로 최적화 되었고, 최적화 된 조건에서 HbA<sub>1c</sub>의 직선 감응 농도 범위는 1 내지 15%이고 검출한계는  $0.52 \pm 0.2\%$  이었다.

[100] (4) HbA<sub>1c</sub>의 임피던스 검출

[101] 임피던스 분석을 위해 개방회로전압에서 APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE의 특성과 HbA<sub>1c</sub>의 분석을 수행하여 전류식 분석 결과와 비교하였다. 먼저, 임피던스 분석 전에 APBA/pTTBA/AuNPs/SPCE를 다양한 농도의 HbA<sub>1c</sub> 함유 용액 중에서 5분 동안 반응시킨 후, 0.1 M의 인산완충용액으로 세정하였다. 제1센서 표면에서 발생한 HbA<sub>1c</sub>-APBA 상호작용은 계면특성의 변화를 야기하여 임피던스 반응이 일어나게 하는데, HbA<sub>1c</sub>의 농도가 증가함에 따라 임피던스가 증가하였다.

[102] 도 5(B)를 참조하면, HbA<sub>1c</sub>의 선형 검량선을, 삽입도는 나이키스트 선도(Nyquist plot)를 나타낸 것으로서, 포획된 HbA<sub>1c</sub>은 0.5 내지 6.0%의 범주에서 선형을 나타내었고, 검출한계는 0.27%로 나타나 앞선 전류식 분석에 비해 검출 민감도가 낮은 것으로 확인되었다.

[103] (5) Hb의 전류식 검출

[104] 전류 측정식의 헤모글로빈 센서는 TBO/pTTBA@MWCNT/AuNPs/SPCE를 사용하였다 (도 7 참조). 헤모글로빈의 농도가 증가함에 따라 전자전달 매개체인 TBO의 환원전류가 증가하는 것을 확인하였다. 또한 도 7(B)는 상기 센서를 이용하여 Hb의 선형 검량선을, 삽입도는 대시간 전류 반응을 나타낸 것이다. Hb 선형농도는 0.1 내지 10  $\mu\text{M}$ 에서 선형으로 나타났다. 본 발명에서 제안하는 당화 헤모글로빈을 검출하는 제1센서와 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈을 동시 검출하는 듀얼 타입의 제2센서를 이용하여 헤모글로빈과 당화 헤모글로빈 농도를 측정하여 두 검출물질의 농도비를 계산하여 보다 정밀한 당화 헤모글로빈의 농도를 유추할 수 있었다.

[105] 특히, 본 발명에 따른 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈 검출방법인 시간대-전류법을 이용하여 실제 사람의 혈액에 대해서 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈을 검출한 결과와 기존의 분석법인 HPLC, 임피던스로 분석한 결과를 비교 평가하면, 본 발명에 따른 시간대-전류법을 통하여 간편하고 안전하며 보다 민감하게 당화 헤모글로빈을 검출할 수 있어, 당뇨병의 현장 진단을 위한 일회용 전류식 당화 헤모글로빈 검출에 유용하게 사용될 수 있다.

[106]

[107] <실시예 3> 실제 시료 분석

[108] 1. 혈액 시료 전처리

[109] 부산대학 병원에서 확보된 3명의 건강한 지원자와 2명의 당뇨병 환자의 혈액 시료에서 본 발명에 따른 센서를 이용하여 HbA<sub>1c</sub>의 농도를 측정하였다. 필터법과 원심분리법을 이용하여 혈액을 전처리한 후, 표준물첨가법을 수행하였다.

[110] 인간 전혈은 원심 분리법 또는 시린지 여과법을 이용하여 전처리하였다. 먼저, 원심 분리법은 2 mL의 전혈을 4°C, 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여

상등액으로 혈장을 분리하였다. 상기 혈장을 폐기하여 포도당 및 다른 당화 단백질과 분자들을 제거하였다. 남아있는 적혈구 세포는 생리학적인 식염수(0.9% NaCl 용액)으로 3회 세정하여 완전하게 혈장을 제거하였다. 이렇게 세정된 적혈구 세포(0.5 mL)에 0.5 mL의 용혈 완충액(26 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7.4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  및 13.5 mM KCN 포함)을 첨가하여 적혈구를 용혈시켰다. 이렇게 얻어진 시료를 0.1M의 인산완충용액(pH 7.4)으로 10배 희석하여 전류식 측정을 수행하였다.

[111] 한편, 보론산 유도체가 개질된 제1센서를 이용한 당화 헤모글로빈 분석을 위해 시린지 필터를 사용한 여과법은 손가락 단자에서 얻은  $2\ \mu\text{L}$ 의 전혈을 시린지 필터(기공크기:  $0.45\ \mu\text{m}$ )상에 모은 후, 혈장을 제거하였다. 그 후, 필터 상에 얻어진 적혈구 세포는 0.9% NaCl 용액으로 3회 세정하였다. 상기 적혈구 세포에  $18\ \mu\text{L}$ 의 용혈 완충액을 첨가하여 필터페이지 상에 헤모글로빈이 용출되었고, 15분 후 임피던스 및 전류 측정을 각각 수행하였다.

[112] 또 다른 타입의 항체-TBO가 개질된 제1센서의 경우는 상기 방법보다 더욱 간편한 방법으로 혈액의 전처리가 가능하다. 인체의 손가락에서 배출된  $1\ \mu\text{L}$ 의 전혈을  $10\ \mu\text{L}$  용혈 완충액으로 용혈 시키고 0.1 M의 인산완충용액(pH 7.4)로 400배 희석하여 전류식 측정을 수행하였다.

[113]

#### [114] 2. 방해효과

[115] 보론산 유도체가 개질된 제1센서의 경우, 전처리 하지 않은 포도당, 당화 알부민, 다른 당화 단백질 등을 포함한 전혈과, 전혈을 시린지 필터나 원심분리를 통해 전처리한 시료를 이용하여  $\text{HbA}_{1c}$ 의 분석을 통해 방해효과를 검토하였다.

[116] 지금까지는 전혈 중 포도당 등 방해인자로 인해 전류식으로는  $\text{HbA}_{1c}$ 의 농도를 검출할 수 없었으나, 본 발명과 같이 시린지 필터한 시료를 이용하여 도 6(A)와 같이 전류식 분석을 통해  $4.72 \pm 0.12\%$ 로  $\text{HbA}_{1c}$ 를 검출하였고, 도 6(B)와 같이 임피던스 분석을 통해 전처리 하지 않은 전혈은  $430.6\ \text{k}\Omega$ , 전처리 한 시료는  $230.7\ \text{k}\Omega$ 의  $\Delta R_p$  값을 나타내었다. 반면 다른 타입의 항체-TBO를 이용한 제1센서의 경우에는  $\text{HbA}_{1c}$ 만 특이적으로 반응함으로 다른 방해효과 없다. 따라서 항체-TBO가 개질된 제1센서를 사용할 경우 간단한 혈액의 전처리 방법으로 당화 헤모글로빈을 검출 할 수 있다.

[117] 도 6(C)를 참조하면, 전처리한 시료에서 임피던스 분석 결과와 전류식 분석 결과가 일치함을 나타내었다.

[118]

#### [119] 3. 실제 시료 분석

[120] 표 1은 본 발명을 통해 개발된 제1센서 및 제2센서와 기존의 분석법인 HPLC를 이용한 실제 혈액에서의  $\text{HbA}_{1c}$ 의 농도 결과를 비교한 자료에 대한 검량선을 나타낸 것으로서, 당뇨병 환자는  $5.64 \pm 0.09\%$ ,  $7.76 \pm 0.04\%$ , 건강한 지원자는  $5.18 \pm 0.02\%$ ,  $5.38 \pm 0.05\%$ , 및  $4.72 \pm 0.12\%$ 로 각각 나타났으며, 원심분리를 통한

건강한 지원자의 HbA<sub>1c</sub>의 농도 분석 결과인  $5.26 \pm 0.03\%$ ,  $5.41 \pm 0.09\%$ , 및  $4.92 \pm 0.08\%$ 과 거의 일치하였다. 그리고, 당뇨병 환자를 위해 현재 병원에서 사용하는 HPLC 실험을 통해 얻어진 HbA<sub>1c</sub>의 농도가 5.7%, 및 7.5%로 본 발명을 통해 개발된 센서를 이용한 결과와 일치하였다.

[121]

[122] [표1]

|           | 본 발명에 의한 혈액 전처리<br>방법을 이용한 HbA <sub>1c</sub> 농도(%) | 기존의 혈액 전처리<br>방법을 이용한 HbA <sub>1c</sub><br>농도(%) |
|-----------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 정상인 혈액 샘플 | 5.2                                                | 5.3                                              |
|           | 5.4                                                | 5.4                                              |
|           | 4.7                                                | 4.9                                              |
|           | 전류식 분석법을 통한 HbA <sub>1c</sub><br>농도(%)             | HPLC 분석을 통한 HbA <sub>1c</sub><br>농도(%)           |
| 환자 혈액 샘플  | 5.6                                                | 5.7                                              |
|           | 7.8                                                | 7.5                                              |

[123]

[124] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

## 청구범위

- [청구항 1] 당화 헤모글로빈 검출용 제1센서 및 헤모글로빈 검출용 제2센서를 포함하며,  
 상기 제1센서는, 전극; 상기 전극 표면 상에 코팅된 금나노입자층; 상기 금나노입자층 상에 전착된 전도성 고분자 층; 및 상기 전도성 고분자 층 상에 공유결합된 당화 헤모글로빈의 수용체와 유기전자전달 매개체를 포함하고,  
 상기 제2센서는, 전극; 상기 전극 표면 상에 전착된 전도성 고분자 복합층; 및 상기 전도성 고분자 복합층 상에 공유결합된 유기전자전달 매개체를 포함하며, 상기 전도성 고분자 복합층은 전도성 고분자와 전극 촉매 물질로 이루어진 것이고,  
 상기 제1센서와 제2센서를 대향하여 배치한 듀얼 타입의 센서로 형성된 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,  
 상기 전도성 고분자는,  
 p-2,2':5',5"-터티오펜-3'-p-벤조산(p-TTBA),  
 p-5,2':5.2"-터티오펜-3'-카르복실산(p-TTCA) 및  
 p-2,5-디-(2-티에닐)-1H-피롤-P-벤조산(p-DTPBA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,  
 상기 당화 헤모글로빈의 수용체는,  
 보론산 유도체, 항체, 또는 압타머 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,  
 상기 보론산 유도체는,  
 아미노-페닐보론산(APBA), 페닐 보로닉산(PBA), 티에닐 보로닉산(TBA) 및 메틸 보로닉산(MBA)으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,  
 상기 압타머는,  
 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서.

- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,  
상기 유기전자전달 매개체는,  
메틸렌 블루(methylene blue, MB) 또는 톨루이딘 블루(toluidine blue O, TBO)중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈  
동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,  
상기 전극 촉매 물질은,  
탄소나노튜브(CNT), 산화그래핀(GO), 산화그래핀 환원물(rGO) 및  
이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 당화  
헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입  
센서.
- [청구항 8] 당화헤모글로빈을 검출하는 제1센서를 제작하는 단계;  
헤모글로빈을 검출하는 제2센서를 제작하는 단계; 및  
상기 당화헤모글로빈을 검출하는 제1센서와 헤모글로빈을 검출하는  
제2센서를 대향하여 배치한 듀얼 타입의 센서를 제작하는 단계를  
포함하며,  
상기 제1센서를 제작하는 단계는, 전극 표면 상에 금나노입자 층을  
코팅하는 단계, 상기 금나노입자 층 상에 전도성 단량체를 첨가하고,  
전해중합하여 전도성 고분자 층을 전착시키는 단계, 상기 전도성 고분자  
층의 작용기를 활성화시키는 단계, 및 상기 작용기가 활성화된 전도성  
고분자 층 상에 당화 헤모글로빈의 수용체인 당화 헤모글로빈의  
수용체와 유기전자전달 매개체를 공유결합시키는 단계를 포함하고,  
상기 제2센서를 제작하는 단계는, 전극 표면 상에 전도성 단량체와 전극  
촉매물질의 혼합물을 첨가하고, 전해중합하여 전도성 고분자 복합층을  
전착시키는 단계, 상기 전도성 고분자 복합층의 작용기를 활성화시키는  
단계, 및 상기 작용기가 활성화된 전도성 고분자 복합층 상에  
유기전자전달 매개체를 공유결합시키는 단계를 포함하는, 당화  
헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입  
센서의 제조방법.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서,  
상기 전도성 단량체는,  
2,2':5',5"-터티오펜-3'-p-벤조산(TTBA),  
5,2':5,2"-터티오펜-3'-카르복실산(TTCA) 및  
2.5-디-(2-티에닐)-1H-피롤-P-벤조산(DTPBA)로 이루어진 군에서 선택된  
어느 하나인 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시  
검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서의 제조방법.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서,  
상기 작용기는,

카르복시기인 것을 특징으로 하는, 당화 헤모글로빈과 헤모글로빈 동시 검출용 마이크로 플루이딕 듀얼 타입 센서의 제조방법.

[청구항 11] 인체로부터 분리된 혈액 시료를 용혈시키거나 과산화수소를 처리하는 단계; 및

상기 용혈시키거나 과산화수소를 처리된 혈액 시료를 청구항 1에 따른 듀얼 타입의 센서 표면에 도입하여 과산화수소의 촉매 환원전류 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류를 분석하는 단계를 포함하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법.

[청구항 12] 청구항 11에 있어서,

상기 혈액 시료를 용혈시키는 단계는, 인체로부터 배출된 혈액을 시린지 필터를 통해 혈장을 분리한 적혈구를 용혈시키거나, 또는 전혈을 용혈시킨 것을 특징으로 하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법.

[청구항 13] 청구항 11에 있어서,

상기 과산화수소의 농도는, 2.0 내지 4.0 mM인 것을 특징으로 하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법.

[청구항 14] 청구항 11에 있어서,

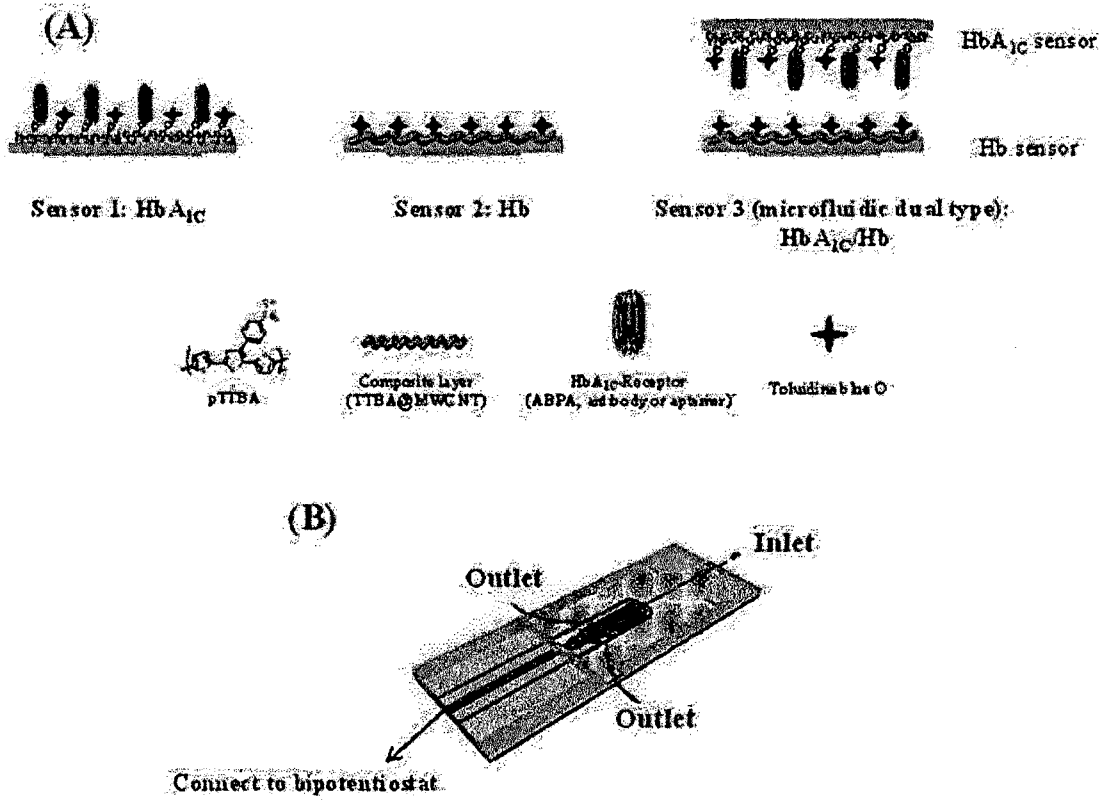
상기 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류 분석은, pH 7.0 내지 7.4, 25 내지 35°C의 온도 및 -0.50 내지 -0.3 V의 적용 전위에서 수행한 것을 특징으로 하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법.

[청구항 15] 청구항 11에 있어서,

상기 과산화수소 또는 유기전자전달 매개체의 환원전류 분석은, 시간대-전류법으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 헤모글로빈 및 당화 헤모글로빈의 동시 측정 전류식 검출방법.

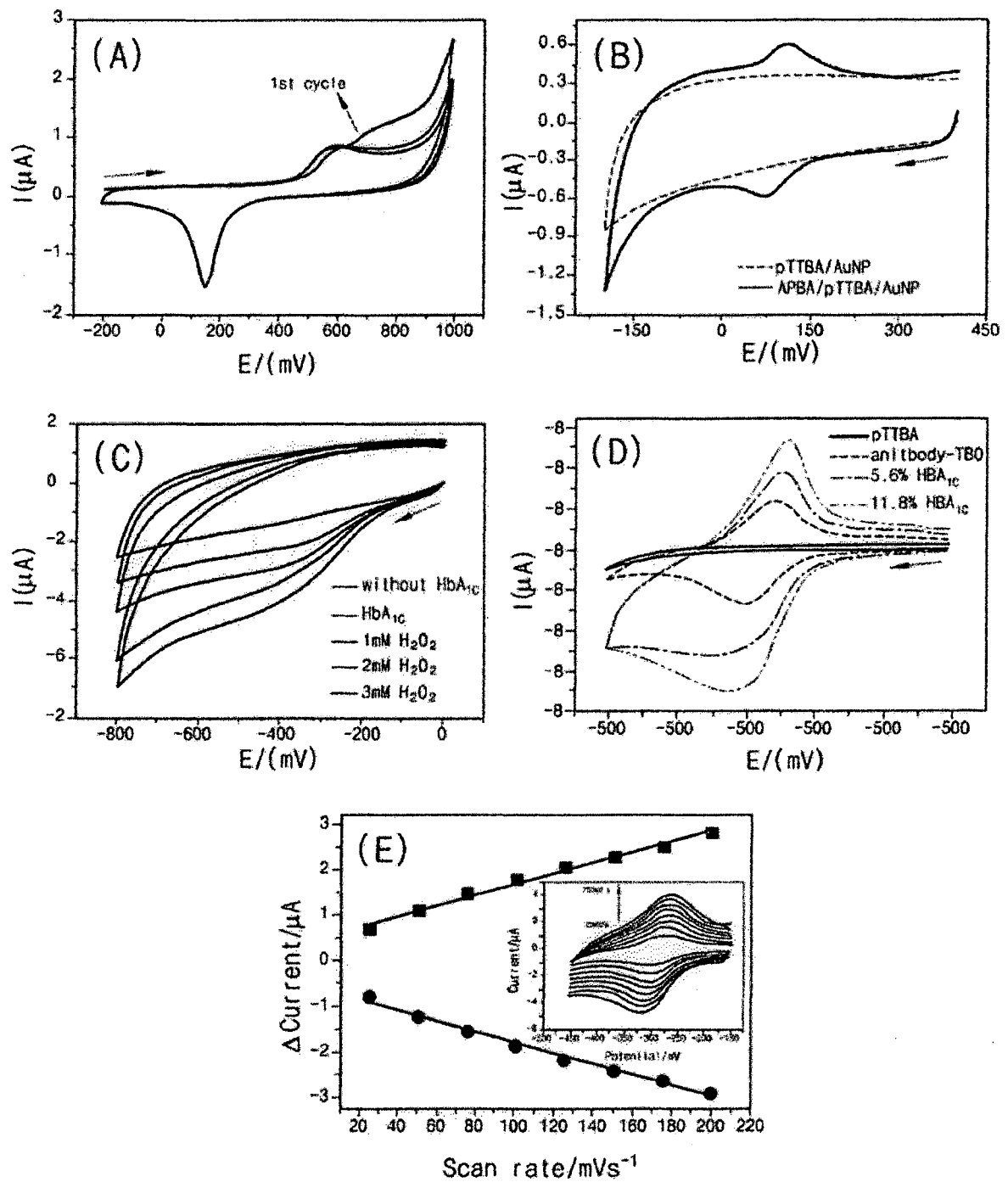
1/4

[Figure 1]

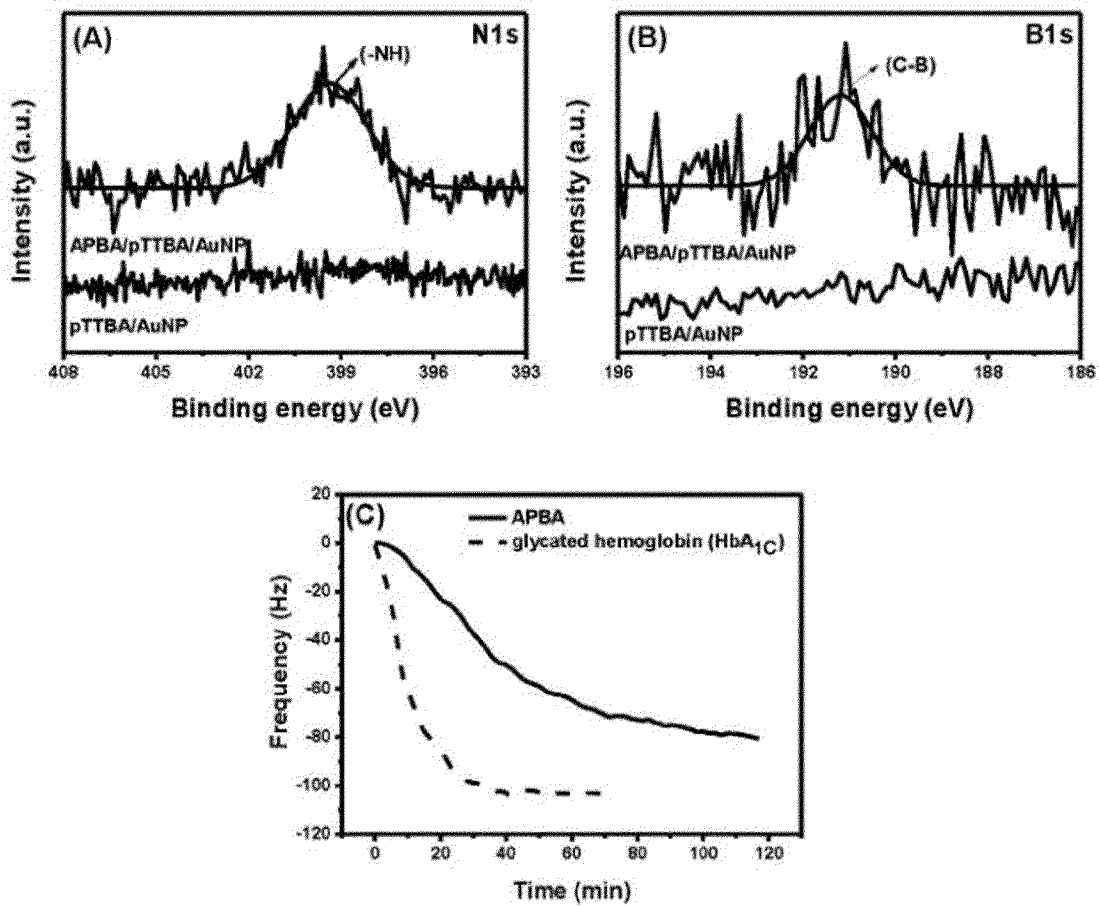


1/4/1

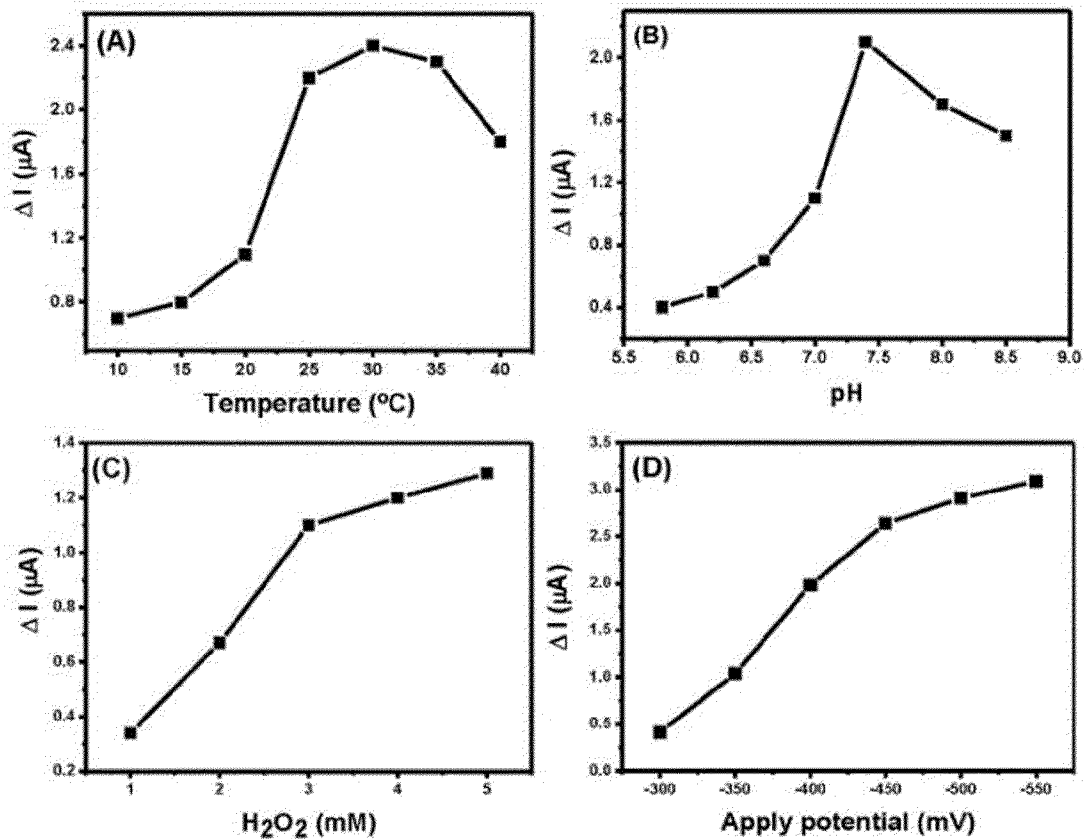
[도2]



[도3]

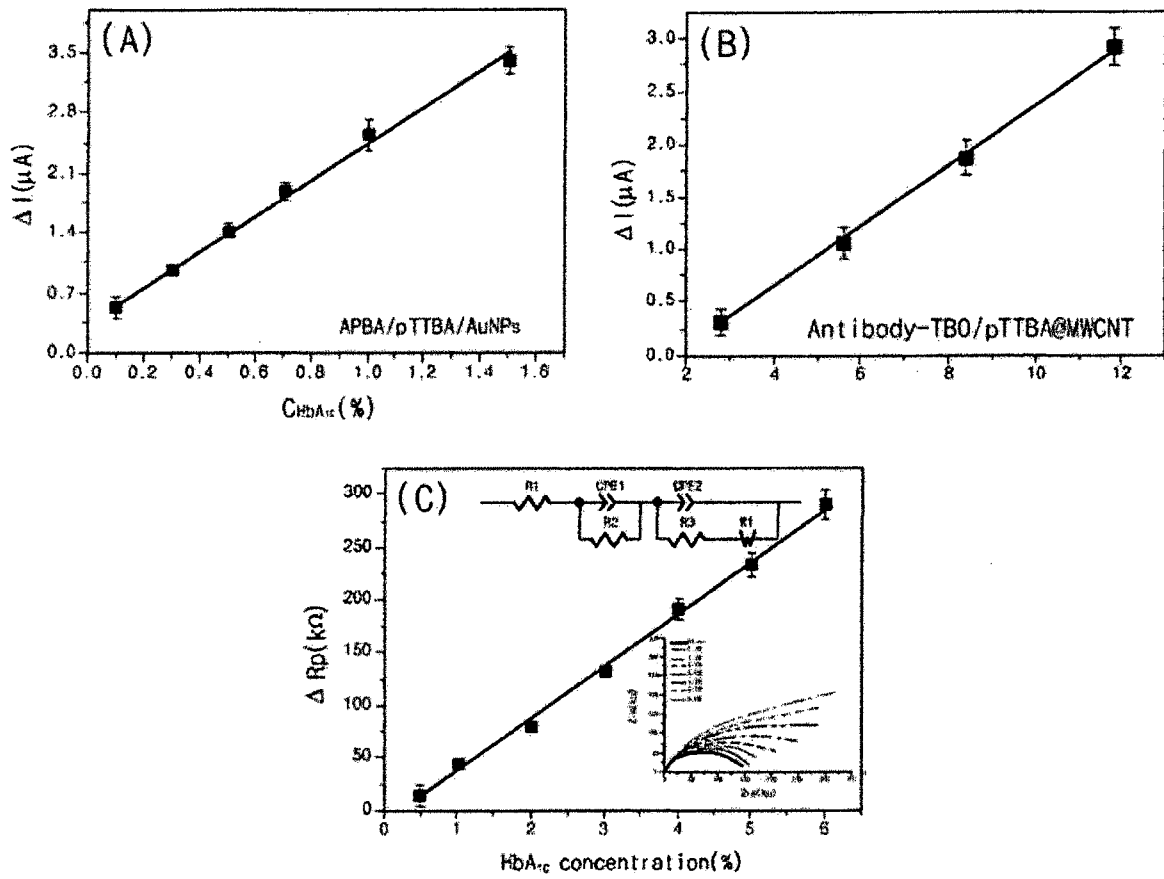


[도4]



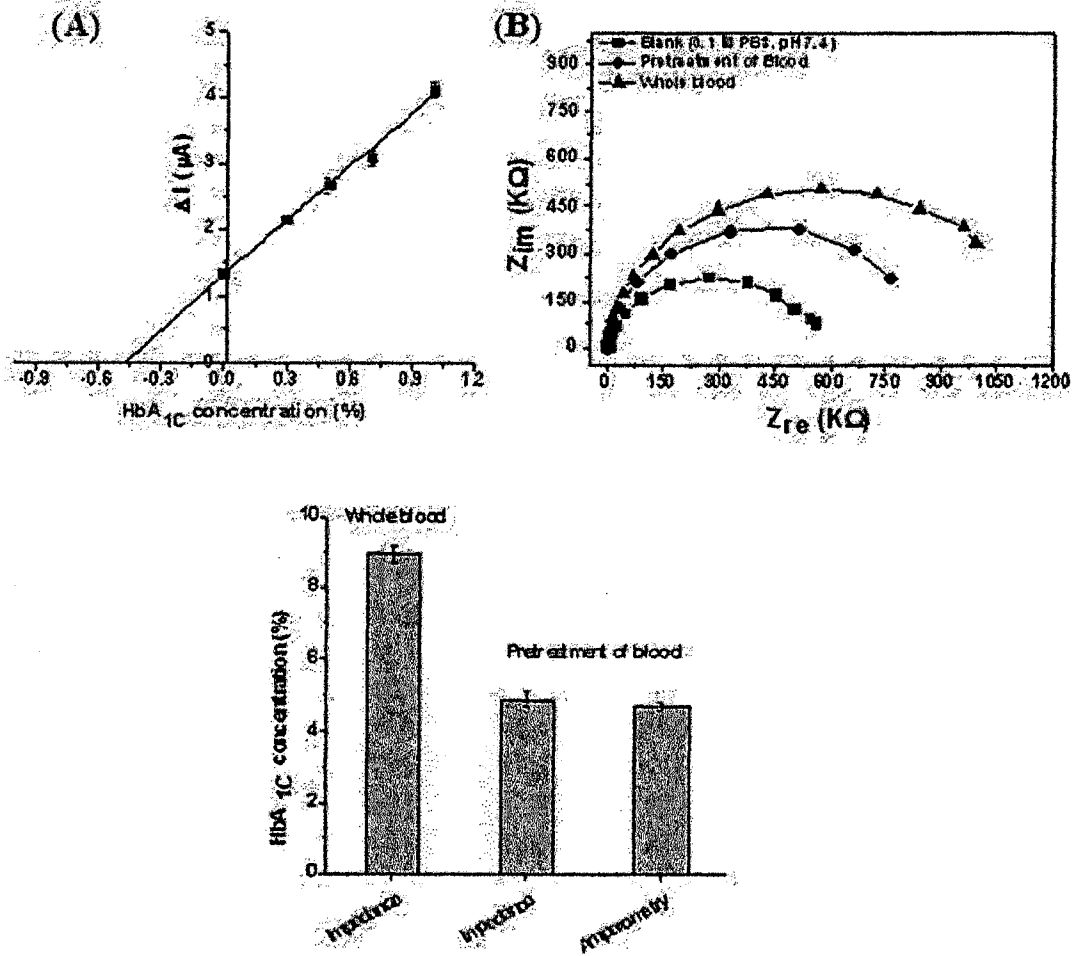
3/4

[도5]



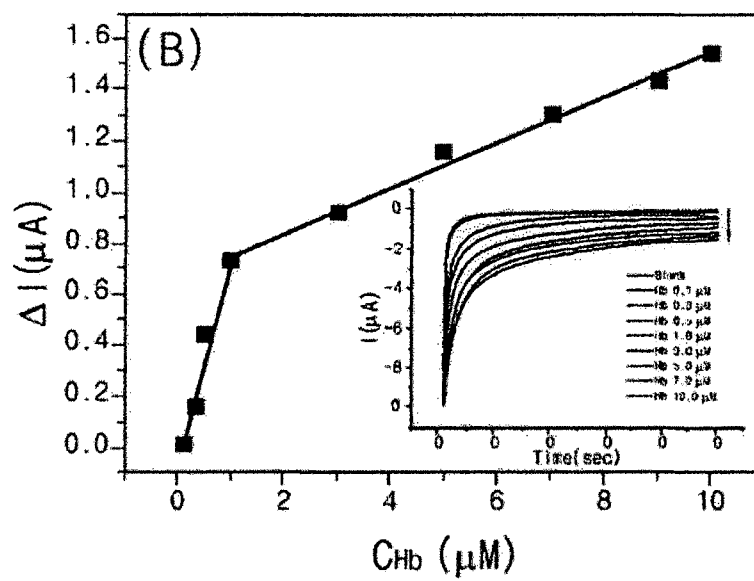
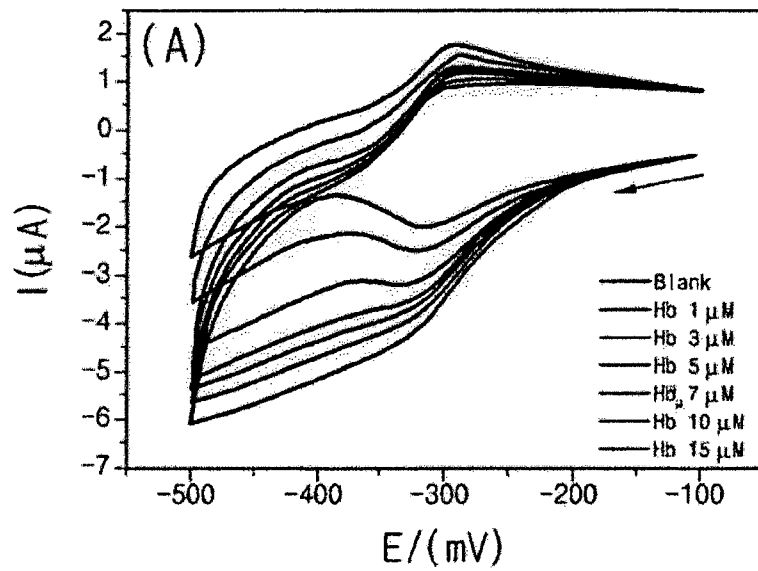
3/4/1

[도6]



4/4

[도7]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2016/009775****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 27/327(2006.01)i, G01N 33/66(2006.01)i, B82Y 15/00(2011.01)n**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/327; G01N 27/403; G01N 33/49; G01N 27/30; G01N 27/406; G01N 33/53; G01N 27/407; G01N 33/68; G01N 33/66; B82Y 15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: hemoglobin, sensor, gold nanoparticle layer, polymer composite layer, concurrent detection, cerebron acid, aptamer, concentration and PH

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | KR 10-2010-0008260 A (I-SENS, INC.) 25 January 2010<br>See paragraphs [0014]-[0022] and figures 1-6.                                                              | 1-15                  |
| Y         | KR 10-2014-0143999 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 18 December 2014<br>See paragraphs [0008]-[0051] and claim 1.         | 1-15                  |
| Y         | BRETT et al., "Poly(Methylene Blue) Modified Electrode Sensor for Haemoglobin",<br>Analytica Chimica Acta 385 (1999), pages 119-123<br>See abstract and page 119. | 6                     |
| A         | KR 10-2012-0103911 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 20 September 2012<br>See paragraphs [0006]-[0013] and figure 1.       | 1-15                  |
| A         | KR 10-2014-0108810 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 15 September 2014<br>See paragraphs [0011]-[0021] and claims 1-8.     | 1-15                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 DECEMBER 2016 (28.12.2016)

Date of mailing of the international search report

**28 DECEMBER 2016 (28.12.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/009775**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member                                                                             | Publication<br>date                                                |
|-------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| KR 10-2010-0008260 A                      | 25/01/2010          | US 2011-0123399 A1<br>US 2013-0153443 A1<br>US 8895258 B2<br>WO 2010-008137 A2<br>WO 2010-008137 A3 | 26/05/2011<br>20/06/2013<br>25/11/2014<br>21/01/2010<br>11/02/2010 |
| KR 10-2014-0143999 A                      | 18/12/2014          | NONE                                                                                                |                                                                    |
| KR 10-2012-0103911 A                      | 20/09/2012          | NONE                                                                                                |                                                                    |
| KR 10-2014-0108810 A                      | 15/09/2014          | KR 10-1478896 B1                                                                                    | 08/01/2015                                                         |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

G01N 27/327(2006.01)i, G01N 33/66(2006.01)i, B82Y 15/00(2011.01)n

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/327; G01N 27/403; G01N 33/49; G01N 27/30; G01N 27/406; G01N 33/53; G01N 27/407; G01N 33/68; G01N 33/66; B82Y 15/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) &amp; 키워드: 헤모글로빈, 센서, 금나노입자층, 고분자 복합층, 동시 검출, 보론산, 압타머, 농도 및 PH

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                         | 관련 청구항 |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Y     | KR 10-2010-0008260 A (주식회사 아이센스) 2010.01.25<br>단락 [0014]-[0022] 및 도면 1-6 참조.                                                                       | 1-15   |
| Y     | KR 10-2014-0143999 A (부산대학교 산학협력단) 2014.12.18<br>단락 [0008]-[0051] 및 청구항 1 참조.                                                                      | 1-15   |
| Y     | BRETT et al., 'Poly(methylene blue) modified electrode sensor for haemoglobin', Analytica chimica acta 385 (1999), 페이지 119-123<br>요약 및 페이지 119 참조. | 6      |
| A     | KR 10-2012-0103911 A (부산대학교 산학협력단) 2012.09.20<br>단락 [0006]-[0013] 및 도면 1 참조.                                                                       | 1-15   |
| A     | KR 10-2014-0108810 A (부산대학교 산학협력단) 2014.09.15<br>단락 [0011]-[0021] 및 청구항 1-8 참조.                                                                    | 1-15   |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 28일 (28.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 12월 28일 (28.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이현길

전화번호 +82-42-481-8525



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                                              | 공개일                                                                |
|-----------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| KR 10-2010-0008260 A  | 2010/01/25 | US 2011-0123399 A1<br>US 2013-0153443 A1<br>US 8895258 B2<br>WO 2010-008137 A2<br>WO 2010-008137 A3 | 2011/05/26<br>2013/06/20<br>2014/11/25<br>2010/01/21<br>2010/02/11 |
| KR 10-2014-0143999 A  | 2014/12/18 | 없음                                                                                                  |                                                                    |
| KR 10-2012-0103911 A  | 2012/09/20 | 없음                                                                                                  |                                                                    |
| KR 10-2014-0108810 A  | 2014/09/15 | KR 10-1478896 B1                                                                                    | 2015/01/08                                                         |