

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 5월 16일 (16.05.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/101955 A1

(51) 국제특허분류:

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/018085

(22) 국제출원일:

2023년 11월 10일 (10.11.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0149429 2022년 11월 10일 (10.11.2022) KR

(71) 출원인: 계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY) [KR/KR]; 42601 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 201호 (신당동), Daegu (KR).

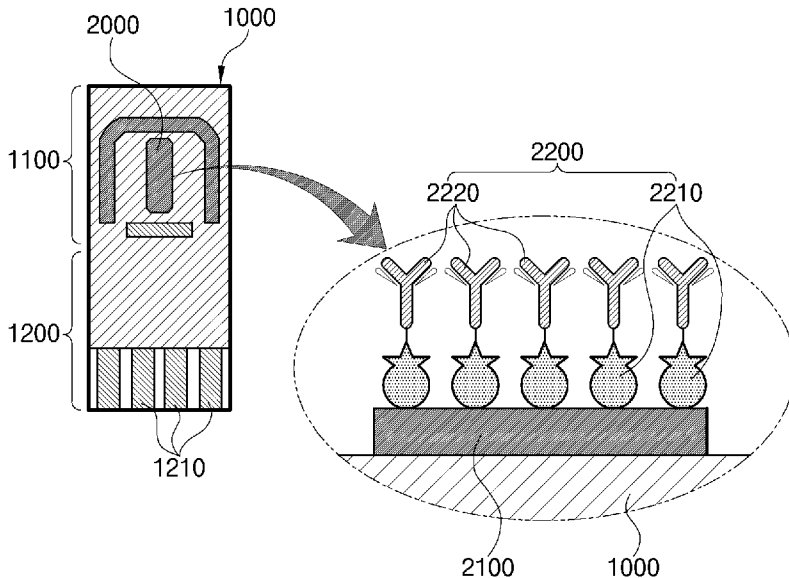
(72) 발명자: 허윤석 (HEO, Yun Seok); 10248 경기도 고양시 일산서구 탄현로 136, 115-904, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08505 서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동 1802호(가산동, 한라원엔원타워), 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: GLYCATED HEMOGLOBIN MEASUREMENT DEVICE USING CARBON ELECTRODE, BIOSENSOR FOR SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF GLUCOSE AND GLYCATED HEMOGLOBIN USING SAME, AND METHOD FOR SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF GLUCOSE AND GLYCATED HEMOGLOBIN USING SAME BIOSENSOR

(54) 발명의 명칭: 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치와 이를 이용한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법



(57) Abstract: The present invention provides a device for measuring glycated hemoglobin measurement using carbon electrodes, a biosensor for simultaneous measurement of glucose and glycated hemoglobin, using same, and a method for simultaneous measurement of glucose and glycated hemoglobin, using the biosensor, wherein the biosensor includes a first measurement electrode, formed on the surface of a measuring part compartmentalized on a base substrate, for measuring a blood glucose level with a single drop of a sample introduced into the measuring part, and a second measurement electrode, formed around the first measurement electrode, for measuring a blood glycated hemoglobin level with a single drop of the sample introduced into the measuring part, whereby the sensor allows for the simultaneous measurement of blood glucose and glycated hemoglobin levels with a single drop of sample, offering a cheaper and simpler measurement method than conventional ones, enables the collection of both short and long-term information about

[다음 쪽 계속]



SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,
ME, 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 제21조(3))

a patient's blood sugar status due to the simultaneous measurement of blood glucose and glycated hemoglobin levels, and is capable of faster measurement compared to conventional sensors, with adequate sensitivity, selectivity, and efficiency suitable for monitoring fluctuations in a patient's blood sugar.

(57) 요약서: 본 발명은 베이스기판에 구획된 측정부 표면에 형성되어, 상기 측정부에 주입되는 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스량을 측정하는 제1 측정전극, 및 상기 제1 측정전극과 주변에 형성되고, 상기 측정부에 주입되는 하나의 시료 방울로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 제2 측정전극을 포함한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 제공함에 따라 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정할 수 있어, 종래보다 저렴하고, 간편한 측정 방식을 제공하고, 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정함에 따라 환자의 혈당 상태에 대한 장, 단기 정보를 동시에 모두 수집할 수 있으며, 종래보다 신속한 측정이 가능하여, 환자의 혈당에 대한 변동을 모니터링에 적합한 감도, 선택성 및 효율성을 갖춘 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치와 이를 이용한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치와 이를 이용한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법 기술분야

- [1] 본 발명은 글루코스 및 당화혈색소를 측정하는 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 측정방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 하나의 시료 방울을 이용하여, 전기화학적으로 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정할 수 있는 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치와 이를 이용한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 글루코스(포도당)는 인체에서 에너지 생산을 위한 주요 대사 기질 중 하나로, 혈당을 모니터링하면 다양한 만성 건강 상태(당뇨병, 고혈압, 지방간)를 이해하는데 도움이 된다.
- [3] 그러나 혈당 농도는 단기간에도 식단과 신체 활동에 따라 자주 변동하게 되는데, 혈중 글루코스만을 측정하면 의료 결과가 혼동될 수 있다.
- [4] 당화혈색소(HbA1c)는 장기적인 혈당 상태를 제공하여 상기한 단점을 보완할 수 있다.
- [5] 단백질의 아미노기와 글루코스의 카르복실기 사이에 즉각적인 결합이 형성되어 일종의 쉬프(Schiff) 염기를 생성하는데, 이 염기는 재배열 후 안정한 당단백질(케토아민)로 천천히 변한다.
- [6] 혈색소인 헤모글로빈(Hb)은 혈액에 존재하는 단백질 중 하나로 당화되어 당화헤모글로빈(HbA1c)을 형성할 수 있습니다.
- [7] 헤모글로빈의 반감기가 60일이므로 당화혈색소(HbA1c)의 측정은 혈액의 장기적인 혈당 상태를 이해하는데 중요하다.
- [8] 글루코스와 당화혈색소를 함께 측정하면 급성 및 만성 증상과 같은 혈당 상태에 대한 명확한 정보를 얻을 수 있다.
- [9] 종래에도 글루코스에 대한 전기화학적 바이오센서를 개발하기 위해 여러 접근 방식이 도입되었는데, 매개체가 있는 글루코스 산화효소(GOX) 기반 바이오센서는 현장 진료 장치로서 혈당을 측정하는데 민감하고, 특이적이고, 선택적이고, 효율적인 것으로 입증되었다.
- [10] 그러나 임상 시료(샘플)에서 당화혈색소의 정량화는 여전히 이온 교환 친화성 크로마토그래피 및 항체 기반 키트와 같은 실험실 기반 방법을 사용하여 수행된다.

- [11] 이러한 방법을 사용하여 혈액에서 당화혈색소를 검출하는 것은 상대적으로 시간이 많이 걸리고 비용이 많이 든다.
- [12] 또한, 이러한 방법에는 거대한 장비를 갖춘 숙련된 작업자를 필요하고, 신뢰할 수 있는 응답을 제공하는 현장 진료 호환 전기화학 바이오센서는 기존의 실험실 기반 방법에 대한 최상의 대안이 될 수 있다.
- [13] 최근 당화혈색소에 대한 전기화학적 바이오센서는 당 결합 붕소산 또는 당화혈색소에 특이적인 항체로 전극의 표면 변형을 사용하여 구성되었다.
- [14] 그러나 이러한 당화혈색소 측정용 전기화학적 바이오센서는 대부분 일회용 전극이 없고, 측정에 1시간 이상 소요되며 선택도가 낮고 감도가 낮다는 단점이 있었다.
- [15] 이러한 단점은 임상 사용을 방해하였는데, 일 예를 들면 효소로 혈액을 전처리 하면 당화혈색소의 실체를 쉽게 정량화할 수 있는 프록토실 발린으로 전환할 수 있다.
- [16] 그러나 전처리 시간이 더 오래 걸리고, 또한 유사한 당화아민 및 단백질에서 잘못된 결과가 생성되었다.
- [17] 그리고 유사하게, 당화혈색소의 당화된 부분에 부착된 붕소산을 포함하는 전극은 전기화학적 바이오센서에 사용될 수 있다.
- [18] 그러나 이 부착물의 선택성은 글루코스 및 유사한 당화알부민의 영향을 받았다.
- [19] 당화혈색소의 특이적인 항체(Ab)는 높은 감도와 선택성을 위한 최고의 도구가 될 수 있다. 그러나 이러한 항체 기반 방법은 임피던스 및 순환 전압전류법과 같은 표면 간접 측정 방법에 의존하기 때문에 응답 신호가 매우 낮다.
- [20] 또한, 상기한 항체 기반으로 한 측정방법은 금 전극만을 사용하였는데, 항체는 단일 전극 스트립의 탄소 전극과 호환되지 않아 비용 및 제조 측면에서 통합 탄소 기반 바이오 센서의 상용화를 어렵게 만드는 문제점이 있었다.
- [21] 종래기술로는 등록특허 제10-0776395호(2007.11.07)와, 공개특허 제 10-2014-0071062호(2014.06.11)를 참조할 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [22] 본 발명은 탄소전극을 이용하여 글루코스 산화효소를 기반으로 한 글루코스 포획층과, 당화혈색소를 포획할 수 있는 당화혈색소 포획층을 하나의 기판에 형성할 수 있어 글루코스와 당화혈색소를 동시에 측정할 수 있는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [23] 다른 목적으로 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정함에 따라 종래보다 저렴하고, 간편한 측정 방식을 제공하고, 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정함에 따라 환자의 혈당 상태에 대한 장, 단기 정보를 동시에 모두 수집할 수 있으며, 종래보다 신속한 측정이 가능하여, 환자의 혈

당에 대한 변동을 모니터링에 적합한 감도, 선택성 및 효율성을 갖춘 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치와 이를 이용한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [24] 본 발명에 따른 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치는 판 상의 측정부와 단자부로 구획된 베이스기판; 상기 베이스기판의 측정부 표면에 형성되는 탄소전극층; 상기 탄소전극층에 입자상으로 도포되는 금나노입자층; 및 상기 금나노입자층을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재된 당화혈색소 안티바디들에 의해 이루어진 당화혈색소 포획층을 포함하여, 상기 당화혈색소 포획층으로 시료에 포함된 당화혈색소들이 포획되고, 상기 측정부에 첨가되는 과산화수소가 당화혈색소의 아이언 헴(iron heme)에 의해 물로 전환되면서 발생하는 전자들에 의한 전류로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 것을 포함한다.
- [25] 본 발명에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서는 판 상의 측정부와 단자부로 구획된 베이스기판; 상기 베이스기판에 구획된 측정부 표면에 형성되는 기준전극; 상기 베이스기판에 구획된 측정부 표면에 형성되어, 상기 측정부에 주입되는 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스량을 측정하는 제1측정전극; 및 상기 제1측정전극과 주변에 형성되고, 상기 측정부에 주입되는 하나의 시료 방울로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 제2측정전극을 포함한다.
- [26] 이때 본 발명에 따른 상기 제1측정전극은 상기 베이스기판의 측정부 표면에 형성되는 제1탄소전극층과, 상기 제1탄소전극층의 상면에 형성되어, 상기 측정부에 도포되는 시료의 글루코스를 포획하는 글루코스 포획층을 포함한다.
- [27] 여기서 본 발명에 따른 상기 글루코스 포획층은 혈청알부민(BSA) + 글루타르알데히드 + 글루코스산화효소 + 매개체(FcMtOH)가 혼합된 효소침착용액을 상기 제1탄소전극층 상면에 침착하여 글루코스 포획층이 형성된다.
- [28] 그러므로 본 발명에 따른 상기 제1측정전극은 상기 글루코스 포획층으로 시료에 포함된 글루코스들을 포획하여, 포획된 글루코스의 산화 반응으로 글루코스에서 글루코노락톤으로 전환되면서 발생하는 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 글루코스량을 측정한다.
- [29] 그리고 본 발명에 따른 상기 제2측정전극은 상기 베이스기판의 측정부 표면에 형성되는 제2탄소전극층과, 상기 제2탄소전극층의 상면에 형성되어, 상기 측정부에 도포되는 시료의 당화혈색소를 포획하는 당화혈색소 포획층을 포함한다.
- [30] 이때 본 발명에 따른 상기 당화혈색소 포획층은 상기 제2탄소전극층에 입자상으로 도포되는 금나노입자층과, 상기 금나노입자층을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재된 당화혈색소 안티바디들을 포함한다.
- [31] 여기서 본 발명에 따른 상기 당화혈색소 안티바디는 상기 금나노입자층의 표면에 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 용액을 도포하여, 3-메르캅토프로피온산 단층

을 형성하고, 상기 금나노입자층 표면의 3-메르캅토프로피온산이 활성화되도록 농도가 0.05M인 N-히드록시숙신이미드(NHS) 및 농도가 0.25M인 N-(3-디메틸아미노프로필)-n'-에틸카르보디이미드염산염(ECD)으로 구성된 ECD-NHS 용액을 도포하여 당화혈색소 안티바디가 상기 금나노입자층 표면에 식재된다.

[32] 그러므로 본 발명에 따른 상기 제2측정전극은 상기 당화혈색소 포획층으로 시료에 포함된 당화혈색소들을 포획하고, 과산화수소가 측정부에 첨가되면, 당화혈색소의 아이언 헴(iron heme)에 의해 물로 전환되면서 발생하는 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 당화혈색소량을 측정한다.

[33] 본 발명에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법은 1-a)글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비하는 단계; 1-b)시료를 준비하는 단계; 1-c)하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입하는 단계; 1-d)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 제1측정전극으로 글루코스량을 측정하는 단계; 1-e)하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척하는 단계; 1-f)시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소를 주입하는 단계; 및 1-g)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 당화혈색소를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[34] 본 발명에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법은 2-a)글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비하는 단계; 2-b)시료를 준비하는 단계; 2-c)하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입하는 단계; 2-d)하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척하는 단계; 2-e)시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소를 주입하는 단계; 및 2-f)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[35] 본 발명에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법에 의해 나타나는 효과는 다음과 같다.

[36] 탄소전극을 이용하여 글루코스 산화효소를 기반으로 한 글루코스 포획층과, 당화혈색소를 포획할 수 있는 당화혈색소 포획층을 하나의 기판에 형성할 수 있어 글루코스와 당화혈색소를 동시에 측정할 수 있다.

[37] 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정함에 따라 종래보다 저렴하고, 간편한 측정방식을 제공한다.

[38] 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정함에 따라 환자의 혈당 상태에 대한 장, 단기 정보를 동시에 모두 수집할 수 있다.

[39] 글루코스 및 당화혈색소의 측정 시간을 20~30분으로 단축 시켜, 종래보다 신속한 측정이 가능하다.

[40]

도면의 간단한 설명

- [41] 도 1은 본 발명의 일 실시 예에 따른 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치를 보인 예시도이다.
- [42] 도 2는 본 발명의 일 실시 예에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 보인 예시도이다.
- [43] 도 3은 본 발명의 일 실시 예에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서의 제1측정전극 및 제2측정전극을 보인 예시도이다.
- [44] 도 4는 본 발명의 일 실시 예에 따른 제1측정전극 및 제2측정전극에 의해 시료 방울에 포함된 글루코스 및 당화혈색소가 측정되는 예시를 보인 예시도이다.
- [45] 도 5는 본 발명의 일 실시 예에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 이용하여 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 과정을 보인 예시도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 본 발명은 판 상의 측정부와 단자부로 구획된 베이스기판; 상기 베이스기판의 측정부 표면에 형성되는 탄소전극층; 상기 탄소전극층에 입자상으로 도포되는 금나노입자층; 및 상기 금나노입자층을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재된 당화혈색소 안티바디들에 의해 이루어진 당화혈색소 포획층을 포함하여, 상기 당화혈색소 포획층으로 시료에 포함된 당화혈색소들이 포획되고, 상기 측정부에 첨가되는 과산화수소가 당화혈색소의 아이언 헴(iron heme)에 의해 물로 전환되면서 발생하는 전자들에 의한 전류로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [47] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시 예를 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [48] 따라서 본 명세서에 기재된 실시 예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 실시 예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들은 대체할 수 있는 균등한 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [49] 본 발명은 하나의 시료 방울을 이용하여, 전기화학적으로 혈중 글루코스 및 당화혈색소를 동시에 측정할 수 있는 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치와 이를 이용한 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서 및 그 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법에 관한 것으로, 도면을 참조하여 살펴보면 다음과 같다.

- [50] 도 1을 참조한 본 발명의 일 실시 예에 따른 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치는 베이스기판(1000)와, 탄소전극층(2100)와, 금나노입자층(2210), 및 당화혈색소 포획층(2220)을 포함하는데, 상기 베이스기판(1000)은 통상의 스트립 바이오센서와 같이 두께가 너비 및 길이보다 상대적으로 얇은 직사각 형태의 판상으로, 전기적, 화학적으로 높은 내구성을 갖는 합성수지 재질로 이루어지는 것이 바람직하고, 상기 베이스기판(1000)의 표면은 측정부(1100)와 단자부(1200)로 구획된다.
- [51] 상기 측정부(1100)에 형성된 측정전극(2000)은 탄소전극층(2100)과, 당화혈색소 포획층(2200)을 포함하는데, 상기 탄소전극층(2100)은 상기 베이스기판(1000)의 측정부(1100) 표면에 스크린 인쇄방법으로 형성된다.
- [52] 이때 상기 탄소전극층(2100)은 상기 단자부(1200)에 형성된 다른 한 단자(1210)와 전기적으로 연결될 수 있도록 상기 단자(1210)에서 측정부(1100)으로 연장된 동박(또는 동도금층) 상에 형성되거나, 또는 측정부(1100) 표면 상에 층으로 형성되어, 어느 한 단자(1210)와 전기적으로 연결될 수 있다.
- [53] 그리고 상기 탄소전극층(2100)의 상면에는 당화혈색소 포획층(2200)을 형성하는데, 상기 당화혈색소 포획층(2200)은 상기 측정부(1100)에 주입되는 하나의 시료 방울에 포함된 당화혈색소를 포획한다.
- [54] 여기서 상기 당화혈색소 포획층(2200)은 금나노입자층(2210)에 당화혈색소 안티바디(2220)들이 식재된 것으로, 상기 탄소전극층(2100)의 표면에 금나노입자가 정전기 증착 방법(potential static deposition method)으로 정착되어, 금나노입자층(2210)을 이룬다.
- [55] 상기 금나노입자층(2210)의 증착 과정을 살펴보면, HgAuCl_4 용액 50ul를 증류수에 혼합하여 상기 탄소전극층(2100)의 표면에 도포한 후, 0.7볼트 전위의 전류를 해당시간 동안 인가하여 금나노입자가 입자상으로 상기 탄소전극층(2100)의 표면에 증착되어 금나노입자층(2210)을 이룬다.
- [56] 그리고 상기 금나노입자층(2210)의 해당 금나노입자 각각에는 당화혈색소 안티바디들(2220)이 식재되는데, 이 과정을 살펴보면, 증착 과정에 의해 형성된 상기 금나노입자층(2210)의 표면을 중수(보통의 물보다 분자량이 큰 물 D_2O)로 세척한 후, 건조 과정을 거치게 되고, 건조된 상기 금나노입자층(2210)의 표면에 4°C의 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 용액(80% 메탄올에서 1mM)에 해당시간 동안 침지하며, 침지가 완료되면 80% 메탄올 및 중수로 순차적으로 세척한 후 다시 건조 과정을 거치게 되고, 상기 3-MPA를 활성화하기 위해, 농도가 0.05M인 N-히드록시 숙신이미드(NHS) 및 농도가 0.25M인 N-(3-디메틸아미노프로필)-n'-에틸 카르보디이미드 염산염(ECD)으로 구성된 ECD-NHS 용액과, 농도가 0.1M인 PBS(phosphate buffer saline)에서 제조하고, 제조된 ECD-NHS 용액을 3-MPA의 침지가 완료된 상기 측정전극(2000)에 도포하여 실온에서 5시간 동안 적용되도록 한다.

- [57] 3-MPA가 활성화되면, 농도 0.1M인 PBS 및 증수로 순차적으로 세척하고 다시 건조과정을 거치게 된다.
- [58] 따라서 상기한 과정에 의해 금나노입자층(2210)을 이루는 금나노입자들에 당화혈색소 안티바디(C-Ab: 2220)가 식재됨에 따라 상기 측정전극(2000)은 상기 당화혈색소 포획층(2200)으로 시료에 포함된 당화혈색소들을 포획하고, 과산화수소(H_2O_2)가 측정부(1100)에 첨가되면, 과산화수소가 당화혈색소의 4개 아이언 헴(iron heme)과 반응하여 물(H_2O)과 함께 전자(e^-)를 발생하게 되고, 발생된 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 당화혈색소량을 측정할 수 있다.
- [59] 도 2 내지 도 4를 참조한 본 발명의 일 실시 예에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서는 베이스기관(100)과, 제1측정전극(200)과, 제2측정전극(300)을 포함한다.
- [60] 상기 베이스기관(100)은 통상의 스트립 바이오센서와 같이 두께가 너비 및 길이보다 상대적으로 얇은 직사각 형태의 판 상으로, 전기적, 화학적으로 높은 내구성을 갖는 합성수지 재질로 이루어지는 것이 바람직하고, 상기 베이스기관(100)의 표면은 측정부(110)와 단자부(120)로 구획된다.
- [61] 이때 상기 베이스기관(100)의 단자부(120)는 전류를 측정할 수 있는 장치와 전기적으로 연결할 수 있도록 복수 개의 단자(121)가 형성되고, 상기 단자부(121)는 측정부(110)의 측정단자들과 전기적으로 연결되며, 상기 베이스기관(100)의 측정부(110)는 하나의 시료 방울이 주입되는 지점으로, 하나의 시료 방울 속에 포함된 글루코스 및 당화혈색소를 측정하는 구역이다.
- [62] 그러므로 상기 측정부(110)에는 복수 개의 단자(121) 중 어느 한 단자(121)와 전기적으로 연결되는 기준전극(미부호)과, 다른 한 단자(121)와 전기적으로 연결되어 글루코스를 측정하는 제1측정전극(200)과, 다른 한 단자(121)와 연결되어 당화혈색소를 측정하는 제2측정전극(300)을 형성한다.
- [63] 여기서 상기 측정부(110)는 하나의 시료 방울 및 과산화수소(H_2O_2) 방울을 수용할 수 있도록 상기 베이스기관(100)의 표면보다 깊이가 있는 오목한 홈으로 형성할 수도 있다.
- [64] 상기 기준전극은 시료와 과산화수소 반응에도 일정한 전위를 갖는 것으로, 측정전극(200, 300)들의 전위차를 얻기 위해 기준이 된다.
- [65] 그리고 본 발명의 일 실시 예에 따른 상기 제1측정전극(200)은 상기 베이스기관(100)의 측정부(110) 표면에 기준전극 및 제2측정전극(300)과 함께 형성되어, 상기 측정부(110)에 주입되는 하나의 시료 방울에 포함된 혈중 글루코스량을 측정한다.
- [66] 여기서 상기 제1측정전극(200)을 보다 상세하게 살펴보면 다음과 같다.
- [67] 상기 제1측정전극(200)은 제1탄소전극층(210)과, 글루코스 포획층(220)을 포함하는데, 상기 제1탄소전극층(210)은 상기 베이스기관(100)의 측정부(110) 표면에 스크린 인쇄방법으로 형성된다.

- [68] 이때 상기 제1탄소전극층(210)은 상기 단자부(120)에 형성된 어느 한 단자(121)와 전기적으로 연결될 수 있도록 상기 단자(121)에서 측정부(110)로 연장된 동박(또는 동도금층) 상에 형성되거나, 또는 측정부(110) 표면 상에 층으로 형성되어, 어느 한 단자(121)와 전기적으로 연결될 수 있다.
- [69] 그리고 상기 제1탄소전극층(210)의 상면에는 글루코스 포획층(220)을 형성하는데, 상기 글루코스 포획층(220)은 상기 측정부(110)에 주입되는 시료 방울에 포함된 글루코스를 포획한다.
- [70] 이때 상기 글루코스 포획층(220)은 효소침착용액의 침착으로 형성되는데, 상기 효소침착용액은 혈청알부민(BSA: 221) + 글루타르알데히드(222) + 글루코스 산화효소(223) + 매개체(FcMtOH: 224)가 혼합된 혼합용액으로, 바람직하게는 혈청알부민(BSA) 25 mg ml^{-1} , 글루타르알데히드 2.5% w/v, 글루코스 산화효소를 10:1:2 비율로 증류수에 용해시킨 후, 매개체(FcMtOH)를 첨가하여 최종 농도가 3mM인 효소침착용액 5 μ l를 제조하고, 5 μ l의 효소침착용액을 상기 제1탄소전극층(210)의 상면에 도포한 후, 실온에서 이를 건조함에 따라 효소침착용액이 상기 제1탄소전극층(210)의 상면에 침착되어 상기 글루코스 포획층(220)이 형성된다.
- [71] 따라서 상기 제1측정전극(200)은 상기 글루코스 포획층(220)으로 시료에 포함된 글루코스들을 포획하여, 글루코스의 산화로 글루코노락톤으로 전환되면서 Fc^+ 와 전자(e^-)가 발생하게 되고, 발생된 전자들에 의해 전류가 발생하여, 발생된 전자 양과 비례하는 전류량으로 혈중 글루코스량을 측정할 수 있다.
- [72] 또한, 상기 제2측정전극(300)은 상기 베이스기판(100)의 측정부(110) 표면에 상기 제1측정전극(200)과 함께 형성되어, 상기 측정부(110)에 주입되는 하나의 시료 방울에 포함된 혈중 당화혈색소량을 측정한다.
- [73] 여기서 상기 제2측정전극(300)을 보다 상세하게 살펴보면 다음과 같다.
- [74] 상기 제2측정전극(300)은 제2탄소전극층(310)과, 당화혈색소 포획층(320)을 포함하는데, 상기 제2탄소전극층(310)은 상기 베이스기판(100)의 측정부(110) 표면에 스크린 인쇄방법으로 형성된다.
- [75] 이때 상기 제2탄소전극층(310)은 상기 단자부(120)에 형성된 다른 한 단자(121)와 전기적으로 연결될 수 있도록 상기 단자(121)에서 측정부(110)로 연장된 동박(또는 동도금층) 상에 형성되거나, 또는 측정부(110) 표면 상에 층으로 형성되어, 어느 한 단자(121)와 전기적으로 연결될 수 있다.
- [76] 그리고 상기 제2탄소전극층(310)의 상면에는 당화혈색소 포획층(320)을 형성하는데, 상기 당화혈색소 포획층(320)은 상기 측정부(110)에 주입되는 하나의 시료 방울에 포함된 당화혈색소를 포획한다.
- [77] 여기서 상기 당화혈색소 포획층(320)은 금나노입자층(321)에 당화혈색소 안티바디(322)들이 식재된 것으로, 상기 제2탄소전극층(310)의 표면에 금나노입자가 정전기 증착 방법(potential static deposition method)으로 정착되어, 금나노입자층(321)을 이룬다.

- [78] 상기 금나노입자층(321)의 증착 과정을 살펴보면, HgAuCl_4 용액 50ul를 증류수에 혼합하여 상기 제2탄소전극층(310)의 표면에 도포한 후, 0.7볼트 전위의 전류를 해당시간 동안 인가하여 금나노입자가 입자상으로 상기 제2탄소전극층(310)의 표면에 증착되어 금나노입자층(321)을 이룬다.
- [79] 그리고 상기 금나노입자층(321)의 해당 금나노입자 각각에는 당화혈색소 안티바디들(322)이 식재되는데, 이 과정을 살펴보면, 증착 과정에 의해 형성된 상기 금나노입자층(321)의 표면을 중수(보통의 물보다 분자량이 큰 물 D_2H_2O)로 세척한 후, 건조 과정을 거치게 되고, 건조된 상기 금나노입자층(321)의 표면에 4°C 의 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 용액(80% 메탄올에서 1mM)에 해당시간 동안 침지하며, 침지가 완료되면 80% 메탄올 및 중수로 순차적으로 세척한 후 다시 건조 과정을 거치게 되고, 상기 3-MPA를 활성화하기 위해, 농도가 0.05M인 N-히드록시 숙신이미드(NHS) 및 농도가 0.25M인 N-(3-디메틸아미노프로필)-n'-에틸 카르보다이미드 염산염(ECD)으로 구성된 ECD-NHS 용액과, 농도가 0.1M인 PBS(phosphate buffer saline)에서 제조하고, 제조된 ECD-NHS 용액을 3-MPA의 침지가 완료된 상기 제2측정전극(300)에 도포하여 실온에서 5시간 동안 적용되도록 한다.
- [80] 3-MPA가 활성화되면, 농도 0.1M인 PBS 및 중수로 순차적으로 세척하고 다시 건조과정을 거치게 된다.
- [81] 따라서 상기한 과정에 의해 금나노입자층(321)을 이루는 금나노입자들에 당화혈색소 안티바디(C-Ab: 322)가 식재됨에 따라 상기 제2측정전극(300)은 상기 당화혈색소 포획층(320)으로 시료에 포함된 당화혈색소들을 포획하고, 과산화수소(H_2O_2)가 측정부(110)에 첨가되면, 당화혈색소의 4개 아이언 헴(iron heme)과 과산화수소가 반응하여 물(H_2O)과 함께 전자(e^-)를 발생하게 되고, 발생된 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 당화혈색소량을 측정할 수 있다.
- [82] 도 5를 참조한 본 발명의 일 실시 예에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법을 살펴보면 다음과 같다.
- [83] 1-a)글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비하는 단계와, 1-b)시료를 준비하는 단계와, 1-c)하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입하는 단계와, 1-d)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 제1측정전극으로 글루코스량을 측정하는 단계와, 1-e)하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척하는 단계와, 1-f)시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소를 주입하는 단계, 및 1-g)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 당화혈색소를 측정하는 단계를 포함하는데, 이를 보다 상세하게 살펴보면 다음과 같다.
- [84] 먼저 1-a)단계로, 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비한다.

- [85] 이때 상기 바이오센서에는 혈중 글루코스량을 측정하는 제1측정전극(200) 및 혈중 당화혈색소량을 측정하는 제2측정전극(300)을 포함하는데, 상기 제1측정전극(200)은 베이스기판(100)의 측정부(110) 표면에 형성되는 제1탄소전극층(210)과, 상기 제1탄소전극층(210)의 상면에 형성되어, 상기 측정부(110)에 주입되는 시료 방울의 글루코스를 포획하는 글루코스 포획층(220)을 포함한다.
- [86] 여기서 상기 글루코스 포획층(220)은 혈청알부민(BSA: 221) + 글루타르알데히드(222) + 글루코스산화효소(223) + 매개체(FcMtOH: 224)가 혼합된 효소침착용액을 상기 제1탄소전극층(210) 상면에 침착하여 형성하는 것이 바람직하다.
- [87] 따라서 상기 제1측정전극(200)은 상기 글루코스 포획층(220)으로 시료에 포함된 글루코스들을 포획하고, 포획된 글루코스의 산화 반응에 의해 글루코노락톤으로 전환되면서 발생하는 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 글루코스량을 측정한다.
- [88] 또한, 상기 제2측정전극(300)은 상기 베이스기판(100)의 측정부(110) 표면에 형성되는 제2탄소전극층(310)과, 상기 제2탄소전극층(310)의 상면에 형성되어, 상기 측정부(110)에 주입되는 시료 방울의 당화혈색소를 포획하는 당화혈색소 포획층(320)을 포함한다.
- [89] 이때 상기 당화혈색소 포획층(320)은 상기 제2탄소전극층(310)에 입자상으로 도포되는 금나노입자층(321)과, 상기 금나노입자층(321)을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재되는 당화혈색소 안티바디(322)들을 포함한다.
- [90] 여기서 상기 당화혈색소 안티바디(322)는 상기 금나노입자층(321)의 표면에 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 용액을 도포하여, 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 단층이 형성되도록 하고, 상기 금나노입자층(321) 표면의 3-메르캅토프로피온산이 활성화되도록 농도가 0.05M인 N-히드록시숙신이미드(NHS) 및 농도가 0.25M인 N-(3-디메틸아미노프로필)-n'-에틸카르보디이미드염산염(ECD)으로 구성된 ECD-NHS 용액을 도포하여 당화혈색소 안티바디(322)가 상기 금나노입자층(321) 표면에 식재되도록 한다.
- [91] 따라서 상기 제2측정전극(300)은 상기 당화혈색소 안티바디(322)로 이루어진 당화혈색소 포획층(320)으로 시료에 포함된 당화혈색소들을 포획하고, 추후 상기 측정부(110)에 과산화수소(H_2O_2)가 첨가되면, 당화혈색소의 4개 아이언 헴(iron heme)과 과산화수소가 반응하여 물(H_2O)과 함께 전자(e^-)를 발생하게 되고, 발생된 전자들에 의해 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 당화혈색소량을 측정한다.
- [92] 다음은 1-b)단계로, 시료를 준비한다.
- [93] 이때 상기 시료는 피검자의 전혈과 농도가 0.1M인 PBS(phosphate buffer saline)와, 헤모글로빈 용해 용액(Hb lysis solution)을 해당 비율로 혼합하여 섞어 용혈을 준비하는 것이 바람직하다.
- [94] 다음은 1-c)단계로, 하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입한다.

- [95] 상기 1-b)단계에서 준비된 시료를 스포이드로 채집하고, 그 스포이드를 이용하여 채집된 시료 중 하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부(110)에 주입한다.
- [96] 다음은 1-d)단계로, 바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 제1측정전극으로 글루코스량을 측정한다.
- [97] 이때 상기 제1측정전극(200)의 상기 글루코스 포획층(220)에 의해 포획된 글루코스의 산화 반응에 의해 글루코스가 글루코노락톤으로 전환되면서 전자가 발생하게 되고, 그 전자의 양으로 전류가 발생하여 글루코스량을 측정할 수 있다.
- [98] 여기서 상기 제1측정전극(200)을 통해 혈중 글루코스량을 측정하면서 제2측정전극(300)에서 시료에 포함된 당화혈색소를 충분히 포획할 수 있도록, 해당시간 동안(20분 정도) 시료 방울이 측정부(110)에 정채하고 있도록 한다.(해당시간 동안 인큐베이션 실시- 일예로 4°C에서 20분 정도 인큐베이션 실시 할 수 있음.)
- [99] 다음은 1-e)단계로, 하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척한다.
- [100] 이때 상기 측정부(110)의 세척은 농도가 0.1M인 PBS(phosphate buffer saline)를 이용하여 세척하는 것이 바람직하고, 세척이 완료되면 건조하여 다음 단계를 실시한다.
- [101] 다음은 1-f)단계로, 시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소(H_2O_2)를 주입한다.
- [102] 이때 상기 측정부(110)로 주입된 과산화수소(H_2O_2)는 제2측정전극(300)의 상기 당화혈색소 안티바디(322)로 이루어진 당화혈색소 포획층(320)에 의해 포획된 당화혈색소의 4개 아이언 헴(iron heme)과 반응하여 물(H_2O)과 함께 전자(e^-)를 발생한다.
- [103] 다음은 1-g)단계로, 바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 당화혈색소를 측정한다.
- [104] 이때 상기 제2측정전극(300)에서 발생한 전자들에 의해 상기 제2측정전극(300)에서 전류가 발생하여, 각각의 전류량을 기반으로 혈중 당화혈색소량을 측정한다.
- [105] 도 5를 참조한 본 발명의 다른 실시 예에 따른 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정 바이오센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법을 살펴보면 다음과 같다.
- [106] 2-a)글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비하는 단계와, 2-b)시료를 준비하는 단계와, 2-c)하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입하는 단계와, 2-d)하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척하는 단계와, 2-e)시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소를 주입하는 단계와, 2-f)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 단계를 포함한다.

- [107] 먼저 2-a)단계로, 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비한다.
- [108] 이때 상기 바이오센서에는 혈중 글루코스량을 측정하는 제1측정전극(200) 및 혈중 당화혈색소량을 측정하는 제2측정전극(300)을 포함하는데, 상기 제1측정전극(200)은 베이스기관(100)의 측정부(110) 표면에 형성되는 제1탄소전극층(210)과, 상기 제1탄소전극층(210)의 상면에 형성되어, 상기 측정부(110)에 주입되는 시료 방울의 글루코스를 포획하는 글루코스 포획층(220)을 포함한다.
- [109] 여기서 상기 글루코스 포획층(220)은 혈청알부민(BSA: 221) + 글루타르알데히드(222) + 글루코스산화효소(223) + 매개체(FcMtOH: 224)가 혼합된 효소침착용액을 상기 제1탄소전극층(210) 상면에 침착하여 형성하는 것이 바람직하다.
- [110] 따라서 상기 제1측정전극(200)은 상기 글루코스 포획층(220)으로 시료에 포함된 글루코스들을 포획하고, 포획된 글루코스의 산화 반응으로 글루코스에서 글루코노락톤으로 전환되면서 발생하는 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 글루코스량을 측정한다.
- [111] 또한, 상기 제2측정전극(300)은 상기 베이스기관(100)의 측정부(110) 표면에 형성되는 제2탄소전극층(310)과, 상기 제2탄소전극층(310)의 상면에 형성되어, 상기 측정부(110)에 주입되는 시료 방울의 당화혈색소를 포획하는 당화혈색소 포획층(320)을 포함한다.
- [112] 이때 상기 당화혈색소 포획층(320)은 상기 제2탄소전극층(310)에 입자상으로 도포되는 금나노입자층(321)과, 상기 금나노입자층(321)을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재되는 당화혈색소 안티바디(322)들을 포함한다.
- [113] 여기서 상기 당화혈색소 안티바디(322)는 상기 금나노입자층(321)의 표면에 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 용액을 도포하여, 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 단층이 형성되도록 하고, 상기 금나노입자층(321) 표면의 3-메르캅토프로피온산이 활성화되도록 농도가 0.05M인 N-히드록시숙신이미드(NHS) 및 농도가 0.25M인 N-(3-디메틸아미노프로필)-n'-에틸카르보디이미드염산염(ECD)으로 구성된 ECD-NHS 용액을 도포하여 당화혈색소 안티바디(322)가 상기 금나노입자층(321) 표면에 식재되도록 한다.
- [114] 따라서 상기 제2측정전극(300)은 상기 당화혈색소 안티바디(322)로 이루어진 당화혈색소 포획층(320)으로 시료에 포함된 당화혈색소들을 포획하고, 추후 상기 측정부(110)에 과산화수소가 첨가되면, 당화혈색소가 헴(heme)으로 전환되면서 발생하는 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 당화혈색소량을 측정한다.
- [115] 다음은 2-b)단계로, 시료를 준비한다.
- [116] 이때 상기 시료는 피검자의 전혈과 농도가 0.1M인 PBS(phosphate buffer saline)와, 헤모글로빈 용해 용액(Hb lysis solution)을 해당 비율로 혼합하여 섞어 준비하는 것이 바람직하다.
- [117] 다음은 2-c)단계로, 하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입한다.

- [118] 상기 2-b)단계에서 준비된 시료를 스포이드로 채집하고, 그 스포이드를 이용하여 채집된 시료 중 하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부(110)에 주입한다.
- [119] 그리고 바이오센서의 측정부(110)에 하나의 시료 방울이 주입되면, 상기 측정부(100)의 기준전극(미부호), 제1측정전극(200) 및 제2측정전극(300)에서 시료에 포함된 글루코스 및 당화혈색소를 충분히 포획할 수 있도록, 해당시간 동안(20분 정도) 시료 방울이 측정부(110)에 정체하고 있도록 한다.(해당시간 동안 인큐베이션 실시- 일예로 4°C에서 20분 정도 인큐베이션 실시 할 수 있음.)
- [120] 다음은 2-d)단계로, 하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척한다.
- [121] 이때 상기 측정부(110)의 세척은 농도가 0.1M인 PBS(phosphate buffer saline)를 이용하여 세척하는 것이 바람직하고, 세척이 완료되면 건조하여 다음 단계를 실시한다.
- [122] 다음은 2-e)단계로, 시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소(H_2O_2)를 주입한다.
- [123] 이때 상기 측정부(110)로 주입된 과산화수소는 상기 제1측정전극(200)의 상기 글루코스 포획층(220)에 의해 포획된 글루코스와 반응하여 글루코스가 글루코노락톤으로 전환되면서 전자가 발생되도록 하고, 상기 제2측정전극(300)의 상기 당화혈색소 안티바디(322)로 이루어진 당화혈색소 포획층(320)에 의해 포획된 당화혈색소의 4개 아이언 헴(iron heme)과 반응하여 물과 전자를 발생한다.
- [124] 다음은 2-f)단계로, 바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정한다.
- [125] 이때 상기 제1측정전극(200) 및 제2측정전극(300)에서 발생한 전자들에 의해 상기 제1측정전극(200) 및 제2측정전극(300)에서 전류가 발생하여, 각각의 전류량을 기반으로 혈중 글루코스량 및 당화혈색소량을 측정한다.
- [126] 본 발명은 도면에 도시된 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 판 상의 측정부와 단자부로 구획된 베이스기관;
상기 베이스기관의 측정부 표면에 형성되는 탄소전극층;
상기 탄소전극층에 입자상으로 도포되는 금나노입자층; 및
상기 금나노입자층을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재된 당화혈색소 안티바디들에 의해 이루어진 당화혈색소 포획층을 포함하여,
상기 당화혈색소 포획층으로 시료에 포함된 당화혈색소들이 포획되고, 상기 측정부에 첨가되는 과산화수소가 당화혈색소의 아이언 헴(iron heme)에 의해 물로 전환되면서 발생하는 전자들에 의한 전류로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 것을 포함하는 탄소전극을 이용한 당화혈색소 측정장치.
- [청구항 2] 판 상의 측정부와 단자부로 구획된 베이스기관;
상기 베이스기관에 구획된 측정부 표면에 형성되는 기준전극;
상기 베이스기관에 구획된 측정부 표면에 형성되어, 상기 측정부에 주입되는 하나의 시료 방울로 혈중 글루코스량을 측정하는 제1측정전극; 및
상기 제1측정전극과 주변에 형성되고, 상기 측정부에 주입되는 하나의 시료 방울로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 제2측정전극을 포함하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 제1측정전극은
상기 베이스기관의 측정부 표면에 형성되는 제1탄소전극층과,
상기 제1탄소전극층의 상면에 형성되어, 상기 측정부에 도포되는 시료의 글루코스를 포획하는 글루코스 포획층을 포함하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 글루코스 포획층은
혈청알부민(BSA) + 글루타르알데히드 + 글루코스산화효소 + 매개체 (FcMtOH) 가 혼합된 효소침착용액을 상기 제1탄소전극층 상면에 침착하여 글루코스 포획층이 형성되는 것을 특징으로 하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 제1측정전극은
상기 글루코스 포획층으로 시료에 포함된 글루코스들을 포획하여, 글루코스의 산화로 글루코노락톤으로 전환되면서 발생하는 전자로 전류가 발생하여, 그 전류량으로 혈중 글루코스량을 측정하는 것을 특징으로 하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.
- [청구항 6] 청구항 2에 있어서,

상기 제2측정전극은

상기 베이스기판의 측정부 표면에 형성되는 제2탄소전극층과,
상기 제2탄소전극층의 상면에 형성되어, 상기 측정부에 도포되는 시료의
당화혈색소를 포획하는 당화혈색소 포획층을 포함하는 글루코스 및 당화
혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.

[청구항 7]

청구항 6에 있어서,

상기 당화혈색소 포획층은

상기 제2탄소전극층에 입자상으로 도포되는 금나노입자층과,
상기 금나노입자층을 이루는 각각의 해당 금나노입자에 식재된 당화혈색
소 안티바디들을 포함하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바
이오센서.

[청구항 8]

청구항 7에 있어서,

상기 당화혈색소 안티바디는

상기 금나노입자층의 표면에 3-메르캅토프로피온산(3-MPA) 용액을 도포
하여, 3-메르캅토프로피온산 단층을 형성하고, 상기 금나노입자층 표면의
3-메르캅토프로피온산이 활성화되도록 농도가 0.05M인 N-히드록시숙신
이미드(NHS) 및 농도가 0.25M인 N-(3-디메틸아미노프로필)-n'-에틸카르
보디이미드염산염(ECD)으로 구성된 ECD-NHS 용액을 도포하여 당화혈
색소 안티바디가 상기 금나노입자층 표면에 식재되는 것을 특징으로 하
는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.

[청구항 9]

청구항 7에 있어서,

상기 제2측정전극은

상기 당화혈색소 포획층으로 시료에 포함된 당화혈색소들을 포획하고,
과산화수소가 측정부에 첨가되면, 상기 측정부에 첨가되는 과산화수소가
당화혈색소의 아이언 헴(iron heme)과 반응하여 물로 전환되면서 발생하
는 전자들에 의한 전류로 혈중 당화혈색소량을 측정하는 것을 특징으로
하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서.

[청구항 10]

1-a)글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오센서를 준비하는 단
계;

1-b)시료를 준비하는 단계;

1-c)하나의 시료 방울을 바이오센서의 측정부에 주입하는 단계;

1-d)바이오센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 제1측정전극으로 글루
코스량을 측정하는 단계;

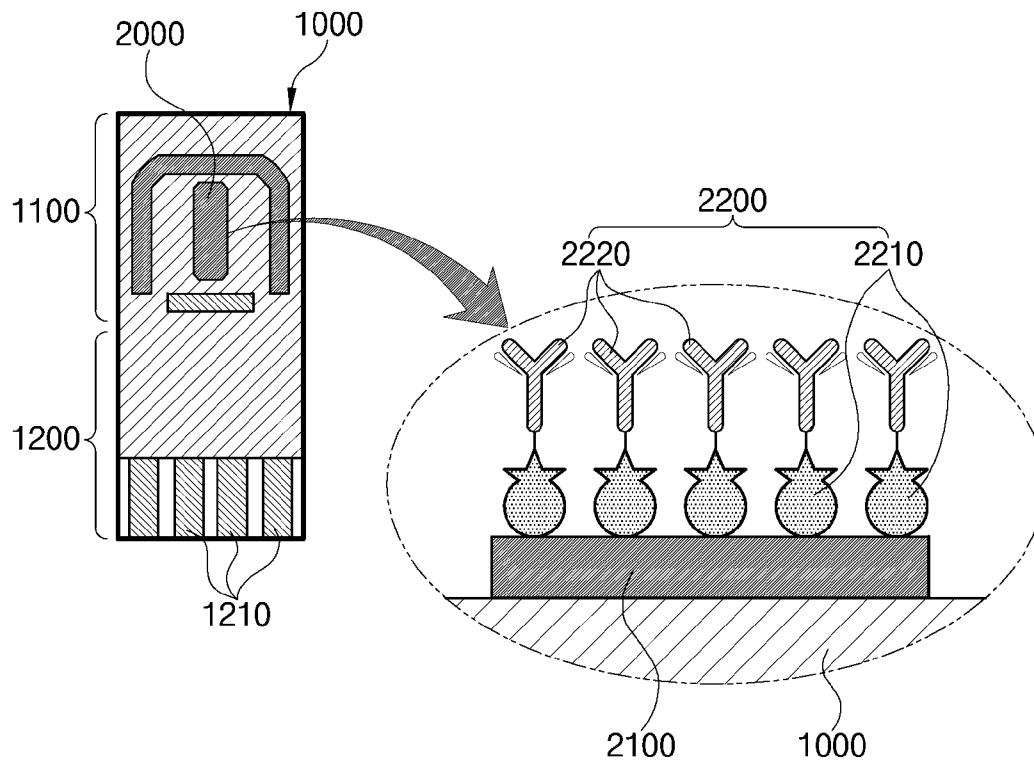
1-e)하나의 시료 방울이 주입된 바이오센서의 측정부를 세척하는 단계;

1-f)시료 방울이 세척된 바이오센서의 측정부에 과산화수소를 주입하는
단계; 및

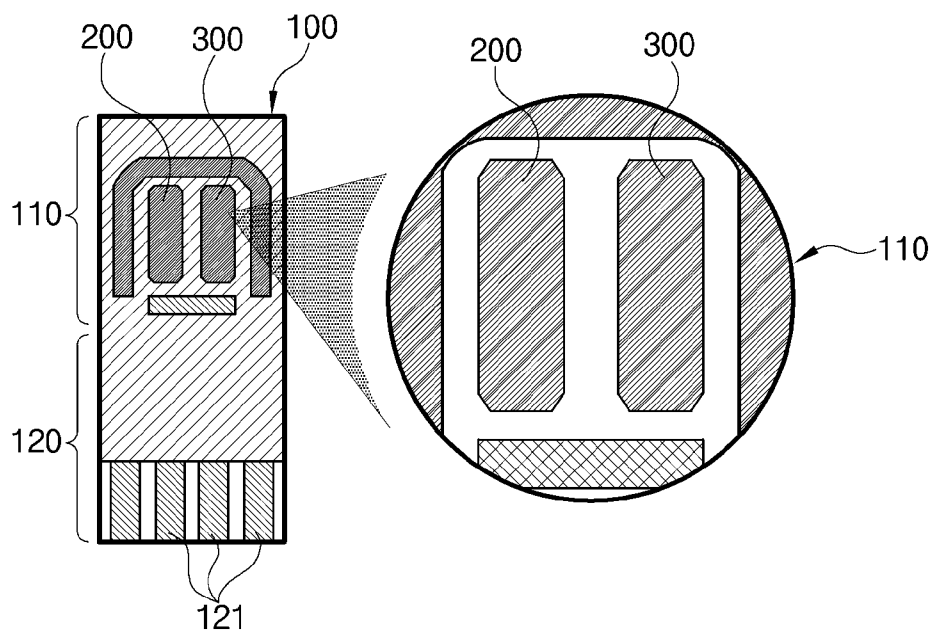
1-g)바이오 센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 당화혈색소를 측정하는 단계를 포함하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오 센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법.

- [청구항 11] 2-a)글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오 센서를 준비하는 단계;
- 2-b)시료를 준비하는 단계;
- 2-c)하나의 시료 방울을 바이오 센서의 측정부에 주입하는 단계;
- 2-d)하나의 시료 방울이 주입된 바이오 센서의 측정부를 세척하는 단계;
- 2-e)시료 방울이 세척된 바이오 센서의 측정부에 과산화수소를 주입하는 단계; 및
- 2-f)바이오 센서의 단자부를 측정장치에 연결하여, 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 단계를 포함하는 글루코스 및 당화혈색소를 동시 측정하는 바이오 센서를 이용한 글루코스 및 당화혈색소 동시 측정방법.

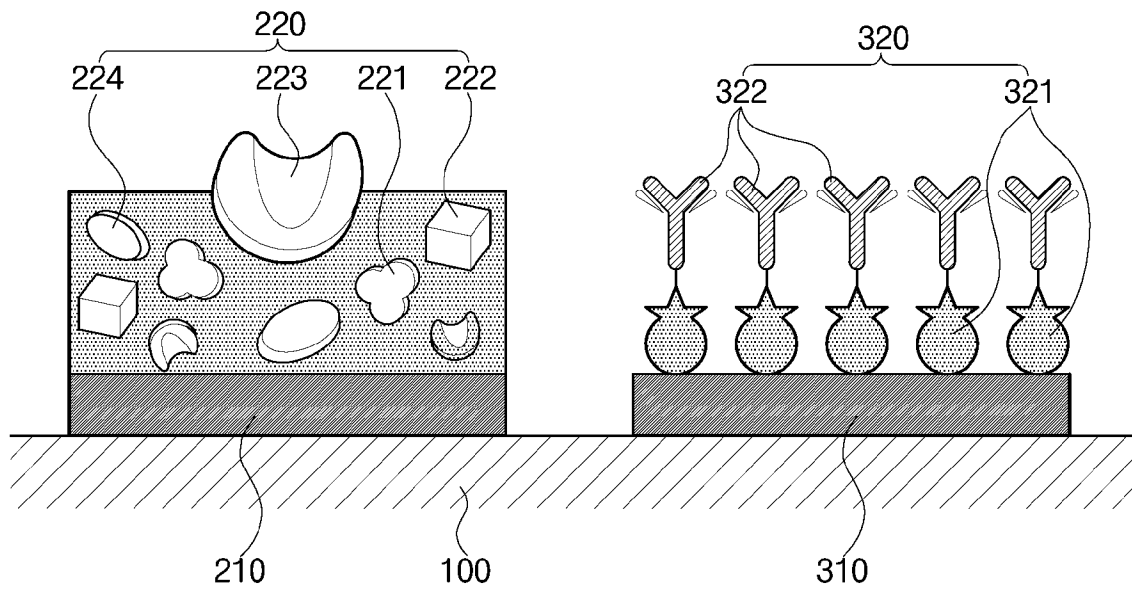
[도1]



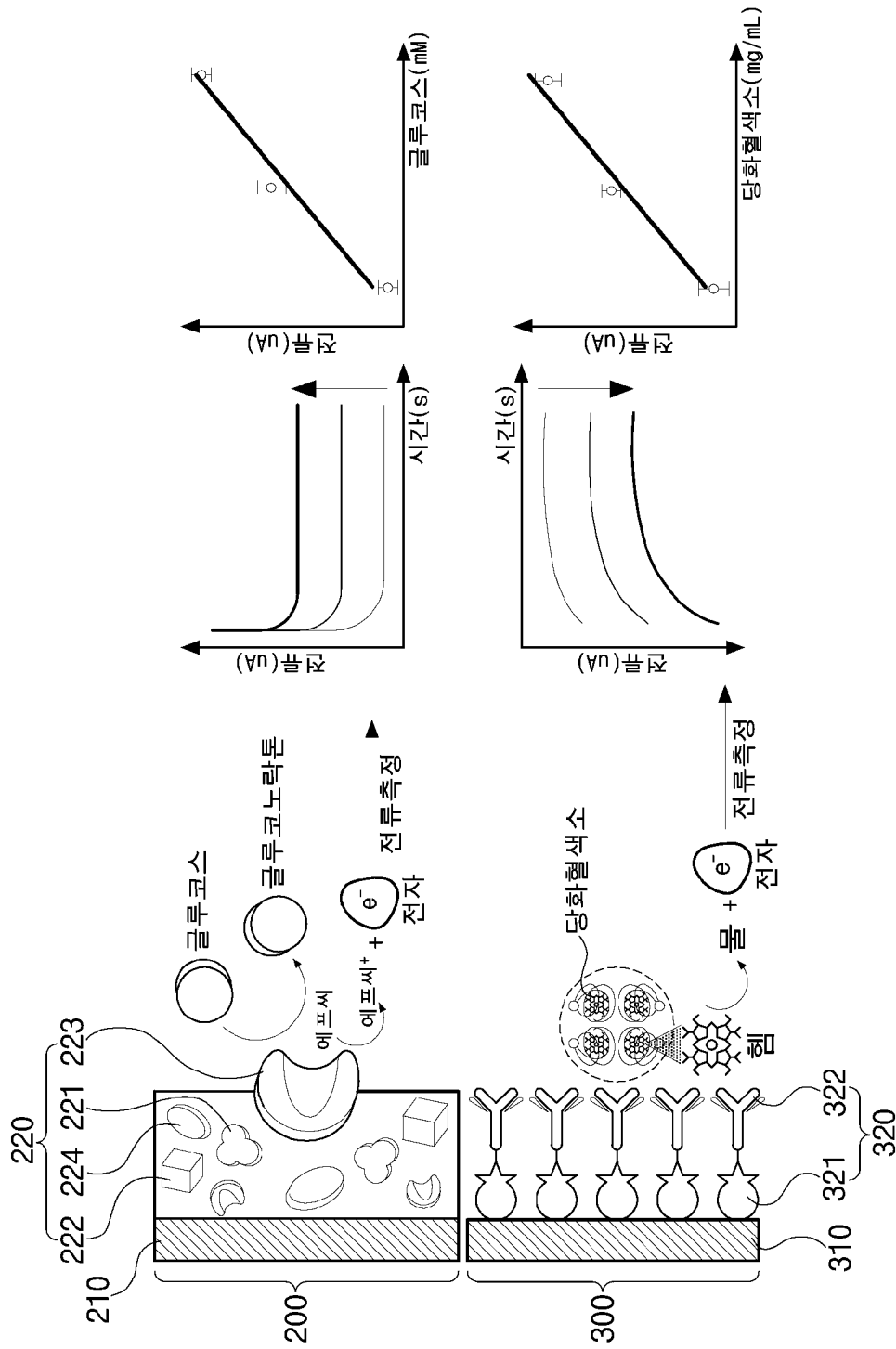
[도2]



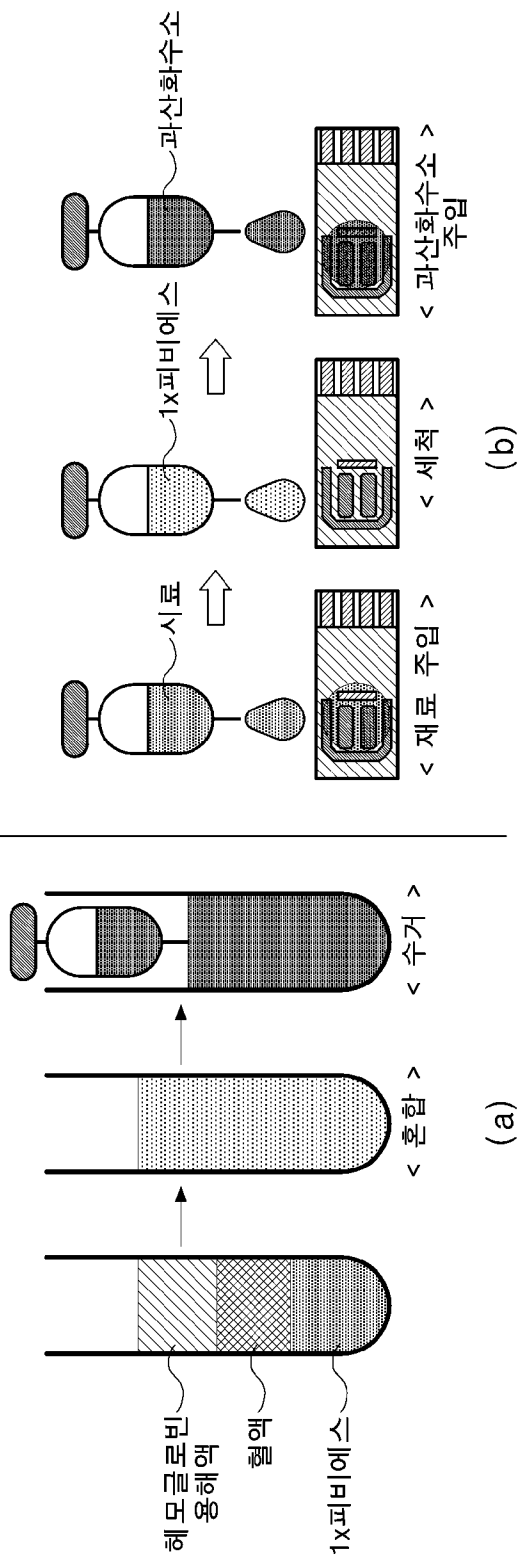
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/018085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G01N 27/30(2006.01)i; G01N 27/327(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/72(2006.01)i**

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 27/30(2006.01); B82Y 15/00(2011.01); G01N 27/26(2006.01); G01N 27/327(2006.01); G01N 27/48(2006.01);
G01N 33/50(2006.01); G01N 33/66(2006.01)

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) & keywords: 탄소전극(carbon electrode), 글루코스(glucose), 당화혈색소(glycated hemoglobin), 기관(substrate), 금 나노입자(gold nano-particle), 전류(current), 과산화 수소(hydrogen peroxide)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2017-0027302 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 09 March 2017 (2017-03-09) See paragraphs [0016]-[0089], claims 1 and 11 and figure 1.	1-11
Y	US 2020-0150074 A1 (PEACEBIO CO., LTD.) 14 May 2020 (2020-05-14) See paragraphs [0021]-[0042] and figures 1 and 5.	1-11
Y	CN 110618179 A (ZHENGREN (BEIJING) MEDICAL INSTRUMENTS CO., LTD.) 27 December 2019 (2019-12-27) See claim 5 and figures 1 and 2.	4,5
A	US 2010-0025264 A1 (YUAN et al.) 04 February 2010 (2010-02-04) See paragraphs [0063]-[0074], claims 1, 23 and 25 and figures 1-4.	1-11
A	KR 10-2013-0059304 A (SD BIOSENSOR, INC.) 05 June 2013 (2013-06-05) See claims 1-12 and figures 2 and 3.	1-11



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2024

Date of mailing of the international search report

29 February 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/018085

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0027302	A	09 March 2017	KR	10-1818368	B1	15 January 2018
				WO	2017-039345	A1	09 March 2017
US	2020-0150074	A1	14 May 2020	CN	111190014	A	22 May 2020
				CN	111190014	B	05 January 2024
				TW	202018290	A	16 May 2020
				TW	I703323	B	01 September 2020
				US	10996187	B2	04 May 2021
CN	110618179	A	27 December 2019	None			
US	2010-0025264	A1	04 February 2010	CN	102076867	A	25 May 2011
				EP	2283149	A1	16 February 2011
				US	8673646	B2	18 March 2014
				WO	2009-140343	A1	19 November 2009
KR	10-2013-0059304	A	05 June 2013	KR	10-1541798	B1	04 August 2015
				WO	2013-081363	A1	06 June 2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 27/30(2006.01)i; G01N 27/327(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/72(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 27/30(2006.01); B82Y 15/00(2011.01); G01N 27/26(2006.01); G01N 27/327(2006.01); G01N 27/48(2006.01); G01N 33/50(2006.01); G01N 33/66(2006.01) 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) & 키워드: 탄소전극(carbon electrode), 글루코스(glucose), 당화혈색소(glycated hemoglobin), 기관(substrate), 금 나노입자(gold nano-particle), 전류(current), 과산화 수소(hydrogen peroxide)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2017-0027302 A (부산대학교 산학협력단) 2017.03.09 단락 [0016]-[0089], 청구항 1, 11 및 도면 1	1-11
Y	US 2020-0150074 A1 (PEACEBIO CO., LTD.) 2020.05.14 단락 [0021]-[0042] 및 도면 1, 5	1-11
Y	CN 110618179 A (ZHENGREN (BEIJING) MEDICAL INSTRUMENTS CO., LTD.) 2019.12.27 청구항 5 및 도면 1, 2	4,5
A	US 2010-0025264 A1 (YUAN 등) 2010.02.04 단락 [0063]-[0074], 청구항 1, 23, 25 및 도면 1-4	1-11
A	KR 10-2013-0059304 A (에스디 바이오센서 주식회사) 2013.06.05 청구항 1-12 및 도면 2, 3	1-11
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년02월28일(28.02.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년02월29일(29.02.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 박태욱 전화번호 +82-42-481-3405

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0027302 A	2017/03/09	KR 10-1818368 B1	2018/01/15
		WO 2017-039345 A1	2017/03/09
US 2020-0150074 A1	2020/05/14	CN 111190014 A	2020/05/22
		CN 111190014 B	2024/01/05
		TW 202018290 A	2020/05/16
		TW I703323 B	2020/09/01
		US 10996187 B2	2021/05/04
CN 110618179 A	2019/12/27	없음	
US 2010-0025264 A1	2010/02/04	CN 102076867 A	2011/05/25
		EP 2283149 A1	2011/02/16
		US 8673646 B2	2014/03/18
		WO 2009-140343 A1	2009/11/19
KR 10-2013-0059304 A	2013/06/05	KR 10-1541798 B1	2015/08/04
		WO 2013-081363 A1	2013/06/06