



- (51) 국제특허분류:
G01N 27/00 (2006.01) G01N 27/30 (2006.01)
G01R 19/145 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002688
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 14일 (14.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0028575 2011년 3월 30일 (30.03.2011) KR
10-2011-0034662 2011년 4월 14일 (14.04.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 아이센스 (I-SENS, INC.) [KR/KR]; 서울특별시 노원구 월계동 465-14, 139-050 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 홍성아 (HONG, Sung A) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 홍은 2동 신원지벤스타아파트 106동 602호, 120-102 Seoul (KR). 성다연 (SUNG, Da Yeon) [KR/KR]; 서울특별시 동대문구 청량리 1동 미주아파트 3동 502호, 130-010 Seoul (KR). 한

준희 (HAN, Jun Hee) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 신사동 556-8 화림빌라 3층, 135-120 Seoul (KR). 송재훈 (SONG, Jea Hun) [KR/KR]; 서울특별시 양천구 목일동 930번지 현대아파트 101동 401호, 158-050 Seoul (KR). 신재호 (SHIN, Jae Ho) [KR/KR]; 서울특별시 도봉구 창 5동 338 신원 리베르텔 1232호, 132-728 Seoul (KR). 차근식 (CHA, Geun Sig) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 홍은동 9-78, 120-100 Seoul (KR). 남학현 (NAM, Hak Hyun) [KR/KR]; 서울특별시 강북구 번 3동 133-1 한양아파트 101동 206호, 142-742 Seoul (KR).

(74) 대리인: 정태훈 (JEONG, Tae Hoon) 등; 서울시 강남구 대치동 968 안양빌딩 7층 TNI 특허법률사무소, 135-848 Seoul (KR).

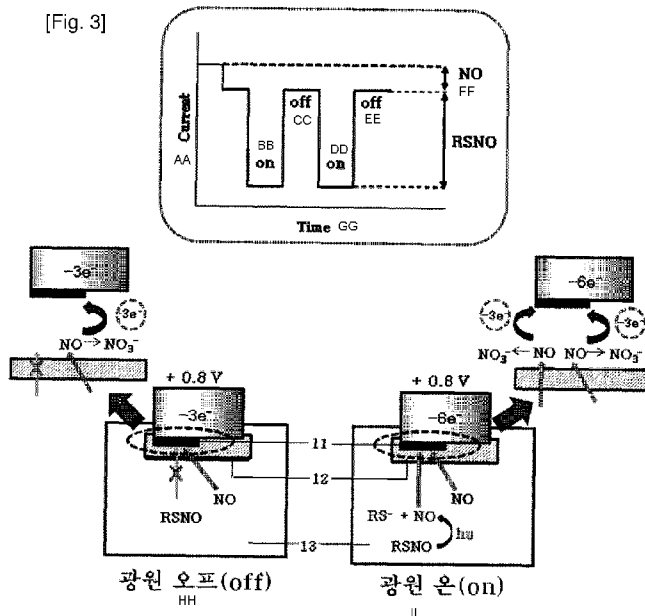
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SENSOR AND DEVICE FOR MEASURING NITROSOTHIOL CONCENTRATION

(54) 발명의 명칭 : 니트로소티올 농도 측정용 센서 및 장치

[Fig. 3]



AA ... Current
BB, DD ... On
CC, EE ... Off
FF ... NO
GG ... Time
HH ... Light source off
II ... Light source on

(57) Abstract: The present invention relates to a sensor and a device for the electrochemical quantitative analysis of nitrosothiol (RSNO) associated with the storage and transfer of nitric oxide (NO) within the human body. The invention provides a sensor for measuring RSNO concentration which comprises an electrode which measures a current generated by the oxidation of NO and a means for initiating and stopping nitrosothiol photolysis, wherein the sensor measures a current by NO oxidation before and after RSNO photolysis. Since the RSNO sensor of the invention enables measurement by distinguishing RSNO and NO signals which are present in a sample at the same time through one electrode, the interruption by NO is improved in the measurement of RSNO. In addition, the sensor of the invention has a simple structure, is easily manufactured, and enables the miniaturization of the electrode, thereby allowing the sensor to be developed as a sensor for *in vivo* measurements hereafter.

(57) 요약서: 본 발명은 인체 내에서 일산화질소의 저장 및 전달에 관여하는 니트로소티올을 전기화학적으로 정량 분석하기 위한 센서 및 장치에

[다음 쪽 계속]



PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

관한 것이다. 본 발명은 일산화질소의 산화 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하는 전극 및 니트로소티올 광분해를 개시 및 정지시키는 수단을 포함하며, RSNO의 광분해 전 및 후의 NO 산화 반응에 의한 전류를 측정하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서를 제공한다. 본 발명의 RSNO 센서는 하나의 전극으로 시료 내에 동시에 존재하는 RSNO와 NO의 신호를 구별하여 측정할 수 있도록 함으로써, RSNO 측정에 있어 NO에 의한 방해작용을 개선하는 것이다. 또한, 본 발명의 센서는 구조가 단순하고 제조가 용이하며, 전극의 소형화가 가능하므로 향후 체내 측정(*in vivo*)용 센서로 개발될 수 있다.

명세서

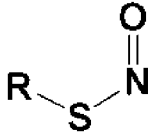
발명의 명칭: 니트로소티올 농도 측정용 센서 및 장치

기술분야

- [1] 본 발명은 니트로소티올(nitrosothiol, RSNO) 농도 측정용 센서 및 장치에 관한 것으로서, 시료 내에 일산화질소(nitric oxide, NO)와 니트로소티올이 동시에 존재할 때에 니트로소티올이 광분해되는 성질을 이용함으로써 하나의 전극에 의해 두 물질로부터의 신호를 구분하여 측정할 수 있는 수단을 제공한다. 즉, 본 발명은 RSNO의 농도 측정시 NO에 의한 방해작용을 배제하여 간단하고 용이한 방법으로 신뢰성 있는 RSNO 측정을 가능하게 하는 수단에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 생화학 및 생리학 부문에서 NO의 심혈관계, 호흡계, 소화계, 비뇨기계 및 신경계에서의 기능들이 속속 밝혀지면서 NO에 대한 연구는 더욱 확대되고 있는 추세이다. NO의 혈관 확장(vasodilation) 및 항혈전(ant-thrombosis) 특성(Radomski, M. W *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87, 5193-5197)은 심혈관계 약물 개발에 응용되고 있으며, 대식 세포(macrophage) 등이 관여하는 NO의 식균작용 (phagocytosis)은 항암제(tumoricidal agent) (Langrehr, J. M *et al.*, *Transplantation* 1993, 55, 1205-1212), 항생제(antibiotics) 및 항박테리아제(bactericidal agent)의 개발에 응용되고 있다. 또한, NO는 세포 간 신호전달물질(signaling molecule)의 하나(Ohta, A. *et al Neurosci. Lett.* 1993, 158, 33-35)이다. 이러한 NO의 구체적인 반응 기작을 규명하기 위해서는 신체 내 또는 NO를 생성하는 세포 내·외에서 NO의 직접적인 측정이 매우 중요하다.
- [3] 한편, 연구자들은 NO의 생리·의학적 역할이 중요해짐에 따라, 체내에서 NO의 저장 또는 전달 과정에 대해 관심을 갖기 시작했다. 특히, 반응성이 큰 라디칼(radical) 물질인 NO가 짧은 수명(Cha, W. S. *et al.*, *Biomaterials* 2007, 28(1), 19-27)에도 불구하고 안정적인 생리활성이 이루어질 수 있다는 점은 연구자들의 가장 큰 관심사였다. 이에 대한 해답이 되는 것이 니트로소티올이다. 즉, NO는 세포 안에서 RSNO 형태로 변형되어 전달되는 것이다 (Zhang, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 7891-7896).
- [4] 최근에는 NO의 저장 및 전달에 관여하는 RSNO의 농도를 측정하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다.
- [5] RSNO는 하기 화학식 1로 표현되며, 설프하이드릴기(sulfhydryl, R-SH)가 NO에 의해 나이트로실레이션(nitrosylation) 됨으로써 형성된다. 또한, 기능기 R에 따라 색 또는 빛에 의해 분해되는 파장 범위 등의 물리적·화학적 특성이 다르며, 인체 내 물질인 경우 역할이나 위치 등을 다양하게 하여 존재하게 된다.
- [6] 화학식 1



- [7] 도1은 생체 내 존재하는 대표적인 RSNO 화합물들이다(Williams D.L-H. *et al.*, *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 869-876). 이들은 공기 중에서 불안정한 통상의 RSNO와 달리, 공기 중에서 안정적인 몇 안 되는 RSNO 화합물들이다.
- [8] RSNO의 생화학적 활성은 S-N 결합의 분리에 의한 NO의 생성을 통해 구현된다. 도2는 RSNO로부터 NO가 생성되는 메커니즘을 나타낸 것이다. (a) 및 (b)는 금속 촉매 Cu(I), (II)에 의한 분해이고, (c)는 빛에 의한 광학분해이며, (d)는 교차 니트로소화 반응에 의한 분해이다.
- [9] RSNO는 체내에서 수 nM 내지 수 μM 의 매우 낮은 농도로 존재하며, 신체 부위에 따라 존재하는 양도 각각 다르다. 따라서 RSNO를 측정하기 위해서는 센서의 감응성(sensitivity)이 매우 우수해야 한다. 또한 일반적으로 RSNO는 공기 중에서 불안정 하여 쉽게 분해되기 때문에, RSNO 측정에 있어 바람직하게는 인체 내에서 측정이 가능할 것 및 이에 따라 센서는 인체 내 수많은 방해종들이 존재하는 가운데에서 RSNO에 대한 선택성(selectivity)이 높을 것이 요구된다.
- [10] 일반적인 RSNO의 측정법은 전기화학적 NO 센서를 이용하는 방법이다. 즉, 상기 금속 촉매로서 Cu(I), (II) 또는 생화학적 촉매를 이용하여 RSNO를 분해시켜 이때 발생하는 NO를 전기화학적 NO 센서를 이용하여 측정함으로써 간접적으로 RSNO를 정량화한다. 그러나 이 방법은 시료 내 RSNO와 NO가 함께 존재할 때 센서가 기존의 NO와 촉매에 의해서 RSNO로부터 분해되어 나온 NO를 구분할 수 없다는 한계점을 가지고 있다. 즉 RSNO 측정 시 NO의 존재가 측정에 방해종으로 작용하는 것이다. 따라서 상기 방법으로는 체내의 정확한 RSNO 농도를 측정하는 것이 불가능하다.
- [11] 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 차동법(differential) 전극계(Cha, W. *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2441-2446)를 구성하여 보정하고자 하는 노력도 있었다. 즉 두 개의 작동전극을 사용하여, 하나의 작동전극으로는 RSNO와 NO의 농도를 동시에 측정하며, 다른 하나의 작동전극으로는 NO의 농도만 측정하여 두 전극에서 얻어진 센서 신호의 차등 값을 이용하여 RSNO 농도를 측정하는 방법이다. 그러나 이 방법은 우선 두 개의 작동전극에 있어 NO에 대한 감응이 정확히 일치해야 하는 조건이 만족되어야 하고, 또한 전극을 두 개 사용해야 하므로 측정장치가 복잡하고 커져버려 신체 내에서의 직접적인 측정에는 이용하기 곤란하다는 한계가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 상술한 바와 같은 문제를 해결하기 위해 본 발명은 RSNO 측정시, NO의 존재로 인한 방해 작용을 배제하여 신뢰성 있는 RSNO 농도 측정이 가능한 RSNO 농도

측정용 센서를 제공하고자 한다.

- [13] 또한, 본 발명은 RSNO와 NO의 신호 구분이 가능하여 제작이 용이하고, 간단한 구조의 소형화된 센서를 제공함으로써 신체 내 적용이 가능하도록 한다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은 일산화질소의 산화 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하는 전극 및 니트로소티올 광분해를 개시 및 정지시키는 수단을 포함하며, RSNO의 광분해 전 및 후의 NO 산화 반응에 의한 전류를 측정하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서를 제공한다.
- [15] 바람직하게, 상기 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키는 수단은, 상기 전극을 광섬유에 도입하고, 상기 전극이 도입된 광섬유에 광원을 장착한 뒤, 상기 광원으로부터 광섬유로 빛의 공급 및 차단을 조정하는 광학 촉매 스위치이다.
- [16] 바람직하게, 상기 전극은 백금(platinum), 금(gold), 은(silver), 바나듐(vanadium), 나이오븀(niobium), 탄탈럼(tantalum), 인듐(indium), 타이타늄(titanium), 니켈(nickel), 몰리브덴(molybdenum), 철(iron), 구리(copper), 코발트(cobalt), 크롬(chromium), 비스머스(bismuth), 알루미늄(aluminum), 니켈 크롬(nickel chromium) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종을 광섬유 단면에 증착시킴으로써 광섬유에 도입된 것이다.
- [17] 바람직하게, 상기 전극은 백금(platinum), 금(gold), 은(silver), 바나듐(vanadium), 산화 규소(silicon oxide), 나이오븀(niobium), 탄탈럼(tantalum), 인듐(indium), 타이타늄(titanium), 니켈(nickel), 몰리브덴(molybdenum), 철(iron), 구리(copper), 코발트(cobalt), 크롬(chromium), 흑연(graphite), 비스머스(bismuth), 알루미늄(aluminum), 산화 아연 망간(zinc oxide manganese), 니켈 크롬(nickel chromium) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종을 와이어(wire), 로드(rod) 또는 판(plate) 형태로 제작하여 광섬유에 부착시킴으로써 광섬유에 도입된 것이다.
- [18] 바람직하게, 상기 전극은 금(gold), 탄소(carbon), 은(silver), 백금(platinum) 및 은과 탄소 혼합(silver & carbon)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상과 파라핀(paraffin)계 오일을 포함하는 혼합 조성물을 광섬유 단면에 도포함으로써 광섬유에 도입된 것이다.
- [19] 바람직하게, 상기 전극은 금(gold), 탄소(carbon), 은(silver), 백금(platinum) 및 은과 탄소 혼합(silver & carbon)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상과 파라핀(paraffin)계 오일을 포함하는 혼합 조성물을 원통형의 광섬유 단면에 도포하여 형성되고, 상기 광섬유 옆면에는 작동회로 연결선이 장착되며, 상기 작동회로 연결선을 포함하는 광섬유 옆면에는 상기 혼합 조성물로부터 코팅층이 형성된다.
- [20] 바람직하게, 상기 광섬유 옆면의 코팅층 위로는 추가적으로 절연성 물질의 피복이 구비된다.

- [21] 바람직하게, 상기 광섬유는 직경 250 μ m 내지 3mm 범위의 원통형으로, 플라스틱, 실리카(silica, SiO₂) 또는 다성분 유리(glass) 재질이다.
- [22] 바람직하게, 상기 광섬유는 단일모드(single mode optical fiber, SMF), 다중모드(Multiple mode optical fiber, MMF), 단계 굴절 (Step index type, SI) 또는 언덕 굴절(Graded index type, GI) 타입이다.
- [23] 바람직하게, 상기 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키는 수단은, 상기 전극을 암실에 배치하고, 상기 암실에 외부 광원으로부터 빛을 공급 및 차단하는 것이다.
- [24] 바람직하게, 상기 광분해는 자외선 영역(320~350 nm) 내지 가시 광선 영역(550~590 nm)의 파장 범위를 갖는 빛에 의해 일어난다.
- [25] 바람직하게, 상기 전극에는 NO에 대한 선택적 투과성 막이 형성되어 있다.
- [26] 바람직하게, 상기 RSNO는 S-니트로소알부민(S-nitrosoalbumin, Alb-NO), S-니트로소-L-시스테인(S-nitroso-L-cysteine, CysNO), S-니트로소-L-시스테인메틸에스테르(S-nitroso-L-cysteinemethylester, CMESNO), S-니트로소-d,L-페니실아민(S-nitroso-d,L-penicillamine, PSNO), S-니트로소-N-아세틸시스테인아민(S-nitroso-N-acetylcysteineamine, ACSNO), S-니트로소-N-아세틸-L-시스테인(S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine, NACysNO), S-니트로소캡토프릴(S-nitrosocaptopril, SNOCAP), S-니트로소-머캅토에틸아민(S-nitroso-mercaptoethylamine), S-니트로소-3-머캅토-프로판산(S-nitroso-3-mercapto-propanoicacid), S-니트로소호모시스테인(S-nitrosohomocysteine, HcysNO), S-니트로소-b,d-티오글루코스(S-nitroso-b,d-thiogluucose), S-니트로소-N-아세틸-d,L-페니실아민(S-Nitroso-N-acetyl-d,L-penicillamine, SNAP), S-니트로소-N-아세틸-d,L-페니실아미닐 글리신 메틸 에스테르(S-Nitroso-N-acetyl-d,L-penicillaminyll glycine methyl ester) 및 S-니트로소-L-글루타티온(S-Nitroso-L-glutathione, GSNO)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상이다.
- [27] 또한, 본 발명은 상기 센서를 장착하기 위한 셀; 상기 셀 내로 시료를 운송하기 위한 펌프; 및 셀에 시료를 공급하거나 셀로부터 시료를 배출시키는 튜빙을 포함하는 RSNO 농도 측정용 장치를 제공한다.
- [28] 바람직하게, 상기 셀은 작업 전극, 보조 전극 및 기준 전극 각각을 장착하는 통로; 상기 통로를 연결하여 셀 내에서 시료가 흐르는 수로; 외부로부터 셀로 시료를 공급하고, 셀로부터 외부로 시료를 배출시키는 튜빙과의 연결부를 포함하는 것이다.
- [29] 바람직하게, 상기 장치에는 레이저(laser), 할로겐 램프, 메탈할라이드 램프, 나트륨등, 삼파장무전극램프, LED, 백열전구, 형광램프, 고주파램프로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 광원이 포함된다.

발명의 효과

[30] 본 발명의 센서에 의하면, 니트로소티올의 농도를 측정하는데 있어, 단일 전극에 의해 니트로소티올과 일산화질소로부터의 신호를 구분하여 측정할 수 있다. 이에 따라, NO에 의한 방해작용을 배제시켜 신뢰성 있는 RSNO의 농도 측정이 가능하다.

[31] 또한, 본 발명의 센서는 구조가 간단하고 제작이 용이하며, 소형화 제작이 가능하다. 따라서, 본 발명은 체내에서 직접적으로 RSNO의 농도를 측정할 수 있는 수단의 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[32] 도1은 생체 내 존재하는 RSNO 화합물의 종류를 도시한 것이다.

[33] 도2는 RSNO가 분해되어 NO를 생성하는 메커니즘을 도시한 것이다.

[34] 도3은 본 발명에 따른 RSNO 센서에서의 감응 곡선이다.

[35] 도4는 본 발명의 광섬유에 도입된 전극의 제작 공정도 및 제작된 전극의 분해사시도이다.

[36] 도5는 본 발명의 RSNO 센서에서 NO에 대한 감응곡선이다.

[37] 도6는 본 발명의 RSNO 센서에서 아질산 이온, 아스코르브산, 요산 및 아세트아미노펜에 대한 감응곡선이다.

[38] 도7 내지 8는 본 발명의 센서가 장착되는 셀의 단면도 및 평면도이다.

[39] 도9은 본 발명의 RSNO 농도 측정용 장치 모형도이다.

[40] 도10은 본 발명의 RSNO 센서에서 임상학적 농도 범위의 SNAP에 대한 감응곡선 및 검정곡선이다.

[41] 도11는 본 발명의 RSNO 센서에서 저농도 범위의 SNAP에 대한 감응곡선 및 검정곡선이다.

[42] 도12은 본 발명의 RSNO 센서에서 고농도 범위의 SNAP에 대한 감응곡선 및 검정곡선이다.

[43] 도13 내지 15는 본 발명의 RSNO 센서에서 SNAP에 대한 감응곡선 및 RSNO와 NO에 대한 검정곡선이다.

발명의 실시를 위한 형태

[44] 본 발명은 시료에 빛을 공급 및 차단함으로써 니트로소티올의 광분해를 개시 및 정지시키고, 이에 따른 일산화질소의 산화 반응 전류를 측정함으로써, 단일 전극으로 RSNO 신호와 NO 신호를 구분할 수 있는 RSNO 농도 측정용 센서를 제공한다.

[45] 구체적으로, 본 발명은 일산화질소의 산화 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하는 전극 및 니트로소티올의 광분해를 개시 및 정지시키는 수단을 포함하며, RSNO의 광분해 전 및 후의 NO 산화 반응에 의한 전류를 측정하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서를 제공한다.

[46] RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키기 위한 수단의 일 실시예로서 본 발명에서는 상기 NO의 산화 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하는 전극을

광섬유에 도입하고, 상기 전극이 도입된 광섬유에 광원을 장착한 뒤, 상기 광원으로부터 광섬유에 빛을 공급 및 차단하는 광학 촉매 스위치를 사용한다. 즉, 상기 광학 촉매 스위치의 온(on)-오프(off)에 의해 빛의 공급 및 차단이 조정되는 것이다.

- [47] 또한, 본 발명은 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키기 위한 수단의 다른 실시예로서, NO의 산화반응에 의한 전류를 측정하는 전극이 구비되는 공간을 암실 환경으로 조성하고, 외부 광원으로부터 상기 전극이 구비된 암실에 직접 빛을 공급 및 차단함으로써 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시킬 수 있다.
- [48] 본 발명의 센서에서는 도3과 같이 NO가 산화되어 한 분자당 전자 3개를 잃고 아질산이온으로 변화하면서 형성되는 산화전류를 측정한다. 이때 광원의 오프(off) 상태에서는 시료 내에 원래 존재하는 NO에 의한 신호를 얻게 되고, 광원의 온(on) 상태에서는 상기 NO에 의한 신호에 더하여 RSNO의 광분해로부터 발생된 NO의 신호가 함께 나타나게 된다. 따라서, 본 발명의 센서에 의하면 NO 및 RSNO 각각에 의한 신호를 구분하여 얻을 수 있는 것이다.
- [49] 본 발명에서 광학 촉매 스위치에 의해 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시킬 때 광원으로부터 빛을 전달하는 수단으로 사용되는 광섬유는 굴절률이 큰 물질로 이루어진 코어(core)를 굴절률이 작은 물질로 이루어진 클래딩(cladding)으로 균일하게 감싼 구조로, 코어와 클래딩에서의 전반사를 사용하여 빛을 손실없이 매우 빠른 속도로 전달할 수 있는 수단이다.
- [50] 본 발명에서는 코어(core) 직경 250 μm 내지 3 mm의 것으로, 플라스틱(plastic), 실리카(silica, SiO_2), 또는 다성분 유리(glass)의 재질이며, 내열성이 좋고 빛의 파장 투과 영역대가 자외선(ultraviolet ray)부터 가시광선(visible rays) 영역을 포함하며, 단파장 (single mode optical fiber, SMF), 다파장(Multiple mode optical fiber, MMF), 단계 굴절 (Step index type, SI) 또는 언덕 굴절(Graded index type, GI) 타입의 광섬유를 사용할 수 있다.
- [51] 본 발명에서 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키기 위한 수단으로 광섬유 및 광학 촉매 스위치를 사용하는 경우, NO의 산화반응 전류를 측정하는 전극은 상기 광섬유에 도입된 형태로 사용된다. 즉, 광섬유는 전극이 도입되는 몸체(body)로 사용된다. 광섬유에 전극을 도입시키기 위한 방법으로는, 스크린 프린팅 법(screen printing method) 등에 의해 금속 또는 비금속의 전도성 물질을 도포하거나, 금속 증착법(sputter)에 의해 금속 박막을 형성하거나, 또는 금속의 와이어(wire), 로드(rod) 또는 판(plate)을 이용할 수 있다.
- [52] 스크린 프린팅 법 등에 의해 전극을 형성하기 위해서는 전극 물질로 금(gold), 탄소(carbon), 은(silver), 백금(platinum) 및 은과 탄소의 혼합(silver & carbon)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 금속 또는 비금속의 전도성 물질과 파라핀(paraffin)계 오일을 포함하는 혼합 조성물을 광섬유에 도포하는 것으로 한다. 이때 광섬유에 전극 물질이 도포되는 영역은 원통형 광섬유의 단면, 옆면 또는 단면과 옆면의 전부 또는 일부가 될 수 있다. 도포 후에는 전극 물질을

건조시키는 것으로 전극의 도입을 완성한다. 바람직하게, 상기 도입된 전극은 도선에 의해 센서의 작동회로에 연결되고, 전극을 포함하는 광섬유의 표면은 절연성 물질이 튜빙된 상태로 사용한다.

- [53] 금속 증착법에 의해 광섬유에 전극을 형성하기 위해서는 백금(platinum), 금(gold), 은(silver), 바나듐(vanadium), 나이오븀(niobium), 탄탈럼(tantalum), 인듐(indium), 타이타늄(titanium), 니켈(nickel), 몰리브데넘(molybdenum), 철(iron), 구리(copper), 코발트(cobalt), 크롬(chromium), 비스머스(bismuth), 알루미늄(aluminum), 니켈 크롬(nickel chromium) 등의 전도성 금속 중 하나 또는 둘 이상 배합된 금속판을 타겟으로 하여 광섬유에 금속 박막을 증착시키는 것으로 한다. 이때에도 광섬유에 금속 박막이 증착되는 영역은 원통형 광섬유의 단면, 옆면 또는 단면과 옆면의 전부 또는 일부가 될 수 있다. 또한, 도입된 금속 박막 형태의 전극은 도선에 의해 센서의 작동회로에 연결되고, 전극을 포함하는 광섬유 표면은 절연성 물질로 튜빙한 상태로 사용하는 것이 바람직하다.
- [54] 전도성의 와이어, 로드 또는 판을 광섬유에 도입되는 전극으로 이용하는 것은 백금(platinum), 금(gold), 은(silver), 바나듐(vanadium), 산화 규소(silicon oxide), 나이오븀(niobium), 탄탈럼(tantalum), 인듐(indium), 타이타늄(titanium), 니켈(nickel), 몰리브데넘(molybdenum), 철(iron), 구리(copper), 코발트(cobalt), 크롬(chromium), 흑연(graphite), 비스머스(bismuth), 알루미늄(aluminum), 산화 아연 망간(zinc oxide manganese), 니켈 크롬(nickel chromium) 등의 전도성 물질 중 하나 또는 둘 이상 배합된 물질로부터 형성된 와이어, 로드, 판을 절연성 접착제에 의해 광섬유에 부착시켜 사용하는 것이다. 이때에도 와이어, 로드, 판 형상의 전극이 부착되는 광섬유의 영역은 원통형 광섬유의 단면, 옆면 또는 단면과 옆면의 전부 또는 일부가 될 수 있다. 또한, 도입된 전극은 도선에 의해 센서의 작동회로에 연결되고, 전극을 포함하는 광섬유 표면은 절연성 물질로 튜빙한 상태로 사용하는 것이 바람직하다.
- [55] 스크린 프린팅 법 등으로 전극 물질을 도포하여 광섬유에 전극을 도입시킬 때에는 빛이 잘 통과하고 전극이 도포되는 면이 평평해야 하므로, 전극 물질이 도포될 광섬유 표면을 사포 등으로 고르게 되도록 연마하는 것이 바람직하다. 그런 다음 광섬유 표면에 전극 물질로 탄소를 포함하는 혼합 조성물을 도포한 후 건조하여 전극을 형성한다. 여기에 추가적으로, 전극의 표면적을 넓히고 전기화학적 활성을 높이기 위해 전극 표면에 백금을 도금시킬 수 있다.
- [56] 한편, 본 발명에서 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키기 위한 수단으로, 전극을 암실 환경에 배치하고 외부 광원으로부터 상기 전극이 배치된 암실에 빛을 공급하는 경우 사용되는 전극은, 디스크 전극(disk electrode), 코인 전극(coin electrode), 막대 전극(rod electrode) 등 통상 사용되는 모든 형태의 전극이라면 제한없이 사용 가능하다.
- [57] 또한, 본 발명의 센서에는 NO의 산화전류 측정에 있어 방해종의 방해 작용을 막기 위해 전극 표면에 NO를 선택적으로 투과시키는 막을 구비한다. 상기 막은,

막 형성 물질의 sol-gel 상태의 용액에 전극을 담그어 전극 표면에 막 형성 물질을 코팅시키는 방법으로부터 형성될 수 있다.

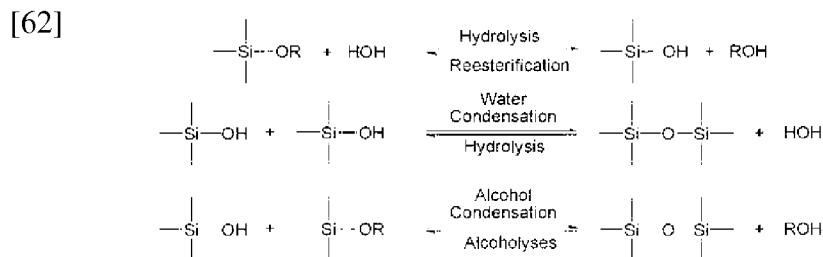
[58] 막 형성 공정의 일 실시예로서, 본 발명에서는 주사슬(backbone) 형성을 위한 실레인(silane) 단량체로서 순도 98% 이상의

메틸트리메톡시실레인[Methyltrimethoxysilane, MTMOS]과 막에 친유성을 부여하기 위한 과불소화된 실레인(perfluorinated silane) 단량체로서 (헵타데카플루오로-1,1,2,2-테트라하이드로데실)트리메톡시실레인

[59] [(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)trimethoxysilane, 17FTMS]을 혼합하여 sol-gel 공정에서의 자기조립 (self-assembly) 반응을 통하여 제조한다.

[60] 상기 자기조립반응은 하기 반응식 1과 같은 경로로 이루어진다.

[61] [반응식 1]



[63] 17FTMS에서 17은 실레인 단량체에 함유된 불소기(fluorine)의 수를 나타낸다.

불소기는 표면 개질의 화학적 특징인 표면 에너지를 낮추는 작용을 하므로, 불소기의 수가 증가할수록 그로부터 형성된 막은 보다 높은 친유성을 띄게 된다. NO는 친유성 물질로 생체 내에서도 친유성 지질막을 통과하여 전달된다.

따라서, 본 발명에서는 전극 표면에 친유성 막을 구비함으로써 NO를 선택적으로 통과시킨다. 반면 친수성의 아질산이온(nitrite ion), 아스코르브산(ascorbic acid), 요산(uric acid) 또는 아세트아미노펜(acetaminophen) 등의 방해종은 통과되지 못하도록 함으로써 방해종의 작용을 제거하는 것이다(Shin, J. H. et al., Anal. Chem. 2008, 80, 6850-6859).

[64] 상술한 바와 같은 본 발명의 센서에서 사용되는 전극은 NO의 산화 반응에 의한 전류, 즉 산화 전류를 측정하는 것으로, 바람직하게 본 발명은 상기 전극을 작업 전극으로 사용하고, 이와 함께 기준 전극 및 보조 전극을 사용하는 삼전극 체계로 이루어진다. 또한, 본 발명에서는 시간대전류법(chronoamperometry)에 의해 NO 산화 전류를 측정한다.

[65] 본 발명에서는 바람직하게 상기 센서를 플로우 시스템(Flow Injection Analysis, FIA)에 도입하여, 흐르고 있는 시료 내에서 RSNO와 NO의 전기화학적 신호를 측정함으로써 신체 내 혈관에서 측정하는 것과 동일한 환경이 조성되도록 하는 RSNO 농도 측정용 장치를 제공한다.

[66] 상기 RSNO 농도 측정용 장치는 센서를 장착하기 위한 셀 및 상기 셀 내로 시료 운반을 위한 펌프 및 튜빙을 포함한다. 또한, 상기 셀은 본 발명의 센서에 포함되는 작업 전극, 보조 전극 및 기준 전극 각각을 장착하기 위한 통로, 상기 각

통로들을 연결하며 셀 내 시료의 이동 공간이 되는 수로, 외부로부터 셀로 또는 셀로부터 외부로 시료를 공급 및 배출시키는 튜빙과의 연결부를 포함하는 구조이다.

- [67] 또한, 상기 장치에서는 시료에 빛을 공급하기 위한 광원으로 레이저(laser), 할로겐램프, 메탈할라이드램프, 나트륨등, 삼파장무전극램프, LED, 백열전구, 형광램프 또는 고주파램프를 사용할 수 있다. 이러한 광원은, RSNO의 광분해 수단으로 광섬유 및 광 촉매 스위치를 사용하는 경우에는 광 촉매 스위치의 온(on)-오프(off)에 의해 조정되며, 광섬유에 빛을 공급 및 차단시키는 광원으로 사용되고, 전극을 암실에 배치하고 광원으로부터 직접 암실에 빛을 공급하는 경우에는 암실에 빛을 공급하는 외부 광원으로 사용되는 것이다.
- [68] 본 발명의 센서를 이용하여 측정 가능한 RSNO의 종류에는, S-니트로소알부민(S-nitrosoalbumin, Alb-NO), S-니트로소-L-시스테인(S-nitroso-L-cysteine, CysNO), S-니트로소-L-시스테인메틸에스테르(S-nitroso-L-cysteinemethylester, CMESNO), S-니트로소-D,L-페니실아민(S-nitroso-D,L-penicillamine, PSNO), S-니트로소-N-아세틸시스테인아민(S-nitroso-N-acetylcysteineamine, ACSNO), S-니트로소-N-아세틸-L-시스테인(S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine, NACysNO), S-니트로소캡토프릴(S-nitrosocaptopril, SNOCAP), S-니트로소-머캅토에틸아민(S-nitroso-mercaptoethylamine), S-니트로소-3-머캅토-프로판산(S-nitroso-3-mercapto-propanoicacid), S-니트로소호모시스테인(S-nitrosohomocysteine, HcysNO), S-니트로소-b,d-티오글루코스(S-nitroso-b,d-thioglucose), S-니트로소-N-아세틸-D,L-페니실아민(S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine, SNAP), S-니트로소-N-아세틸-D,L-페니실아미닐 글리신 메틸 에스테르(S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillaminyl glycine methyl ester) 및 S-니트로소-L-글루타티온(S-Nitroso-L-glutathione, GSNO) 등 인체 내에 존재하거나, 또는 인위적으로 합성된 것일 수 있다.
- [69]
- [70] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [71]
- [72] 실시예 1(RSNO 농도 측정용 센서의 제작)
- [73] (1) 광섬유를 이용한 RSNO 센서용 전극의 제작
- [74] 도4는 본 발명에 따른 RSNO 센서의 구성요소로서 광섬유에 도입된 전극의 제작 과정 및 제작된 전극의 구조를 나타낸 것이다.
- [75] 전극의 몸체로 사용된 광섬유(21)는 범용수지인

PMMA(Polymethylmethacrylate) 재질의 것을 선택하였다. 광섬유는 10 cm의 길이로 절단하여, 양쪽 단면이 고르게 되도록 거친 것에서부터 고운 것의 순서(100, 400, 2000, 4000 grit)로 사포로 연마해 주었다. 그런 다음, 광섬유 옆면에 상용화된 납이 포함된 합금 도선을 감아 작동회로 연결선(22)을 장착하였다. 다음으로, 탄소 반죽(DUPONT, Lot # RKP306)으로 광섬유 단면을 절반에 걸쳐 도포하여 작업전극(23)을 형성한 다음, 또한 상기 작동회로 연결선(22)과 광섬유의 옆면을 함께 탄소 반죽으로 코팅하여 연결선(22)과 작업전극(23)이 전기적으로 연결되도록 하였다. 이 후에 드라이기를 이용하여 광섬유에 도포된 탄소 반죽을 10분간 건조하였다. 건조가 끝나면 전극 이외의 탄소 코팅 부분을 에폭시(epoxy)를 이용하여 절연막(24)을 형성하고, 에폭시가 건조된 후 수축 튜브를 이용하여 전극의 피복(25)을 형성하였다.

- [76] 또한, 작업전극(23) 표면에 Pt black 층을 형성하기 위해, 3 중량%의 염화백금산[chloroplatinic acid(H_2PtCl_6)], 0.029 중량%의 납 아세테이트(lead acetate) 및 97 중량% 물의 혼합용액에서, -0.1 V~0.5 V (vs. Ag/AgCl) 전위 구간에 걸쳐, 50 mV/s의 주사 속도로, 8 회 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry, CV)에 의한 처리를 하였다.

[77]

- [78] (2) NO 선택적 투과성 막의 형성

- [79] NO 선택적 투과성 막의 제작을 위해 빛을 차단한 갈색의 Microcentrifuge tube에 용매로서 에탄올(ethanol) 311.25 μ L를 넣고, 주사슬 형성을 위한 실레인 단량체로서 순도 98 % 이상의 MTMOS 51 μ L를 넣은 후 용액을 섞어주고, 바로 불소(fluoro, F)기 공급을 위한 실레인 단량체로서 17FTMS 12.75 μ L 첨가한 다음, 바로 볼텍스(vortex)를 이용하여 용액을 섞어주었다. 다음으로, 가수분해 반응을 위한 증류수 80 μ L와 산촉매인 0.5 M의 염산을 5 μ L첨가하였다. 그리고 마그네틱바로 2시간 동안 격렬하게 스티어링(stirring) 시켜 반응을 충분히 진행시켰다.

- [80] 상기 제조된 sol-gel 용액(제로젤, xerogel)에 상기 제작된 전극을 담그어 전극 표면에 NO 선택적 투과성 막이 형성되도록 한 다음, 24시간 동안 실온에서 건조시켰다.

[81]

- [82] NO 및 방해종에 대한 감응도 평가

- [83] 완충용액(pH 7.4 PBS 0.1M(NaCl 50 mM)) 8 mL를 용량 10 mL의 팔콘튜브(falcon)에 넣은 후 30분간 질소 가스를 버블링(bubbling)하였다. 이 후 질소 가스가 버블링된 용액이 담긴 팔콘튜브를 NO가 잘 퍼징(fusing) 될 수 있도록 차갑게 해주기 위해 얼음물에 넣은 뒤 20분간 NO 퍼징하여, 농도 1.9 mM의 푸른색의 NO 포화 용액을 제조하였다. 포화된 용액으로부터 다양한 농도의 NO 용액을 준비하였다. 또한, 방해종으로 50 μ M 농도의 아질산 이온, 아스코르브산, 요산 및 아세토아미노펜 용액을 준비하였다.

- [84] 상기 제작된 전극에 대해 전기화학적 측정 장비인 Electrochemical analyzer workstation 760D(CH Instrument 사)를 사용하여 상기 준비된 각 용액으로부터의 산화전류를 측정하였다. 인가전위는 700 mV(vs. Ag/AgCl)로 하였다. NO 용액에 대한 측정 결과를 도5 및 방해종 용액에 대한 측정 결과를 6의 감응곡선으로 나타내었다.
- [85] NO의 경우 농도가 증가할수록 산화 전류가 증가하였다. 반면, 방해종의 경우 NO의 최대 농도 1 μM 보다 50배 더 진한 50 μM 의 농도에 대해서도 매우 낮은 감응도를 나타내었다.
- [86] 따라서, 본 발명에서 제작된 전극은 NO에 대해 선택적이며, 그 농도에 따라 감응하는 것을 알 수 있다.
- [87]
- [88] 실시예 2(RSNO 및 RSNO/NO 농도 동시 측정용 장치의 제작)
- [89] (1) RSNO 및 RSNO/NO 농도 동시 측정용 장치에 사용되는 셀의 제작
- [90] 도7 및 8는 본 발명의 센서를 사용하는 RSNO농도 측정용 장치에 사용하기 위한 셀(cell)의 형상을 도시한 것이다. 셀은 아크릴 수지(acrylic) 재질로, 직육면체 형상으로 제작하였다. 7에 도시된 바와 같이 위에서 볼 때 셀의 가로 길이는 6.7cm, 세로 길이는 3.8 cm로 하였고, 도8와 같이 측면에서 볼 때 셀의 높이는 2.6 cm 로 하였다.
- [91] 셀 상면으로부터 작업 전극, 기준 전극 및 보조 전극을 장착하기 위한 통로를 형성하였다. 셀의 좌측단으로부터 2.3 cm 위치에 직경 0.5 mm의 보조 전극이 삽입될 통로(31)를, 그 지점으로부터 0.8 cm의 간격을 두고 직경이 0.45 cm인 기준 전극이 삽입될 통로(32) 및 그 지점으로부터 0.5 cm 간격을 두고 직경이 0.35 cm인 작업 전극이 삽입된 통로(33)를 형성하였다. 또한, 수로(34)는 셀의 상면으로부터 1.4 cm의 간격을 두고 통로 하부에서 통로와 수직 방향으로 위치하며 세 개의 통로를 연결하는 수로를 형성하였다. 수로의 폭은 0.5 cm, 높이는 0.1 cm로 하였다. 각 전극의 통로에는 시료의 누수를 방지하기 위해 O-ring을 장착하였다. 또한, 외부에서 셀로 시료를 공급하고, 다시 셀에서 외부로 시료를 배출시키는 튜빙과의 연결부(35)를 셀의 상면으로부터 1.4 cm 간격을 두고 형성하였다. 외부로부터 튜빙 및 연결부(35)에 의해 공급된 시료는 수로를 흐르고 다시 연결부(35) 및 튜빙에 의해 외부로 배출된다.
- [92]
- [93] (2) 플로우 시스템(Flow Injection Analysis, FIA)의 구성
- [94] 상기 제작된 셀에 실시예 1에서 제작된 전극을 작업 전극으로 장착하였고, 기준 전극 및 보조 전극을 장착하였다. 도9에 도시된 바와 같이 셀에 시료(44)를 흘려주기 위한 펌프(41) 및 셀에 빛을 공급하는 광원(43)을 셀(42)과 함께 구성하여 RSNO 농도 측정 장치를 제작하였다.
- [95]
- [96] 임상학적 농도 범위의 SNAP에 대한 감응도 평가

- [97] 상기 제작된 장치에 의해 RNSO의 임상학적 농도 범위 내에서 농도에 따른 신호를 측정하였다.
- [98] 바탕용액으로 pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer(140 mM KCl 16 μ M ethylenediaminetetraacetic acid)를 사용하였고, 인가전위로 700 mV(vs. Ag/AgCl)를 걸어 주었다. RNSO로 S-니트로소-N-아세틸-d,l-페니실아민(S-Nitroso-n-acetyl-d,l-penicillamine, SNAP)에 대해 측정하였다. SNAP 용액은 1, 2, 5, 10 μ M의 농도로 준비하였다. 용량이 40 mL인 바이알(vial)에 상기 용액을 30 mL씩 넣고 SNAP이 빛에 의해 분해되지 않도록 은박지로 바이알을 감싸 빛을 차단해 주었다. 바탕용액 또는 시료 용액은 연동운동 원리의 페리스탈틱 펌프(peristaltic pump)에 의해 셀까지 운반되었으며, 운송 속도는 10 rpm(revolution per minute)으로 고정하였다.
- [99] 바탕용액을 이용하여 전극을 4시간 동안 안정화시켰다. 안정화된 전극의 전류값은 약 40 nA이었다. 이후 2 μ M의 SNAP 용액을 충분하게 전체적으로 잘 순환되도록 흘려주었다. 광학 촉매 스위치 오프(off) 상태에서 SNAP 용액의 안정화 신호를 100초 동안 수집한 후, 광학 촉매 스위치를 온(on) 시켰다. 광섬유에서 통과된 빛에 의해 RSNO에서 발생된 NO의 산화전류를 300초 동안 측정하였다. 300초가 되면 다시 광촉매 스위치를 오프(off)시킨 뒤 안정화되는 신호를 100초 동안 수집하였다. 이 후 신호 수집을 일시 정지한 뒤 바탕용액을 흘려주어 10분간 전극을 세척(washing)하였다.
- [100] 상기 방법을 반복함으로써 다양한 SNAP 용액에 대해 신호를 측정하였다. 측정 결과를 도10에 나타내었다. 농도에 따라 신호가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 각 농도에서의 전류 값으로부터 얻어진 검정곡선은 0.998의 직선성을 보였다. 이로부터 본 발명의 장치는 1 내지 10 μ M 농도 범위의 SNAP에 대해 좋은 감응도를 나타내고 있음을 알 수 있다.
- [101]
- [102] 저농도 범위의 SNAP에 대한 감응도 평가
- [103] 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ M의 SNAP 용액을 준비하였다. 각 용액에 대해 상기와 동일한 방법으로 신호를 측정하였다. 측정 결과를 도11에 나타내었다. 저농도 범위의 SNAP 용액에서도 농도에 따라 신호가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 각 농도에서의 전류 값으로부터 얻어진 검정곡선은 0.999의 매우 좋은 직선성을 보였다. 이로부터 본 발명의 장치는 0.2 내지 1 μ M 농도 범위의 SNAP에 대해 좋은 감응도를 나타내고 있음을 알 수 있다.
- [104]
- [105] 고농도 범위의 SNAP에 대한 감응도 평가
- [106] 5, 10, 25, 50, 100 μ M의 SNAP 용액을 준비하였다. 각 용액에 대해 상기와 동일한 방법으로 신호를 측정하였다. 측정 결과를 도12에 나타내었다. 고농도 범위의 SNAP 용액에서도 농도에 따라 신호가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 각 농도에서의 전류 값으로부터 얻어진 검정곡선은 50 μ M 이상의

농도에서 검출한계를 보였으나, 본 발명의 장치는 5 내지 50 μM 농도 범위의 SNAP에 대해 좋은 감응도를 나타내고 있음을 알 수 있다.

[107]

[108] NO 및 RSNO의 농도 측정

[109] Cal 용액 1(2 nM NO, 0.2 μM SNAP), Cal 용액 2(10 nM NO, 1 μM SNAP) 및 NO 및 SNAP의 농도가 상기 Cal 용액 1 및 Cal 용액 2의 범위에 속하는 미지의 시료 용액 1, 2를 준비하였다. 각 용액에 대해 상기와 동일한 방법으로 신호를 측정하였다. 측정 결과를 도13에 나타내었다. 시료 주입 후 측정되는 신호는 NO에 의한 것이고, 광학 촉매 스위치를 켜었을 때 측정되는 신호는 RSNO에 의한 것이다.

[110] 도14 및 15는 Cal 용액 1(0.2 μM RSNO, 2 nM NO)과 Cal 용액 2(1 μM RSNO, 10 nM NO)에 대해 NO 및 SNAP 각각의 검정곡선을 얻었고, 이에 미지의 시료 용액 1, 2에서 얻어진 전류값을 표시한 것이다. 그 결과, NO 및 RSNO의 검정곡선 모두에 미지 시료 용액으로부터 얻어진 NO 및 RSNO 농도가 포함되었으며, 두 물질의 구별이 가능한 결과를 나타냈다. 한편, 도13으로부터 시료를 세척하기 위해 바탕용액을 다시 흘려주었을 때 전극이 시료를 흘려주기 이전의 안정화 상태로 잘 회복되고 있음을 알 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 일산화질소의 산화 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하는 전극 및 니트로소티올의 광분해를 개시 및 정지시키는 수단을 포함하며, RSNO의 광분해 전 및 후의 NO 산화 반응에 의한 전류를 측정하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.
- [청구항 2] 제1항에서,
상기 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키는 수단은, 상기 전극을 광섬유에 도입하고, 상기 전극이 도입된 광섬유에 광원을 장착한 뒤, 상기 광원으로부터 광섬유로 빛의 공급 및 차단을 조정하는 광학 촉매 스위치인 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.
- [청구항 3] 제2항에서,
상기 전극은 백금(platinum), 금(gold), 은(silver), 바나듐(vanadium), 나이오븀(niobium), 탄탈럼(tantalum), 인듐(indium), 타이타늄(titanium), 니켈(nickel), 몰리브데넘(molybdenum), 철(iron), 구리(copper), 코발트(cobalt), 크롬(chromium), 비스머스(bismuth), 알루미늄(aluminum), 니켈 크롬(nickel chromium) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종을 광섬유 단면에 증착시킴으로써 광섬유에 도입된 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.
- [청구항 4] 제2항에서,
상기 전극은 백금(platinum), 금(gold), 은(silver), 바나듐(vanadium), 산화 규소(silicon oxide), 나이오븀(niobium), 탄탈럼(tantalum), 인듐(indium), 타이타늄(titanium), 니켈(nickel), 몰리브데넘(molybdenum), 철(iron), 구리(copper), 코발트(cobalt), 크롬(chromium), 흑연(graphite), 비스머스(bismuth), 알루미늄(aluminum), 산화 아연 망간(zinc oxide manganese), 니켈 크롬(nickel chromium) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종을 와이어, 로드 또는 판 형태로 제작하여 광섬유에 부착시킴으로써 광섬유에 도입된 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.
- [청구항 5] 제2항에서,
상기 전극은 금(gold), 탄소(carbon), 은(silver), 백금(platinum) 및 은과 탄소 혼합(silver & carbon)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상과 파라핀(paraffin)계 오일을 포함하는 혼합 조성물을 광섬유 단면에 도포함으로써 광섬유에 도입된 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.
- [청구항 6] 제2항에서,

상기 전극은 금(gold), 탄소(carbon), 은(silver), 백금(platinum) 및 은과 탄소 혼합(silver & carbon)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상과 파라핀(paraffin)계 오일을 포함하는 혼합 조성물을 원통형의 광섬유 단면에 도포하여 형성되고, 상기 광섬유 옆면에는 작동회로 연결선이 장착되며, 상기 작동회로 연결선을 포함하는 광섬유 옆면에는 상기 혼합 조성물로부터 코팅층이 형성된 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 7]

제6항에서,

상기 광섬유 옆면의 코팅층 위로는 추가적으로 절연성 물질의 피복이 구비되는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 8]

제2항에서,

상기 광섬유는 직경 $250\mu\text{m}$ 내지 3mm 범위의 원통형으로, 플라스틱, 실리카(silica, SiO_2) 또는 다성분 유리(glass) 재질인 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 9]

제2항에서,

상기 광섬유는 단일모드(single mode optical fiber, SMF), 다중모드(Multiple mode optical fiber, MMF), 단계 굴절 (Step index type, SI) 또는 언덕 굴절(Graded index type, GI) 타입인 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 10]

제1항에서,

상기 RSNO의 광분해를 개시 및 정지시키는 수단은, 상기 전극을 암실에 배치하고, 외부 광원으로 부터 상기 암실에 빛을 공급 및 차단하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 11]

제1항에서,

상기 광분해는 최대로는 자외선 영역(320~350 nm) 내지 가시 광선 영역(550~590 nm)의 파장 범위를 갖는 빛에 의해 일어나는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 12]

제1항에서,

상기 전극에는 NO에 대한 선택적 투과성 막이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 13]

제1항에서,

상기 RSNO는 S-니트로소알부민(S-nitrosoalbumin, Alb-NO), S-니트로소-L-시스테인(S-nitroso-L-cysteine, CysNO), S-니트로소-L-시스테인메틸에스테르(S-nitroso-L-cysteinemethylester, CMESNO), S-니트로소-d,l-페니실아민(S-nitroso-d,l-penicillamine, PSNO), S-니트로소-N-이세틸시스테인아민(S-nitroso-N-acetylcysteineamine, ACSNO), S-니트로소-N-아세틸-L-시스테인(S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine, NACysNO), S-니트로소캡토프릴(S-

-nitrosocaptopril, SNOCAP), S-니트로소-머캅토에틸아민(*S*-nitroso-mercaptoethylamine), S-니트로소-3-머캅토-프로판산(*S*-nitroso-3-mercapto-propanoicacid), S-니트로소호모시스테인(*S*-nitrosohomocysteine, HcysNO), S-니트로소-b,d-티오글루코스(*S*-nitroso-b,d-thiogluucose), S-니트로소-N-아세틸-d,l-페니실아민(*S*-Nitroso-N-acetyl-d,l-penicillamine, SNAP), S-니트로소-N-아세틸-d,l-페니실아미닐 글리신 메틸 에스테르(*S*-Nitroso-N-acetyl-d,l-penicillaminyI glycine methyl ester) 및 S-니트로소-l-글루타티온(*S*-Nitroso-l-glutathione, GSNO)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 센서.

[청구항 14]

제1항 내지 제13 항 중 어느 한 항의 센서를 장착하기 위한 셀; 상기 셀 내로 시료를 운송하기 위한 펌프; 및 셀에 시료를 공급하거나 셀로부터 시료를 배출시키는 튜빙을 포함하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 장치.

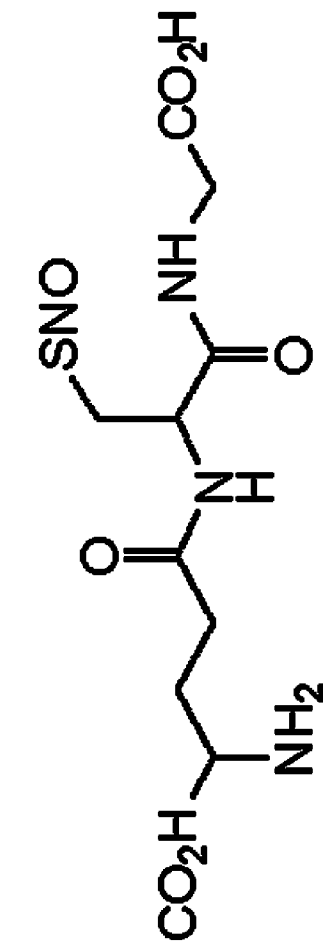
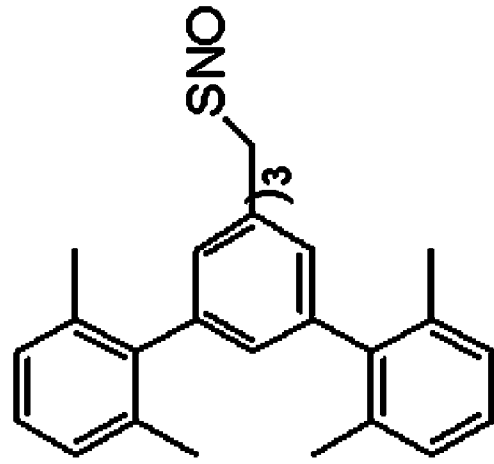
[청구항 15]

제14항에서,
상기 셀은 작업 전극, 보조 전극 및 기준 전극 각각을 장착하는 통로; 상기 통로를 연결하여 셀 내에서 시료가 흐르는 수로; 외부로부터 셀로 시료를 공급하고, 셀로부터 외부로 시료를 배출시키는 튜빙과의 연결부를 포함하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 장치.

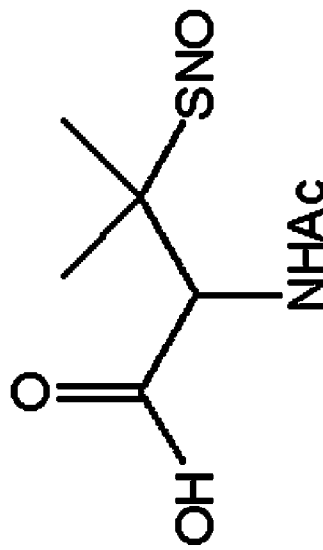
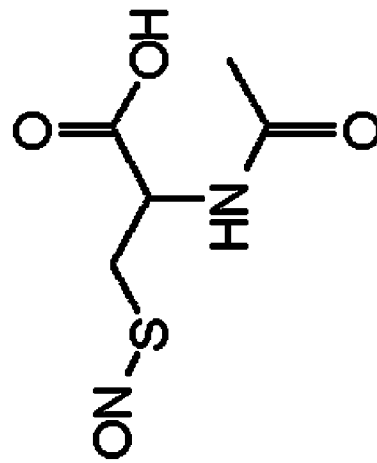
[청구항 16]

제14항에서,
상기 장치는 레이저(laser), 할로젠램프, 메탈할라이드램프, 나트륨등, 삼파장무전극램프, LED, 백열전구, 형광램프, 고주파램프로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 광원을 사용하는 것을 특징으로 하는 RSNO 농도 측정용 장치.

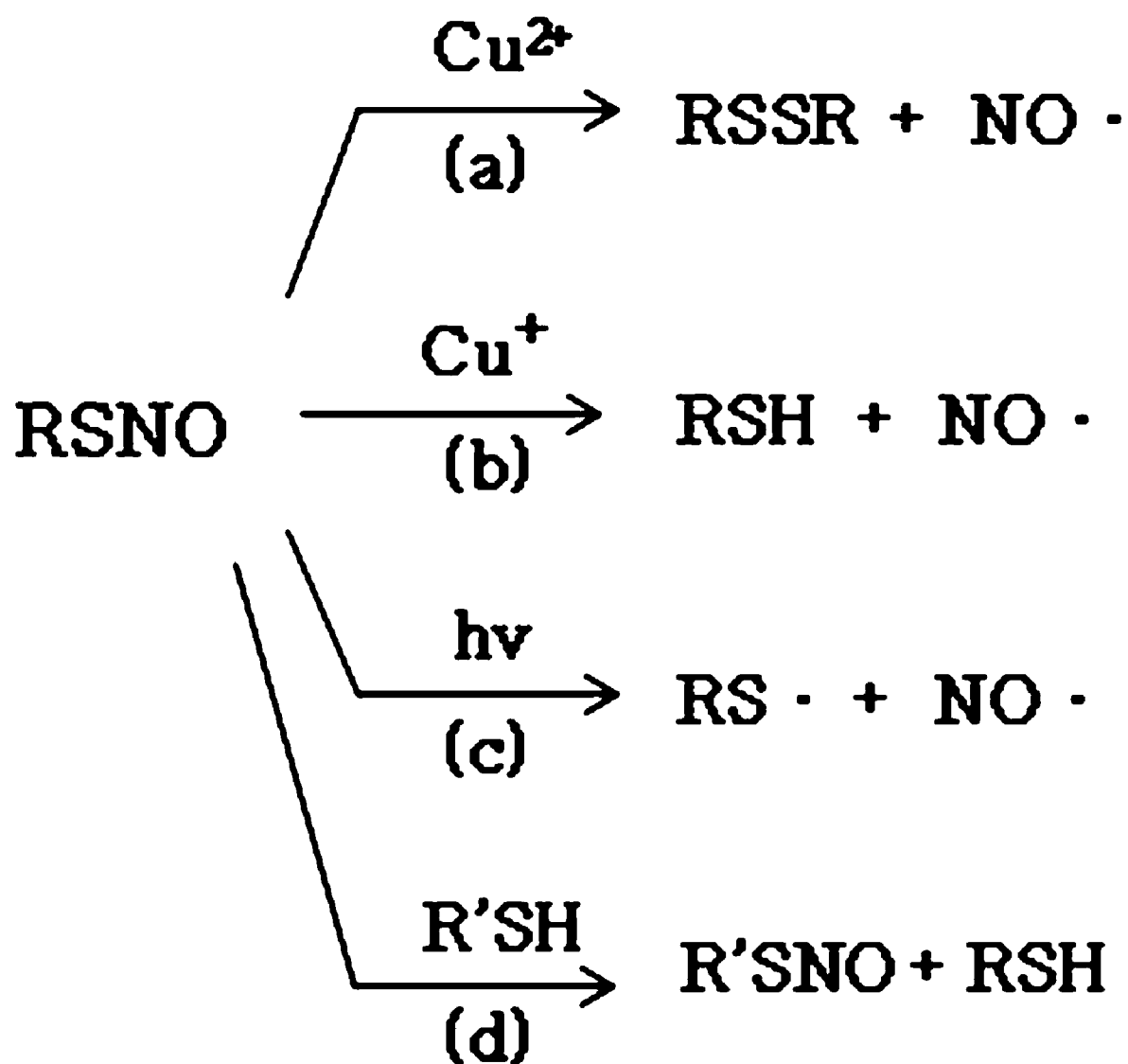
[Fig. 1]

S-nitrosogluthathione
(GSNO)

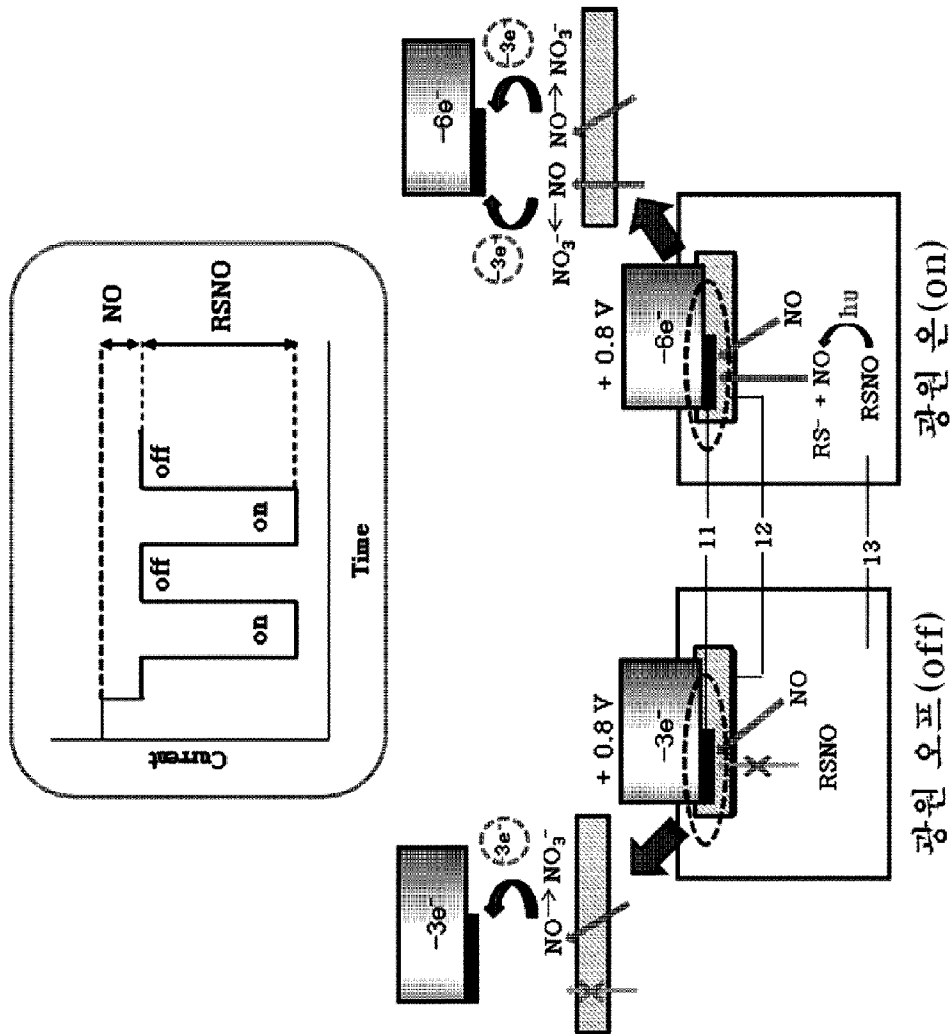
Tm-SNO

S-nitroso-N-acetyl penicillamine
(SNAP)S-nitroso-N-acetyl cysteine
(SNAC)

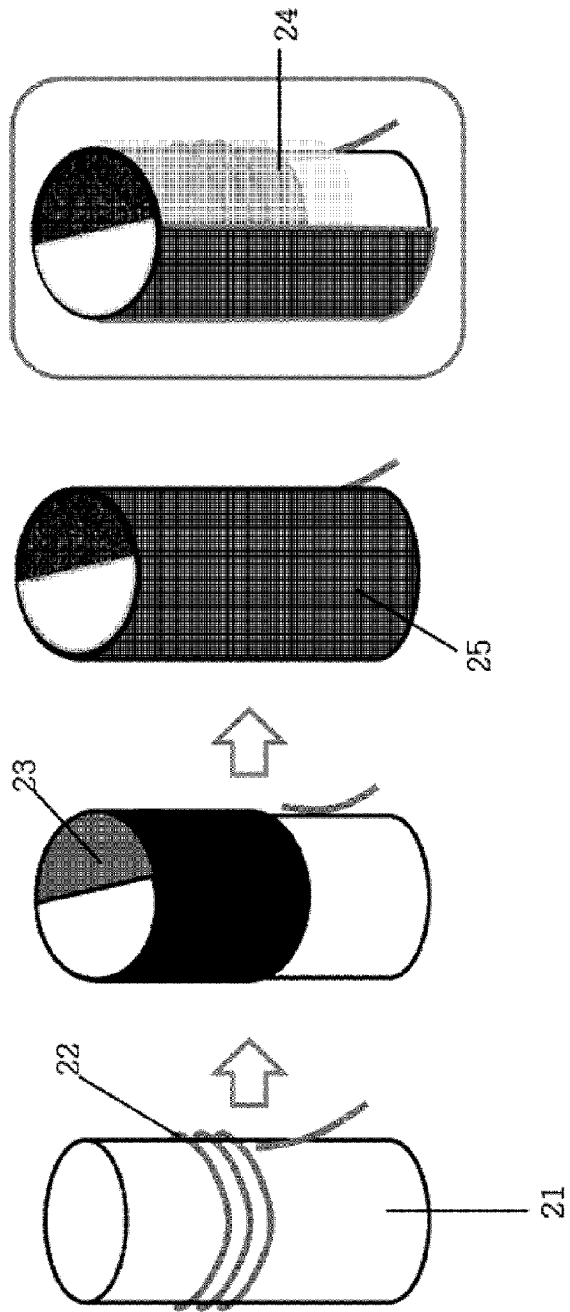
[Fig. 2]



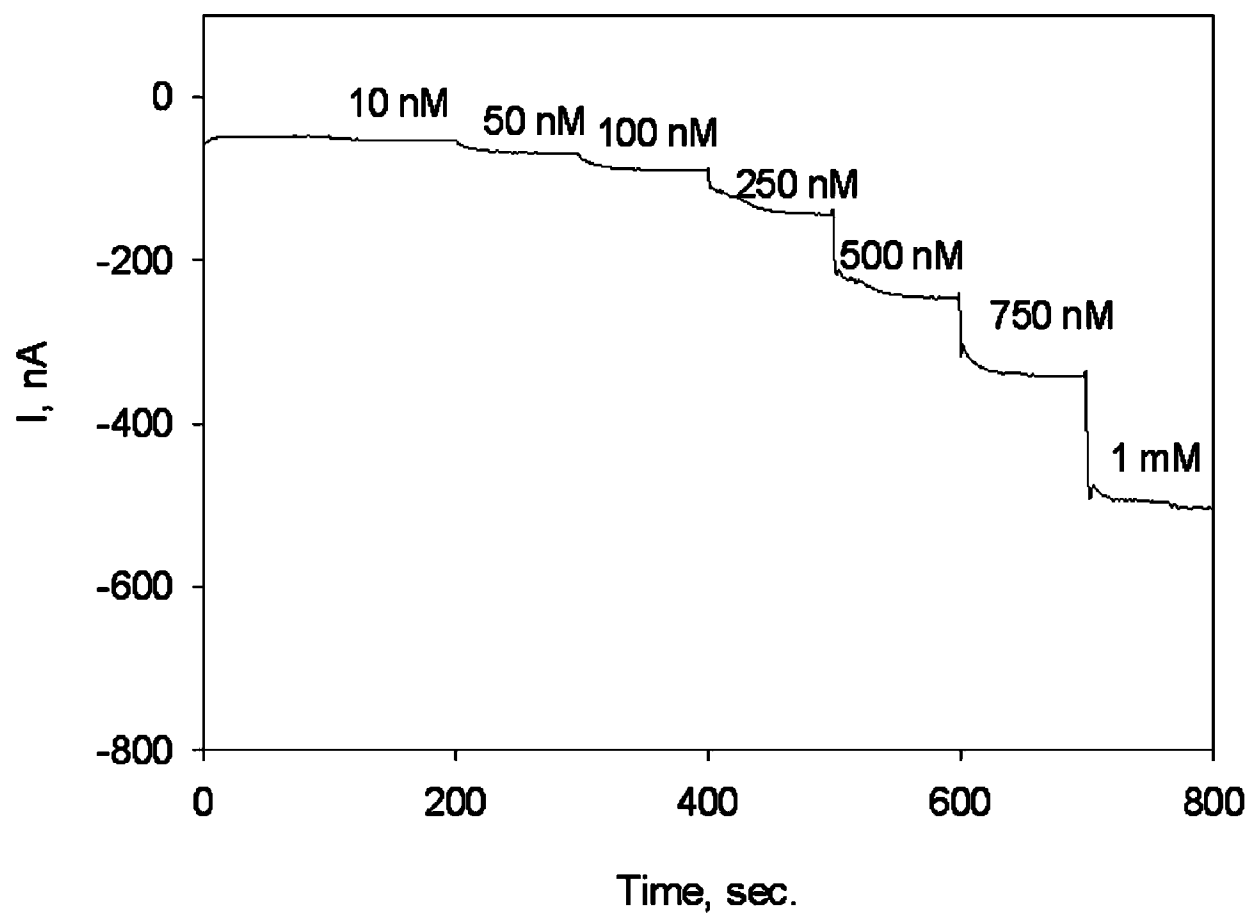
[Fig. 3]



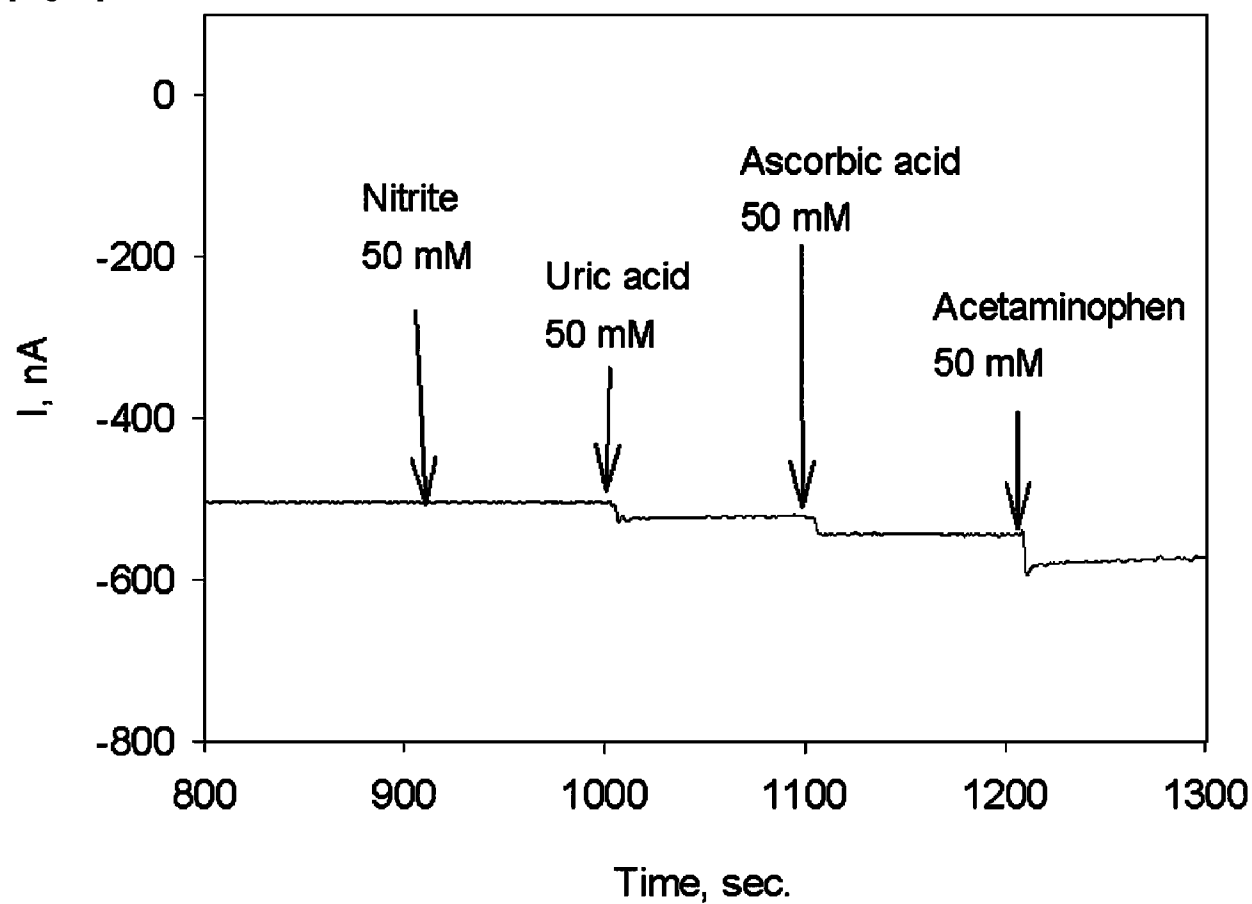
[Fig. 4]



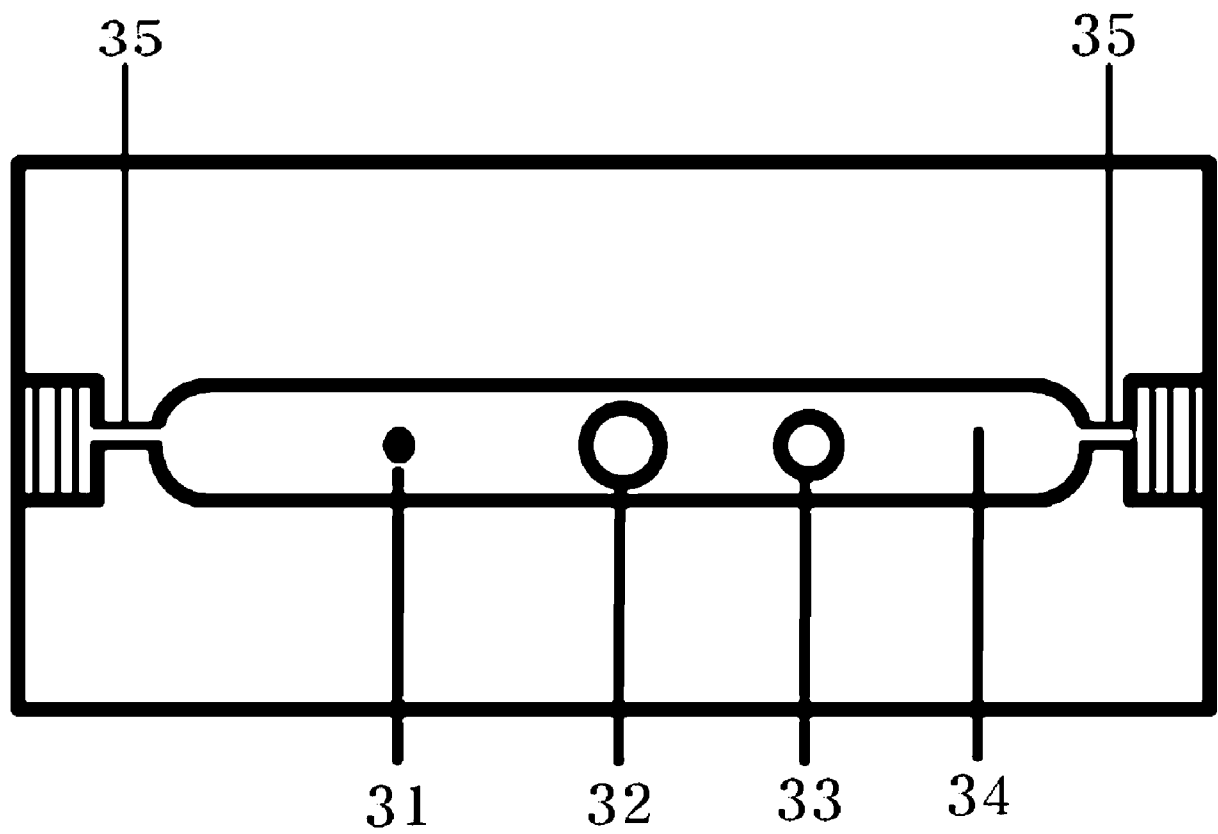
[Fig. 5]



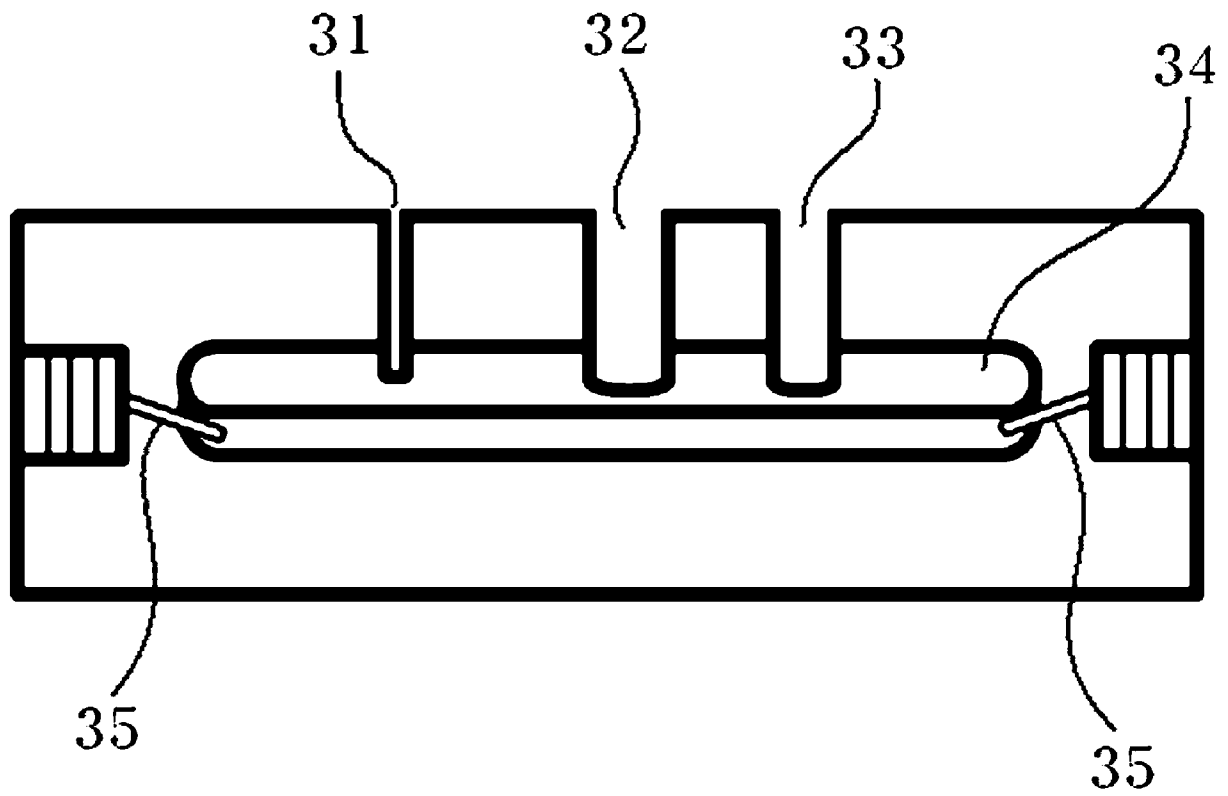
[Fig. 6]



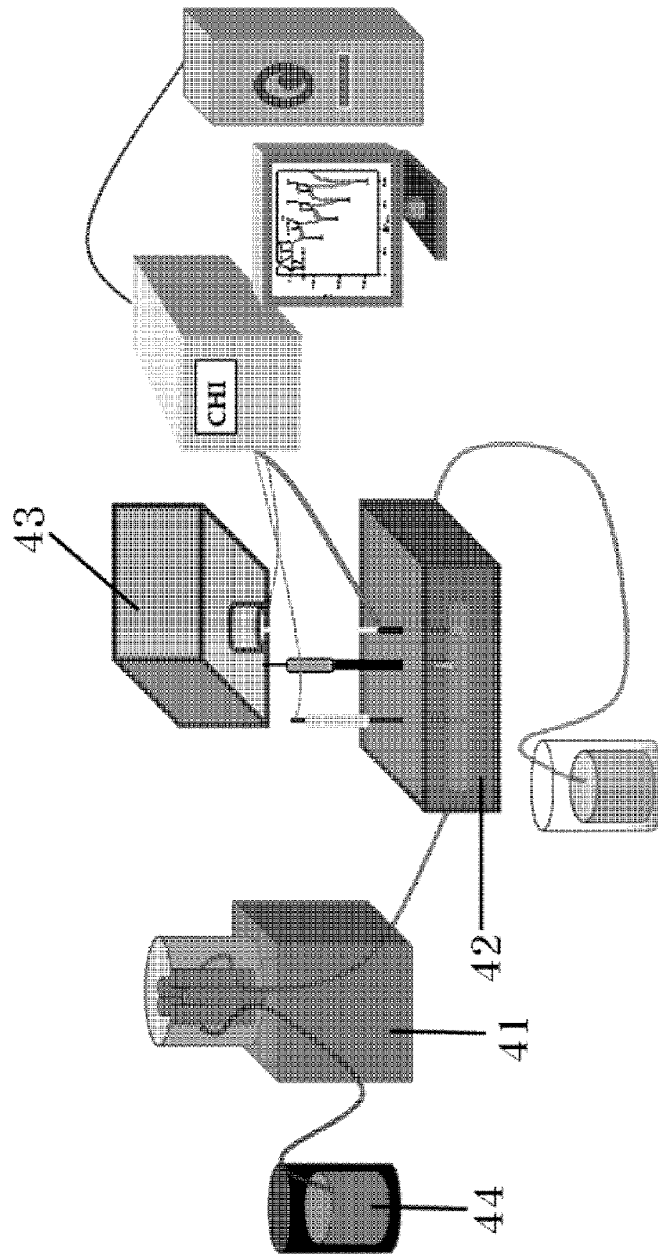
[Fig. 7]



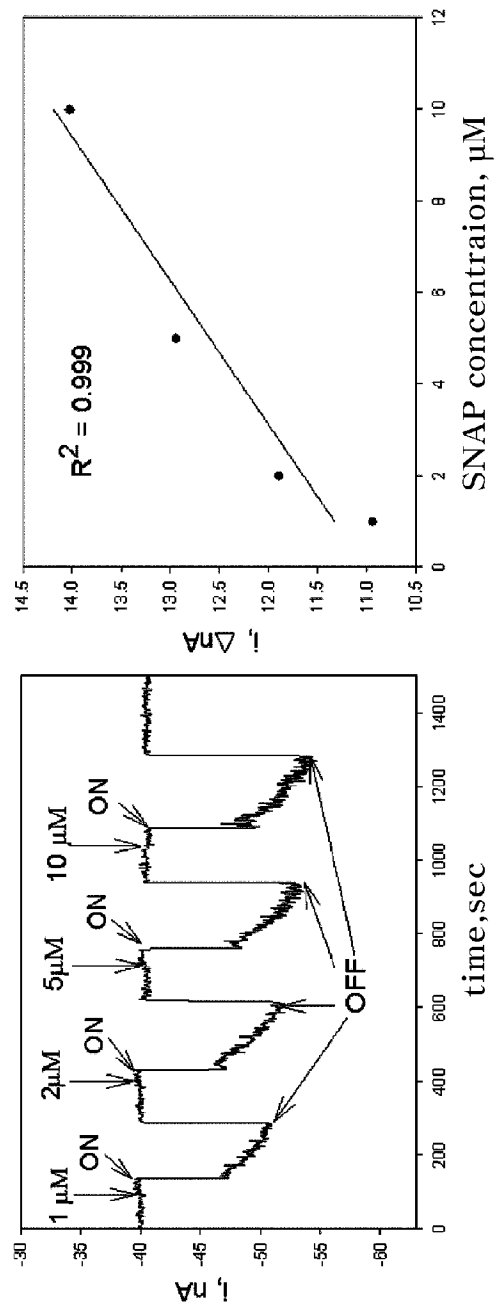
[Fig. 8]



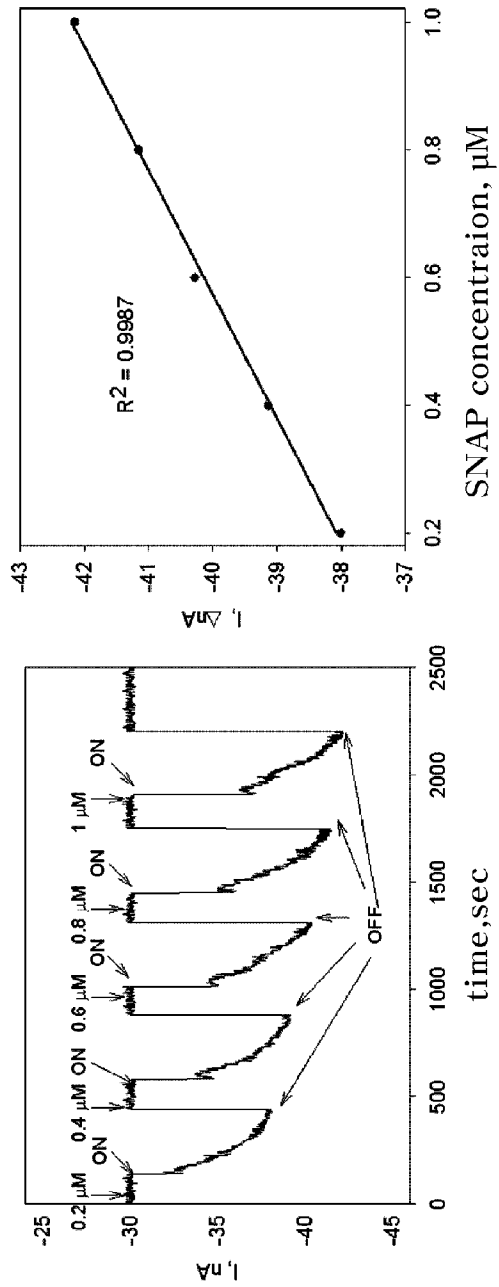
[Fig. 9]



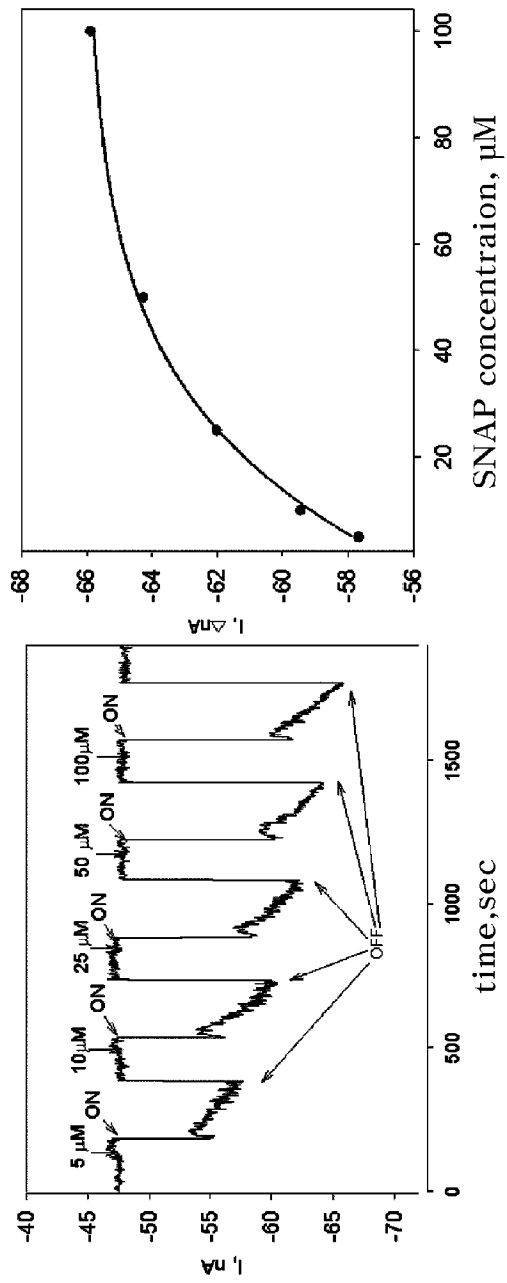
[Fig. 10]



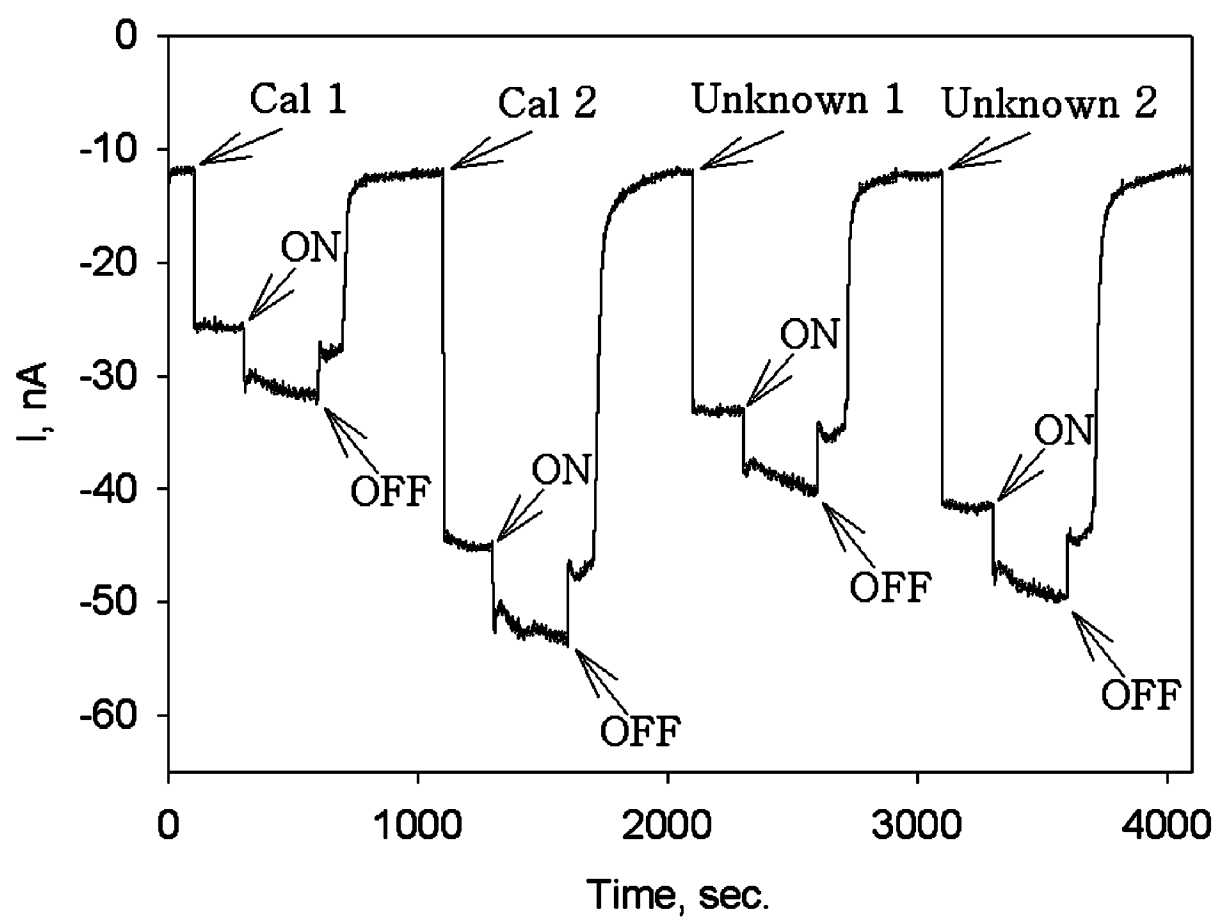
[Fig. 11]



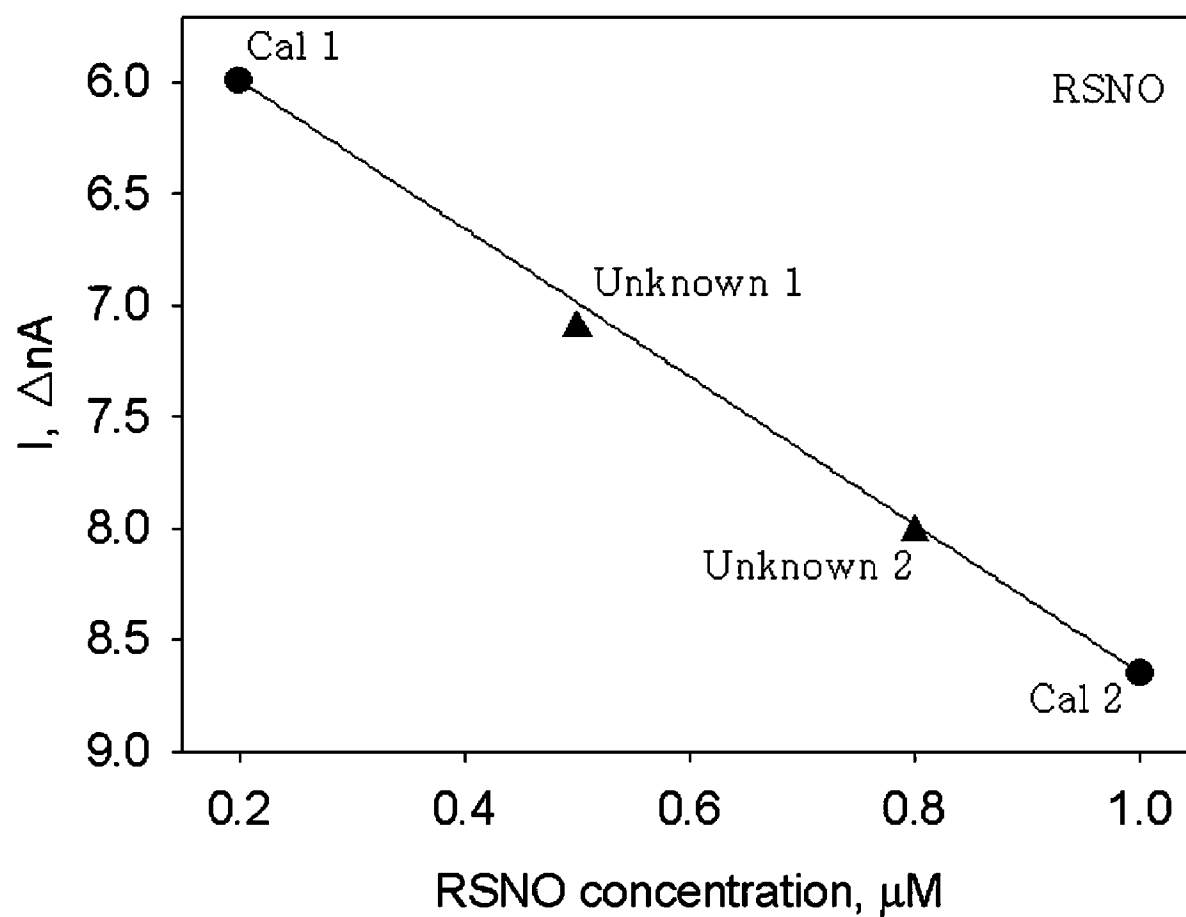
[Fig. 12]



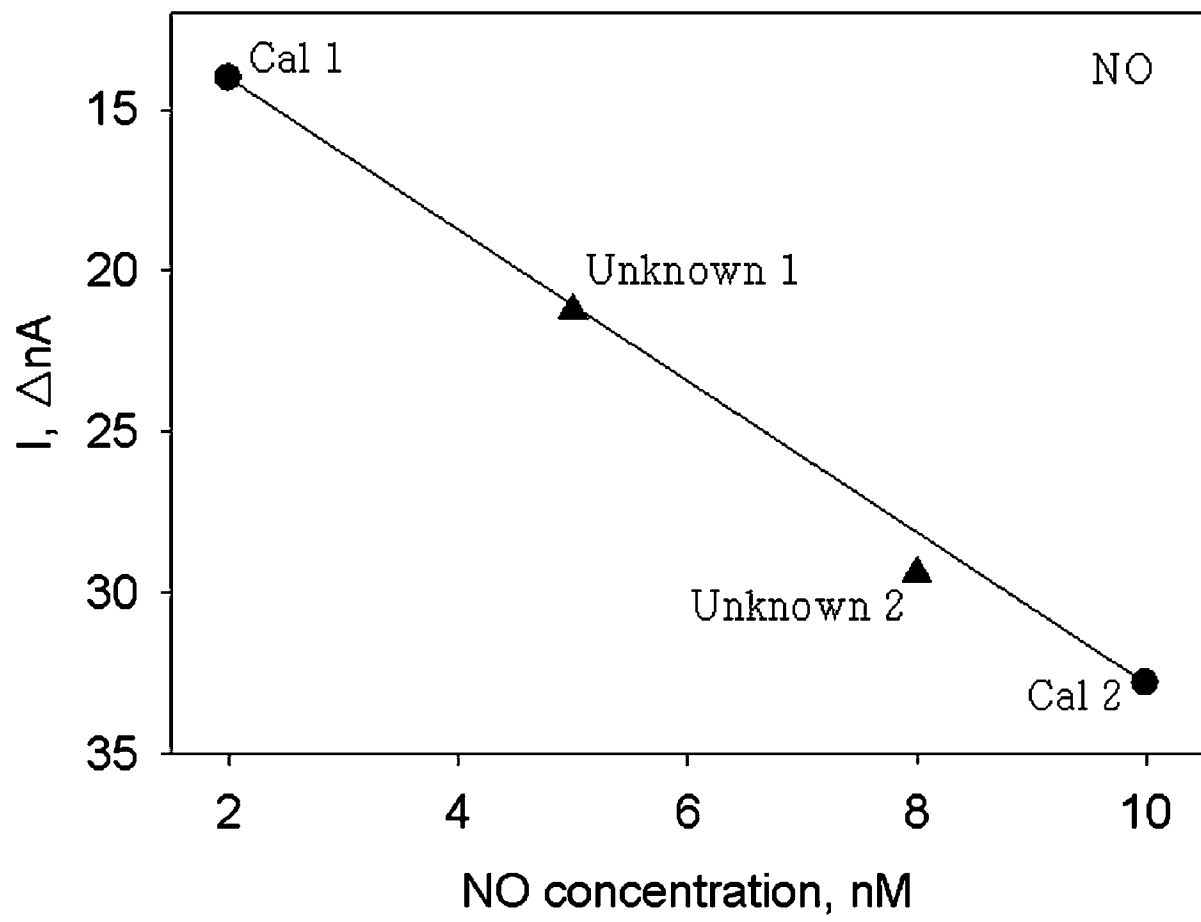
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002688**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 27/00(2006.01)i, G01R 19/145(2006.01)i, G01N 27/30(2006.01)i, G01N 33/48(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 27/00; G01N 21/76; C40B 40/10; C12Q 1/20; G01N 33/53; G01N 33/50; C12Q 1/68; G01N 33/68

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: nitrosothiol, sensor, optical fiber.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0176271 A1 (SILVER JAMES H. et al.) 24 July 2008 See abstract, figures 1 to 35, claims 1 to 20.	1-16
A	US 2009-0017552 A1 (LIPPARD STEPHEN J. et al.) 15 January 2009 See abstract, figures 1 to 9, claims 1 to 20.	1-16
A	US 2006-0084097 A1 (RONG-GUI HU et al.) 20 April 2006 See abstract, figures 1 to 8, claims 1 to 79.	1-16
A	US 2009-0029390 A1 (YANG, EUN GYEONG et al.) 29 January 2009 See abstract, figures 1 to 6, claims 1 to 13.	1-16



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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 MARCH 2012 (27.03.2012)

Date of mailing of the international search report

27 MARCH 2012 (27.03.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2011/002688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2008-0176271 A1	24.07.2008	AU 2001-259656 A8	26.11.2001
		US 2002-0128546 A1	12.09.2002
		US 2003-0009093 A1	09.01.2003
		US 2003-0114735 A1	19.06.2003
		US 2004-0176672 A1	09.09.2004
		US 2006-0079740 A1	13.04.2006
		US 6442413 B1	27.08.2002
		US 6895265 B2	17.05.2005
		US 7006858 B2	28.02.2006
		US 7033322 B2	25.04.2006
		US 7181261 B2	20.02.2007
		US 7769420 B2	03.08.2010
		US 8133698 B2	13.03.2012
		WO 01-87137 A2	22.11.2001
		WO 2007-058872 A2	24.05.2007
		WO 2008-089282 A2	24.07.2008
US 2009-0017552 A1	15.01.2009	US 7494821 B2	24.02.2009
		WO 2007-149105 A2	27.12.2007
US 2006-0084097 A1	20.04.2006	AU 2003-218377 A1	08.10.2003
		AU 2003-225974 A1	08.10.2003
		US 2004-0009538 A1	15.01.2004
		US 2004-0023311 A1	05.02.2004
		US 2006-0234313 A1	19.10.2006
		US 7575881 B2	18.08.2009
		US 7588901 B2	15.09.2009
		WO 03-079999 A2	02.10.2003
		WO 03-080000 A2	02.10.2003
US 2009-0029390 A1	29.01.2009	JP 2008-096423 A	24.04.2008
		KR 10-0860060 B1	24.09.2008
		KR 10-2008-0033643A	17.04.2008
		US 7816094 B2	19.10.2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>G01N 27/00(2006.01)i, G01R 19/145(2006.01)i, G01N 27/30(2006.01)i, G01N 33/48(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 27/00; G01N 21/76; C40B 40/10; C12Q 1/20; G01N 33/53; G01N 33/50; C12Q 1/68; G01N 33/68 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: 니트로소티올, 센서, 광섬유.		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2008-0176271 A1 (SILVER JAMES H. 외 1명) 2008.07.24 요약, 도 1 내지 35, 청구항 1 내지 20 참조.	1-16
A	US 2009-0017552 A1 (LIPPARD STEPHEN J. 외 1명) 2009.01.15 요약, 도 1 내지 9, 청구항 1 내지 20 참조.	1-16
A	US 2006-0084097 A1 (RONG-GUI HU 외 4명) 2006.04.20 요약, 도 1 내지 8, 청구항 1 내지 79 참조.	1-16
A	US 2009-0029390 A1 (YANG EUN-GYEONG 외 2명) 2009.01.29 요약, 도 1 내지 6, 청구항 1 내지 13 참조.	1-16
☐ 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 “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 신구성 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 2012년 03월 27일 (27.03.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 03월 27일 (27.03.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 노대현 전화번호 82-42-481-5637 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2008-0176271 A1	2008.07.24	AU 2001-259656 A8 US 2002-0128546 A1 US 2003-0009093 A1 US 2003-0114735 A1 US 2004-0176672 A1 US 2006-0079740 A1 US 6442413 B1 US 6895265 B2 US 7006858 B2 US 7033322 B2 US 7181261 B2 US 7769420 B2 US 8133698 B2 WO 01-87137 A2 WO 2007-058872 A2 WO 2008-089282 A2	2001.11.26 2002.09.12 2003.01.09 2003.06.19 2004.09.09 2006.04.13 2002.08.27 2005.05.17 2006.02.28 2006.04.25 2007.02.20 2010.08.03 2012.03.13 2001.11.22 2007.05.24 2008.07.24
US 2009-0017552 A1	2009.01.15	US 7494821 B2 WO 2007-149105 A2	2009.02.24 2007.12.27
US 2006-0084097 A1	2006.04.20	AU 2003-218377 A1 AU 2003-225974 A1 US 2004-0009538 A1 US 2004-0023311 A1 US 2006-0234313 A1 US 7575881 B2 US 7588901 B2 WO 03-079999 A2 WO 03-080000 A2	2003.10.08 2003.10.08 2004.01.15 2004.02.05 2006.10.19 2009.08.18 2009.09.15 2003.10.02 2003.10.02
US 2009-0029390 A1	2009.01.29	JP 2008-096423 A KR 10-0860060 B1 KR 10-2008-0033643A US 7816094 B2	2008.04.24 2008.09.24 2008.04.17 2010.10.19