

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
G01N 33/50

(45) 공고일자 1997년03월 17일  
(11) 공고번호 97-003313

(21) 출원번호	특1987-0008931	(65) 공개번호	특1988-0003189
(22) 출원일자	1987년08월 13일	(43) 공개일자	1988년05월 14일
(30) 우선권주장	896, 418 1986년08월 13일 미국(US) 리페스칸 인코포레이티드 로거 필립스 미합중국 94043 캘리포니아 마운틴 비유 위안도트 스트리트 2443		
(72) 발명자	로거 필립스 미합중국 94303 캘리포니아 팔로 알토 리차드슨 커어트 845 제오프레이 맥가라우그 미합중국 95066 캘리포니아 스코트 밸리 하시엔다 드라이브 291 프랑크 쥬리크 미합중국 94402 캘리포니아 산 마테오 16번가 142 레이 언더우드 미합중국 96080 캘리포니아 레드 블루프 페인스 크릭 로드 146005		
(74) 대리인	남상욱, 남상선		

심사관 : 김호석 (책자공보 제4877호)

(54) 검체 결정용 최소 공정 시스템

요약

내용없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

검체 결정용 최소 공정 시스템

[도면의 간단한 설명]

제1도는 분석되는 유체를 사용하는 반응 패드를 함유하는 시험장치의 한 구현을 나타내는 사시도.

제2도는 본 발명의 수행에 사용할 수 있는 장치의 개략적인 블록도.

제3도는 본 발명의 수행에 사용할 수 있는 다른 장치의 개략적인 블록도.

\* 도면의 주요부분에 대한 부호의 설명

- |                     |                |
|---------------------|----------------|
| 5 : 광원              | 6 : 광 검출기      |
| 7 : 증폭기             | 8 : 트랙 및 홀드 회로 |
| 11 : 시약 패드          | 12 : 플라스틱 홀더   |
| 13 : 접착제            |                |
| 19 : 아날로그 대 디지털 변환기 |                |
| 20 : 마이크로프로세서       |                |
| 21 : 프로그램 및 데이터 메모리 |                |
| 22 : 디스플레이          |                |

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 수용성 유체, 특히 전혈(whole blood) 중의 화학 또는 생화학 성분들(검체들)의 비색 결정용 시험장치 및 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예로는 전혈 중의 글루코오스의 농도를 비색

측정하기 위한 시험장치 및 방법에 관한 것이다.

채색 수용성 유체, 특히 전혈과 같은 채색 생물학적 유체 및 혈청과 플라즈마와 같은 뇨 및 생물학적 유체 유도체 중에서 화학 및 생물학적 성분들의 정량 분석은 중요성이 강조되고 있다. 중요한 작용은 의학 진단 및 치료로서, 그리고 치료약제, 중독제, 해로운 화합물 등에 노출에 따른 정량에 관련이 있다. 몇가지 경우에, 결정되는 물질의 양은 데시리터당  $\mu\text{g}$  또는 그 이하의 범위로 작은 규모이거나 또는 정확하게 결정하는 것이 어렵기 때문에 사용된 장치가 복잡하며, 단지 숙련된 기술자에 게만 유용하다. 이러한 경우에, 일반적으로 얻어진 결과는 시료 추출후 몇시간 또는 몇일 동안 이용될 수 없다. 다른 경우에, 빠르거나 또는 즉각적인 정보를 입력하는 것과 같은 실험실 운영 이외에, 일정하고 빠르고 그리고 반복하여 실험을 수행하기 위해 기사들의 능력이 종종 강조되고 있다.

하나의 통상적인 의학 시험은 당뇨병에 의한 혈액 글루코오스 값의 측정이다. 일반적으로는 당뇨 환자의 개개인의 성질 및 병의 경중에 의존하여 하루에 2 내지 7번 이들의 혈액 글루코오스 값을 측정한다. 측정된 글루코오스 값의 관찰된 패턴을 기초로 하여 환자과 의사는 함께 질병을 더 잘 처리하기 위해 식사, 운동 및 인슐린 섭취량을 조절한다. 명백하게 이러한 정보는 즉시 환자에게 이용되어야 할 것이다.

현재 미국에서 폭넓게 사용된 방법은, 마스트 등에게 1967년 1월 17일자 발행된 미합중국 특허 제 3,298,789호에 설명된 형태의 시험 제품을 사용한다. 이 방법에서, 신선한 전혈의 시료(대표적으로 20~40 $\mu\text{l}$ )는 글루코오스옥시다제 및 퍼옥시다제 활성을 갖는 효소계를 함유하는 에틸셀룰로오스-피복된 시약 패드 위에 가해진다. 효소계는 글루코오스와 반응하고 과산화수소를 방출한다. 또한 패드는 시료의 글루코오스 값으로 강도에 비례하는 색상을 제공하기 위해 퍼옥시다제의 존재하에 과산화수소와 반응하는 지시약을 함유한다.

다른 일반적인 혈액 글루코오스 시험 방법은 유사한 화합물을 사용하나 에틸셀룰로오스-피복된 패드 대신에 효소 및 지시약들이 잘 분산된 방수필름을 사용한다. 이러한 형태의 시스템은 레이 등에게 1971년 12월 28일자 발행된 미합중국 특허 제3,630,957호에 발표되었다.

양쪽의 경우 모드에서 시료는 특성 시간(대표적으로 1분)동안 시약 패드와 접촉을 유지한다. 그 다음 첫 번째 경우에 혈액 시료는 물의 흐름으로 씻어지고, 두번째 경우에 필름을 벗겨낸다. 시약 패드 또는 필름은 그 다음 건조시키고 평가한다. 평가는 색상 차트와 발생한 색상을 비교하거나 또는 색상 강도 값을 읽기 위해 확산반사각 기구에 패드 또는 필름을 설치하여 수행하였다.

상기 방법들이 몇년 동안 글루코오스 조절에 사용되어 오는 동안 이들은 어떤 한계성을 드러냈다. 필요한 시료 크기는 손가락 시험을 위해 오히려 더 커졌고, 모세 혈관 혈액이 잘 드러나지 않는 몇몇 사람들에게 사용하기가 어려웠다.

또한, 이러한 방법들은 그 방법에 의한 결과치들이 시료와 시험 시약사이의 반응의 절대 범위와 관련된 절대 색상 읽기에 기초를 둔다는 점에서 비색 결정에 따른 단점을 다른 단순 노동 기능사들에게 분담한다. 간격을 둔 반응시간 후, 시료는 세척되거나 또는 시약 패드를 벗겨내어야 하는 사실은 사용자가 시간 간격이 끝난 후에 준비하고, 필요한 시간에 담거나 또는 세척 흐름을 사용할 것을 요구한다. 시료를 제거하여 반응을 정지시킨다는 사실을 결과에 있어서의, 특히 사용자의 손에서 약간의 불확실성을 야기한다. 상부 세척은 실제보다 낮은 결과치를 제공할 수 있고, 하부 세척은 높은 결과치를 제공할 수 있다.

비색 결정을 위한 단순 노동 기사들에게 가끔 필요한 다른 문제는 혈액이 시약 패드에 공급될 때 타이밍 순서를 설정해야 한다는 점이다. 사용자들은 혈액 시료를 얻기 위해 손가락을 찌를 것이고, 그 다음 그의 또는 다른 사람의 나머지 손으로 타이밍 회로를 작동하면서 손가락으로부터 시약패드로 혈액을 동시에 공급해야 한다. 그러므로, 동시에 두손의 사용을 요한다. 이것은 혈액이 시약 패드로 공급될 때만 타이밍 회로가 작동하도록 해야 할 필요가 있으므로 특히 어렵다. 모든 공지의 방법들은 이러한 결과를 얻기 위해 추가 조작 또는 추가 회로를 요구한다. 따라서, 반사각 측정 기구의 단순화가 요구되고 있다.

적혈구 세포 또는 다른 착색 성분들의 존재는 이러한 절대값의 측정을 방해하므로, 가장 폭넓게 실행되고 있는 2개의 공지 방법에서 적혈구 제거를 요구한다. 미합중국 특허 제3,298,789호의 장치로 에틸 셀룰로오스막은 적혈구가 시약 패드로 유입되는 것을 막는다. 유사하게는 미합중국 특허 제 3,630,957호의 방수 필름은 적혈구 세포의 유입을 방지한다. 상기 두 경우에 측정전 적혈구 세포의 잠정적인 방해물 제거하기 위해 세척하거나 문지를 필요가 있다.

따라서, 반사각을 측정하게 될 반사각 조각으로부터 과량의 액체를 제거할 필요가 없는, 혈액과 같은 착색액체 중에서 검체의 검출을 위한 시스템의 필요성이 요구되고 있다.

본 발명의 신규의 방법, 조성물 및 장치는 유체가 매트릭스를 통과할 때 매트릭스의 반사각 변화시에 활성화된 신호형성 시스템 및 반사각 측정장치를 함유하는 친수성 다공성 매트릭스로 구성되는 진단 분석법을 제공한다. 상기 방법은 장치내에 존재하고 적혈구와 같은 큰 입자들을 여과제거하는 매트릭스에 시료, 즉 전혈을 가하는 것으로 구성된다. 신호형성 시스템은 매트릭스의 반사각을 더욱 변화시키는 생성물을 형성하고, 변화는 시료중의 검체의 존재와 관련이 있다.

예시적인 진단 분석 시스템은 전혈 중의 글루코오스를 결정하는 것인데, 그러한 결정은 혈액으로부터 방해없이 수행되고, 어려움에 있는 복잡한 프로토콜을 사용하지 않는다.

#### [시약 원소]

본 발명은 글루코오스, 특히 효소 생성물로서 과산화수소의 제조시에 얻어진 효소 기질을 함유하는 검체의 결정을 위한 장치를 작동하기 위해 믿을 만하고 쉽게 사용할 수 있는 개량된 빠르고 간단한 방법학을 제공한다. 이 방법은 매트릭스를 포함시키기에 충분한 소량의 전혈을 다공성 매트릭스에 가하는 단계를 포함한다. 매트릭스에 부딪히는 것을 신호형성 시스템 중의 하나 또는 그 이상의 시

약들인데, 이들 시약은 매트릭스의 반사각의 양을 최초로 변화시키는 생성물을 생성하게 된다. 대표적으로 매트릭스는 혈액이 사용될 때 반사각-측정장치에 존재한다. 액체 시료는 매트릭스를 통과하고 측정 표면에서 반사각의 최초 변화를 일으킨다. 그 다음 측정은 시료 중의 검체의 양으로 반응 생성물의 형성의 결과로서 측정 표면의 반사각 또는 매트릭스에서의 반사각의 다른 변화와 관련을 갖도록 반사각의 최초 변화 후에 한번 또는 그 이상 수행된다.

혈액의 측정, 특히 글루코오스의 측정을 위해, 대표적으로 전혈이 분석 매질로서 사용된다. 매트릭스는 과산화수소를 생성하는 산화제 효소를 함유한다. 또한, 매트릭스에 함유된 것을 두 번째 효소, 특히 퍼옥시다제 및 퍼옥시다제와 결합하여 광 흡수 물질을 생성하는 연료 시스템일 것이다. 광 흡수 물질은 반사각 신호를 변화시킨다. 전혈에 대한 측정은 헤마토크리트 및 혈액 산화에 의해 유발된 배경 장애를 제거하는데 사용된 한 파장에서 측정함과 더불어, 그 결과치에 영향을 줄 수 있는 다른 파장에서 측정된다.

매트릭스 및 매트릭스내에 함유된 신호를 형성하는 시스템으로 이루어진 시약 원소가 사용된다. 시약 원소는 특정 분야를 위해 다른 성분들을 포함할 수 있다. 방법은 전처리(항 응고제로 임의의 처리되는 것을 제외)없이 소량의 혈액을 매트릭스에 공급할 필요가 있다. 측정 시간은 유체가 매트릭스를 통과할 때 매트릭스의 반사각의 변화를 자동적으로 검출하는 장치에 의하여 활성화된다. 그 다음 반응 생성물 형성의 결과로서 미리 결정된 시간 기간에 걸쳐서의 반사각의 변화는 시료중의 검체의 양과 관련이 있다.

관련된 본 발명의 제1성분은 불활성 다공 매트릭스와 신호 생성 시스템의 성분들을 포함하는 패드형상의 시약 원소이며, 상기 시스템은 다공성 매트릭스의 구멍속에 침지되는 광 흡수 반응 생성물을 제조하기 위해 검체와 반응할 수 있다. 신호-형성 시스템은 매트릭스를 통해 액체의 흐름을 별로 방해하지 않는다.

반사각 측정에 도움을 주기 위해, 매트릭스가 실질적으로 부드럽고 편평한 적어도 한 면을 갖는 것이 바람직하다. 통상적으로 매트릭스는 적어도 하나의 부드럽고 편평한 면을 갖는 얇은 시이트로 제조될 것이다. 사용할 때, 분석될 액체 시료는 시이트의 한 면에 가해지고 존재하는 어떤 분석화합물은 모세관, 삼기, 중력 효과 및/또는 확산 활동에 의해 시약 원소를 통과한다. 매트릭스내에 존재하는 신호형성 시스템의 성분들은 광 흡수 반응 생성물을 제공하기 위해 반응할 것이다. 입사광은 시료가 사용된 지역 이외의 지역에서 시약 원소와 부딪힌다. 광은 반사광 산란으로서 원소의 표면으로부터 반사된다. 이러한 산란광은, 예를 들면 반사각 스펙트로포토미터의 검출기에 의해 회수되고 측정된다. 반사광의 양은 통상적으로 시료중의 검체의 양이 역함수로서 시료중의 검체의 양과 관계가 있다.

#### [매트릭스]

시약 원소의 제조를 위해 필요한 각각의 성분들은 순서대로 제시될 것이고, 제1성분은 매트릭스 자체이다.

매트릭스는 시약들이 공유 결합 또는 비공유 결합할 수 있는 친수성 다공성 매트릭스일 것이다. 또한, 단백질의 생물학적 활성, 즉 효소의 효소학적 활성에 중대한 악영향을 미치지 않고 매트릭스에 단백질 조성물을 결합시킬 것이다. 단백질이 공유 결합되는 정도로 매트릭스는 공유 결합을 위한 활성 부위를 갖거나 또는 문헌에 공지된 방법에 의해 활성화될 수 있다. 매트릭스 조성물은 반사할 것이고, 매트릭스로부터 반사각에 실질적으로 영향을 미치지도록 공극 부피 또는 표면에 광-흡수 염료의 형성을 허락하도록 충분한 두께를 가질 것이다. 매트릭스는 필요한 구조 및 물리적인 성질을 제공하는 기질 위체 일정한 조성물 또는 피복일 수 있다.

매트릭스가 물에 적셔질 때에는 통상적으로 변형하지 않을 것이다. 즉, 그의 원래의 구조 및 크기를 유지할 것이다. 매트릭스는 흡수된 부피가 타당한 범위내, 즉, 약 50% 이하, 바람직하게는 10% 이하로 유지되도록 보정될 수 있어서 한정된 흡수력을 가질 것이다. 매트릭스는 일정한 구조 유지를 위해 필요한 충분한 수화강도(wet strength)를 가질 것이다. 매트릭스는 비공유 결합 시약들이 매트릭스의 표면 위에 비교적 일정하게 분포될 수 있게 한다.

매트릭스 표면의 예로서, 특히 전혈을 포함하는 시료와 더불어 폴리아미드가 있다. 단량체가 락탐 또는 디아민과 디카복실산의 결합인 경우에 폴리아미드는  $C_4$  내지  $C_8$ 의 단량체의 축합 중합체이다. 또한, 이에 필적할 수 있는 성질을 갖는 다른 중합체 조성물도 사용될 수 있다. 폴리아미드 조성물들은 매트릭스의 표면이 중성, 양성 또는 음성 및 중성, 염기성 또는 산성일 수 있도록 대전된 표면 위에 제공되는 다른 작용을 하는 그룹의 원소들을 유입시키기 위해 변형시킬 수 있다. 바람직한 표면은 '+' 전하를 띄고 있다.

전혈과 더불어 사용될 때, 바람직하게 다공성 매트릭스는 약 0.1 내지  $2.0\mu m$  범위의 평균 직경을 갖고, 더 바람직하게는 약 0.6 내지  $1.0\mu m$ 의 평균 직경을 갖는 구멍을 갖고 있다.

다공성 물질을 제조하는 바람직한 방법은, 비-직조한 섬유 중심 위에 친수성 중합체를 주조하는 것이다. 중심 섬유는 폴리에스테르 및 폴리아미드와 같은 규정된 외관 및 강도를 갖는 어떤 섬유물질일 수 있다. 다음에 상세히 기술할 광 흡수 반응 생성물을 형성할 시약은 매트릭스의 구멍내에 존재하나 매트릭스를 차단하지 않아서 분석될 혈액과 같은 분석매질의 액체부분이 매트릭스의 구멍을 통해 흐를 수 있다. 그러나, 에리트로사이트와 같은 입자들은 표면에 유지된다.

매트릭스는 실질적으로 반사체이므로 반사 뒷면 물질의 사용없이도 산란 반사각을 제공한다. 매트릭스에 가해진 입사광의, 바람직하게는 25%, 더 바람직하게는 50%가 반사되고 산란 반사광으로서 방출된다. 약  $0.5mm$ 이하의 두께를 갖는 매트릭스가 통상적으로 사용되나, 약 0.01 내지  $0.3mm$ 가 바람직하다. 특히 나일론 매트릭스용으로는 0.1 내지  $0.2mm$ 의 두께가 가장 바람직하다.

통상적으로, 매트릭스는 물리적 형태 및 강도를 부여하기 위해 지지체에 부착하나, 이는 반드시 필요한 것은 아니다. 제1도는 핸들에 시약 패드를 직접적으로 견고하게 부착시키는 접착제(13)에 의해

플라스틱 홀더(12)의 한쪽 끝에 얇은 친수성 매트릭스 패드(11)가 위치해 있는 본 발명의 한 실시예를 나타낸다. 구멍(14)은 시료가 시약 패드의 한면에 가해져 빛이 다른 면으로부터 반사될 수 있도록 시약 패드(11)가 부착된 지역의 플라스틱 홀더(12)에 존재한다.

시험되는 액체 시료는 패드(11)에 가해진다. 일반적으로, 시험되는 시료의 예인 혈액과 더불어 시약 패드는 표면적의 약  $10\text{mm}^2$  내지  $100\text{mm}^2$  정도, 특히  $10\text{mm}^2$  내지  $50\text{mm}^2$  인 것이고, 정상적으로 시료의  $5\sim 10\mu\text{l}$ 가 포화 이상이 될 수 있는 부피이다.

공기 문헌에서 산란 반사각 측정은 매트릭스 뒷면에 부착되거나 또는 위치한 반사 뒷면 물질을 사용하여 수행하였다. 이러한 뒷면 물질은 시약 원소 또는 반사 장치의 일부분으로서 본 발명을 수행동안 필요하지 않거나 또는 일반적으로 존재하지 않을 것이다.

제1도에서 알 수 있듯이, 지지체는 시료가 가해지는 지역의 반대쪽에서 시약 패드의 면으로부터 광 반사각을 측정할 동안 시료가 시약 패드의 한쪽면에 사용될 수 있도록 시약 패드(11)를 고정한다.

제2도는 빛이 시약 패드의 다른 면 위에서 반사되고 측정될 동안 핸들 뒷면의 구멍을 갖는 면에 시약이 사용되는 시스템을 제공한다. 설명된 것과 다른 구조들이 사용될 수도 있다. 패드는 여러 가지 형태 및 모양을 가질 수 있고, 본 발명 범위내로 제한을 받는다. 패드는 적어도 한 표면 및 통상적으로 두 표면 위에 부착될 수 있다.

친수성 층(시약원소)은 홀더, 클램프 또는 접착제와 같은 어떤 편리한 수단에 의해 지지체에 접촉될 수 있으나; 바람직한 방법으로 뒷면 물질에 접촉된다. 결합은 뒷면 표면이 친수성 층에 사용된 물질의 약간을 끌어들이기에 충분하도록 용융시키는 가열 방법, 또는 유사하게 뒷면에 친수성 시료패드를 용융시키는 마이크로파 또는 초음파 결합 방법에 의한 어떤 비반응성 접착제로 수행될 수 있다. 상기 결합은 측정이 수행되는 지역에 접착제가 필요치 않으므로 발생할 것 같지는 않지만 산란 반사각 측정을 실질적으로 방해하지는 않거나 그러한 반응을 측정할 수 있는 것이 중요하다. 예를 들면, 접착제(13)는 접착제가 칠해진 조각 내측에 구멍(14)을 먼저 펀칭하여 그 뒷면 조각(12)에 가해진 후에 시약 패드를 구멍(14)의 주변에 있는 접착제에 가함으로써 시약 패드(11)의 주변부가 뒷면 조각에 부착된다.

#### [화학 시약]

실질적으로 분석 매질이 흡수하는 파장과는 다른 파장에서 특징적으로 흡수하는 화합물을(직접 또는 간접적으로) 제조하기 위해 시료 중의 검체와 반응할 수 있는 어떤 신호형성 시스템이 사용될 수 있다.

폴리아미드 매트릭스는 미리 결정된 파장 범위에서 흡수되는 염료를 직접 또는 간접적으로 형성하기 위해 염료 중간체와 더욱 반응하는 생성물을 제조하는 것과 같은 방법으로 산소를 이용하는 산화제 효소와 기질(검체)을 반응시키는 반응을 수행하는데 특히 유용하다. 예를 들면, 산화제 효소는 기질을 산화시킬 수 있고 반응생성물로서 과산화수소를 생성한다. 그 다음 과산화수소는 염료 중간체 또는 전구물질의 산화 형태를 생성하기 위해 촉매화된 또는 비촉매화된 반응으로 염료 중간체 또는 전구물질과 반응할 수 있다. 이러한 산화된 물질은 착색된 생성물을 형성하거나 또는 2차 전구물질을 반응하여 최종 염료를 형성할 수 있다.

검체 및 대표적인 시약의 비제한적인 예로는 다음 표에 제시한 물질들을 포함한다 :

검체 및 시료 형태	시약
혈액, 혈청, 뇨 또는 다른 생물학적 유체 중의 글루코오스, 와인, 과일, 주스 또는 다른 착색된 수용성 유체, 전혈은 특히 바람직한 시료 형태이다.	글루코오스옥시다제, 퍼옥시다제 및 산소 수용체; 다음 산소 수용체 :
	0-디아니시딘 (1)
	0-톨루이딘
	0-톨리딘 (1), 벤지딘 (1)
	2,2'-아지노디-(3-에틸벤조티아졸린술폰산- (6)) (1)
	3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존 + N,N-디메틸아닐린 (1)
	페놀 + 4-아미노페나존 (1)
	황화 2,4-디클로로페놀 + 4-아미노페나존 (2)
	3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존 + 3-(디메틸아미노)벤조산 (3)
	2-메톡시-4-알릴페놀 (4)
4-아미노안티피러린 디메틸아닐린 (5)	

(1) 본 발명에 인용된 참고 문헌과 리히터리히 및 콜롬보 등의 임상화학 367 페이지에 보고됨.

(2) Analyst, 97(1972) 142-5

(3) Anal. Biochem. 105(1980) 389-397

(4) Anal. Biochem. 79(1977) 597-601

(5) Clinica Chemica Acta, 75, (1977) 387~391

상기 문헌 모두 참고 문헌으로 소개됨.

#### [분석 방법]

본 발명의 분석 방법은 시험되는 시료에 존재하는 검체의 양에 의존하는 산란 반사각에 의해 측정되는 흡수율의 변화에 의존한다. 이러한 변화는 시간에 따른 돌 또는 그 이상의 지점 사이에 있는 시험 시료의 흡수율 변화를 측정하여 결정될 수 있다.

분석의 첫번째 단계는 매트릭스에 시료를 적용하는 것일 것이다. 실질적으로, 분석은 다음과 같이 수행될 수 있다 :

검체를 함유하는 수용성 유체의 첫번째 시료를 얻는다. 혈액은 예를 들면 손가락에서 얻을 수 있다. 반사각이 이러한 유체 중의 측정될 지역중에서 매트릭스 위의 과도한 포화(즉, 약 5~10 $\mu$ l)는 시험 장치의 시약 원소 또는 원소들에 적용된다. 타이머의 연속적인 작동은 하기에서 명백하게 설명하는 것처럼 필요하지 않다(공지 문헌에 통상적으로 요구되는 것과 같다). 과량의 유체는 광 흡수에 의해 제거될 수 있으나 이러한 제거 또한 필요하지 않다. 시험장치는 대표적으로 시료의 사용전에 반사각에 의한 광 흡수율, 예를 들어 색상 강도를 측정하기 위한 기구에 설치된다. 흡수율은 시료의 사용 후 어떤 시점에서 측정된다. 본 발명에서, 흡수는 가시광선 뿐 아니라 적외선 및 자외선과 같은 가시광선 이외의 지역의 광선에도 관계가 있다.

흡수율의 측정으로부터 색상 현상율이 검체값에 의해 보정될 수 있다.

#### [측정 기구]

적당한 소프트웨어를 갖는 산란 반사각 스펙트로포토미터와 같은 적당한 기구는 어떤 시점에서 반사각을 자동적으로 읽고, 반사 변화율을 계산하고, 보정 인자를 사용하여 수용성 유체 중에서 검체의 값을 산출할 수 있다. 이러한 장치는 시약 패드가 첨부된 뒷면 물질(12)로 구성되는 본 발명의 시험 장치를 보여주는 제2도에 개략적으로 제시하였다. 광원(5), 예를 들면 고강도 광 방출 다이오드(LED)는 시약 패드 위에 광속의 빔을 투사한다. 이러한 광의 실질적인 부분(반응 생성물 없이 25% 이상, 바람직하게는 35% 이상, 더 바람직하게는 50% 이상)은 시약 패드로부터 산란적으로 반사되고, 광 검출기(6), 예를 들면 수용하는 빛에 비례하는 출력전류를 생산하는 광전 변환기에 의해 검출된다. 광원(5) 및/또는 검출기(6)는 바람직하다면 특정 파장의 빛을 발생하거나 또는 감응하기 위해 조절될 수 있다. 검출기(6)의 출력은 증폭기(7), 예를 들면 광전 변환기 전류를 전압으로 전환시키는 선형 직접 회로로 통과한다. 증폭기(7)의 출력은 트랙 및 홀드회로(8)로 공급될 수 있다. 이것은 증폭기(7)로부터 아날로그 전압을 추적 또는 전달하고, 마이크로프로세서(20)로부터 시작할 때 그 시점의 규모로 전압을 차단 또는 유지시키는 선형/디지털 집적회로이다. 아날로그 대 디지털 변환기(19)는 트랙 및 홀드회로(8)로부터 아날로그 전압을 읽고, 예를 들면 마이크로프로세서(20)의 시작 시에 12비트의 2진수로 전환된다. 마이크로프로세서(20)는 디지털 집적회로일 수 있다. 이것은 다음 조절기능을 수행한다; 1) 전 시스템을 위한 시간 조절; 2) 아날로그/디지털 변환기(19)의 출력의 측정; 3) 프로그램 및 데이터 메모리(21)와 함께 특정 시간 간격으로 측정된 반사각에 해당하는 데이터 저장; 4) 저장된 반사각으로부터 검체값을 측정; 및 5) 디스플레이(22)로 검체 농도 데이터를 산출. 메모리(21)는 데이터 및 마이크로프로세서 작동 프로그램을 저장하는 디지털 집적회로일 수 있다. 통상적으로, 이것은 액정 또는 LED 디스플레이와 같은 가시 디스플레이나, 또한 테이퍼 프린터, 가청신호 등일 수 있다. 또한, 상기 기구는 스타트-스톱 스위치를 포함할 수 있고, 바람직하다면 시료 사용, 측정 등의 시간을 나타내기 위해 가청 또는 가시 시간 출력을 제공할 수 있다.

#### [반사각 전환]

본 발명에서 반사회로 그 자체는 시약 패드에 가해진 현탁액의 수용성 부분(즉, 혈액)이 반사각을 측정하는 표면으로 이동될 때 발생하는 반사각의 저하를 측정함으로써 타이밍을 초기화하는데 사용될 수 있다. 대표적으로, 측정장치는 회색을 띤 실질적으로 건조한 미반응 시약 조각으로부터 매우 짧은(대표적으로 약 0.2초) 반사율을 자동적으로 측정하는 '준비' 모드로 전환된다. 최초 측정은 통상적으로 분석될 유체가 매트릭스에 침투되기전에 수행되나, 반사율을 측정하는 것과는 다른 시약 원소의 위치에 가해진 후에 수행될 수 있다. 반사값은 대표적으로 메모리에 연속적인 값을 저장한 다음 각각의 값을 최초 반응하지 않은 값과 비교하여 마이크로프로세서에 의해 평가한다. 수용액의 시약 매트릭스를 통과할 때, 반사각의 저하는 측정시간 간격의 출발을 신호로 나타낸다. 반사각의 5~50%, 대표적으로 약 10%의 저하는 타이밍을 초기화하는데 사용될 수 있다. 이러한 간단한 방법에서, 사용자에 의한 활성화의 요구없이 측정이 수행되는 표면에 도달하는 분석 매질의 정확한 동시성 및 측정 서열의 개시를 얻을 수 있다. 본 발명에 제시된 전체 시스템은 특히 폴리야미드 매트릭스의 사용 및 글루코오스 및 생물학적으로 근원의 다른 물질과 같은 여러 가지 당의 농도를 결정하는데 이러한 매트릭스의 사용에 특히 관계가 있지만, 본 발명의 반사각 전환 특성을 이러한 매트릭스로 제한할 필요가 없다. 예를 들면, 반사각 전환에 사용된 매트릭스는 불용성 친수성 물질 및 어떤 다른 형태의 물질로 형성될 수 있다.

#### [글루코오스 분석에 대한 특정 적용]

적혈구의 존재하에 글루코오스 검출과 관련된 특정에는 더 상세하고 특히 유리하게 설명할 수 있도록 제시될 수 있다. 이것은 본 발명의 바람직한 구현을 나타내지만, 본 발명은 혈액 중의 글루코오스의 검출로 제한되지 않는다.

시약 원소를 형성하기 위한 폴리야미드 표면의 사용은 본 발명의 많은 바람직한 특성을 제공한다. 시약 원소가 친수성(즉, 시약 및 시료를 용이하게 취함)이고, 수화시 분해되지 않고(반사각 측정을 위해 편평한 표면을 제공하도록), 효소에 적합하고(우수한 단 안정성을 부여하도록), 막의 단위체적

당 제한된 시료 체적을 취하고(측정의 원하는 동적 범위를 결정하기 위해 필요한), 일정한 제조를 위해 충분히 수화 강도를 보여준다.

대표적인 배열에서, 상기 방법은 플라스틱 홀더 및 시약 원소(매트릭스와 결합된 신호형성 시스템을 갖는 매트릭스)로 구성되는 장치를 사용하여 수행된다. 시약 원소를 제조하는데 사용되는 바람직한 매트릭스는 나일론미세 여과막, 특히 비직조 폴리에스테르 섬유 중심에 주조된 나일론 -66으로부터 만든 막이다. 이러한 부류의 여러 가지 나일론 미세 여과막은 0.1 내지 3.0 $\mu$ 의 평균 구멍 크기를 갖는 폴올트라하인필트레이션주식회사에 의해 상업적으로 제조되었다. 이러한 물질들은 물에 노출시 기계적 강도 및 유연성, 치수 안정성을 가질 뿐 아니라 급속한 수화 성질을 갖는다.

나일론의 특정 화학 구조의 여러가지 변화가 가능하다. 이들은 대전된 말단 그룹(Pall Ultrafine Filtration Corporation; 'Pall'에 의해 상품명 Ultipore로 시판됨)을 갖는 비기능성 나일론 -66을 포함한다. 음전하가 pH 6이상에서 우세한 반면, 양전하는 pH 6 이하에서 우세하다. 다른 막에서, 나일론은 막이 형성되기 전에 다른 성질들을 갖는 막을 제공하기 위해 작용한다. 카르복시 그룹과 함께 작용화된 나일론은 넓은 pH 범위에 걸쳐 마이너스로 충전된다(이 나일론은 Pall에 의해 카르복시딘으로서 시판됨), 또한 나일론은 넓은 pH 범위에 걸쳐 충전물의 약간의 변화를 발휘하도록 그의 표면위에 플러스로 대전된 그룹, 대표적으로 고밀도 4차 아민그룹과 작용할 수 있다(이 나일론은 Pall에 의해 Posidyne으로서 시판됨). 이러한 물질들은 본 발명의 수행을 위해 특히 적합하다. 단백질(Pall에 의해 Biodyne Immuno Affinity membranes로서 시판됨)의 공유 결합 비유동을 위해 계획한 반응성 작용 그룹을 갖는 막을 사용하는 것이 가능하다. 이러한 물질들은 시약으로서 사용된 효소와 같은 공유 결합으로 부착된 단백질에 사용될 수 있다. 모든 이러한 물질들이 유용하지만 그의 표면위에 플러스로 대전된 그룹의 높은 밀도를 갖는 나일론은 건조한 시약 패드로 형성될 때 시약의 가장 우수한 안정성을 제공한다. 비작용화된 나일론은 차선의 안정성을 차선의 카르복실화된 나일론에 제공한다.

바람직한 결과는 전혈과 더불어 사용할 때 약 0.2~2.0 $\mu$ m, 바람직하게는 약 0.5~1.2 $\mu$ m, 가장 바람직하게는 약 0.8 $\mu$ m의 공극 크기로 얻을 수 있다.

시약 원소가 조립된 핸들의 형태는 핸들이 시료에 의해 시약 원소의 한쪽면에 접근할 수 있고, 반사각이 측정되는 입사광에 의해 시약 원소의 다른 면에 접근할 수 있는 한 비교적 중요하지 않다. 또한, 핸들은 광시스템에 기록되도록 흡수 측정장치 속에 시약 원소의 유입을 돕는다. 적당한 핸들의 한 예로는 3M 465 또는 Y 9460 전이 접착제가 사용되는 미라르(mylar) 또는 다른 플라스틱 조각이다. 구멍이 전이 접착제와 플라스틱 내측으로 펀치된다. 그 다음 시약 또는 후에 가해질 시약들을 함유하는 시약 원소, 대표적으로 얇은 패드의 형태는 핸들 및 전이 접착제를 통해 펀치된 구멍 주변의 지역에서 핸들에 견고하게 부착하도록 전이 접착제에 의해 핸들에 부착된다. 이러한 장치는 시약 패드(11)가 접착제(13)에 의해 미라르 핸들(12)에 부착되어 있음을 보여주는 제1도에 설명하였다. 구멍(14)은 시약패드의 다른 면에 접근이 제한되지 않을 동안 시약 패드(11)의 한 면 위에 시료 또는 입사광의 접근을 허락한다. 시약 패드 및 핸들의 모든 치수는 광원 및 반사된 광 검출기에 가까운 위치에서 반사각 측정기구 속으로 시약 패드가 밀접하게 위치하도록 선택될 수 있다.

나일론 매트릭스가 시약 패드를 형성하기 위해 선택되어 규정된 두께로 사용된다면, 시료가 가해져 광 반사각의 측정되는 지역의 어떤 방향에서 측정하여도 6mm 이하인 홀더에 의해 지지되는 시약 패드를 갖는 것이 바람직하다. 크게 지지되지 않은 지역은 표면으로부터 반사각의 측정이 역영향을 미치도록 막에 불충분한 치수 안정성을 제공하는 경향이 있다. 제1도에 제시된 시약 조각에 있는 5mm 직경 구멍(14)은 상당히 만족스럽게 작동한다.

적어도 2mm의 직경이 제조, 시료 사용 및 광 반사각 측정을 용이하게 하기 위해, 바람직하지만 이러한 구멍의 최소 직경을 특히 제한할 필요는 없다.

많은 염료가 지시약으로서 사용될 수 있지만 시료의 성질에 따라 선택될 것이다. 분석 매질로서 전혈 또는 다른 분석 매질과 더불어 분석되는 용액 중의 다른 오염물질과 더불어 적혈구가 빛을 흡수하는 파장과는 다른 파장을 흡수하는 염료를 선택할 필요가 있다. 효소 면역 분석에서 퍼옥시다제 값을 결정하는 착색 현상을 위해 적당한 것으로 상기에서 설명되었지만, MBTH-DMAB 염료 쌍(3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존 히드로콜로라이드 및 3-디메틸아미노벤조산)은 시판되는 글루코오스 측정 시약으로 결코 사용되지 않았다. 이러한 염료 쌍은 벤지딘 유도체와 같은 글루코오스 측정을 위해 사용된 전통적인 염료와 비교함으로써 증가된 효소 안정성 및 더 큰 동적 범위를 제공한다. 더욱더, MBTH-DMAB 염료 쌍은 대부분의 벤지딘 유도체의 특성인 발암물질이 아니다.

글루코오스 측정에 사용할 수 있는 다른 염료 쌍은 AAP-CTA(4-아미노안티피렌 및 크로모트로프산) 쌍이다. 이러한 쌍이 MBTH-DMAB처럼 넓은 동적 범위로서 제공되지 않지만, 글루코오스를 측정할 때 본 발명의 실행에 사용하기 안정하고 적당하다. 또한, AAP-CTA 염료 쌍은 더 폭넓게 사용된 벤지딘 염료보다 확장된 동적 범위 및 더 큰 효소활성 안정성을 제공한다.

MBTH-DAMB 쌍의 사용은 단일 보정 인자를 갖는 혈액의 산화도 및 헤마토그리트의 보정을 허락한다. 더 대표적으로 사용된 벤지딘 염료는 이러한 보정을 허락하지 않는다. 염료는 대략적으로 635nm에서 흡수되나, 그보다 큰 700nm의 범위에서 흡수되지 않는 발색단을 형성한다. 파장(± 약 10nm) 측정에 있어서의 약간의 편차는 허용된다. 700nm에서 헤마토크리트 및 산화도 모두는 혈액 색상을 측정할 수 있다. 더욱더, 빛 방출다이오드(LED)는 635nm 및 700nm에서의 측정을 상업적으로 가능하게 하므로 장치의 대량 생산을 단순화한다. 상기에 제시된 바람직한 막 구멍 크기 및 헤마토크리트와 산화 행동 모두에 시약제제를 사용함으로써, 단일 700nm 파장에서 측정함으로써 보정할 수 있다.

2개의 추가 조건은 폴리아미드 매트릭스 위에 글루코오스 옥시다제/퍼옥시다제 제제를 위한 특정 안정성 및 장기간의 보존기간을 제공하기 위한 것이다. 이들은 3.8 내지 5.0, 바람직하게는 약 3.8 내지 4.3, 가장 바람직하게는 약 4.0의 pH를 사용하고, 시약을 매트릭스에 가하기 위한 진한 완충계를 사용한다. 가장 효과적인 완충계는 효과적인 5~15%의 농도와 더불어 구연산 완충 용액 10중량%인 것으로 발견되었다. 이것은 시약들이 매트릭스에 대해 사용되는 용액의 무게/부피 퍼센트이다. 다른

완충제는 같은 몰 기초 위에서 사용될 수 있다. 더 큰 안정성은 사용 용액의 낮은 pH, 바람직하게는 약 pH 4, MBTH-DMAB 염료계 및 대략적으로 500~1000U/ml의 더 높은 효소 농도를 사용하여 달성되었다.

신호형성 시스템의 나머지를 형성하는 MBTH-DMAB 시약 및 효소 시스템을 제조하는데, 제시된 값 이하가 우수한 결과를 제공하지만 정확한 부피 및 비를 유지할 필요가 없다. 글루코오스옥시다제가 약 27~54부피%의 용액으로 존재하고, 퍼옥시다제가 약 2.7~5.4mg/ml의 농도로 존재하고, MBTH가 약 4~8mg/ml의 농도로 존재하고, DMAB가 약 8~16mg/ml의 농도로 존재할 때, 시약은 매트릭스 패드에 의해 즉시 흡수된다. DMAB-MBTH 무게비는 (1~4) : 1, 바람직하게는 약 (1.5~2.5) : 1, 가장 바람직하게는 약 2 : 1의 범위에서 바람직하게 유지된다.

시약 원소의 기본적인 제조기술들은 잘 알려져 있고 정립되어 있다. 막 그 자체는 특히, 바람직한 구현예로서 나일론 막이 선택될 때 강하고 안정하다. 단지 2개의 용액들이 시약을 사용하기 위해 필요하고, 이러한 용액들은 모두 즉시 제제될 수 있고 안정하다. 일반적으로 첫번째는 염료 성분들을 함유하고, 두번째 효소를 함유한다. MBTH-DMAB 염료 쌍이 사용될 때, 예를 들면 각각의 염료들은 수용성 유기 용매, 대표적으로 아세토니트릴과 물의 1 : 1 혼합물에 용해된다. 매트릭스는 용액속에 침지되고, 과량의 액체는 흡인제거되고, 그 다음 매트릭스는 대표적으로 50~60°C에서 10~20분 동안 제거된다. 그 다음, 염료를 함유하는 매트릭스는 효소를 함유하는 수용액 속에 침지된다. 대표적인 제제는 어떤 바람직한 완충제, 방부제, 안정제 등 뿐만 아니라 퍼옥시다제 및 글루코오스옥시다제를 함유할 것이다. 그 다음 매트릭스는 과량의 액체를 제거하기 위해 흡인되고, 사용 전에 건조된다. 글루코오스 시약의 대표적인 제제는 다음과 같다:

#### [염료 침액]

다음 성분을 합친다 :

40mg MBTH, 80mg DMAB, 5ml 아세토니트릴, 및, 5ml 물

모든 고체가 용해될 때까지 교반하고, 유리판 또는 다른 편평한 표면 위에 따른다. 포지된 막(Pall Co.)의 조각을 침액시키고, 과량의 액체를 흡인제거하고, 56°C에서 15분간 건조시킨다.

#### [효소 침액]

다음 성분을 합친다 :

6ml 물, 10mg EDTA, 2 나트륨염, 200mg 폴리펩, 저밀도, <시그마', 0.668g 구연산나트륨, 0.523g 구연산, 2.0ml 물에 용해된 6wt% 간트레즈 AN-139 <GAF', 30mg 양고추냉이 퍼옥시다제, 100단위/mg, 및 3.0ml, 글루코오스옥시다제, 2000단위/ml.

모든 고체가 용해될 때까지 교반하고, 유리판 또는 다른 편평한 표면 위에 따른다. 염료로 사전에 침지된 막의 조각을 침지시키고, 과량의 액체를 흡인제거하고, 56°C에서 15분간 건조시킨다.

최소한의 반사각 측정을 위해 사용된 전자장치는 광원, 반사된 광 검출기, 증폭기, 아날로그 대 디지털 변환기, 메모리 및 프로그램을 갖춘 마이크로프로세서 및 디스플레이 장치를 포함한다.

대표적으로, 광원은 빛 방출 다이오드(LED)로 구성된다. 또한, 2개의 다른 파장을 측정할 수 있는 다색성 광원 및 광 검출기를 사용하는 것이 가능하지만, 바람직한 장치는 2개의 다른 파장의 빛을 방출할 수 있는 2개의 LED 광원 또는 단일 다이오드를 포함할 것이다. 본 명세서에서 바람직한 것으로서 제시된 빛의 파장을 만드는데 통상적으로 이용할 수 있는 LED는 635nm에서 최대 방출값을 갖는 Hewlett Packard HLMP-1340 및 700nm에서 협소대역 최대 방출값을 갖는 Hewlett Packard QEMT-1045를 포함한다. 적합하게 상업적으로 이용할 수 있는 광 검출기는 Hamamatsu 5874-18K 및 Litronix BPX-65를 포함한다.

측정은 다른 방법을 통해 수행할 수 있지만, 다음 방법에 의해 바람직한 결과를 제공한다. 측정은 개시한 후 특정 간격으로 광 개시체에 의해 수행된다. 635nm LED는 반사각 전환에 의해 나타난 바와 같이 출발시간 후 대략적으로 20초에 시작하는 간단한 측정시간 간격 동안에만 작동된다. 이러한 측정은 높은 글루코오스의 값이 시료 중에 존재함을 나타낸다면 30초간 측정이 수행되고, 이는 정확도를 증가시키기 위해 최종 계산에 사용된다. 대표적으로, 높은 값은 약 250mg/dl에서 시작하는 것으로 고려된다. 배경은 측정 기간의 시작 후 약 15초 동안에 수행된 700nm 측정으로 보정되었다.

광 검출기로부터의 측정은 대략적인 LED가 활성화될 동안 주로 1초 이하의 간격에 걸쳐 적분된다. 그 다음, 처음의 반사각 측정은 신호가 증폭되고 디지털 신호로 전환된 후 마이크로프로세서에 의해 수행된 계산에 사용된다. 여러개의 마이크로프로세서가 계산을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 록웰 인터내셔널(Rockwell International)사에 의해 제조된 A/M 65 단일 보ورد 마이크로컴퓨터는 만족할만한 것으로 입증되었다.

본 발명의 방법 및 장치들은 사용자에게 대한 최소한의 작동조작으로 매우 간단한 절차에 의해 이용할 수 있게 한다. 사용할 때에 시약 조각은 조각내의 구멍이 검출 시스템의 렌즈를 통해 기록도록 검출기내에 설치된다. 제거할 수 있는 캡 또는 다른 커버는 주변 광으로부터 조립체를 차폐하도록 렌즈 및 조각 위에 설치된다. 그 다음, 측정 순서는 Rdry 측정이라 불리워지는 반응하지 않은 시약 패드로부터 반사광의 측정을 수행하기 위해 마이크로컴퓨터를 활성화하는 측정장치의 버튼을 누름으로써 개시된다. 그 다음, 캡은 제거되고, 시약 패드가 렌즈 및 측정장치와 함께 작동되는 동안 혈액 샘플을 시약 패드에 가한다. 시약 조각은 조각을 최소화하기 위해 렌즈와 더불어 기록계의 왼쪽에 있는 것이 바람직하다. 기구는 매트릭스 및 반사된 광을 통과하는 시료가 반대면 위에서 측정될 때 반사각의 감소에 의해 혈액 또는 다른 시료의 사용을 민감하게 할 수 있다. 반사각의 감소는 본 명세서의 다른 부분에 상세히 설명된 타이밍 순서를 개시한다. 커버는 시료를 가한 후 15초내에 교환되어야 하지만, 이러한 시간은 측정되는 시료의 형태에 의존할 수 있다. 시험 결과는 대표적으로, 혈액 글루코오스 시료가 측정될 때 혈액을 가한 후에 대략 30초 동안에 표시되지만, 20초 반응은

250mg/dl 이하의 글루코오스 농도를 갖는 글루코오스 시료에는 20초간의 반응만으로도 가능하다. 다른 시료가 측정된다면, 결과를 표시하기 위한 시간은 다를 수 있으나, 이는 선택된 시약, 시료의 특성으로부터 용이하게 결정될 수 있다.

특히 정확한 글루코오스 값(또는 측정되는 다른 검체)의 평가는 배경전류, 즉 배경 보정을 수행하기 위해 시약 패드로부터 반사된 빛이 없고 동력이 없는 광 검출기로부터의 전류를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 값은 본 명세서의 바람직한 구현에 따라 제조된 특정 기구에 의한 2~3개월 기간에 걸친 실험으로 변하지 않는다는 것이 입증되었고, 컴퓨터 메모리속에 일정한 것으로서 이러한 배경 측정을 프로그램하는 것이 가능하다. 그러나, 순서를 약간 변경시키는 것에 의한 각각의 분석을 통해 이러한 값을 더 정확한 결과를 얻을 수 있다. 변경된 순서에서, 시약 조각이 설치되기 전에 뚜껑을 밀폐하고 계기를 가동할 것으로, 배경 전류는 측정될 것이다. 그 다음, 시험 조각은 커버가 밀폐된 계기속에 삽입하고, R<sub>dry</sub> 측정을 수행하고, 상기 제시한 순서를 계속 실시한다. 이러한 변경된 순서와 더불어 배경 전류는 계기의 수명을 통해 안정할 필요는 없고, 그 결과 더 정확한 결과를 제공한다.

글루코오스 분석에서 얻어진 계산을 위해 필요한 처음 데이터는 상기 제시된 바와 같이 배경 반사율로서 보고된 배경 전류, R<sub>b</sub> ; 상기 제시된 반응하지 않은 시험 조각의 측정값, R<sub>dry</sub> ; 및 최종점 측정값이다. 상기 제시된 바람직한 구현에 의하면, 최종점은 특히 안정하지 않으므로 혈액의 최초 적용을 시간적으로 정밀하게 수행되어야 한다. 그러나, 본 발명에 제시된 계기는 자동적으로 이러한 타이밍을 수행한다. 250mg/dl 이하의 글루코오스 농도를 위해 적당하게 안정한 최종점은 20초만에 도달하여 최종 반사각 R<sub>20</sub> 이 얻어진다. 450mg/dl까지의 글루코오스 농도를 위해서는 30-초 반사각 측정(R<sub>30</sub>)으로 충분하다. 본 발명에 제시된 시스템이 글루코오스 800mg/dl까지의 우수한 미분을 수행하지만 측정은 450mg/dl 이상에서 얼마간 노이즈가 있고, 부정확하지만 중대한 문제를 일으킬만큼 그렇게 크지 않다. 더 긴 반응시간은 글루코오스 농도의 높은 값을 위해 더 적합한 측정을 제공할 것이다.

2중의 파장 측정을 위한 700nm 반사각 측정은 대표적으로 15초(R<sub>15</sub>)동안 수행된다. 이 시간에 의해, 혈액은 완전히 포화된 시약 패드를 가질 것이다. 15초를 지나서 염료 반응은 계속되고, 700nm 측정에 의해서 소량부분에도 민감하게 측정된다. 따라서, 700nm 신호에 의한 염료 흡수가 불리하므로 15초를 지난 측정은 계산에서 무시된다.

상기 제시된 처음 데이터는 더 쉽게 반사각 측정을 관찰할 수 있는 글루코오스 농도에 비례하는 매개변수를 계산하기 위해 측정된다. 바람직하다면, 투과 스펙트로스코피(비어의 법칙)에 의해 관찰된 흡수와 검체 농도 사이의 관계와 유사한 반사각의 로드 전환을 사용할 수 있다. 특히 반사각 스펙트로스코피를 위해 유도된 쿠벨카-몬크(Kubelka-Monk) 방정식의 단순화가 특히 유용한 것으로 입증되었다. 여기서 변위 K/S는 다음 방정식 (1)에 의해 정의된 K/S와 더불어 검체 농도와 관계가 있다.

$$K/S-t = (1-R*t)^2 / (2 * R*t) \quad (1)$$

R\*t는 특정의 최종점 시간 t에서 주어진 반사율이고, 방정식 (2)에 의해 제시된 입사광 비임의 흡수 분율이고, 여기서 R<sub>t</sub>는 최종점 반사각 R<sub>20</sub> 또는 R<sub>30</sub>이다.

$$R*t = (R_t - R_b) / (R_{dry} - R_b) \quad (2)$$

R\*t는 반사되지 않은 광(R<sub>b</sub>)을 위한 0으로부터 최종 반사된 광(R<sub>dry</sub>)을 위한 1로 변한다. 계산에서 반사율의 사용은 이들 성분들이 각각의 R<sub>dry</sub> 및 R<sub>b</sub> 측정과 더불어 조절되므로 안정성이 높은 광원으로서 설계된 계기를 크게 단순화하고, 검출회로가 필요없게 된다.

단일 파장 측정을 위해, K/S는 20초(K/S-20) 또는 30초(K/S-30)에서 계산될 수 있다. YSI(Yellow Springs Instruments) 글루코오스 측정에 대한 이러한 매개변수와 관계된 보정 곡선은 다음 방정식 3에 나타낸 3차 다항방정식에 의해 정확하게 제시할 수 있다.

$$YSI = a_0 + a_1(K/S) + a_2(K/S)^2 + a_3(K/S)^3 \quad (3)$$

이러한 다항의 계수들은 다음 표 1에 제시되었다.

[표 1]

단일 파장 보정 곡선의 3차 다항을 위한 계수

	K/S-20	K/S-30
a <sub>0</sub>	-55.75	-55.25
a <sub>1</sub>	0.1632	0.1334
a <sub>2</sub>	-5.765×10 <sup>-5</sup>	-2.241×10 <sup>-5</sup>
a <sub>3</sub>	2.58×10 <sup>-8</sup>	1.20×10 <sup>-8</sup>

바람직한 구현으로서 측정되는 단일 화학종은 MBTH-DMAB 인다민 염료이고, 분석되는 착물 매트릭스는 0.8μ 포지딘 막 위에 분포된 전혈이다. 식품의 비파괴 분석을 위한 적외선 근처 스펙트럼의 사용에 관한 검토와 참고 문헌[CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18(3) 203-30



(1983)]에 제시된 실험 결과의 검토는  $0D\lambda_a$ 가 결정되는 성분의 최대 흡수에 해당하는 파장의 광 밀도인 경우에 광 밀도 차이  $\lambda_0D((\lambda_a-\lambda_b))$ 의 측정에 기초를 둔 기기의 사용차이이고, 같은 성분이 상당히 흡수되지 않는 경우에  $\lambda_0D_b$ 는 파장의 광 밀도이다.

이중의 파장 측정을 위한 연산은 단일 파장 측정보다 더 복잡할 필요가 있으나 훨씬 더 강력하다. 700nm 측정에 의해 사용된 제1차 보정은 혈액으로 인한 배경 색상의 단순한 가감이다. 이러한 보정을 수행하기 위해, 혈액 색상으로 인한 635nm 및 700nm에서의 흡수율 사이의 관계는 혈액 색상의 넓은 범위에 걸쳐 0mg/dl 글루코오스와 더불어 혈액 시료를 측정하여 결정할 수 있다. 색상 범위는 헤마토크리트를 변환시켜 구성되고, 대략적인 선형 관계들이 관찰되었다. 이러한 선으로부터 700nm에서의 K/S-15는 635nm에서 K/S-30과 동등하도록 정상화되었다. 이러한 관계는 K/S-15n이 700nm에서 정상화된 K/S-15인 경우에 다음 방정식 4로 나타내었다.

$$K/S-15n = (K/S-15 \times 1.54) - 0.133 \quad (4)$$

정상화된 700nm 신호와 635nm 신호의 동등함은 글루코오스가 0인 경우에만 해당됨을 주목해야 한다. 보정곡선이 유도된 표현은 다음 방정식 5 및 6으로 정의하였다.

$$K/S-20/15 = (K/S-20) - (K/S-15n) \quad (5)$$

$$K/S-30/15 = (K/S-30) - (K/S-15n) \quad (6)$$

이러한 곡선은 K/S의 4차 항이 부가된 방정식 3과 유사한 4차 다항 방정식에 의해 가장 적합화될 수 있다. 이러한 방정식을 위한 컴퓨터-적합 계수들은 다음 표 2에 제시하였다.

[표 2]

2중의 파장 보정 곡선의 4차 다항을 위한 계수

	K/S--20/15	K/S--30/15
$a_0$	-0.1388	1.099
$a_1$	0.1064	0.05235
$a_2$	$6.259 \times 10^{-5}$	$1.229 \times 10^{-4}$
$a_3$	$-6.12 \times 10^{-8}$	$-5.83 \times 10^{-8}$
$a_4$	$3.21 \times 10^{-11}$	$1.30 \times 10^{-11}$

또한, 크로마토그래프 효과로 인한 실수를 제거하기 위한 2차 보정이 수행되었다. 낮은 헤마토크리트 시료는 같은 635nm 측정을 한 높은 헤마토크리트 시료와 비교하여 낮은 700nm 측정값을 갖는다. 헤마토크리트 및 글루코오스의 넓은 농도 범위에 걸쳐서 (K/S-30)/(K/S-15)의 비를 K/S-30에 대해 도시될 때, 그래프 위에 얻어진 선은 크로마토그래피 효과를 발휘하는 시료(곡선 위)와 발휘하지 않는 시료(곡선 아래) 사이의 경계선을 나타낸다. 곡선 위의 시료에 대한 K/S-30은 동일한 (K/S-30)/(K/S-15)의 곡선 위의 점에 해당하도록 측정을 평가하여 보정하였다.

상기 보고한 보정 인자들은 단일 기구 및 제한된 다수의 시약제제에 적합하도록 만들어진 테일러이다. 상기 알고리즘은 상기 제시된 것과 같은 방법으로 각각의 기구 및 시약을 위해 적절화할 수 있다.

요약하면, 본 발명의 시스템은 조작자의 활동을 최소화하고, 공지 기술의 반사각 측정 방법에 대해 여러가지 장점들을 제공한다. 예를 들면, 혈액에서 글루코오스 결정을 위한 종전의 방법과 비교할 때, 여러가지 명백한 장점이 있다. 첫째로, 얇은 시약 패드를 포화시키기 위해 필요한 시료의 양이 작다(대표적으로 5~10 $\mu$ l). 둘째로, 필요한 조작시간은 단지 얇은 친수성 층에 시료를 가해 커버를 덮는데 필요하다(대표적으로 4~7초). 셋째로, 연속적인 타이밍 시작이 필요없다. 넷째로, 전혈을 사용할 수 있다. 방법은 적혈구가 없는 시료의 어떤 분리 또는 이용을 필요로 하지 않고, 한편 다른 진하게 착색된 시료와 더불어 사용할 수 있다.

그밖의 여러가지 명백하지 않은 장점들도 전혈과 더불어 본 발명의 수행 결과가 발생한다. 일반적으로, 수용액(즉, 혈액)은 반사각 측정을 위해 사용되지 않은 표면, 막의 반대편 위에 액체 층을 제공하기 위해 친수성 막을 통과할 것이다. 그러나, 명백하게 매트릭스와 더불어 혈액내의 적혈구 및 단백질의 상호작용 때문에 혈액은 매트릭스의 반대편 위에서 반사각 측정을 방해하는 다공성 매트릭스를 투과하는 과량의 액체를 갖지 않는 수화폴리아미드 매트릭스인 것으로 발견되었다.

더욱더, 본 발명에 사용된 얇은 막들은 빛을 투과하여 반사각 측정장치에 단지 약한 신호를 제공하도록 수화될 때에만 필요하다. 일반적으로 이전의 기술들은 반사층이 충분한 빛을 반사하기 위해 매트릭스 아래에 필요함을 지적하였다. 다른 경우에 흰색 패드는 색상 측정 전에 모두 필요가 없다. 사실 본 발명은 입사광이 매트릭스를 침투할 때 시약 원소 위의 빛 흡수 표면과 더불어 수행된다. 시약 원소 위의 빛-흡수 표면을 사용하여 두개의 다른 파장에서 반사각을 측정하여 결합되고, 매트릭스로부터 과량의 액체를 제거하지 않아도 반사각 측정을 가능하게 하므로 종래 기술에 필요하던 단계를 제거할 수 있다.

지금까지 본 발명을 설명하였지만, 이는 단지 본 발명을 설명할 목적으로 제시한 것이며, 특정 제한

이 없는한 본 발명을 한정하지 않는 다음의 특정 실시예를 참고로 더 잘 설명될 것이다.

[실시예 1]

[재생성]

남자 혈액 시료(JG, 헤마토크리트=45)를 표 3-5에 제시한 재생성 데이터를 얻기 위해 사용하였다.

[표 3]

단일 파장 MPX 시스템의 재생성

YSI (mg/dL)	평균 (mg/dL)		S. D. (mg/dL)		% C. V.	
	20초	30초	20초	30초	20초	30초
25	23.1	23.0	2.1	2.04	9.1	9.0
55	53.3	53.2	3.19	3.32	6.0	6.3
101	101	101	3.0	3.3	3.0	3.3
326	326.6	327	13.3	9.8	4.1	3.0
501		503		17.1		3.4
690		675		28		4.15
810		813		37		4.5

[표 4]

이중 파장 MPX 시스템의 재생성

YSI (mg/dL)	평균 (mg/dL)		S. D. (mg/dL)		% C. V.	
	20초	30초	20초	30초	20초	30초
25	25	27	1.34	1.55	5.4	5.7
55	55	57.4	2.58	2.62	4.7	4.6
101	101	101.5	2.55	2.18	2.5	2.1
326	332	330	15.0	7.1	4.5	2.1
501		505		21.3		4.2
690		687		22.8		3.3
810		817		30.4		3.7

[표 5]

3.0mm 구경의 재생성

YSI (mg/dl)	% C. V.	
	4.7 <del>mm</del>	3.0 <del>mm</del>
55~100	4.8	4.9
300	3.0	5.0
600	3.8	5.5
avg.	3.9	5.1

혈액을 세분하여 25~800mg/dl의 범위의 글루코오스로 희석하였다. 20번의 결정은 500조각 시료(Lot FJ4-49B) 중에서 임의로 선택된 조각들로부터 각각의 글루코오스 시험값에서 수행하였다. 이러한 연구의 결과들은 다음 결론을 제공한다 :

1. 단일 대 이중 파장

30초 이중 결과에 대한 평균 C.V.는 30초 단일 파장에 대해 3.7% 대 4.8%이고, 25~810mg/dl의 글루코오스 범위를 통해 23% 증가하였다. 25~326mg/dl 글루코오스 범위에서는 C.V.에서 33% 향상되었다. 여기서 C.V.는 대부분의 사용 범위에서 상당한 개량, 즉 5.4% 내지 3.6% 감소하였다. 20초 이중 파장 측정은 25~325mg/dl 범위에서 단일 파장 측정과 비교하여 C.V.에서 유사한 개량을 제공하였다(표 3 및 4).

## 2. 이중 파장, 20 대 30초 결과치

25~100mg/dl 범위에서 20초 결과치에 대한 평균 C.V.는 30초 측정값인 4.2% 대 4.1%와 거의 동일하다. 그러나, 326mg/dl에서 30초 측정값은 2.1%의 C.V.를 가지며, 20초 측정값은 4.5%의 C.V.를 갖는다. K/S-20 응답 곡선에서 알 수 있는 것처럼, 곡선은 250mg/dl 이상에서 급격하게 감소하기 시작한다. 이것은 20초 결과치에 대한 300 이상의 글루코오스 값에서 재생성을 빈약하게 한다. 이러한 재생 데이터로부터 20초 결과치에 대한 컷오프값은 100 내지 326mg/dl 사이에 있다. 250mg/dl의 컷오프는 후에 실시예 II에 제시한 회수 연구의 결과치로부터 결정된다.

## 3. 구멍크기

작은 광 구멍 크기, 3.0mm US. 5-0분을 연구하였다. 10-복제를 사용하는 최초 실험, 손을 적신 디스크 시료는 광 디스탐과 더불어 쉽게 기록되기 때문에 3.0mm 구멍과 더불어 증가된 C.V.를 보여준다. 그러나, 기계로 만든 롤 막을 사용할 때 큰 구멍, 4.7mm의 평균 C.V.(표 5)는 3.9% US.이고, 3.0mm 구멍의 평균 C.V.는 5.1%이다. 이러한 C.V.의 30% 증가는 아마도 하기에 설명한 것처럼 롤 막 로트(roll membrane lot)의 고르지 않은 표면에 기인한다.

[실시예 2]

[회수]

Yellow Spring Instrument Model 23A 글루코오스 분석기(미합중국 오하이오 옐로우 스프링스 소재의 Yellow Spring Instrument(YSI사 제품)를 사용하는 통상적인 공지 방법에 대해 본 방법(MPX)을 비교하기 위해 36명 수혈자로부터 혈액을 시험하였다. 수혈자는 남자 및 여자를 동등하게 배분하였고, 35 내지 55% 헤마토크리트 범위를 갖는다. 혈액 시료는 항원으로서 리튬 헤파린과 더불어 수집되어 30시간내에 사용된다. 각각의 혈액시료는 세분화되어, 0~700mg/dl의 범위내의 152 시료를 얻기 위해 글루코오스로 희석된다. 각각의 시료는 전체 304개의 데이터 포인트에 대해 반복하여 시험된다.

응답 곡선들은 이들 데이터로부터 구성되고, 그 다음 글루코오스 값은 적당한 방정식(표 1 및 2)으로부터 계산된다. 그 다음, 이러한 MPX 글루코오스 값은 산란도를 얻기 위해 YSI 값에 대해 도시하였다.

## MPX 시스템의 비교

20초 및 30초 측정시간 모두를 위해 이중 파장 산란도보다 단일 파장 산란도에서 육안으로 보아도 더 산란되어 있다. 20초 측정은 250mg/dl 이상에서 더 산란되나, 30초 측정은 글루코오스 값이  $\geq 500$ mg/dl일 때까지 폭넓게 산란되지 않는다.

이러한 산란도들은 여러 가지 글루코오스 범위에서 YSI로부터 변화를 결정하여 정량화하였다. 그 결과는 다음과 같다 :

[표 6]

회수 데이터로부터 MPX의 정확도

파장	측정시간 (초)	S.D. (mg/dl)	다음 범위를 위한 C.V.			
		0~50	50~250	250~450	450~70	
단일	20	$\pm 5.6$	7.2	14.5	-	
단일	30	$\pm 6.9$	7.1	8.8	10.2	
이중	20	$\pm 2.3$	5.3	12.8	-	
이중	30	$\pm 2.19$	5.5	5.8	8.4	

주 : 이들은 내부 방법 C.V.s.이다

a. 이중 파장 시스템은 단일 파장 시스템보다 30% 낮은 범위인 C.V.s.을 제공한다.

b. 0-50mg/dl의 단일 파장 시스템은 이중 파장 측정을 위한 S.D.가 단지  $\pm 2.2$ mg/dl인 반면에  $\pm 6$ -7mg/dl의 S.D.을 보여준다.

c. 30초 MPX 측정을 위한 절단은 250mg/dl이다. 50-250mg/dl 범위를 위해 20- 및 30초 모두는 유사한 내부방법 C.V.s.(단일 파장용으로는 대략적으로 7%, 이중 파장용으로는 5.5%)를 제공한다. 그러나, 250-450mg/dl에서 단일 파장용으로는 14.5%, 이중 파장용으로는 12.8%에 대해 20초 측정값보다 2배 이상의 내부 방법 C.V.s.을 갖는다.

d. 30초 측정은 단일 및 이중파장측정(10.2 및 8.4%의 C.V.s.)에 대해 450mg/dl 이상에서 모두 불안정하다.

결론적으로, 2개의 MPX 시스템은 0-450mg/dl 범위에서 적정 정량을 제공한다.

### 1. MPX 30 이중 파장

이러한 이중 파장 시스템은 50-450mg/dl(표 7)의 범위를 위해 11.3%(C.V.) 및 0-50mg/dl을 위해  $\pm 4.4$ mg/dl의 95%의 허용한계(YSI의 2S.D. 내인 측정의 가능성으로서 정의된)를 갖는 30초 측정 시간을 제공한다.

### 2. MPX 30/20 이중 파장

이러한 이중 파장 시스템은 0-250mg/dl 범위내에서 20초 측정 시간 및 250-450 범위를 위해 30초 시간을 제공한다. 95%의 신뢰한계는 MPX 30 이중 시스템(표 7)에서 50-450mg/dl을 위한 11.1%(C.V.) 및 0-50mg/dl을 위한  $\pm 4.6$ mg/dl(S.D.)와 거의 동일하다.

[표 7]

MPX, GlucoScan Plus 및 Accu-Chek vG\* 시약 조각을 위한 95% 신뢰한계의 비교

측정 범위	MPX 단일 파장		MPX 이중 파장	
	20초	30초	20초	30초
mg/dl				
0~50	11.2mg/dl	13.8mg/dl	4.6mg/dl	4.4mg/dl
50~250	14.4%	14.2%	10.6%	11.0%
250~450	—	17.6%	—	11.6%
77~405	GlucoScan Plus (Drexler Clinical) 15.9%			
77~405	Accu-Chek bG (Drexler Clinical) 10.7%			
50~450	MPX 20/30 Dual Hybrid 11.1%			
50~450	MPX 30 Dual 11.3%			

\* MPX에 대한 허용 한계는 YSI로부터 얻었다. GlucoScan Plus 및 Accu-Chek bG에 대한 허용 한계를 회귀방정식 대 보정의 작은 차로 인한 편차를 제거한 YSI로부터 얻었다.

[실시예 3]

[안정성]

적정 안정성으로 수행된 대부분의 벤치-스케일 작업은 손으로 처리한 0.8 $\mu$  포지던 막 디스크를 사용하여 완성하였다. 특정 염료/효소 제제는 사전에 만들었다.

### 1. 실온 안정성

이 연구는 실리카 겔 건조기상에서 18~20°C로 저장한 0.8 $\mu$  포지던 막 시약의 감응에 대한 변화를 차트로 표시하기 위해 시도하였다. 2.5달 후 실온 시료의 감응 대 5°C에 저장된 샘플의 감응에 대해 측정된 바로는 현저한 변화가 없었다. 각각의 산란도는 0~450mg/dl의 글루코오스 범위를 나타낸다.

### 2. 37°C에서 안정성

RT 연구와 동일한 시약을 사용하여 37°C 안정성 연구를 수행하였다. 37°C에서 처리한 시약 및 접촉제와 함께 접촉제 없이 처리한 조각의 RT 시약의 글루코오스 값의 차이를 시간에 걸쳐 도시하였다. 손으로 만든 조각의 빈약한 재생성으로 인한 데이터가 약간 벗어나지만 안정성은 이들이 접촉제와 함께 또는 없이 처리되었든간에 우수하다.

### 3. 56°C에서 안정성

8개 시료의 5 내지 6일 안정성 연구는 디스크 막 위에 다르게 제조한 다른 제제(표 8)를 사용하여 수행하였다. 낮은 글루코오스 시험값(80~100mg/dl)을 위해, 평균 글루코오스 값은 가장 높게는 9.55%로부터 3.4%까지 저하된다. 가장 높은 시험값(280~300mg/dl)에서, 평균 3.4%까지 감소된 글루코오스 측정값은 가장 크게 10.0% 감소된다.

[표 8]

pH=4.0의 안정성, 56°C에서 5 내지 6일간 처리된 8개의 포지던 디스크 시약 제제

시료 번호	% 차이 (56°C 대 RT 시료)	
	YSI (80~100mg/dl)	YSI (280~320mg/dl)
FJ22B	-6.25	5.4
FJ27A	-4.0	-5.14
FJ28B	-2.4	-5.3
FJ30H	-9.55	-10.0
FJ31C	4.43	-1.24
FJ36	-3.2	-8.5
FJ48B*	-3.0	0.0
GM48A*	-3.0	-2.5
8개의 평균	-3.4	-3.4

이러한 2개의 시료들은 효소 및 염료의 정규 농도 2배를 포함한다.

19일간에 걸쳐 이러한 막의 56°C이 응력화에 대한 연구는 접착제와 함께 또는 접착제 없이 처리된 조각에 대해 주요한 차이가 없음을 보여준다. 두 경우에, 글루코오스 값의 19일 감소는 낮은 시험값 (80~100) 및 300mg/dl에서 <15%이다. 효소 및 염료의 정규 농도 2배를 갖는 손으로 처리한 0.8μ 포지던 막을 사용하는 다른 56°C 연구를 완성하였다. 같은 체형의 2개의 별개의 제제를 만들고, 14 일간에 걸쳐 안정성을 측정하였다. 두 연구의 평균 결과를 도시하였고, 그 결과 변화는 높고 낮은 글루코오스 시험값 모두에서 14일간에 걸쳐 ±100% 범위내이었다. 이들 데이터는 특히 안정한 이들 제제를 보여준다.

[실시에 4]

[시료 크기]

MPX용으로 요구되는 시료 크기는 표 9에 나타내었다.

[표 9]

측정시의 시료 크기의 효과

시료 크기 (μl)	이중 포장					단일 포장				
	평균					평균				
낮은 글루코오스=56										
3	41	50	39	31	40	31	42	30	19	30
4	44	49	49	49	48	41	45	44	45	44
5	54	48	49	51	50	50	49	48	49	49
10	48	48	50	47	48	54	53	56	55	54
20	49	49	49	50	49	55	57	58	60	58
높은 글루코오스=360										
3	301	260	276	286	280	274	232	244	260	252
4	383	378	367	341	367	361	356	342	318	344
5	398	402	382	370	388	378	387	366	351	370
10	364	362	378	368	368	356	358	379	369	366
20	375	370	380	378	376	380	382	389	385	384

표에 보고된 부피는 마이크로 피펫을 사용하여 제1도에 제시된 시약 패드로 이송된다. 손가락 스틱

으로부터의 혈액이 조각에 사용될 때 전체 시료는 이송될 수 없고, 그 결과 여기에 보고된 부피들은 분석용 손가락으로부터 압착하는데 필요한 전체 시료 크기를 나타내지 않는다.  $3\mu\text{l}$  시료는 시약 패드 주변을 완전히 덮기 위해 필요한 최소한의 양이다. 이것은 시약 패드를 완전히 포화시키기 위해 충분한 시료를 제공하지 않으므로 MPX는 낮은 결과치를 제공하게 된다.  $5\mu\text{l}$  시료는 완전히 충분하지만,  $4\mu\text{l}$  시료는 시약패드를 충분히 포화시키지 못한다.  $10\mu\text{l}$  시료는 큰 맑은 방울이고,  $20\mu\text{l}$  시료는 매우 큰 방울로서 피펫으로부터 혈액이 샘플링을 위해 사용될 때 사용된다.

낮은 글루코오스 농도에서, 단일 파장 결과치는 이중의 파장 측정을 사용하여 완전히 제거된 시료 크기에 약간 의존한다. 단일 파장에 대한 이러한 의존을 수용할 수 있지만 바람직하지는 않다.

[실시에 5]

[재생성]

상기 제시한 실험 측정값은 데이터당 통상적으로 2, 3 또는 4번의 반복 결정을 항상 수행하였다. 이러한 세트는 항상 높은 헤마토크리트 또는 높은 산소값과 더불어 시료용으로 알맞는 것으로 제시되었다. C.V.s.는 5% 이하이다. 그러므로 재생성은 매우 우수함을 나타낸다.

본 발명은 현재 상업적으로 이용되거나 또는 문헌에 제시된 시스템에 대해 많은 장점을 제공한다. 프로토타입은 간단하고, 거의 복잡한 기술이 필요없고, 조작에러가 비교적 없다. 분석은 빠르게 수행할 수 있고, 값이 싸고, 비교적 해롭지 않은 시약을 사용하고, 가정용으로 사용할 수 있다. 사용자들은 치료 유지와 관련하여 이해하고 사용할 수 있는 결과치를 얻을 수 있다. 추가로, 시약은 얻어진 결과가 장기간 동안 믿을 수 있도록 긴 보존기간을 갖는다. 장치는 간단하고 믿을만하고 실질적으로 자동이다.

본 명세서에 특히 나타낸 모든 특허 및 다른 간행물들은 본 발명이 관련된 분야의 통상의 지식을 가진 자의 수준으로 제시되었고, 각각 참고문헌으로 소개되었다.

본 발명은 상기에서 충분히 설명되었고, 또한 다음 청구범위에 한정된 본 발명의 정신 또는 범위로 부터 벗어남이 없이 많은 변경 및 변화가 수행될 수 있음은 이 분야의 당업자에게 명백할 것이다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1

하나의 막과, 빛-흡수 염료 생성물을 생성하도록 글루코오스와 반응하고 상기 막에 결속되며 상기 염료 생성물의 양을 상기 막의 표면으로부터의 반사율 측정에 의해 결정하는 하나의 신호 생성 시스템을 사용하여 혈액 시료 중의 글루코오스를 결정하기 위한 방법에 있어서, 적혈구를 제거하기에 충분한 크기의 구멍을 갖고 신호 생성 시스템을 포함하는 단일 반사층인 친수성 다공 막의 제1표면에 미측정 전혈 샘플을 가하는 단계와, 과잉의 시료나 적혈구를 상기 제1표면으로 제거하지 않고, 상기 시료가 가해지는 상기 막의 제1표면과는 다른 제2표면에서 반사율을 측정하는 단계, 및 상기 반사율 측정으로부터 시료 내부에 있는 글루코오스의 농도를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신호 형성 시스템은 적혈구가 흡수되는 파장과는 다른 파장에서 빛을 흡수하는 염료 생성물을 생성하며, 상기 반사율 측정은 두개의 다른 파장에서 수행되며, 상기 측정 중 하나의 측정은 적혈구로 인한 배경 흡수를 보정하기 위한 측정이고 다른 하나의 측정은 상기 염료 생성물의 흡수 파장에서 측정되는 것을 특징으로 하는 혈액시료 중의 글루코오스 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 두개의 파장은 635 및 700nm인 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신호 생성 시스템은 글루코오스 옥시다제, 퍼옥시다제, 표시기로서 약 1 : 1 내지 약 4 : 1의 중량비로 3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존/3-(디메틸아미노)벤조산 및, pH 3.8 내지 5.0을 제공하는 완충제를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 완충제는 상기 막내에서 건조된 5~15중량비의 완충제를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 막은 폴리아미드를 포함하며, 상기 신호 생성 시스템은 글루코오스 옥시다제, 퍼옥시다제 및, 3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존/3-(디메틸아미노)벤조산을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 구멍은 약 0.1 내지  $3.0\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 막은 폴리아미드로 구성되고 약 0.01 내지 약 0.5 $\mu\text{m}$ 의 두께를 갖는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 막은 폴리아미드로 구성되고 상기 제2표면내에 10 $\mu\text{l}$  이하의 구멍 체적을 갖는 것을 특징으로 하는 혈액 시료 중의 글루코오스 결정 방법.

**청구항 10**

글루코오스 옥시다제, 퍼옥시다제 및, 염료 표시기를 포함하고 반응 염료 생성물을 형성하도록 글루코오스와 반응하는 신호 생성 시스템에 결속되어 있으며 적혈구를 여과해내는 단일 반사층인 친수성 다공성 매트릭스를 포함하는 시약 원소상의 적용 위치에 전혈 시료를 가하는 단계와, 상기 적용 위치와는 다른 상기 막상의 측정 위치로 상기 시료가 이동할 수 있게 허용하는 단계와, 배양 기간의 타이밍을 초기화하도록 상기 측정 위치에서의 시료의 반사율 감소에 대한 상기 측정 위치에서의 반사율을 모니터링하는 단계, 및 상기 시료내의 글루코오스의 양을 결정하도록 형성된 염료 생성물의 측정으로서 배양 기간 중 상기 측정 위치에서의 반사율 변화를 결정하는 단계로 구성되는 일련의 단계들을 포함하는 글루코오스 결정 방법으로서, 상기 측정 위치에서의 모든 반사율 측정은 상기 적용 위치로부터 과잉의 시료나 적혈구를 제거함이 없이 수행되며, 상기 하나 이상의 측정은 빛이 상기 염료 생성물에 의해 흡수되는 파장에서 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코오스 결정 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 염료 표시기는 3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존/3-(디메틸아미노)벤조산인 것을 특징으로 하는 글루코오스 결정 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 친수성 막은 폴리아미드인 것을 특징으로 하는 글루코오스 결정 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 친수성 막은 양전하로 대전되어 있는 것을 특징으로 하는 글루코오스 결정 방법.

**청구항 14**

제10항에 있어서, 상기 시료내의 글루코오스의 양을 결정하는 단계는 상기 시료내의 간섭기 층으로 인한 상기 염료 생성물 흡수파장에서의 배경 흡수율에 대한 보정을 제공하는 제2파장에서의 반사 변화율을 결정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 글루코오스 결정 방법.

**청구항 15**

다공성 매트릭스내의 표면에 의해 시료가 가해져 그 시료가 다공성 매트릭스를 통해 이동되어 시료내에 검체가 존재할 때 그 검체와 반응하는 시약을 함유하는 다공성 매트릭스로부터 반사율을 측정하는 장치에 있어서, 하우징과, 상기 하우징 내부의 내측 챔버와, 상기 내측 챔버를 접근시키기 위한 수단으로서, 그 내측 챔버를 접근시킴으로써 상기 다공성 매트릭스가 접근 수단을 통해 상기 내측 챔버에 삽입되거나 그 내측 챔버로부터 제거되게 하는 내측 챔버 접근 수단과, 상기 접근 수단을 통해 외부 광이 상기 내측 챔버로 진입되는 것을 차단하기 위한 수단과, 상기 접근 수단을 통해 액체 샘플을 가하도록 접근할 수 있는 제1표면에 유지되는 상기 다공성 매트릭스를 상기 내측 챔버내에 유지하는 수단과, 상기 다공성 매트릭스가 상기 내측 챔버내에 유지될 때, 상기 다공성 매트릭스가 제1표면과는 다른 제2표면을 조명하는 수단과, 상기 조명 수단에 의해 비추어져, 상기 다공성 매트릭스가 내측 챔버내에 유지될 때 상기 다공성 매트릭스의 제2표면으로부터 반사되는 광의 세기를 검출하고, 그 세기와 관련된 출력을 생성하여 일련의 출력을 생성하는 광의 세기 검출 수단과, 상기 일련의 출력을 비교하는 수단과, 상기 유체 시료가 제2표면에 도달했는가를 표시하기에 충분한 예정된 차이값만큼 상기 출력이 감소했는가를 결정하는 수단을 포함하는 상기 출력 처리 제어 수단으로서, 상기 출력에 있어서의 예정된 감소값은 상기 유체 시료가 다공성 매트릭스에 최초로 가해진 시간을 결정함이 없이 제2타이밍 시간을 초기화한 후에, 예정된 시간에서 상기 표면으로부터 취해진 측정값인 타이밍 주기를 상기 제어 수단이 초기화시키게 되어 있는 출력 처리 제어 수단, 및 상기 측정값은 보고하는 수단을 포함하는 것을 특징으로 하는 반사율 측정 장치.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 장치는 상기 조명 수단, 검출 수단, 제어 수단 및 보고 수단에 작동가능하게 연결된 내장형 전기 동력 공급원을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 반사율 측정 장치.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 상기 조명 수단과 광 검출 수단은 상이한 파장의 두 광원과 단일의 광 검출기를 포함하거나, 다색 광원과 다른 파장의 광을 검출하도록 되어 있는 두개의 검출기를 포함하며, 상기 두 검출기 중 하나는 생성물의 흡수율을 측정하고 다른 하나는 배경 흡수율의 측정하는 것을 특징으로 하는 반사율 측정장치.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 광의 제1파장은 690 내지 710nm이고, 제2파장은 625 내지 645nm인 것을 특징

으로 하는 반사율 측정 장치.

#### 청구항 19

제15항에 있어서, 상기 제어 수단은 상기 다공성 매트릭스로부터 반사된 광 흡수율에서 측정된 배경 검출기의 전류를 수집하여 저장할 수도 있는 것을 특징으로 하는 반사율 측정 장치.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 장치는 동력 공급원을 더 포함하며; 상기 제어 수단은 동력이 검체 검출모드에 있는 상기 제어 수단으로 공급될 때 상기 검출 수단으로부터 판독된 일련의 반사율을 자동으로 수집하여 비교하는 수단과, 반사율에 있어서의 감소가 검출될 때 타이밍 회로를 초기화시키는 수단과, 상기 반사율의 감소후에 예정된 간격으로 반응물의 반사율을 수집하는 수단과, 상기 반응물 반사율로부터 분석될 액체내의 검체의 농도값을 연산하는 수단, 및 상기 값을 보고 수단으로 전송하는 수단을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 반사율 측정 장치.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 제어 수단은 검체 검출 모드 이전의 기본 반사율 모드에 있는 상기 제어 수단에 동력이 공급될 때 매트릭스로부터 기본 반사율을 수집하여 저장하는 수단과, 상기 제어 수단에 의한 상기 값의 연산 이전에 측정된 반응물 반사율로부터 상기 기본 반사율값을 감산하는 수단을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 반사율 측정 장치.

#### 청구항 22

적혈구를 차단하기에 충분한 크기를 갖는 단일 반사층인 불활성 다공질의 친수성 매트릭스와 광 흡수반응 생성물을 생성하도록 검체와 상호 반응이고, 액체 시료를 시약 원소에 가하기 이전에 상기 매트릭스의 구멍내에 스며들게 되는 시약 시스템을 포함하는 시약 원소의 제1표면으로부터 기본 반사율을 정량적으로 측정하는 단계와, 상기 시약 원소의 제2표면에 상기 액체 시료를 가하여 그 액체 시료가 제2표면으로부터 제1표면으로 이동시키는 단계와, 상기 제2표면으로부터 과잉의 시료나 시료의 부동 성분을 제거함이 없이, 상기 시약의 제1표면으로부터 반응물의 반사율을 정량적으로 측정하는 단계와, 간섭 물질에 의한 반응 생성물의 파장에서 배경 반사율을 보정하기 위해 상기 반응 생성물의 반사율을 측정하는데 사용된 광 파장과는 상이한, 간섭물질에 의해 반사된 광 파장을 사용하여 상기 시약 원소의 제1표면으로부터 간섭 물질의 반사율을 정량적으로 측정하는 단계, 및 상기 반사율 측정값으로부터 상기 검체의 농도를 나타내는 값을 연산하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 시료내의 검체 농도 결정 방법.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 매트릭스는 폴리아미드를 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 시료내의 검체 농도 결정 방법.

#### 청구항 24

제22항에 있어서, 상기 매트릭스내의 구멍의 평균 직경은 0.2 내지 1.0 $\mu\text{m}$ 이며, 상기 액체는 전혈인 것을 특징으로 하는 액체 시료내의 검체 농도 결정 방법.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 검체는 글루코오스이며, 상기 시약은 글루코오스와 반응시 광 흡수 반응 생성물을 생성하는 것을 특징으로 하는 액체 시료내의 검체 농도 결정 방법.

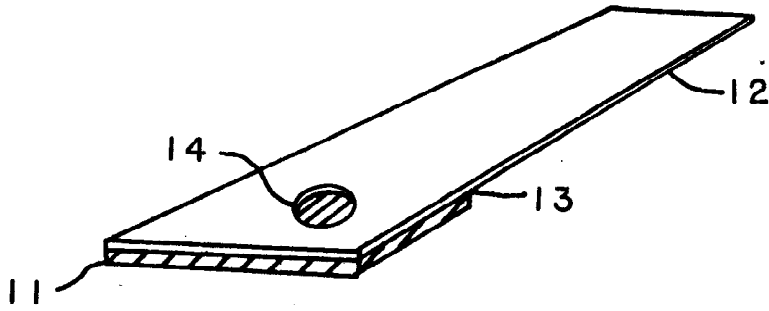
#### 청구항 26

검체가 반사율 측정 장치내에 위치한 다공성 반사율 측정 매트릭스내의 시약과 반응한 후 예정 시간 주기의 종점에서 반사율 측정장치내의 검체 측정을 수행하는 방법에 있어서, 검체에 함유된 유체 시료를 다공성 매트릭스의 제2표면에 가해, 그 시료가 모세관 작용에 의해서 상기 제1표면으로 이동하여 검체가 그 시료내에 존재할 때 다공성 매트릭스내의 시약과 반응하기 이전에 상기 다공성 매트릭스의 건조한 제1표면으로부터 제1반사율을 측정하는 단계와, 상기 시료를 상기 다공성 매트릭스의 제2표면에 가하는 단계와, 상기 시료가 상기 다공성 매트릭스에 가해진 후에 제1표면으로부터 추가의 반사율을 측정하는 단계와, 상기 제1표면에서 측정된 상기 추가의 반사율을 비교하는 단계와, 상기 시료가 상기 제1표면에 도달했음을 표시하는데 충분한 반사율의 감소가 측정되었을 때 예정 시간 주기를 초과하는 단계, 및 상기 샘플이 상기 다공성 매트릭스에 최초로 가해진 시간을 측정하지 않고 예정된 시간주기의 종점에서 반사율을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 검체 측정을 수행하는 방법.

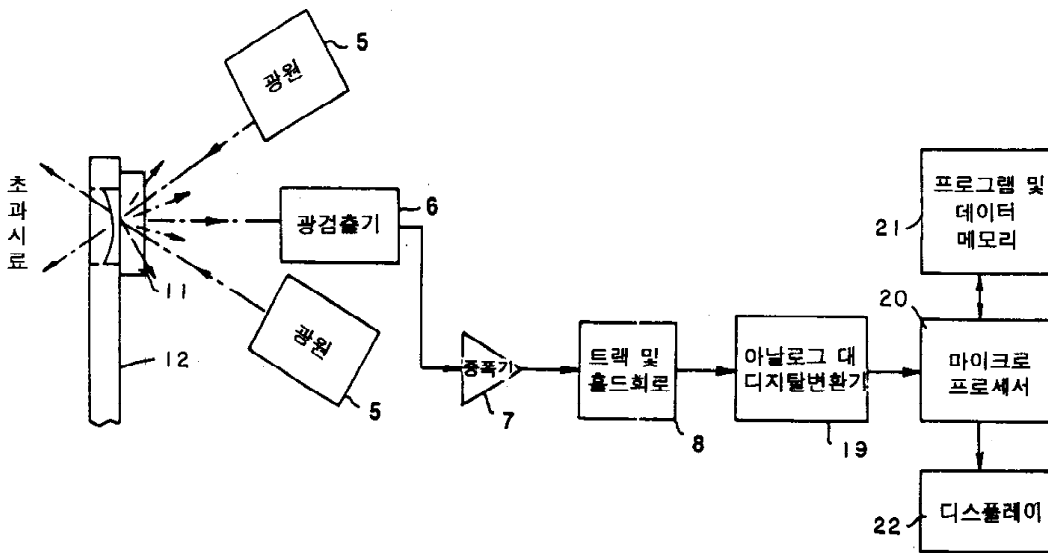
**도면**



도면1



도면2



도면3

