

가시 반사광을 이용한 임상화학 분석장치 개발의 기초연구

*유동주°, *정태화, **민홍기, ***허 용
 * : 한국과학기술연구원 유전공학연구소
 ** : 인천대학교 정보통신공학과
 *** : 명지대학교 전자공학과

A Study on Clinical Chemistry Analyzer Development by Using the Reflected Visible Light

*Dong-Joo Yoo°, *Tca Hwa Jung, ** Hong-Kee Min, *** Woong Huh
 * : Genetic Engineering Research Institute, KIST
 ** : Dept. of Information and Telemetering Engineering, Inchen University
 *** : Dept. of Electronics Engineering, Myoung Ji University

Abstract

In this paper, we study about reflectance photometer for measuring reflectance changes on reagent strip material after applying of a liquid sample. To obtain more accurate reflectance parameter, the strip loader and cassette is designed.

The system is designed to work with IBM personal computer. As the experimental results, reflectance level measured of korean standard color paper and shows a exponentially proportion to brightness of paper. A diagnostic strip for total protein is applied to our system and shows a good correlation in a physically protein concentration range.(up to 500 mg/dl)

1. 서 론

임상검사에서 주로 사용되는 기기는 AAS(Atomic Absorption Spectrophotometer)이다. 그밖에도 적외광도계, NMR Spectrometer 등 많은 분석기기가 사용되고 있다.^[1] 이러한 기기들의 사용 시약의 형태는 액체이며 시료의 보관 및 실험시 여러가지 조건에 맞추어 분석해야하는 단점이 있다. 이러한 분석시의 복잡함을 단순화하며 빠른 시간에 물질을 분석할수 있는 분석기기가 많은 사람들에게 의하여 연구되고 있다. 최근에는 액체시약이 아닌 고체 상태 시약을 이용하여 여러가지 항목을 분석할 수 있는 시험지가 개발되었다. 특히 기존에 노분석에서만 사용하던 시험지를 1970년대 부터 미국등 여러나라에서 혈액구성물질을 분석하기 위한 시험지가 개발되어 1980년 후반부터 시판되고 있다.^[2,3] 고체 상태 시험지를 분석방법으로는 시각에 의한 비교색도 분석과 시험지에서 반사되는 반사광을 감지하여 물질을 분석하는 방법으로 구분할 수 있다. 시각에 의한 것은 샘플을 시험지에 첨가하였을때 검체와 시험지 간에 화학적 반응에 의하여 특정 색상으로 변화된 색상을 구분하는 방법으로 주로 양성과 음성반응만을 판단하는데 사용된다. 반사광에 의한 방법은 기준광을 시험지에 조사하여 시료에서 반사되는 광과 기준광세기를 검출하여 검사체를 스펙트랄 영역에서 정량분석하는 방법이다.^[4,6] 그림 1은 반사광도계의 블럭다이어그램이며 동작원리는 공헌

으로부터 발광된 빛을 적외선 차단 필터를 사용하여 열외를 갖는 적외선을 차단한 후 간섭(interference) 필터를 사용하여 필요 분석파장대 통과한 후 glass optical fiber를 통하여 시험지에 조사한다. 이때 반사된 광을 glass optical fiber로 획득한 후 광센서로 검출한다. 검출된 광센서의 출력전류를 전류-전압 변환 앰프로 직류전압값으로 변환하여 전단 증폭후 디지털 변환하여 물질의 정량분석을 수행한다.

본 연구는 고체상태 시험지를 정량분석하기 위한 기초적인 실험으로 공학소자와 퍼스널 컴퓨터를 사용하여 반사광도계를 제작하였다. Reagent strip의 일정한 위치와 optical fiber의 발광부 및 수광부의 위치를 고정하기 위한 loader 와 cassette를 제작하였다. 조명 및 관측조건은 45° /수직으로 strip 표면에 대하여 45° 방향으로 조명하였다. Strip에서 반사된 광세기는 전압으로 변환

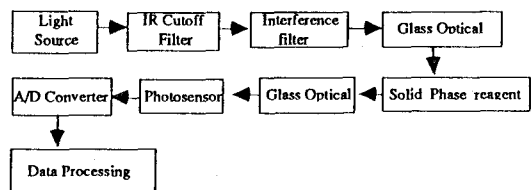


그림 1. 반사광도계의 블럭다이어그램
 Fig.1 Block diagram of reflectance photometer

하여 OP Amp를 사용하여 증폭후 A/D변환기로 디지털화하였다. A/D변환기의 분해능은 12비트이며 입력신호 범위는 0 - 1V로 하였다. 실험은 먼저 4가지의 diffuse reflectance용 표준판중 흰색에서 반사전압이 최대 1V로 하였으며, 이를 기준으로 하여 한국표준색표의 흰색에서 검은색까지의 명도 차이에 따른 17단계의 색상에 대한 반사값을 측정하였다. 또한 임상분석용 항목은 총 단백질 진단 시험지를 사용하였으며, 측정은 실온에서 하였다. 샘플은 일정한 농도차를 되도록 구성하였으며, 일정량의 샘플을 strip에 첨가하여 30초간격으로 반사값을 측정하였다.

2. 광원선택과 Optical Glass Fiber의 특성

임상분석시 주된 검사체는 혈액으로 대부분의 그 구성물질은 380-700nm사이의 가시선에서 특정스펙트랄을 흡수하는 특성을 갖는다. 이 영역에서 사용되는 광원은 텅스텐과 제논램프가 사용되는데 본 실험에서 사용한 텅스텐램프의 상관 색 온도(correlated color temperature)는 3000K이며 파장에따른 상대적인 분광광도는 그림2와 같다.

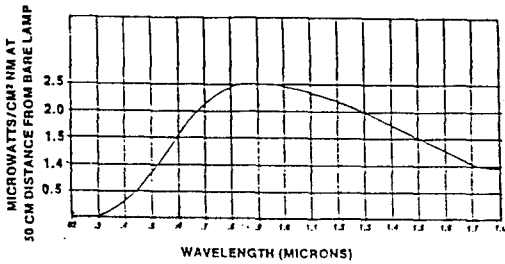


그림 2. 사용광원의파장에 따른 상대적인 스펙트랄 특성
Fig 2. Correlated spectral characteristics according to wavelength

발광파장은 가시선만을 통과하고 열원영역의 적외선을 차단하였으며, 각 파장에서 시험지의 색상에 대한 반사값을 검출하기 위하여 간섭 필터를 채용하였다. 간섭 필터는 단색광을 만드는 광학소자로서 표1은 통과대역및 전송특성을 나타낸다.

표 1. 간섭 필터 특성
Table 1. Characteristics of interference filter

Pass 영역(nm)	494.5-504.5	544-553	565.5-575.5	605.5 -616.5
bandwidth(nm)	10	9	10	11
peak파장(nm)	499.5	549	570.5	611
전송율(%)	57.5	59	60	59

Interference필터를 통과한 단색광을 시험지까지의 광 pass는 기존에는 optical mirror 및 렌즈를 사용하여 광을 전송하였는데 이는 숙련된 전문가에 의하여 수행해야하므로 광 전송을 사용자 임의대로 전송할 수 있는 glass optical fiber를 이용하였다. 그림3은 optical fiber에서 출력되는 광세기를 collimating하기 위한 플로브 구조이다.

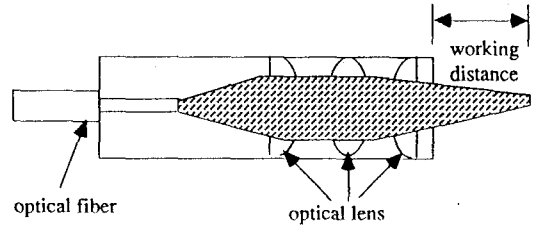


그림 3. 광을 collimating하기위한 플로브 형태
Fig 3. Collimating probe for light

기존에 사용되는 적분구를 사용하지 않고 optical fiber를 사용하였으며, fiber를 지지하기 위한 외부공 밀폐 및 optical fiber를 고정하기 위한 장치를 제작하였다. 장치의 개략적인 구조는 그림 4와 같다.

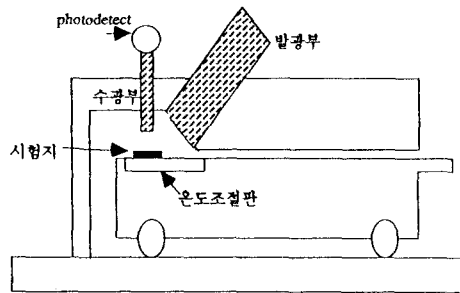


그림 4. 시험지 로더 및 지지대
Fig 4. Apparatus for supporting the fiber

수광부와 시험지와의 거리는 5mm이며 발광부는 플로브의 높이를 조절하여 집광하였다. 밀폐부의 재료는 알루미늄을 사용하였다. 시험지의 삽입 및 제거를 하기 위하여 밀부분에 로울러를 부착하였다. 조명 및 관측조건은 45°/수직으로 시험지면에 대하여 45° 방향으로 조명하여 수직방향의 반사광을 수광하였다.

3. 광검출부 및 앰프부

그림 5는 Optical fiber와 광센서와의 접속부분으로 광센서의 감지부분과 fiber 출력부를 최대한로 근접시켜 미소광 감지를 최대한로 하였다. 사용한 광센서는 실리콘 포토다이오드로 가시영역에서 높은 민감도를 나타낸다.

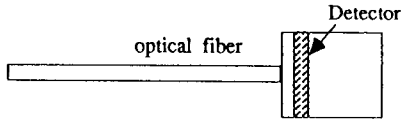


그림 5. Optical fiber를 사용한 광센서 입력형태
Fig 5. Detction shape of photosensor with optical fiber

그림 6은 사용한 포토다이오드의 스펙트럴 응답곡선이다.

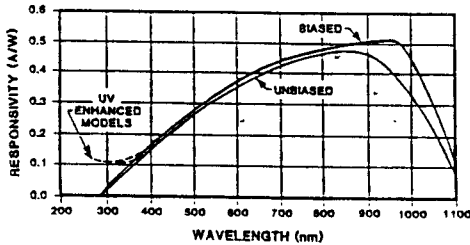


그림 6. 포토다이오드의 스펙트럴 응답곡선
Fig 6. Spectral response curve of photodiode

포토다이오드를 사용한 검출회로의 기본형은 zero bias 형, 역바이어스형, 전하증폭형으로 분류되며 그중 zero bias 형으로 구성하였다. 그림 7은 검출회로로 zero bias때문에 센서의 접합용량이 크게되어 고속동작은 불가능하지만 역전류의 영향이 적어 직선성이 좋은 잇점이 있다. 반사광을 감지하여 출력된 직류전압을 전압증폭하여 최대직류전압이 1V가 되도록 하였으며 A/D변환기를 통하여 디지털값으로 변환하였다. A/D변환기의 분해능은 12비트이며 입력전압의 범위는 0 - 1V로 하였다.

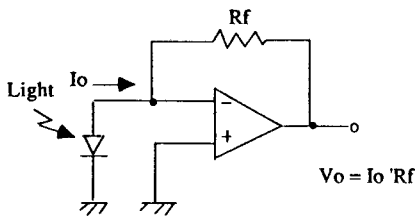


그림 7. Zero bias형 검출회로
Fig 7. Circuit of zero bias type

4. Diffuse Reflectance용 표준판 및 색표측정

고체상태 시험지를 사용하기 전에 Oriel사의 certified diffuse reflectance용 표준판 4가지중 white에서 최대 출력전압이 1V가 되도록 하여 30초간격으로 10회 측정하였다. 각 파장에서서 평균편차는 약 0.001이었다. 그림 8은 각 분석파장에서 표준판 (white(100%), gray(75%), gray(50%), black(0%))의 반사광을 측정한 그래프이다.

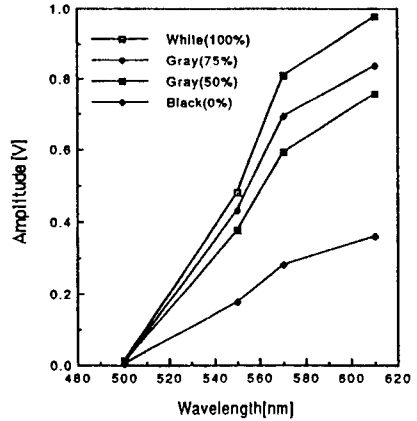


그림 8. 표준반사물질의 반사값 그래프
Fig 8. Graph of reflected light for standard reflectance materials

그림 9는 한국표준색채판의 무채색인 흰색에서 검은색까지 명도에 따른 17개의 색상을 간섭필터의 통과영역이 610nm에서 5회 측정한 그래프이다.

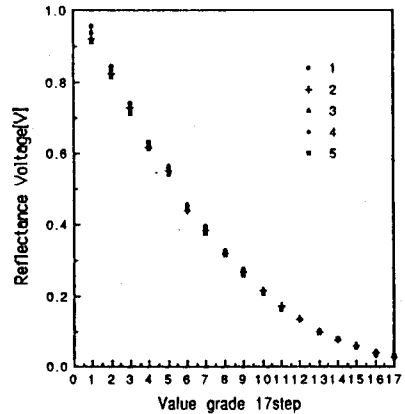


그림 9. 흰색에서 검은색의 명도 17단계 반사측정 그래프
Fig 9. Graph of reflected light for 17 step's brightness paper

그림 10은 여러 파장에서 단백질 검사용 시험지를 이용하여 시간에 따른 반사값을 측정한 그래프이다. 측정조건은 실온에서 30초간격으로 측정하였으며, 샘플량은 10ul이다. 측정한 샘플농도는 3가지 (0,100,500mg/dl)를 사용하였다.

실험결과는 610nm에서 농도에 비례하여 반사값이 뚜렷히 감소하였다. 그림 11은 단백질 진단용 시험지에서 시간에 따른 반사광의 변화를 나타낸 그래프이다. 샘플링 간격은 1분이며, 6분까지 측정하였다.

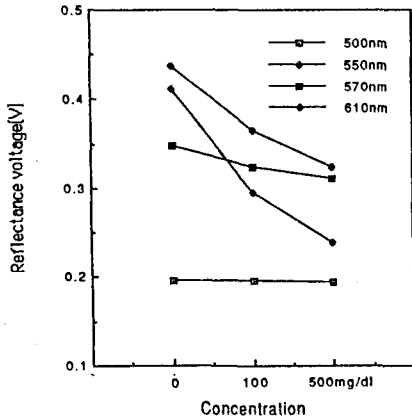


그림 10. 여러 파장에서 검사용 시험지를 측정한 그래프
Fig 10. Graph of reflected light for total protein assay

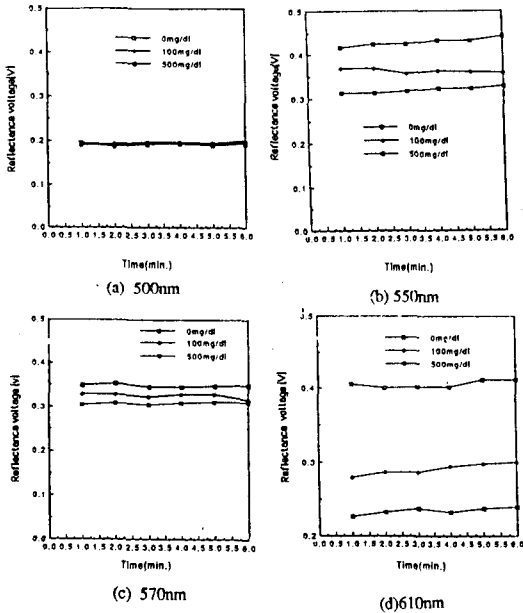


그림 11. 샘플링 타임(1분)일때 반사전압의 그래프
Fig 11. Graph of reflected light at sampling time (1min.)
(a) 500nm (b) 550nm (c) 570nm (d)610nm

5. 결 론

본 연구에서는 광학부품을 사용하여 퍼스널 컴퓨터에서 특정 물질에 대한 반사값을 측정하였다. 흰색 표준 반사 물질의 반사전압이 최대 1V로 하였으며, 이를 기준으로하여 한국 표준색표집에 흰색에서 검은색에 대한 측정 결과는 명도가 낮아짐에 따라 출력전압이 지수함수적 곡선 형태임을 알 수 있었으며, 또한 총단백질 검사 시험지를 사용하여 여러가지 농도 별로 실험한 결과는 검사체 농도의 증가에 따라 시험지의

스펙트랄 흡수 특성에 의하여 610nm에서 뚜렷히 낮아짐을 알 수 있었다. 따라서 추후 임상검사용 시험지의 항목증가에 따른 특정 파장에 대한 반사 특성에 대한 지속적인 연구와 임상분석에 많은 응용이 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Robert D. Braun "Introduction to instrumental analysis", McGRAW-HILL international edition, 1987
- 2) Willis E. H, Alfred Greenquist et al "Automated Instrumentation for Fluorescence Assays on Reagent Strips" Anal. Chem, 55, pp. 878-881,1983
- 3) Arthur Karmen, Richard Lent "Clinical Chemistry Testing with the Ames SERALYZER Dry Reagent System" The J. of Clin. Lab. Automat., Vol. 2, No. 4, pp. 284-296,1982
- 4) Okubo A."DryChemistry", 일본BME., Vol1, No.11,pp.852-857
- 5) William E. Neeley"Reflectance Photometer for Multilayer Dry Film Slides", Anal. Chem. Vol. 56, pp. 742-745,1984
- 6) John A. Lott, Elias Khabbaza"Haemoglobin analysis on whole blood by reflectance photometry", J. of Automat. Chem., Vol. 7, NO. 4, pp.197-200,1985