

# 건습시약 스트립을 사용한 임상화학분석장치 개발[ I ]

유동주\* · 정태화\* · 민홍기\*\* · 허 웅\*\*\*

= Abstract =

## Development of Clinical Chemistry Analyzer with the Dry Reagent Strip[ I ]

Dong-Joo Yoo\*, Tea Hwa Jung\*, Hong-Kee Min\*\*, Woong Huh\*\*\*

For quantitative measurement of reflected light from a clinical diagnostic strip, a prototype of reflectance photometer was designed. The strip loader and cassette were made to obtain more accurate reflectance parameters. The strip was illuminated at 45°C through optical fiber and the intensity of reflected light was determined at rectangular angle using a photodiode. The Kubelka-Munk coefficient and reflection optical density were determined at four different wavelengths(500,550,570 and 610nm) for blood glucose strip. For higher concentration than 300mg/dl about glucose, a saturation state of absorbance was observed at 500,550 and 570nm. The correlation between glucose concentration and parameters was the best at 610nm.

### 1. 서 론

1954년 L. T. Skeggs가 자동 분석기를 개발한 이래 오차가 적은 분석값을 얻기 위한 정밀도의 추구하고 보다 적은 시료로 많은 항목을 짧은 시간에 간단히 분석할 수 있는 미량화, 다항목화, 신속화, 간편화 등이 지향되고 있다. 분석기는 측정방법에 따라서 흡광광도법, 발광광도법, 전기화학적분석법, 반사광도법 등으로 구분할 수 있다. 그중 흡광광도

법을 이용한 분석장치가 가장 많이 사용되고 있다. 흡광 및 발광기들의 사용 시약의 형태는 액체이며, 보관 및 실험시 여러가지 조건에 맞추어 분석해야하는 단점이 있다. 이러한 분석시의 복잡함을 단순화하며, 빠른 시간에 물질을 분석할 수 있는 분석기기가 많은 사람들에 의하여 연구되고 있다<sup>1</sup>. 최근에는 액체 상태 시약이 아닌 고체 상태 시약을 이용하여 여러가지 항목을 분석할 수 있는 스트립이 개발되었다. 특히 기존에 뇨분석에서만 사용하던 스트립이 1970년대 부터 미국등 여러나라에서 혈액구성물질을 분석하기 위한 스트립이 개발되어 1980년 후반부터 시판되고 있다<sup>2,3</sup>. 스트립 매트릭스 재질로는 셀룰로오스와 필름을 가장 많이 사용한다. 분석방법으로는 시각에 의한 비교색도 분석과 스트립에서 반사되는 반사광을 감지하여 물질을 분석하는 방법으로 구분할 수 있다. 시각에 의한 것은 샘플을 스트립에 첨가하였을때

<접수 : 1992년 12월 31일>

\* : 한국과학기술연구원 유전공학연구소

\*\* : 인천대학교 정보통신공학과

\*\*\* : 명지대학교 전자공학과

\* : Genetic Engineering Research Institute, KIST

\*\* : Dept. of Information and Telecommunication Engineering, Inchen University

\*\*\* : Dept. of Electronics Engineering, Myoung Ji University

검체와 스트립간에 화학적 반응에 의하여 특정 색상으로 변화된 색상을 구분하는 방법으로 주로 양성과 음성반응만을 판단하는데 사용된다. 분석기기에 의한 방법은 기준광을 스트립 매트릭스위에 조사하여 반사되는 광과 기준광세기를 검출하여 검체를 스펙트랄 영역에서 정량분석하는 방법이다<sup>7-14</sup>.

본 연구는 임상 분석용 고체상태 스트립을 정량 분석하기 위한 분석기기 개발에 관한 연구로서, 시스템 구성도는 그림 1과 같이 광원, 파장선택부, 광전송부, 시약부, 광검출부 및 증폭부, 아날로그-디지털 변화부, 자료처리부로 구성된다<sup>15-16</sup>. 선택한 광원은 가시선에서 강한휘도이며, 연속광원인 텅스텐 램프이다.

램프에서 발광되는 원적외선은 적외선차단필터로 차단하였다. 분석 파장은 500nm-610nm 사이의 투과특성을 갖는 간섭필터들을 사용하고 단파장으로 변환하였다, 출력된 단파장을 스트립 매트릭스 표면까지의 광전송 및 수광은 광화이버를 사용하였다. 스트립의 조명 및 관측조건은 45°/수직이다. 입사광의 집광은 광플로브를 사용하였다. 발광부와 수광부사이에 간섭이 없도록하여 수광부와 스트립과의 거리는 5m이다. 매 관측시 정확한 반사광 데이터를 수집할 수 있는 스트립 카세트와 로더를 제작하였다.

광센서는 가시영역에서 선택적 민감도를 갖는 포토다이오드를 사용하였으며, 측정된 광전류는 전압으로 변환하여 전단증폭후 아날로그-디지털 변환하였다. 아날로그-디지털 변환기의 분해능은 12비트이며, 입력 전압의 범위는 0-1V이다. 기준광은 표준반사광중 흰색을 사용하였다. 본 시스템의 유효성을 검토 위하여 사용한 샘플은 한국표준색표질의 무채색 흰색에서 검은색까지의 명도 17단계로 구성된 시험지이다. 임상 검사샘플은 총단백질과 포도당이다. 각 항목당 측정은 농도별 표준시

약을 구성하여 일정량을 스트립 매트릭스에 주사하여 반사광을 측정하였다.

## 2. 시스템 구성

### 1) 광학부

임상 화학의 주된 분석 검체는 혈액으로서, 대부분의 구성물질은 가시영역(380nm-700nm)에서 스펙트랄 흡수 특성을 나타낸다. 가시영역의 광원 선택조건은 분석 스펙트랄 영역에서 충분한 에너지를 갖는 연속 광원을 사용하여야 하며, 측정 시간내에서 발광 세기가 일정하여야 한다. 이러한 광원에서 텅스텐램프와 제논 아크 램프를 주로 사용한다. 본 연구에서는 텅스텐램프를 사용하였으며, 상관색 온도는 3000K이다. 텅스텐 램프는 연속 스펙트럼이고 적외부로 부터 가시부에 걸쳐 장파장영역에서 강도가 강하고 휘도가 높고 광강도의 안정성이 좋은 특징이 있다.

측정온도가 약 40° 이상 온도상승하면, 혈액내의 물질의 반응속도가 현저히 낮아지게 된다. 이러한 열원을 갖고 있는 원적외선을 제거하기위하여 적외선 차단필터를 사용하였다.

특정 가시선영역을 선택하기 위한 광학 소자는 간섭필터와 모노크로마토가 있다. 본 연구에서는 간섭필터를 사용하였다. 간섭필터는 투명판에 의한 간섭 효과를 이용한 소자로서, 선택한 파장만을 통과한다. 사용한 간섭필터는 Oriel사 제품으로 파장 패스영역은 500, 550, 570, 610nm이며, 전송율은 약 60%이다. 광화이버를 이용하여 간섭필터를 통과한 단파장 광을 스트립 매트릭스 표면위에 조사하도록 하였다.

그림 2은 광화이버에서 조사되는 광을 스트립 매트릭스크기로 집광(collimating)하기위한 플로브 구조이다.

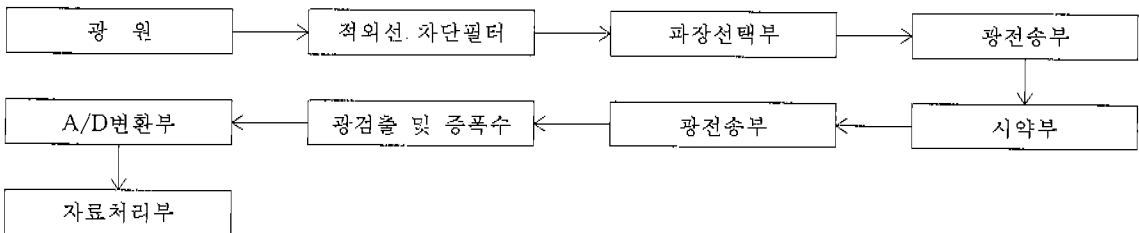


그림 1 전체시스템 구성도.

Fig. 1 System block diagram.

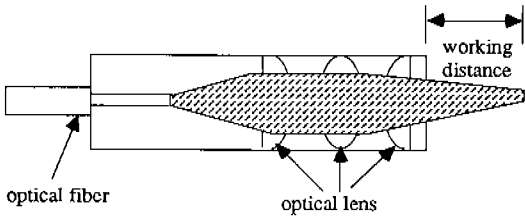


그림 2 집광 플로브구조.

Fig. 2 Shape of light collimating probe.

### 2) 스트립 특성 및 구조<sup>2-6</sup>

고체상태 스트립의 매트릭스 구조는 그림 3과 같이 화학물질의 분석에 필요한 셀룰로오스로 구성된다. 지지대는 스트립 로더에서 삽입과 제거가 가능하도록 플라스틱으로 되어있다.

이 셀룰로오스매트릭스는 샘플을 흡수하는 특성을 가지고 있다. 예를 들면 혈청 빌리루빈(serum bilirubin) 검사는 pH 농도가 1에 가까운 상태에서 다이아조니움 결합(diazonium coupling) 반응으로 분석되며, 비슷하게 혈액 요소 질소(blood urea nitrogen: BUN) 검사는 낮은 pH 농도가 되도록 50% 카치온 교환 수지다. 또 다른 특성으로는 시약이 수화될때까지 화학적 상호작용이 발생하지 않는 방법으로 짝짓기 반응(coupling reacting)이 되도록 필요한 시약을 매트릭스안 짜넣는 것이 가능하다. 예로서 트리글리세라이드 시약 패드(triglycerides reagent pad)는 4개의 효소에 의하여 짝짓기 결합을 포함하는 연속 반응을 수행하는데 필요한 시약을 포함한다.

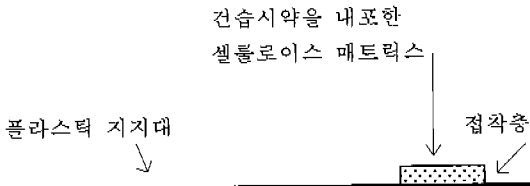


그림 3 고체시약 스트립구조.

Fig. 3 Shape of solid state strip

또한 기존 습식시스템에서의 니코틴 아미드 아데닌 디뉴클레오티드(nicotinamide-adenine dinucleotide)와 같은 보조 효소를 포함하는 시약에서는 1년이 지나면 매우 불안정한 상태인 반면에 건식 시스템은 임상 검사실의 실온에서 매우 안정한 상태를 존재한다. 이 뛰어난 안정 상태 특성의 장점

은 습식시약 시스템의 수작업에 의한 전처리과정 에 대한 필요성을 제거할 수 있으며, 사용자는 적은 량의 샘플으로도 여러 항목의 검사를 할 수 있다.

### 3) 스트립 로더 및 카세트

정확하고 일정한 반사광을 수집하기 위하여 스트립 로더와 카세트를 제작하였다. 로더는 스트립을 측정시마다 일정한 위치에 놓기 위한 판과 밑부분에 히터를 삽입하여 최적온도에서 측정하기 위한 온도조절판으로 구성된다. 또한 광교정기로 사용할 흰색 표준판 캡을 삽입하여 절대 반사율을 측정할 수 있게 하였다. 흰색 표준판은 BaSO<sub>4</sub> 분말을 캡에 첨가한 후 압축기로 압축기로 압축하여 제작하였다. 카세트는 발광 및 수광부로 사용되는 광화이버의 위치를 고정하기 위한 것이다. 구조는 사진 1과 같다. 수광부와 스트립와의 거리는 5mm이며, 입사광은 플로브 높이를 조절하여 매트릭스의 크기로 집광하였다. 재료는 열전달 특성이 좋은 알루미늄을 사용하였다. 스트립삽입 및 제거를 용이하도록 밑부분에 로울러를 부착하였다. 조명 및 관측조건은 45°/주직으로 매트릭스 표면에 대하여 45° 방향으로 조명하여 수직방향으로 반사광을 수광하였다. 또한 반응온도는 35-37° 로 설정하여 빠른 시간에 분석할 수 있도록 하였다.

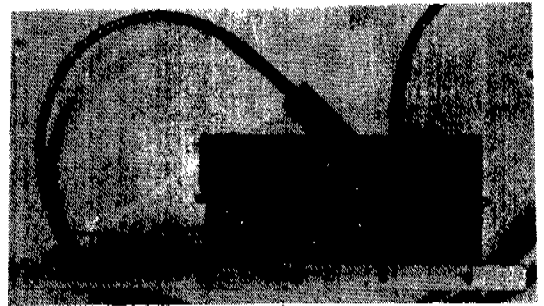


그림 4 스트립 로더 및 카세트

Fig. 4 Strip loader and cassette.

### 4) 검출부 및 자료처리부

검출부는 광센서의 감지부분과 화이버 출력부를 최대로 근접시켜 미소광 감지를 최대로 하였다. 광센서는 실리콘 포토다이오드로 가시영역에서 높은 민감도를 나타낸다.

포토다이오드를 이용한 검출회로의 기본형은

zero bias형, 역바이어스형, 전하증폭형으로 분류되며 그중 zero bias형으로 구성하였다. 이회로는 zero bias때문에 센서의 집합용량의 크게되어 고속 동작은 불가능하지만 역 전류의 영향이 적어 직선성이 좋은 잇점이 있다. 반사광을 감지하여 출력된 직류전압은 전압증폭하여 최대전압이 1V가 되도록 하였으며, A/D변환기를 통하여 디지털값으로 변환하였다. A/D변환기의 분해능은 12비트이며 입력 전압의 범위는 0-1V로 하였다.

시스템에 측정된 반사광은 반사광학밀도( $D_R$ : reflection optical density)와  $k/s$ (kumelka-munk)계수로 표시하였다.

$$D_R = \log(R_o/R_{test}) \dots\dots\dots(1)$$

$$k/s = (1 - 0.1R)^2 / 2(0.1R) \dots\dots\dots(2)$$

여기서 R : 반사율이며,

$R_o$  : 측정과장대에서 기준반사판에 조명하였을때 측정된 반사광세기이며,

$R_{test}$  : 샘플을 스트립매트릭스에 주사후 측정된 반사광세기이다.

### 3. 실험

#### 3-1. 스트립 측정 흐름도

그림 5는 스트립 분석 흐름도이다.

### 4. 데이터 처리 및 결과

#### 4-1. 흰색교정판 측정

교정판은 BaSO<sub>4</sub> 분말로 제작한 캡을 사용하였다. 그림 6은 hunterlab Ultrascan sphere spectrorcolorimeter에서 측정된 결과로서, 측정과장대(350-700nm)에서 반사율이 85%이상임을 알 수 있다.

#### 4-2. 표준색채판 측정

본 시스템에서 관측한 반사 파라메타들의 유용성을 연구하기 위하여, 한국색채연구소에서 출판한 무채색에 대한 반사레벨을 관측하였다. 측정된 무채색의 명도는 17등급으로 구성된 것을 사용하였다. 측정방법은 앞의 표준판과 같은 과정으로 수행하였다. 그림 7은 610nm 과장에서 반사광 밀도를

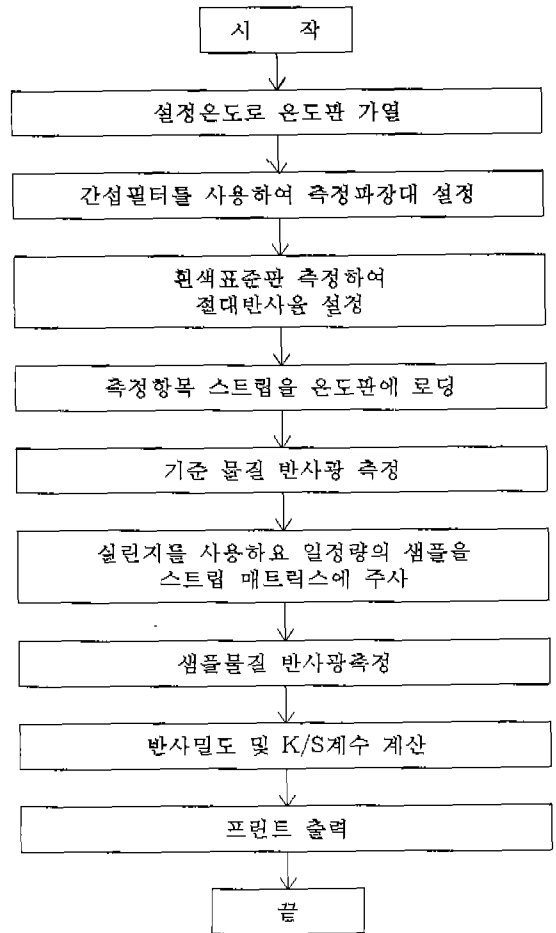


그림 5 스트립 분석 흐름도  
Fig. 5 Flow chart of strip analysis.

측정한 그래프로서, 명도가 맞아짐에 따라 반사밀도가 커짐을 알 수 있다. 즉, 명도1에서는 대부분이 반사되며, 명도 17에서는 반사밀도가 약 3.5로 입사광의 1/3500정도가 반사됨을 알 수 있다.

#### 4-3 임상용 스트립 측정

임상용으로 측정된 항목은 뇨의 총단백질 분석용과 혈액의 포도당 분석용이다. 총단백질 분석용 스트립에서는 3가지의 농도샘플을 구성하여 측정하였으며, 각 샘플량은 10 $\mu$ l이다. 측정 온도는 36 $^{\circ}$ C로 하였다. 그림 8은 측정된 그래프이며, 측정된 결과는 610nm의 과장을 사용하였을때, 스트립 매트릭스의 흡수 특성에 의한 색상변화에 가장 민감함을 알 수 있다.

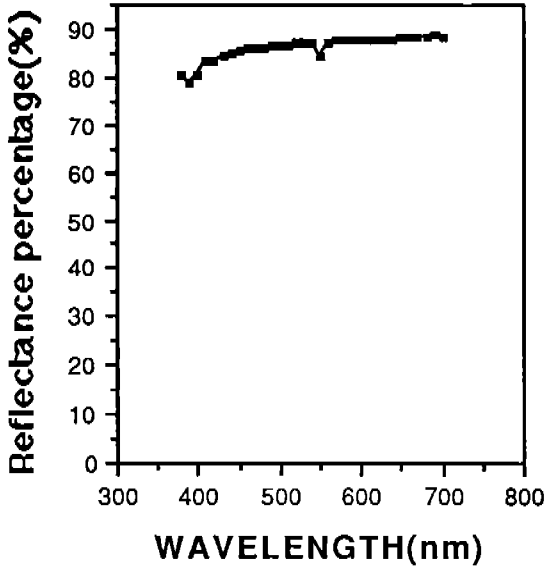


그림 6 BaSO<sub>4</sub> 확산반사도측정.

Fig. 6 Diffuse reflectance measurement of BaSO<sub>4</sub>.

$$y = -0.49721 + 0.22071x \quad R^2 = 0.967$$

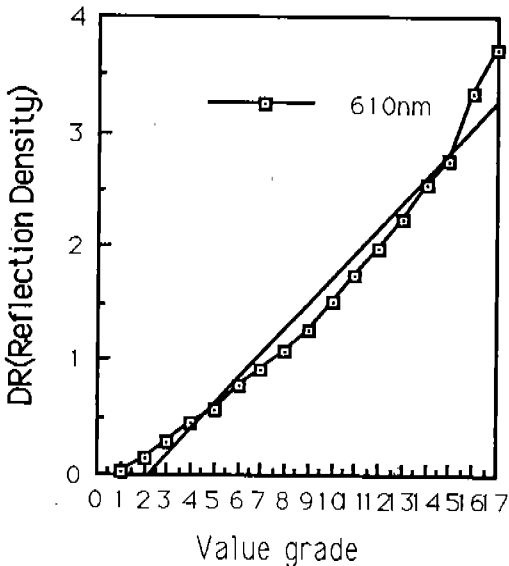


그림 7 610nm에서 무체색을 반사측정한 그래프.

Fig. 7 Reflection density graph of value grade at 610nm.

그림 9는 표준 포도당농도(0, 50, 100, 200, 300, 400(mg/dl))까지의 기준시약을 스트립에 첨가후 1분후에 kubelka-munk계수를 측정 한 그래프이다.

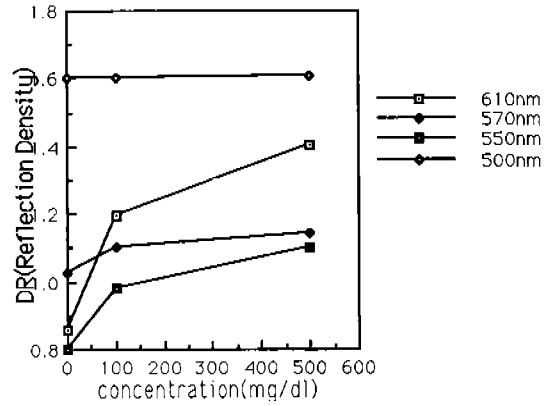


그림 8 총단백질 검사용 스트립을 측정한 그래프

Fig. 8 Reflection density graph of total protein strip.

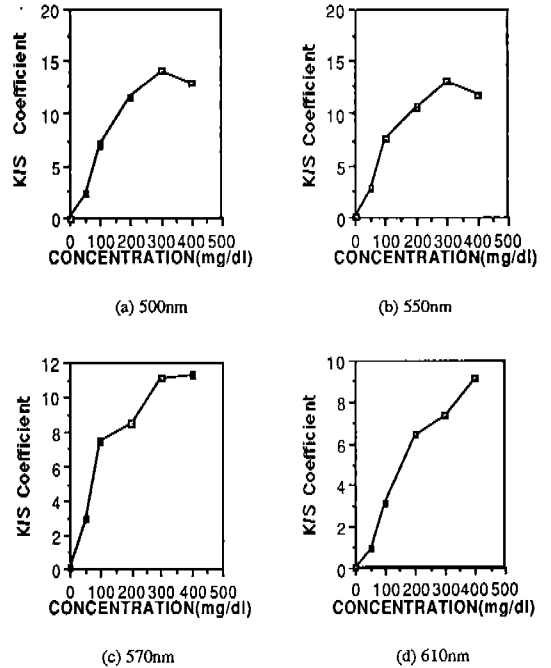


그림 9 Kubelka-munk 계수로 표시한 그래프.

Fig. 9 Graph of kubelka-munk coefficient for glucose strip.

500nm, 550nm, 570nm 파장에서는 400(mg/dl)표준시약농도인 경우 포화상태를 나타냄을 알 수 있다. 그림 10은 반사 광학밀도로 나타낸 그래프이다. 여러파장대중 610nm에서의 반사밀도가 가장 잘 나타남을 알 수 있다. 각 샘플량은 5μl이며, 측정온도는 36°C이다. 측정횟수는 10회에 대한 평균

차이다.

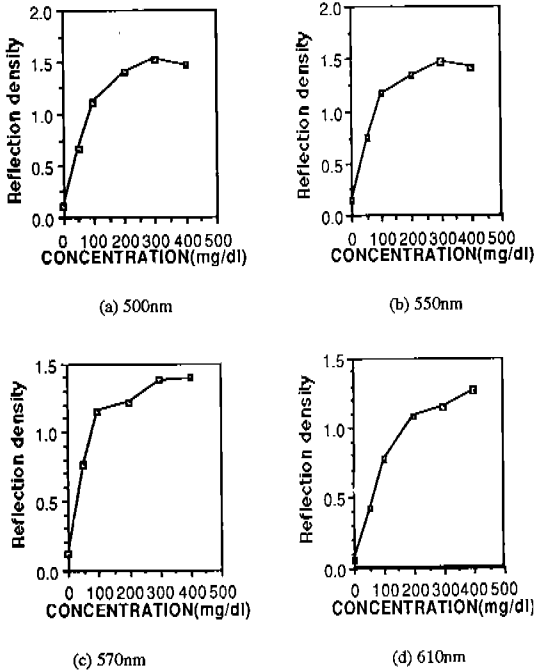


그림 10 반사광학밀도로 표시한 그래프.

Fig. 10 Graph of reflection density for glucose strip.

## 5. 결 론

본 시스템의 반사측정 유효성을 검토하기 위하여 측정된 17단계 무채색 명도판에서는 명도가 점차로 낮아짐에 따라서 반사밀도계수가 선형적으로 커짐을 확인할 수 있었다. 뇨의 총단백질 분석용 스트립을 사용하여 여러가지 농도별로 반사세기를 측정하였을 때 농도가 증가함에 따라 건습시약에서 스펙트랄 흡수특성에 의하여 반사광이 적어짐을 알 수 있었으며 4가지 단백질장중에서 610nm에서 농도에 따른 반사광의 변화를 가장 나타남을 알 수 있었다. 혈액의 포도당 분석용 스트립에서 반사세기를 측정하였을 때, 300(mg/dl) 농도보다 높은 샘플농도에서는 흡수포화상태를 관측할 수 있었다.

## 참고문헌

1) Robert D. Braun "Introduction to Instrumental Analysis", McGRAW-HILL international edi-

tion, 1987

- 2) Hobert H. Willard and et. al. "Instrumental Methods of Analysis", Wadsworth Publishing Company, 1988
- 3) William E. Neeley, David Epstein and Alred Zettner "An Instrument for Digital Matrix Photometry", Clin. Chem. 27/10, pp. 1665-1668, 1981
- 4) Steven C. Charlton, Roger L. Fleming, and Adan Zipp "Solid-Phase Colorimetric Determination of Potassium", Clin. Chem. 28/9. pp 1857-1861, 1982
- 5) Willis E. H, Alfred Greenquist et al "Automated Instrumentation for Fluorescence Assays Reagent Strips" Anal. Chem, Vol. 55, pp. 878-881, 1983
- 6) 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. 284296, 1982
- 7) Okubo A. "Dry Chemistry", Japan BME., Voll, No. 11, pp. 852857, 1987
- 8) William E. Neeley "Reflectance Photometer for Multilayer Dry Film Slides", Anal. Chem. Vol. 56, pp. 742745, 1984
- 9) 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
- 10) John G. Webster, "Coloimetry", Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, Vol. 2, pp. 771-779, 1988
- 11) Harry N. Norton, "Sensor and Analyzer Handbook", Prentice Hall, pp. 517-548, 1982
- 12) Adam Zipp and W. E. Homby "Solid-Phase Chemistry: Its Principles and Applications in Clinical Analysis", Talanta, Vol. 31, No. 10B, pp. 863-877, 1984
- 13) Adem Zipp, "Development of Dry Reagent Chemistry for the Clinical Laboratory", Jormal of Automatic Chemisry, Vol. 3, No. 2, April, pp. 71-75, 1981
- 14) Akiyuki Ohkubo and et, al "Plasma Glucose

Concentrations of Whole Blood, as Determined with a Multilayer-Film Analytical Element", Clin. Chem. 27/7, pp. 1287-1290, 1981

- 15) 유동주, 정태화, 민홍기, 허웅 "가시반사광을 이용한 임상화학 분석장치 개발의 기초연구",

의공학회 춘계학술대회, pp. 144-147, 1992

- 16) 유동주, 정태화, 민홍기, 허웅 "건습시약용 분석장치 개발[ I ]", Proc. of KITE Summer Conference '92, Vol, 15, No. 1, pp. 445-447, 1992