



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월04일

(11) 등록번호 10-2462930

(24) 등록일자 2022년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/327 (2006.01) G01N 15/00 (2017.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 27/3277 (2013.01)
G01N 33/49 (2019.01)

(21) 출원번호 10-2020-0064525

(22) 출원일자 2020년05월28일

심사청구일자 2020년05월28일

(65) 공개번호 10-2021-0147383

(43) 공개일자 2021년12월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170027184 A

KR1020170089812 A

KR1020190074422 A*

Sathish Panneer Selvam et al., Sensors & Actuators: B. Chemical, Vol. 302, 2020, pp.1-7.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김병권

서울특별시 영등포구 당산로41길 23, 103동 1504호 (당산동4가, 현대아파트)

이정은

서울특별시 용산구 청파로47길 66, 714호 (청파동2가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김종선, 이형석

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 정아영

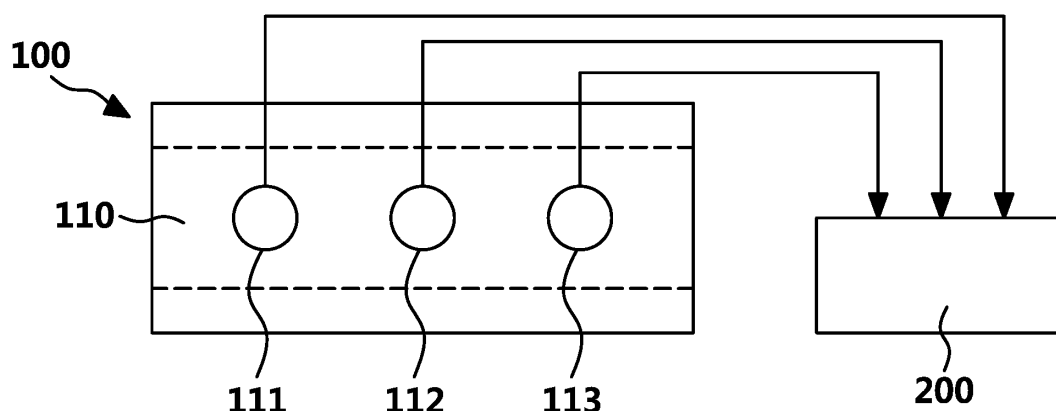
(54) 발명의 명칭 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치 및 그 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액이 포함되는 반응부, 상기 반응부 내에 위치하며, 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부, 및 상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 측정부를 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치 및 그 측정 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 추가적인 활성화 물질이나 광학 설정없이 전기화학적 방법을 통해 간편하고 정확하게 혈소판과 세로토닌의 농도를 측정할 수 있다.

대표도 - 도1

10



(52) CPC특허분류

G01N 2015/0084 (2013.01)

G01N 2333/70571 (2013.01)

(72) 발명자

강예지

서울특별시 광진구 아차산로41길 11 (자양동)

송재우

서울특별시 서초구 나루터로4길 28, 309동 104호
(잠원동, 신반포8차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711106277

과제번호 2018R1C1B6008668

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구(총연구비0.5억이상~3억이하)

연구과제명 개별 나노/마이크로 입자의 전극 충돌을 이용한 고감도 입자 분석 기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 숙명여자대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액이 포함되는 반응부;

상기 반응부 내에 위치하며, 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부; 및

상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에 서 세로토닌 퀴논이민으로 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 측정부를 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 측정부에서 측정한 피크 전류의 세기 변화를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구하는 연산부를 더 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 측정부에서 측정한 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구하는 연산부를 더 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 측정부에서 측정한 피크 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 시간의 흐름에 따라 표시하는 출력부를 더 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 피크 전류의 세기 측정을 위하여 상기 작업전극에 상기 기준전극 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 것을 특징으로 하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 작업전극은 탄소, 탄소 섬유, 인듐 산화주석, 불소도핑 산화주석, 붕소도핑 다이아몬드, 금, 은, 백금, 구리 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치.

청구항 7

혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액을 반응부에 주입하는 단계;

상기 반응부 내에 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부를 제공하는 단계;

상기 작업전극에 상기 기준전극 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 단계; 및

상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에 서 세로토닌 퀴논이민으로 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 단계를 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 측정된 피크 전류의 세기 변화를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구하는 단계를 더 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 측정된 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구하는 단계를 더 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 측정된 피크 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 시간의 흐름에 따라 표시하여 출력하는 단계를 더 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치 및 그 측정 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 전기화학적 방법으로 혈소판이 전극에 충돌 또는 흡착시 발생하는 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 통하여 혈소판 및 세로토닌의 농도를 측정하는 장치 및 그 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈소판은 출혈에 따른 조기 지혈 작용 및 혈액의 응고에 중요한 역할을 하는 중요 혈액 세포 성분으로서, 골수 내 거핵세포로부터 세포질이 떨어져 생성되는 지름 2 ~ 3 μ m의 디스크 모양을 띠는 세포질 조각이다. 혈소판은 핵을 가지고 있지 않고 순환 혈액 내에서 수명은 7 ~ 10일 정도이다.

[0003] 혈소판은 혈관이 손상되어 혈액이 혈관 외 조직에 노출되면 신속히 손상된 조직에 붙고 활성화 과정을 거쳐 혈소판괴를 형성하여 혈관 파손 부위를 막아 출혈을 멈추게 한다. 또한 혈장 단백질 응고인자들이 혈소판괴 주위에서 활성화되게 하여 피브리노겐을 피브린으로 변화시키고 피브린 응괴를 형성하게 함으로서 혈소판괴 주위로 기계적으로 견고한 지혈응괴를 완성시킨다.

[0004] 정상적인 성인의 경우 혈액 1mm³ 속에 약 30만 ~ 45만 개가 포함되어 있으며, 혈소판이 부족하면 작은 점상 출혈이 나타나게 되며 멍이 잘 들고 점막출혈(예: 코피)이 발생할 뿐만 아니라, 외과 수술이나 침습적 내과 기술 시

과도한 출혈의 위험을 초래할 수 있다. 따라서 수술을 받는 경우 출혈 위험 환자를 선별하기 위해 혈소판 수가 미리 스크리닝되고 면밀히 모니터링 될 필요가 있다.

[0005] 이 경우 임상 실험실에서 혈소판 수를 측정하는 가장 보편적인 방법으로 쿨터세포계수(automated Coulter cell counting) 방법 또는 유세포 분석법(flow cytometry)을 이용한 자동화된 혈구분석검사가 있다. 종래 기술에서 혈소판, 백혈구 및 적혈구의 구별은 혈소판과 백혈구 사이의 크기 관련 전기 신호에 일정한 컷오프를 적용하고, 전혈(whole blood)을 특이적 용해 버퍼로 처리하여 적혈구를 제거함으로써 가능하다. 이러한 방법은 수많은 자동 혈액 분석기에 널리 채택되어 현재 임상 진료에서 상용되나 그 결과 값이 완벽한 것은 아니다. 혈액 세포와 혈소판의 구별은 주로 크기를 기준으로 하기 때문에, 단편화된 적혈구와 같은 작은 입자는 종종 혈소판으로 오인되는 문제가 있다. 반대로 특정 질병 또는 환자의 상태에 따라 생성될 수 있는 큰 크기의 혈소판은 혈소판 수에서 누락되어 실제적인 혈소판 수를 감소시키는 결과를 낳을 수도 있다. 이러한 오류를 확인하기, 위하여 말초 혈액도말(blood film preparation)을 염색하여(로마노프스키 염색, Romanowsky staining) 현미경 관찰(microscopic observation)하는 등 번거로운 추가 임상검사가 수행될 수 있다.

[0006] 이러한 배경을 감안할 때 혈소판을 감지하는 보다 특이적인 방법은 임상검사 업무를 향상시키는 실질적인 가치가 있다고 볼 수 있다. 혈액 분석의 특이성은 다양한 방식으로 향상될 수 있으며, 그 중 하나는 유세포 측정 면역표현형 분석(CD61같은 혈소판 특이항체)을 사용하는 것이다. 그러나 이러한 분석 역시 시간이 많이 걸리고 고가의 장비를 필요로 하는 점에서 신속 대량 검사에 적용하기에는 적합하지 않다.

[0007] 한편, 적절한 혈소판 특이적 산화환원 물질이 분석 대상으로 선택될 수 있다면 전기화학적 방법은 좋은 대안이 될 수 있다. 이와 관련하여 신경 전달 물질로 잘 알려진 세로토닌은 혈소판에도 다량 존재하여 혈소판 검출에 이용할 수 있다. 세로토닌은 주로 위장관의 장크롬 친화성 세포(enterochromaffin cell)에서 합성되며 중추신경계의 세로토닌성 신경세포에서 일부 합성되기도 한다. 혈류로 분비된 세로토닌은 세로토닌 수용체를 통해 혈소판과 같은 다른 세포에 흡수된다. 특히 세로토닌은 혈소판 활성화를 평가할 수 있는 적합한 마커로서, 혈소판 내에서 세로토닌은 ADP 및 2가 칼슘 이온과 같은 혈소판 기능에 필수적인 물질과 함께 고농도(65mmol/L)로 과립 내에 저장되며, 혈소판 활성화에 의해 외부로 분비된다.

[0008] 지혈 작용에 의해 혈소판이 활성화되면 혈소판은 세로토닌을 주변 환경으로 방출하는데, 세로토닌의 이러한 방출 특성은 해파린유도저혈소판증을 진단하기 위한 임상검사로도 사용되고 있다.

[0009] 최근에는 전기화학적 방법을 이용하여 혈소판 내 세로토닌의 농도를 측정하는 연구가 시도되고 있다. 하지만 이러한 연구는 대개 복잡한 3차원 포지셔닝 시스템이 필요하고, 섬세한 광학적 조정이 필요하므로 숙련된 전문가만이 실험을 수행할 수 있다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 제10-1884832호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 광대한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 추가적인 활성화 물질이나 광학 설정없이 전기화학적 방법을 통해 간편하고 정확하게 혈소판과 세로토닌의 농도를 측정할 수 있는 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치 및 그 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액이 포함되는 반응부; 상기 반응부 내에 위치하며, 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부; 및 상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 측정부를 포함한다.

- [0013] 여기서, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 상기 측정부에서 측정된 피크 전류의 세기 변화를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구하는 연산부를 더 포함할 수 있다.
- [0014] 여기서, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 상기 측정부에서 측정된 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구하는 연산부를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 여기서, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 상기 측정부에서 측정된 피크 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 시간의 흐름에 따라 표시하는 출력부를 더 포함할 수 있다.
- [0016] 여기서, 상기 피크 전류의 세기 측정을 위하여 상기 작업전극에 상기 기준전극 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하 할 수 있다.
- [0017] 여기서, 상기 작업전극은 탄소, 탄소 섬유, 인듐 산화주석, 불소도핑 산화주석, 붕소도핑 다이아몬드, 금, 은, 백금, 구리 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0018] 한편, 본 발명에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액을 반응부에 주입하는 단계; 상기 반응부 내에 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부를 제공하는 단계; 상기 작업전극에 상기 기준전극 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 단계; 및 상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0019] 여기서, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 상기 측정된 피크 전류의 세기 변화를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 여기서, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 상기 측정된 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0021] 여기서, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 상기 측정된 피크 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 시간의 흐름에 따라 표시하여 출력하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 상술한 바에 따른 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치 및 그 측정 방법은 추가적인 활성화 물질이나 광학 설정없이 전기화학적 방법을 통해 간편하고 정확하게 혈소판과 세로토닌의 농도를 측정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치를 도식적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 블록도를 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판이 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 산화되어 피크 전류가 발생하는 원리를 도시한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법의 각 단계별 순서도를 도시한 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 직경이 25 μm 인 Pt UME와 직경이 2 mm인 백금 전극을 작업전극으로 할 경우 50 mV/s의 스캔 속도에서 순환 전압-전류곡선을 도시한 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 인가 전위가 0.5 V 일 때 혈소판 결핍 혈장(platelet-poor plasma, PPP) 용액 및 농도별 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma, PRP) 용액의 전류-시간 곡선을 측정하여 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 인가 전위가 0.2 V 및 0.5 V 일 때 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 전류-시간 곡선을 측정하여 도시한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 각 시료에 따른 작업전극의 표면에 혈소판이 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 산화되어 생성되는 피크 전류의 유무를 전류-시간 곡선을 측정하여 도시한 것이다.
- 도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌

또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기를 측정하여 그 적분 면적을 도정한 것이다.

도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착에 따른 혈소판의 충돌 횟수와 전하량 분포의 관계를 도정한 것이다.

도 9c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착에 따른 혈소판의 충돌 횟수와 혈소판 내 세로토닌의 농도의 관계를 도정한 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 혈소판의 충돌 주파수에 따른 혈소판의 농도 값을 도정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 출원에서 사용하는 용어는 단지 특정한 예시를 설명하기 위하여 사용되는 것이다. 때문에 가령 단수의 표현은 문맥상 명백하게 단수여야만 하는 것이 아닌 한, 복수의 표현을 포함한다. 덧붙여, 본 출원에서 사용되는 “포함하다” 또는 “구비하다” 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 기능, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 명확히 지칭하기 위하여 사용되는 것이지, 다른 특징들이나 단계, 기능, 구성요소 또는 이들을 조합한 것의 존재를 예비적으로 배제하고자 사용되는 것이 아님에 유의해야 한다.

[0025] 한편, 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진 것으로 보아야 한다. 따라서, 본 명세서에서 명확하게 정의하지 않는 한, 특정 용어가 과도하게 이상적이거나 형식적인 의미로 해석되어서는 안 된다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 “시료”는 혈소판 입자를 포함하는 혈액 샘플일 수 있다. 상기 시료는 본 발명에 따른 반응부에 투입되기 전에 정제 또는 농축되지 않은 상태로 사용할 수 있다. 한편, 상기 시료에 따라 입자가 지나치게 큰 경우, 예를 들어 수십 혹은 수백 μm 이상의 크기를 가지는 입자가 포함되어 있는 경우 적절한 필터를 이용하여 여과함으로써 큰 입자를 제거할 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 “충돌 주파수”는 혈소판 입자가 작업전극에 충돌 또는 흡착하는 횟수, 충돌 또는 흡착하는 빈도 등을 의미할 수 있다.

[0028] 본 발명자들은 상술한 과제를 해결하기 위하여 연구한 결과, 하기와 같은 발명을 안출하기에 이르렀다.

[0030] <본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치>

[0031] 본 명세서는 혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액이 포함되는 반응부; 상기 반응부 내에 위치하며, 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부; 및 상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 측정부를 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치를 개시한다.

[0032] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법에 관한 사항은 하기 후술하는 <본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법>에 따른다. 이하에서는 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치와 관련하여, 각 장치의 구성별로 세분화하여 서술하고자 한다.

[0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치를 도식적으로 나타낸 것이다. 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 반응부(100), 전극부(110) 및 측정부(200)를 포함하고, 상기 전극부(110)는 기준전극(111), 상대전극(112) 및 작업전극(113)을 포함하는 것을 확인할 수 있다.

[0035] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 블록도를 도기한 것이다. 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 반응부(100), 전극부(110) 및 측정부(200) 이외에 연산부(300) 또는 출력부(400)를 더 포함할 수 있고, 상기 전극부(110)는 기준전극(111), 상대전극(112) 및 작업전극(113)을 포함하는 것을 확인할 수 있다.

[0036] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판이 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 산화되어 피크 전류가 발생하는 원리를 도기한 것이다. 도 3을 참조하면, 단일 혈소판 입자가 작업전극의 표면에 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 입자 내의 세로토닌이 상기 작업전극의

표면에서 산화되어 피크 전류가 발생하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 상기 세로토닌의 피크 전류 발생 곡선을 통하여 비가역적 전기화학적 산화로 인해 환원 전류는 관찰되지 않은 것을 확인할 수 있다.

- [0038] 구체적으로, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 반응부(100)는 상기 작업전극(113)과 시료 및 반응 용액 중에 분포 또는 존재하는 혈소판 입자의 충돌이 발생하는 곳으로, 검출 대상인 상기 혈소판 입자가 일정 기간 동안 상기 반응부(100) 내에 저장되면서 상기 작업전극(113)과 충돌을 일으키는 공간을 제공하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 반응부(100)의 형상은 원통, 플레이트, 정육면체, 직육면체, 정다면체, 다각기둥 또는 구일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 작업전극(113)은 전극 반응에 직접 참가하여 반응을 일으키는 전극을 의미하며, 상기 작업전극(113)은 상기 혈소판 입자 내 세로토닌이 산화 반응을 일으키는 전극을 의미한다.
- [0041] 상기 작업전극(113)은 탄소, 탄소 섬유, 인듐 산화주석, 불소도핑 산화주석, 붕소도핑 다이아몬드, 금, 은, 백금, 구리 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 작업전극(113)의 표면의 형상은 삼각형, 사각형, 오각형 등 다각형, 원형, 타원형, 반원형, 구형, 반구형, 피라미드형, 원통형, 사면체형, 육면체형, 함몰형 또는 비정형인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 보다 구체적으로, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 작업전극(113)의 표면의 형상은 원형인 것이 바람직할 수 있다. 이는 상기 작업전극(113)의 표면의 형상이 원형인 경우 전극 중심으로부터 전극 가장자리까지의 최대거리가 일정하기 때문이다.
- [0044] 상기 작업전극(113)은 디스크 전극(Disk electrode) 또는 초미세전극(Ultramicroelectrode, UME)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 여기서 상기 작업전극(113)이 디스크 전극일 경우 그 직경이 1 내지 5 mm인 것이 바람직하고, 2 내지 3 mm인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 작업전극(113)이 초미세전극인 경우 그 직경이 0.1 내지 500 μm 인 것이 바람직하고, 25 ~ 50 μm 인 것이 더욱 바람직하다.
- [0045] 상기 작업전극(113)은 1개 또는 상기 작업전극(113)의 표면의 최대 대각선의 길이가 상이한 2개 이상일 수 있으며, 상기 작업전극(113)의 최대 대각선 길이를 달리하는 2개 이상의 작업전극(113)을 장착함으로써 상이한 크기를 갖는 혈소판의 농도 및 세로토닌의 농도를 동시에 검출할 수 있다. 이와 관련하여 구체적인 내용은 하기 {실시예 및 평가}에서 상세하게 설명한다.
- [0047] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 기준전극(111)은 전위 측정시 단극 전위가 일정하여 기준이 될 수 있는 전극을 의미한다. 상기 기준전극은 Ag, Au, Pt, Cu 및 Al로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 금속을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 보다 구체적으로, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 기준전극(111)은 은/염화은(Ag/AgCl)으로 이루어진 것이 바람직할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 상대전극(112)은 상기 작업전극(113) 또는 상기 기준전극(111)과 짝지어 전극반응을 일으키는 전극을 의미할 수 있다. 상기 상대전극(112)은 Pt, Au, IrO₂, Cu, Al, Ag, Ni 및 C로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 상기 기준전극(111), 상기 상대전극(112) 및 상기 작업전극(113)의 형상 및 크기는 동일하거나 상이하게 형성될 수 있다.
- [0052] 상기 기준전극(111), 상기 상대전극(112) 및 상기 작업전극(113)이 상기 반응부(100) 내에 장착되는 위치에는 제한이 없으나, 상기 반응부(100)의 내벽에 부착되는 것보다는 이격되어 배치되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 기준전극(111), 상기 상대전극(112) 및 상기 작업전극(113) 간의 거리에는 제한이 없으나, 1 cm 이내에 배치되는 것이 바람직하다.
- [0054] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 시료는 산화환원종을 포함할 수 있다. 여기서, 상기 산화환원종은 혈소판 입자 내 세로토닌을 의미하는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 반응 용액은 전해질을 포함할 수 있다. 상기 전해질은 과염

소산 테트라부틸암모늄(TBAP), 황산마그네슘(MgSO₄), 황산칼슘(CaSO₄), 염화나트륨(NaCl), 염화칼륨(KCl), 염화수소(HCl), 수산화칼륨(KOH), 수산화나트륨(NaOH), 질산나트륨(NaNO₃), 질산칼륨(KNO₃), 인산(H₃PO₄), 테트라부틸암모늄 헥사플루오로 포스페이트(Tetrabutylammonium hexafluorophosphate), 테트라부틸암모늄 테트라플루오로보레이트(Tetrabutylammonium tetrafluoroborate) 및 이온성 액체 (Ionic liquid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 상기 전해질의 농도는 10 mM 내지 100 mM인 것 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가령, 상기 전해질의 농도가 10 mM 미만인 경우 상기 산화환원종의 과전압을 낮추는 역할을 충분히 할 수 없다는 문제가 있다. 상기 전해질은 상기 산화환원종의 과전압을 낮추고 상기 반응 용액을 안정화시키는 역할을 한다.

[0058] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 측정부(200)는 상기 작업전극(113)의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극(113)의 표면에서 산화되어 발생하는 전류의 세기를 측정한다. 보다 구체적으로, 상기 측정부(200)는 상기 작업전극(113)의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 세로토닌 퀴논이민으로 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기를 측정할 수 있다.

[0059] 상기 작업전극(113)의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극(113)의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기는 순환 전압전류법(Cyclic voltammetry, CV), 폴라로그래피(Polarography), 크로노암페로메트리(Chronoamperometry), 스트리핑 볼타메트리(Stripping voltammetry), 선형 주사 전압전류법(Linear sweep voltammetry), 네모파 전압 전류법(Square wave voltammetry), 유체역학적 전압전류법(Hydrodynamic voltammetry), 계단 전압전류법(Staircase voltammetry), 펄스 차이 전압전류법(Differential pulse voltammetry), 및 고속스캔 전압전류법(Fast-scan cyclic voltammetry)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 전압전류법을 이용하여 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 보다 구체적으로, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 순환 전압전류법(Cyclic voltammetry, CV)을 이용해 인가 전압 변화에 따른 상기 작업전극(113)의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극(113)의 표면에서 산화되어 발생하는 전류의 세기 변화를 측정할 수 있다. 순환전압 전류법은 고체 전극 등에서 전류 전위곡선을 얻는 방법의 하나로써, 삼각파를 이용하여 전극 전위를 주기적으로 변화시킨다. 순환전압 전류법을 통하여 반응 용액 중의 화합물과 전극 물질 자신의 산화환원 거동을 알 수 있으며, 복잡한 전처리 과정을 필요로 하지 않기 때문에 몇 초만에 그 결과를 확인할 수 있다.

[0061] 상기 피크 전류의 세기 측정을 위하여 상기 작업전극(113)에 기준전극(111) 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 피크 전류의 세기 측정을 위하여 상기 작업전극(113)에 기준전극(111) 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 것이 바람직하고, 0.4 내지 0.6 V의 전압을 부하하는 것이 더욱 바람직하다.

[0062] 가령, 상기 작업전극(113)에 0.1 V 미만의 전압을 부하하는 경우 산화환원종의 산화가 충분히 일어나지 않아 전류의 세기를 측정할 수 없고, 이와 반대로 상기 작업전극에 1.0 V를 초과하는 전압을 부하하는 경우 백그라운드 전류 및 노이즈가 증가하는 문제점이 발생할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 상기 측정부(200)에서 측정한 전류의 세기 변화를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구하는 연산부(300)를 더 포함할 수 있다.

[0064] 이 경우 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도는 하기 수학적 식 1로부터 도출될 수 있다.

수학적 식 1

$$C_{ST} = \frac{6Q}{\pi n F (d_{PLT})^3}$$

[0065]

[0067] 상기 수학적 식 1에서, Q 는 측정부에서 측정한 전류의 세기가 나타나는 피크(peak) 전류를 적분한 값, n 은 한 분자당 이동 전자 수, F 는 패러데이 상수(96,485 C/mol), d_{PLT} 는 혈소판의 평균 직경(혈소판의 모양이 구형이고,

평균 직경은 3 μm 임)이다. 이때, 세로토닌의 한 분자가 전기화학적으로 산화되면 두 개의 전자가 생성되므로 상기 n 은 2로 간주할 수 있다.

[0068] 또한, 상기 수학적 식 1에서 Q 는 전하량을 의미하는데, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치의 작업전극의 표면에서 세로토닌의 산화로 인한 전하는 전류-시간 곡선에서 피크 전류 아래의 영역을 적분함으로써 얻을 수 있다.

[0069] 즉, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 세로토닌의 농도는 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기를 시간의 흐름에 따라 적분한 값에 의하여 얻을 수 있다.

[0070] 한편, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 측정부(200)는 상기 작업전극(113)의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 발생하는 혈소판의 충돌 주파수를 측정할 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 상기 측정부(200)에서 측정한 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구하는 연산부(300)를 더 포함할 수 있다. 이 경우 상기 혈소판의 농도는 하기 수학적 식 2로부터 도출할 수 있다.

수학적 식 2

$$f_{exp} = 1.18 \times 10^{-3} N_{PLT} - 7.13 \times 10^{-6} N_{PLT}^2$$

[0074] 상기 수학적 식 2에서, f_{exp} 는 실험적으로 구한 충돌 주파수, N_{PLT} 는 μL 당 혈소판 수이다.

[0075] 한편, 혈소판의 농도와 관련하여 혈소판의 충돌 주파수의 이론 값은 하기 수학적 식 3으로부터 도출될 수 있다.

수학적 식 3

$$f_{the} = 4D_{PLT}C_{PLT}r_sN_A$$

[0078] 상기 수학적 식 3에서, f_{the} 는 이론적으로 구한 충돌 주파수, D_{PLT} 는 혈소판의 확산계수(diffusion coefficient), C_{PLT} 는 혈소판의 농도, r_s 는 전극의 반경, N_A 는 아보가드로 상수이다. 이때, 혈소판의 확산계수인 D_{PLT} 의 값은 혈장 내에서 $1.6 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ 이다.

[0079] 또한, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 상기 측정부(200)에서 측정한 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 시간의 흐름에 따라 표시하는 출력부(400)를 더 포함할 수 있다.

[0081] <본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법>

[0082] 한편, 본 명세서는 혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액을 반응부에 주입하는 단계; 상기 반응부 내에 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부를 제공하는 단계; 상기 작업전극에 상기 기준전극 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 단계; 및 상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 단계를 포함하는, 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법을 추가로 개시한다. 이하에서는 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법과 관련하여, 각 단계별로 세분화하여 서술하고자 한다.

[0083] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법의 각 단계별 순서도를 도시한 것이다.

[0084] 도 4를 참조하면, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 혈소판을 포함하는 시료 및 반응 용액을 반응부에 주입하는 단계(S100), 상기 반응부 내에 기준전극, 상대전극 및 작업전극을 포함하는 전극부를 제공하는 단계(S200), 상기 작업전극에 상기 기준전극 대비 0.1 내지 1.0 V의 전압을 부하하는 단계(S300), 및 상기 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 상기 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되

어 발생하는 피크 전류의 세기 또는 상기 혈소판의 충돌 주파수를 측정하는 단계(S400)을 포함하는 것을 확인할 수 있다.

[0086] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 상기 측정한 피크 전류의 세기 변화를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 경우 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도는 상술한 바와 같이 상기 수학적 1로부터 도출될 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 상기 측정한 혈소판의 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 경우 상기 혈소판의 농도는 상술한 바와 같이 상기 수학적 2로부터 도출될 수 있다.

[0088] 한편, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 방법은 상기 측정한 피크 전류의 세기 또는 충돌 주파수를 시간의 흐름에 따라 표시하여 출력하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0089] 이하, 첨부한 도면 및 실시예들을 참조하여 본 명세서가 청구하는 바에 대하여 더욱 자세히 설명한다. 다만, 본 명세서에서 제시하고 있는 도면 내지 실시예 등은 통상의 기술자에게 의하여 다양한 방식으로 변형되어 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 본 명세서의 기재사항은 본 발명을 특정 개시 형태에 한정되는 것이 아니고 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 균등물 내지 대체물을 포함하고 있는 것으로 보아야 한다. 또한, 첨부된 도면은 본 발명을 통상의 기술자로 하여금 더욱 정확하게 이해할 수 있도록 돕기 위하여 제시되는 것으로서 실제보다 과장되거나 축소되어 도시될 수 있다.

[0091] {실시예 및 평가}

[0092] 제조예 1. 작업전극의 제조

[0093] 작업전극을 제조하기 위하여 Pt UME 또는 탄소 섬유(carbon fiber) UME를 통상적인 절차에 따라 제조하였다. 보다 구체적으로, 유리 모세관을 아세트, 에탄올 및 증류수로 세척한 후, 직경이 25 μm 인 Pt 와이어를 모세관에 밀봉하였다. 그 후 Pt 와이어가 없는 밀봉된 모세관의 앞 부분을 연마 장비 50 rpm으로 연마하였다. 그 후, Pt 와이어가 전극 표면으로 드러나면 전극을 다시 경면(mirror finish)과 같이 되도록 3 μm 및 0.1 μm 의 다이아몬드 패드(Allied High Tech Products, Inc.)로 순차적으로 연마하였다. 그리고 Pt UME를 제조한 후 상기 전극을 1 mM 페로센메탄올 용액 중의 표준산화환원 전기화학으로 테스트하였다. 각각의 실험 전에 제조한 작업전극은 에탄올과 아세트산으로 세척하고 다이아몬드 패드(0.1 μm , Allied High Tech Products, Inc.)에 초순수로 광택을 냈다.

[0094] 마찬가지로, 직경이 10 μm 인 탄소 섬유(carbon fiber)를 상기 Pt UME 제조 과정과 동일한 방법으로 탄소 섬유(carbon fiber) UME를 제조하였다.

[0095] 한편, 디스크 전극으로서 직경이 2 mm인 백금 전극(platinum electrode)을 제조하였다.

[0097] <실험준비>

[0098] 1. 시료 준비

[0099] 세로토닌(5-히드록시트립타민), 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS, 0.01 M, pH7.4), 포볼 12-미리스테이트-13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate), 페로센메탄올(ferrocenemethanol, 97 %), 티로피반(tirofiban), 생리 식염수(normal saline, NS), 적혈구 용해 완충제(Red blood cell lysis buffer, RLB), 아세트(99.5 %), 에탄올(94.5 %)을 추가 정제 없이 사용하였다. 이 때 상기 생리 식염수(normal saline, NS)는 150 mM NaCl을 포함하고 있다.

[0100] 또한, 백금 와이어(99.99 %, 직경 25 μm), 탄소 섬유(99.99 %, 직경 10 μm)을 사용하고, 상기 완충액은 초순수로 제조하였다.

[0102] 2. 샘플 준비

[0103] 혈액을 EDTA 항응고 튜브(BD vacutainer, BD)에 넣고, EDTA 포함 전혈을 실온에서 15 분 동안 250 g에서 원심 분리하였다. 혈액의 응고를 방지하기 위하여 K_2EDTA 를 항응고제로 사용하였다. 각 튜브의 탈리액으로부터 혈소판 풍부혈장(PRP) 용액을 풀링(pooling)하여 필요한 부피를 얻었다. 펠릿의 상부를 흡인하여 백혈구(white blood cell, WBC)를 함유하는 버피 코트층(buffy coat layer)을 제거하였다. 펠릿의 나머지 하부는 농축적혈구(packed red cell)액으로 사용되었다.

[0105] 3. 전기화학적 측정장치

[0106] 전기화학 실험은 작업전극으로 직경이 2 mm인 백금 전극(platinum electrode), 직경이 25 μ m인 Pt UME 및 직경이 10 μ m인 탄소 섬유(carbon fiber) UME를 사용하였고, 상대전극으로 직경이 0.5 mm인 백금 와이어(Pt wire) 및 기준전극으로 은/염화은(Ag/AgCl, 3 M NaCl) 전극을 포함하는 3개의 전극 셀로 구성된 CHI617B 포텐시오스탯(CH Instrument Inc., Austin, TX)의 전위차계로 수행되었다. 상기 전기화학적 측정장치는 패러데이 케이지(Wuhan Corrtest Instrument Co., Ltd, wuhan, China)에 위치한 5 mL 비커 타입 셀에 설치되었다.

[0107] 한편, 혈소판 결핍 혈장(PPP) 용액, 혈소판풍부혈장(PRP) 용액, 농축적혈구(packed red cell)액에 존재하는 적혈구, 백혈구, 혈소판의 수치는 자동 혈액 분석기(Advia2120i)에 의해 측정되었다.

[0109] 4. 세로토닌 산화 전위 측정

[0110] 순환 전압전류법 측정을 수행하기 위하여, 혈소판 결핍 혈장 용액(혈소판 최종 농도 1.66 fM, 혈소판 거의 미포함, PPP), 혈소판의 최종 농도가 각각 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM이 되도록 혈소판풍부혈장 (PRP)용액을 생리 식염수에 첨가하였다.

[0111] 한편, 전류-시간 곡선 측정을 수행하기 전에 생리 식염수에 용해된 100 fM의 혈소판풍부혈장(PRP) 용액과 혈소판 결핍 혈장 용액에 대하여 순환 전압-전류곡선(cyclic voltammogram)을 기록하였으며, 그 결과 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 경우 정상상태 전류 범위가 0.4 V 또는 0.6 V(vs Ag/AgCl)인 S자형 곡선을 보였다(도 5 참조).

[0112] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 직경이 25 μ m인 Pt UME와 직경이 2 mm인 백금 전극을 작업전극으로 할 경우 50 mV/s의 스캔 속도에서 순환 전압-전류곡선을 도시한 것이다.

[0113] 도 5a를 참조하면, 작업전극으로 직경이 25 μ m인 Pt UME를 사용하는 경우 혈소판 결핍 혈장 용액은 50 mV/s의 스캔 속도에서 특별한 전류 피크를 나타내지 않고, 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 경우 전위 값이 0.6 V 부근에서 약간 증가하는 전류 피크를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0114] 도 5b를 참조하면, 작업전극으로 직경이 2 mm인 백금 전극(디스크 전극)을 사용하는 경우 혈소판 결핍 혈장 용액은 50 mV/s의 스캔 속도에서 특별한 전류 피크를 나타내지 않지만, 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 경우 전위 값이 0.4 V 부근에서 뚜렷하게 증가하는 전류 피크(양극 피크 전류)를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0115] 이 결과에 기초하여, 전류-시간(i-t) 곡선 실험은 작업전극인 UME 표면에서 혈소판 내 세로토닌의 완전한 산화를 보장하는 양극 전위를 나타내는 0.5 V의 인가된 전위에서 수행되었다.

[0117] <실험예>

[0118] 실험예 1. 초미세전극(Pt UME)에서 혈소판 내 세로토닌 검출

[0119] 혈소판의 충돌 또는 흡착을 관찰하기 위하여 산화환원종으로 사용된 혈소판 내 세로토닌을 초미세전극(Pt UME) 표면에서 연속적으로 산화시킨 결과, 피크 전류가 관찰되었다. 전류-시간 곡선 측정 조건은 직경이 25 μ m인 Pt UME를 사용하여 50 mV/s의 스캔 속도에서 0.5 V의 인가된 전위로 생리식염수(NS 용액)에서 측정되었다. 혈소판 결핍 혈장 용액(혈소판 농도 1.66 fM, 혈소판 거의 미포함), 혈소판의 최종 농도가 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM이 되도록 혈소판풍부혈장(PRP) 용액을 생리 식염수에 첨가하였다.

[0120] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 인가 전위가 0.5 V 일 때 혈소판 결핍 혈장(platelet-poor plasma, PPP) 용액 및 농도별 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma, PRP) 용액의 전류-시간 곡선을 측정하여 도시한 것이다.

[0121] 도 6을 참조하면, 혈소판 결핍 혈장(PPP) 용액의 경우 피크 전류가 관찰되지 않았으나, 혈소판의 농도가 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM의 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 경우 혈소판의 농도가 증가할수록 충돌 신호를 나타내는 피크 전류 값이 증가하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0123] 이 결과는 혈소판의 농도가 높을수록 작업전극의 표면에 충돌 또는 흡착하는 혈소판의 수가 증가하고, 이에 따라 작업전극의 표면에서 산화되는 세로토닌의 양도 증가하는 것을 의미한다.

[0124] 한편, 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 인가 전위가 0.2 V 및 0.5 V 일 때 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 전류-시간 곡선을 측정하여 도시한 것이다.

[0125] 도 7을 참조하면, 전위 의존성을 확인한 결과 혈소판의 농도가 100 fM의 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 경우 피크

전류 값이 0.2 V에서는 거의 나타나지 않고, 0.5 V에서만 나타나는 것으로 보아 상기 피크 전류 값이 혈소판 내 세로토닌의 산화에 의한 것임을 확인할 수 있다.

[0127] 실험예 2. 혈소판 내 세로토닌의 산화에 의한 전류인지 여부 확인

[0128] 다음으로, 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류가 혈소판 내 세로토닌에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여, 혈소판의 농도가 100 fM의 혈소판풍부혈장(PRP) 용액, 혈소판 결핍 혈장(혈소판 농도 1.66 fM, 혈소판 거의 미포함, PPP) 용액, 농축적혈구(packed red cell)액을 생리 식염수에 첨가하고, 직경이 25 μ m인 Pt UME를 사용하여 0.5 V로 전위를 인가하여 전류-시간 곡선을 측정하였다.

[0129] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 각 시료에 따른 작업전극의 표면에서 혈소판이 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 산화되어 생성되는 피크 전류의 유무를 전류-시간 곡선을 측정하여 도시한 것이다.

[0130] 도 8을 참조하면, 혈소판 결핍 혈장 용액(PPP)과 농축적혈구(packed red cell)액의 경우 혈소판의 농도가 각각 1.66 fM, 0.93 fM이지만 이러한 혈소판의 농도는 충돌 신호를 감지하기에 충분하지 않아 충돌 신호를 나타내는 피크 전류 값이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있다. 반면에 혈소판풍부혈장(PRP) 용액의 경우 혈소판의 농도가 100 fM로서 많은 수의 충돌 신호가 나타나고, 피크 전류 값도 상대적으로 더 큰 것을 확인할 수 있다.

[0131] 따라서 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류는 혈소판이 작업전극에 충돌 또는 흡착되어 혈소판 내 세로토닌의 산화에 의한 것임을 알 수 있다.

[0133] 실험예 3. 산화 전류의 세기에 따른 혈소판 내 세로토닌의 농도 측정

[0134] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 측정부에서 측정한 혈소판 내의 세로토닌이 상기 작업전극의 표면에서 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기를 통하여 상기 혈소판 내의 세로토닌의 농도를 구할 수 있다.

[0135] 도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌이 산화되어 발생하는 피크 전류의 세기를 측정하여 그 적분 면적을 도시한 것이다.

[0136] 도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착에 따른 혈소판의 충돌 횟수와 전하량 분포의 관계를 도시한 것이다.

[0137] 도 9c는 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착에 따른 혈소판의 충돌 횟수와 혈소판 내 세로토닌의 농도의 관계를 도시한 것이다.

[0138] 도 9를 참조하면, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 작업전극의 표면에 혈소판의 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌의 산화로 인한 전하는 전류-시간 곡선에서 피크 전류 아래의 영역을 적분함으로써 얻을 수 있는 것을 확인할 수 있다. 또한, 혈소판의 충돌 또는 흡착시 혈소판 내의 세로토닌의 산화로 인한 전하는 혈소판 내 세로토닌의 농도를 구하는데 이용될 수 있다(수학식 1 참조).

[0139] 예를 들어, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치를 통하여 세로토닌 농도를 측정한 결과(수학식 1 참조), 어느 한 단일 혈소판 내 세로토닌 농도가 178 μ M로 측정되었다. 이를 이전에 보고된 파립형의 혈소판 내 존재하는 세로토닌 농도 값을 이용하여 비교하였다. 단일 혈소판 입자의 치밀과립 내 존재하는 세로토닌 농도 값은 65 mM로 알려져 있다. 단일 혈소판 내 치밀과립의 평균 직경은 161 nm이며, 단일 혈소판의 치밀과립 당 세로토닌 분자 1.42×10^{-19} mol을 생성한다. 단일 혈소판 입자 당 6 개의 치밀과립이 있으며, 따라서 단일 혈소판 입자 당 세로토닌 분자의 수는 8.52×10^{-19} mol이다. 이 값을 9 fL(혈소판 입자의 평균 부피)로 나누면 단일 혈소판 입자의 세로토닌 농도는 94.7 μ M이다. 이 값은 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 얻은 세로토닌의 농도인 178 μ M의 중앙값(89 μ M)과 매우 유사한 것을 확인할 수 있다.

[0141] 실험예 4. 충돌 주파수에 따른 혈소판의 농도 측정

[0142] 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치는 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 측정부에서 측정한 혈소판의 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판의 농도를 구할 수 있다.

[0143] 혈소판의 최종 농도가 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM이 되도록 혈소판풍부혈장(PRP) 용액을 생리 식염수에 첨가하고, 직경이 25 μ m인 Pt UME를 사용하여 0.5 V로 전위를 인가하여 전류-시간 곡선을 측정하였고, 수

집된 데이터로부터 회귀 분석을 통하여 혈소판의 농도와 혈소판의 충돌 주파수의 관계를 도출하였다.

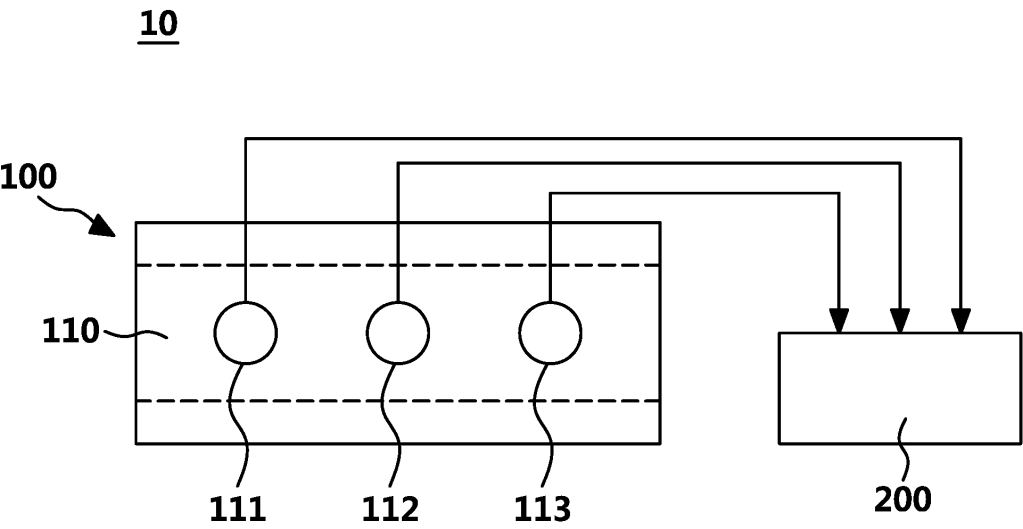
- [0144] 충돌 횟수는 각각 혈소판의 농도가 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM일때, $1.6 (\pm 0.9)$, $2.7 (\pm 1.5)$, $4.7 (\pm 2.3)$ 및 $9.0 (\pm 3.5)$ 이었다. 이와 같은 실험 결과를 바탕으로 회귀 분석을 통하여 혈소판의 농도를 충돌 주파수로 변환하는 상기 수학적 2를 도출했다(수학적 2 참조).
- [0145] 이에 따라 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 상기 수학적 2를 통하여 작업전극의 표면에 상기 혈소판이 충돌 또는 흡착시 발생하는 혈소판의 충돌 주파수를 측정하여 상기 혈소판의 농도를 구할 수 있다. 보다 구체적으로, 도출한 상기 수학적 2를 통해 혈소판을 포함한 시료의 충돌 횟수를 측정 시간으로 나누어 충돌 주파수를 계산할 수 있고, 이렇게 계산된 충돌 주파수를 통하여 상기 혈소판을 포함한 시료에 존재하는 혈소판의 농도를 구할 수 있다.
- [0146] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치에서 혈소판의 충돌 주파수에 따른 혈소판의 농도 값을 도시한 것이다. 도 10에서 도시된 오차 막대는 5 개 이상의 시료 측정에서의 표준 편차를 나타낸다.
- [0147] 도 10을 참조하면, 혈소판의 농도가 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM의 혈소판풍부혈장(PRP) 용액에서 각각의 혈소판의 충돌 주파수(실험 값)는 $0.008 (\pm 0.004)$, $0.014 (\pm 0.007)$, $0.023 (\pm 0.012)$ 및 $0.045 (\pm 0.018)$ Hz인 것을 확인할 수 있다(수학적 2 참조).
- [0148] 다만, 혈소판의 농도가 10.1 fM, 20.1 fM, 40.2 fM 및 100 fM의 혈소판풍부혈장(PRP) 용액에서 상기 수학적 3을 통해 구한 혈소판의 충돌 주파수의 이론 값은 각각 0.0005, 0.0009, 0.0019 및 0.0047 Hz로서, 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치를 통해 실험적으로 측정한 혈소판의 충돌 주파수가 그 이론 값보다 10 내지 16 배 더 큰 것을 확인할 수 있다(수학적 3 참조).
- [0149] 이는 마이그레이션 효과(migration effect)에 의한 것으로 추정할 수 있다. 보다 구체적으로, 전극의 인가 전위는 0.5 V이고, 혈소판의 제타 전위(zeta potential)는 -14.2 mV이기 때문에, 양으로 하전된 전극과 음으로 하전된 혈소판 입자 사이의 이동은 혈소판의 충돌 주파수의 이론 값보다 더 높은 충돌 주파수를 야기할 수 있다.
- [0150] 상술한 바에 따른 본 발명의 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치 및 그 측정 방법은 추가적인 활성화 물질이나 광학 설정없이 전기화학적 방법을 통해 간편하고 정확하게 혈소판과 세로토닌의 농도를 측정할 수 있다.
- [0151] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다.
- [0152] 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

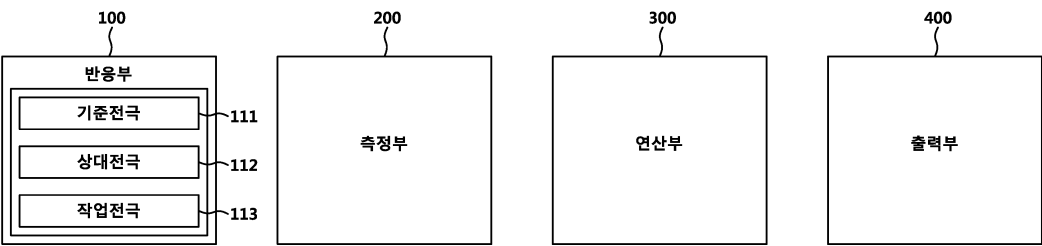
- [0154] 10: 혈소판 및 세로토닌 농도 측정 장치
 100: 반응부
 110: 전극부
 111: 기준전극
 112: 상대전극
 113: 작업전극
 200: 측정부
 300: 연산부
 400: 출력부

도면

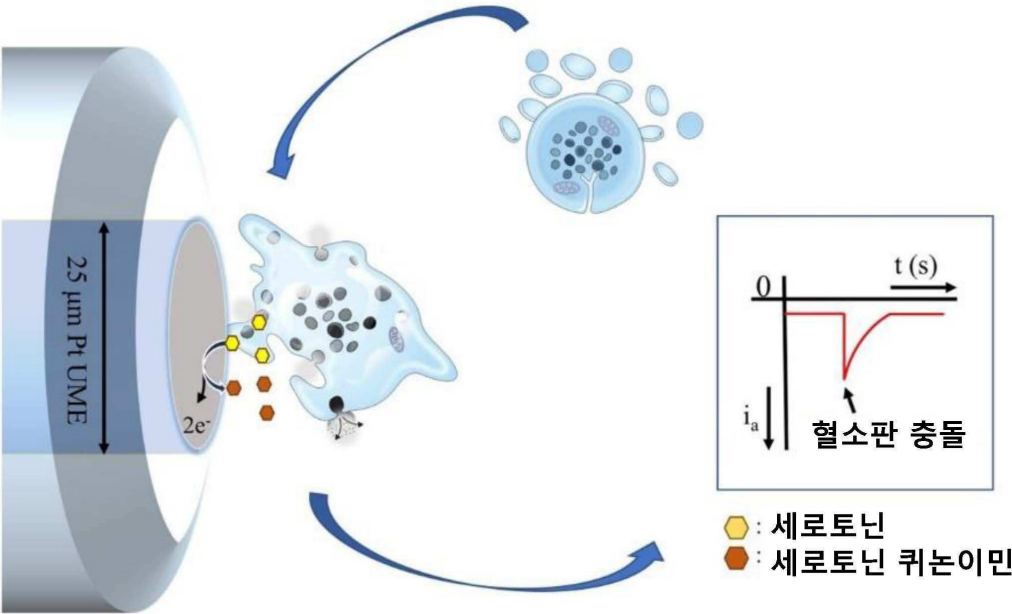
도면1



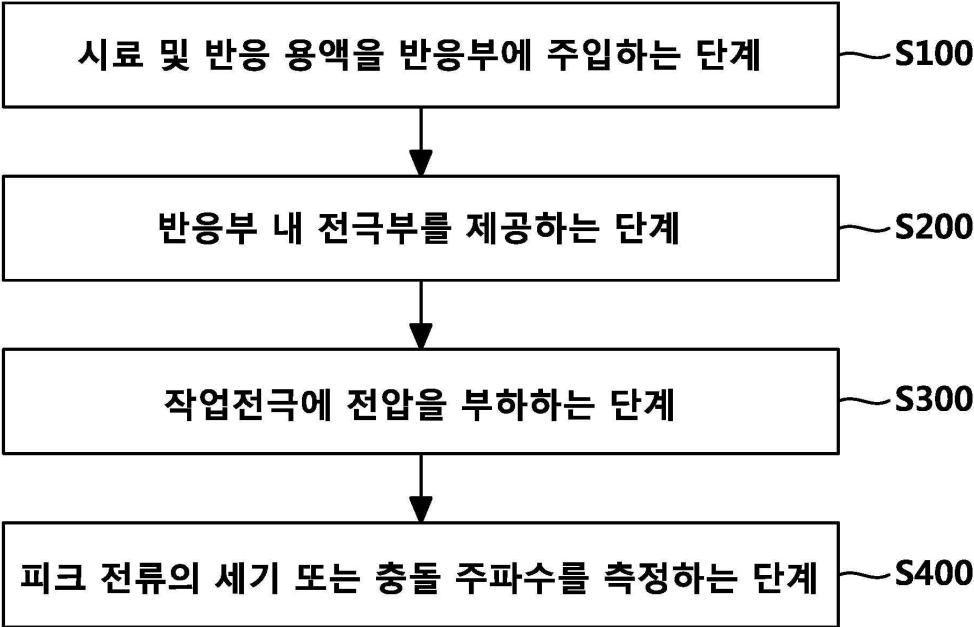
도면2



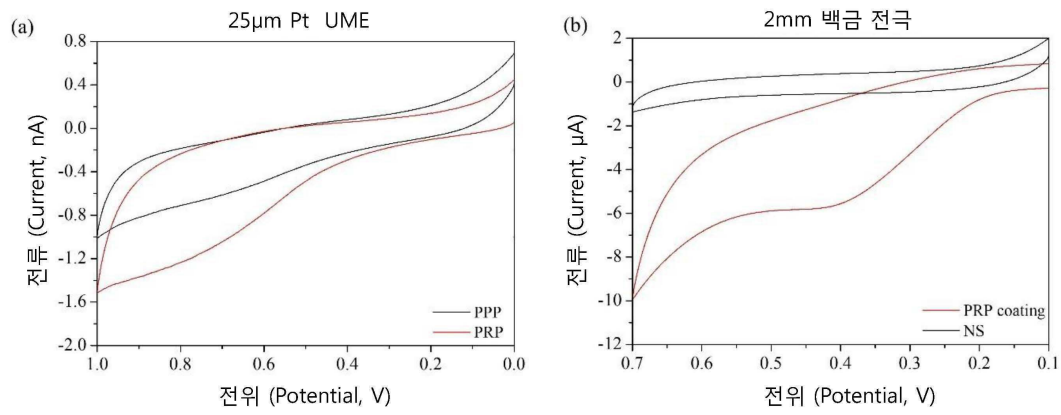
도면3



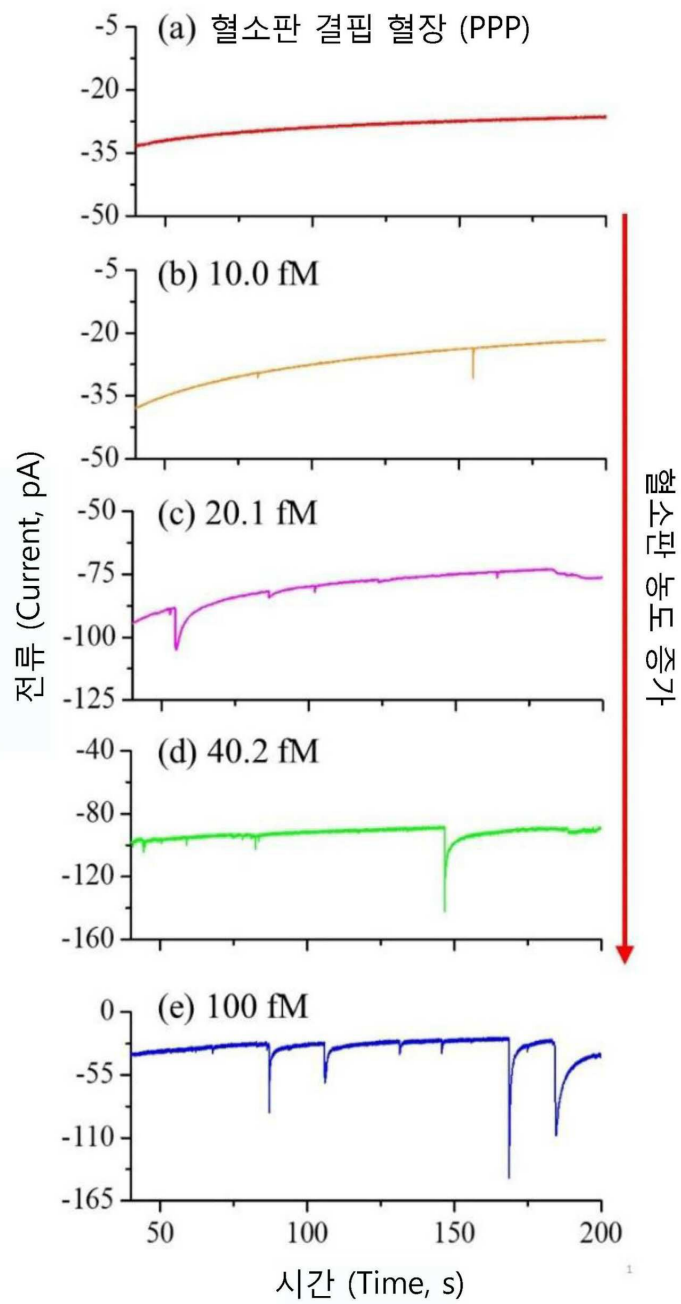
도면4



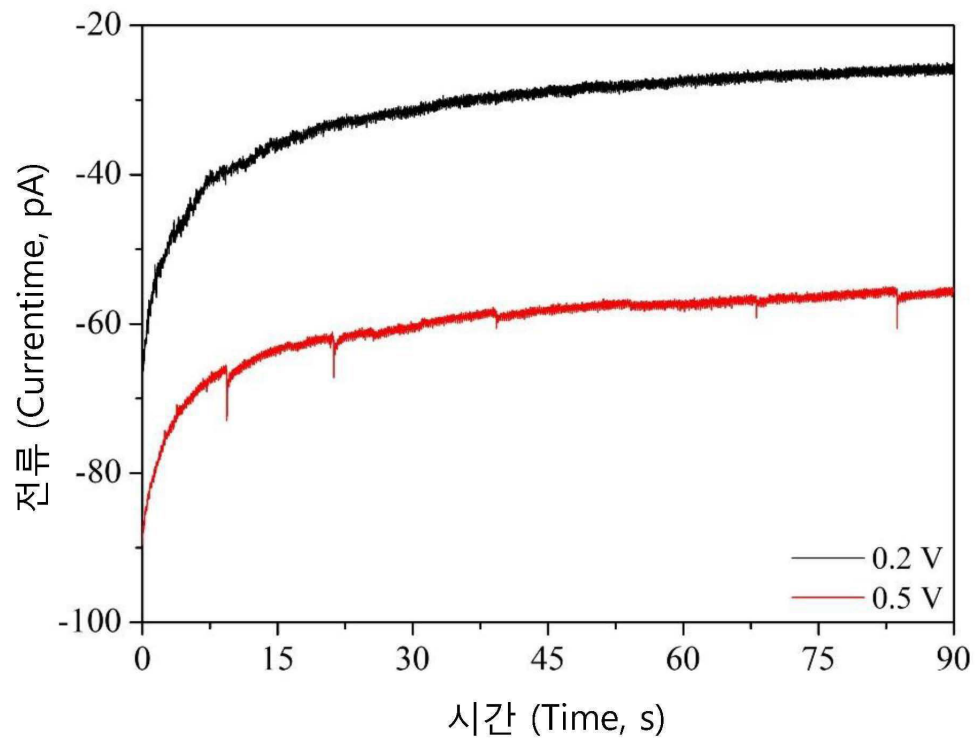
도면5



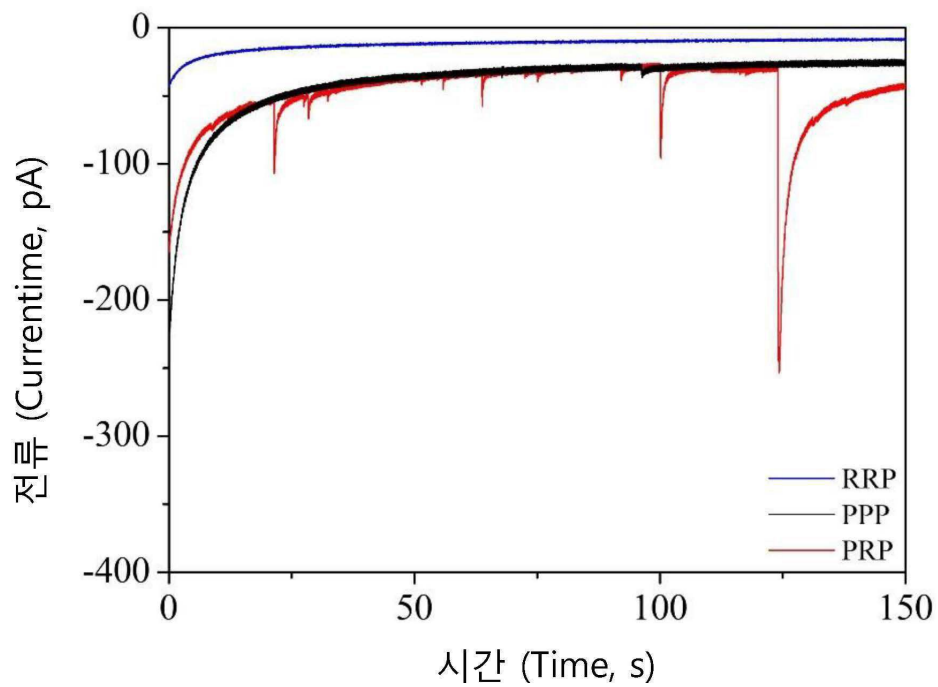
도면6



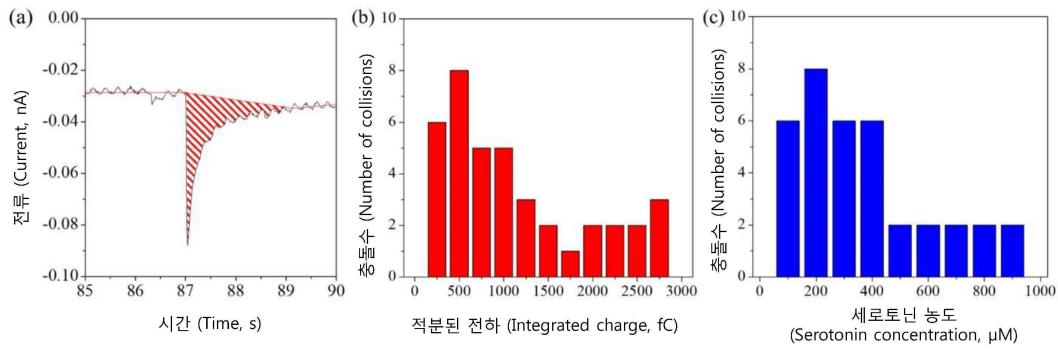
도면7



도면8



도면9



도면10

