



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0024405
(43) 공개일자 2015년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 5/1455 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2015-7001132
(22) 출원일자(국제) 2013년06월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년01월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/062366
(87) 국제공개번호 WO 2013/186357
국제공개일자 2013년12월19일
(30) 우선권주장
12172251.6 2012년06월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/660,016 2012년06월15일 미국(US)

(71) 출원인
프레제니우스 메디칼 케어 도이칠란드 게엠베하
독일연방공화국, 61352 바드 홈부르크, 엘제-크뢰너-스트라쎄 1
(72) 발명자
가겔, 알프레드
독일, 96123 리첸도르프, 마인처 슈트라쎄 4아
마이에르호퍼, 안드레아스
독일, 97422 슈바인푸르트, 도이치켈트 슈트라쎄 12
(74) 대리인
한양특허법인

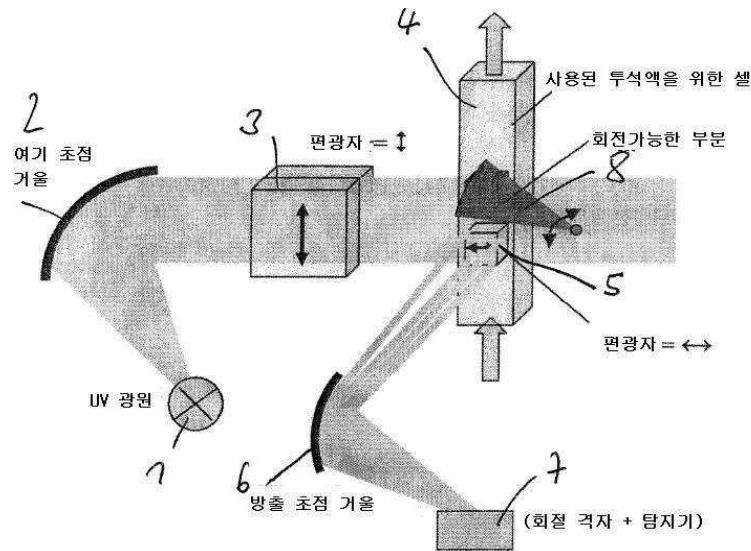
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 환자의 체외 혈액 처리를 모니터링하기 위한 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 환자의 투석 처리를 모니터링하기 위한 방법, 바람직하게는 혈액투석여과 및/또는 복막투석 처리를 모니터링하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은, - 체외 혈액 처리에 사용되는 유체의 샘플을 선편광된 조사광으로 조사하는 단계; - 제1 편광면에서 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계; - 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면에서 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계; - 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하는 단계; 및 - 상기 결정된 이방성과 상기 투석 유체에 의해 방출된 형광 광의 강도 둘 다에 기초하여 상기 유체에서 1개 이상의 형광단의 농도를 결정하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

환자의 체외 혈액 처리, 바람직하게는 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막투석 처리를 모니터링하기 위한 방법으로서,

상기 방법은,

- 상기 체외 혈액 처리에 사용되는 유체의 샘플을 선편광된 조사광(linearly polarized irradiation light)으로 조사하는 단계;
- 제1 편광면에서 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계;
- 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면에서 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계;
- 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하는 단계; 및
- 상기 결정된 이방성과 상기 유체에 의해 방출된 형광 광의 강도 둘 다에 기초하여 상기 유체의 샘플에서 1개 이상의 형광단(fluorophore)의 농도를 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제1 편광면 및 제2 편광면은 서로에 대해 수직으로 배향되어 있으며, 이방성 (A)은 하기 수학적식:

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}}$$

을 근거로 결정되고, 여기서, I_{vv} 는 수직 편광면에서 탐지된 형광 광의 강도이고, I_{vh} 는 수평 편광면에서 탐지된 형광 광의 강도이고, G는 상기 제1 편광면 및 제2 편광면에서 강도를 탐지할 때 기기의 감도 차이를 보정하는 기기 상수(apparatus constant)인 것인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 형광 광의 강도는 소정의 조사 파장(irradiation wavelength)에서 상기 유체의 샘플을 조명할 때 소정의 탐지 파장에서 탐지되며, 상기 이방성은 개개의 형광단을 결정하기 위해 사용되며, 상기 형광 광의 강도는 이 개개의 형광단의 농도를 결정하기 위해 사용되며, 바람직하게는 특정한 개개의 형광단의 이방성은 공지되어 있는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유체의 샘플에 존재하는 2개 이상의 형광단의 농도는 합계 스펙트럼의 총 이방성 (A_{ges})의 하기 수학적식:

$$A_{ges} = \sum_i f_i * A_i$$

$$f_i = \frac{S_i}{S_{ges}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,ges} + 2 * G * I_{vh,ges}}$$

을 근거로 결정되고, 여기서, A_{ges} 은 합계 스펙트럼의 총 이방성이고, A_i 는 i번째 형광단의 이방성이고, f_i 는 총 강도에 대한 i번째 형광단의 강도 분율(fraction)이고, S_i 는 i번째 형광단의 물리적 복사(physical radiation)의 총 강도이고, S_{ges} 는 모든 형광단의 물리적 복사의 총 강도이고,

$I_{vh,i}$ 는 i 번째 형광단의 탐지된 수평 형광 강도이고, $I_{vv,i}$ 는 i 번째 형광단의 탐지된 수직 형광 강도이고, i 는 모든 형광단에 대한 지수(index)이고, 상기 i 번째 형광단의 이방성 (A_i)은 바람직하게는 공지되어 있는 것인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유체의 샘플은 연속적으로 조사되며, 상기 탐지는 연속적으로 수행되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광단의 농도는 총 이방성에 기초하여 직접 결정되며, 바람직하게는 알부민의 농도는 총 이방성에 기초하여 결정되는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광단의 농도, 바람직하게는 인간 알부민의 농도는 탐지된 형광 광의 수직 및 수평 강도에 기초하여 직접 결정되는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유체의 샘플은 펄스화되고 선편광된 조사광으로 조사되고 상기 제1 편광면 및 제2 편광면에서의 형광 광의 탐지는 시간-분해 방식(time-resolved fashion)으로 수행되며,

$$A = A_0 * e^{-t/\theta}$$

로서,

여기서, θ 는 분자의 회전에 의해 전이 쌍극자 모멘트의 축이 발산형으로(diffusely) 배향되는 기간을 설명하는 특성 시간 상수(characteristic time constant)인 회전 상관 시간(rotation correlation time)이며, A_0 는 편광 소멸 효과(depolarizing effects)가 적용되기 이전인 $t=0$ 시점에서의 이방성인 것인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 회전 상관 시간은 상기 유체의 샘플의 온도를 변화시킴으로써, 상기 유체의 샘플의 점도를 변화시킴으로써, 및/또는 외부 자기장 및/또는 전기장을 적용함으로써 변화되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 총 형광 강도는 외부 전기장 및/또는 자기장의 적용에 의해 상기 유체의 샘플의 전이 쌍극자 모멘트를 정렬함으로써 증가하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서, 측정된 이방성 스펙트럼의 매트릭스 분해가 수행되고, 공지된 물질의 공지된 이방성 스펙트럼에 대한 비교가 수행되어 공지된 물질의 각각의 강도에 기초하여 이의 각각의 농도를 결정하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플 중 인간 알부민의 농도는 탐지된 수평 강도로부터 탐지된 수직 강도의 공제에 기초하여 결정되는 것인 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 체외 혈액 처리에 사용되는 유체는 환자의 투석, 혈액 투석, 혈액투석여과 및/또는 복막투석 처리에 사용되는 투석 유체, 또는 환자의 혈액여과 처리의 한외여과물인

것인 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서, 기준 측정은 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과 및/또는 복막투석 처리에서의 새로운 투석 유체에 대해 수행되며, 바람직하게는

- 상기 체외 혈액 처리에 사용될 새로운 투석 유체의 샘플을 선편광된 조사광으로 조사하는 단계;
- 제1 편광면에서 상기 새로운 투석 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계;
- 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면에서 상기 새로운 투석 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계;
- 상기 새로운 투석 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하는 단계; 및
- 상기 결정된 이방성과 상기 유체에 의해 방출된 형광 광의 강도 둘 다에 기초하여 상기 새로운 투석 유체의 샘플에서 1개 이상의 형광단의 농도를 결정하는 단계를 사용하는 것인 방법.

청구항 15

환자의 체외 혈액 처리, 바람직하게는 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막투석 처리를 모니터링하기 위한 장치로서,

상기 장치는, 투석 처리에 사용되는 유체의 샘플을 선편광으로 조사하기 위한 조사 광원(irradiation light source) (1), 및 제1 편광면 및 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면에서 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하기 위한 탐지기 (7)를 포함하고, 여기서, 분석 유닛(A)이 존재하여 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하고 상기 결정된 이방성 및 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도에 기초하여 상기 유체의 샘플에서 1개 이상의 형광단의 농도를 결정하는 것인 장치.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 각을 이루면서 정렬된 편광면을 가지는 2개 이상의 편광자(polarizer) (5, 5')가 유체의 샘플과 형광 광의 강도를 탐지하기 위한 탐지기 (7) 사이에 제공되고, 이동성 셔터(movable shutter) (8)가 2개의 편광자 (5, 5') 중 어느 하나를 교대로 가려서 2개의 편광면에서 형광 광의 강도를 교대로 탐지하도록 광로에 존재하는 것인 장치.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 추가적으로 회전 가능한 셔터가 유체의 샘플을 투과한 광원의 광의 광로에 존재하여 2개 이상의 편광면에서의 상기 형광 광의 강도 뿐만 아니라 상기 투과된 광의 강도가 단일 탐지기에 의해 탐지될 수 있는 것인 장치.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 제1 편광면과 연관된 편광자(associated polarizer) (5)를 가지는 제1 탐지기 및 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면과 연관된 편광자 (5')를 가지는 제2 탐지기가 상기 유체의 샘플의 반대 편에 배열되어 제1 편광면 및 제2 편광면의 형광 광을 동시에 탐지하는 것인 장치.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 제3 탐지기 (9)가 조사광과 동일선상에(collinearly) 존재하여 상기 유체의 샘플이 상기 탐지기와 상기 조사 광원 사이에 위치하여 투과 강도를 탐지하도록 하는 것인 장치.

청구항 20

청구항 15 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치는 청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 기재된 방법을 수행하도록 구성된 장치.

청구항 21

환자에 대한 체외 혈액 처리, 바람직하게는 환자에 대한 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막 투석 처리를 수행하기 위한 체외 혈액 처리 기기로서,

청구항 15 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 기재된 환자의 체외 혈액 처리를 모니터링하기 위한 장치가 존재하는 것인 체외 혈액 처리 기기.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 환자의 체외 혈액 처리, 바람직하게는 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막 투석 처리를 모니터링하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 투석은 가장 일반적으로 알려지고 사용되는 체외 혈액 처리 방법 중 하나이고 환자에게 신장의 신부전이 발생했을 때 신장의 기능을 대체하기 위한 목적이다.

[0003] 신장이 망가지는 경우, 환자를 투석하는 것은 환자의 혈액으로부터 요소, 크레아티닌 및 요독증 독소와 같은 노폐물을 제거하기 위해 필요하다. 더욱이, 투석 도중, 과량의 물 및 보통 소변에 의해 제거되는 다른 물질들이 환자의 신체로부터 제거된다. 가장 흔하게 사용되는 투석의 방법은 혈액투석으로, 환자의 혈액이 투석막을 따라 흐르고, 이 투석막의 반대편에서 투석액이 제공된다. 따라서, 혈액 및 투석액이 다공성 막에 의해 분리된다.

[0004] 이 막을 통하여, 혈액과 투석액 사이의 농도 구배로 인해 환자의 혈액으로부터 제거될 물질들이 확산한다. 확산 속도가 매우 느린 더 큰 분자들은 또한 혈액 쪽에서 막의 투석액 쪽으로 액체 흐름에 의해 대류적으로 (convectively) 수송될 수 있다.

[0005] 투석액은 꼭 모든 물질에 대해서는 아니고, 임의의 물질에 대해서 혈액 쪽에서 투석액 쪽으로 농도 구배를 제공하는 농도를 가지도록 제조된다. 사실상, 인체 내의 다른 노폐물 뿐만 아니라 요소 및 크레아티닌의 제거는 바람직하지만, 예를 들면, 칼륨, 나트륨 또는 중탄산염과 같은 전해질의 제거 또는 농도의 변화는 전혀 바람직하지 않고 해로운 것으로 여겨진다. 따라서, 투석액은 일반적으로 환자의 혈장 내의 전해질 농도와 유사한 전해질 농도를 포함하도록 하여, 이 물질들에 대해서는 농도 구배는 존재하지 않는다.

[0006] 혈액투석 이외에, 복막투석이 막을 통하여 투석액으로 노폐물의 확산을 달성하기 위해 역시 막 및 투석액을 사용하는 또 다른 투석 방법이다. 그러나, 상기 막은 생체막, 즉 복막이고 상기 투석액은 직접 복강으로 도입된다.

[0007] 투석 도중, 과량의 물과 작은 분자의 요독증 물질, 예를 들면, 요소 및 크레아티닌의 제거는 일반적으로 문제가 없지만, 더 큰 분자는 다공성 막을 통하여 제거하기가 더욱 어렵다. 이 문제를 해결하기 위해, 특정한 고 유량 투석막이 혈액투석여과와 같은 아주 대류적인 방법과 결합하여 제공된다. 이는 소위 중간-크기의 분자의 범위인 1 kDa 이상의 분자 질량을 가지는 분자의 제거가 향상되는 결과를 야기하였다. 혈액투석여과에서, 상기에 설명된 형태로 투석액을 사용하는 확산 방법은 혈액여과와 결합되고, 환자의 혈액이 필터를 가로지르는 압력 구배의 대상이 된다. 따라서, 압력 구배에 따른 여과 방법은 증가된 액체 흐름을 유발하고, 그래서 중간-크기 분자의 상당한 부분의 제거를 가능하게 하는 매우 대류적인 방법으로 여겨진다. 그러나, 압력 구배 때문에, 전해질 및 당류 뿐만 아니라 물 또한 환자의 혈액으로부터 고속으로 제거되고 이러한 혈액 성분들은 대체액의 투입에 의해 대체되어야 한다.

[0008] 매우 대류적인 방법과 결합한 고 유량 막의 도입은 중간-크기 및 더 큰 분자의 제거를 향상시킨다.

[0009] 더 큰 분자는 일반적으로 단백질, 예를 들면, 베타2-마이크로글로불린은 약 11 kDa의 크기를 가지며, 이 분자는 충분히 제거되지 않으면 아밀로이드증을 유발한다. 독성이 있는 더 작은 분자 또한 그 분자가 단백질에 결합되면 투석하기가 어려울 수 있다. 예를 들면, 단백질에 결합된 요독증 독소는 p-크레실 설페이트 및 인독실 설페이트이다.

[0010] 따라서, 투석막에서 이 중간-크기의 분자가 통과할 수 있을 만큼 충분히 큰 구멍 크기를 가지는 것이 바람직하

다. 반면에, 막의 구멍 크기가 커질수록, 필수적인 혈액 성분 또한 유실될 위험이 높아지기 때문에 막의 구멍 크기는 무한히 확장될 수 없다. 따라서, 막의 투과성은 일반적으로 약 60 kDa의 크기로 제한된다. 그러나, 이 값은 약 66 kDa의 크기를 가지는 인간 혈장 알부민의 분자 질량의 아주 약간 이하이다. 실제로, 임상적으로 중요한 알부민의 손실이 일어날 수 있는데 이러한 손실은 중요하게 방법의 투석액에서 각각의 압력 및 각각의 농도와 같은 각각의 파라미터에 의존한다. 특히, 혈액여과 도중에 도입된 압력 구배와 결합된 고 유량 막은 인간 알부민의 제거를 증가시킨다. 다른 처리 사이에 필요한 막의 세척이 막에서 구멍의 크기를 증가시키는 경향이 기 때문에, 인간 알부민 손실의 또 다른 이유는 막의 다회 사용일 수 있다. 이는 더 큰 분자에 대한 막의 투과성을 변화시킨다. 따라서, 심지어 정상 조건 하의 정상 혈액투석에서도, 인간 혈청 알부민은 막을 관통할 수 있다.

[0011] 말할 필요도 없이 복막투석의 경우에는 막의 구멍의 크기는 영향받을 수 없지만 환자 각각의 복막의 상태에 의해 영향받는다. 그러나, 투석액으로 인간 알부민의 손실은 그럼에도 불구하고, 예를 들면, 염증에 의해 일단 복막이 손상되면 일어날 수 있다.

[0012] 투석 도중에 분해물의 제거를 확인하기 위해, 라만 분광법이 US 2008/0158544 A1에 개시되며, 상기 라만 분광 측정기는 1개 이상의 분해 물질, 예를 들면, 요소의 독특한 라만 분광 특징을 활용하고, 확인하고, 전체 혈액 백그라운드에 대해 이러한 분해물을 정량하기 위해 혈액이 투석기를 통과한 후에 측정된다.

[0013] WO 2010/091826 A1은 혈액의 체외 처리 기구에 관한 것으로, K_t/V 값, 즉 깨끗한 물질의 체적 유량의 제거 (K)를 결정하기 위해 투석액에서 전자기 복사(radiation)의 흡수가 측정되며, t는 처리 시간이고 V는 환자의 분포 부피이다. 신대체요법(renal replacement therapy)에서, 요소는 일반적으로 요산의 처리 효율성을 측정하기 위한 마커 물질로써 사용되며, K는 요산 제거이고 V는 환자의 요소 분포 부피이고, 원칙적으로 환자의 체수분량과 일치한다. 그러나, 총 흡수를 측정함으로써, 일반적으로 특정 분자의 제거는 확인될 수 없다.

[0014] 따라서, 이 상황을 의료인에게 알리기 위해 투석 처리 도중에 인간 알부민의 손실을 모니터링하는 것이 바람직하며, 과량의 알부민 손실의 경우에는 이 처리가 조절될 수 있거나, 자동적으로라도 조절하거나, 심지어 처리를 중단한다.

[0015] 더욱이, p-크레실 설페이트 및 인독실 설페이트 또는 페닐과 같은 더 작은 분자 물질뿐만 아니라 상기에 언급된 중간 분자들과 같은 다른 단백질 (66 kDa보다 작은 크기의 단백질)은 또한 이 물질들이 독성이 있기 때문에 그들의 제거에 관해서도 또한 결정된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 따라서, 본 발명의 목적은 환자의 체외 혈액 처리를 모니터링하기 위한 방법 및 기구를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 이 목적은 청구항 1에 따른 방법에 의해 해결된다. 유리한 실시형태는 종속항으로부터 얻어질 수 있다.

[0018] 따라서, 환자의 체외 혈액 처리, 바람직하게는 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막투석 처리를 모니터링하기 위한 방법은, 체외 혈액 처리에 사용되는 유체의 샘플을 선편광된 조사광으로 조사하는 단계, 제1 편광면에서 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계, 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면에서 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계, 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하는 단계, 및 상기 결정된 이방성과 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도 둘 다에 기초하여 상기 유체의 샘플에서 1개 이상의 형광단의 농도를 결정하는 단계를 포함한다. 상기 유체의 샘플에서 각 형광단의 농도를 측정된 이방성 및 편광된 형광 광의 강도에 기초하여 결정함으로써, 상기 유체의 샘플에서 여러 가지 형광 활성 물질의 형광 신호를 구별하는 것이 가능하다. 사실상, 상기 유체의 샘플에서 각각의 형광단의 각각의 농도를 결정하기 위한 이방성을 사용함으로써, 상기 유체의 샘플에서 각각의 형광단의 각각의 농도를 결정하는 것이 가능해지는데, 이는 각각의 형광단에 대한 이방성이 상이하기 때문이다.

[0019] 체외 혈액 처리에 사용되는 유체는 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과 및/또는 복막투석 처리의 경우에 투석 유체 또는 환자의 혈액여과 처리의 경우 한외여과물일 수 있다.

[0020] 이러한 형광 분광법의 변형을 사용함으로써, 예를 들면, 대류적인 투석 처리가 처리 중에 온라인으로 결정될 수

있다. 이런 수행은 예를 들면 투석 유체의 내용물을 분석함으로써 결정될 수 있다. 만약 특정 분자의 제거가 임의의 허용치 이하이거나 또는 만약 인간 알부민 등의 물질이 용납될 수 없는 양으로 환자의 혈장으로부터 제거된다면, 상기 처리는 처리 장치에 의해 자동적으로 조절될 수 있고 및/또는 경보가 내려질 수 있다.

[0021] 바람직하게, 상기 제1 편광면 및 상기 제2 편광면은 서로에 대하여 수직으로 배향되어 있으며, 이방성 (A)은 하기 수학적식:

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}}$$

[0022]

[0023] 으로서, 여기서, I_{vv} 는 수직 편광면에서 탐지된 형광 광의 강도이고, I_{vh} 는 수평 편광면에서 탐지된 형광 광의 강도이고, G는 상기 제1 및 제2 편광면에서 강도를 탐지할 때 기기의 감도 차이를 보정하는 기기 상수(apparatus constant)인 수학적식을 기초로 하여 결정된다. 상기 이방성은 형광단을 정확히 결정하기 위해 사용될 수 있는데, 상이한 형광단은 상이한 이방성을 보이기 때문이다.

[0024]

더 바람직한 일 실시형태에 있어서 소정의 조사 파장(irradiation wavelength)에서 상기 샘플을 조명할 때 소정의 탐지 파장에서 형광 광의 강도가 탐지되며, 상기 이방성은 각각의 형광단을 결정하기 위해 사용되며, 상기 형광 광의 강도는 각각의 형광단의 농도를 결정하기 위해 사용되며, 바람직하게는 특정한 개개의 형광단의 이방성은 공지된 것이다.

[0025]

바람직하게, 상기 유체의 샘플에 존재하는 2개 이상의 형광단의 농도는 합계 스펙트럼의 총 이방성 (A_{ges})의 하기 수학적식:

$$A_{ges} = \sum_i f_i * A_i$$

[0026]

$$f_i = \frac{S_i}{S_{ges}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,ges} + 2 * G * I_{vh,ges}}$$

[0027]

으로서, 여기서, 이고,

[0028]

A_{ges} 는 합계 스펙트럼의 총 이방성이고, A_i 는 i 번째 형광단의 이방성이고, f_i 는 총 강도에 대한 i 번째 형광단의 강도 분율(fraction)이고, S_i 는 i 번째 형광단의 물리적 복사(physical radiation)의 총 강도이고, S_{ges} 는 모든 형광단의 물리적 복사의 총 강도이고, $I_{vh,i}$ 는 i 번째 형광단의 탐지된 수평 형광 강도이고, $I_{vv,i}$ 는 i 번째 형광단의 탐지된 수직 형광 강도이고, i 는 모든 형광단의 지수이고, 상기 i 번째 형광단의 이방성 A_i 는 바람직하게는 공지되어 있는 수학적식에 기초하여 결정된다. 이를 기초로, 탐지된 형광에 기초한 유체의 샘플에서 2개 이상의 형광단의 농도를 결정하는 것이 가능해진다. 다시 말해서, 상기 유체의 샘플, 예를 들면, 투석 유체 또는 한의 여과물에서, 상이한 각각의 형광단을 구별하는 것이 가능해진다.

[0029]

더욱이, 상기 유체의 샘플을 연속적으로 조사하며 탐지를 연속적으로 수행하는 것이 바람직하다. 상이한 유체의 샘플의 농도의 변화가 이러한 방식으로 쉽게 관찰될 수 있다. 상기 용어 "연속적"은 환자의 체외 혈액 처리 도중, 예를 들면, 체외 혈액 처리 기구의 셋-업(set-up) 또는 조절 도중에, 측정 과정의 짧은 차단(interceptions)을 포함하는 것으로 이해된다.

[0030]

바람직하게, 형광단의 농도는 총 이방성에 기초하여 직접 결정되며, 바람직하게는 알부민의 농도가 총 이방성에 기초하여 결정된다. 이는 총 이방성에 대한 상기 형광단의 기여가 중요한 경우에 특히 도움이 된다.

[0031]

바람직한 일 실시형태에 있어서, 형광단의 농도, 바람직하게는 인간 알부민의 농도는 탐지된 형광 광의 수직 및 수평 강도에 기초하여 직접 결정된다. 이는, 다시, 투석 유체의 총 이방성에 대한 형광단의 기여가 중요한 때에 특히 적합하다. 이 방법에 기초하여, 상기 농도의 결정은 수행하기가 매우 용이하다.

[0032]

더욱 바람직한 일 실시형태에 있어서, 상기 유체의 샘플은 펄스화되고 선편광된 조사광으로 조사되고 상기 제1 및 제2 편광면에서 형광 광의 탐지는 시간-분해 방식(time-resolved fashion)으로 수행되며, 상기 이방성은

$$A = A_0 * e^{-t/\theta}$$

- [0033]
- [0034] 로서 정의되며, 여기서, θ 는 분자의 회전에 의해 전이 쌍극자 모멘트의 축이 확산형으로(diffusely) 배향되는 시간을 설명하는 특성 시간 상수이며, A_0 는 편광 소멸 효과(depolarizing effects)가 적용되기 이전인 $t=0$ 시점에서 이방성이다. 상기 이방성의 회전 상관 시간 θ 는 형광단의 실체(substance)를 결정하기 위해 사용되는데, 각 형광단은 상이한 회전 상관 시간 θ 를 갖기 때문이다.
- [0035] 바람직하게, 상기 회전 상관 시간 θ 는 상기 회전 상관 시간 θ 의 거동에 기초하여 상기 형광단을 더 확인하기 위해 상기 유체의 샘플의 온도를 변화시킴으로써, 상기 유체의 샘플의 점도를 변화시킴으로써, 및/또는 외부 자기장 및/또는 전기장을 적용함으로써 변화될 수 있다.
- [0036] 더 바람직한 방법에 있어서, 총 형광 강도가 외부 전기장 및/또는 자기장의 적용에 의해 상기 샘플의 전이 쌍극자 모멘트를 정렬함으로써 증가된다. 외부 장(fields)의 적용은 탐지된 강도의 증가를 돕고, 그래서, 신호 대 잡음비(signal to noise ratio)를 향상시킨다.
- [0037] 바람직하게, 측정된 이방성 스펙트럼의 매트릭스 분해가 수행되고 공지된 물질의 각각의 농도를 각각의 강도에 기초하여 결정하기 위해 공지된 물질의 공지된 이방성 스펙트럼에 대한 비교가 수행된다. 이를 기초로, 상기 액체의 샘플의 실제 조성에 관해서 형광 스펙트럼의 복잡한 중첩(superpositions) 조차도 분석하는 것이 가능해진다.
- [0038] 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과 및/또는 복막투석 처리에서 새로운 투석 유체에 기준 측정을 수행하는 것이 바람직하며 사용된 투석 유체로부터 얻어진 측정값(readings)에 대한 초기 투석 유체의 오염의 기여는 제거될 수 있다. 이 방법은 바람직하게는 상기 체의 혈액 처리에 사용될 새로운 투석 유체의 샘플을 선편광된 조사광으로 조사하는 단계; 제1 편광면에서 상기 새로운 투석 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계; 상기 제1 편광면과는 상이한 제2 편광면에서 상기 새로운 투석 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하는 단계; 상기 새로운 투석 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하는 단계; 및 상기 결정된 이방성과 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도 둘 다에 기초하여 상기 새로운 투석 유체의 샘플에서 1개 이상의 형광단의 농도를 결정하는 단계를 사용한다.
- [0039] 또 다른 바람직한 방법에서, 상기 샘플 중 인간 알부민의 농도는 탐지된 수평 강도에서 탐지된 수직 강도를 뺀 뺄셈(subtraction)에 기초하여 결정된다.
- [0040] 상기-언급된 목적은 또한 청구항 15의 특징을 가지는 장치에 의해 만족된다. 바람직한 실시형태는 종속항으로부터 얻어질 수 있다.
- [0041] 따라서, 환자의 체의 혈액 처리, 바람직하게는 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막투석 처리를 모니터링하기 위한 장치는 투석 처리에 사용되는 유체의 샘플을 선편광으로 조사하기 위한 조사광원 및 제1 편광면 및 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면에서 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도를 탐지하기 위한 탐지기를 포함하고, 분석 유닛이 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 이방성을 결정하고 상기 결정된 이방성 및 상기 유체의 샘플에 의해 방출된 형광 광의 강도에 기초하여 상기 유체의 샘플에서 1개 이상의 형광단(fluorophore)의 농도를 결정하기 존재한다.
- [0042] 바람직하게, 각을 이루면서 정렬된 편광면을 가지는 2개 이상의 편광자(polarizer)가 유체의 샘플과 형광 광의 강도를 탐지하기 위한 탐지기 사이에 제공되고, 이동성 셔터(movable shutter)가 2개의 편광면에서 형광 광의 강도를 교대로 탐지하기 위해 2개의 편광자 중 어느 하나를 교대로 가리기 위해 광로에 존재한다. 2개의 편광자의 제공에 의해, 광학 부분(optical parts)의 움직임을 방지하는 셋업(setup)이 제공될 수 있고, 그래서 신뢰할 수 있는 측정을 가능케 한다.
- [0043] 바람직하게, 회전 가능한 셔터가 유체의 샘플을 투과한 광원의 광의 광로에 존재할 수 있어 2개 이상의 편광면에서 상기 형광 광의 강도뿐만 아니라 상기 투과된 광의 강도가 단일 탐지기에 의해 탐지될 수 있다.
- [0044] 더욱이, 대안에서, 제1 편광면과 연관된 편광자(associated polarizer)를 가지는 제1 탐지기 및 상기 제1 편광면과 상이한 제2 편광면과 연관된 편광자를 가지는 제2 탐지기가 제1 및 제2 편광면의 형광 광을 동시에 탐지하기 위해 유체의 샘플의 반대 편에 배열된다.
- [0045] 바람직하게는 제3 탐지기가 조사광과 동일선상에(collinearly) 존재하여 상기 유체의 샘플은 투과 강도

(transmission intensity)를 탐지하기 위해 상기 탐지기와 상기 조사 광원 사이에 위치된다.

[0046] 상기 장치는 바람직하게는 상기에 나타난 방법을 수행하기 위해 구성된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 본 발명은 동반하는 도면과 관련되어 고려될 때 다음의 상세한 설명을 참고로 하여 더욱 손쉽게 인식된다:

도 1 은 분자의 전이 쌍극자 모멘트뿐만 아니라 분자의 쌍극자 모멘트의 도식화한 다이어그램을 보여 준다;

도 2 는 사용된 투석물(dialysate)에서 형광단의 이방성을 결정하기 위한 도식화한 실험 셋-업(set-up)을 보여 준다;

도 3 은 다른 분자들, 특히 인간 알부민 및 트립토판의 이방성 스펙트럼의 도식화한 다이어그램을 보여 준다;

도 4 는 제안된 방법을 수행하기 위한 장치를 도식화해 나타낸 것이다;

도 5 는 총 편광된 형광의 측정된 강도의 함수로써 인간 알부민의 농도를 나타내는 도식화한 다이어그램이다;

도 6 은 상이한 분자 질량의 단백질에 대한 상관 시간 상수(correlation time constants)를 보여주는 도식화한 다이어그램이다;

도 7 은 UV-광에서 이방성을 측정하기 위한 실험 셋업을 도식화해 나타낸 것으로, 편광의 강도는 수평면에서 측정된다;

도 8 은 도 7의 도식화해 나타낸 것과 일치하지만 상이한 편광자를 가져서, 편광의 강도가 수직면에서 측정된다;

도 9 는 UV 편광성을 측정하는 실험 셋업의 대체 가능한 구성(arrangement)을 보여 준다; 및

도 10은 UV 이방성을 측정하는 실험 셋업의 또 다른 대체 가능한 구성을 보여 준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 바람직한 실시형태의 상세한 설명

[0049] 다음과 같이, 본 발명은 동반하는 도면을 참고로 하여 더욱 상세하게 설명된다. 도면에서, 동일한구성 요소는 동일한 기준 숫자에 의해 표시되고 이의 반복되는 설명은 불필요한 중복을 피하기 위해 생략될 수 있다.

[0050] 본 발명의 목적은 체외 혈액 처리에서 임의의 분자의 제거를 모니터링하는 것이며, 동시에, 인간 알부민 등의 중요한 분자가 과량으로 제거되지 않도록 확실히 하는 것이다.

[0051] 다음에서, 상기 방법은 투석 처리에 기초하여 설명된다. 그러나, 투석 처리에 제한되도록 의도되지 않으며 또한 환자의 투석, 혈액투석, 혈액투석여과, 혈액여과 및/또는 복막투석 처리 같은 모든 다른 체외 혈액 처리에 사용되도록 의도된다.

[0052] 이러한 목적을 달성하기 위해, 소위 중간 분자, 즉, 66 kDa보다 작은 크기의 단백질 부분의 농도뿐만 아니라 알부민의 농도는 각각 측정될 수 있어야만 한다. 더욱이, 사용된 투석물에 또한 형광 활성인 인독시 설페이트, p-크레졸 및 페놀 같은 추가적인 작은 분자 물질이 존재한다.

[0053] 유감스럽게도, 병리학적 분석을 위해 관심이 있는 개개의 형광단의 방출 스펙트럼은 특정 조사 파장에 대해 넓게 중첩하며 또한 동일한 UV 범위에 있다. 이러한 불편뿐만 아니라, 이전에 언급된 분자들의 형광 스펙트럼은 상대적으로 넓어서 측정된 스펙트럼의 디콘볼루션(deconvolution)이 어렵거나 많은 측정 오차를 수반하여 수행될 수 밖에 없다. 따라서, 보통의 형광 분광법에 기초하여 투석 유체에서 각각의 물질의 정확한 농도 또는 정확한 비율을 결정하는 것이 가능하지 않으며, 그래서 농도의 신뢰 가능한 정량적 측정을 제공하는 것이 불가능하다.

[0054] 본 발명에서 제안된 이방성을 사용함으로써, 이 문제는 극복될 수 있다. 여기에 연결된 효과는 방출된 샘플의 형광이 선편광으로 샘플 자극(excitation) 이후에 방출된 형광 광의 이방성을 보임에 따라 광 선택(photo selection)이라고 칭해진다.

[0055] 일반적으로, 원자 또는 분자가 전자적으로 광자를 흡수하는 때에, 전자가 더 높은 원자 또는 분자 궤도로 올라간다. 이러한 전자 구조의 변화 때문에, 전하의 새로운 공간적 분포가 존재하여 흡수하는 원자 또는 분자의 전

기 쌍극자 모멘트가 보통 변화된다.

- [0056] 전이 쌍극자 모멘트는 개개의 원자 또는 분자의 바닥 상태와 여기 상태 사이의 전이와 관련된 전기 쌍극자 모멘트에 의해 정의된다. 전이 쌍극자 모멘트의 벡터의 방향은 전이의 편광면과 상응하며, 이는 분자가 소정의 편광의 전자기파와 어떻게 상호작용하는지를 결정한다. 이 전이 쌍극자 모멘트의 크기의 제곱은 분자 내의 전하 분포에 기초한 상호작용의 강도이다.
- [0057] 도 1은 여기 에너지 장 벡터(excitation energy field vector) $p_{g \rightarrow a}$ 에 의한 분자의 여기에 의해 개개의 분자가 바닥 상태의 전기 쌍극자 모멘트 p_g 로부터 여기 상태인 p_a 로 여기된 때 간략한 표현인 전이 쌍극자 모멘트 $p_{a \rightarrow g}$ 로 나타난다. 더욱이, 여기 상태에서부터 바닥 상태로 전이 쌍극자 모멘트 $p_{a \rightarrow g}$ 를 통하여 완화(relax)하기 이전에, 내부 과정(일반적으로 분자 내 진동 과정이 원인인 소위 내부 전환)에 의해 분자가 일반적으로 완화하는 것으로 보여진다. 내부 완화 과정 때문에 전이 쌍극자 모멘트 벡터 $p_{a \rightarrow g}$ 는 여기 벡터(excitation vector) $p_{g \rightarrow a}$ 에 대하여 각 α 로 일반적으로 이동된다.
- [0058] 전이 쌍극자 모멘트는 각 분자의 구조에 의해 결정되며 분자와 함께 이동하지만 분자에 대한 상대적인 정렬(alignment)은 고정된 상태로 남아 있다.
- [0059] 쉽게 인식된 바와 같이, 흡수의 가능성은 소정의 편광의 전자기파의 방향 또는 보다 정확하게는 그의 장 벡터가 전이 쌍극자 모멘트 $p_{a \rightarrow g}$ 와 동일 선상에 있을 때 가장 높다. 따라서, 만약 선편광이 투석 유체의 샘플 중의 분자를 들뜨게 하는 데 사용된다면, 선편광에 의해 분자를 들뜨게 하는 가능성은 우연히 동일 선상 조건을 충족시키는 분자에 대해서 가장 높다. 이 과정은 조사광의 편광면에 대해 - 우연히 - 특정한 공간적 관계로 배열된 분자가 들뜨게 되기 때문에 광 선택이라고 칭해진다.
- [0060] 또한, 광자의 방출에 의해 여기 상태에서부터 바닥 상태로 전이가 수행될 때(물론, 광자의 방출 없이, 예를 들면 음자(phonon)의 방출에 의해서도 완화가 가능하다), 전이 쌍극자 모멘트 $p_{a \rightarrow g}$ 의 방향은 방출된 형광의 편광을 결정한다. 쌍극자 방출은 쌍극자 모멘트의 축에 대해 대칭적으로 전파하며 이의 강도는 쌍극자 축에 대해 수직일 때 최대이고, 쌍극자 축에 대해 수평인 경우 사라진다.
- [0061] 따라서, 방출된 형광은 편광되고 이방성이다.
- [0062] 도 2는 방출광(emitted light)뿐만 아니라 여기광(excitation light)을 측정하기 위한 구성을 도식적으로 보여준다. 여기광(excitation light)은 광원 L에 의해 방출되었으며 제1 편광자에서 편광되어 전기장의 벡터는 여기선 및 방출선(rays)이 위치되는 판에 수직이다.
- [0063] 탐지기 D 쪽에서, 회전 가능한 제2 편광자가 제공되고 오직 방출된 형광만이 통과될 수 있도록 위치된다. 바람직하게, 여기광의 방향 및 탐지기 D가 샘플에 대해 배치되는 방향은 여기광이 탐지기에 영향을 주는 것을 방지하기 위해 서로에 대하여 수직이다.
- [0064] 제2 편광자를 회전시킴으로써, 강도 I_{vv} (수직 강도) 및 강도 I_{vh} (수평 강도)는 탐지기 D에 의해 탐지될 수 있다. 강도의 차이 I_{vv} (수직 강도) 및 강도 I_{vh} (수평 강도)는 탐지기 D에 의해 탐지될 수 있다. 강도의 차이 $I_{vv} - I_{vh}$ 는 탐지기 D에서 받은 빛의 편광에 대한 척도이다. 이방성 A 뿐만 아니라 편광 P는 다음과 같이 정의될 수 있다:

$$P = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + G * I_{vh}} \tag{1}$$

[0065]

$$A = \frac{I_{vv} - G * I_{vh}}{I_{vv} + 2 * G * I_{vh}} \tag{2}$$

[0066]

[0067] 여기서, I_{vh} 는 제2 편광자가 회전되어 오직 수평으로 편광된 빛만 통과할 수 있을 때 탐지된 형광 광의 강도이

다. I_{vv} 는 방출 편광자가 회전되어 오직 수직으로 편광된 빛만 통과할 수 있을 때 탐지된 형광 광의 강도이다. G 는 수평 및 수직 판에서 측정 시스템의 가능성 있는 상이한 감도에 대해 보정하기 위해 제공되는 기기 상수이다. G 는 실험적으로 결정되며 상수로써 시스템의 소프트웨어에 넣어질 수 있다. 상수 G 는 수평으로 편광된 여기광이 사용될 때 수평 편광자에서 편광자를 통과하는 빛의 강도를 측정함으로써 및 수직으로 편광된 여기광이 사용될 때 수직 편광자에서 시스템의 강도를 측정함으로써 온라인으로 또한 측정될 수 있다. 기기 상수는 이후 $G=I_{hv}/I_{hh}$ 로 결정된다. $I_{vv} + 2GI_{vh}$ 는 총 방출 전력이 등방성으로 총 각도 $\Omega=4\pi$ 를 넘어서 방출된다면 평균 방출 강도이다.

[0068] 수학식 (1) 및 수학식 (2)로부터 얻어질 수 있는 것처럼, 편광 P 및 이방성 A 는 서로에 대하여 용이하게 대응될 수 있다.

[0069] 이방성은 $-0.2 \leq A_0 \leq 0.4$ 사이 범위에 있다. 최대값 0.4는 다른 편광 소멸 효과의 부재 시 흡수 및 방출 전이 쌍극자 모멘트의 동일 선상 정렬과 상응한다. 다시 말해서, 이는 $\alpha=0^\circ$ 에 상응한다. 그러나, 실제적으로 방출 쌍극자 모멘트뿐만 아니라 흡수 쌍극자 모멘트는 일반적으로 동일 선상에 있지 않고 서로에 대하여 각 α 로 둘러싸고 있다. 탐지된 이방성은 그래서

$$A_0 = \frac{3 * \cos^2 \alpha - 1}{5} \tag{3}$$

[0070]

이다.

[0071]

[0072] $\alpha=0$, 즉, 흡수 쌍극자 모멘트 및 방출 쌍극자 모멘트의 동일 선상 배열에서, $A_0=0.4$ 이고, $\alpha=90^\circ$ 에서 A_0 값은 -0.2 이다. 소위 마법의 각(magic angle) $\alpha=54.7^\circ$ 에서 이방성이 관찰될 수 없다.

[0073] 전이 쌍극자 모멘트의 방향이 흡수 대역에 의존하여 변하기 때문에, 각 α 및 이와 함께 이방성 A_0 은 또한 여기 파장 λ_{exc} 및 또한 방출 파장 λ_{em} 에 가변적이다. 도 3에 매우 도식적으로 보여진 것처럼 이방성의 함수 A_0 (λ_{exc} , λ_{em})은 각 형광단에 대해 특이적이다.

[0074] 특히, 도 3의 윗 쪽 다이어그램에서, 여기 파장 $\lambda_{exc}=275$ nm에서 인간 알부민, 소 알부민 및 순수한 알부민의 이방성 스펙트럼이 보여진다. 상이한 방출 파장 λ_{em} 290 nm와 400 nm 사이에서 이방성은 0.2와 0.1 사이에서 변화하는 것이 명확하게 보여질 수 있다.

[0075] 도 3의 아래 다이어그램에서, 인독실 셀레이트 뿐만 아니라 인간 알부민(66.5 kDa), 아미노산 트립토판(204 Da), 이 두 물질의 혼합물의 이방성 스펙트럼이 보여진다. 여기서, 다시, 이방성 함수 $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ 이 각 형광단에 특이적인 것이 명확하게 보여질 수 있다.

[0076] 더욱이, 이방성 함수 $A_0(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ 은 다른 매질(media)로 개개의 형광단의 결합뿐만 아니라 매질의 온도 및 점도와 같은 외부적 요인에 의해 영향받을 수 있다. 트립토판의 이방성 함수 트립토판 및 인간 알부민의 복합물의 함수와 상당히 상이한 도 3의 아래 다이어그램을 분석하는 때에도 보여질 수 있다.

[0077] 하기에 더 논의되는 바와 같이 오직 더 큰 분자만이 그들의 상대적으로 큰 회전 상관 시간 상수 θ 때문에 중요한 이방성을 보인다는 점에서 사용된 투석물의 분석에 대하여 중요한 고려가 제공된다. 사용된 투석물에서 이러한 물질들은 일반적으로 단백질이고, 알부민은 이 종의 중요한 대표 물질이다. 더 작은 분자의 형광단은 일반적으로 편광 강도 I_{vv} 및 I_{vh} 에서 오직 등방성으로 분포된 강도를 제공한다. 이들의 특이적 이방성은, 그래서, $A_j=0$ 이다. 따라서, 이 결과에 기초하여, 투석 유체에 존재할 것이라고 예상되는 다른 형광단이 등방성 기여(isotropic contributions)만 제공한다면 알부민 부분의 강도가 총 이방성 A_{ges} 에 기초하여 결정될 수 있다.

[0078] 도 4는 본 방법과 결합하여 사용될 수 있는 측정 셋업을 도식적으로 나타낸다. 특히, 렌즈에 의해 시준되고(collimated) 맞춰지는 광원 L 이 제공되고 여기광은 분광기 P_{exc} 에 의해 편광된다. 편광되고, 시준되고 맞춰지는 여기광은 이후 큐벳 C 로 향하게 하고 광원 L 의 변하는 강도에 대해 조절하기 위해 광다이오드 D 에 의해 측

정된다.

[0079] 큐벳 C에서 형광단에 의해 발산되는 형광은 각도로 추출되며 광원 L로부터의 방출광은 형광을 방해하지 않는다. 형광은 그의 방향으로 조정될 수 있는 제2 편광자 P_{cm}을 통하여 전해진다. 이후, 편광된 형광은 회절 격자 (diffraction grating) G에 영향을 주고 CCD-센서로 반사되어 형광의 총 스펙트럼은 분석 유닛 A에서 분석될 수 있다. 결과는 디스플레이에서 보여진다.

[0080] 투석기의 사용된 투석물 다운스트림은 일반적으로 1개 이상의 형광단을 포함하기 때문에, 그들의 흡수 및 방출 스펙트럼은 중첩될 것으로 추정된다. 따라서, 요약된 스펙트럼의 총 이방성 A_{ges}는 아래 수학적식으로 나타난다:

[0081]
$$A_{ges} = \sum_i f_i * A_i \quad (4)$$

[0082]
$$f_i = \frac{S_i}{S_{ges}} = \frac{I_{vv,i} + 2 * G * I_{vh,i}}{I_{vv,ges} + 2 * G * I_{vh,ges}} \quad (5)$$

[0082] 여기서,

[0083] 이고, A_{ges}는 요약된 스펙트럼의 이방성이고, A_i는 i번째 형광단의 이방성이고, f_i는 총 강도에 대한 i번째 형광단의 강도 분율(fraction), S_i는 i번째 형광단의 물리적 복사의 총 강도이고, S_{ges}는 모든 형광단의 물리적 복사의 총 물리적 강도이고, I_{vh,i}는 i번째 형광단의 측정된 수평 형광 강도이고, I_{vv,i}는 i번째 형광단의 측정된 수직 형광 강도이고, i는 모든 형광단의 지수이다.

[0084] 형광단의 물리적 복사의 총 물리적 강도 S_i는, 충분히 회석된다면 그의 농도 C_i에 비례한다. i 형광단의 이방성 A_i는 공지된 상수로 추정된다. 강도 분율(intensity fractions) f_i는 요약된 스펙트럼에 기초하여 결정된다.

[0085] 상기에 언급된 대로, 오직 더 큰 분자만이 이방성의 중요한 부분을 제공한다. 따라서, 상기 수학적식 (4)에 기초하여, 알부민의 강도 부분 f_{alb}는 비록 알부민의 형광 부분이 요약된 스펙트럼에 기초하여 직접 결정될 수는 없다고 하더라도 측정된 총 등방성 A_{ges}에 기초하여 계산될 수 있다.

[0086]
$$f_{Alb} = \frac{A_{ges}}{A_{Alb}} \quad (6)$$

[0086]

[0087] 이를 기초로, 알부민의 복사의 총 물리적 강도가, 하기 수학적식 (5)에 기초하여 주어진다.

[0088]
$$S_{Alb} = f_{Alb} * S_{ges} = \frac{A_{ges} * S_{ges}}{A_{Alb}} \quad (7)$$

[0088]

[0089] 이를 기초로, 알부민의 농도는 다음에 따라 결정될 수 있다.

[0090]
$$C_{Alb} = \frac{1}{5} * \frac{g(\lambda)}{I_{exc,0}} * S_{Alb} \quad (8)$$

[0090]

[0091]
$$g(\lambda) = \frac{10 * \epsilon * \lambda_{em}^4}{\pi^2 * c * \Phi_e * \alpha(\lambda_{exc}) * L * p^2} \quad (9)$$

[0091] 여기서, 이고, I_{exc,0}은 편광된 조사 광의 강도이고, ε는 전기장 상수(electrical field constant)이고, λ는 파장 패어(조사 λ_{exc}, 방출 λ_{em})이고, c는 빛의 속도이고, Φ_e는 양자 효율(quantum efficiency)이고, α(λ_{exc})는 조사 파장 λ_{exc}에서 흡수 계수(absorption coefficient)이고, L은 큐벳을 통한 길(path)이고, p는 여기된 형광단의 전기 쌍극자 모멘트이다.

[0092] 여기 강도 $I_{exc,0}$ 는 시간에 따라 달라질 수 있으며 바람직하게는 온라인으로 측정되고 정정된다. 함수 $g(\lambda)$ 는 또한 순수한 알루미늄 또는 다른 기준 용액을 기초로 실험적으로 결정된 보정 함수(calibrating function)로써 보여질 수 있다. 함수 $g(\lambda)$ 는, 예를 들면, 개개의 기기의 제조사 쪽에서 정해질 수 있다.

[0093] 다른 측면에서, 물의 스펙트럼의 스토우크스 선(Stokes lines)의 강도 $I_{H2O,0}$ 또한 결정될 수 있어서 장치의 작동에 실제 강도 I_{H2O} 가 측정될 수 있으며 보정 함수 $g(\lambda)$ 는 기기의 실제 상태에 맞추어 조정될 수 있다:

$$g(\lambda) = g_0(\lambda) * I_{H2O} / I_{H2O,0}$$

[0094]

[0095] 이를 기초로, 상대적으로 큰 물리적 저항력을 가지는 비용-효율이 높은 큐벳이 형광단의 농도를 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0096] 편광된 복사 구성 요소 S_x 및 S_z 가 다른 형광단의 등방성 복사, 특히, 상기에 논의된 것처럼 측정된 복사 강도의 이방성에 대한 오직 제한된 -있어도 극히 적은- 영향을 가지는 더 작은 분자의 등방성 복사에 의해 중첩된다면, 등방성 구성 요소는 편광된 복사 구성 요소 S_x 및 S_z 에 대해 동일한 오프셋 S_{offset} 을 제공한다

$$S_{x,ges} = S_{x,Alb} + S_{offset} \tag{10a}$$

$$S_{z,ges} = S_{z,Alb} + S_{offset} \tag{10b}$$

[0097]

[0098] 따라서, 알루미늄의 복사 강도는 간단한 뺄셈에 의해 쉽게 결정될 수 있다(오직 인간 알루미늄만이 중요한 이방성을 보인다는 가정 하):

$$\Delta S_{Alb} = S_{z,Alb} - S_{x,Alb} = S_{z,ges} - S_{x,ges} = I_{vv,ges} - G * I_{vh,ges} \tag{11}$$

$$\Delta S_{ges} = 3 * \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb} - \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb} = 2 * \frac{I_{exc,0}}{g(\lambda)} * C_{Alb}$$

[0099]

$$C_{Alb} = \frac{1}{2} * g(\lambda) * \frac{I_{vv,ges} - G * I_{vh,ges}}{I_{exc,0}} \tag{12}$$

[0100]

[0101] 여기서, $I_{vh,i}$ 는 탐지된 총 수평 형광 강도이고 $I_{vv,i}$ 는 탐지된 총 수직 형광 강도이다.

[0102] 도 5는, 도식으로 나타낸 다이어그램에서, 인간 혈청 알루미늄(HAS) 및 자유 트립토판의 상이한 혼합물에 대한 총 편광된 형광 복사복사된 강도의 함수로써 인간 혈청 알루미늄(HAS)의 농도를 제시한다.

[0103] 상이한 형광단은 분자 크기에 대하여 구별될 수 있다. 이 점에 있어서, 다음의 고려가 흥미있다:

[0104] 여기된 광자의 흡수는 약 10^{-15} 초 걸린다. 분자 진동으로 완화에 의해, 다시 말해서, 내부 전환에 의해, 여기 상태 S_1 은 매우 빠르게, 일반적으로 10^{-12} 초 이내에 에너지적으로 가능한 제일 낮은 진동 수준으로 완화하는데, 이는 형광의 수명(lifetime)이 $\tau=10^{-8}$ 초 범위에 있고, 이와 같이 상당히 더 길기 때문이다.

[0105] 이 에너지적으로 가장 낮은 진동 수준으로부터, 여기된 전자는 광자의 방출 또는 방사 전이(radiation transition)에 의해 바닥 상태 S_0 로 완화한다. 양 과정은 여기 상태 S_1 의 수를 줄인다. 따라서, 만약 샘플이

짧은 여기 자극(excitation impulse)에 의해 여기되면, 형광 강도 I는 하기 감쇠 함수(decay function)를 나타낸다:

$$I = I_0 * e^{-t/\tau} \tag{13}$$

[0106]

여기서, τ 는 여기 상태의 수명이다.

[0107]

[0108]

이방성 A에 대하여, 또 다른 메커니즘이 강도의 편광 소멸에 추가되는데, 분자는 방출의 방향과 관계가 있는 그들의 축 주위를 회전하기 때문이다. 여기 자극 바로 직후에 모든 분자는 동기화되지만 이 자극 이후에, 회전 상관 시간 θ 로 칭해지는 특정 시간(time span) 도중에 모두 분산된다. 자유롭게 회전하기 위해서, 구형 분자 페랑(Perrin) 관계식이 주어진다:

$$A = A_0 * e^{-t/\theta} \tag{14}$$

[0109]

[0110]

여기서, θ 는 분자의 회전에 의해 발산형으로 배향된 전이 쌍극자 모멘트의 축이 시간을 설명하는 내에서 특정 시간 상수인 회전 상관 시간이고, A_0 은 어떠한 편광 소멸 효과가 발생하기 이전인 $t=0$ 시점에서 이방성이다.

[0111]

펄스화 여기에서, 수학적 (14)에 따른 이방성의 감쇠는 시간-분해 방식으로 관찰될 수 있다. 이를 기초로, 회전 상관 시간 θ - 또는 개개의 형광단 θ_i 의 회전 상관 시간을 나타내는 1개 이상의 형광 신호의 중첩에 의해서 결정될 수 있고, 상기 회전 상관 시간 θ 는 각 형광단에 특이적이다. 따라서, 결정된 회전 상관 시간 θ 는 개개의 형광단에 대한 지시자이다.

[0112]

연속적으로 샘플을 조사할 때, 이방성 A_m 의 다음에 따른 값이 결정될 수 있다:

$$\int_0^{\infty} A_m * e^{-t/\tau} * dt = \int_0^{\infty} A_0 * e^{-t/\theta} * e^{-t/\tau} * dt$$

$$A_m * \int_0^{\infty} e^{-t/\tau} * dt = A_0 * \int_0^{\infty} e^{-t*(1/\theta+1/\tau)} dt$$

$$A_m * \tau = A_0 * \frac{1}{\frac{1}{\theta} + \frac{1}{\tau}}$$

$$\frac{A_m}{A_0} = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \tag{15}$$

[0113]

[0114]

구형 분자의 상관 시간 상수 θ 를 더 자주 계산하기 위해, 하기 상관관계식이 사용된다:

$$\theta = \frac{\eta * M}{R * T} * (\bar{v} + h) \tag{16}$$

[0115]

[0116] 여기서, n 은 온도 T에서 용매의 점도[Pa*s]를 나타내고, M은 분자의 몰 질량[g/mol]이고, R은 일반적인 기체 상수[8,314 J/mol/K]이고, T는 온도 [K]이고, \bar{v} 는 분자의 특정 부피[ml/g], 예를 들면, 단백질:0.73ml/g이고, h는 수화[ml/g](예를 들면, 단백질에 대해: 0.32ml/g)이다.

[0117] 더 낮은 점성의 용매(예를 들면 물 또는 혈장)에서 더 작은 분자에 대하여 이방성은 매우 빠르게 감쇠하고, 더 큰 분자, 예를 들면 단백질에 대해서는 이방성은 상당히 긴 시간 동안 유지되며 심지어 형광 수명 τ 을 초과할 수도 있다.

[0118] 도 6에서 상이한 분자 질량의 상이한 단백질의 상이한 측정이 보여지며, 예를 들면 알부민(66 kDa) 및 예를 들면, $\beta 2m$ (11.7 kDa) 같은 더 가벼운 단백질, 예를 들면, 자유 트립토판 (< 0.5 kDa) 같은 훨씬 더 작은 분자는 상관 시간 상수 θ 에 의해 구별될 수 있다.

[0119] 수학적 식 (15)에 따르면, 평균 이방성 A_m 은 상관 시간 상수 θ 및 이와 같이, 수학적 식 (16)에 의해 얻어질 수 있는, 분자 질량 (M)에 따라 변한다.

[0120] 샘플을 냉각시키는 것과 같이 더 낮은 온도를 적용함으로써, 또는 예를 들면, 겔 형성 또는 냉동에 의해 점도를 증가시킴으로써, 이방성의 수명이 연장될 수 있다.

[0121] 공간에서 일반적으로 통계적으로 균등하게 분포되어 있는 분자의 축의 방향은 각각의 전기 또는자기 쌍극자 모멘트에 작용하는 외부 전기 또는 자기장을 적용함으로써 정렬될 수 있다. 이 측정에 의해, 최적으로 정렬된 편광면에서 여기는 증가될 수 있어서 이 과정의 신호 강도는 향상될 수 있다. 더욱이, 분자의 자유 회전이 방해될 수 있어서 이방성의 수명은 연장될 수 있다.

[0122] 이를 기초로, 분자 간의 명확한 구분이 달성될 수 있다.

[0123] 예를 들면, 자유 트립토판에 대해서, 형광 수명이 $\tau=3$ ns 및 $\theta=50$ 피코세컨드(picosecond)의 상관 시간 상수의 분자가 제공되며 $A_m/A_0=1.6$ %이다. 그러나, 인간 알부민에 결합되는 트립토판 분자에 대해서, 형광 수명은 $\tau=8$ ns 이고 상관 시간 상수는 $\theta=41$ nsec이고, $A_m/A_0=83.7$ %이다.

[0124] 사용된 투석물에서 이방성 스펙트럼은, 일반적으로, 상이한 중간 분자 물질 및 심지어 다른 형광단의 강도 부분의 중첩을 포함한다. 이 측정된 총 스펙트럼을 기초로, 개개의 물질의 이방성 부분은 개개의 물질의 개개의 농도를 결정하기 위해 계산되어야 한다.

[0125] 다음에 따른 방법에 의해, 측정된 스펙트럼 $f(\lambda)$ 은 N개의 상이한 형광단의 스펙트럼의 선형 대립(linear opposition)으로써 보여진다:

$$f(\lambda) = \sum_{i=1}^N c_i s_i(\lambda)$$

[0126]

[0127] 여기서, c_i 는 i-th 형광단의 농도이고 $s_i(\lambda)$ 는 감도(sensitivity)이다.

[0128] 만약 스펙트럼이 M개의 상이한 파장 패어 $\lambda_i(\lambda_{i,exc}, \lambda_{i,em})$ 에서 측정된다면, n개의 미지수를 가지는 m방정식의 방정식 시스템이 얻어진다:

$$\begin{pmatrix} f(\lambda_1) \\ f(\lambda_2) \\ \vdots \\ f(\lambda_M) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} s_1(\lambda_1) & s_2(\lambda_1) & \cdots & s_N(\lambda_1) \\ s_1(\lambda_2) & s_2(\lambda_2) & \cdots & s_N(\lambda_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ s_1(\lambda_M) & s_2(\lambda_M) & \cdots & s_N(\lambda_M) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_N \end{pmatrix}$$

[0129]

[0130] 상기-언급된 방정식의 시스템의 해법이 제공될 수 있으며, 보다 현실적으로, 최소자승법(least square fit)에 의한다:

$$S = \sum_{i=1}^M \left(f(\lambda_i) - \sum_{j=1}^N s_j(\lambda_i) c_j \right)^2$$

[0131]

[0132] 따라서, 농도 c_j 는 선형 방정식 시스템에서 상관 계수이고, k-th 농도 c_k 는 하기 행렬식 $\det()$ 에 의해 계산될 수 있다:

$$c_k = \frac{\det(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_{k-1}, \bar{y}, x_{k+1}, \dots, \bar{x}_N)}{\det(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N)}$$

[0133]

[0134] 도 7 및 도 8은 상기 방법을 수행하기 위한 측정 기구의 셋업의 예시를 보여 준다. 여기광을 제공하기 위해 사용되는 UV 조사 광원 1이 제공된다.

[0135] UV 광원 1은 이후 단색화장기(monochromator) 또는 패브리-페롯 필터(Fabry-Perrot filter) 등의 다른 광학 대역 통과와 관련되어 사용되는 좁은 방출 LED로써, 레이저로써 또는 Hg, Xe 또는 중수소 램프 같은 넓게 발광하는 광원으로써 제공될 수 있다.

[0136] 광원 1로부터 방출된 여기광은 초점 거울 2에 의해 초점이 맞춰진다. 초점 거울 2는 UV 광원 1의 빛을 맞추고 및/또는 시준하기 위해 제공된다. 맞춰진 및/또는 시준된 빛은 이후에 가장 낮게는, 고정된 편광자인 편광자 3을 통하여 인도된다(guided). 고정된 편광자는 빛을 수직으로 편광하기 위한 목적이다(I_v). 수직으로 편광된 빛은 이후 사용된 투석물 형태의 투석 유체가 흐르는 큐벳 4를 통하여 인도된다.

[0137] 기기 상수 $G(\lambda)$ 는 제조사 측에서 수동으로 편광자 3을 90 °로 회전시킴에 따라 결정될 수 있어서 수직 편광 및 수평 편광에 대한 강도는 신뢰 가능하게 측정될 수 있다.

[0138] 사용된 투석물이 통과하여 흐르는 큐벳 4에서, 편광된 여기광은 그들을 여기서키는 형광단을 방해한다. 여기된 형광단으로부터 방출된 형광은 이후 제1 편광자 5를 통하여 이후 -방출 초점 거울 6에 의해- 회절 격자로 및 실제 형광 스펙트럼을 결정하기 위한 탐지기 7로 인도된다.

[0139] 편광자 5는 도 7에서 수평 편광자로써 배치된다. 도 8에서 제2 편광자 5'는 수직 편광자로써 배치된다.

[0140] 도 8과의 비교에서 볼 수 있듯이, 제1 편광자 5 또는 제2 편광자 5' 둘 중 하나를 닫을 수 있는 돌아갈 수 있는 셔터 부분이 제공되어서, 돌아갈 수 있는 셔터 부분 8에 의해, 탐지기 7에 의해 탐지된 형광이 수평 편광자 (도 7)와 수직 편광자 (도 8) 사이에서 선택될 수 있다.

[0141] 더욱이, 방출 광로에서, 제1 수평 편광자 5 및 제2 수직 편광자 5'는 장치에 고정된 상태로 형성되어 있어서 광학 파트는 오정렬(misaligned)되어 있을 수 없으며 기기 상수 G 는 신뢰 가능하게 결정될 수 있다. 보여지는 편광자의 단단한 배열(rigid arrangement)의 장점은 광학 구성 요소가 작동 시에 움직여질 필요가 없다는 것이다. 따라서, 기계 재생에 기초한 허용 오차(tolerance)가 없다.

[0142] 도 9는 유사한 배열에서 큐벳의 투과 측으로부터 기인한 광로에 위치한 회전하는 조리개(aperture) 형태인 또 다른 회전 가능한 부분을 사용하여 큐벳을 통과하여 투과된 여과광이 2개의 상이하게 편광된 형광과 동일한 탐지기 7로 측정될 수 있다. 특히, 셧-오프(shut-off) 탐지기의 백그라운드 강도 I_d 뿐만 아니라 편광의 강도 I_{vv} , 편광의 광도 I_{vh} 의 강도, 투과의 강도 I_t 가 이러한 구성 및 단일 탐지기 7로 측정될 수 있다.

[0143] 도 10에서 투과 강도뿐만 아니라 2개의 상이한 편광의 강도가 동시에 측정될 수 있음에 따라 또 다른 배열이 보여진다. 특히, 투과 강도 I_t 를 탐지기하기 위한 제3 탐지기 9뿐만 아니라 편광된 형광 강도 I_{vv} 및 I_{vh} 를 탐지기하기 위한 연관된 탐지기 2개의 편광자 5 및 5'의 T-모양의 배열이 있다.

[0144]

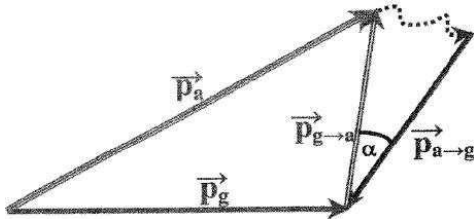
수직 편광자 5는 큐벳 4의 한 쪽에서 제공되고 수평 편광자 5'은 큐벳 4의 반대 쪽에서 제공되어서 빛은 한쪽 또는 반대 쪽에서 결합되고, T-모양의 배열을 야기한다. 이는 큐벳 4 바깥으로 방출된 형광을 결합시키기 위한 표면이 확장될 수 있어 감도가 증가된다는 장점이 있다. 더욱이, 언급된 배치로 서로에 대해 90°로 위치한 편광자를 통하여 큐벳의 2개의 다른 면에서 빛이 결합되고 2개의 강도가 동시에 분석될 수 있다.

[0145]

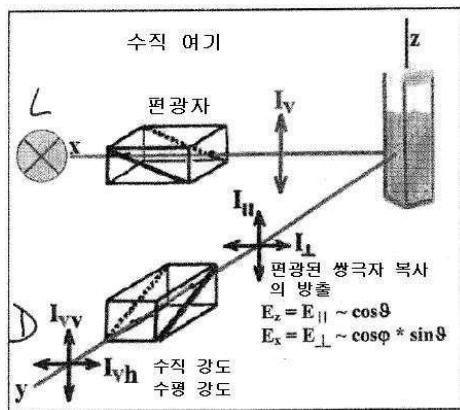
큐벳 4의 바깥의 빛을 결합시키기 위해, 특정한 윈도우 40이 반사를 막기 위해 제공된다.

도면

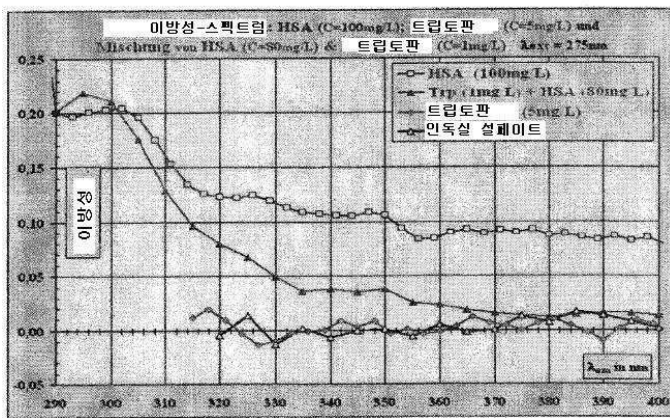
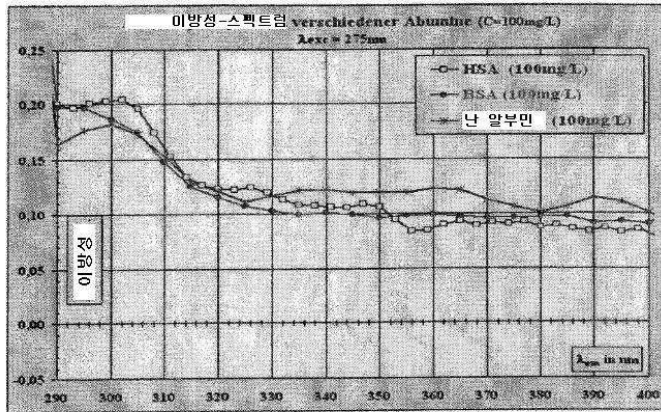
도면1



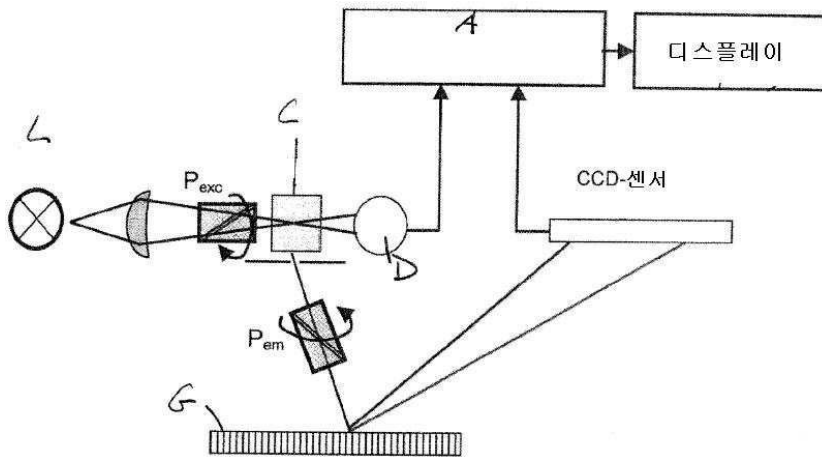
도면2



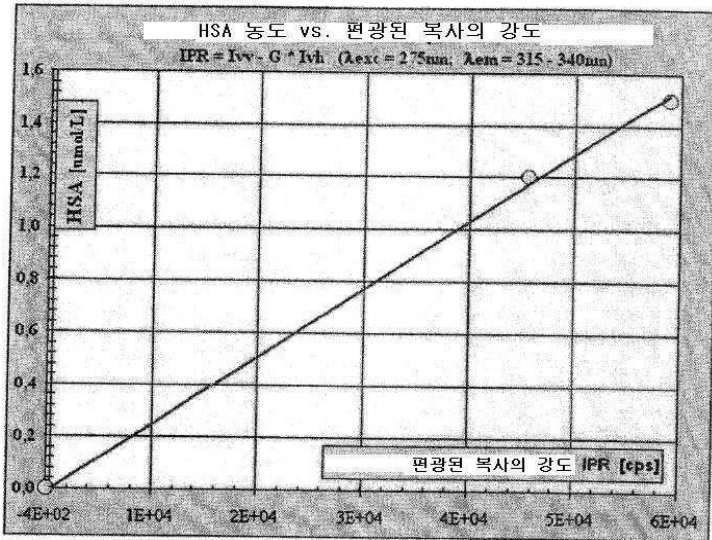
도면3



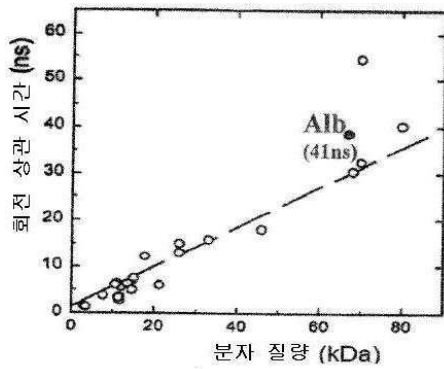
도면4



도면5

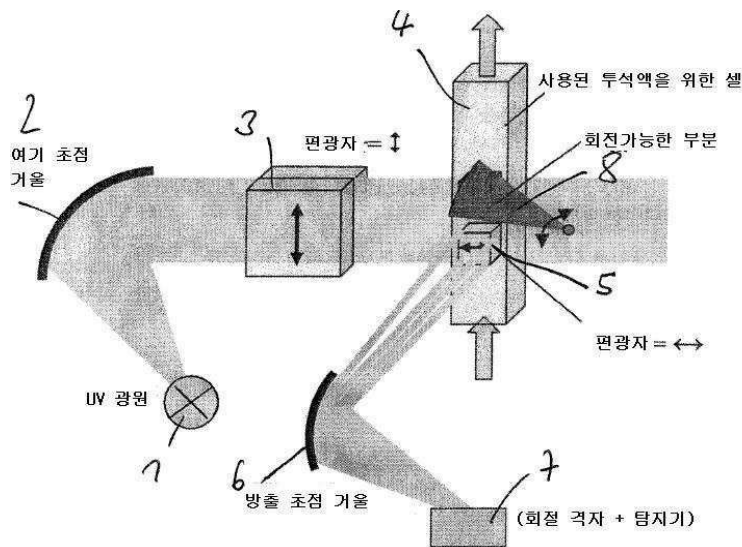


도면6

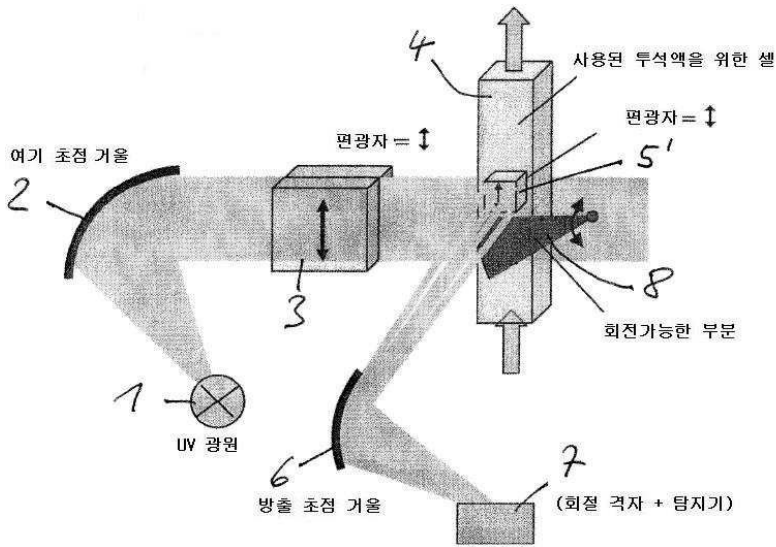


Ref: Joseph R. Lakowicz, Topics in the Fluorescence Spectroscopy, Volume 6, Protein Fluorescence, ISBN: 0-306-46451-9, 2002 Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow

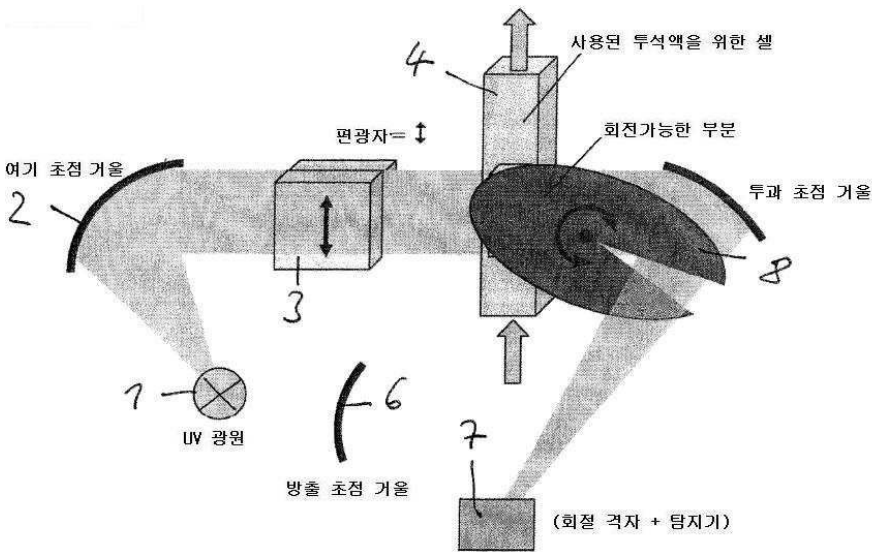
도면7



도면8



도면9



专利名称(译)	标题：用于监测患者的体外血液处理的方法和设备		
公开(公告)号	KR1020150024405A	公开(公告)日	2015-03-06
申请号	KR1020157001132	申请日	2013-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	弗雷森纽斯医疗护理德国有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	费森尤斯医药doyichilrandeu geem BEHA		
当前申请(专利权)人(译)	费森尤斯医药doyichilrandeu geem BEHA		
[标]发明人	GAGEL ALFRED 가겔알프레드 MAIERHOFER ANDREAS 마이에르호퍼안드레아스		
发明人	가겔,알프레드 마이에르호퍼,안드레아스		
IPC分类号	A61B5/1455 A61B5/00		
CPC分类号	A61B5/14546 A61M2205/3306 A61B5/0071 A61M1/16 A61B5/6866 A61B5/4848 A61B5/7225 A61M1/3406 A61B5/14558 A61M1/1619 A61B5/05 A61B5/1455 A61B5/4836 A61M1/28 A61M1/1609		
代理人(译)	汉阳专利事务所		
优先权	2012172251 2012-06-15 EP 61/660016 2012-06-15 US		
其他公开文献	KR102058260B1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于监测患者透析治疗的方法，优选用于监测血液透析过滤和/或腹膜透析治疗，所述方法包括以下步骤：- 将用于体外血液处理的流体样品与线性偏振光接触照射光照射；检测由第一偏振面处的流体样本发射的荧光的强度；检测由不同于第一偏振面的第二偏振面处的流体样本发射的荧光的强度；确定流体样品发出的荧光的各向异性；并且基于所确定的各向异性和透析液发射的荧光的强度来确定流体中至少一种荧光团的浓度。

