

평면 소자형 락테이트 바이오센서

하정한¹ · 허 황² · 강태영³ · 이용석³ · 윤순호³ · 신정원³ · 남학현³ · 차근식^{3*}

¹(주)아이센스 부설연구소, ²울산대학교 자연과학대학 화학과

³광운대학교 자연과학대학 화학과

(2006. 10. 18. 접수; 2006. 11. 22. 승인)

Planar microchip-based lactate biosensor

Jeonghan Ha¹, Hwang Huh², Tae Young Kang³, Yong Seok Lee³, Soon Ho Yoon³,
Jungwon Shin³, Hakhyun Nam³ and Geun Sig Cha^{3*}

¹R&D Center, i-SENS, Inc., Seoul 139-845, Korea

²Department of Chemistry, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

³Department of Chemistry, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea

(Received October 18, 2006; Accepted November 22, 2006)

요 약: *Pediococcus*에서 추출된 lactate oxidase(LOD)를 poly(vinyl alcohol)(PVA)에 고정화하여 2전극계로 구성된 lactate 바이오센서를 제조하였다. Lactate는 LOD 효소와의 반응에서 생성되는 H₂O₂를 전기화학적으로 금(Au)위에 형성시킨 Pt-black 층에서 산화시켜 정량 할 수 있었다. Pt-black으로 만들어진 센서는 과산화수소에 대해서 낮은 전위(+300 mV vs. Ag/AgCl)에서 큰 산화전류를 보여주었으며, ascorbic acid, acetaminophen, uric acid 등과 같이 산화되기 쉬운 산화 종들의 영향을 감소시켜주었다. 외부보호막으로는 다양한 종류의 친수성 폴리우레탄을 사용하였다. 센서는 *in vitro* 방식으로 흐름계와 비흐름계 모두에서 성능을 평가하였다. 제작된 센서는 0.05 M NaCl을 포함하는 0.05 M 인산염 완충용액(pH 7.6)에서 성능을 시험하였으며, 0.1 mM에서 9.0 mM의 lactate 농도구간에서 직선적 감응성을 나타내었다. 최적화된 센서는 4°C 완충용액에 보관하였으며, 25일 이상 감응도(sensitivity)가 거의 변화하지 않았다.

Abstract: Two electrode-based lactate biosensor was prepared by immobilizing lactate oxidase (LOD) obtained from *pediococcus* species in a poly(vinyl alcohol). Hydrogen peroxide (H₂O₂) produced by the reaction of lactate and LOD was detected on the Pt-black that was electrochemically deposited on the Au electrode. Sensors fabricated with Pt-black deposited Au electrode provided a high current of H₂O₂ oxidation at a substantially lowered applied potential (+300 mV vs. Ag/AgCl), resulting in reduced interferences from easily oxidizable species such as ascorbic acid, acetaminophen, and uric acid. An outer membrane is formulated by adjusting water uptake of hydrophilic polyurethane (HPU). The sensor performance was evaluated *in vitro* with both flow-through arrangement and static mode. The sensor showed a linear range from 0.1 mM to about 9.0 mM in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.6) containing 0.05 M NaCl. Storing the sensors prepared in this work at 4°C buffer solution while not in use, they provided same electrochemical performance for more than 25 days.

Key words: planar microchip, lactate, lactate oxidase, hydrophilic polyurethane

★ Corresponding author

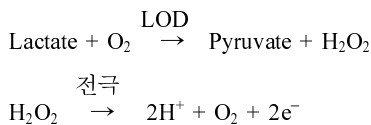
Phone : +82-(0)2-940-5244 Fax : +82-(0)2-911-8584

E-mail: gscha@kw.ac.kr

1. 서 론

지난 30여 년 동안 임상학 및 발효공정의 제어 분야에 관련되어 lactate 바이오센서가 연구 개발 되어 왔다. Lactate는 해당과정 중 산소가 부족할 때 생기는 물질로 산소가 부족한 조건에서의 에너지 대사 과정을 알아 볼 수 있는 척도가 된다. 건강한 사람의 경우 혈액에는 0.5 mM 정도의 lactate가 존재하지만 신체가 호흡곤란, 충격 등과 같은 증상을 나타내거나 혹은 간, 신장에 이상이 있을 때 그리고, 메탄올, 에탄올 등과 같은 독극물을 섭취하였을 때에는 그 혈중 농도가 7~8 mM을 초과하게 된다.¹ 이러한 조건을 lactic acidosis라 하며, 빠른 시간 내에 치료를 받지 않는 환자의 경우에는 신체조직에 손상을 가져오며, 경우에 따라 죽음에 이르기기도 한다. 따라서 정확하면서도 신속하게 lactate의 양을 측정하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다.

최근에는 lactate 농도를 측정하기 위해 전기화학 측정법과 효소를 결합한 바이오센서가 많이 개발 연구 되어지고 있다. 특히, 경제성, 효소기질 반응의 간결함, 센서를 제작하기 쉽다는 장점들 때문에 lactate oxidase(이하 LOD)를 전류법과 결합한 바이오센서가 많이 연구되어지고 있다.^{2,3} LOD는 flavin 효소로 lactate를 pyruvate로 바꾸어 주는 역할을 한다. 이때 O₂를 소모하면서 전기활성종인 H₂O₂를 생성한다. 전체 반응식은 다음과 같다.



즉, 생성된 H₂O₂를 정량함으로써 lactate의 농도를 알 수 있다. 하지만 LOD를 이용한 바이오센서는 O₂의 농도에 따라 상한 검출한계(upper limit)가 영향을 받는다는 단점이 있다.⁴ 이러한 단점을 극복하여 향상된 범위를 갖는 바이오센서를 만들고자하는 연구들이 있었다. 예를 들어, 시료를 묻히는 방법,⁵ 반투과막을 사용하는 방법,⁶ 전자전달 매개체(mediator)를 사용하는 방법⁷ 등이다. 또한 효소(예를 들어, oxidase) 반응으로 생성되는 H₂O₂를 전류법으로 정량하기 위해서는 +700~800 mV(vs. Ag/AgCl) 정도의 높은 전위가 요구된다. 하지만 높은 전위에서는 ascorbic acid, acetaminophen, uric acid 등과 같은 전기활성 종들이 심각한 방해작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 방해종들의 영향을 제거하기 위한 다양한 연구들이 있었다.

예를 들어, 작업전극 위에 선택적 투과막을 씌우는 방법,³ 작업전극에 Pt-black 층을 도금하여 H₂O₂에 대한 산화 전위를 떨어뜨리는 방법,⁴ 전자전달 매개체를 이용한 방법,⁷ 그리고, 산화금속을 도입하는 방법^{8,9} 등이다.

본 연구에서는 소형화된 평면형 2전극계를 바탕으로 LOD와 전류법을 도입한 바이오센서를 제작하였다. 연구의 목적은 센서의 검출한계를 향상시키는 것으로 이를 위해 다양한 친수성폴리우레탄을 외부보호막으로 사용하였다. 전기활성종들에 의한 방해작용을 제거하기 위해서는 작업전극의 재질인 Au 표면 위에 Pt-black 층을 형성함으로써 가해주는 작업전위를 +300 mV(vs. Ag/AgCl)로 낮추어 주는 방법을 사용하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 장치

2.1.1. 시약

L-Lactate oxidase(LOD)는 *pediococcus*(EC no. 2328416, 32 units/mg)에서의 추출물로 Fluka 사(Buch, Switzerland) 제품이며, poly(vinyl alcohol)(이하 PVA, M.W. 9,000~10,000)은 Aldrich 사(Milwaukee, WI, USA)의 제품을 사용하였으며, L-(+)-lactic acid(free acid), hydrogen hexachloroplatinate(IV)(H₂PtCl₆), lead acetate, L-ascorbic acid, acetaminophen, uric acid는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 표준 혈청은 Nissui Pharmaceutical 사(Tokyo, Japan)의 동결 건조 시킨 제품을 구입하였다. Blood gas/electrolyte/metabolite/BUN control(모델 QC 823)은 Bionostics 사(Devens, MA, USA)의 제품을 사용하였다. 10, 16, 20, 25, 42, 60, 그리고 100 wt.%의 흡수력을 가진 hydrophilic polyurethane(이하 HPU)은 Thermedics 사(Woburn, MA, USA)의 제품을 사용하였다. 3-aminopropyltriethoxysilane(Z-6011)은 Dow Corning 사(Midland, MI, USA)의 제품을 사용하였다. 기타 실험에 사용된 여러 가지 표준용액이나 완충용액 등은 특급시약등급이나 분석시약등급에 준 하는 시약을 사용하였으며, 모든 용액의 제조에는 탈이온수(저항 18 MΩ · cm; Pure Power I)를 사용하였다.

2.1.2. 장 치

바이오센서로부터 발생한 전류량을 얻는 데는 RS-232 통신 직렬 포트 컴퓨터와 연결되어 작동되는 8 채널 potentiostat(모델 cDAQ-0804)을 Elbio 사(Seoul,

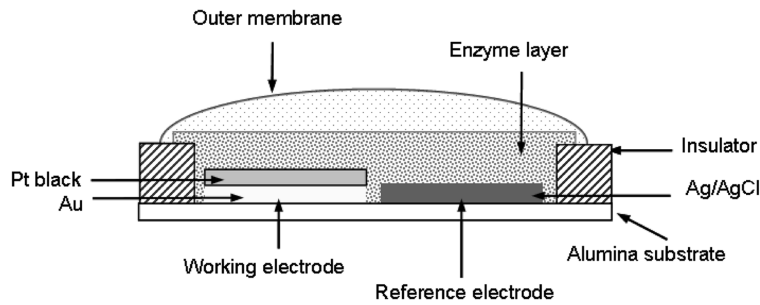


Fig. 1. Schematic of the planar type amperometric microelectrode.

Korea)에서 구입하여 사용하였으며, National Instruments 사(Austin, TX, USA)에서 개발한 LabVIEW 프로그램 개발 언어를 사용하여 데이터를 컴퓨터에 기록하였다. Au 표면에 Pt-black 층을 형성시키기 위해서 EG&G PAR 273A Potentiostat/Galvanostat(Princeton, NJ, USA) 장비를 사용하였다. 흐름계 주입을 위해 Gilson 사(Villiers, LE, BEL, France)의 multi-channel peristaltic pump(모델 M312)를 사용하였다. 전극에 효소층이나 외부 보호막 등의 용액 상을 도입할 때에는 EFD 사(Providence, RI, USA)의 air fluid dispenser(모델 2000XL)를 사용 하였다. 저장된 데이터는 WaveMetrics 사(Lake Oswego, OR, USA)의 IGOR Pro 4.0 을 이용하여 처리하였다.

2.2. Lactate 바이오센서의 제작

평면형 전류법 센서는 프린팅기법을 이용하여 먼저 알루미늄 판 위에 전극을 형성하고, 그 위에 절연층을 도입하여 제작되었다. 센서는 작업전극(Au; 면적 0.5 mm^2)과 기준전극(Ag/AgCl; 면적 0.7 mm^2)으로 구성되었다. 형성된 Ag 층은 0.1 M FeCl_3 용액으로 10 분간 처리하여 Ag/AgCl로 만들어 주었다. 또한 작업전극의 재질인 Au에 Pt-black 층을 형성하기 위해서 $0.5 \text{ wt.}\% \text{ H}_2\text{PtCl}_6$ 와 $0.025 \text{ wt.}\% \text{ lead acetate}$ 의 혼합용액에서 -100 mV (vs. Ag/AgCl) 전위를 걸어주어 10분간 처리하였다. 효소층은 LOD(160 units)와 PVA 5 mg 을 pH 7.6, 0.05 M 인산염 완충용액(즉, $0.053 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $0.015 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$, 그리고 0.05 M NaCl) $160 \mu\text{L}$ 에 녹여서 겔 상태로 만들어 주었다. 만들어진 겔은 2000XL 디스펜스를 사용해서 기본 전극(즉, 작업전극과 기준전극) 위에 $30 \mu\text{m}$ 의 두께로 올려졌으며(이때, 전극에 올려지는 효소의 양은 3 units가 되게 하였음), 효소 수화겔 층(enzyme layer)은 다시 두께 $20\text{-}25 \mu\text{m}$ 의 외부 보호막으로 덮어 씌워 주었다(이때, 전극에

올려지는 외부 보호막 용액의 양은 $10 \mu\text{L}$ 이었다)(Fig. 1 참조). 외부 보호막(outer membrane)의 경우 20 mg 의 HPU(즉, 10, 16, 20, 25, 42, 60, 그리고 $100 \text{ wt.}\%$ 의 흡수력)를 $500 \mu\text{L CHCl}_3$ 에 녹인 뒤, $3 \mu\text{L}$ 의 Z-6011을 첨가하여 만들었다. 전체적으로 센서는 기본 전극부와 효소층 그리고, 외부 보호막으로 구성 되어 있다.

2.3. Lactate 바이오센서의 성능 평가

본 연구의 목표인 상한 검출 한계를 향상 시키는 바이오센서 막 조성을 선택하고자 가장 먼저 센서를 비흐름계(즉, 교반기 상에서 비이커에 완충용액을 채우고 lactate의 농도를 300초 간격으로 변화 시켜 줌)에서 실험하였다. 2.2 절에 설명한 것과 같이 다양한 흡수력을 가지는 7 종류의 HPU 막을 Au 작업전극에 도입하여 $+800 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl) 전위 조건에서 lactate 감응성을 비교하였다. 7 종류의 HPU 막 중 가장 우수한 성능을 보여주는 막($25 \text{ wt.}\%$ 의 흡수력을 가진 HPU를 도입한 막)은 다시 Pt-black을 작업전극으로 하는 센서에 도입이 되었으며, 이때, $+300 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl) 전위를 기준전극에 가하여 비흐름계(즉, 교반기 상에서 비이커에 완충용액을 채우고 lactate과 방해종들의 농도를 변화 시켜 줌)와 흐름계(즉, multi-peristaltic pump 와 syringe를 사용하여 cell에 특정 농도의 lactate 표준용액과 혈청 그리고, QC 823 표준용액을 넣어 줌)에서 실험하였다. 모든 실험은 0.05 M NaCl 을 포함하는 pH 7.6, 0.05 M 인산염 완충용액에서 이루어졌다. 시험하지 않을 때는 센서를 4°C 완충용액에 보관하였다.

2.4. Control 시료 및 혈청 시료 분석

본 연구에서 제작한 바이오센서를 사용하여 control 시료 및 혈청 시료에 존재하는 lactate의 농도를 정량

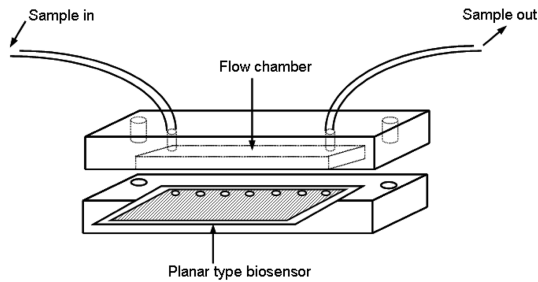


Fig. 2. Schematic of flow-through arrangement for serum and control sample measurement.

하기 위해 흐름계 cell을 제작하였다(Fig. 2). 혈청 시료에는 lactate가 포함되어 있지 않았으므로 양을 조절하여 넣어주었다. 시료 주입부에 2 개의 검정용액(즉, 정확하게 lactate의 양을 조절하여 만듦)을 주입하여 2 점 검정선을 작성 한 후, control 시료 또는 혈청 시료를 주입하도록 설계하였다. 흐름 통로에 들어가는 샘플의 부피는 200 μL 이며, 시료가 통로 내에 머무르는 동안 시료를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 효소의 고정

바이오센서가 최적의 성능을 나타내기 위해서는 효소를 고정화 시키는 방법과, 고정화된 효소의 양, 그리고 센서에 도입된 외부보호막의 선택이 무엇보다도 중요한 요소이다. 지금까지 효소를 고정화시키기 위해서 효소를 수화겔에 잡아 두는 방법,⁹ 화학적인 가교 결합 방법¹⁰ 그리고, 전기적으로 만들어지는 고분자막에 고정 시키는 방법¹¹ 등이 있었다. 이 중에서도 수화겔에 효소를 도입하는 방법은 기타의 다른 방법들과 비교를 했을 때, 센서의 안정성, 재현성 및 검출한계가 좋으며, 그리고 수용액상에서 효소의 활동도를 최대한으로 유지 시켜 준다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 작업전극과 기준전극 위에 PVA(3 wt.%)와 LOD(3 units)를 함께 고정화하여 효소 수화겔 층을 도입하였다.

3.2. 외부보호막의 결정

수용성으로 PVA와 같은 수화겔에 효소를 고정하는 방식을 채택한 바이오센서는 효소의 유출을 최소화하고, 센서의 수명을 향상시키기 위해서 외부 보호막이 필요하다. 지난 수십 년 동안 아주 미세한 동공을 가지는 다양한 고분자 물질들이 외부보호막으로 바이

오센서에 도입이 되었다. 예를 들면, cellulose acetate,⁴ poly(vinyl chloride),¹² polycarbonate¹³ 그리고, polyurethane¹⁴ 등이다. 그러나 상기에 제시한 물질들은 대체적으로 접착력이 약하거나, 막 자체의 미세동공 크기가 일정하지 않으며, 혹은 기질의 투과율이 상당히 낮다는 단점을 가지고 있다. 그러나 polyurethane의 경우는 경질부(hard-segment)와 연질부(soft-segment)의 비율을 조절하여 투과율을 조절할 수 있다는 장점을 가지고 있어 다양한 분야에서 그 쓰임새가 많으며 특히, 생의학 분야에서 많은 관심을 받아왔다.¹⁵ 특히, hydrophilic polyurethane(HPU)은 물에 녹거나 혹은 물을 흡수할 수 있는 연질부(예를 들어, poly(tetramethylene oxide), poly(ethylene oxide), poly(ethylene glycol), 그리고 poly(propylene glycol))들로 구성 되어 있으며 특히, 사용된 연질부들의 비율과 성질에 따라서 물을 흡수하는 능력과 막 자체의 미세동공 크기가 다르고, 다양한 고체상에 우수한 접착력을 제공하며, 생체 적합성이 우수하고, 센서가 사용되기 위해 필요한 안정화 시간이 비교적 짧은 장점이 있다. 이러한 HPU의 장점을 이용한 센서는 전류법을 이용한 크레아티닌 센서,⁹ 카보네이트 센서,¹⁶ 염소 이온 선택성 전극,¹⁷ 용존 산소 센서¹⁸ 등이 있다.

본 연구에서는 aliphatic 계열의 HPU를 외부보호막으로 도입하여 lactate 센서에 대한 연구를 수행하고자 하였다. Fig. 3은 Au 작업전극에 Ag/AgCl 기준전극에 대해서 +800 mV의 전위를 걸어준 조건에서, HPU가 형성된 센서들을 비어커에 장착하여 lactate의 농도를

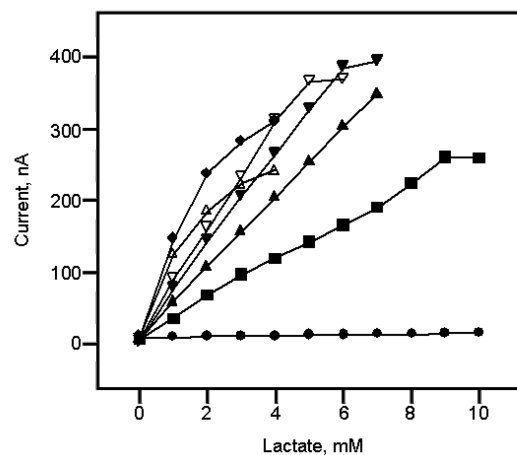


Fig. 3. Calibration curves of the lactate biosensors with HPU outer membrane of different water uptake; \blacklozenge 100, \blacktriangle 60, \blacktriangledown 42, \blacktriangledown 25, \blacktriangle 20, \blacksquare 16, and \bullet 10 wt.%. Applied potential: +800 mV (vs. Ag/AgCl).

300초 간격으로 변화 시켜 줄 때 나오는 전류량 감응 신호에 대한 검정선을 보여주고 있다. 즉, HPU의 종류에 따른 신호의 세기를 나타내 주는 결과이다. HPU의 흡수력 정도가 줄어들수록 감응신호의 세기는 줄어들지만, 상한 검출한계는 늘어난다는 것을 알 수 있다. 이는 HPU의 흡수력이 줄어들수록 막의 미세 동공 크기가 작아져서 lactate의 막내 투과율이 줄어들기 때문이다. 임상학적 관점에서 관심을 갖는 농도인 5 mM(즉, lactic acidosis 증상을 확인 할 수 있는 농도)까지 가장 우수한 감응세기를 보이는 흡수력 25 wt.%의 HPU(이하 HPU-25)가 외부 보호막으로 가장 적당할 것으로 판단되었다. 따라서 이후의 실험에서부터는 HPU-25 만을 외부보호막으로 사용하여 실험하였다.

3.3. 방해종의 영향에 관한 연구

Lactate와 LOD의 효소 반응으로 생긴 과산화수소를 측정하기 위해서는 +700~800 mV(vs. Ag/AgCl)의 높은 산화전위가 요구된다. 하지만 이 전위에서는 생체 시료 내에 존재하는 ascorbic acid, uric acid 등의 물질들과 약을 복용했을 때에 혈액에 존재하는 acetaminophen 등의 산화성 물질들이 전극에서 산화되어 심각한 측정 오차가 유발된다는 단점을 가진다.^{3,4,7,8} 본 연구에서는 상기의 제시된 방해종들의 영향을 감소시키고자 Pt-black 층을 Au 작업전극 위에 형성 시켜 주는 방법을 도입하였다. Pt-black은 과산화수소의 산화전위를 낮추어주어 방해종들의 영향을 줄여줄 뿐만 아니라 작업전극의 면적을 향상 시켜 감응세기를 향상 시

키는 것으로 보고 된 적이 있다.¹⁰

Fig. 4는 Au 전극에서와 Au에 Pt-black이 도입된 전극에서 Ag/AgCl을 기준전극으로 했을 때, 과산화수소 8 mM에 대한 선형전위주사법(linear sweep voltammetry)에 대한 그림이다. Pt-black 층이 도입이 되었을 때, 과산화수소를 산화 시키는데 필요한 전위가 약 +300 mV(vs. Ag/AgCl) 까지 낮아지는 것을 확인할 수 있다. Pt-black 층은 전기화학적 방법으로 전극에 도입이 된다. 이때 흘러주는 전류량에 따라서 전극에 올려지는 Pt-black의 양이 결정된다. 즉, 일정한 전위(-100 mV vs. Ag/AgCl)에서 시간에 따라 Pt-black 층을 형성하는 방법에서는 Pt-black 형성시간을 조절하는 것이 센서의 최적화된 조건을 찾을 수 있는 기본 요소가 된다. 따라서 본 연구에서는 전류법, 즉, -100 mV(vs. Ag/AgCl)의 전위에서 5, 10, 15, 그리고 20분간 처리한 각각의 센서를 만든 뒤, 작업전극에 +300 mV(vs. Ag/AgCl)의 전위를 가해주어 과산화수소 0.1 mM을 반응 시켰을 때 나오는 전류값을 비교함으로써 최적의 성능을 나타내게 하는 Pt-black 형성시간을 결정하고자 하였다. Fig. 5는 네 가지 전극(5, 10, 15, 그리고 20 분간 Pt-black 층을 형성 시켜준 전극)의 과산화수소 0.1 mM에 대한 감응세기를 비교하여 최대 감응세기를 기준으로 정규화하여 비교한 결과이다. 감응세기는 Pt-black 층을 형성 시켜 주는 시간이 10 분이 될 때까지는 그 정도가 가파르게 커지다가 10 분 이후의 시간부터는 더 이상 감응세기가 향상되지 않았다. 즉, 최적의 센서를 제작하기 위해서는 10 분간 처리하는 것이 가장 효과적 이라는 결론을 얻을 수 있

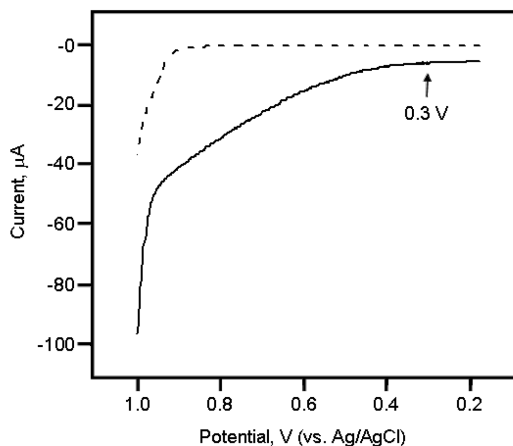


Fig. 4. Linear sweep voltammetry of 8 mM hydrogen peroxide at the Au and Au/Pt-black electrodes; - - - Au and — Au/Pt-black.

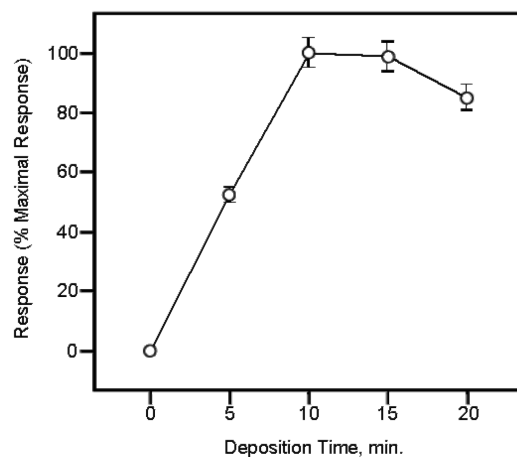


Fig. 5. Normalized current-signal versus the deposition time of Pt-black on Au electrode.

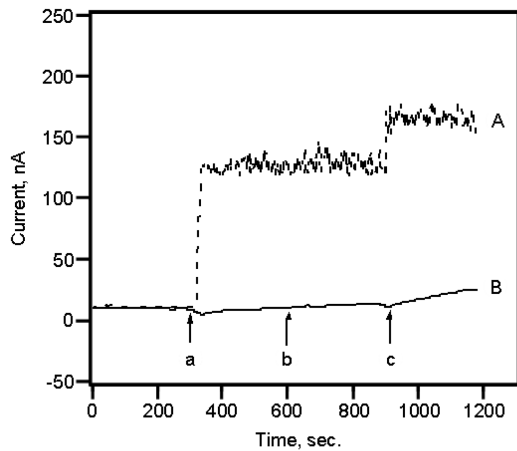


Fig. 6. Dynamic response curves toward interfering substances at the Au/Pt-black electrode without (A) and with (B) HPU-25 outer membrane; (a) ascorbic acid 114 μ M, (b) acetaminophen 132 μ M, and (c) uric acid 458 μ M. Applied potential: +800 mV (vs. Ag/AgCl).

었다. 때문에 이후의 실험에서 부터는 Pt-black 층을 Au 위에 형성 시켜주기 위해서 모든 전극을 10 분간 처리하여 주었다.

Pt-black 층을 도입하여 제작된 센서는 과산화수소에 대한 산화 전위를 낮추어 산화성 방해종들의 영향을 줄여 주지만, ascorbic acid와 같이 산화전위가 매우 낮은 물질의 영향을 완벽히 제거해 주지는 못하는 것으로 알려져 있다.⁴ 따라서 본 연구에서도 Pt-black 층을 도입하여 제작된 센서의 방해종에 대한 영향을 조사해 보았다. 이를 위해서 아무런 보호막 없이 Pt-black 층이 노출된 센서(bare Pt-black)와 Pt-black에 HPU-25 외부보호막이 도입된 센서를 ascorbic acid 114 μ M, acetaminophen 132 μ M, 그리고 uric acid 458 μ M 즉, 임상학적 범위에서 가장 높은 농도를 순차적으로 반응시켰다(Fig. 6 참조). 센서 막이 없는 Pt-black 센서의 경우에는 ascorbic acid가 센서의 성능에 큰 영향을 끼친다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 HPU-25를 도입한 센서의 경우에는 ascorbic acid의 영향이 크게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 센서 막이 없는 Pt-black 전극에서의 ascorbic acid 114 μ M의 감응세기에 대해서 HPU-25가 도입된 센서의 ascorbic acid 114 μ M의 감응세기는 0.4% 수준으로 ascorbic acid의 영향이 매우 감소하는 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 HPU-25가 도입된 센서에서 방해종(즉, ascorbic acid 114 μ M, acetaminophen 132 μ M, 그리고 uric acid 458 μ M)들의 영향은 센서 막이 없는 Pt-

black에서의 영향과 비교하였을 때, 약 8.5% 정도의 수준으로 HPU-25가 센서에 도입이 되어 ascorbic acid 외의 방해종들의 영향까지 감소시킨다는 것을 알 수 있다. 이는 전혀 예기치 못했던 결과로 이러한 현상이 나타나는 이유를 크게 두 가지로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째는 HPU-25의 미세 동공 크기 때문에 방해종의 막내 투과율이 감소하기 때문이다. 즉, HPU-25 외부보호막이 입자 크기에 대해서 선택적 투과막(permselective membrane)으로 작용하여 lactate(분자량 90.08)에 비해서 크기가 큰 물질인 ascorbic acid(분자량 176.1), acetaminophen(분자량 151.2), 그리고 uric acid(분자량 190.1) 등의 막내 투과율을 떨어뜨리기 때문이다. 두 번째는 HPU 막이 음전하를 띤 물질에 대해서 투과율이 낮기 때문이다.⁹ 즉, ascorbic acid 와 같이 음전하를 강하게 띠는 물질은 막과의 정전기적 반발력 때문에 막을 투과하기가 어렵게 된다. 두 가지 이유 중에서 lactate 자체가 용액 중에서 음전하를 띠고 있다는 것을 고려하면, 입자 크기에 의해서 막내투과율이 조절된다는 사실이 방해종의 영향을 감소시키는 주요 요인으로 생각할 수 있다.

3.4. HPU-25와 Pt-Black이 도입된 lactate 바이오센서

HPU-25 외부보호막과 Pt-black 층이 도입된 센서의 성능을 조사하고자 Ag/AgCl 기준전극에 대해서 작업전극(Au/Pt-black)에 +300 mV의 전위를 가해준 조건에서 센서를 비커에 장착하여 lactate의 농도를 300 초 간격으로 변화 시켜주면서 시험하였다. Fig. 7은 상기의 조건에서의 lactate에 대한 감응곡선과 검정선 그리고 방해종에 대한 영향을 보여주는 결과이다. 최적의 조건으로 만들어진 lactate 바이오센서의 상한 검출한계는 9 mM(직선도 0.999)이었다. 이는 임상학적으로 관심 있는 lactate(즉, lactic acidosis)의 농도인 5 mM을 충분히 측정할 수 있는 범위이다. 또한 Pt-black 층을 도입한 센서의 경우, 작업전극의 재질로 순수한 Au 만을 사용한 센서보다 검출가능 농도범위가 더 커진다는 것을 알 수 있다(즉, 6 mM에서 9 mM로 커짐). 이는 Pt-black 층이 Au 위에 형성 되면서 작업전극의 면적이 넓어져서 전극반응에서 다시 발생하는 산소의 양이 증가하기 때문이다.¹⁰ 또한 최적의 센서에서의 방해종의 영향은 거의 무시할 수 있는 수준이라는 것을 알 수 있다. 제작된 센서의 임상학적 범위(즉, 0.36~1.5 mM)를 고려하여 센서의 하한 검출한

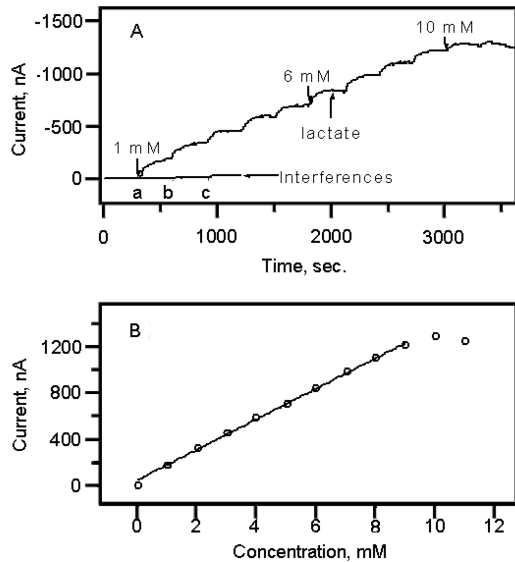


Fig. 7. Dynamic response (A) and calibration curves (B) of the lactate biosensor based on Au/Pt-black electrode with HPU-25 outer membrane toward lactate and interferences: (a) ascorbic acid 114 μ M, (b) acetaminophen 132 μ M, and (c) uric acid 458 μ M. Applied potential: +300 mV (vs. Ag/AgCl).

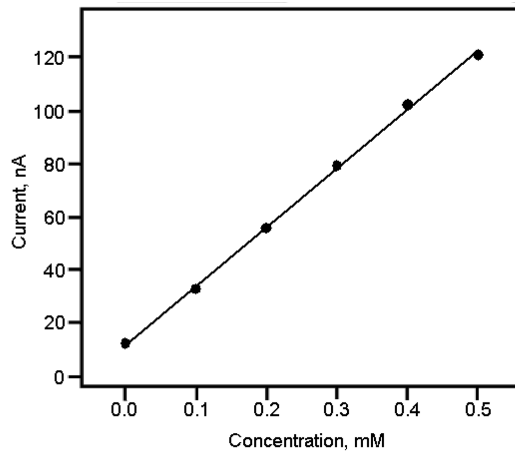


Fig. 8. Calibration curve of the planar type lactate biosensor at low lactate concentrations.

계를 알아보았다(Fig. 8). 센서는 0.1~0.5 mM의 lactate 농도 구간에서 직선성(직선도 0.999) 있는 감응을 보여 주었다. 사용하지 않는 센서는 4°C 완충용액에 보관 하였으며, 27 일 동안 성능을 유지 하였다(Fig. 9).

상업화된 대부분의 바이오센서들은 흐름계 주입법을 사용하므로 본 연구를 통해 개발된 lactate 바이오

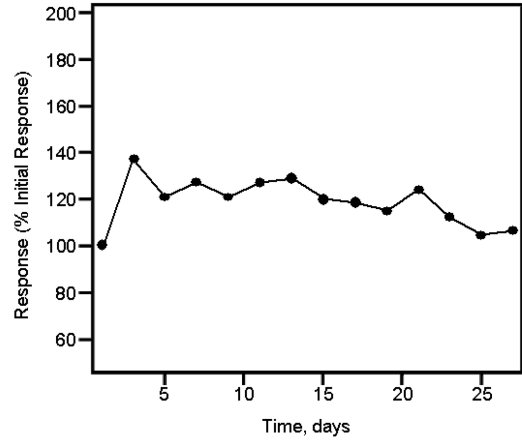


Fig. 9. Lifetime of the lactate biosensor based on Au/Pt-black electrode with HPU-25 outer membrane; ordinate is the percentage to the initial response.

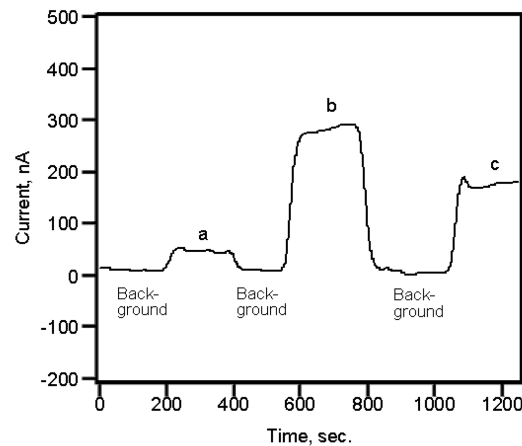


Fig. 10. Measurements of lactate in serum sample: lactate standard solution; (a) 0.5 mM and (b) 5 mM, (c) serum sample. Applied potential: +300 mV (vs. Ag/AgCl).

Table 1. Determination of lactate levels in serum and control samples^{a,b}

Serum type	Manufacturer's specifications	Lactate value determined
Serum sample ^c	3.0	2.9 \pm 0.2
Control sample ^d	2.7 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3

^aIn mM. ^bNumber of samples: n = 5. ^cControl human serum samples (Model Suitrol A) from Nissui Pharmaceutical (Tokyo, Japan). ^dBlood gas/electrolyte/metabolite/BUN control (Model QC 823) from Bionostics (Devens, MA, USA).

센서가 상업적으로 응용이 가능한지를 알아보기 위해 서 multi-channel peristaltic pump를 사용한 흐름계 주

입법을 이용해 표준용액(0.5 mM과 5 mM)과 혈청시료, 그리고 control sample을 센서에 적용 시켜 보았다 (Fig. 10). 본 연구에서 제작된 센서의 감응시간은 70 초(0 → 0.5 mM) 그리고 90 초(0 → 5 mM) 이었다. 또한 혈청시료에 포함된 단백질은 센서의 성능에 크게 영향을 끼치지 않아서 정확한 혈청시료내의 정확한 lactate의 농도를 얻을 수 있었으며, control sample의 경우 제조자가 제공한 농도 값과 본 연구에서 구한 값이 잘 일치 하였다(Table 1).

4. 결 론

다양한 친수성 폴리우레탄과 Pt-black 층을 도입한 2전극계의 평면 소자형 lactate 바이오센서를 제작한 뒤, 비흐름계와 흐름계 실험을 통하여 바이오센서의 성능을 평가하였다. 본 연구에서 개발된 최적의 성능(즉, 큰 감응세기와 넓은 검출영역)을 나타내는 바이오센서는 Pt-black을 입힌 Au 전극 위에 LOD가 고정된 PVA를 형성시킨 후, 친수성 폴리우레탄(흡수력 25 wt.%)을 외부 보호막으로 도입한 것으로, 순수한 Au 전극을 사용한 센서와 비교할 때, 친수성 폴리우레탄의 선택적 투과성에 의하여 낮은 가역전위(+300 mV vs. Ag/AgCl)에서도 쉽게 산화되는 ascorbic acid, acetaminophen과 uric acid 등과 같은 산화 종들의 영향이 감소되었고 lactate에 대한 상한 검출한계가 9 mM(직선도 0.999)로 향상되었다. 전극수명은 25일 이상 유지되는 것을 확인하였다. 또한 흐름계 실험을 통하여 혈청시료 및 control sample을 최적화한 센서에 적용함으로써 상용화 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2005-210-C00017).

참고문헌

1. P. B. Oliver, *Am. J. Medicine*, **48**, 209(1970).

2. E. I. Iwuoha, A. Rock and M. R. Smyth, *Electroanalysis*, **11**(5), 367(1999).
 3. Q. Yang, P. Atanasov and E. Wilkins, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 203(1999).
 4. K. Hajizadeh, H. B. Halsall and W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta*, **243**, 23(1991).
 5. P. Vadgama, *Analyst*, **111**, 803(1986).
 6. W. H. Mullen, S. J. Churchouse, F. H. Keedy and P. M. Vadgama, *Clin. Chim. Acta*, **157**, 191(1986).
 7. N. Shimojo, K. Naka, H. Uenoyama, K. Yoshioka and K. Okuda, *Clin. Chem.*, **39**, 2312(1993).
 8. G. Cui, S. J. Kim, S. H. Choi, H. Nam and G. S. Cha, *Anal. Chem.*, **72**, 1925(2000).
 9. J. H. Shin, Y. S. Choi, H. J. Lee, S. H. Choi, J. Ha, I. J. Yoon, H. Nam and G. S. Cha, *Anal. Chem.*, **73**, 5965 (2001).
 10. G. F. Khan and W. Wernet, *Anal. Chem.*, **69**, 2682 (1997).
 11. P. N. Bartlett and D. J. Caruana, *Analyst*, **119**, 175 (1994).
 12. M. Kyrolainen, H. Hakanson, B. Mattiasson and P. Vadgama, *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 1073(1997).
 13. J. Schneider, B. Grundig, R. Renneberg, K. Cammann, M. B. Madaras, R. P. Buck and K.-D. Vorlop, *Anal. Chim. Acta*, **325**, 161(1996).
 14. M. Koudelka, S. Gernet and N. F. De Rooij, *Sens. Actuators*, **18**, 157(1989).
 15. I. Yilgor and E. Yilgor, *Polymer*, **40**, 5575(1999).
 16. J. H. Shin, S. Y. Yoon, I. J. Yoon, S. H. Choi, S. D. Lee, H. Nam and G. S. Cha, *Sens. Actuators B*, **11**, 260(1999).
 17. J. S. Lee, S. D. Lee, G. Cui, H. J. Lee, J. H. Shin, G. S. Cha and H. Nam, *Electroanalysis*, **11**, 260(1999).
 18. S. H. Choi, J. Ha, J. H. Shin, Y. S. Choi, S. H. Han, H. Nam and G. S. Cha, *Anal. Chim. Acta*, **431**, 267(2001).