

포도당 산화효소를 고정화한 Polypyrrole 나노튜브 효소전극의 포도당 용액 및 당뇨병 혈청에 대한 감응특성

A Sensing of Glucose Solution and Diabetic Serum using Polypyrrole Nanotubules Enzyme Electrode Immobilized Glucose Oxidase

김현철, 구할본

(Hyun-Cheol Kim and Hal-Bon Gu)

Abstract

We synthesized polypyrrole (PPy) nanotubules by oxidative polymerization of the pyrrole monomer on the pore of a polycarbonate membrane. The electrochemical behavior was investigated using cyclic voltammetry and AC impedance. The redox potential was about -0.5 V vs. Ag/AgCl reference electrode, while the potential was about 0 V for electro-synthesized PPy film. It is considered as the backbone grows according to the pore wall. Therefore, it is possible to be arranged regularly. That leads to improvement in the electron hopping. The AC impedance plot gave a hint of betterment of mass transport. PPy nanotubules have improved in mass transport, or diffusion. That is because the diffusion occurs through a thin pore wall of PPy nanotubules.

The kinetic parameter of PPy nanotubules enzyme electrode with glucose solution was evaluated. The formal Michaelis constant and maximum current calculated by computer were about 23.8 mmol dm⁻³ and 440 μ A respectively. Obviously, an affinity for the substrate and current response of the PPy nanotubules enzyme electrode are rather good, comparing with that of PPy film. What is more, the enzyme electrode is sensitive to blood sugar of a diabetic serum despite an obstruction of ascorbic acid, oxygen, some protein and/or hormone.

Key Words : Polypyrrole, Nanotubule, Enzyme electrode, Glucose oxidase, Serum

1. 서 론

효소전극의 제조에 대한 요소기술은 첫째, 생화학적 반응의 증진을 위한 고정화양의 향상이고, 둘째, 기질과의 반응에 의한 응답전류의 증가이다. 또한,

고정화된 효소의 실효활동도 손실을 최소화하기 위하여 전극의 표면에 효소를 고정화시켜야 한다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 다양한 방법으로 효소전극에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.[1]

효소 고정화양의 향상에 관하여, gel matrix법과 cross-linking법은 대체로 성공적인 방법이다. 그러나 이러한 방법들은 전극표면으로 기질의 확산이 제한되거나, 효소에 손상을 야기하여 실효활동도가 감소하며, 특히 cross-linking에 의한 방법은 고정화의

전남대학교 전기공학과

(광주광역시 북구 용봉동 300,

Fax: 062-530-0077

E-mail : hbgu@chonnam.ac.kr)

강도가 약하다는 문제점을 포함하고 있다.[2]

따라서, 우리는 효소의 실효활동도 증대와 이에 따른 기질전환력의 향상을 도모하고, 아울러 높은 응답전류의 달성을 목적으로 template를 이용하여 합성한 PPy 나노튜브에 포도당 산화효소를 전기화학적으로 고정화하여 효소전극을 제조하였다. 본 연구에서는 PPy 나노튜브의 전기화학적 특성과 효소전극으로써 포도당 용액에 대한 전류응답 및 당뇨병 환자의 혈청 샘플에 대한 응답특성에 대하여 발표한다.

2. 실험 방법

고분자 나노튜브의 합성은 0.1 mol dm^{-3} pyrrole 에 particle track-etched polycarbonate membrane (PT-PCM)을 넣고, 산화제로 0.5 mol dm^{-3} FeCl_3 용액을 넣어 PT-PCM의 pore 벽에 PPy nanotubules를 합성하였다. 합성 후, methylene chloride에 넣어 PT-PCM를 녹이고, $\text{In}_2\text{O}_3\text{-SnO}_2$ (ITO) 코팅 유리에 부착시켜 사용하였다.

PPy 나노튜브의 표면구조는 field emission SEM (Hitachi S-4700)을 이용하여 관찰하였다.

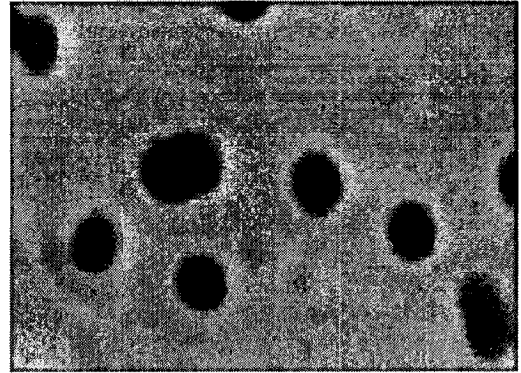
PPy 나노튜브의 산화환원 거동을 연구하기 위하여 0.5 mol dm^{-3} KCl 용액에서 순환 전압전류 특성을 관찰하였다.

포도당 센서를 위한 효소전극은, ITO 유리전극에 부착된 PPy 나노튜브를 2mg/ml 의 포도당 산화효소를 포함하는 phosphate 완충용액(pH 8.00)에서 20분간 전기화학적으로 도핑하여 제조하였다. 참조전극으로 Ag/AgCl, 대향전극으로 백금선을 사용하여 0.7V의 포텐셜을 인가하였다.

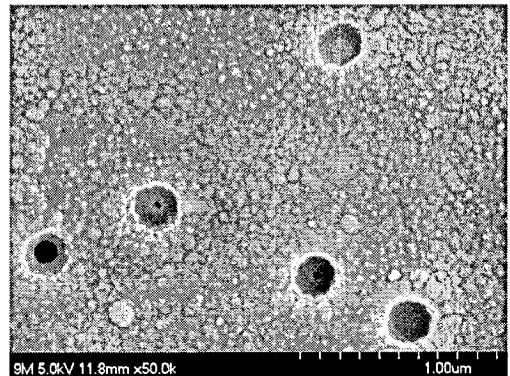
포도당 주입에 따른 효소전극의 전류응답은 1mmol dm^{-3} *p*-quinone을 포함하는 phosphate 완충용액(pH 7.00)에서 +0.35V의 포텐셜로 amperometric 방법을 이용하여 측정하였다. 한편, 당뇨병 환자의 혈청 샘플은 채혈 후 저온 원심분리를 이용하여 얻었으며, 혈청 1~2적(滴)으로 도전료를 형성한 후, +0.7 V vs. Ag/AgCl의 포텐셜을 인가하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

그림 1은 PT-PCM 및 본 연구에서 합성한 PPy



(a)



(b)

그림 1. Template membrane 및 PPy nanotubule의 SEM 사진.

Fig. 1. SEM photographs of template membrane and PPy nanotubule. (a) Template membrane. (b) PPy nanotubule.

나노튜브의 미세 표면구조를 보여준다. 그림에서 알 수 있듯이 template의 pore 내부에서 중합이 이루어져, 중합시간에 따라 튜블의 두께가 두꺼워지며, 점차 pore를 채우게 된다. 본 연구에서 합성한 PPy 나노튜브의 외경은 400nm이고, 내경은 중합시간에 따라 감소하여 250nm에서 20nm까지 관찰할 수 있었다.

그림 2는 전해중합의 방법으로 합성한 PPy 필름과 template을 이용하여 9분 동안 합성한 PPy 나노튜브의 순환 전압전류 특성이다. PPy 필름의 전형적인 산화환원 거동은 그림 2(a)와 같다. 그림에서 알

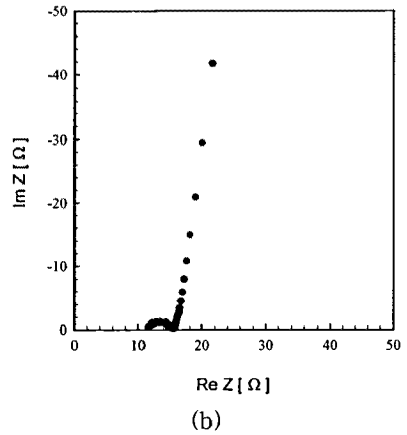
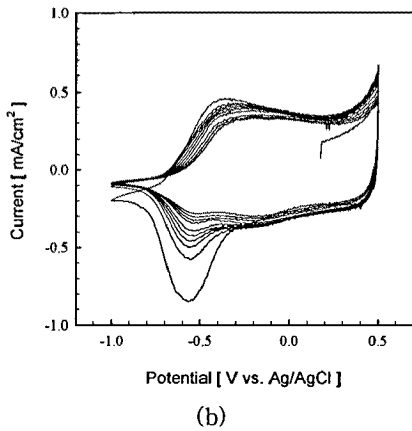
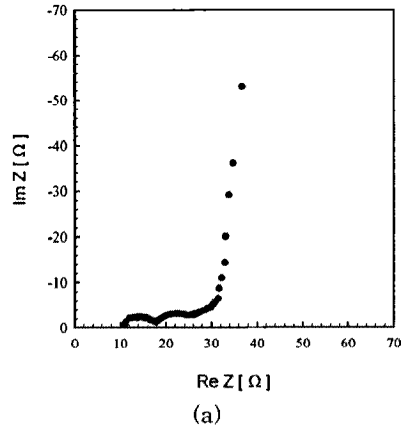
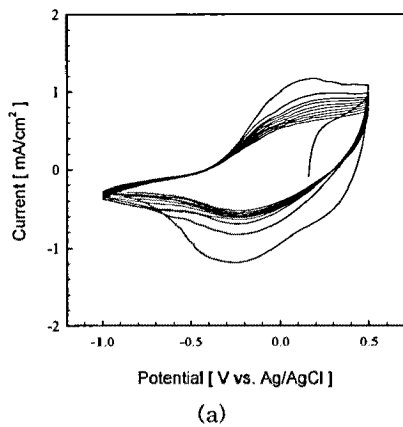


그림 2. PPy 필름 및 PPy 나노튜브의 순환 전압전류 특성. (a) PPy 필름. (b) 9분 중합한 PPy 나노튜브.

Fig. 2. Cyclic voltammograms of PPy film and PPy nanotubes. (a) PPy film. (b) PPy nanotubes synthesized for 9 min.

그림 3. PPy 필름 및 PPy 나노튜브의 교류 임피던스 특성. (a) PPy 필름. (b) 9분 중합한 PPy 나노튜브.

Fig. 3. AC impedance spectroscopy of PPy film and PPy nanotubes. (a) PPy film. (b) PPy nanotubes synthesized for 9 min.

수 있듯이 산화환원 피크는 0V 근처에서 나타난다. 한편, 튜블 구조를 갖게 되면 그림 2(b)와 같이 산화환원의 faradic 반응이 Ag/AgCl 참조전극에 대하여 -0.5V 근처에서 활발히 일어나 피크를 형성한다. 그 이후, +0.5V까지는 계면에서의 이중층의 충전에 해당하는 capacitive 영역이다. 이와 같이, 튜블 구조에서 산화환원 포텐셜이 낮아지는 것은 PPy의 주쇄가 template를 따라 성장함으로써, π 공역계의 발달이 증대되고 또한 전자의 호핑 메카니즘에 개선을 가져오기 때문이라고 생각된다.

그림 3은 PPy 필름과 PPy 나노튜브에 대한 교류 임피던스 특성을 나타낸다. 전자수수에 대하여 반응의 속도 율속단계에 해당하는 고주파수 영역의 faradic 임피던스는 두 경우 모두 약 10 Ω 이내로 나타나 π 공역계가 발달하였음을 시사하고 있다. 그러나 그림 3(a)에서는 고주파수 영역에서 두 개의 반원이 나타나는 반면, 그림 3(b)의 나노튜브에 있어서는 하나의 반원만이 관측된다. 일반적으로 고주파수 영역의 임피던스 특성은 전자수수 반응에 관계되는

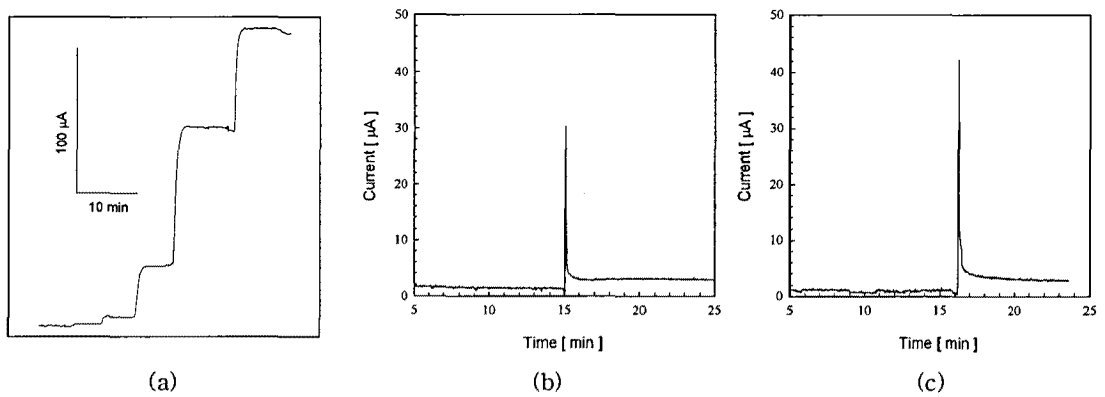


그림 4. 포도당 용액 및 당뇨병 환자의 혈청 주입에 따른 PPy 나노튜브 효소전극의 전류응답 특성. (a) 포도당 감지전류, 주입된 포도당 농도는 각각 0.5, 1, 5, 10 및 20 mmol dm⁻³. (b) 당뇨 혈청의 혈당 감지전류, 175 mg/dL (9.71 mmol dm⁻³). (c) 당뇨 혈청의 혈당 감지전류, 230 mg/dL (12.78 mmol dm⁻³).

Fig. 4. Current response of PPy nanotubules enzyme electrode. (a) Glucose sensing current according to injection of different concentration glucose solution. (b) Blood sugar sensing current for injection diabetic serum (175 mg/dL). (c) Blood sugar sensing current for injection diabetic serum (230 mg/dL).

것인데, faradic 임피던스 특성에 해당하는 반원 이전에 나타나는 반원 형태의 임피던스 특성은(그림 3(a)의 첫 번째 반원) 전자수수가 발생하기 위하여 나타나는 고분자 주쇄의 쌍극자 재배향과 중심이온과 배위자 사이의 거리변경 단계에 해당하는 반응성 임피던스이다. 그것에 해당하는 임피던스 응답이 그림 3(b)에서 나타나지 않는 것은 PPy 나노튜브가 중합될 때, template의 pore 벽을 따라 성장함으로써 보다 규칙적인 주쇄의 배열을 가지고 있기 때문이고, 이것은 곧 전자 호핑의 개선을 뒷받침한다.

또한, 물질이동이 율속단계가 되는 저주파수 영역에서 확산 임피던스에 해당하는 Warburg 임피던스가 그림 3(a)의 경우에 관측되는 반면에, 그림 3(b)의 경우에는 거의 관측되지 않으며 곧바로 포화영역으로 들어간다. 이것은 나노튜브의 얇은 관벽으로 인하여 물질이동이 거의 제한되지 않음을 시사한다.

그림 4는 본 연구에서 합성한 PPy 나노튜브에 전기화학적 방법으로 포도당 산화효소를 고정화하여 제조한 효소전극의 포도당 용액과 당뇨병 환자의 혈청에 대한 전류응답을 보여주고 있다. 그림 4(a)에서 포도당 주입 후 수 분 이내에 정상상태에 도달하는

것을 볼 수 있다. 또한 응답전류의 크기도 필름상태의 PPy에 비하여 5배에서 많게는 100배정도 증가하였다. Lineweaver-Burke plot을 이용하여 컴퓨터로 계산한 결과 Michaelis 상수 K_M 과 최대전류 i_{max} 는 각각 23.8 mmol dm⁻³ 과 440 μA 로 우수한 기질 친화력과 생화학적 반응속도를 얻었다. 이러한 결과는 나노튜브의 얇은 관벽에 효소가 고정화됨으로 전극의 표면부에 고정화가 가능하고, 무엇보다도 효소의 활동지점으로 기질의 확산과 생성물의 제거가 원활하게 진행되기 때문이다. 또한 PPy 나노튜브의 개선된 전자호핑 기구도 응답전류 향상에 상승효과를 부여한다.

한편, 임상으로의 응용을 위하여 혈청의 혈당에 대한 전류응답을 측정하였으며, 그 결과를 그림 4(b)와 (c)에 나타내었다. 그림 4(b)의 경우는 혈당 관찰이 요망되는 공복시 혈당 경계치 140 mg/dL를 약간 넘는 경우이고, 그림 4(c)는 어느 정도 약물 치료를 요하는 정도의 혈당 값이다. 두 경우 모두 우수한 감도의 전류응답을 보였다. 혈청에는 아스코빈산, 여러 가지 단백질 또는 호르몬이 존재하여 혈당의 감지에 방해요소로 작용하게 된다. 그럼에도 불구하고 30 μA ~ 40 μA 의 대단히 양호한 응답전류를 얻을 수

있었다.

4. 결 론

본 연구에서 제조한 PPy 나노튜브 효소전극은 효소의 실효 활동도의 손실이 낮아 기질친화력이 증대되었고, 효소가 얇은 관벽에 고정화됨으로써 기질과 생성물의 확산이 개선되었다. 포도당 용액에 대하여 $23.8 \text{ mmol dm}^{-3}$ 의 Michaelis 상수와 $440 \mu\text{A}$ 의 우수한 기질 친화력과 생화학적 반응속도를 얻었으며, 혈당의 감지에 방해요소가 존재하는 당뇨병 환자의 혈청에 대해서도 우수한 감도와 양호한 응답전류를 얻었으며 임상으로의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

참고 문헌

- [1] N. C. Fould and C. R. Lowe, "Enzyme Entrapment in Electrically Conducting Polymers", J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, vol.82, pp.1259-1264, 1986
- [2] Brian R. Eggins, Biosensor: an Introduction, Wiley and Teubner, New York, 1996.