

백금 도금된 탄소반죽 전극을 이용한 일회용 글루코오스 센서

이동주* · 유재현 · 최 강 · 최문희 · 김문환 · 류준오* · 한상현 · 차근식 · 남학현†

*(주) 올메디쿠스 부설연구소, 광운대학교 이과대학 화학과

(1999년 10월 1일 접수 : 1999년 11월 9일 채택)

Disposable Glucose Sensor Based on Platinised Carbon Paste Electrode

Dong Joo Lee*, Jae Hyun Yoo, Gang Cui, Moon Hee Choi, Moon Hwan Kim,
Joon Oh Ryu*, Sang-Hyun Han, Geun Sig Cha, Hakhyun Nam†

*All medicus Co. Ltd., Anyang 431-062, Korea

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

(Received October 1, 1999 : Accepted November 9, 1999)

초 록

Carbon paste 전극을 백금도금 한 후 이 전극을 사용한 일회용 전류법 glucose 센서를 제작하였다. 전극에 시료용액을 가한 후, voltammetry를 이용하여 본 센서의 감응성을 연구하였다. screen printing된 carbon paste 전극 표면 위에 전기도금 방법으로 도입된 백금은 센서의 분석성능과 mediator의 전기 화학적 가역성을 크게 향상시켜 준다. 제작된 센서가 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 에 대한 heterogeneous rate constant는 $1.45 \times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 이며, 이 센서는 적용전위 0.3 V vs. Ag/AgCl에서 glucose에 대한 좋은 감응성을 보여주었다. 이 때 glucose에 대한 Michaelis-Menten 상수는 24.5 mM이다. 일회용 glucose 스트립 센서의 분석성능을 평가하기 위하여 NOVA S.P. Ultra M analyzer와 비교실험을 수행하였다. 이 때 시료용액으로서 80~297 mg/dL 범위의 glucose를 함유하고 있는 30여 종류의 혈청을 사용하였고, 상관계수는 0.983으로서 정밀도와 정확도가 비교적 우수함을 보여주었다.

Abstract : Disposable, amperometric glucose sensor was constructed using platinised carbon paste electrode. The sensor response was studied by amperometry and cyclic voltammetry applying sample solutions on the strip-type electrode. Platinization of screen-printed carbon paste electrode effectively improved the electrochemical reversibility of a mediator and the analytical characteristics of the sensor. The heterogeneous rate constant for $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ was $1.45 \times 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. An applied potential of 0.3 V vs. Ag/AgCl resulted in the best selectivity for glucose. The apparent Michaelis-Menten constant for glucose on the strip sensor, K_m^{app} , was 24.5 mM. To evaluate the analytical performance of the glucose sensor strip, a correlation study was performed with the NOVA S.P. Ultra M analyzer for 30 serum samples containing 80~297 mg/dL of glucose: the correlation coefficient value was 0.983. It can be seen that the strip sensor has satisfactory precision and accuracy.

Key words : Platinised carbon paste electrode, Glucose sensor, Strip sensor, Amperometry

1. 서 론

최근 당뇨병을 진단하고 예방하는데 있어서 혈액내의 glucose 양을 주기적으로 측정해야 할 필요성이 증대되고 있다.^{1,2)} 전기 화학적 방법을 이용한 glucose biosensor는 높은 선택성과 감도를 가지며 시료가 혼탁하더라도 시료를 별도의 전처리 없이 사용 가능하며 짧은 시간 내에 정확한 양을 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

자가 혈당진단(self-monitoring blood glucose, SMBG)을 위한 대부분의 효소 전극은 screen printing 기술을 이용해 만들

어진다.^{3,4)} 최근 이러한 기술을 이용하여 상품화된 glucose 센서인 ExacTech(Medisense), Glucocard(Kyoto Daiichi Kagaku), Glucometer Elite(Bayer Diagnostics)등 많은 제품들이 이미 시장에서 판매되고 있다. 이러한 screen printing 기술의 주된 장점은 일회용 전기화학적 센서를 빠르고 손쉽게 대량생산 할 수 있다는 것이다. 또한 screen printing 기술을 이용하여 제작된 paste들은 재현성이 뛰어나며 일정한 감도를 가진다. 상품화된 paste 중 Pt, Au와 같은 귀금속은 높은 소성 온도(850~1200°C)가 필요하다. 이러한 문제 때문에 전기화학 센서에 가장 널리 사용되는 물질은 다양한 종류의 carbon-based paste들이다. 이 paste들은 낮은 경화온도, 낮은 바탕전류 및 넓은 potential window를 가지는 장점들이 있지만, mediator의 전기화학적 가

†E-mail: namh@daisy.kwangwoon.ac.kr

역성과 센서의 분석성능을 향상시키기 위해 종종 전극표면을 활성화시킬 필요가 있다.^{5,6)}

본 연구에서는 일회용 blood glucose 스트립 센서의 재현성 및 감응성을 증진시키기 위하여 carbon paste 전극의 표면을 활성화하는 방법을 다루었다. blood glucose 농도 측정을 위해 효소로 glucose oxidase(GOD)를, mediator로 ferricyanide를 각각 사용하였고, poly(vinyl alcohol)(PVA)을 분산제로 이용하여 전극표면에 도입하였다. 전극표면은 Pt black을 전기 도금하여 활성화 하였으며, 제작된 센서는 glucose를 측정하기 위하여 전극표면에 일정전위를 걸어주어 시간에 따른 전류변화를 측정하였다. 일회용 glucose 스트립 센서의 분석성능을 평가하기 위하여 NOVA S.P. Ultra M analyzer와 비교실험을 수행하였다. 그 결과 상관계수는 0.983으로서 정밀도와 정확도가 비교적 우수함을 보여주었다.

2. 실험

2.1. 시약

본 실험에 사용된 glucose oxidase(GOD, EC 1.1.3.4, type VII-S, 180,000 units/g, from aspergillus niger), β -D(+)-glucose, ascorbic acid(AA), uric acid(UA), acetaminophen(AP)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품이고, poly(vinyl alcohol)(PVA, MW. 22,000)은 Fluka사(Ronkonkoma, NY, USA)의 제품을 사용하였고, potassium ferricyanide는 Junsei사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. chloroplatinic acid, ferric chloride는 Yakuri사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 스트립 전극제작에 사용하는 carbon paste(TU-15ST), silver paste(LS-506J)는 Asahi사(Tokyo, Japan)의 제품을, insulator paste(CR-10) 및 경화제는 (주)서울화학연구소(Seoul, Korea)의 제품을 각각 사용하였다. 표준 혈청은 Nissui pharmaceutical사(Tokyo, Japan)의 동결 건조시킨 제품을 구입하여 증류수 5 ml를 첨가한 후 사용하였고, 시료 혈청은 한양대학병원으로부터 제공받았다. 전극 지지체는 polyester(PE) 필름을 사용하였다. 이외의 여러 가지 물질이나 완충용액 등은 특급시약등급이나 분석시약등급에 준하는 시약을 사용하였으며, 용액의 제조에는 탈 이온수(저항 18 M Ω ·cm)를 사용하였다.

2.2. 장치

Strip 전극은 반자동 screen printer(MSP 150S, 미농상사)를 사용하여 제작하였다. 혈청시료에 대한 본 센서의 정확성, 재현성 및 감응 성능을 평가하기 위해 Nova Biomedical사의 생화학분석기(Model Stat Profile Ultra M, Waltham, MA)를 기준으로 하였다. 효소 및 전자전달 매개체는 EFD사의 수동 dispenser(model 100XL, USA)를 사용하여 전극에 도입하였다.

Chronoamperometry(CA), cyclic voltammetry(CV) 등의 전기화학실험은 EG&G PARC 273A Potentiostat/Galvanostat(Princeton, NJ, USA)에서 수행하였다. Platinizing 실험에 사용되는 cell은 자체 제작하였고, 상대전극은 Pt plate를 사용하였으며, 기준전극은 saturated calomel electrode(SCE)를 사용하였다. 제작된 pseudo-reference electrode의 성능평가는 high impedance input 16-channel voltameter를 사용하였고, Orion double junction Ag/AgCl 전극(Model 90-20)을 기준전극으로 사용하였다. 얻어진 data는 A/D 변환기를 거쳐 PC에 저장하였다.

2.3. 일회용 효소 전극의 제작

Screen printing 과정은 3단계로 진행된다. 첫 단계로는 PE 필름 위에 연결부 및 기준전극과 보조전극을 silver paste로 프린

팅 한 후 130°C에서 5분 동안 경화시켰다. 두 번째 단계로 작동전극은 carbon paste를 사용하여 프린팅한 후 140°C에서 15분 동안 경화시켰다. 작동전극의 크기는 diameter가 2 mm인 원형으로 제작되었다. 마지막 단계로는 절연막이 되는 insulator paste를 프린팅 한 후 140°C에서 5분 동안 경화시켰다. 제작된 strip 전극은 -0.2 V vs. SCE에서 chloroplatinic acid(3 wt%)와 lead acetate(0.01 wt%)포함된 용액을 사용하여 작동전극에 일정시간 Pt black을 도금하였다. Pseudo-reference electrode는 screen printing된 Ag 전극의 표면을 0.3 M FeCl₃ 용액에 10분간 chloridation하여 제작하였다. 제작된 Ag/AgCl pseudo-reference electrode는 탈 이온수로 세척한 후, 3 M KCl 용액에 30분간 안정화시킨 후 사용하였다.

Pt black을 도금한 전극 위에 수동 dispenser를 사용하여 일정량의 ferricyanide와 GOD를 고정화시킨 후 decicator 안에서 일정온도(24~26°C)와 습도(50~55%)를 유지하며 16시간 동안 방치시킨 후 실험을 수행하였다. 효소와 mediator를 균일하게 분산시키기 위하여 분산제로 PVA를 사용하였다.

표준용액 제조 및 스트립 센서의 성능시험에 140 mM NaCl을 포함하는 50 mM phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4 용액을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

전극표면에 Pt black을 도금한 전극은 전극성능을 개선하기 위한 하나의 방법이며 biosensor에서 널리 응용되고 있다.^{7,8)} 그 이유로는 (1) 전극의 표면적을 증가시키고, (2) 높은 촉매활성을 나타내기 때문이다. 본 연구에서는 screen printing 기술을 이용한 carbon paste전극의 mediator에 대한 비가역적인 성질을 개선하기 위해 Pt black을 도금하였다.

Fig. 1은 Pt black을 도금한 전극과 도금하지 않은 전극의 [Fe(CN)₆]⁴⁻에 대한 cyclic voltammogram이다. Pt black으로 전기 도금한 전극은 10 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻에 대해 가역적인 전기화학 성질을 나타내었다(Fig. 1a): E_{pa} = 0.276 V, E_{pc} = 0.198 V, $\Delta E_p = 69$ mV, $i_{pa}/i_{pc} = 1.06$. 그러나 도금하지 않은 전극의 경우에는 산화, 환원 peak가 관찰되지 않았다(Fig. 1b). 또한 Pt black을 도금한 전극에서 [Fe(CN)₆]⁴⁻³⁻에 대한 heterogeneous rate constant는 1.45×10^{-2} cm \cdot s⁻¹이다. Fig. 2는 scan rate에

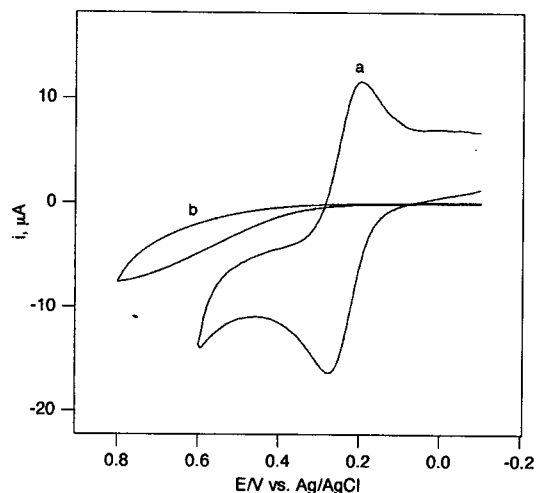


Fig. 1. Cyclic voltammograms for 10 mM ferrocyanide at the platinized (a) and the unplatinized (b) carbon paste electrode: scan rate, 60 mV/s; electrolyte, PBS (140 mM NaCl).

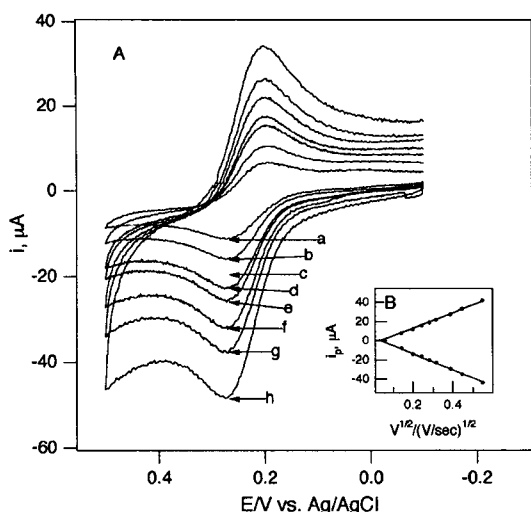


Fig. 2. Cyclic voltammograms of platinumized carbon paste electrode for 10 mM ferrocyanide at different scan rate : a) 20, b) 40, c) 60, d) 80, e) 100, f) 150, g) 200, h) 300 mV/sec. Inset figure shows the dependence of the peak current on the square root of the scan rate.

변화에 따른 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 의 cyclic voltammogram이다. scan rate 값이 20~200 mV/sec인 범위에서는 산화-환원 peak 전위가 변하지 않았으며, scan rate가 증가함에 따라 산화-환원 peak 전류값도 증가한다(Fig. 2A). peak 전류값은 scan rate의 제곱근에 비례함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 위 실험 결과로부터 mediator $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 가 일전자 반응이며 거의 가역적인 반응을 알 수 있다. 제작된 일회용 스트립 전극의 정밀도를 측정하기 위해 0.3 V vs. Ag/AgCl(240 mM NaCl) 조건하에서 전류값을 측정하였다. 그 결과 $i_{pa}(\mu\text{A}) = 14.7 \pm 0.5(\text{mean} \pm \text{SD}, n=37)$ 의 값을 보여주며, 분산계수(%)는 3.08이었다.

또한 -0.2 V vs. SCE 조건하에서 반응시간에 따른 Pt black 층의 변화에 기인한 신호크기 변화를 알아보기 위해서 CV를 조사하였다(Fig. 3). Fig. 3은 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 의 cyclic voltammogram이다. 도금 시간이 길수록 전극표면 위에 도입되는 Pt black의 양이 많아지며, 전극의 표면적도 따라서 커지기 때문에 피크 전류값은 증가하게 된다. 그러나 그림에 나타

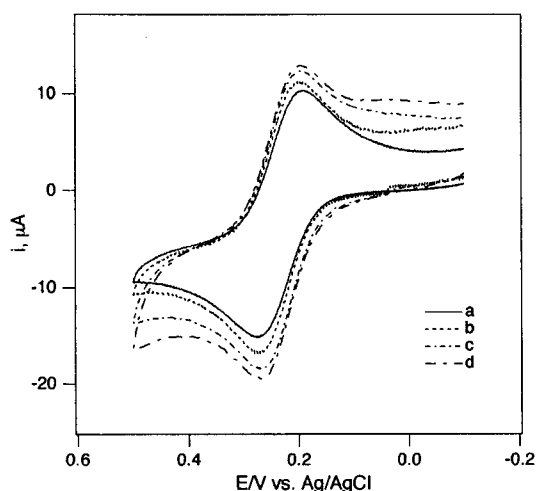


Fig. 3. Cyclic voltammograms of varying period of chloroplatinic acid deposition on the carbon paste electrode. a) 30, b) 60, c) 120, d) 180 sec.

나는 바와 같이 도금 시간이 길수록 바탕 전류값 또한 증가하는 현상이 나타난다. 바탕 전류값이 커지면 lower detection limit도 커지므로 오히려 전극성능을 악화시키는 경우가 발생한다. 또한 효율성의 측면도 고려하여야 한다. 따라서 -0.2 V vs. SCE 하에서 2 분간 반응을 걸어주어 작동전극표면에 도금을 수행하였다.

일회용 glucose 센서에서 작동전위는 센서의 성능에 큰 영향을 미친다. 최적의 작동전위를 결정하기 위해 GOD 및 mediator가 도입된 전극에 11.1 mM glucose를 포함한 용액을 떨어뜨린 후 chronoamperometry를 사용하여 수행하였다. Fig. 4는 그 결과를 dynamic 곡선으로 나타낸 것이다. glucose에 대한 감응은 0.2 V 이하에서부터 나타나기 시작한다. 낮은 작동전위는 쉽게 산화되는 방해 종들이(AA, UA, AP) 존재하는 실제 시료 측정에서 매우 유용하다. 그러나 상대적으로 너무 낮은 전위는 방해 종들의 산화를 줄일 수 있지만, 반면에 감도가 나빠진다. 따라서 본 연구에서는 작동전위를 0.3 V로 선택해 계속 실험을 수행하였다.

Mediator의 최적화는 효소(10 mg/mL)와 glucose(22.2 mM)의 농도를 고정시키고 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 의 양을 변화시켜 steady-state 전류를 측정하여 결정하였다. 전류 감응이 가장 큰 값을 가지는 mediator의 농도는 250 mM 이상에서 얻어졌다. 그러나 높은 농도의 mediator는 큰 바탕 전류값을 유발한다. 따라서 본 연구를 수행하는 동안 150 mM의 mediator를 사용하였다. 효소 양의 최적화도 이와 같은 방법으로 수행하였다. 즉 mediator인 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (150 mM)와 glucose(22.2 mM) 양을 고정시키고 GOD양을 순차적으로 변화시켰다. GOD양이 증가할수록 전류 응답도 역시 증가하였다. GOD양이 많으면 전극표면에 고르게 분산되지 않으며, GOD양이 15 mg/mL 이상 일때 glucose 22.2 mM까지 직선성을 가진다. 따라서 15 mg/mL의 GOD를 glucose 센서에 사용하였다.

Biosensor가 사용되는 환경은 센서 감응에 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 용액의 pH 변화에 대한 전류값의 영향을 조사하여 Fig. 5에 나타내었다. pH 7.4 근처에서 가장 큰 전류응답을 관찰할 수 있었으며, 본 실험에서는 최적의 pH를 7.4로 결정하여 계속 실험을 수행하였다.

AP과 AA 등은 생체 내에 일정량 존재하고, 쉽게 산화되는 전기활성 물질로서 glucose센서에 방해작용을 한다. Fig. 6는 10

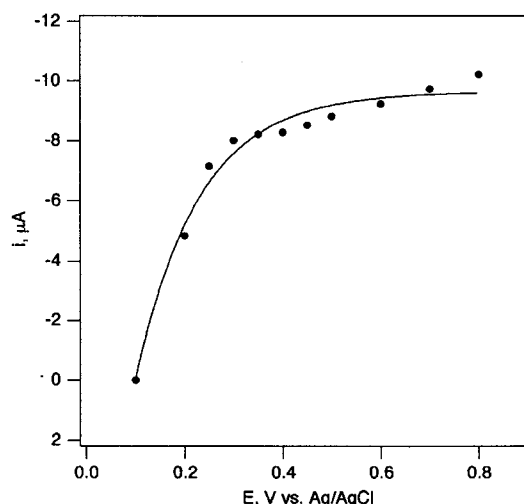


Fig. 4. Current response dependence on the potential of 11.1 mM glucose at platinumized carbon paste electrode incorporating GOD and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

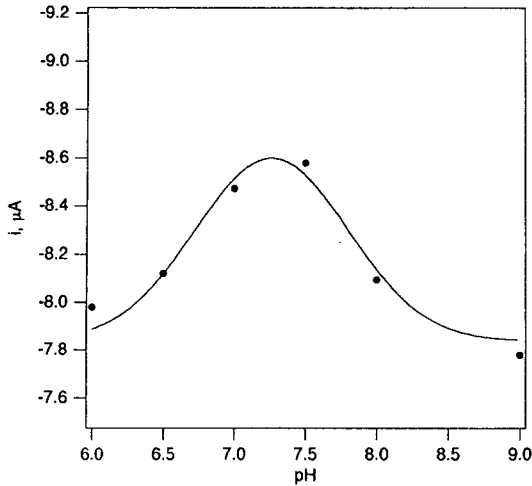


Fig. 5. Effect of pH on the sensitivity of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/\text{GOD}$ immobilized strip sensor.

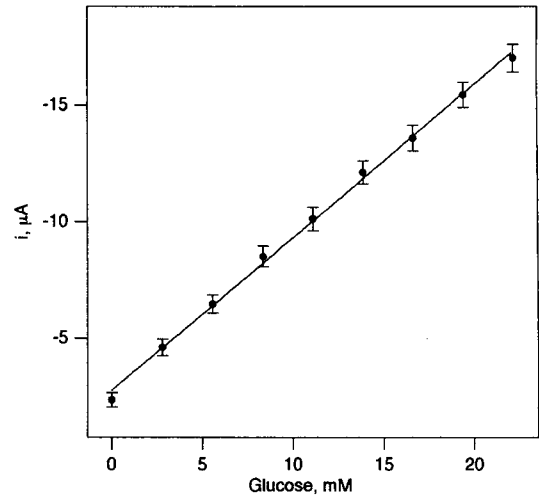


Fig. 7. Glucose calibration determined with $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/\text{GOD}$ immobilized strip in PBS at 0.3 V vs Ag/AgCl.

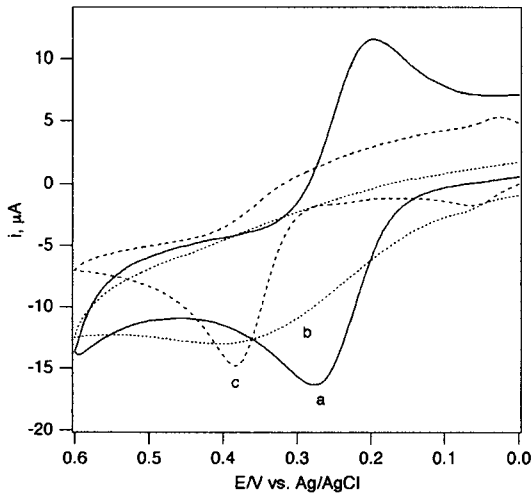


Fig. 6. Cyclic voltammogram of 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (a), 1.14 mM ascorbic acid (b), 1.32 mM acetaminophen (c) at the platinumized carbon paste electrode. Scan rate, 60 mV/s.

mM의 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, 1.32 mM의 AP, 1.14 mM의 AA에 대한 cyclic voltammogram이다. AP과 AA 산화피크는 각각 0.38 V 과 0.37 V이고 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 산화피크 0.28 V에 비해 보다 높은 전위에서 나타났다. 방해물질에 대한 selectivity coefficient (S_i) 정량은 다음 식으로 계산하였다.⁹⁾

$$S_i = \frac{|I_{gluc}| - |I_i|}{|I_{gluc}|} \times 100\%$$

I_{gluc} 는 11.1 mM glucose 0.3 V 조건하에서 steady-state 전류 값이고, I_i 는 방해물질인 AA(1.14 mM) 또는 UA(1.41 mM)의 0.3 V에서의 전류값이며, 측정된 AA와 UA의 S_i 값은 각각 87 %, 71%이다. 본 연구에서 사용된 AA와 UA의 농도는 정상 임상범위 보다 과량이므로 실제 혈액에 적용할 때는 보다 좋은 selectivity coefficient를 기대할 수 있다.

Fig. 7은 Pt black을 도금한 전극을 이용하여 제작한 센서의 glucose(0, 2.8, 5.5, 11.1, 16.6, 22.2 mM, n=5) 표준용액에 대한 검정곡선을 나타낸 것으로서, 22.2 mM까지 좋은 직선성 감응을 보여준다($y = -2.7625 - 0.656x$, $r = -0.9989$). CA을 이용하여 길보기 “Michaelis-Menten constant”(K_m) 값을 구하는 방

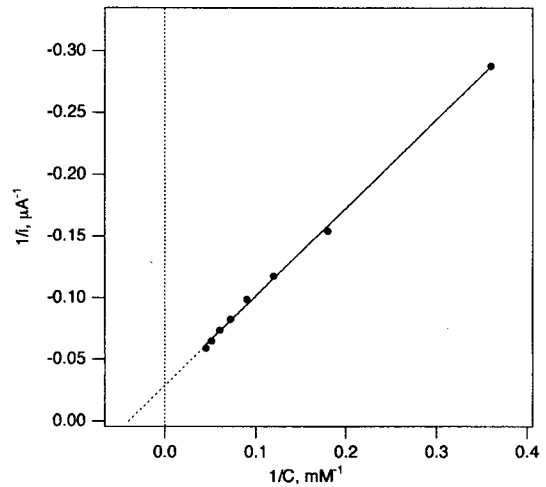


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot obtained from Fig. 7.

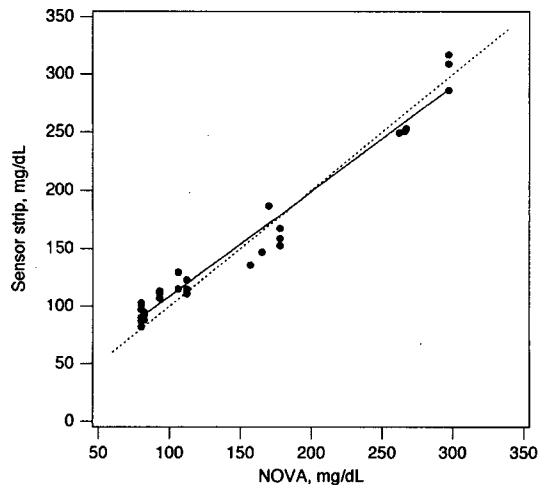


Fig. 9. Linear regression of the glucose strip sensor against NOVA glucose values. The solid line is the regression line and the dotted line is the 1 : 1 line.

법은 Wilson과 Shu가 제안한 바가 있다. K_m 값은 아래의 식으로 구할 수 있다.¹⁰⁾

$$\frac{1}{i_{ss}} = \frac{K_m}{i_{max}} \times \frac{1}{C} + \frac{1}{i_{max}}$$

$1/i_{ss}$ vs. $1/C$ 에 대하여 도시하면, 기울기 값 K_m/i_{max} 과 절편 값 $1/i_{max}$ 를 이용하여 K_m 값을 구할 수 있다. Fig. 7을 이용하여 Lineweaver-Burk plot을 그려 K_m 값을 구한 결과는 24.5 mM이다(Fig. 8). 이러한 겉보기 Michaelis-Mente 상수는 효소 자체가 아닌 효소 전극의 특성을 나타내며, 전극의 감응이 직선성을 나타내는 기질 농도의 범위를 초과하여도 측정이 가능하다는 것을 보여 준다.

일회용 glucose 스트립 센서의 분석성능을 평가하기 위하여 NOVA S.P. Ultra M analyzer와 비교실험을 수행하였다. 이 때 시료용액으로서 80~297 mg/dL 범위의 글루코오스를 함유하고 있는 30여 종류의 혈청을 사용하였고, 상관계수는 0.983으로서 정밀도와 정확도가 비교적 우수함을 보여주었다(Fig. 9).

4. 결 론

본 연구에서는 screen printing 방법으로 제작한 carbon paste 전극의 표면을 백금 도금하여 성능이 향상된 일회용 혈당 측정 스트립 센서를 개발하였다. 개발된 일회용 glucose 스트립 센서 전극은 표준용액에 대하여 22.2 mM까지 좋은 직선성 감응을 보여주었고, 혈청시료에 대해서는 분산계수가 6.43~12.41 정도의 정밀도를 나타내었다. 또한 혈청시료에 대해 Nova Biomedical사의 생화학분석기를 표본으로 삼아 비교하여 본 결

과 비교적 우수한 정확도 및 정밀도를 나타내었다. 이러한 전기 화학적 방법을 이용한 blood glucose 자가진단 시스템은 임상학적으로 중요한 glucose를 정량 하는데 경제적이고, 신속하며, 믿을 수 있는 방법으로 제시될 수 있다

감사의 글

본 연구는 (주)올메디쿠스 및 광운대학교 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. P. Schlapfer, W. Mindt and P. Racine, *Clin. Chim. Acta*, **57**, 283 (1974).
2. B. Harrison, R. Markes, P. Bradley and I. A. Ismal, *Clin. Biochem.*, **29**, 521 (1996).
3. M. F. Cardosi and S.W. Birch, *Anal. Chim. Acta*, **276**, 69 (1993).
4. B. D. Lewis, *Clin. Chem.*, **38**, 2093 (1992).
5. J. Wang, X. Cai, C. Jonsson and M. Balakrishnan, *Electroanalysis*, **8**, 20 (1996).
6. N. Motta and A. R. Guadalupe, *Anal. Chem.*, **66**, 566 (1994).
7. Y. Ikariyama, S. Yamauchi, T. Yukiashi and H. Vshioda, *Anal. Lett.*, **20**, 1790 (1987).
8. G. F. Khan and W. Wernet, *J. Electrochem. Soc.*, **143**, 3336 (1996).
9. S. S. E. Atarsh and R. D. O'Neill, *Electrochim. Acta*, **40**, 2791 (1995).
10. F. R. Shu and G. S. Wilson, *Anal. Chem.*, **48**, 1679 (1976).