

Tribenzylamine Ionophore를 이용한 pH-ISE의 제조 및 임상응용

서울산업대학교 화학공학과¹ · 서울보건대학 임상병리과²

조 동 회¹ · 박 정 오²

Preparation and Clinical Application of pH-ISE(Ion Selective Electrode) Based on Tribenzylamine Ionophore

Dong-Hoe Cho¹ and Chung-Oh Park²

Department of Chemical Engineering, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea¹

Department of Biomedical Laboratory Science, Seoul Health College, Sunnam 461-713, Korea²

The pH-ISE(ion selective electrode) based on tribenzylamine as a hydrogen ion carrier was prepared and its electrochemical characterization was studied. It responded linearly to hydrogen ions in the range of pH 3.1 - pH 11.0 and the Nernstian slope showed 55.0 mV/pH (at $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$), it also showed a fast response time of 8 sec. When it was directly applied to human blood(pH 6.0-8.5), we could get the same satisfying results. A good reproducibility and stability were shown with the precision of 2 mV (± 0.1). The pH-ISE based on tribenzylamine exhibited biocompatibility in clinical applications.

Key Words : ionophore, ISE, solid contact electrode, tribenzylamine, hydrogen ion sensor

I. 서 론

최근 생체 관련물질의 검출에 대한 의료용 센서의 개발과 연구의 필요성이 크게 대두되면서 그에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 체내에 미량 또는 극미량의 무기질 원소는 유도결합플라스마, 원자흡수분광법, 이온크로마토그래피 등의 방법으로 분석하고 있다. 그러나 기기가 고가이고, 취급할 때 숙련된 기술을 필요로 하며, 분광학적 간섭으로 인하여 어려운 점이 많다. 이러한 기기에 비하여 미량의 이온으로 존재하는 경우에 이온 활동도에 따라 생성되는 전위를 측정하여 특정 이온의 농도를 간편하게 구하는 이온센서가 개발되어 왔다. 우리

주변에서 일어나는 자연의 화학반응은 대부분 물의 존재 하에서 일어나게 되고, 그 반응은 수소이온과 수산화이온이 중요한 역할을 한다. 이런 것을 간편하게 측정하는 이온선택성전극(ISE, ion selective electrode)을 이용한 여러 가지 바이오 센서들이 연구되어 왔다(Schulthess 등, 1981; Wu 등, 1987; Chojnacki와 Biernat, 1990; Linder 등, 1993; Cho 등, 2000). 이 중 일부는 현재 의료진단 등에 사용되고 있으나 장비가 고가이고 용적이 클 뿐만 아니라 분석 시간이 길고 사용하기가 까다로움 등의 문제점들이 있다. 따라서 산업계의 복잡한 생화학적 공정의 모니터링이나 환경공학적 감시 및 제어분야 등에서 측정 환경에 영향을 주지 않으면서 소형이고 빠른 분석시간을 가진 센서를 필요로 하고 있다. 이 중에서 수소이온전극은 임상, 의학, 환경, 공정제어, 자동화 등 여러 분야에서 가장 많이 활용되고 있다(Ma 등, 1988; Cosofret 등, 1993). 수소 이온 선택성 전극에 대한 연구가 40년 이상

교신저자 : 박정오, (우)461-713 경기도 성남시 수정구 양지동 212 서울보건대학, 임상병리과.

Tel : (031) 740- 7138

E-mail : chungoh@shjc.ac.kr

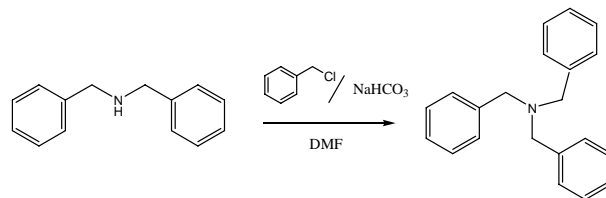
진행되어 오면서도 ISE(ion selective electrode)에 대한 많은 논문들은 전통적으로 유리관의 하부에 감응막을 부착하고, 그 내부에 액체 전해질을 첨가한 형태(conventional barrel configuration)에 대한 논문이 주종을 이루고 있지만, 약 10년 전부터 본격화 되기 시작한 WTE(wire type electrode)들이 조금씩 많은 연구의 범위를 넓혀 가고 있다. 이 WTE는 CWE(coated wire electrode)와 SCE(solid contact electrode)로 구별되어지는데, 이 두 형태는 모두 전통적인 전극의 내부에 액체 전해질이 제거된 형태로서 간단한 디자인과 적은 양의 운반체의 사용으로 제작비용이 저렴하고, 기계적 안정성이 있으며 의약이나 약학, 생체분야에 적용이 가능한 소형화 등의 장점들을 가지고 있다. 이 중 CWE는 금속 기질 바로 위에, 이온 선택성 운반체와 기타 첨가제들을 포함하는 고분자 막을 휘발 건조시켜 제조하는 방법과 금속 기질 위에 전기 화학적인 방법을 통하여 고분자체를 직접 형성시키는 방법 등으로 제조되어진 전극들이다. 이러한 전극들의 가장 큰 장점은 제조 과정에서도 알 수 있듯이 전극 크기의 소형화와 전극 구조의 단순화에 있다. 이 CWE는 수소 이온 이외에도 Ca^{2+} , NO_3^- , K^+ , Cl^- , Li^+ , ClO_4^- 등과 같은 다양한 다른 이온의 검출에 이미 많이 응용되어진 바 있다(James 등, 1972; Catrall 등, 1975; Xie 등, 1980; Alegret 등, 1991). 이렇게 발표된 CWE는 전통적으로 내부 용액을 포함하고 있는 형태의 전극들보다 훨씬 좋은 감응 범위와 선택성들을 나타내고 있는 반면, 전극의 수명이 상당히 짧고, 전극 표준 전위가 불안정하며, 재현성이 저하되거나 동일 전극에서도 용액 내에 유지되는 시간에 따라서 표준 전위가 변화하는 등의 단점들도 많이 가지고 있기 때문에, 많은 연구자들은 이런 문제점을 해결하기 위하여 도핑된 이온들을 포함하는 도전성 고분자 층을 만들어 전자 전도나 이온 전도 등의 완충 층을 제공함으로써 이를 이용하여 전자의 차폐 현상을 줄이고자 하였다. 이 전극이 바로 solid contact electrode이다. 즉, solid contact electrode는 금속의 기질 위에 도전성의 고분자층을 전기 화학적인 방법으로 형성시켜서 금속과 전기 화학적으로 형성된 고분자 층간의 접촉성을 증가시키고 그 위에 이온 선택성 운반체를 포함하는 고분자 용액을 입힌 전극이다.

본 연구에서는 ionophore로 tribenzylamine을 이용하여 PVC층이 형성된 poly(aniline) solid contact electrode의 수소 이온에 대한 선택적인 감응성 및 전기화학적 특성을 연구하고, 임상에 응용성을 적용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Aniline, potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpCIPB), 2-nitrophenyloctylether(2-NPOE), tetrahydrofuran(THF)는 Aldrich사의 시약을 사용하였으며 polyvinyl chloride(PVC, $n = 1,100$)는 Junsei chemical사의 시약을 사용하였다. 수소이온운반체로 사용한 tribenzylamine(TBA)은 0.01 M dibenzylamine을 10 mL dimethylformamide(DMF)에 용해하고 1 M NaHCO_3 와 0.013 M benzyl chloride를 넣어 153°C 에서 4시간 반응시켰다(Scheme 1). 반응 혼합물은 diethyl ether로 3회 추출하고 물로 2회 세척하고 감압 건조 후 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 정제하였다. $^1\text{H-NMR}$ (Varian Co., Gemmi 200 M), 적외선분광기(Bomem Co., Michelson series), 및 가스 크로마토그래피(Hewlett Packard 5890)로 구조를 확인, 분석하였다. Tris[hydroxymethyl]aminomethane(Tris)는 Sigma의 시약을 사용하였다. 이외에 실험에 사용된 시약들은 모두 분석급의 시약을 사용하였으며 전 실험을 통하여 탈이온수를 사용하여 실험하였다.



Scheme 1. Synthesis of tribenzylamine.

2. 전극의 제조

1) 전극의 세척 혼합용액의 제조

지름 1 mm, 길이 50 mm의 Pt 작업 전극의 표면은 $0.3\ \mu\text{m}$ 의 산화알루미늄 분말을 이용하여 전극의 표면을 닦은 후에 초음파 세척기 안에서 탈이온수로 30분간 세척하였고 $105 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 오븐 내에서 건조시킨 후 사용하였다. 기준 전극으로는 포화 칼로멜 전극을 사용하였으며, 보조 전극은 지름 1 mm × 길이 50 mm의 백금선을 사용하였다. Poly(aniline)의 전기화학적 합성에 사용된 용액은 0.03 M 아닐린에 대하여 0.045 M 염산을 6가지의 비율(1:1.5, 1:2.0, 1:2.5, 1:3.0, 1:4.0, 1:5.0)로 변화시키면서 제

조하였다. 이 용액 내에서 백금 표면에 poly(aniline) 층을 형성시키는 동안에는 질소 가스를 계속 주입하면서 실험하였다. 이 때 사용된 전위는 기준 전극에 대하여 0.0 volt에서 1.0 volt까지의 범위를 이용하였으며 주사속도는 100 mV/s로 하였다. 전극표면에 감응물질을 도포하기 위하여 사용된 혼합용액은 1 wt% TBA, 0.7 wt% KTpCIPB, 67.2% NPOE, 31.1 wt% PVC를 섞은 후 THF 5 mL에 용해시켜 제조하였다(Michalska 등, 1997; Kim 등, 1999).

2) pH-ISE의 제조

도전성 poly(aniline)가 흡착된 Pt/poly(aniline) 전극을 PVC 혼합 용액 속에 담구어서 전극 전체의 두께가 2.5 ± 0.1 mm가 되도록 하였다. 막이 형성된 전극은 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 오븐에서 24시간 건조시킨 후, 완전 건조가 이루어지면 감응부 3 mm를 제외한 나머지 부분을 열수축 튜브를 이용하여 110°C 에서 1분간 수축시켜서 제조하였다.

3) 완충 용액의 제조

pH 완충 용액은 0.01 M tris[hydroxymethyl] amino-methane과 0.01 M NaOH를 150 mL의 탈염수에 녹여서 제조하였으며, 전위 측정 시에는 이 용액에 0.5 M 염산을 적가하여 pH를 13.5에서 1.3까지 조정하면서 약 15단계의 각 pH에서의 전위값을 측정하였다(Cho 등, 1998)

3. 전극 전위 측정

1) 측정장치

전극이 pH 시료 용액 내에서 나타내는 전위값은 $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 에서 Ion analyzer와 EDS 시스템을 이용하여 측정하였다(Sakong 등, 1997; Faria 등, 1998). 시료 용액에 있어서의 pH 측정은 Mettler Toledo Inrab 412 유리 전극을 이용하여 측정하였으며 외부 기준 전극으로는 double-junction 칼로멜 전극 Orion 90-20-00을 이용하였다. 전위의 측정은 전극의 안정화 이후에 변화되는 전위가 0.1 mV 이하가 1분 이상 지속되어지면 해당 pH에서의 상응 전위로 간주하였다.

2) 시험용액의 전극 전위 및 선택 계수의 측정

방해 이온에 대한 선택 계수는 fixed interference method를 이용하여 측정하였다. 측정 용액은 0.01 M의 tris[hydroxymethyl]aminomethane과 0.01 M의 NaOH의 Tris 용액 150 mL에 0.130 M과 0.013 M의 NaCl, KCl,

LiCl을 각각 첨가하여 제조하였다. 이 용액에 0.5 M 염산을 첨가하여서 pH를 13.5에서 3.5까지 변화시켰으며 각 변화하는 약 13단계의 pH에서의 전위값을 측정하여 방해 양이온에 대한 선택 계수를 계산하였다(Yuan 등, 1993; Han 등, 2000).

III. 결과 및 고찰

Scheme 1에 의해서 tribenzylamine 흰색분말의 수소이온 운반체를 얻었다. 이것은 적외선분광기와 $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 확인 하였고, 가스크로마토그래피를 이용하여 순도 98%의 순도를 확인하였다.

IR spectrum : $3028 \sim 2805 \text{ cm}^{-1}$ (aromatic C-H, aliphatic C-H)

$1472 \sim 972 \text{ cm}^{-1}$ multiple peak(C-N)

$743 \sim 697 \text{ cm}^{-1}$ doublet(aromatic C=H)

$^1\text{H-NMR}$: δ 3.56 singlet(phenyl 15H)

δ 7.26 ~ 7.40 multiplet(phenyl 15H)

수소이온 운반체로서 tribenzylamine을 이용하여 pH-ISE를 제조하였고, 이 전극의 pH에 대한 감응 특성을 Fig. 1.에 나타내었다. 이 전극은 $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$, pH 3.1~11.0 범위에서 선형적으로 감응을 하였고, 이때 Nernstian 기울기는 55.0 mV/pH 이었다. 알칼리 금속 이온에 대한 선택 계수를 Table 1에 나타내었다. 이 선택 계수들은 다른 benzylamine계나 benzyldiamine계의 ionophore가 나타내는 선택 계수들과 비교하여 볼 때, 양이온의 경우에는 K^+ 에 대한 방해가 다른 알칼리 금속 이온보다 약간의 방해를 더 받는 것을 알 수 있다. 이것은 PVC막 층에 첨가된 친지방성 첨가제의 음이온(TpCIPB)이 K^+ 이온과 난용성의 착물을 형성하기 때문으로 생각된다(Rouhollahi 등, 1998).

Fig. 2에 나타낸 것과 같이 전극의 안정화 시간은 pH 7.47, Tris 완충 용액 내에서 측정하였다. 처음 용액에 전

Table 1. The potential response characteristics of pH-ISE based on TBA in the Tris buffered pH solution with interference ion species at $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$

Mole of interference ions	$\text{K}^{\text{pot}}_{\text{HM}}$		
	$\text{M} = \text{Li}^+$	$\text{M} = \text{Na}^+$	$\text{M} = \text{K}^+$
0.13M	-10.62	-10.01	-8.72
0.013M	-11.14	-10.49	-8.73

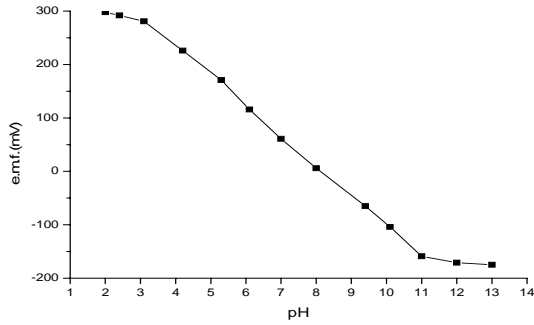


Fig. 1. pH response characteristics of pH-ISE based on TBA ionophore in Tris pH buffered solution.

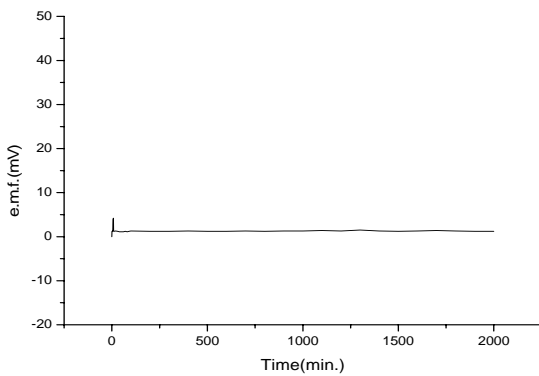


Fig. 2. The potential drift of pH-ISE based on TBA ionophore in pH 7.47 Tris buffer solution.

극이 접촉된 후 30분 동안에 전극은 빠르고 불규칙하게 감응 전위가 변화하였으며 그 후 30분 동안은 전극의 전위 변화는 2 mV 이하로 안정화되어졌다. 그래서 이 실험에서는 실험 용액 내에 전극을 2시간 이상 유지시켜 안정화시킨 후 측정하였다. 전극의 재현성은 pH 6.5와 pH 8.5의 Tris pH 완충 용액에서 측정하였다. 각 pH에서 10분씩 안정화한 후 측정하였으며 각 용액에서 10번씩 측정하여 표준 편차를 구하였다. 측정된 값들에서의 표준 편차는 pH 6.5의 Tris pH buffer solution에서 1.0 mV이고 pH 8.5 Tris pH solution에서 0.5 mV이었다. 전극의 감응 속도는 (t_{90}) 전극이 pH 7.47 Tris 완충 용액 내에 0.1 M 염산 용액을 적가한 후 전위가 안정되는 시간을 측정하여 구하였으며 약 8초 이하에서 모두 감응이 완료되어 안정된 전위가 나타났다. 또 매일 pH가 측정된 전극을 약 60°C 건조기에서 건조시켰다가 약 pH 4, pH 7, pH 10의 세 Tris 완충 용액에서 나타내는 전위를 간이로 측정하여 감응 기울기를 찾았을 때, 6개월 이상 감응 기울기의 변화가

나타나지 않았다.

방해 이온 측정에서도 예상되어진 결과이지만 인간의 혈액에 포함되어진 정도의 방해 이온에는 특별한 방해를 받지 않고 감응할 수 있을 것으로 보인다. 특히, 생리학적으로 밀접하게 관련되고 있는 pH 6.0에서 pH 8.5의 범위에서 이 전극은 Tris 완충 용액 하에서 측정된 기울기와 거의 정확히 일치하고 있다.

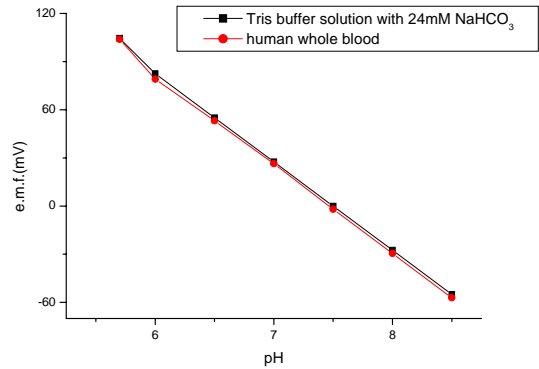


Fig. 3. pH response for pH-ISE based on TBA ionophore in variation solution at $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Fig. 3에서 보여지는바와 같이 전형적으로 인간 혈액에 포함되어진 것으로 알려진 24 mM bicarbonate ion이 첨가되어진 Tris 완충 용액과 인간의 혈액 등의 두 가지 용액에서 pH 감응에 대한 전위의 변화 기울기를 비교하였다. 기울기는 각각의 용액에서 55.0 mV/pH, 54.7 mV/pH를 나타내고 있다. 24 mM bicarbonate ion의 존재 하에서의 Tris 완충용액의 결과와 혈액에서 측정된 결과에서 알 수 있듯이, 이 정도의 작은 농도의 농도로는 이 PVC 막을 가로질러 나타날 수 있는 CO₂의 확산에 무관하게 일정한 값을 나타내는 것으로 보인다. 사람전혈에서 전위가 7일 이상 측정된 후에, 이 전극을 이용하여 다시 Tris 완충 용액 하에서 수소 이온 감응에 대한 기울기와 감응 범위들을 측정하였는데 그 결과는 변화가 없었다. 이러한 전극에 대한 감응시간을 알아보기 위하여 Tris pH 7.47 완충용액에 0.01 M HCl을 첨가하면 감응시간을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 감응시간은 pH 평형전위값의 90%에 도달했을 때의 전위값을 측정한다. pH 7.47의 용액이 pH 5.65로 전위값이 변할 때 값은 평형전위 값은 81.2 mV이지만, 이 전위값의 90%인 73.1 mV를 나타낼 때 걸리는 시간을 측정하면 약 8초로 매우 빠르게 감응을 하는 것을 알 수 있다.

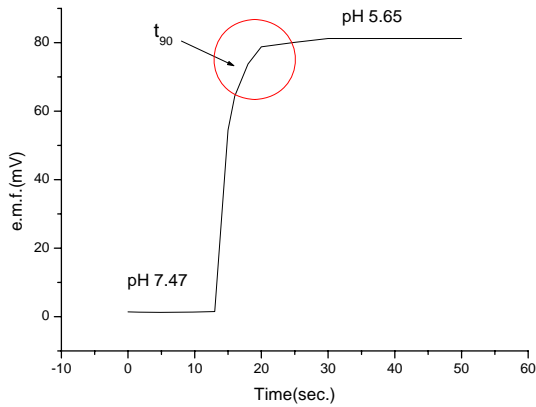


Fig. 4. Dynamic response time of pH-ISE to the variation pH.

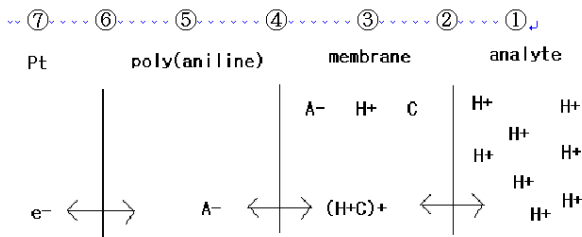


Fig. 5. Hydrogen ion response mechanism in poly(aniline) pH-ISE based on ionophore.

지금까지의 결과를 종합하여 볼 때, pH-ISE의 수소 이온에 대한 감응은 Fig. 5에 보여지는 것처럼, ①의 pH 시료 용액 중에 H^+ 이온이 membrane의 외부 계면 ②에서 ionophore의 nitrogen 전자쌍에서 착물을 형성한다. 다음에 membrane 계면 ②에서 수소 이온 착물이 membrane ③을 가로질러 membrane 내부 ④까지 이동한다. 이동된 착물은 ④의 계면에서 carrier C와 H^+ 이온 분리되고 ⑤에서 ④의 계면을 통하여 음이온 교환된다. ⑤에서 전자가 이동되고 ⑥에서도 역시 전자 이동되어 ⑦금속 내부로 전자 이동되어지는 감응 mechanism을 가지게 되는 것으로 사료된다.

이와 같은 결과들을 종합하여 볼 때, 전자의 이동이 아니라 수소이온이 운반체와 착물을 형성하여 PVC의 막의 내외부를 가로질러 이동되어지는 것으로 보인다.

Tribenzylamine ionophore로 이용한 수소이온 고체 이온 선택성 전극은 Tris pH 완충용액 $20 \pm 0.2^\circ C$ 에 대하여 pH 3.1 - pH 11.0 범위에서 우수한 감응성을 나타낼 뿐 아니라, 다른 알칼리 금속이온에 대해서도 방해도가 적게

나타내었으며, 이 전극을 인간의 혈액에 이용하여 분석을 하였을 때도 우수한 감응성 및 재현성을 나타내어 임상 및 의약분야에 그 응용성이 매우 크다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Alegret S, Florido A. Response characteristics of conductive polymer composite substrate all-solid-state poly(vinyl chloride) matrix membrane ion-selective electrodes in aerated and nitrogen-saturated solutions. *Analyst* 116:473-476, 1991.
2. Cattrall RW, Drew DM, Hamilton JC. Some alkylphosphoric acid esters for use in coated-wire calcium-selective electrodes. *Anal Chim. Acta* 76:269-277, 1975.
3. Cho DH, Chung KC, Jeong SS, Park MY. Potentiometric Behavior of N,N,N,N-tetrabenzylmethylenediamine-Based Hydrogen Ion-Selective Electrodes. *Talanta* 51:761-767, 2000.
4. Cho DH, Chung KC, Park MY. Hydrogen Ion-selective Membrane Electrodes Based on Alkyldibenzylamines as Neutral Carrier. *Talanta* 47:815-821, 1998.
5. Chojnacki J, Biernat JF. Application of azoles as neutral carriers in liquid membrane ion-selective pH electrodes. *J Electroanal Chem* 277:159-164, 1990.
6. Cosofret VV, Linder E, Buck RP, Kusy RP, Whitley JQ. Design of ionophore-free H^+ -selective solvent polymeric membranes for further biomedical applications. *J Electroanal Chem* 345:169-181, 1993.
7. Faria RC, Bulhoes LOS. Hydrogen ion selective electrode based on poly(1-aminoanthracene) film. *Anal Chim Acta* 377:21-27, 1998.
8. Han WS, Park MY, Chung KC, Cho DH, Hong TK. Enhanced Electrochemical Performance of Poly(aniline) Solid Contact pH Electrodes Based on Alkyldibenzylamine. *Anal Sci* 16:1145-1150, 2000.
9. James H, Carmack G, Freiser H. Coated wire ion-selective electrodes. *Anal Chem* 44:856-857, 1972.
10. Kim JS, Ohki A, Ueki R, Ishizuka T, Shimotashiro T, Maeda S. Cesium-ion selective electrodes based on calix[4]arene dibenzocrown ethers. *Talanta* 48:705-710, 1999.

11. Linder E, Cosofret VV, Kusy RP, Buck RP, Rosatzin T, Schaller U, Simon W, Jeney J, Tóth K, Pungor E. Responses of H⁺ selective solvent polymeric membrane electrodes fabricated from modified PVC membranes. *Talanta* 40:957-967, 1993.
12. Ma SC, Chaniotakis NA, Meyerhoff ME. Response properties of ion-selective polymeric membrane electrodes prepared with aminated and carboxylated poly(vinyl chloride). *Anal. Chem* 60:2293-2299, 1988.
13. Michalska A, Hulanichi A, Lewenatam A. All-Solid-State Potentiometric Sensors for Potassium and Sodium Based on Poly(pyrrole) Solid Contact. *Microchemical J* 57:59-64, 1997.
14. Rouhollahi A, Ganjali MR, Shamsipur M. Lead ion selective PVC membrane electrode based on 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Talanta* 46:1341-1346, 1998.
15. Sakong DS, Kim JM, Cha GS. Silicone Rubber Membrane-Based Chloride Ion-Selective Electrode. *J Kor Chem Soc* 41(12):653-660, 1997.
16. Schulthess P, Shijo Y, Pham HV, Pretsch E, Ammann D, Simon W. A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecylamine as neutral carrier. *Anal Chim Acta* 131:111-116, 1981.
17. Wu HL, Yu RQ. A PVC membrane pH-sensitive electrode based on methyldioctadecylamine as neutral carrier. *Talanta* 34:577-579, 1987.
18. Xie RY, Christian DD. Serum lithium analysis by coated wire lithium ion selective electrodes in a flow injection analysis dialysis system. *Anal Chem* 58:1806-1810, 1980.
19. Yuan R, Chai YQ, Shen GL, Yu RQ. Chemically modified electrode based on poly[tetra(4-aminophenyl) porphyrin] as a pH sensor. *Talanta* 40(8):1255-1259, 1993.
20. Zhao P, Cai WJ. pH polymeric membrane micro-electrodes based on neutral carriers and their application in aquatic environments. *Anal Chim. Acta* 395:285-291, 1999.