

## 크레아틴의 방해영향을 줄인 크레아티닌 바이오센서

구현우 · 권기학 · 임은혜 · 신재호\*

광운대학교 자연과학대학 화학과

(2012년 11월 23일 접수 : 2012년 11월 28일 채택)

## A Creatinine Biosensor with Reduced Interference from Creatine

Hyunwoo Gu, Kihak Gwon, Eunhye Lim, and Jae Ho Shin\*

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

(Received November 23, 2012 : Accepted November 28, 2012)

### 초 록

크레아티닌 센서의 생체시료 측정 시 가장 심각한 방해 작용을 발생하는 물질인 크레아틴을 효과적으로 제거하기 위하여 creatine kinase와 adenosine triphosphate를 사용한 두 번째 효소층을 도입하여 크레아틴에 대한 방해작용을 현저히 감소시켰다. 또한 평면형 소형 크레아티닌 센서를 개발하기 위해 탄소전극 표면에 Pt black(Pt-B)을 도입하여 표면적을 증가시킴으로써 전기화학적 감응 특성을 증가시킨 스크린 프린팅 방식의 Pt-B/C 전극을 제작하였다. 최적화된 소형 크레아티닌 센서를 흐름계 카트리지에 장착하여 미지시료를 측정된 결과 5% 이내의 오차 범위 내에서 우수한 측정 정확성과 재현성을 보임을 확인하였다.

**Abstract :** The planar-type amperometric creatinine biosensor employing an additional enzyme layer containing creatine kinase and adenosine triphosphate was developed to eliminate severe interference from creatine. In the additional enzyme layer, an interfering substance, creatine is converted to noninterfering product, phosphocreatine. Furthermore, the carbon electrode electrodeplated with Pt black(Pt-B) was employed to fabricate creatinine biosensors with improved sensor performance(e.g., sensitivity, reliability, and reproducibility). The creatinine levels in an unknown sample were determined within less than 5% errors using creatinine microsensors equipped in a flow-cell cartridge.

**Keywords :** Creatinine biosensor, Creatine interference, Creatine kinase

### 1. 서 론

혈액 내 크레아티닌(creatinine)은 중요한 임상학적 진단항목 중 하나로서 포유동물의 크레아틴 대사작용의 최종 생성물로서 체내에서 비가역적으로 생성되며, 그 존재량은 체내 총 근육량에 비례한다.<sup>1,2)</sup> 혈청 크레아티닌 농도는 주로 신장의 사구체 여과율(glomerular filtration rate; GFR)을 평가하기 위하여 측정된다. 정

상 성인의 GFR 수치는 남성  $70 \pm 14$  mL/min/m<sup>2</sup>, 여성  $60 \pm 10$  mL/min/m<sup>2</sup>이며, 만성 신부전증은 신기능의 저하가 3개월 이상 지속된 상태로써 사구체 여과율의 감소(정상치의 20-30% 이하)로 인해 혈중 크레아티닌 농도가 만성적으로 증가하고, 신장의 정상적 내분비 기능 및 대사기능의 손상에 따른 이상 증상이 나타나는 상태를 말한다. 또한 장기간에 걸쳐 지속적인 신원질량의 감소로 인하여 GFR이 비가역적으로 감소하고 다양한 원인으로 인하여 영구적으로 GFR이 30 mL/min/m<sup>2</sup> 이하로 저하된 상태를 말한다. 반복적인 감염이나

\*E-mail: jhshin@kw.ac.kr

신염의 악화, 요로계의 폐색 당뇨병이나 장기간의 고혈압으로 혈관이 손상되고 신장조직의 반흔을 초래하여 점진적인 신장기능이 상실되고 이에 따르는 요독증과 신성 골이영양증 등의 질환을 동반하게 된다. 또한 근육에 질병이 있거나 감압전 기능에 이상이 있을 경우에도 혈중 크레아티닌 농도는 정상에서 벗어나게 된다.<sup>3)</sup> 이러한 이유로 크레아티닌 측정은 신장, 감압전, 그리고 근육 등의 기능 정상유무를 판단하기 위한 중요한 지표가 된다.<sup>4)</sup>

전기화학적 바이오센서는 생물학적인 요소를 사용하여 분석대상물로부터의 분석적 정보를 전기적 신호로 알려주는 장치이다. 여기서 생물학적 요소는 센서들이 일반적으로 요구하는 선택성을 위한 분자 인식 능력을 제공할 뿐 만 아니라 분석하고자 하는 대상이 전기적으로 비활성인 경우 이와 반응을 통하여 전기화학적으로 측정이 가능한 화합물을 생성하는 역할을 수행한다.<sup>5)</sup> 선택적인 분자 특이 인식력을 가지고 있는 생물학적 요소는 효소, 항체, 세포기관, 미생물 균체 등으로 이를 이용하여 원하는 분석 대상에 적합한 다양한 종류의 바이오센서를 쉽게 제작할 수 있다. 또한 생물학적 요소의 다양한 고정방법이나 전자전달 중간체의 사용, 혹은 화학적 촉매의 사용을 통해 보다 우수한 감응 특성과 선택성을 지니면서 방해작용 없이 분석이 가능한 전기화학적 바이오센서를 제작할 수 있다.<sup>6)</sup> 전기화학적 바이오센서는 측정 방법에 따라 전도도법(conductometry) 센서, 전위차법(potentiometry) 센서, 전류법(amperometry) 센서 등으로 구분되며, 이러한 방법 중 효소반응에 의해 생성되는 전기화학적 활성물질을 일정 전위에서 산화 또는 환원시켜 정량하는 전류법 바이오센서는 다른 방법들에 비하여 높은 감응성, 우수한 선택성, 사용 편의성 및 측정 장치의 경제성 등 많은 장점을 가지고 있다.<sup>7,8)</sup>

산화효소를 이용한 전류법 바이오센서에 있어서 효소반응의 최종산물인 과산화수소(hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ )의 측정은 매우 중요한 요소이다. 이는 과산화수소가 많은 경우의 생화학적 물질 분석 시 이에 사용되는 산화효소 반응의 최종 생성물이기 때문이며, 이러한 이유로 과산화수소를 생성하는 산화효소를 사

용한 전류법 센서는 가장 널리 사용되고 있다.<sup>9-11)</sup> 전류법을 이용하여 과산화수소를 측정하기 위해서는 0.6-0.7 V(vs. Ag/AgCl)의 높은 산화전위를 인가해야 하는데 이 전위에서는 혈액 내 존재하는 아스코르브산(ascorbic acid), 요산(uric acid) 등의 생체물질과 약을 복용했을 때에 혈액에 존재하게 되는 아세트아미노펜(acetaminophen) 등의 산화성 물질이 함께 산화되어 심각한 측정 오차를 유발한다는 단점을 가지고 있다.<sup>11,12)</sup> 이러한 단점을 해결하기 위한 방법으로 1) 음전하의 반발력에 의한 선택투과성을 가지는 막을 이용하는 방법<sup>13,14)</sup>, 2) 입자 크기에 의한 선택투과성을 가지는 막을 이용하는 방법<sup>15,16)</sup>, 3) 전자 전달 매개 물질을 사용하여 보다 낮은 산화전위를 사용하는 방법<sup>17-20)</sup>, 4) 과산화효소(oxidase)를 사용하여 환원전위를 사용하는 방법<sup>21,22)</sup>, 5) 전처리 산화제 막을 도입하는 방법<sup>23,24)</sup> 등이 연구되었다.

대부분의 전류법을 이용한 크레아티닌 바이오센서는 1983년에 Tsuchida 등이 보고한 세 가지 효소에 의한 순차적인 촉매반응에 의해 생성되는 과산화수소를 측정하는 방법<sup>25)</sup>을 이용하고 있다(Fig. 1). 임상시료 중의 크레아티닌이 creatinine amidohydrolase (creatininase; CA)에 의해 크레아틴(creatin)으로 산화되고, 크레아틴은 다시 creatine amidohydrolase (creatinase, CI)에 의하여 사코신(sarcosine)과 요소(urea)로 분해된다. 마지막으로 사코신은 sarcosine oxidase(SO)에 의해 분해되어 포름알데히드(formaldehyde)와 글라이신(glycine), 그리고 과산화수소가 생성된다. 이때 생성된 과산화수소를 전류법으로 측정함으로써 크레아티닌의 농도를 정량할 수 있게 된다. 그러나 이와 같은 방식의 크레아티닌 바이오센서는 필연적으로 혈액 내 이미 68-118 mM 정도 존재하는 크레아틴에 의해 심각한 방해작용을 받게 된다. 크레아티닌 센서의 감응원리에서도 알 수 있듯이 크레아틴은 크레아티닌 분해과정 중 생성되며, 시료 중에 존재하는 크레아틴과 분리 구분하여 감지하는 것이 불가능하게 된다. 결과적으로 일회용 바이오센서 칩 및 스트립을 사용하여 혈중 크레아티닌 수치를 수시로 측정하고자 할 때 크레아틴의 방해작용에 의한

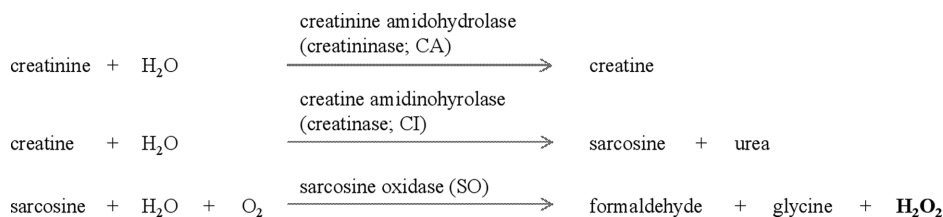
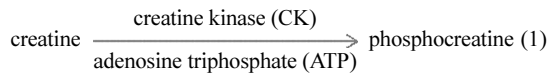


Fig. 1. Schematic of a series of enzyme reactions employed for a common amperometric creatinine biosensor.

영향은 매우 심각한 측정상의 오차를 유발할 수 있다.

본 연구에서는 임상시료 내 크레아티닌 측정 시 가장 심각한 방해작용을 하는 크레아틴의 영향을 줄이기 위해 추가적인 효소층을 도입하였다. 즉, 시료 중 크레아틴은 식 (1)과 같이 크레아틴 인산화효소(creatine kinase; CK)에 의해 센서 신호에 영향을 주지 않는 크레아틴인산(phosphocreatine)으로 변형된다. 따라서 센서 전극막의 상층에 CK와 adenosine triphosphate(ATP) 층을 도입하여 혈액 내 크레아틴이 효소층에 도달하기 전에 제거하는 원리를 도입하였다 (Fig. 2).



## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

크레아티닌 가수분해효소(creatinine amidohydrolase; creatininase, EC 3.5.2.10., 600 units/mg), 크레아틴 가수분해효소(creatine amidinohydrolase; creatinase, EC 3.5.3.3., 14.2 units/mg), 사코신 산화효소(sarcosine oxidase, EC 1.5.3.1., 31.6 units/mg), 크레아틴 인산화효소(creatine kinase), 크레아티닌(creatinine), 크레아틴(creatine), 아스코르브산(ascorbic acid), 요산(uric acid), 아세트아미노펜(acetaminophen), 아데노신 3인산(adenosine triphosphate; ATP)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 탄소 전극 표면에 Pt-B를 도입하기 위해 사용한 염화 백금산(chloroplatinic acid;  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ )과 아세트산 납(lead acetate;  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ )은 Aldrich사(Milwaukee, WI, USA)의 제품을, 효소를 안정적으로 고정시키기 위한 고정막으로 사용된 친수성 폴리우레탄은 Thermedics 사(Woburn, MA, USA)의 제품(AR-25-80A)을 사용하였다. Poly(vinyl alcohol)(PVA, MW. 8000-9000)과 anion exchanger인 polyethyleneimine(50 wt% solution in water), cation exchanger인 Nafion (5 wt% solution in lower aliphatic alcohols/water mixture, contains 15-20% water)은 Aldrich사의 제품을 사용하였다. 이외에 실험에 사용된 시약은 분석등급에 준하는 것을 사용하였으며, 모든 용액의 제조에는 탈이온수(18 MW·cm)를 사용하였다.

### 2.2. 장치

탄소와 은 전극 제작을 위한 스크린 프린터(screen printer)는 Marubeni사(Tokyo, Japan)의 제품(LS-150)를 사용하였다. 전극 위에 효소층, 효소 보호층 등 용

액 상의 도입에는 EFD사(East Providence, RI, USA)의 air fluid dispenser(Model 2000XL)를 사용하였다. 전압전류법(voltammetry), 전류법(amperometry)을 이용한 센서의 전기화학적 특성은 CH Instruments사(Austin, TX, USA)의 Potentiostat/Galvanostat(Model 600B)를 사용하여 측정하였다.

### 2.3. 평면형 소형 전극의 개발

크레아티닌 바이오센서에 사용된 평면형 소형 전극의 구성 및 구조는 Fig. 3에 나타내었다. 제작과정을 간단히 설명하면, 폴리에스터(polyester; PE) 기판 위에 스크린 프린팅(screen printing) 법을 이용하여 제작하였다. 지지체로 사용된 폴리에스테르 필름 위에 탄소 반죽(carbon paste)을 사용하여 작동전극(working electrode, 지름 4mm)과 보조전극(counter electrode)을, 은 반죽(silver paste)을 사용하여 기준전극(reference electrode)을 성형하고, 그 위에 절연층을 도입하여 제작하였다. 기준전극 부분인 Ag 전극은 0.1 M  $\text{FeCl}_3$  용액으로 10분간 처리하여 Ag/AgCl 전극으로 제조하였다. 전류법을 이용한 바이오센서는 센서의 감응도는 전극면적에 직접적인 영향을 받는다. 또한 측정하고자 하는 크레아티닌은 혈중 농도범위가 mM 정도로 낮은 농도이므로 센서의 감도를 향상시켜주기 위해 탄소전극 표면에 나노 크기의 미세 3차원 구조를 형성하고자 Pt-B를 도입하고자 하였다. 이를 위해 염화백금산 0.3 g과 아세트산 납 0.029 g을 물 9.7 g에 녹인 용액에 탄소 전극을 담그고 Ag/AgCl 기준전극 대비 인가 전위  $-0.1 \sim 0.5$  V에서 주사 속도(scan rate) 50 mV/s로 처리하였다.

### 2.4. 크레아티닌 바이오센서 및 센서 카트리지의 제작

크레아티닌 바이오센서의 제작을 위한 다층구조 센서막(multilayered sensing membrane)의 제작과정은 다음과 같다(Fig. 2). 백금이 도금된 탄소전극 위에 비이온성 계면활성제인 Triton-X100 0.5% 용액을 전극 위에 떨어뜨려 10분 간 전처리 하였다. 효소층의 도입을 위해 0.05 M NaCl이 첨가된 0.05 M phosphate (pH 7.6) 용액 300  $\mu\text{L}$ 에 PVA 12 mg을 첨가하여 수화겔 용액을 제조한 후 이 용액에 creatininase(CA), creatinase(CI), sarcosine oxidase(SO)를 각각 1,500 unit을 넣어 효소 혼합 용액을 제조하였다. 제조된 효소 수화겔 2  $\mu\text{L}$ 를 분취하여 전극 위에 떨어뜨린 후 40°C 오븐에서 20분 간 건조시켜 첫 번째 효소층(1st enzyme layer)을 고정하였다. 효소층 보호를 위해 도입되는 보호막(protecting layer)은 친수성 폴리우레탄(AR-25-80A) 20 mg을 cyclohexanone 500  $\mu\text{L}$ 에 녹인 용액을 6  $\mu\text{L}$  분취하여 전극 위에 떨어뜨린 후 40°C 오

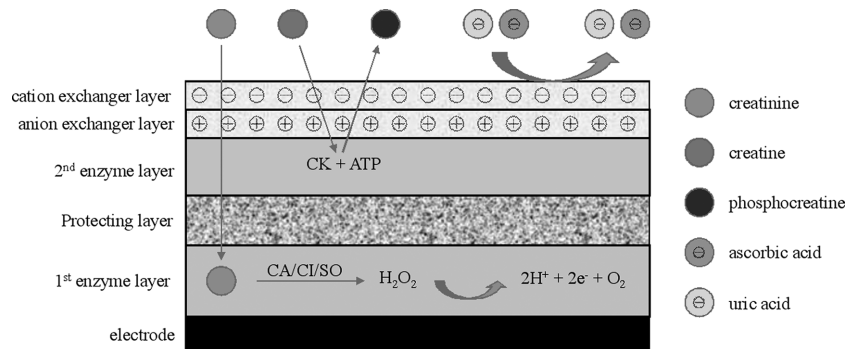


Fig. 2. The concept of an amperometric creatinine biosensor with reduced interference from creatine: CK, creatine kinase; ATP, adenosine triphosphate; CA, creatinase; CI, creatinase; SO, sarcosine oxidase.

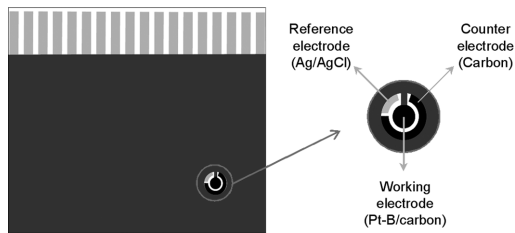


Fig. 3. A schematic drawing of a planar-type amperometric microsensor used in this study.

본에서 20분 간 건조시켜 제작하였다. 종래 크레아티닌 바이오센서에서 가장 심각한 방해 작용을 발생하는 물질인 크레아틴을 효과적으로 제거하기 위하여 creatine kinase(CK)와 아데노신 3인산(adenosine triphosphate; ATP) 각각 10 units과 20 mM 혼합한 수화겔 용액을 일정량(3  $\mu$ L)을 도포 후 건조하여 두 번째 효소층(2nd enzyme layer)을 형성하였다. 그 위에

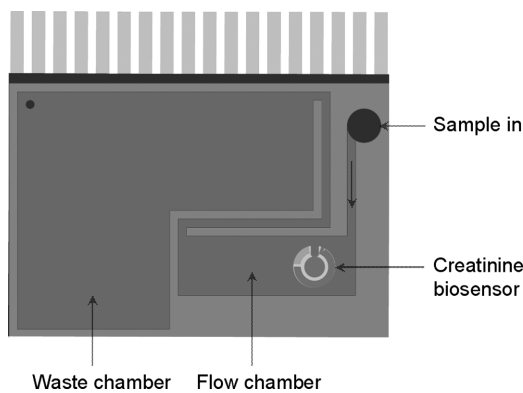


Fig. 4. A schematic drawing of a flow-cell cartridge equipped with a planar-type creatinine biosensor.

다른 방해종들의 효과를 줄이기 위해 polyethyleneimine (50 wt%) 용액과 Nafion(5 wt%) 용액을 각각 3  $\mu$ L씩 도포하여 anion과 cation exchanger 막을 도입하였다. 이때 각 막은 도포 후 40°C 오븐에서 약 10분 동안 건조시켜 형성시켰다.

유료가 형성된 센서 카트리지(cartridge)의 제작을 위해(Fig. 4 참고), 다층구조 센서막이 도입된 평면형 소형 크레아티닌 바이오센서 위에 아크릴로 제작된 유로를 도입하였다. 평면형 전극체와 아크릴 유로가 완전히 접착되도록 아크릴 유로를 에폭시로 접착한 후, 12시간 이상 압착하여 센서 카트리지를 제작하였다.

### 3. 결과 및 고찰

Pt black(Pt-B)의 도입을 통한 센서의 감응성 증가 효과를 평가하기 위해 Pt-B를 도입한 탄소전극과 도입하지 않은 탄소전극의 효소반응의 최종 산물인 과산화수소에 대한 감응성을 비교하였다. Fig. 5는 0.05

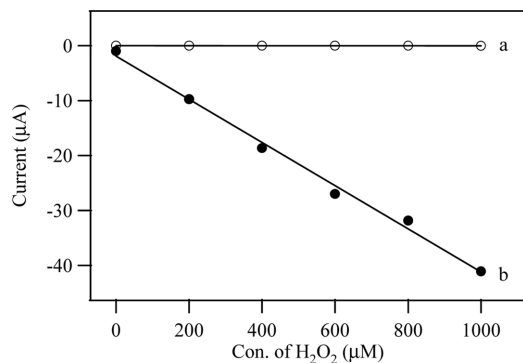


Fig. 5. Calibration curves of the planar-type electrodes towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a) bare carbon electrode and b) Pt black-modified carbon electrode.

M phosphate(pH 7.5) 전해질에서 0-1,000  $\mu\text{M}$  농도 범위에서 과산화수소에 대한 감응성을 측정된 결과로, Pt-B를 도입한 탄소전극과 도입하지 않은 탄소전극의 감응기울기가 각각 39.29과 0.01  $\text{nA}/\mu\text{M}$ 로 Pt-B를 도입한 전극이 약 4000배의 과산화수소 감응성이 증가함을 관찰 할 수 있었다. 이는 Pt 나노구조체가 탄소 전극 표면에 형성되어 유효 전극표면이 증가한 효과와 탄소 소재보다는 Pt 소재가 과산화수소에 대한 전자전달이 우수하기 때문에 얻어진 결과라고 판단되어진다.

효소층 보호를 위해 도입되는 보호막(protecting layer)으로 사용되는 고분자 물질은 셀룰로스 아세테이트(cellulose acetate; CA), 폴리염화비닐(poly(vinyl chloride); PVC), 그리고 폴리카보네이트(polycarbonate; PC) 등이 있다. 하지만 상기에 제시한 물질은 전극 표면에 대한 접착력이 약하거나, 막 자체의 다공 구조가 일정하지 않으며, 혹은 기질(여기서는 크레아티닌)에 투과율이 낮다는 단점을 가지고 있다. 이에 비해 hard-와 soft-segment로 구성되는 폴리우레탄(polyurethane; PU)은 이들의 종류 및 비율을 조절함으로써 친수성의 정도, 다공의 크기 및 기질에 대한 투과율을 조절할 수 있다는 장점을 지닌다. 또한 뛰어난 생체 적합성으로 말미암아 생의학 분야에서 많은 관심을 받아왔다. 특히 친수성 폴리우레탄(hydrophilic polyurethane; HPU)은 사용된 soft-segment의 비율과 성질에 따라 물을 흡수하는 능력과 막 자체의 공극률(porosity)이 다르고, 다양한 고체상 전극과의 우수한 접착력을 제공하며, 생체 적합성이 우수하고, 센서에 도입되었을 경우 안정화 시간이 비교적 짧은 장점이 있다. 본 연구에서는 이러한 친수성 폴리우레탄의 장점을 이용하여 방향족 계열의 친수성 폴리우레탄을 외부 보호막으로 도입하여 크레아티닌 센서에 대한 연구를 수행하였다.

성인의 혈중 정상 크레아티닌 농도는 남성의 경우 68-118  $\mu\text{M}$  이며, 여성의 경우 68-98  $\mu\text{M}$ 이다. 그러나 신부전증 환자의 경우 혈중 크레아티닌 농도가 700  $\mu\text{M}$  이상까지 올라가는 것으로 알려져 있다. 반면에 영유아의 경우 작은 근육량으로 인해 27-53  $\mu\text{M}$  정도의 낮은 농도에서 정상 크레아티닌 농도범위를 형성한다. 따라서 다양한 환자에 대해 임상적용에 유용한 크레아티닌 센서의 개발을 위해서는 넓은 감응범위(수십  $\mu\text{M}$ 에서 수백  $\mu\text{M}$ 까지)를 가지는 센서의 개발이 필수적이라 할 수 있다. 먼저 이와 같이 넓은 범위에서 센서 감응 특성을 조사하기 위해 0-1,000  $\mu\text{M}$ 의 크레아티닌 농도범위에서 감응성을 확인하였으며, 정상 구간에서도 좀 더 정확한 측정이 가능한지 확인하기 위하여 0-100  $\mu\text{M}$  구간에 해당하는 크레아티닌 감응을

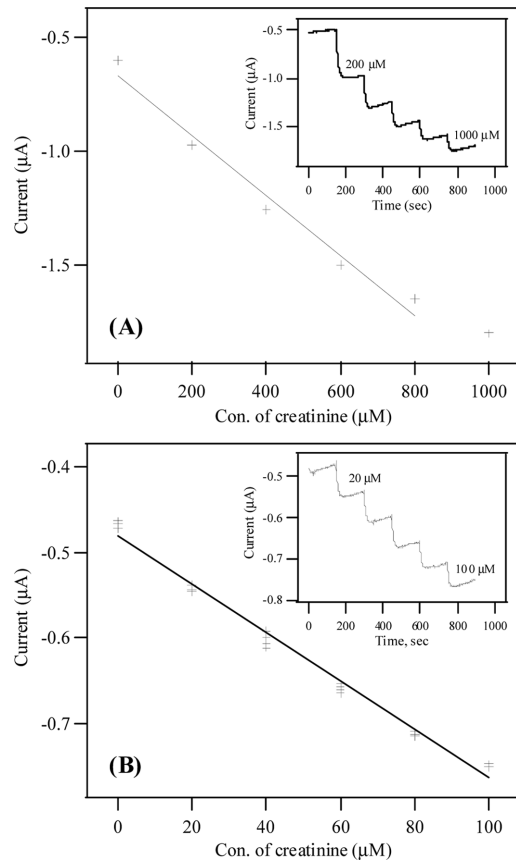
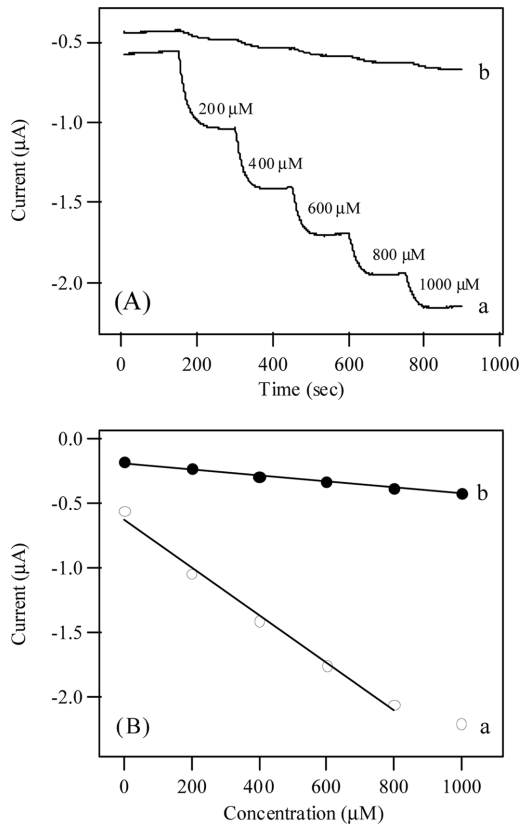


Fig. 6. Calibration curves of the creatinine biosensor towards creatinine in the range of 0 to 1000 mM (A) and 0 to 100 mM (B). The inset represents the dynamic response curve for each range.

확인하였다(Fig. 6). Fig 6(A)에서 볼 수 있는 바와 같이, 개발된 크레아티닌 바이오센서는 임상학적 농도인 800  $\mu\text{M}$ 의 고농도까지 우수한 직선성( $R^2 = 0.9885$ )과 감응성(기울기 =  $-1.32 \text{ nA}/\mu\text{M}$ )을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 크레아티닌의 정상 농도범위인 100  $\mu\text{M}$  이하의 농도범위에서도 우수한 감응특성(기울기 =  $-2.28 \text{ nA}/\mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0.9962$ )을 보였다.

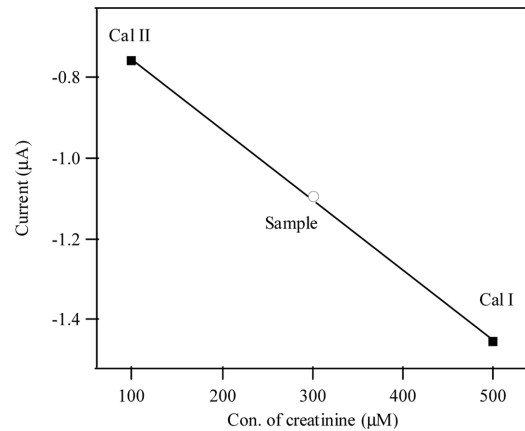
기존 크레아티닌 바이오센서에서 가장 심각한 방해 물질로 작용하는 크레아틴을 효과적으로 제거하기 위하여 creatine kinase(CK)와 adenosine triphosphate(ATP)를 사용한 효소층을 도입하였다. 제작된 크레아티닌 센서의 크레아티닌과 크레아틴의 감응성을 각각 0-1,000  $\mu\text{M}$  농도 범위에서 비교하였다(Fig. 7). 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 CK/ATP 효소층을 도입한 센서의 경우 크레아틴에 대한 감응성이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이때 크레아티닌과 크레아



**Fig. 7. (A) Dynamic response and (B) calibration curves of creatinine biosensor towards (a) creatinine and (b) creatine.**

틴에 대한 감응기울기는 각각  $-1.85$ 과  $-0.24$   $\text{nA}/\mu\text{M}$ 로 크레아티닌에 대한 감응성이 크레아틴에 대한 감응성 보다 7.7배 정도 더 우수함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로 임상시료 내 크레아티닌과 비슷한 농도로 존재하는 크레아틴은 더 이상 심각한 방해작용을 하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 아스코르브산과 요산에 대한 방해작용은 음이온 폴리머 Nafion을 도입함으로써 개선하고자 하였다. 이를 확인하기 위해  $300$   $\mu\text{M}$  크레아티닌의 농도를 측정할 때 음이온성 방해종인 아스코르브산과 요산이 각각  $50$   $\mu\text{M}$ 과  $200$   $\mu\text{M}$  존재(혈액 내 정상농도범위) 할 때와 존재하지 않을 때의 센서신호 크기를 비교하였다. 방해종이 존재하였을 때의 센서신호 크기가 약 6% 정도 증가하는 것을 확인하였으나, 이는 허용 오차범위 내에서의 증가라고 판단하였다.

크레아티닌 바이오센서의 실제 임상 적용성을 향상시키기 위해 흐름계를 이용한 시료 주입법을 사용하고자 하였다. 이를 위해 개발된 평면형 소형 크레아티



**Fig. 8. Determination of creatinine concentration in a sample solution with a creatinine biosensor equipped in a flow-cell cartridge.**

닌 센서를 흐름계 카트리지에 장착하고 시료주입구에 주사기를 연결하여 미지 시료를 측정하였다. 카트리지의 주입구를 통해 바탕용액으로 사용한  $50$   $\text{mM}$  NaCl이 첨가된  $0.05$   $\text{M}$  phosphate(pH 7.6) 완충용액  $500$   $\mu\text{L}$ 를 주사기로 주입하여 센서가 충분히 안정화 되도록 30분간 일정 전위를 유지하였다. 센서가 안정화 된 후 검정용액 1(Cal I, 크레아티닌  $500$   $\mu\text{M}$ 이 포함된 바탕용액)  $700$   $\mu\text{L}$ 를 주사기로 주입하였고, 2분 간 신호를 얻었다. 2분 후 검정용액 2(Cal II, 크레아티닌  $100$   $\mu\text{M}$ 이 포함된 바탕용액)  $700$   $\mu\text{L}$ 를 주사기로 주입하고 2분 간 기다려 신호를 얻었다. 최종적으로 크레아티닌의 농도를 알고 있는 시료용액(Sample, 크레아티닌  $300$   $\mu\text{M}$ 과 크레아틴  $100$   $\mu\text{M}$ 이 포함된 바탕용액)  $700$   $\mu\text{L}$ 를 주사기로 주입한 후 2분 간 신호를 얻었고 이를 처리하여 측정값을 계산하였다(Fig. 8). 센서는  $-1.70$   $\text{nA}/\mu\text{M}$ 의 감응기울기를 나타냈었고, 이를 통한 계산 결과, 미지 시료의 크레아티닌 농도는  $292.8$   $\mu\text{M}$ 로 결정되었다. 이는 참값인  $300$   $\mu\text{M}$ 과 비교하여 3% 이내의 오차 범위 내에서 측정이 가능함을 나타내며, 십 여 번의  $100$ - $500$   $\mu\text{M}$  크레아티닌 농도범위 내에서 반복실험에서도 5% 이내 오차의 우수한 정확성을 나타내었다.

#### 4. 결 론

크레아티닌 센서의 생체시료 측정 시 가장 심각한 방해 작용을 발생하는 물질인 크레아틴을 효과적으로 제거하기 위하여 creatine kinase(CK)와 adenosine triphosphate(ATP)를 사용한 두 번째 효소층을 도입하여 크레아틴에 대한 방해작용을 현저히 감소시켰다.

또한 평면형 소형 크레아티닌 센서를 개발하기 위해 탄소전극 표면에 Pt black(Pt-B)을 도입하여 표면적을 증가시킴으로써 전기화학적 감응 특성을 증가시킨 스크린 프린팅 방식의 Pt-B/C 전극을 제작하였다. 최적화된 소형 크레아티닌 센서를 흐름계 카트리지에 장착하여 미지시료를 측정된 결과 5% 이내의 오차 범위 내에서 우수한 정확성과 재현성을 확인하였다.

### 감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2011년도 산학연공동기술개발사업(No. 00045474)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

### 참고문헌

1. M. B. Madaras and R. P. Buck, 'Miniaturized Biosensors Employing Electropolymerized Permselective Films and Their Use for Creatinine Assays in Human Serum' *Anal. Chem.*, **68**, 3832 (1996).
2. G. F. Khan and W. Wernet, 'A highly sensitive amperometric creatinine sensor' *Anal. Chim. Acta*, **351**, 151 (1997).
3. E. J. Kim, T. Haruyama, Y. Yanagida, E. Kobatake, and M. Aizawa, 'Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system' *Anal. Chim. Acta*, **394**, 225 (1999).
4. K. Spencer, 'Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine' *Ann. Clin. Biochem.*, **23**, 1-25 (1986).
5. G. G. Wallace, 'Conducting electroactive polymer-based biosensors' *Trends Anal. Chem.*, **18**, 245 (1999).
6. S. Milardovic, I. Kruhac, D. Ivekovic, V. Rumenjak, M. Tkalec, and B. S. Grabaric, 'Glucose determination in blood samples using flow injection analysis and an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized on hexacyanoferrate modified nickel electrode' *Anal. Chim. Acta*, **350**, 91 (1997).
7. Q. Chen, 'Novel designs and fabrication of amperometric biosensors' A Bell & Howell, Michigan, 1998, p. 19.
8. I. C. Popescu, S. Cosnier, and P. Labbe, 'Peroxidase-glucose oxidase-poly(amphiphilic pyrrole) bioelectrode for selectively mediated amperometric detection of glucose' *Electroanalysis*, **9**, 998 (1997).
9. I. C. Popescu, G. Zetterberg, and L. Gorton, 'Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP-modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 443 (1995).
10. S. Yabuki, F. Mizutani, and Y. Hirata, 'Preparation of a microperoxidase and ferrocene-immobilized polyion complex membrane for the detection of hydrogen peroxide' *J. Electroanal. Chem.*, **468**, 117 (1999).
11. Y. Zhang, Y. Hu, and G. S. Wilson, 'Elimination of the Acetaminophen Interference in an Implantable Glucose Sensor' *Anal. Chem.*, **66**, 1183 (1994).
12. I. M. Christie, P. H. Treloar, and P. Vadgama, 'Plasticized poly(vinyl chloride) as a permselective barrier membrane for high-selectivity amperometric sensors and biosensors' *Anal. Chim. Acta*, **269**, 65 (1992).
13. M. N. Szentirmay and C. R. Martin, 'Ion-exchange selectivity of Nafion films on electrode surfaces' *Anal. Chem.*, **56**, 1898 (1984).
14. J. Wang, N. Naser, and M. Ozsoz, 'Plant tissue-based amperometric electrode for eliminating ascorbic acid interferences' *Anal. Chim. Acta*, **234**, 315 (1990).
15. S. V. Sasso, R. J. Pierce, R. Walla, and A. M. Yacynych, 'Electropolymerized 1,2-diaminobenzene as a means to prevent interferences and fouling and to stabilize immobilized enzyme in electrochemical biosensors' *Anal. Chem.*, **62**, 1111 (1990).
16. S. K. Jung and G. S. Wilson, 'Polymeric Mercaptosilane-Modified Platinum Electrodes for Elimination of Interferants in Glucose Biosensors' *Anal. Chem.*, **68**, 591 (1996).
17. Y. Degani and A. Heller, 'Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. II: Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino-acid oxidase' *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2615 (1988).
18. E. Kiaudet, F. Battaglini, and E. J. Calvo, 'Electrochemical study of sulphonated ferrocenes as redox mediators in enzyme electrodes' *J. Electroanal. Chem.*, **293**, 55 (1990).
19. Y. Kajiya, H. Sugai, C. Iwakura, and H. Yoneyama, 'Glucose sensitivity of polypyrrole films containing immobilized glucose oxidase and hydroquinonesulfonate ions' *Anal. Chem.*, **63**, 49 (1991).
20. A. Heller, 'Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes' *J. Physiol. Chem.*, **96**, 3579 (1992).
21. J. E. Frew, M. A. Harmer, H. A. O. Hill, and S. I. Libor, 'A method for estimation of hydrogen peroxide based on mediated electron transfer reactions of peroxidases at electrodes' *J. Electroanal. Chem.*, **201**, 1 (1986).
22. C. Petit, K. Murakami, A. Erdem, E. Kilinc, G. O. Borondo, J.-F. Liegeois, and J.-M. Kauffmann, 'Horseradish Peroxidase Immobilized Electrode for Phenothiazine Analysis' *Electroanalysis*, **10**, 1241 (1998).
23. G. Cui, S. J. Kim, S. H. Choi, H. Nam, and G. S. Cha, 'A Disposable Amperometric Sensor Screen Printed on a Nitrocellulose Strip: A Glucose Biosensor Employing Lead Oxide as an Interference-Removing Agent' *Anal. Chem.*, **72**, 1925 (2000).
24. J. H. Shin, Y. S. Choi, S. H. Choi, J. Ha, I. J. Yoon, H. Nam, and G. S. Cha, 'A Planar Amperometric Creatinine Biosensor Employing an Insoluble Oxidizing Agent for Removing Redox-Active Interferences' *Anal. Chem.*, **73**, 5965 (2001).
25. T. Tsuchida and K. Yoda, 'Multi-Enzyme Membrane Electrodes for Determination of Creatinine and Creatine in Serum' *Clin. Chem.*, **29**, 51 (1983).