

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
G01N 15/06

(45) 공고일자 2005년04월08일
(11) 등록번호 10-0481663
(24) 등록일자 2005년03월29일

(21) 출원번호 10-2002-0057740
(22) 출원일자 2002년09월24일

(65) 공개번호 10-2004-0026323
(43) 공개일자 2004년03월31일

(73) 특허권자

김희찬
서울 종로구 연건동 28번지 서울대학교부속병원 의공학과

박세진
서울특별시 용산구 도원동 23번지 삼성래미안아파트 114동 1504호

정택동
서울특별시 도봉구 쌍문4동 59-5 한양6차아파트 604동 809호

(72) 발명자

김희찬
서울 종로구 연건동 28번지 서울대학교부속병원 의공학과

박세진
서울특별시 용산구 도원동 23번지 삼성래미안아파트 114동 1504호

정택동
서울특별시 도봉구 쌍문4동 59-5 한양6차아파트 604동 809호

(74) 대리인

유미특허법인

심사관 : 정호근

(54) 중기공성 백금을 포함하는 바이오센서 및 이를 이용한글루코스 농도 측정방법

요약

본 발명은 중기공성 백금을 포함하는 바이오 센서 및 이를 이용한 글루코스 농도 측정방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 금속 전극 및 상기 금속 전극 표면을 둘러싼 중기공성(mesoporous) 백금을 포함하는 바이오 센서, 및 상기 바이오 센서에 전압을 인가하고, 전류세기를 측정, 분석하는 단계를 포함하는 글루코스 농도 측정 방법에 관한 것으로, 간섭물질에 의한 방해배제를 배제시켜 글루코스 농도만을 선택적인 측정할 수 있다.

대표도

도 1

색인어

중기공성, 백금, 글루코스, 비효소성 측정

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 글루코스, 아스코르빈산 및 아세트아미노페놀에 대한 중기공성 백금 반응을 전류세기로 나타낸 것이고,

도 2는 글루코스 농도별 중기공성 백금의 감응성을 나타낸 정량곡선이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[발명이 속하는 기술분야]

본 발명은 중기공성 백금을 포함하는 바이오센서 및 이를 이용한 글루코스 농도 측정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 중기공성 백금 층이 형성된 전극을 포함하는 바이오센서를 사용하여 글루코스 산화반응을 선별적으로 감응하여 글루코스 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

[종래기술]

바이오 센서는 생체 물질이 전자 측정기와 유기적으로 결합되어 임의의 시료 내의 화학적 정보를 쉽게 처리 가능한 전기적인 신호로 바꾸어주는 센서를 말한다. 상기 바이오 센서는 복잡한 화학적, 생물학적 처리를 할 필요가 없이 실시간으로 원하는 화학종의 정량적 정보를 매우 선택적으로 얻을 수 있다는 장점 때문에 널리 개발되고 있으며, 의학분야에서 널리 사용되고 있다. 특히 당뇨병과 같이 혈액 글루코스를 자주 모니터해야하는 질병에서 글루코스의 측정을 위한 바이오 센서에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

글루코스 측정을 위한 바이오 센서는 생체 물질인 글루코스와 반응하는 효소를 제한된 부위, 일반적으로 전극에 고정화(immobilization)시킨 감응막(효소층)에 의하여 분석 대상 물질인 글루코스의 농도를 측정한다.

이와 같이 효소를 이용하는 효소성 글루코스 측정용 바이오 센서는 지금까지 광범위하게 연구되어서 다양한 형태로 개발되어 왔다. 그러나 효소는 온도 및 pH의 영향을 많이 받아 주위 조건에 따라 활성에 영향을 많이 받으므로 불안정한 물질이다.

따라서, 효소를 사용하지 않는 비효소성 글루코스 측정용 바이오 센서를 개발하기 위한 연구가 진행되고 있다(Vassilyev, Y. B., Khazova, O. A., Nikolaeva, N. N. J. *Electroanal. Chem.* 1985, 196, 105; Beden, B., Largeaud, F., Kokoh, K. B., Lamy, C. *Anal. Chem.* 1996, 41, 701; Bae, I. T., Yeager, E., Xing, X., Liu, C. C. J. *Electroanal. Chem.* 1991, 309, 131; Sakamoto, M., Takamura, K. *Bioelectrochem. Bioener.* 1982, 9, 571 ; Kokkinidis, G., Xonoglou, N. *Bioelectrochem. Bioener.* 1985, 14, 375; Wittstock, G., Strubing, A., Szargan, R., Werner, G. J. *Electroanal. Chem.* 1998, 444, 61-73; Zhang, X., Chan, K.-Y., You, J.-K., Lin, Z.-G., Tseung, A. C. C. J. *Electroanal. Chem.* 1997, 430, 147-153; Sun, Y., Buck, H., Mallouk, T. E. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1599-1604; Shoji, E., Freund, M. S. 2001, 123, 3383-3384). 그러나 연구된 비효소성 글루코스 센서는 대부분 생체 내에서 글루코스 측정시 주된 방해 물질인 아스코르브산(AA), 요소산, 4-아세트아미노페놀(AP) 등의 방해를 받는다. 비효소성 글루코스 측정용 바이오 센서에 대한 연구의 예로는 백금 표면에서 글루코스 직접 산화를 이용한 센서(*Anal. Chem.* 2001, 73, 1599-1604)가 있다. 상기 백금 전극에서 글루코스의 직접 산화를 시도한 방법은 방해 물질의 산화 속도에 비해 훨씬 느리기 때문에 백금을 전극으로 사용하는 비효소성 전류법 센서를 구현하기는 매우 어려우며, 유독한 중간체의 생성, 낮은 민감도 및 선택도 등에 문제가 있다.

이러한 백금 전극의 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 백금-납 합금 전극(Pt₂Pb electrodes)이 있다. 백금-납 합금 전극에서의 글루코스 산화는 백금 전극에서보다 낮은 음전위에서 이루어지며, 백금-납 합금 전극은 L-아스코르빈산, 요소산 및 4-아세트아미노페놀 등의 간섭물질에 둔감하다. 또한 백금-납 합금 전극에서 납은 거의 용해되지 않아 안정하고, 순수 납에 비하여 더 큰 반응을 형성시킨다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고, 염소이온에 의한 표면중독은 여전히 심각한 수준이며, 전류 신호가 0.01 N 염화나트륨에서 빠르게 감소되어 결국에는 거의 소실되는 문제점이 있다.

그 외, 다른 물질을 이용한 백금 표면의 변형이 시도되어, 탈륨(Tl), 납, 비스무트(Bi) 또는 산화텅스텐(WO₃)으로 변형된 백금 표면을 이용한 방법이 제안되고 있으나, 금속 이온의 용해와 중금속의 독성으로 인하여 실제 사용은 제한되고 있다.

한편, 중기공성(Mesoporous) 물질은 기공을 갖는 무기물질로, 2 내지 50 nm의 기공크기를 갖는 물질을 일컫는다. 중기공성 물질은 여러개의 계면활성제 분자들이 집합된 마이셀 구조가 기공 구조를 유도한다. 계면활성제는 일반적으로 친수성의 머리부분과 소수성의 꼬리부분으로 이루어져 있어 수용액에서 다양한 구조이 자기조립된 마이셀(self-assembled micell) 및 액정구조를 이룬다. 이러한 마이셀 또는 액정 구조의 표면에 위치한 친수성 부분과 무기 물질이 상호작용을 통하여 유기/무기 나노복합체가 형성되고, 계면활성제를 제거하면 중기공성 물질이 생성된다. 이러한 원리를 통하여 중기공성 백금이 개발되었으며, 그 특성에 대한 연구가 이루어지고 있다(Gollas, B.; Elliott, J. M.; Bartlett, P. N. *Electrochimica Acta* 2000, 45, 3711-3724; Attard, G. S.; Glyde, J. C.; Goeltner, C. G. *Nature* 1995, 378, 366-368; Attard, G. S.; Goeltner, C. G.; Corker, J. M.; Henke, S.; Templer, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, 36, 1315; Kuhn, A. T. *Industrial Electrochemical Processes*; Elsevier: Amsterdam, 1971; Whitehead, A. H.; Elliott, J. M.; Owen, J. R.; Attard, G. S. *Chem. Commun.* 1999, 331-332; Attard, G. S.; Edgar, M.; Goeltner, C. G. *Acta Mater.* 1998, 46, 751-758; Birkin, P. R.; Elliott, J. M.; Watson, Y. E. *Chem. Commun.* 2000, 1693-1694; Elliott, J. M.; Owen, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000, 2, 5653-5659). 최초 중기공성 백금 필름을은비이온성 계면활성제(octaethylene glycol mono-hexadecyl ether, C₁₆EO₈)로 구성된 육방 액체 결정상(hexagonal (H1) liquid crystalline

phase, 29)으로부터 전해석출(electrodeposition)에 의하여 생성되었다(Attard, G. S.; Bartlett, P. N.; Coleman, N. R. B.; Elliott, J. M.; Owen, J. R.; Wang, J. H. Science 1997, 278, 838-840). 전해석출된 백금 필름은 육방 배열의 원통형 구멍(pore diameter, 2.5 nm; pore-pore distance 5.0 nm)이 형성되어 있으며, 접촉성 및 광택이 있다. 또한 에반스 등(Evans, S. A. G.; Elliott, J. M.; Andrews, L. M.; Bartlett, P. N.; Doyle, P. J.; Denuault, G. Anal. Chem. 2002, 74, 1322-1326)에 따르면, 미세전극상에 전해석출된 중기공성 백금 필름(Elliott, J. M.; Birkin, P. R.; Bartlett, P. N.; Attard, G. S. Langmuir 1999, 15, 7411-7415)은 천연 백금에 비하여 과산화수소 검출이 매우 우수한 것으로 보고된바 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명은 중금속 중독을 야기하지 않고, 글루코스의 농도를 정확하게 측정할 수 있는 비효소성 글루코스 농도 측정방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 중기공성 백금을 이용하여 글루코스 산화반응을 선택적으로 감응할 수 있는 비효소성 글루코스 농도 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 전극 및 상기 전극에 형성된 중기공성 백금층을 포함하는 바이오센서를 제공한다.

또한 본 발명은 금속 전극 및 상기 금속 전극 표면을 둘러싼 중기공성(mesoporous) 백금을 포함하는 바이오 센서에 전압을 인가하는 단계 및 상기 인가단계에서 측정된 전류세기를 분석하는 단계를 포함하는 중기공성 백금을 이용한 글루코스 농도 측정 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 효소를 사용하지 않는 비효소성 바이오 센서를 이용하여 생체내 물질의 농도를 측정하는 방법에 관한 것으로서, 중기공성 백금을 사용하고, 글루코스의 산화를 측정하여 글루코스의 농도를 측정한다.

본 발명의 바이오 센서는 금속 전극 및 상기 전극 표면을 둘러싼 중기공성 백금층을 포함한다.

상기 금속 전극으로는 탄소, 백금, 금, 은과 같은 비활성 금속 또는 스테인레스스틸과 같은 산에 대한 저항성이 있는 금속을 사용할 수 있다. 백금 전극은 글루코스를 전기화학적으로 산화시키는데 필요한 과전압이 다른 금속 전극에 비해 비교적 낮다.

중기공성 백금의 거칠기(roughness)는 대부분의 대 시간 전류법(chronoamperometry)에서 확산 영역의 크기보다 작다. 확산층은 10⁻²초에 전극표면으로부터 수 마이크로미터 떨어지므로, 2-50 nm 직경의 기공내 반응물은 확산-조절 전기화학적 시스템(diffusion-controlled electrochemical system)에 의하여 소모된다. 결과적으로, 빠른 산화성 또는 환원성 반응물질에서 패러데이 전류는 전위단계이후 10⁻²초내에 전극의 기하학적 영역에 비례한다. 그러나, 반응속도론적 조절 전기화학(kinetic-controlled electrochemical)에서의 패러데이 전류는 기하학적 영역보다는 전극의 초미세 영역에 더욱 반응한다. 따라서, 본 발명의 중기공성 백금 전극은 느린 반응으로부터 패러데이 전류를 선택적으로 강화시킨다.

중기공성 백금 층은 중기공성 물질 제조방법에 따라 제조할 수 있으며, 바람직하게는 비이온성 계면활성제(octaethylene glycol monohexadecyl ether, C₁₆EO₈)로 구성된 육방 액체 결정상으로부터 전해석출(electrodeposition)방법으로 실시하여 제조할 수 있다. 전해석출된 중기공성 백금은 금속 전극 표면에 일정하게 도금된다.

바람직하게는 중기공성 백금 층은 직경 1.5 내지 3 nm의 구멍이 육방배열구조로 이루어지며, 중기공성 백금 층은 금속 전극 표면에서 60 내지 600 nm의 두께로 코팅되는 것이다. 상기 중기공성 백금 층의 두께가 60 nm 미만으로 형성되면 중기공 구조가 충분히 형성되지 못하여 글루코스 선택성이 낮을 수 있으며, 600 nm 초과할 경우 중기공 구조의 생성과정에서 기공이 막힐 위험성이 있다. 기공의 크기와 벽의 두께는 사용하는 계면활성제의 험수성 사슬부의 길이와 친수성 사슬부의 길이에 의하여 결정되므로, 바람직한 계면활성제를 사용하는 것이 좋다.

한편, 본 발명의 글루코스 농도 측정방법은 글루코스를 포함하는 완충액에 바이오 센서를 침지한 후, 상기 바이오 센서에 일정 전압을 인가하여 전류변화를 측정하는 것이다. 상기 완충액은 인산완충액 또는 NaCl을 포함하는 인산완충액(pH 7.4)을 사용할 수 있다.

상기 전압은 기준전극 대비 -0.1 내지 0.5 V가 바람직하며, 상기 범위를 벗어날 경우 수소의 흡탈착, 산화백금의 형성과 소멸, 산소의 환원 등의 다른 과정이 글루코스 산화과정에 비하여 우세하게 발생할 수 있어 정확한 글루코스 농도를 측정하기 어려울 수 있다. 상기 기준 전극으로는 Ag/AgCl을 사용한다.

본 발명의 중기공성 백금은 글루코스 농도에 따라 비례적인 감응도(전류 세기 증가)를 나타내며(도 1 및 도 2), 그 외 간섭물질에 대한 감응도는 현저히 낮아 글루코스 산화반응만을 선택적으로 감응한다. 또한 기존의 백금-납 합금 전극이 비록 간섭물질에 둔감하지만 이때 간섭물질이 산화되지 않은 낮은 전위상태에서의 결과인 것에 비하여, 본 발명의 중기공성 백금 전극은 간섭물질이 산화된 상태에서도 글루코스만을 선택적으로 감응하여 글루코스 정량에 매우 효율적이다.

또한 본 발명의 중기공성 백금 전극은 염소이온을 포함하는 완충액 또는 0.15 M의 PBS 완충액에서도 글루코스 선택적인 감응도를 가진다. 이는 기존의 전기화학적 센서들이 특히 염소이온에 의하여 활성이 감소되는 문제점을 해결한 것으로, 생체물질에서 염소이온 농도가 높은 것을 감안하면 바이오 센서로써 매우 적합함을 의미하는 것이다. 그리고, 중기공성 백금 전극은 기계적, 화학적으로 안정하며, 전기화학적인 세척으로 쉽게 재생시킬 수 있다.

이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 중기공성 백금의 준비

C₁₆EO₈ 0.42 g, 증류수 0.29 g 및 하이드로젠 헥사클로로플라티네이트 하이드레이트(hydrogen hexachloroplatinate hydrate) 0.29 g을 혼합하고, 혼합물이 투명해지고 균질화 되도록 온도를 80 °C로 상승시켰다. 백금 막대 전극은 균질화된 혼합물에 넣고 온도를 상온(~23 - 26 °C)으로 낮추어, 혼합물이 높은 점성을 가진 액체 결정상으로 형성되도록 하였다. 백금 막대 전극에 기준전극(Ag/AgCl) 대비 -0.06 V의 일정전위에서 25.4 mC를 인가하여 백금 전해 석출을 실시하여 백금 막대 표면에 중기공성 백금층을 형성시켰으며, 중기공성 백금은 4회에 걸쳐 증류수에 1시간 두어 C₁₆EO₈을 추출하였다. 이후 중기공성 백금에 기준전극 대비 +1 내지 0.45 V의 전위를 순환시켜 0.5 M 황산에서 일정한 순환 전압전류가 형성되도록 하였다.

제조한 중기공성 백금은 약 2.5 nm 직경 및 약 2.5 nm 월(wall)두께의 육방 원통형 구멍을 가진다. 중기공성 백금의 특징을 조사하였으며(Attard, G. S.; Bartlett, P. N.; Coleman, N. R. B.; Elliott, J. M.; Owen, J. R. Langmuir 1998, 14, 7340-7342), 확인된 특성은 하기와 같다.

- 거칠기 인자(high roughness factor) 7.25
- ~30%의 패러데이 효율을 가지는 ~38 m²/g의 특이 영역
- 중기공성 필름 (20±5 nm over 1 mm² area of 300 nm thick film)에서 보고된 우수한 평탄도에 의한 거울상 표면
- 구멍 간격 6.1 nm에 상응하는 1.68°(2θ)의 단일 X-레이 회절 피크
- 연마된 연질 백금(Pt-s) 표면과 동일한 확산력.

실시예 2: 중기공성 백금을 이용한 글루코스 농도 측정

완충액(phosphate buffered saline solution, 0.1 M phosphate 및 0.15 M NaCl, pH 7.4, 37.2±0.2 °C)에 글루코스, 아스코르빈산 또는 아세트아미노페놀을 농도별로 각각 첨가한 다음 중기공성 백금이 형성된 전극을 넣고 기준전극 대비 0.4 V를 인가하여 전류변화를 측정하였다. 또한 대조군으로 연질 백금을 전극으로 동일하게 실시하였다.

도 1은 글루코스, 아스코르빈산 및 아세트아미노페놀에 대한 중기공성 백금 반응을 전류세기로 나타낸 것이다. 도 1에서 (a)는 중기공성 백금 전극에서의 반응이고, (b)는 연질 백금 전극에서의 반응을 나타낸 것이다. 그리고 화살표는 글루코스, 아스코르빈산(AA) 또는 아세트아미노페놀(AP)을 첨가함을 의미한다.

표 1은 중기공성 백금 전극 및 연질 백금 전극의 글루코스 및 간섭물질들에 대한 감응도를 나타낸 것이다.

[표 1]

전극	글루코스	아스코르빈산	아세트아미노페놀
중기공성 백금 전극	9.6 μAcm ⁻² mM ⁻¹	4.4 μAcm ⁻² mM ⁻¹	1.1 μAcm ⁻² mM ⁻¹
연질 백금 전극	0.039 μAcm ⁻² mM ⁻¹	10 μAcm ⁻² mM ⁻¹	0.75 μAcm ⁻² mM ⁻¹

도 1 및 표 1에서, 중기공성 백금은 글루코스 0 내지 10 mM 범위에서 9.6 μAcm⁻²mM⁻¹의 감응도를 나타내었고, 연질 백금은 0.039 μAcm⁻²mM⁻¹의 감응도를 나타내었다. 즉, 중기공성 백금 전극은 연질 백금 전극에 비하여 글루코스 감응도를 약 250 배 증가시켰으며, 간섭물질인 아스코르빈산 및 아세트아미노페놀에 비하여 글루코스만을 선택적으로 높게 검출하였다. 반면에 연질 백금 전극은 간섭물질들에 비하여 글루코스 검출능이 현저히 낮았다.

도 2는 글루코스 농도별 중기공성 백금의 감응성을 나타낸 정량곡선이다. 글루코스 농도에 대한 백금 전극의 감응도는 농도에 비례하여 증가하였으며, 감응도는 0.9 μAcm⁻²mM⁻¹이다. 도 2의 정량곡선을 이용하여 시료내 글루코스의 농도를 확인할 수 있다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 비효소성 글루코스 측정에서 중기공성 백금을 전극으로 사용하여 글루코스 농도를 정량적으로 측정할 수 있고, 간섭물질에 의한 방해물을 배제시켜 글루코스에 대한 선택적인 감응도를 측정할 수 있다. 또한 비효소성 글루코스 측정 센서로 사용하여 기존의 글루코스 측정 센서에 비하여 선택성, 감응도 및 안정성을 향상시킬 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

전극 및 상기 전극에 형성된 중기공성 백금층을 포함하는 바이오센서.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 전극은 비활성 금속 또는 산 저항성을 가지는 금속 전극인 것인 바이오센서.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 중기공성 백금층은 1.5 내지 3 nm의 직경을 갖는 포어가 육방 배열구조로 형성된 것인 바이오센서.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 중기공성 백금층은 상기 전극 표면에 60 내지 600 nm 두께로 도금된 것인 바이오센서.

청구항 5.

제 1항 내지 4항중 어느 한 항에 따른 바이오 센서에 전압을 인가하는 단계; 및

상기 인가단계에서 측정된 전류세기를 분석하는 단계

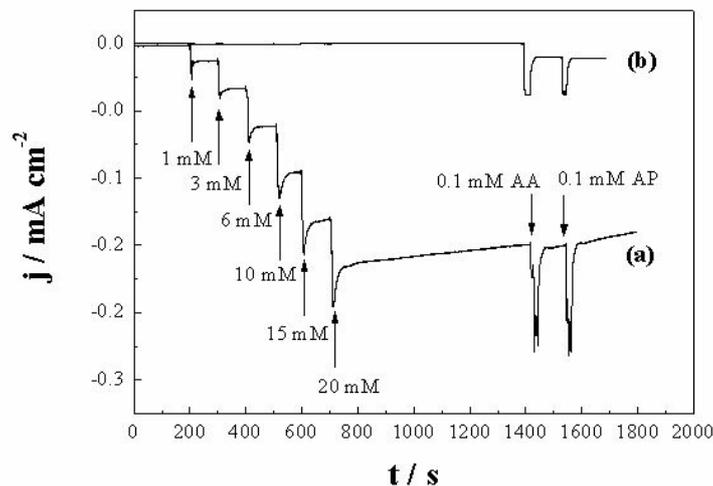
를 포함하는 중기공성 백금을 이용한 글루코스 농도 측정 방법.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 전압은 기준 전극 대비 -0.1 내지 0.5 V인 것인 측정 방법.

도면

도면1



도면2

