Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 28, No. 6, 425-429, 2015
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2015.28.6.425

Development of a cholesterol biosensor modified with carbon nanotube

Haidong Kim★

Department of Chemistry, Kyung Hee University, 26 Kyungheedae-ro, Dongdaemun-ku, Seoul 02247, Korea
(Received October 6, 2015; Revised October 26, 2015; Accepted October 27, 2015)

탄소나노튜브를 이용하여 개조한 콜레스테롤 바이오 센서 개발

김해동★

경희대학교 화학과
(2015. 10. 6. 접수, 2015. 10. 26. 수정, 2015. 10. 27. 승인)

Abstract: A cholesterol biosensor was developed using a modified carbon electrode with carbon nanotubes. The disposable cholesterol biosensor was modified with carbon nanotubes to enhance electron transfer during the enzymatic reaction of cholesterol. Cholesterol oxidase and peroxidase, with potassium ferrocyanide as a mediator, were immobilized on a screen-printed carbon nanotube electrode. The electrochemical cholesterol biosensor developed using carbon nanotubes showed a rapid and reliable signal for measuring total cholesterol. The cholesterol sensor showed a linear response in 5 seconds with a small volume (0.5 μL) in the range of 100~400 mg/dL, with a coefficient of variation of 4.0%.

요 약: 탄소나노튜브를 이용하여 변형한 콜레스테롤 측정을 위한 바이오 센서를 개발하였다. 개발된 콜레스테롤 바이오 센서는 일회용으로 콜레스테롤의 효소반응에서 전자전달을 증진시키기 위하여 탄소잉크로 스크린 프린트된 전극을 탄소나노튜브를 이용하여 변형하였으며, 변형한 탄소나노튜브 전극위에 콜레스테롤 산화효소와 과산화효소, 전자매개 물질로 페로시안 칼륨을 도포하여 제작하였다. 탄소나노튜브를 이용하여 변형한 콜레스테롤 바이오 센서는 전기화학적으로 콜레스테롤 측정시 매우 신속하고 안정된 신호를 나타내었다. 개발된 콜레스테롤 센서는 소량의 (0.5 μL) 시료로 총 콜레스테롤 100~400 mg/dL 영역에서 5초 이내에 직선적인 감응을 나타내었으며 좋은 재현성을 나타내었다(CV 4.0% 이하).

Key words: cholesterol, point-of-care, blood test

1. 서 론

콜레스테롤은 모든 동물의 세포를 둘러싸고 있는 세포막의 주성분으로, 체내에서 콜레스테롤은 담즙산, 호르몬, 비타민등이 합성될 때 필요로 하는 인체에 필수적인 지질로서 인체의 생리적 및 생화학적 반응에

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)2-961-0564 Fax : +82-(0)2-961-0237
E-mail : haikim@khu.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons. org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중요한 역할을 하는 물질이다. 정상인은 혈중 콜레스테롤 함량이 보통 5.2 mM (200 mg/dL)이며, 6.2 mM (240 mg/dL) 이상이면 건강의 잠재적 위험으로 간주된다. 과도한 혈중 콜레스테롤 함량은 심혈관 질환에 나쁜 영향을 주며 심근경색, 뇌경색등의 질병을 유발할 수 있다고 알려져 있다. 콜레스테롤은 음식을 통하여 흡수되지만 우리 몸에서 합성되기도 하며, 콜레스테롤의 약 2/3는 에스테르화 되어 있고 나머지 1/3은 스테롤 형태로 존재한다. 콜레스테롤은 지단백질이 형성될 때 단백질 비율이 낮은 저밀도 지질단백질 (low density lipids, LDL)과 단백질 비율이 높은 고밀도 지질단백질 (high density lipids, HDL)로 구분되며, 정상인의 경우에 혈중 HdL 함량은 60 mg/dL 이상이고 LdL 함량은 130 mg/dL 이하이다.

인체의 건강에 미치는 콜레스테롤의 영향이 증대함에 따라 혈중 콜레스테롤을 측정하는 다양한 방법에 대하여 연구가 이루어 졌다.[1,2] 정확하고 저가이면서도 감도가 좋은 바이오 센서들은 소량의 혈액을 분석하여 인체의 질병을 조기진단하고 관리하는데 매우 중요하다. 현재까지 콜레스테롤 측정을 위하여 개발된 대부분의 바이오 센서들은 콜레스테롤의 효소반응을 이용하고 있으며, 콜레스테롤과 콜레스테롤과 산화효소 사이의 반응에 따라 생성된 과산화수소를 전기화학적인 원리 혹은 광학적인 빛의 흡수등을 이용하여 측정하고 있다.[3] 발광성을 가진 전도성 고분자 (luminol-biotinylated pyrrole)를 이용하여 콜레스테롤을 분석하는 방법,[4] 분광분석법을 이용한 분석,[5] HPLC를 이용한 분석법,[6] 전기화학적인 방법[7-8] 등이 개발되었다.

전극과 전극에 고정된 콜레스테롤-콜레스테롤 산화효소 사이의 전기화학 반응을 이용한 콜레스테롤 바이오 센서들은 최근에 많은 관심이 집중되고 있다.[9] 전기화학적인 전류법을 이용한 바이오 센서들은 제작이 용이하고, 저가로 제작이 가능하며, 실시간으로 손쉽게 사용이 가능하다는 장점이 있다. 효소를 이용한 콜레스테롤 바이오 센서들은 높은 선택성과 뛰어난 감도를 가지고 있지만 효소들의 활동도가 시간에 따라 감소하고, 센서 제작시 변질되기도 하는 원초적인 단점을 가지고 있다. 또한, 효소의 활동도는 시료의 온도, pH, 습도, 기타 다른 화학종의 유무에 따라 영향을 받기 때문에 사용에 한계를 가지고 있다.[10] 이러한 효소를 이용한 콜레스테롤 바이오 센서들의 단점을 극복하기 위하여 효소를 사용하지 않는 바이오 센서들이 개발되기도 하였다.[11-12]

탄소나노튜브는 기존의 다른 물질들과 다른 아주 독특한 전기전자적, 광학적인 성질을 가지고 있어 여러 분야에서 응용이 가능하므로 최근에 가장 주목을 받고 있는 물질이다. 탄소나노튜브는 구조가 잘 알려져 있고 화학적 안전성과 여러 물질들에 대한 전기화학적인 촉매활동성을 가지고 있어 다양한 전기화학적인 바이오 센서를 개발하는데 사용되고 있다. 특히, 극소형 구조, 기능성 표면, 뛰어난 전기 전도도, 높은 생화학적 친화성과 반응성등은 바이오 센서로 사용시 이상적인 감응을 나타낼 것으로 기대되고 있다.[13-14] 이러한 이유 때문에 전기화학적 바이오 센서에 탄소나노튜브를 많이 사용하고 있다. 탄소나노튜브를 사용한 전기화학적 바이오 센서는 높은 감도를 나타내는 넓은 면적, 튜브타입의 구조와 화학적 안정성, 전극반응에 의한 전자이동이 용이, 나노구조를 변형시켜 다기능성을 부여하고, 초소형 센서를 만들 수 있다는 여러 장점들을 가지고 있다. 탄소나노튜브를 전극으로 사용시에는 일반적으로 다양한 대상물질의 산화-환원반응의 과전류를 낮추어 산화-환원반응에 의한 전류를 증진시킨다. 탄소나노튜브를 사용한 전기화학식 바이오 센서들에 의한 단백질의 산화-환원에 대한 전자이동과 전기화학반응에 대한 많은 연구결과들이 보고 되고 있다. 최근에는 나노물질인 그래핀을 이용한 바이오 센서들이 개발되고 있다.[15] 탄소나노튜브와 같이 그래핀 나노시트는 물리화학적으로 독특한 구조와 감응능력, 우수한 기계적, 전기전자적, 열적 안정성등이 인정받아 여러 분야에서 응용되고 있다. 그래핀 나노시트를 이용한 바이오 센서는 거대한 표면적-부피 비율로 인하여 잠재적으로 우수한 바이오 센서를 개발하는데 사용될것으로 예측된다.

2. 실험 및 방법

2.1. 시약 및 용액제조

시료용액 제조에 사용된 Cholesterol과 효소용액 제조에 사용된 Poly vinyl pyrrolidone (PVP)은 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 2-Pyrrolidinon은 Samchun사 시약을 사용하였다. Cholesterol oxidase (COD-321), Cholesterol estrase (COE-311), Peroxidase (PEO-302)는 Toyobo (Osaka, JAPAN) 사에서 구입하였다. Potassium Ferrocyanide Trihydrate와 TX-100, Buffer용액에 사용된 Potassium Phosphate Monobasic, Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous, Sodium Chloride, Potassium Chloride는 Daejung사 제품을 사용하였다. 스트립 전극의 제작에 사용된 기판

은 PET film을 사용하였고, 스크린프린팅에 사용된 Carbon paste (FTU-16), 절연페이스트 (CR-18G-KT), 경화제 (Hardener CR-1)는 Asahi (Tokyo, JAPAN)사의 제품을 구매하였으며, 산처리된 Multiwalled Carbon Nanotube (MWCNT)는 한화나노텍에서 구입하여 사용하였다.

시료용액 제조 (예: 400 mg/dL): 콜레스테롤 시료 용액은 다음의 순서대로 제조하였다. (1) Cholesterol stock (10 배) solution 준비: 0.4 g Choleserol을 2-Pyrrolidinon 10 mL에 넣고, 천천히 교반시키며 녹인다. (2) Buffer (PBS pH 7.4)와 Cholesterol stock solution을 9:1 비율로 취하고 교반하여 혼합시킨다. (3) 진한 농도의 용액을 묽히거나, 같은 방법으로 원하는 농도의 샘플을 제조한다.

효소용액 제조: 효소용액은 다음의 순서대로 제조하였다. (1) 3차 초순수를 이용하여 pH 7.4 PBS Buffer를 바탕용액으로 준비한다. (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM) (2) PBS Buffer에 분산제 역할의 PVP를 0.05 wt% 넣고 완전히 용해시킨다. (3) 상기 용액에 200 mM Potassium Ferrocyanide Trihydrate를 넣고 암소에서 용해시킨다. (4) 용액 (3)에 COD를 1 U/strip을 넣고, 천천히 교반한다. COD가 전부 녹으면 POD를 2 U/strip을 넣고, 천천히 교반한다. (5) POD가 완전히 녹으면 계면활성제인 TX-100을 0.5 wt% 넣고 충분히 교반시킨다.

2.2. 실험기기 및 장치

센서의 건조 및 보관은 Forced Convention Oven (0F-02GW (60L), JEIOTEC)과 데시케이터(AS1.5486.21, KERN)에서 수행하였다. 전극제작에 사용된 디스펜서는 제타사 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 라미네이터는 LamiTek 사에서 구입하여 사용하였다.

Amperometry, Cyclic Voltammetry, Linear Sweep Voltammetry 등의 전기화학실험은 Digi-IVY사 (Austin, TX, USA)의 Mini Potentiostat DY2113를 사용하였다.

2.3. 전극제작

콜레스테롤 바이오 센서 스트립은 *Fig.* 1에 도시된 순서대로 제작하였다.

(1) PET 필름위에 입고된 카본페이스트를 스크린프린팅 하여 3 개의 전극을 형성하고 일정온도 (120 °C)에서 일정시간 (30 min)동안 건조 시킨다. (2) 카본페이스트가 완전히 건조 된 뒤, 절연페이스트를 스크린프린팅 하고 일정한 조건 (120 °C/60 min)에서 건조

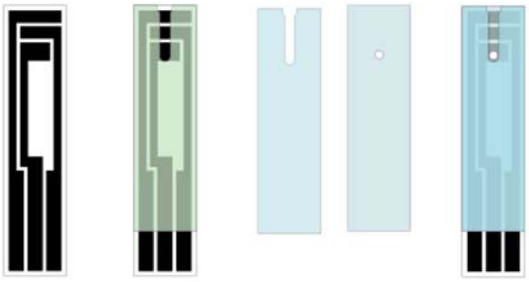

Fig. 1. Steps of cholesterol biosensor production.

시킨다. (3) 인쇄된 전극에 절연페이스트와 동일한 스페이서를 부착하여 반응 공간을 만든 후, 라미네이터를 이용하여 고정시킨다. 이 때 라미네이터 온도는 90 °C 일 때 바람직하다. (4) 센서 스트립의 노출된 전극위에 계면활성제 TX-100 용액에 녹인 탄소나노튜브 용액을 일정량 적가후 건조 (60 °C/10 min) 시킨다. (5) 제조된 효소용액을 센서전극의 반응 공간에 일정량 토출한다. (6) 효소용액이 토출된 센서 스트립을 일정한 조건 (40 °C/20 min)에서 건조시킨다. (7) 건조된 센서전극 위에 hole을 포함하는 커버를 부착한 다음 라미네이터 (90 °C)를 이용하여 흡착시킨다. (8) 제작된 센서 스트립을 컷팅하여 사용한다.

2.4. 전극신호 측정

상기한 바와 같은 장치를 이용하여 콜레스테롤에 의한 전극신호를 측정하였다. 콜레스테롤 바이오 센서의 전극에 콜레스테롤 시료를 적가한 후 3분동안의 반응시간을 두었다. 반응시간 3분 후 전극에 +300 mV 전위를 인가하여 5초 후에 전극전류를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

혈중 콜레스테롤은 많은 양이 에스테르화 된 상태로 존재하기 때문에 콜레스테롤 산화효소와 반응시키기 위해서는 먼저 콜레스테롤 에르테라제 효소를 사용하여 콜레스테롤 에스테르를 분해시킨다. 콜레스테롤은 콜레스테롤 산화효소와 반응하여 과산화 수소를 발생시키며, 이때 발생된 과산화 수소는 +2가 이온인 Ferrocyanide ($Fe(CN)_6^{4-}$) 촉매하에 과산화효소 (peroxidase) 반응한다. Ferrocyanide 이온은 반응에 의하여 +3가 이온인 Ferricyanide ($Fe(CN)_6^{3-}$)로 산화되며, 탄소 작업전극에서 다시 원래의 형태인 +2가 이온인 Ferrocyanide ($Fe(CN)_6^{4-}$)로 돌아가게 된다. 이때 탄소 작업 전극에 흐르는 전류는 반응한 Ferrocyanide 에

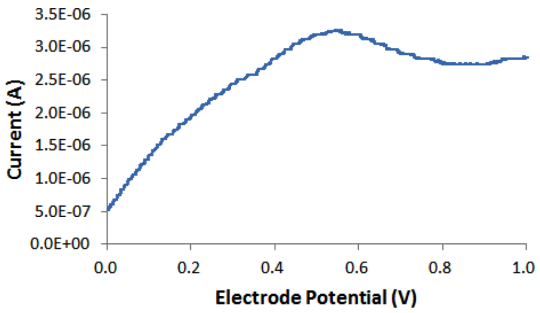

Fig. 2. Current-voltage response of the biosensor by linear sweep voltammetry.

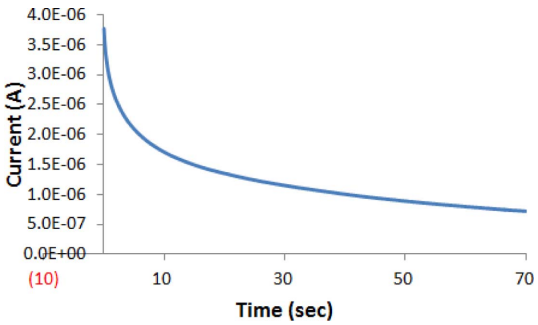

Fig. 3. Response time of the cholesterol biosensor after sample injection.

비례하며, 반응한 Ferrocyanide 는 다시 콜레스테롤이 콜레스테롤 산화효소와 반응하여 생성된 과산화 수소에 비례하므로 결국 탄소작업전극에 흐르는 전류는 시료중에 존재하는 콜레스테롤에 비례하게 된다. 콜레스테롤과 콜레스테롤 산화효소의 반응에 의하여 생성된 과산화 수소를 전극에서 직접 산화 시킬수 있으나 이 경우 전극에 높은 전압 (+600 mV)을 가해주어야 한다. 그러나, 이렇게 높은 전극전압이 걸리게 되면 시료중 여러 다른 물질들이 같이 반응을 하게 되어 오차를 유발시키게 되므로 Ferrocyanide 중간체를 이용하여 시료용액중에 존재하는 다른 화학종들이 반응하지 않는 낮은 전극전압에서 반응을 시킨다.

3.1. 최적의 작업전극 전위

본 연구에 의하여 개발된 콜레스테롤 바이오 센서의 최적의 전극반응을 알아보기 위하여 일정농도의 콜레스테롤을 전극에 적가한 후 전극전위를 0-1000 mV까지 변화시키면서 전극전류를 측정하였다. 전극전위가 변함에 *Fig.* 2에 도시한 바와같이 따라 전극전류는 580 mV까지 증가하였으며 이후 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 시료에 콜레스테롤과 같이 존재하는 다른 화학종들의 방해효과를 최소화 하기 위하여 본 연구에서는 콜레스테롤을 전류법으로 측정하기 위하여 전극의 전위를 +300 mV로 정하였다.

3.2. 최적의 전류신호 측정시간

탄소작업전극에 일정 농도의 콜레스테롤을 적가한 후 3분 동안의 반응시간이 지난 후 전극에 전위를 인가하여 시간에 따라 변하는 전극전류를 측정하여 *Fig.* 3에 도시하였다. 작업전극 전류는 급격하게 감소하여 5초에 이르면 반응이 50% 이상 진행되고 있음을 알 수 있으며, 이후 신호는 반감된다. 따라서 오차가 가장 적고 재현성이 좋은 측정시간을 찾아야 하며, 본 연구에서는 5초 간격으로 50초 까지 시험한 결과 반응시작 후 5초에서 측정 데이터의 재현성과 신호대 잡음비가 가장 좋아 이후 콜레스테롤 측정은 전극전위 인가후 5초에서 측정하였다.

3.3. 전극반응 환경의 최적화

전극에 일정전위를 인가하여 전극표면에서 전기화학 반응을 효과적으로 유발시키기 위해서는 전극 주변의 환경이 전기화학 반응이 잘 일어날 수 있도록 최적화 되어야 한다. 전극위에는 효소외에 중간체로 Ferrocyanide, pH를 일정하게 유지하기 위한 완충용액 시료용액이 잘 섞이게 하기 위한 계면활성제등이 존재한다. 가능한 가장 방해효과가 적고 신호대 잡음비가 가장 크게 나오는 첨가제의 농도가 바람직 하다.

콜레스테롤 산화효소와 전극반응의 중간체로서 사용된 Ferrocyanide 의 농도는 전극반응에서 매우 중요한 역할을 수행하므로 적정 농도로 사용되어야 한다. 적정농도로 유지할때 신호는 증가하나 과량으로 존재시 오히려 전극반응을 방해할 수 있다. 본 연구에서는 실험에 의하여 200 mM을 유지할때 가장 좋았으며, 완충용액은 Phosphate buffer (PBS)의 pH 는 정상인의 체내 pH 와 비슷한 수준인 pH 7.4 일때 좋은 결과를 나타내었다. 본 연구에 의한 콜레스테롤 센서의 시간에 대한 안정성을 시험하기 위하여 콜레스테롤 센서를 밀봉하여 5 ºC에 보관하고 매일 200 mg/dL 콜레스테롤 용액으로 신호를 측정한 결과 60일 까지는 측정신호가 5% 이하의 일정한 수준을 나타내었으나 이후 점차 감소하는 경향이 관찰되었다.

3.4. Calibration

정상인의 혈중 총 콜레스테롤은 200 mg/dL 이므로

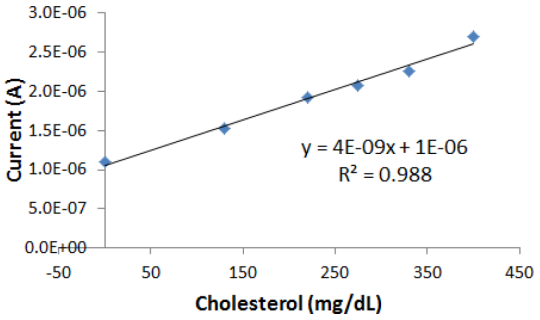

Fig. 4. Calibration curve of the cholesterol biosensor.

본 연구에서 개발된 콜레스테롤 바이오 센서는 총 콜레스테롤의 농도가 100-400 mg/dL 영역에서 사용될 수 있도록 최적화 하였다. 콜레스테롤 시료의 부피는 0.5 μL 정도의 극소량의 시료를 사용하였으며, 반응시간 3분후 전극에 +300 mV 전위를 인가한 후 5초후에 전극신호를 측정하였다. 콜레스테롤 표준용액 100-400 mg/dL 농도 영역에서 측정한 전류신호를 *Fig.* 4에 도시하였다. 측정된 전극신호는 직선적으로 변화하였으며 상관계수는 0.988로 양호한 결과를 나타내었다. 콜레스테롤 각 농도에서의 재현성은 CV 4.0% 이하로 신뢰성 있는 결과를 나타내었다.

4. 결 론

탄소나노튜브를 이용하여 스크린 프린트된 탄소전극을 변형하여 총 콜레스테롤을 측정할 수 있는 콜레스테롤 바이오 센서를 개발하였다. 탄소나노튜브로 변형한 탄소전극은 전극에서의 효소반응이 용이하게 일어날 수 있는 환경을 조성하는 것으로 생각된다. 탄소나노튜브에 의한 전극에서의 전기화학 반응환경의 개선은 전극에서 효율적이고 신속한 전자전이가 일어나게 하므로 효소의 반응시간을 단축시키고, 전극신호가 증가하므로 낮은 농도의 콜레스테롤도 측정할 수 있도록 검출한계를 낮추고, 고농도 콜레스테롤까지 전극감응 신호의 직선성이 향상되는 것으로 사료된다. 본 연구에 의하여 개발된 콜레스테롤 바이오 센서는 cholesterol esterase, cholesterol oxidase, peroxidase 효소들과 전자전달 중간체로서 ferrocyanide를 사용하였으며, 극 소량의 부피 0.5 μL를 사용하여 총 콜레스테롤 100-400 mg/dL 범위에서 직선적인 감응을 나타내었다. 측정된 데이터는 CV 4.0% 이하로 주어진 농도 범위에서 재현성 있는 신호를 나타내었다. 개발된 콜레스테롤 바이오 센서는 전기화학식 일회용으로 대량생산시 저가로 제작이 가능하여 현장에서의 대사질환 검사등에 유용하게 사용될 수 있다.

References

1. S. K. Arya, M. Datta and B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1083-1100 (2008).
2. G. R. Warnick, M. M. Kimberly, P. P. Waymack and E. T. Leary, *Labmedicine*, **39**(8), 481-490 (2008).
3. O. Turkarslan, S. K. Kayahan and L. Toppare, *Sens. Actuators B,* **136**, 484-488 (2009).
4. J. B. Claver, J. A. Cabello, J. M. Sanfrutos, A. M. Fernandez, M. C. V. Miron, F. S. Gonzalez and L. F. C. Vallvey, *Anal. Chim. Acta,* **754**, 91-98 (2012).
5. C. K Pires, B. F. Reis, C. X. Galhardo and P. B. Martelli, *Anal. Lett.*, **36**, 3011-3024 (2003).
6. B. Canabate-Diaz, C. A. Segura, A. F. Gutierrez, V. A. Belmonte, F. A. Garrido, V. J. L. Martinez and M. J. Duran, *Food Chem,* **102**, 593-598 (2007).
7. Y. Y. Hosokawa, H. Hakamata, T. Murakami, S. Aoyagi, M. Kuroda, Y. Mimaki, Y. A. Ito, S. Morosawa and F. Kusu, *Electrochim. Acta*, **54**, 6412-6416 (2009)
8. M. Barbadillo, E. Casero, Petit-Dominguez, M. D., L. Vazquez, F. Pariente and E. Lorenzo, *Talanta,* **80**, 797-802 (2009).
9. Y. Wang, X. Hui, J. Zhang and L. Guang, *Sensors*, **8**, 2043-2081 (2008).
10. S. Park, H. Boo and T. D. Chung, *Anal. Chim. Acta,* **556**, 46-57 (2006).
11. F. Ricci and G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron,* **21**, 389-407 (2005).
12. J. L. Yi, D. K. Jung and Y. P. Jae, *J. Kor. Phys. Soc.*, **54**, 1769-1773 (2009).
13. H. Chengguo and H. Shenghui, *J. Sensors,* 1-40 (2009).
14. J. Wang, *Electroanal.*, **17**, 7-14 (2005).
15. M. Q. Israr1, K. Hasan, J. R. Sadaf, I. Engquist, O. Nur, M. Willander and B. Danielsson, *J. Biosens Bioelectron*, **2**(3), 1000109 (2011).