

# μFIA 바이오 센서를 이용한 포도당 농도 측정 Measurement of Glucose Concentration Using a μFIA Biosensor

송대빈 Joseph Irudayaraj  
정회원  
D. B. Song

## ABSTRACT

A microdialysis coupled flow injection amperometric biosensor was calibrated to measure the concentration of glucose using 7 standard samples from 10ml to 70ml of glucose solution. The output of the sensor increased linearly with an increase in the glucose concentration with an  $R^2$  correlation of 0.99. The amperometric biosensor was then applied to measure the glucose concentration of 2 commercial samples(Orange and Pineapple juice) and the results compared with HPLC. Around 12% error was observed in glucose concentration measurements of the samples analyzed. The sensor has potential in rapid measurement once the calibration is done. Potential for on-line sensing is also discussed.

**Keywords** : Biosensor, Glucose measurement, FIAS, Microdialysis probe.

## 1. 서 론

바이오 센서는 생물학적 인식 반응(biological recognition reaction)이나 생물 촉매 공정(bio-catalytic process)을 측정 가능한 전기적 신호로 변환시켜주는 적절한 변환기(transducer)와 같은 생물학적 인식 요소로 이루어진 감지 장치를 의미한다(Habermüller 등, 2000). 1962년 효소를 이용한 Glucose 전극봉의 개발이후 이 분야에 대한 수 많은 연구와 기기의 개발이 진행되어 왔다(Wang, 2001). 분석도구로서 바이오 센서는 효소, 항체, 수용체, 세포, 조직 등과 같은 생물학적 인식 요소들에 광범위하게 적용 가능하다는 장점이 있는 반면, 위에 열거한 생물학적 인식 요소들의 불안정성으로 인해 신뢰성이 유지되지 못하는 단점을 동시에 지니고 있다. 이러한 이유로 임상, 생물반응공정, 식품, 환경감시, 농업 분야에 상업적으로 적용된 예는 거의 없는 실정이다(Velasco-Garcia 등, 2003). 현재 SIRE(sensors with injectable recognition elements), MEMS(microelectromechanical system), μTAS (micro total analysis

system) 등과 같은 센서 성능 향상을 위한 많은 연구들이 진행되고 있다(Vijayakumar, 1998).

FIA(flow injection analysis)는 연속적인 흐름을 유지하는 완충용액 중에 시료와 반응물을 투입하여 분석을 행하는 방식으로 Ruzicka와 Hansen(1975)에 의해 처음으로 소개되었다. FIA는 기존의 분석 방법에 비해 시료 샘플링 회수를 높일 수 있고, 반응 시간을 단축시킬 수 있으며, 다양한 대상물 측정에 적용이 가능한 등의 이점이 있어 공정 분석에 적합한 방식으로 인식되고 있다(Vijayakumar, 1998).

이 연구는 자동 샘플링 기구(microdialysis probe)를 사용하여 반응 공정 중 특정 물질의 농도를 실시간으로 측정할 수 있도록 고안된 μFIAS(microdialysis coupled flow injection amperometric sensor)를 이용하여 식품의 포도당 농도 측정 성능을 평가하고자 수행되었다.

## 2. 센서 측정 원리

### 가. 자동 샘플링

This article was submitted for publication in April 2003; reviewed and approved for publication by editorial board of KSAM in September 2003. The authors are D. B. Song, Assistant Professor, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University and Joseph Irudayaraj, Associate Professor, Department of Agricultural & Biological Engineering, The Penn State University. The corresponding author is D. B. Song, Assistant Professor, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea. e-mail : dbsong@nongae.gsu.ac.kr

공정이 연속적으로 진행되는 가운데 분석 물질의 농도를 연속적으로 측정하기 위해서는 공정 중에 시료를 연속적으로 채취할 수 있는 적절한 샘플링 장치가 필요하다. 이 연구에서는 의료용으로 사용되는 microdialysis probe를 샘플링 장치로 사용하였다. Fig. 1은 microdialysis probe를 사용한 샘플링 장치의 개략도를 나타낸 것이다. 샘플용액에 microdialysis probe를 담근 후 완충용액의 공급을 중단하면 probe 안쪽의 완충용액과 바깥쪽의 샘플용액간의 포도당 농도 차이에 의한 삼투작용으로 샘플용액 중의 포도당은 probe 안쪽으로 이동하여 probe 내부는 포도당으로 증만하게 되고 이와 동시에 probe 내의 완충용액은 샘플용액으로 이동된다. 삼투작용에 의해 probe 내부로 완전히 이동된 포도당은 펌프로부터 probe 아랫부분으로 공급되는 완충용액에 의해 probe 밖으로 배출된다. 이와 같이 완충용액의 공급, 정지, 재공급의 반복 과정으로 일정량의 포도당 샘플링이 가능하도록 장치를 구성하였다.

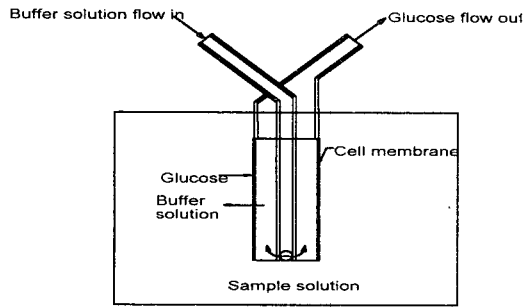


Fig. 1 Schematic diagram of the auto-sampler.

나. 포도당 농도 측정

포도당은 효소와 반응하여 gluconic acid와 과산화수소수를 생성한다. 이 때 생성된 과산화수소수를 백금을 촉매제로 사용하여 전기-화학적 방법으로 산화시키면 전자를 방출하게 된다. 이렇게 방출된 전자 수

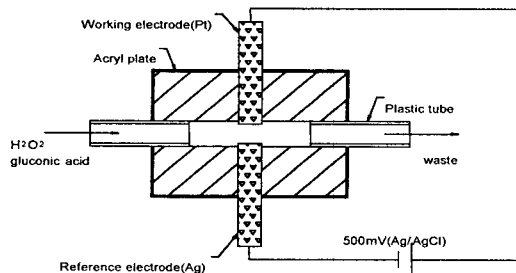
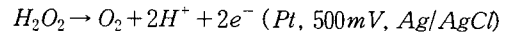
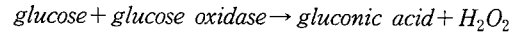


Fig. 2 Schematic diagram of the electrochemical cell.

는 포도당의 농도와 비례하기 때문에 포도당의 농도를 전류값으로 측정할 수 있다(Cass, 1990). Fig. 2는 실험에 사용된 전류값 측정을 위한 electrochemical cell의 구조도 이다.



3. 재료 및 방법

가. 실험 장치

실험에 사용된  $\mu$ FIAS는 Fig. 3과 같이 구성되었다. 펌프에 의해 토출된 완충용액은 방향조절용 인젝션 밸브로 공급된다. 인젝션 밸브의 유로 선택에 따라 microdialysis probe에 의해 샘플 용액으로부터 포도당이 완충용액 내로 유입되고 효소는 주사기를 사용하여 수동으로 완충용액으로 투입된다. 완충용액으로 투입된 포도당과 효소는 흐름 관로 안에서 반응을 일으키면서 electrochemical cell의 전극봉 사이를 통과하여 배출된다. Electrochemical cell의 전극봉에서 검출된 전류값은 전류계를 거쳐 컴퓨터로 전송되어 파일로 저장되도록 구성하였다. 실험 장치를 구성하는 각 부품의 상세한 규격은 Table 1과 같다.

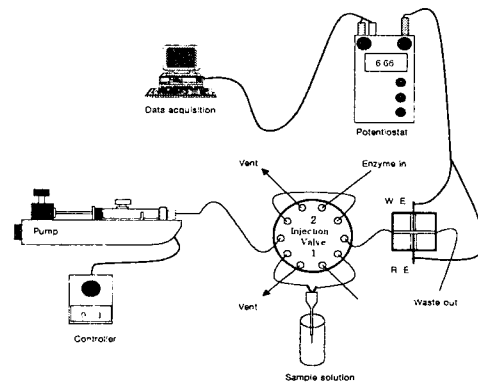


Fig. 3 Schematic representation of the  $\mu$ FIAS.

나. 실험 재료

실험에 사용된 재료의 종류 및 상세한 규격은 Table 2와 같다. 포도당(D-glucose)과 증류수를 사용하여 각 농도별로 4mL의 표준 포도당 용액을 제조하였다. Glucose oxidase와 증류수를 사용하여 0.5mg/ mL의 효소 용액을 제조하였다. Sodium phosphate(mono/dibasic), sodium chloride, 증류수를 사용하여 0.5M의 Sodium phosphate 완충용액(pH7.0, 10mM NaCl)을 제조하였다.

Table 1 Specifications of μFIAS

Component	Specification	Remarks
Syringe pump	2.5L, 25μL/min	BioAnalytical Systems, Inc.
Injection valve	10port, C22Z-3180E	Valco Instrument Co. Ins.
Sampling system	2.5μL, CMA/12	CMA/Microdialysis
Electrochemical cell	5μL	W. E.(platinum. Ø1mm) R. E.(silver coated with AgCl. Ø2mm)
Potentiostat	200nA, +500mV(Ag/AgCl). LC-3D	BioAnalytical Systems, Inc.
Data acquisition	Lab VIEW	National Instruments.

Table 2 Specifications of the experimental materials

Chemical	Specification	Remarks
Glucose oxidase	Type X-S, 245.9unit/mg	Sigma Chemical Co.
D-glucose		Mallinckrodt Baker, Inc.
Sodium phosphate	Monobasic	EM Industries, Inc.
Sodium phosphate	Dibasic	EM Industries, Inc.
Sodium chloride		EM Industries, Inc.

다. 실험 방법

(1) 센서 작동

고안된 센서는 샘플링, 효소용액 투입, 전류값 측정의 3개 과정으로 구성되어 있다. 샘플링은 Fig. 3에서 인젝션 밸브가 1의 위치로 선택된 경우로 펌프에서 토출된 완충용액은 microdialysis probe를 통과하면서 삼투 작용으로 probe 내에 흡입된 샘플 용액을 인젝션 밸브 밖으로 밀어낸다. 이 때 인젝션 밸브의 유로가 차단된 2의 위치에 주사기로 효소용액을 투입하는 작업이 동시에 이루어진다. 효소용액 투입 과정은 인젝션 밸브가 2의 위치로 선택된 경우로 펌프에서 토출된 완충용액은 샘플링 과정 중 주사기로 투입된 관로내 효소를 인젝션 밸브 밖으로 이송시키는 사이클이다. 위의 두 과정이 연속적으로 진행되면 인젝션 밸브와 electrochemical cell 사이의 관로에 포도당과 효소가 연속적으로 투입되어 반응하게 된다. 전류값 측정 과정은 인젝션 밸브를 통과한 포도당과 효소가 혼합·반응하여 생성된 과산화수소수가 electrochemical cell 내의 전극봉 사이에서 산화되어 발생하는 전류값을 측정하는 과정이다. 샘플링과 효소용액 투입 과정은 동시에 이루어지며 나머지는 전류값 측정 과정으로 이루어진다. 실험에서 완충용액의 유속은 25μL/min로 하였다. 샘플링과 효소용액 투입과정은 microdialysis probe의 체적과 유속을 감안하여 8초로 결정하였고 전류값 측정은 292초로 하여 1회 측정시간이 300초가 되도록 하였다.

(2) 농도 측정 및 성능 검증

포도당 농도를 전류값으로 환산하기 위해 7 수준(10, 20, 30, 40, 50, 60, 70mM)의 표준 포도당 용액을 사용

하여 각 샘플 농도에서 전류값을 측정하였다. 각 농도에서 5회 측정하여 평균값을 사용하였다. 센서의 성능을 검증하기 위해 시판되는 2종류 제품(Orange juice 177.4mL, Pineapple juice 177.0mL)의 포도당 농도를 센서로 측정하고, 이를 HPLC(Carbohydrate analysis I25A 10μm water 3.9×300nm)의 측정값과 비교하였다. 검증용시료의 포도당 농도를 측정한 예비 실험 결과 시료의 포도당 농도가 너무 높아 전류값 200nA를 초과하였기에 구입한 시료 전량을 500mL 비이커에 채우고 자석 교반기에서 약 30분간 균질하게 한 후, 피펫을 사용하여 1회에 1mL 씩 비이커의 5군데에서 총 10mL의 시료를 고르게 채취하였다. 채취한 시료는 증류수를 사용하여 1/20로 희석하여 실험에 사용하였다.

4. 결과 및 고찰

가. 농도 측정

각 포도당 농도에서 측정된 전류값의 평균치, 표준 편차는 Table 3과 같다. 반복간의 표준편차는 센서의 성능을 나타내는 중요한 인자로 가능한 적게 나타나는 것이 바람직하다. 이 실험에서는 농도 10mM을 제외하고는 모두 1 이상의 편차를 나타냈다. 특히 60mM에서는 4.8의 높은 편차를 보였다. 실험에서 편차가 높게 나타난 이유는 샘플링 시간의 변동에 따른 것으로 향후 측정 시스템의 자동화를 통해 개선이 가능할 것으로 판단된다. Fig. 4는 농도 10mM에서 센서의 반복 작동 상태를 나타내는 것으로 비교적 안정적인 성능을 나타내는 것을 알 수 있다. Fig. 5는 포도당 농도와 전류값의 상관관계를 나타낸 것으로 R<sup>2</sup> 0.99로 매우 높은 상관 관계를 보였다.

Table 3 Peak electric current with the glucose concentration

unit : nA

Repetition	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM	60mM	70mM
1	30.26	39.79	63.16	77.05	92.04	97.38	118.64
2	30.80	39.38	62.02	77.58	89.32	100.11	114.72
3	30.30	42.43	63.65	80.58	92.77	109.62	118.90
4	29.50	45.31	66.51	81.30	93.37	104.74	111.87
5	30.14	42.97	62.59	78.43	89.44	105.79	111.08
Mean	30.20	41.98	63.59	78.99	91.39	103.53	115.04
S. D.	0.46	2.44	1.74	1.87	1.89	4.83	3.66

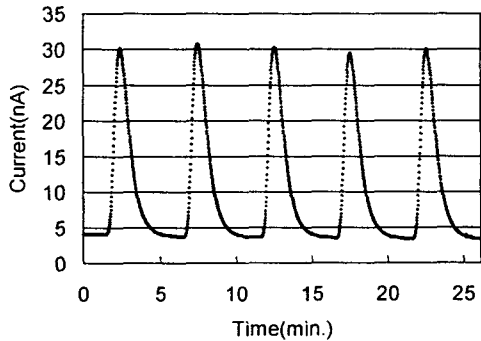


Fig. 4 Measured current of glucose solution(10 mM).

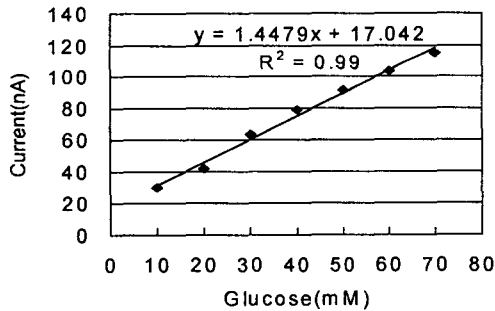


Fig. 5 Calibration of the sensor.

나. 성능 검증

센서의 성능 검증을 위해 시판되는 오렌지, 파인애플 주스의 포도당 농도를 비교한 결과는 Table 4와 같다. 실험 결과 HPLC의 측정값을 기준으로 두 제품 모두 약 12%의 오차를 나타냈다. 이처럼 비교적 큰 오차를 나타낸 이유는 제품에 포함된 고형분이 microdialysis probe의 표면 부착으로 인한 샘플량의 변화, 수동에 의한 기기 작동, 실험실 온도 변화에 의한 문제 등으로 판단된다. 따라서 이러한 문제점들을 보완한다면 공정 중 농도의 실시간 관측과 조절에 효과적으로 사용이 가능할 것으로 예상된다.

Table 4 Concentration comparison between the sensor and HPLC

Product	Sensor (g/100mL)	HPLC (g/100mL)	Error (%)
Orange juice	7.31	6.48	12.87
Pineapple juice	9.53	8.44	12.89

5. 요약 및 결론

반응 공정 중 특정 물질의 농도를 실시간으로 측정할 수 있도록 자동 샘플링 기구(Microdialysis probe)를 사용한  $\mu$ FIAS(Microdialysis coupled flow injection amperometric sensor)의 성능 검증을 위한 실험을 수행하였다. 7개 농도의 포도당 용액을 측정된 결과 반복 간 측정 전류값의 표준오차는 1 이상으로 비교적 높게 나타났으며, 포도당 농도와 전류값은  $R^2$  0.99로 매우 높은 상관관계를 보였다. 그러나 오렌지, 파인애플 주스를 사용한 센서 성능 검증 실험결과 HPLC와의 오차는 약 12%로 다소 높게 나타났다.

참고 문헌

1. Cass, A. E. G. 1990. Biosensors-A Practical Approach. Oxford University Press, New York.
2. Habermüller, K., M. Mosbach and W. Schuhmann. 2000. Electron-transfer mechanism in amperometric biosensors. Fresenius J. Anal. Chem. 366:560-568.
3. Ruzicka, J. and E. H. Hansen. 1975. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Anal. Chim. Acta, 78:145.
4. Velasco-Garcia, M. N. and T. Mottram. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. Biosystems Engineering. 84(1):1-12.
5. Vijayakumar, A. R. 1998. Amperometric Carbon Paste Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Oxidases. Ph.D. Thesis. Lund University, Sweden.
6. Wang, J. 2001. Glucose biosensors:40 years of advances and challenges. Electroanalysis 13:983-988.