

Poly(3-methylthiophene)막 위에 urease를 고정화 한 voltammetric biosensor의 특성

박성호, 박수현, 민남기, 홍석인
고려대학교

Characteristics of Voltammetric Urea Sensors Based on Poly(3-methylthiophene) film

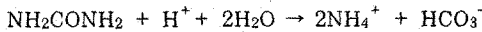
Sung Ho Park, Suh Hun Park, Nam Ki Min, Suk In Hong
Korea University

Abstract -신장병 진단의 척도로 요소의 농도는 매우 중요하다. 요소의 농도를 측정하기 위한 센서개발이 본 연구의 목적이다. 기존의 Potentiometry법은 Nernst 식이 적용된다는 가정하에 감도를 측정했다. 실험결과 전극상에서 우레아제의 요소 가수분해 반응은 Nernst식을 적용할 수 없는 비가역적인 반응으로 판단되어 센서의 감도 측정을 Linear sweep Voltammetry(LSV)법을 이용하였다. Voltammetry법은 가역적이든 비가역적이든 관계없이 Cottrell 식에 의한 전류와 농도의 직선관계로부터 감도를 측정할 수 있다는 장점이 있다. 센서 전극의 표면은 SEM으로 분석하였고, LSV 법으로 측정된 센서의 감도는 34 μA/decade 였다

면을 SEM으로 분석한 것이다. 표면이 bare 한 상태이기 때문에 전극 자체 표면에 약간의 흡착외에는 메끄러운 상태를 볼 수 있다.

1. 서 론

요소는 사람 몸속의 신장병을 측정하는 물질이다. 이런 이유에서 최근 요소 센서가 개발되고 있다. 요소는 가수분해 반응에 의해 2개의 암모늄 이온과 1개의 탄산 이온을 내 놓으며 이 반응을 측정하는 효소가 우레아제이다[1].



반응이 진행됨에 따라 pH는 증가하고 전극전위는 감소하기 때문에 그 동안 요소 농도에 따른 전극 전위변화를 감지하는 Potentiometric 요소센서에 대한 많은 연구가 있었다[2-5]. 그러나, 전극상에서 우레아제의 요소 가수분해 반응은 Nernst 식을 적용할 수 없는 비가역적인 반응으로 판단되어, 본 논문에서는 기존의 Potentiometry 법 대신 Voltammetry 법을 사용하였다. Voltammetry 법은 가역적이든 비가역적이든 관계없이 Limiting 전류가 벌크 농도에 비례한다는 Cottrell 식으로부터 감도를 측정할 수 있다.

전도성 고분자로는 3-methylthiophene(P3MT)을 사용하였다. P3MT는 PPy와 마찬가지로 전극상에 단량체가 전기적 산화에 의하여 중합되고 일반적으로 전해질 이온이 도우핑된 상태나 도우핑되지 않은 상태에서 산소, 습도, 온도에 대하여 매우 안정하다[6,7].

2. 센서 전극 제작

전극기질로는 지름 3mm의 백금 RDE tip을 사용하였다. 0.3 μm 알루미늄 파우더를 폴리싱하고 5분간 증류수에 담근 상태에서 초음파세척 후, 1M H₂SO₄용액에 담고 -0.2 ~ 1.0V의 전위영역에서 Cyclic voltammetry 법으로 전극의 특성 피크를 관찰한 다음 증류수로 세척한다. 이 전극을 작업 전극으로 사용하고 백금 wire를 상대전극, SCE를 기준전극으로 하는 3전극 시스템에서 고분자를 전기 중합한다.

그림1은 P3MT가 코팅되지 않은 상태의 백금전극 표

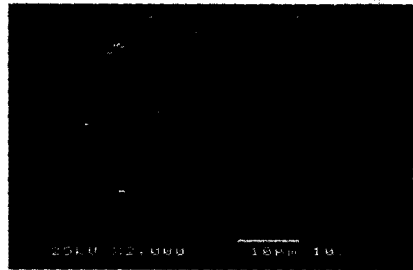


그림1. 고분자를 코팅하기 전의 백금전극 표면에 대한 SEM 이미지

바이오 센서에서는 일반적으로 PPy와 P3MT 고분자를 사용하는데 본 실험에서 P3MT를 사용하였다. CH₃CN을 용매로하여 P3MT 0.1M, 전해질로서 NaClO₄를 0.1M인 시료용액을 만들고 5분간 질소가스로 bubbling을 한 다음 Cyclic voltammetry(CV)법으로 고분자를 전기중합 한다. 이때 전위 범위는 0.5 ~ 1.6V, scan rate은 10mV/s, Cycle 수는 10회로 하였다.효소 고정화는 Chronoamperometry법으로 하였다.우레아제 0.5mg/ml용액을 시료용액으로 하여 0.6V의 전위를 900초 동안 가해서 백금 전극 상의 고분자 표면에 우레아제를 고착시킨 후 실온에서 건조시킨다. 이때의 우레아제 농도는 앞선 실험을 통해 얻은 최적화값이다. P3MT를 전극에 코팅한 후 LSV 법으로 Background 신호를 측정하고, 이어서 고분자 위에 우레아제를 입힌 다음 전극의 감도를 측정한다. 감도 측정 은 요소 농도 0.1 μM ~ 1mM까지의 영역에서 실시하였다. 사람의 정상적인 혈중 요소의 농도는 20 ~ 30 μM 정도이다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1 고분자의 전기 중합

그림 2는 전극에 P3MT를 코팅한 후 SEM으로 표면 분석을 한 것이다. P3MT가 전극 표면전체에 코팅이 된 상태인데 사진 중간에 보면 전기중합 과정에서 핵들이 뭉뚱되어 있음을 보여준다. 그림 1과 비교했을 때 roughness가 많이 증가 한 것으로 보아 고분자가 코팅 되었음이 확연히 구분된다.



(a) SEM 표면분석

그림 2. 표면에 고분자 고착 후의 백금전극 표면의 SEM 이미지효소

그림 3에서 Cycle 회수가 증가 할 수록 충전전류가 증가하는 것으로 보아 고분자가 전극표면에 계속 흡착되고 있음을 알 수 있었다. 실험과정에서 산화 전류 값이 크게 떨어질수록 고분자가 전극에 두껍게 고착됨을 관찰할 수 있었다. 또 극성용매가 약간이라도 포함되면 전기 중합이 잘 이루어지지 않았다.

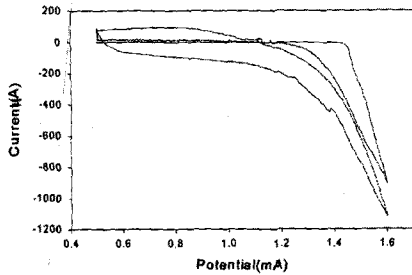


그림 3. CH₃CN 용액 속에 0.1M NaClO₄와 0.1M P3MT가 포함된 Cyclic voltammogram. 전위 범위는 -0.2~1.8V이고 scan rate은 20mV/s이다.

3.2 효소의 고착

그림 4는 P3MT위에 효소를 고착시킨 후 SEM 으로 분석한 것이다. 그림 2와 비교할 때 표면에 돌기가 많이 생긴 것을 알 수 있다. 이것은 효소 분자들이 P3MT위에 불규칙적으로 흡착되기 때문이다. 이것을 통해 고분자 위에 효소들이 코팅되었음을 간접적으로 알 수 있다.

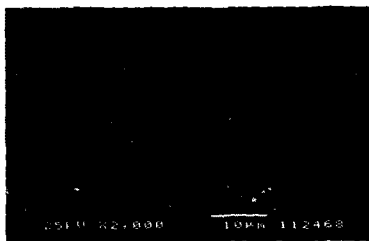


그림 4. 우레아제를 고분자 표면에 고착시킨 후 백금전극표면에 대한 SEM 이미지

그림 5는 Chronoamperometry법으로 효소를 고분자 표면에 고착 할 때의 시간에 따른 전류 변화를 보여주는 그래프이다.

시료 용액은 우레아제 농도가 5mg/ml인 1mM phosphate buffer 용액이다. 반응 초기에 매우 큰 값을 보이던 산화전류는 depletion 효과에 의해 시간에 따라 감소한다. 이것은 전극표면으로부터 우레아제의 농도 기울기가 시간에 따라 점점 작아지기 때문이다. 그리고, 최대 산화전류값이 클수록 센서 전극의 감도가 증가하는 것으로 보아 효소가 고착되는 양이 최대 산화전류 값에 비례하는 것으로 생각된다.

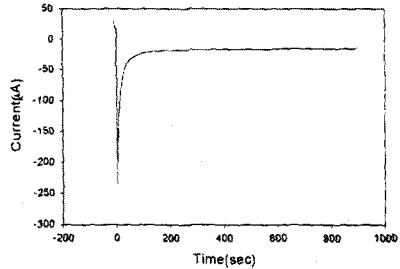


그림 5. 1mM phosphate buffer 용액속에 5mg/mL의 효소를 고착시키는 동안 시간에 따른 전류의 변화

3.3 전극의 감도

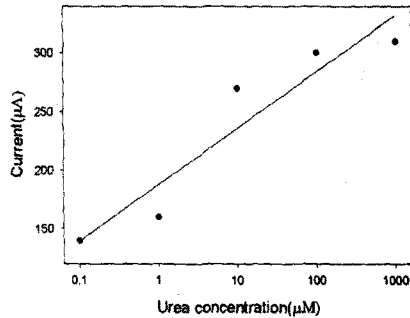


그림 6. 우레아의 농도 변화에 따른 전류의 변화

그림 6은 LSV 법에 의한 요소농도에 따른 센서전극의 감도를 나타낸 그래프이다. 요소농도 증가에 따라 Limiting 전류도 증가함을 알 수 있다. 요소농도 0.1~1000 μ M의 범위에서 감도는 34 μ A/decade로 측정되었다.

4. 결론

기존의 Potentiometric 센서는 Nernst 식이 적용될 수 있는 가역적인 전극반응이어야 가능했지만 Linear sweep voltammetric 센서는 가역적이든 비가역적이든 상관없이 모두 적용하여 감도를 측정할 수 있다는 장점이 있다. 요소 농도 0.1~1000 μ M의 영역에서 감도는 34 μ A/decade 였고 센서 전극의 표면은 SEM으로 분석하였다. 아직 감도가 그다지 크지 못하고 센서의 축소화라는 문제점이 있어서 더 많은 연구가 필요하다.

감사의 글
본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (과제번호:1999-2-307-001-3)지원으로 수행되었음.

(참 고 문 헌)

- [1] J.K.Fawcell and J.E. Scoll, Arapid and precise method for the dermination of urea,J. Clin. Pathol. 13(1960) 156-159
- [2] R. Tor and A. Freeman, New enzyme membrane for enzyme electrodes, Anal. Chem. 58(1986) 1042-1046
- [3] H. Yamato, M. Ohwa, and W. Wemet, "A Polypyrrole /Three-Enzyme Electrode for Creatinine Detection", Anal. Chem. 67, 2776-2780., 1995
- [4] D. G. Pijanowska, and W. Torbicz, "pH-ISFET based urea biosensor", *Sensors & Actuators*, 44, 370-376, 1997
- [5] T. Osaka, S. Komaba, M. Seyama, and K. Tanabe, "High-sensitibity urea sensor based on the composite film of electroinactive polypyrrole with polyion complex", *Sensors & Actuators*, 35-36, 463-469, 1996
- [6] J. Wang and R. Li, "Highly stable voltammetric measurements of phenolic compounds at poly(3-methylthiophene)-coated glassy carbon electrodes", *Analytical Chemistry*, 61, 2809, 1989
- [7] H. B. Mark et al, "The electrochemistry of neurotransmitters at conducting organic polymer electrode: electrocatalysis and analytical applications", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38, 229, 1995