2001년도 대한전기학회 하계학술대회 논문집 2001.7.18-20

전도성 고분자를 이용한 요소 측정용 반도체 바이오센서의 특성

박성호, 진준형, 민남기, 홍석인
고려대학교

Characteristics of Conducting Polymer-based Urea Sensors with Planar Pt Electrode on Silicon Substrate

Sung Ho Park. Joon Hyung Jin. Nam-Ki Min. Suk-In Hong
Korea university

Abstract - 신장병 진단에 중요한 요소의 농도를 측정하기 위한 요소 센서를 반도체 위에 개발이 연구의 목적이다. 센서의 감도 측정은 선형 전위 주사법(Linear sweep voltammtry)을 이용하였다. 선형 전위 주사법은 가역적이든 비가역적이든 관계없이 cottrell 식에 의한 전류와 농도의 직선관계로부터 감도를 측정할 수 있는 장점이 있고 또한 저 농도에서 민감하게 반응한다. 따라서 기존 전위차 측정형 바이오 센서(Potentiometric biosensor)에서 규명할 수 없는 감도 문제를 선형 전위 주사법으로 규명하고자 하였다. 센서전극은 p-type 실리콘 웨이퍼 위에 전극을 제작했다. 그 위에 cyclic voltammetry 법을 사용하여 전도성 고분자를 전기 중합하였고, 그위에 다시 chronoamperometry법을 사용하여 우레아제를 고정화 하여 작업전극으로 제작하였다. 센서의 감도는 phosphate buffer 용액(pH7.4)속에서 온도 35℃를 유지하며 측정하였다.

1. 서 론

신장병의 조기 진단을 위해 체내 요소 농도의 정확한 측정은 매우 중요하며, 이런 이유에서 최근 다양한 요소 센서가 개발되고 있다. 요소는 가수분해 반응에 의해 2개의 암모늄 이온과 1개의 탄산 이온을 내 놓으며 이 반응을 촉매하는 효소가 urease이고, 화학반응식은 다음과 같다[1].

$$NH_2CONH_2 + H^- + 2H_2O \rightarrow 2NH_4^+ + HCO_3^-$$

반응이 진행됨에 따라 pH는 증가하고 전극전위는 감소하므로 전극 전위의 변화를 측정하여 요소의 농도를 결정 할 수 있다[2-5]. 그러나 체내 요소 농도의 정상치가 수 mM에 불과하므로 본 논문에서는 전위차 측정형 바이오 센서(Potentiometric biosensor) 보다 높은 감도를 기대할 수 있는 선형 전위 주사법(Linear sweep voltammtry)을 이용한 요소 센서의 감도 측정법을 고안 하였다.

선형 전위 주사법은 전극 반응의 가역성에 의존하지 않으며, Limiting 전류를 측정함으로서 용액내의 요소의 농도를 Cottrell 식으로부터 구할 수 있다.

효소의 고정화와 감도 향상을 위해 2가지 종류의 전도성 고분자, 즉 3-methylthiophene(P3MT)과 polypyrrol(PPy)을 사용하였다. 산화적 전기 중합법(anodical electropolymerization)으로 각 단량체로부터 고분자를 합성 하였으며, 일반적으로 P3MT가 PPy보다 전해질 이온이 도우핑된 상태나 도우핑되지 않은 상태 모두에서 산소, 습도, 온도에 대하여 매우 안정하며, 감도 향상 효과도 우수하다[6].

2. 실 험

2.1 센서 전극 제작과 감도 측정

센서전극은 실리콘웨이퍼 위에 제작되었고, p-type 산화실리콘 위에 티타늄(200Å)과 백금(1000Å)을 박막공정을 통해 작업전극을 제작하였다. 작업전극을 1M H_2SO_4용액에 담그고 -0.2 ~ 1.0V의 전위영역에서 Cyclic voltammetry 법으로 백금전극의 특성 피크를 관찰한 다음 증류수로 세척한다.

이 전극을 작업 전극으로 사용하고 백금 wire를 상대전극, SCE를 기준전극으로 하는 3전극 시스템에서 전도성 고분자를 중합한다. 이때 사용된 전도성 고분자는 PPy와 P3MT를 사용하였다. P3MT는 물에 잘 녹지않는 특성 때문에 CH_3CN을 용매로 하였고 전해질로서 $NaClO_4$를 0.1M, P3MT 0.1M로 시료용액을 만들었고 PPy는 2차 증류수를 용매로 전해질은 KNO_3 0.1M, PPy 0.2M로 시료용액을 만들었다. 5분간 질소가스로 bubbling을 한 후 Cyclic voltammetry(CV)법으로 고분자를 전기중합 한다. CV법은 고분자 중합에 가장 보편적인 방법으로 Scan rate과 Cycle 수를 조절하여 고분자의 두께를 조절할 수 있는 장점이 있다. 고분자 중합 전위 범위는 P3MT는 0.5 ~ 1.6V이고, PPy는 0~0.8V로 중합전위를 설정하였다. Scan rate은 10mV/s, Cycle 수는 10회로 하였다.

효소 고정화는 전기 화학적인 방법으로 시간에 따라 일정한 전위를 가하여 효소와 고분자를 공유결합 시켰다. 이때 효소 0.5mg/ml용액을 시료용액으로 하여 0.6V의 전위를 900초 동안 가해서 백금 전극 상의 고분자 표면에 우레아제를 고착시킨 후 실온에서 건조시킨다. P3MT와 PPy를 전극에 코팅한 후 선형전위 주사법(LSV)으로 Background 신호를 측정하고, 이어서 고분자 위에 urease를 입힌 다음 전극의 감도를 측정한다. 감도 측정은 요소 농도 0.1μM ~ 10mM까지의 영역에서 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 전극의 표면 분석

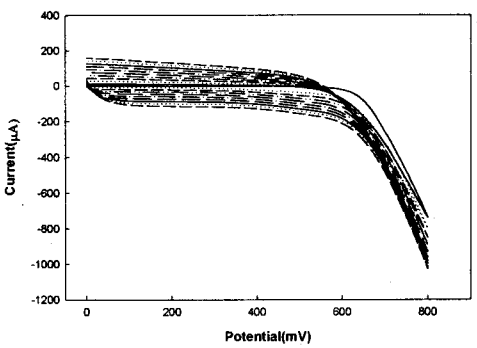

그림 1 수용액 속에서의 PPy의 전기 중합 CV diagram (scan rate 10mV/s)

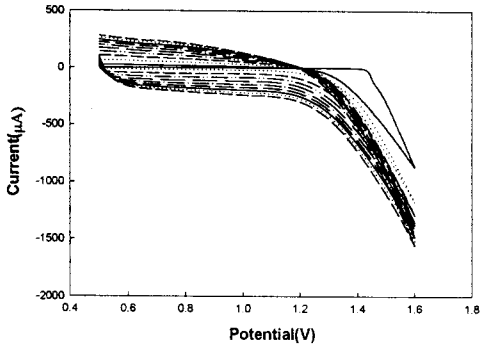

그림 2 수용액 속에서의 P3MT의 전기 중합 CV diagram (scan rate 10mV/s)

그림 1과 2에서 Cycle 회수가 증가 할 수록 충전전류가 증가하는 것으로 보아 고분자가 전극표면에 계속 흡착되고 있음을 알 수 있다. 두 전도성 고분자는 중합되는 전위의 범위가 다름을 볼 수 있는데 P3MT의 경우 0.5~1.6V이고 PPy의 경우 0~0.8V로 P3MT의 중합전위범위가 더 높다. 또한 산화전류값도 P3MT는 -1.6mA 까지 떨어지고 PPy는 -1.1mA 까지 떨어짐을 관찰 할 수 있는데 이는 두 Voltammogram을 비교해 볼 때 PPy가 중합조건이 더 낮은 조건에서 중합될 수 있음을 확인 할 수 있다. 또한 P3MT의 경우 극성용매가 약간이라도 포함되면 전기중합이 잘 이루어지지 않았는데 P3MT가 극성용매에 잘 용해되지 않는 특성 때문에 극성용매가 포함될 경우 고분자 중합이 간섭을 받기 때문이다.

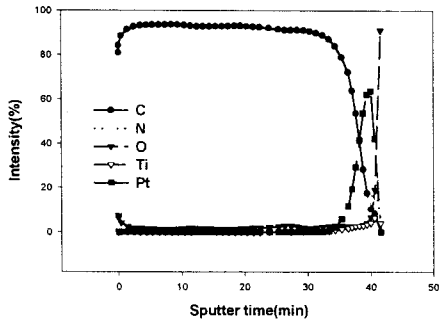

그림 3 AES를 이용한 전극 표면의 depth profile

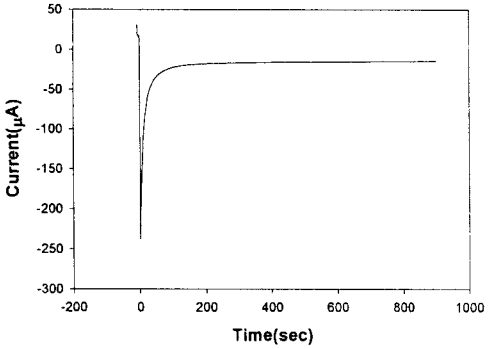

그림 4 phosphate buffer 용액(pH7.4)속 효소를 고착시키는 동안 시간에 따른 전류의 변화

그림 3은 센서 전극의 표면부터 산화 실리콘까지의 Depth profile 이다. Sputter time이 초기일때는 탄소가 가장 intensity가 높지만 32분부터 탄소의 양은 급격히 감소하고 티타늄과 백금의 양이 증가한다. 41분부터는 산화 실리콘의 영향으로 산소의 양이 급격히 증가함을 보인다. 위의 그림을 통해 센서 표면부터 순차적인 성분분석 결과를 보고 작업전극의 고분자 중합 상태와 박막 전극 상태를 확인 할 수 있다.

그림 4는 Chronoamperometry법으로 효소를 고분자 표면에 고착 할 때의 시간에 따른 전류 변화를 보여주는 그래프이다. 시료 용액은 urease 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 산화 전류값에 비례하는 것을 알 수 있다.

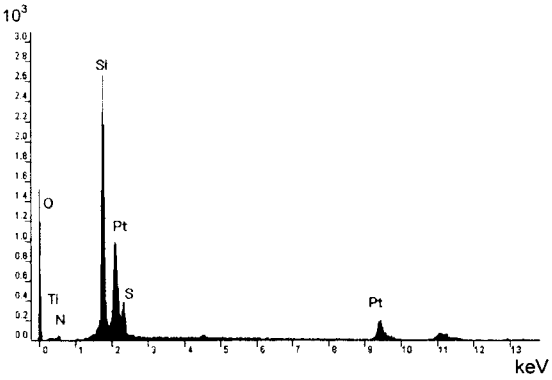

그림 5 P3MT에 효소를 고정화한 전극표면의 EDX 스펙트럼 분석

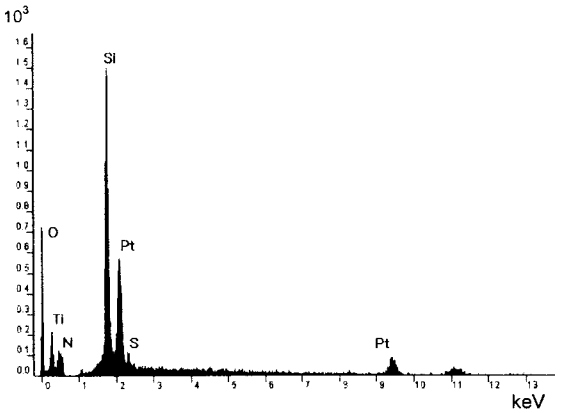

그림 6 PPy에 효소를 고정화한 전극표면의 EDX 스펙트럼 분석

그림 5와 6은 센서 전극 표면을 EDX로 분석한 것이다. 성분 분석결과 Si, Pt, C, N, S 순으로 함유량이 분석되었고 PPy보다는 P3MT에서 황의 함유량이 더 높은 것으로 나타났다. 탄소는 효소의 구성성분이기도 하지만 고분자의 구성물질이기 때문에 탄소만으론 효소의 유무를 알 수 없다. 그러나 효소를 구성하고 있는 아미

노기에 포함되어 있는 질소와 황 성분에 의해 전도성 고분자 표면에 효소가 고착되었음을 간접적으로 알 수 있다.

3.2 전극의 감도 측정

전극의 감도 측정은 선형 전위 주사법을 이용하였다. 전위차 측정법은 가역적이든 비가역적이든 관계없이 cottrell 식에 의한 전류와 농도의 직선관계로부터 감도를 측정할 수 있는 장점이 있고 또한 저 농도에서 민감하게 반응한다는 장점을 가지고 있다.

$$i(t) = \frac{nFAD_O^{1/2}C_O^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \qquad (1)$$

(1)식에서 F는 Faraday 상수(96485C/mol), A는 전극 면적, Do는 전극 표면에서 산화되는 화학종의 확산계수이다. 위의 식에서 limiting 전류가 산화되는 화학종Co*의 벌크농도와 비례하는 관계를 통해 감도를 측정할 수 있다.

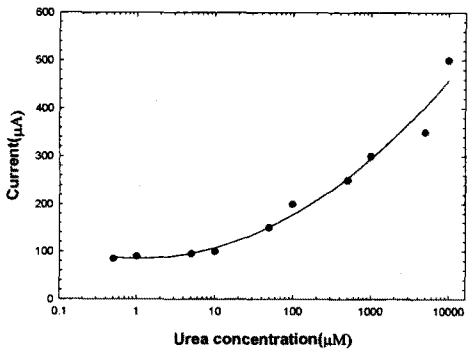

그림 7 PPy 표면에 효소를 고정화한 센서의 효소 농도 변화에 따른 전위의 변화

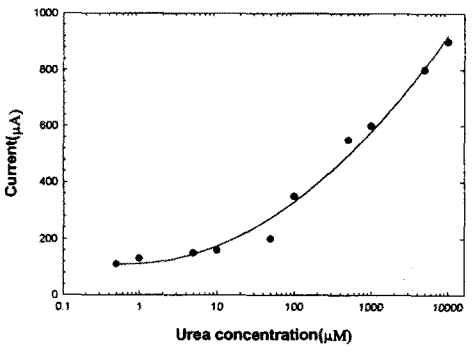

그림 8 P3MT의 표면에 효소를 고정화한 센서의 효소 농도 변화에 따른 전위의 변화

그림 7과 8에서 PPy와 P3MT 모두 처음 감도가 나타나기 시작하는 전류값은 PPy의 경우 80μA에서 감도가 측정되기 시작하고 P3MT는 120μA에서 감도가 나타나기 시작한다. 요소의 농도가 커질수록 P3MT의 감도 측정값이 더 커짐을 알 수 있다. 요소의 농도가 10mM이 되면 PPy에서는 500μA정도의 감도값이 측정되는데 비해 P3MT는 910μA까지 감도값이 두배정도 크게 측정된다. PPy를 사용한 센서의 감도는 42μA/decade이고, P3MT를 사용한 센서의 감도는 89μA/decade 였다.따라서 P3MT에 효소를 고정화 한 센서의 감도가 PPy에 효소를 고정화 한 센서보다 감도가 훨씬 뛰어남을 알 수 있다.

4. 결 론

실리콘 웨이퍼 상에 전도성 고분자를 이용하여 urease를 고정화한 요소 측정용 반도체 바이오 센서를 제작하였다. 선형 전위 주사법을 이용함으로써 요소 농도가 저농도 일때에도 고감도를 유지하도록 하였으며, 전도성 고분자로서 P3MT가 PPy보다 안정적이며 우수한 감도를 보였다. 요소 농도 범위를 0.1μM~10mM까지 변화시켜 가며 센서의 감도를 측정한 결과 P3MT의 경우는 42μA/decade, PPy의 경우는 89μA/decade의 감도를 얻었다. 또한, 본 연구에서 사용한 고분자 전기 중합법은 센서 전극이 마이크로화 되는 경우 특정 전극에 선택적으로 고분자와 효소를 코팅하는데 매우 유용한 방법이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

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

[참 고 문 헌]

[1] 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

[2] A. Senillou, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier, A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonum based urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip , Talanta, 50, 219-226, 1999

[3] C. Eggenstein, M. Borchardt, C. Diekmann, A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer , Biosensors & Bioelectronics, 14, 33-41, 1999

[4] C. Puig-Lleixa, C. Jimenez, J. Alonso, Polyurethane- acrylate photocurable polymeric membrane for ion-sensitive field-effect transistor based urea biosensors , Analytica Chimica Acta, 389, 179-188, 1999

[5] M. J. Schoning, A. Kurowski, M. Thust, Capacitive microsensors for biochemical sensing based on porous silicon technology , Sensors and Actuators, B64, 59-64, 2000

[6] A. P. Soldatkin, V. Volotovsky, A.V. Elskaya, N. Jafferzic- Renault, Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers , Analytica Chimica Acta, 403, 25-29, 2000