

소형화된 glucose 센서 제작 및 전기 화학적 특성 분석

윤 동 화, 양 정 훈, 진 준 형, 민 남 기, \*홍 석 인

Development of miniaturized glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on polypyrrole-ferricyanide films on platinum electrodes

Dong-Hwa Yun, Jung-Hoon Yang, Joon-Hyung Jin, Nam-Ki Min, \*Suk-In Hong

**Abstract** - 본 논문은 당뇨병의 지표물질인 glucose의 농도를 극미량의 시료를 사용하여 정량 할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 효소 고정화 전극을 제작하였다. 전극은 실리콘 웨이퍼상에 마이크로 크기의 전극을 반도체 공정을 이용하여 제작하였고, 전기 화학적 방법으로 마이크로 전극에 전도성 고분자 polypyrrole(PPy) 및 glucose oxidase (GOx)를 고정화한 고감도의 전기화학 전극을 개발하였다.

도전성 고분자의 전기 화학적 중합은 순환 전압 전류법으로 하였으며, 용액의 액성에 따른 효소의 표면 전하를 이용하여, 도전성 고분자를 코팅한 전극에 일정한 전압을 인가하고 GOx를 도우핑 하였다. 제작된 전극은 시간대 전류법으로 glucose의 농도에 따른 감도 측정결과 마이크로 리터의 시료에 5  $\mu$ A/decade를 얻었다. 전극의 표면분석은 Scanning electron microscopy(SEM), Energy dispersive X-ray spectroscopy(EDX)를 이용하였다.

1. 서 론

체액을 통한 혈액검사의 지표물질(예: 신장기능-urea, 당 뇨-glucose, 고지혈증-cholesterol 등)의 수치는 각종 성인 병과의 밀접한 연관성을 가지고 있으며, 또한 이러한 지표 물질들의 신속하고 정확한 측정은 각종 질병의 진행상황 판단에 매우 중요하다. 지난 10년간 glucose 센서에 대한 연구가 활발히 진행되어왔다.[1] 그러나 지금 까지 개발된 센서들의 많은 문제점들을 개선하기 위해 보다 정확하고 정밀한 glucose 센서의 개발이 필요한 실정이다. 본 논문에서는 반도체 공정을 이용하여 백금 전극을 제작하고 glucose에 선택적 특성을 갖는 효소전극을 제조할 목적으로, 전자 전달 매개체인 ferricyanide(FCN)와 pyrrole을 이용하여 PPy 필름을 성장시키고 GOx를 고정화한 효소전극을 제조하였다.

효소전극은 생화학적 반응에 아울러 전기 화학적 반응을 수반한다. 그러므로 전극의 표면 부에 효소의 안정적인 고정 화와 전기 화학적으로 활성인 전극/효소의 복합체가 요구된다.[2]

도전성 고분자는  $\pi$  전자로 인하여, 본질적으로 전기 화학적 활성을 가지고 있으며, 효소의 고정화에 있어서 물리적인 고착뿐만 아니라 고분자 사슬과 효소간에 정전 상호작용이 발생하여 전자수수 등 전기 화학적 coupling을 유지하게 된다.[3]

도전성 고분자로 PPy를 이용하는 효소전극의 경우, 전기 화학적 중합법에 있어서 지지전해질로 KCl을 사용하는 연구가 많다. 지지전해질로 KCl을 사용하여 합성한 PPy는 전기 화학적 산화환원 반응에 있어서 산화포텐셜이 비교적 높고, 반응 속도상수가 충분히 빠르지 않다. 그러므로 고분자 내의 전자의 호핑에는 어느 정도 장벽이 존재하게 되는데, 이것은 효소전극의 전류응답 특성에도 영향을 미치게 된다.[4] 또한 전기 화학적 중합법으로 합성고 동시에 효소를 고정화하기 때문에 크기가 작고 빠른 지지전해질의 음이온과 크고 느린 효소가 고분자 주쇄에 함께 배워하게 된다. 이 과정에서 전해 질 음이온이 우선적으로 배워하게 되며, 일반적으로 알려진 바와 같이 작은 크기의 도펀트는 고분자의 배향성을 저해하

고, 또한 효소의 배위과정이 열세하게 되어 효소전극으로서의 특성을 저하시킨다.[5] 따라서 우리는 PPy의 산화 포텐셜을 낮추고 효소전극의 생화학적 반응속도를 개선하며, glucose에 대한 전류응답 속도 향상을 도모하기 위하여 비교적 크기가 큰 FCN을 지지전해질로 하여 GOx/PPy 전극을 제조하였다.

2. 본 론

2.1 실험

2.1.1 시약 및 기기

본 실험에 사용된 glucose oxidase(GOx, EC 1.1.3.4, Type II-S, 500,000 units/g, from Aspergillus niger)와  $\beta$ -D(+)-glucose는 Sigma사(St. Louis, Mo, USA)의 제품이고, pyrrole (MW, 67.09)은 Acros사의 제품이다. Potassium ferricyanide(Red prussiate, MW, 329.25)는 Daejung사의 제품이며, 이외의 여러 가지 물질이나 완충용액 등은 특급시약등급이나 분석시약등급에 준하는 시약을 사용하였으며, 용액의 제조에는 탈 이온수(저항 18.2 M $\Omega$ ·cm)를 사용하였다.

순환 전압 전류법, 시간대 전류법 등의 전기 화학 실험은 Potentiostat/Galvanostat (Model VMP Multi-Potentiostat, USA) PerkinElmer사의 제품을 이용하여 수행하였으며, 상대 전극은 백금 코일 전극을 이용하였으며, 기준 전극은 Saturated Calomel Electrode (SCE, Z112115) Aldrich사의 제품을 사용하였다. 탈 이온화한 증류수의 제조에는 Milli-Q water system을 썼고, 모든 실험은 25 $\pm$ 0.2°C에서 수행하였다.

2.1.2 Glucose 센서의 제작

센서의 기판으로 SiO<sub>2</sub> 절연층이 성장된 n-type (100) 4-인치 실리콘 웨이퍼를 이용하여, 7 $\times$ 8mm<sup>2</sup>의 센서를 구현하였다.

제작 공정 단계는 다음과 같다.

- (1) 실리콘 웨이퍼를 Photolithography 공정을 이용하여 패터닝 한다.
- (2) RF sputter를 이용하여 Ti/Pt를 각각 200 Å/2000 Å 증착 한다. Ti는 중간층의 역할을 하며, 그 역할은 Pt와 절연층 간의 접합을 향상시키기 위한 것이다.
- (3) Ti/Pt가 증착된 웨이퍼를 lift-off 공정 한 후 Ag를 RF sputter를 이용하여 2000 Å를 증착 한다.
- (4) Ag를 증착 한 후 Ag/AgCl 기준 전극을 형성하기 위해 2% FeCl<sub>3</sub> 용액으로 염화처리 시킨 후 100°C 30분 동안 건조시킨다.
- (5) 작업 전극을 0.1mol/l의 pyrrole과 0.1mol/l의 FCN 수용액상에서 전기 화학적 중합으로 코팅한다.
- (6)코팅된 작업 전극을 시간대 전류법으로 GOx를 고정화 한다.

2.2 결과 및 고찰

2.2.1 Pyrrole의 전기 화학적 중합

그림 1과 2는 고분자 필름의 성장을 보여주는 순환 전압

전류 곡선으로 0 V 에서 0.8 V 사이의 전압을 인가하고 기준 전극으로 SCE를 사용하여 얻은 곡선이다. 그림 1은 지지전해질로 KCl을 사용한 것이며, 그림 2는 지지전해질로 FCN을 사용한 것이다. 두 그래프 모두 cycle이 증가할수록 전극 표면 위에 도입되는 PPy/FCN 필름의 두께는 두꺼워지며, 전극의 표면적도 따라서 커지기 때문에 피크 전류 값은 증가한다. 그러나 그림에 나타나는 바와 같이 KCl을 사용한 전극의 경우에는 산화, 환원 피크가 관찰되지 않으며, mediator를 사용한 전극은 FCN에 대해 가역적인 전기 화학적 성질을 나타내었다.

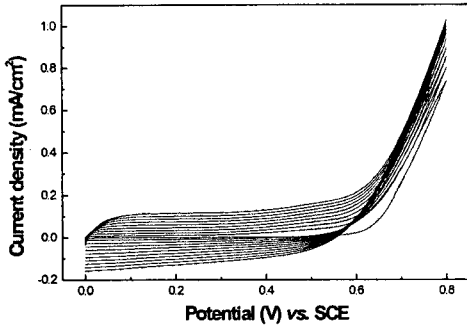


그림 1. 수용액에서의 pyrrole의 전기 화학적 중합 반응에 대한 순환 전압 전류 곡선(0.1M KCl, 0.1M pyrrole)

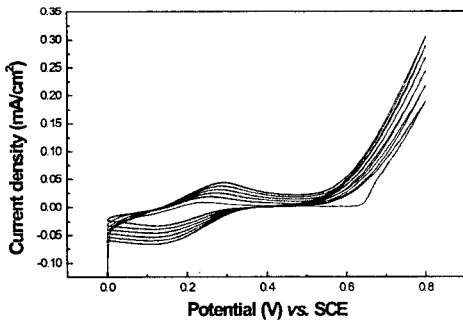


그림 2. 수용액에서의 pyrrole의 전기 화학적 중합 반응에 대한 순환 전압 전류 곡선(0.1M FCN, 0.1M pyrrole)

### 2.2.2 GOx의 고정화

그림 3은 PPy/FCN 필름 위에 효소의 고정화에 따른 시간대 전류법으로 0.6 V의 일정 전압 하에 5 mg/ml의 GOx를 포함하는 1mmol/l의 phosphate buffer solution(pH 7.4)에서 수행되었다. 이 경우 양의 값을 가지는 전압을 인가하면 음극 전류가 PPy/FCN 전극에서 흐르게 되며 산화형의 효소는 안정화된다. 전류의 감소가 점점 커짐에 따라 depletion 효과가 나타나는 것을 볼 수 있으며, 이것은 효소가 PPy/FCN 필름에 흡착된다는 것을 보여준다.

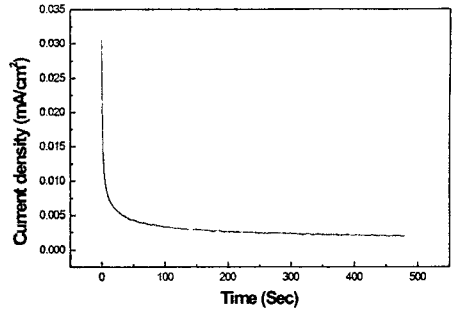


그림 3. 일정 전압 (0.6 V vs. SCE) 하에서 GOx의 전기 화학적 흡착에 대한 시간 의존 전류 곡선 (5mg/ml GOx, 1mM phosphate buffer solution)

### 2.2.3 감도 측정

그림 4는 0.6 V의 일정한 전압을 인가한 후 서로 다른 양(1, 3, 5, 7, 9 mmol/l)의 glucose를 첨가 한 후 각각의 전류 곡선을 나타내고 있다. glucose 농도를 증가시키에 따라 전류의 값도 증가하고 있음을 볼수 있다.

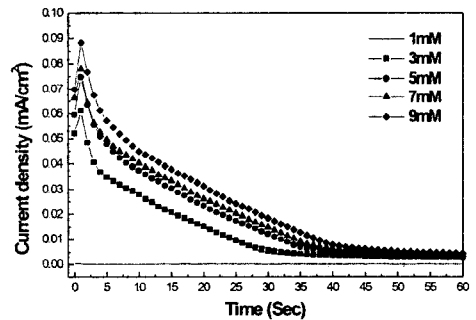


그림 4. 일정 전압(0.6 V) 하에 시간에 대한 glucose의 농도에 따른 전류의 변화

### 2.2.4 Glucose 센서의 microscopy 고찰

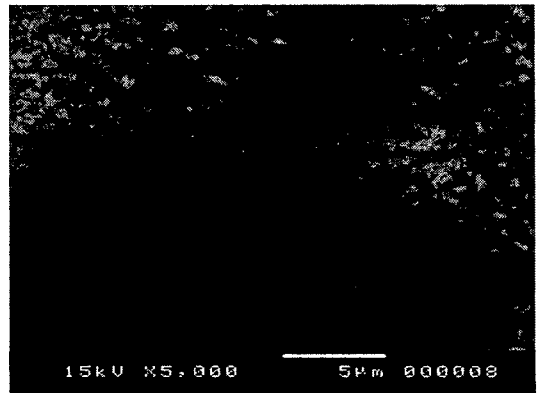


그림 5. Ag/AgCl 박막 기준 전극의 SEM 이미지

Ag/AgCl 기준전극과 효소가 고정화된 PPy/FCN 필름과 백금 상대 전극의 표면은 SEM으로 관찰하였으며, EDX spectroscopy를 이용하여 성분 분석을 하였다.

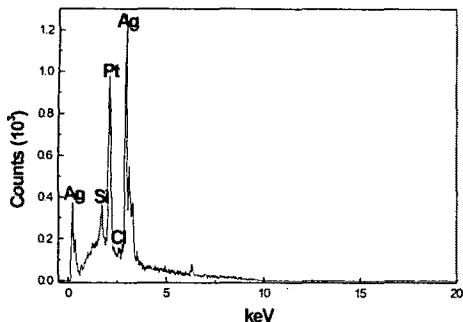


그림 6. Ag/AgCl 박막 기준 전극의 EDX 스펙트럼

그림 5는 기준전극의 표면을 SEM을 사용하여 표면을 관찰한 것이며, 그림 6에서 보이는 피크들은 은 박막 기준전극 표면에 염화처리되어있는 것을 보여준다.

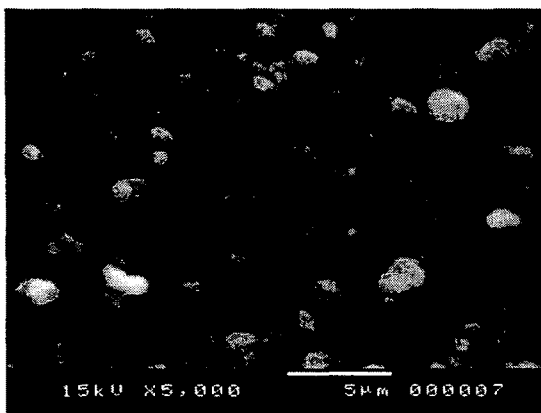


그림 7. 효소가 고정화된 PPy/FCN 작업 전극의 SEM 이미지

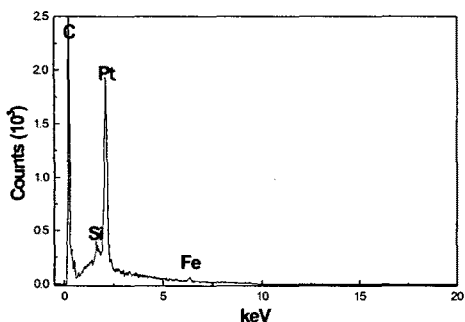


그림 8. 효소가 고정화된 PPy/FCN 작업 전극의 EDX 스펙트럼

그림 7은 작업전극의 표면을 SEM으로 관찰한 것이며, 그림 8에서 효소에 의한 탄소와 mediator에 의한 철 피크가 나타나고 있음을 보여주고 있다. 그림 9와 10은 각각 백금 상대전극에 대한 SEM 이미지와 EDX 스펙트럼이다.

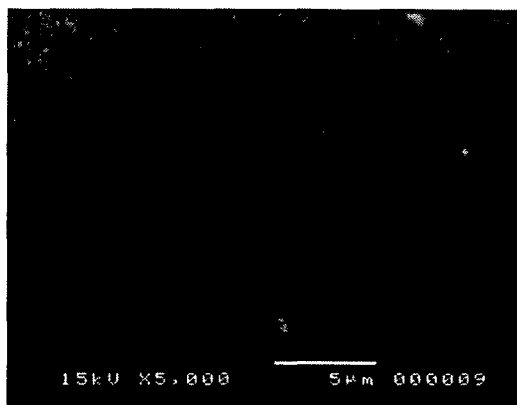


그림 9. 백금 상대 전극의 SEM 이미지

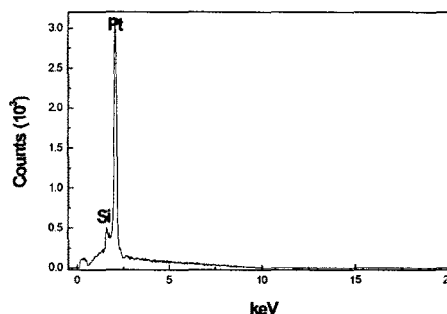


그림 10. 백금 상대 전극의 EDX 스펙트럼

### 3. 결 론

본 연구에서는 반도체 공정을 이용한 미세 패턴의 마이크로 전극을 제작하고 전기 화학적 방법을 이용한 전도성 고분자 필름 성장 및 효소 고정화 기술로 glucose 센서를 제작하였다. 제작된 전극은 1 mmol/l에서 9 mmol/l까지의 극미량의 시료에서도 감도가 뛰어나며, 제작된 센서에서 서로 다른 농도의 glucose에 대한 실험 결과에 따라 전극 표면에서 발생하는 mA 크기의 전류는 glucose의 농도 변화에 비례하는 것을 알 수 있었다. 반도체 공정으로 제작된 소형화 센서들은 glucose 뿐만 아니라 여러 가지 생체 지표 물질을 한번에 검출할 수 있는 다중 센서의 제작에도 큰 역할을 할 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 단독 기초연구(과제번호 01-PJ1-PG3-31400-0083) 지원으로 수행되었음.

### (참 고 문 헌)

- (1) B. Harrison, "A Comparison of Statistical Techniques to Evaluate the Performance of the Glucometer EliteR Blood Glucose Meter", *Clin. Biochem.*, 29, 521, 1996.
- (2) G. F. Khan, "Design of a stable charge transfer complex electrode for a third-generation amperometric glucose sensor", *Anal. Chem.*, 68, 2939, 1996.
- (3) N. C. Floud, "Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymer", *Anal. Chem.*, 60, 2473, 1988.
- (4) N. C. Floud, "Enzyme entrapment in electrically conducting polymers", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 82, 1289, 1986.
- (5) N. Motta, A. R. Guadalupe, "Activated carbon paste electrodes for biosensors", *Anal. Chem.*, 66, 566, 1994.