

실리콘 공정으로 제작된 콜레스테롤 센서의 전극 표면적이 따른 감도 특성

송민정, 윤동화, 진준형, 민남기, 홍석인
고려대학교

Sensitivity dependence on the effective surface area for cholesterol biosensor fabricated by silanization process

M. J. Song, D. H. Yoon, J. H. Jin, N. K. Min, S. I. Hong
Korea University

Abstract - 센서의 소형화 되는 추세에 전극 면적은 sensitivity의 중요한 요인이다. 본 연구에서는 콜레스테롤을 측정하기 위해 각각 planar 전극과 porous 전극에 효소 고정화 방법으로 covalent binding인 silanization 공정을 이용하여 전극 면적에 따른 전기화학적 감도를 비교하였다. Randles-Sevcik equation을 이용하여 전극 면적을 구한 결과 planar 전극의 경우 0.1608 cm^2 , porous 전극의 경우 0.5054 cm^2 로 porous 전극 면적이 planar 전극에 비해 약 3.1배 증가하였다. 또, planar 센서의 sensitivity는 $0.08567 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 이고 porous 센서의 sensitivity는 planar sensor에 비해 약 3.1배 증가한 $0.2656 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 였다. 따라서 porous sensor의 sensitivity의 증가는 전극 면적의 증가에 따른 것이라고 할 수 있다.

1. 서 론

콜레스테롤은 모든 세포의 필수 요소로, 우리 몸 세포들과 혈액 속에 존재한다. 이 물질은 적정치 ($\leq 5.2 \text{ mM}$)를 넘어서면 여러 가지 합병증을 야기할 수 있다. 따라서 콜레스테롤을 검출하는 것은 건강을 유지하는데 있어 매우 중요하다.

최근에는 센서의 소형·집약적인 기술들이 요구되고 있다. 센서 사이즈가 점점 작아지면서 낮은 sensitivity가 문제점으로 야기되고 있다. 이런 문제점을 해결하고자 여러 효소 고정화 방법들을 이용하는 연구가 진행되고 있으며, 근본적인 문제 해결책으로 전극 면적을 증가시키기 위한 연구도 진행 중이다. 본 연구에서는 porous 구조를 이용하여 전극 면적을 증가시키고 그 전극 면적을 계산하여 전극 면적 증가와 sensitivity의 증가의 관계를 보고자 한다.

2. 실 험

2.1 실험 재료

전기화학적 기기는 IBM PC에 연결된 VMP Multi-Potentiostat (Bio-Logic Science Instruments, France)로 구성된다. 모든 전기화학적 실험은 Teflon 재질의 전기화학 cell에서 이루어진다. working electrode는 Pt disk를 사용하고, counter electrode로서 Pt wire는 Metrohm Ltd. (Herisau, Switzerland)로부터 구입했다. reference electrode로 SCE를 사용하였다. Streptomyces sp.로부터 얻어진 cholesterol oxidase (ChOx, E.C. 1.1.3.6)와 cholesterol (C-8667)은 Sigma Chemical Co.로부터 구매되었다. Triton X-100은 Merk로부터 얻었다. 모든 다른 시약들은 analytical reagent-grade를 사용한다. Cholesterol은 물에 녹지 않으므로 2-propanol이나 Triton X-100을 첨가하여 균일한 용액으로 만든다. 0.1M stock cholesterol solution은 1.0% (m/v) Triton X-100을 포함하는 0.05M phosphate buffer (pH 7.0)에서 만든다. 이 용액은 어두운 4°C에 저장하고 10~15일 동안 안정하다. Potassium ferricyanide와 Potassium

chloride는 덱산 순약으로부터 각각 Gr과 EP 등급으로 구입하였다. Glutaraldehyde 용액은 Kanto Chemical Co.에서, Potassium dichromate는 Junsei Chemical Co.에서 각각 구입했다. potassium phosphate buffer solution을 제조하기 위해 potassium phosphate, dibasic (K2HPO4) 와 potassium phosphate, monobasic (KH2PO4)는 Yakuri Pure Chemicals Co.에서, 97% aminopropyltriethoxysilane (APTES)는 Lancaster에서 얻었다.

2.2 센서 제작

Planar sensor와 porous sensor 제작 시 모두 p-type (100, 14~17 $\Omega \cdot \text{cm}$) silicon wafer를 사용한다.

최적의 sputtering 조건은 Ti 200Å, Pt 2000Å이다. metal 증착 후 전극은 hot plate를 이용하여 120°C에서 2시간 동안 anneal을 해준다. porous sensor의 경우에 macroporous silicon 층은 금속 증착 전에 anodic etching 공정에 의해서 생성되어진다. 이 때 etching solution은 $\text{HCl:C}_2\text{H}_5\text{OH:H}_2\text{O}$ 으로 이루어진다.

Anodization time은 40분 정도이며, current density는 -6 mA/cm^2 이다. 254 nm의 UV 빛을 사용하였을 때 Porous silicon 층의 photoluminescence (PL)의 특성 피크는 610 nm 파장에서 관찰되어진다. 다양한 박막의 표면 분석을 위해 SEM (Hitachi, S-4700 FE-SEM, Korea basic science institute, Seoul branch)을 사용하였다.

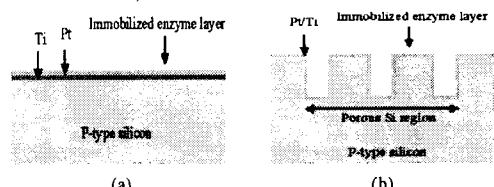


Fig 1. Schematic of the planar (a) and the porous (b) structures.

2.2.1 효소 고정화법

그림 2는 cholesterol oxidase가 고정화되어진 Pt electrode를 제작하는 과정이다. Pt disc electrode (지름 1 cm)는 15% nitric acid에 5% potassium dichromate solution의 혼합 solution에 의해 80°C에서 2시간 동안 산화되어지고 중류수로 rinse 후 N_2 gas로 건조시킨다. 이렇게 산화시킨 전극을 2% APTES aqueous solution 37°C에서 1시간 동안 처리하여 다시 중류수로 rinse 후 N_2 gas로 건조시킨다. silane 층의 안정성을 강화시키기 위해 120°C 오븐에서 30분 동안 넣어둔다. silanized electrode는 25% glutaraldehyde solution의 증기에 1시간 동안 노출시킨다. 이 glutaldehyde activated electrode 역시 중류수로 헹궈주고 N_2 gas로 건조시킨다. 마지막 단계로 위의 공정을 통해 얻어진 전극을 10 U/ml cholesterol oxidase solution에 하루 동안 담구어 효소를 고정화시킨다. 이 phosphate buffer solution을 이용하여 약하게 결합되어진 효소나 잔존하는

monomers을 제거해준다. Cyclic voltammograms를 이용하여 전극의 특성 피크를 관찰하였다. 이 때 scan range은 0.0~0.7 V (vs. SCE)이고, scan rate 50 mV/s이다.

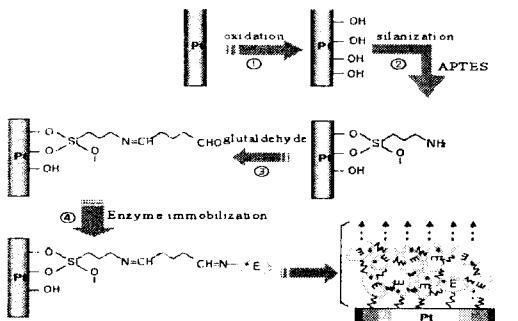
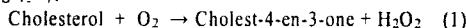


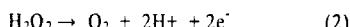
Fig. 2 Schematic representation of preparing cholesterol oxidase immobilized Pt electrode

2.3 Cholesterol 검출

Cholesterol을 검출하는 biosensor는 cholesterol oxidase를 촉매로 cholesterol이 산화되어 4-cholesteneone를, O₂가 환원되어 H₂O₂를 생산한다. 이 때 생성된 H₂O₂의 양으로 다음에 반응식물에 따라 cholesterol의 양을 결정한다.



생산된 H₂O₂는 enzyme electrode에서 amperometric current method에 의해 감지된다.



Cholesterol의 amperometric detection은 +0.7 V (vs. SCE)의 potential에서 행하여졌다. 이는 효소 반응 시 생성된 H₂O₂를 전기화학적으로 산화시키고 이 때 발생되는 전자가 Pt 전극 표면에 이동함으로써 이를 current로 감지하는 것이다. 본 연구에서는 cholesterol 농도별로 100s 동안 측정하였다.

2.4 전극 표면적 계산

Screen-printed Pt electrode의 active surface area를 결정하기 위해 cyclic voltammograms를 ferricyanide/ferrocyanide redox couple의 mixed solution에서 행하였다. 이 때, Pt 층착된 각각의 planar electrode와 porous electrode는 working electrode로 사용되었다. 각각의 working electrode를 이용하여 10 mM ferricyanide를 포함하는 3 M KCl solution에서 0.0 ~ +0.6 V 범위로 scan rate를 달리하여 cyclic voltammogram를 측정하였다. 전극면적과 중차 두께의 관계를 알아보기 위해 중차 두께(Pt 두께 1000 Å, 2000 Å, 3000 Å, 4000 Å)를 달리하여 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

3 결 론

3.1 porous silicon 표면 morphology

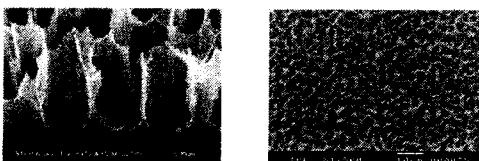


Fig. 3. SEM images of the porous silicon layer : (a) tilted view, (b) top view. About 2 μm diameter and 5 μm depth pores are formed in 40 minutes. Current density is 6 mA/cm².

Porous sensor의 경우 표면적은 planar sensor에 비해 두드러지게 증가한다. 이는 측정 시그널을 증가시킬 뿐

만 아니라 porous surface의 한쪽에 biosensitive materials를 보호하는 역할을 한다.

그림 3은 anodic etching에 의해 만들어진 porous silicon layer의 scanning electron micrographs (SEM)이다. 위에서 본 사진인 (b)에서 어두운 부분은 평균 지름 2 μm 의 pore를 가진 etch spot을 나타낸다 그림 1-(a)에서 보듯이 pore depth는 약 5 μm 정도이다.

3.2 planar sensor와 porous sensor의 전기화학적 특성
플라스테롤은 물에 녹지 않는 성질이 있어 알콜이나 비온성 계면활성제인 Triton X-100을 phosphate buffer에 첨가하여 용액을 만들어야 한다. 이 때, 계면활성제의 양이 3% (m/v) 이상일 경우에는 enzyme의 활성을 저해시키게 되고, 5% (m/v) 이상일 경우에는 cholesterol molecules 주위에 dense micelle들을 형성하게 되어 substrate의 효소 산화에 방해를 하게 된다.

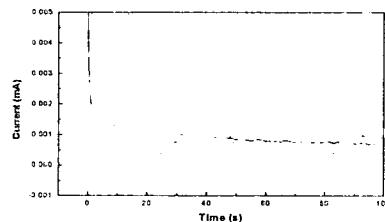


Fig. 4 Chronoamperograms of a planar silicon electrode in a phosphate buffer solution at 0.7V vs. SCE. (a) 90mM, (b) 60mM, (c) 30mM, (d) 10mM cholesterol solution

정상인의 경우 cholesterol의 적정치는 100 mL의 혈액에 200 mg 이하 ($\leq 5.2 \text{ mM}$)이다. 혈중 cholesterol 농도가 6.2 mM 이상의 경우는 여러 가지 질병들을 야기할 수 있는 위험 수준이다. 따라서, cholesterol 검출을 위한 센서는 0 mg/dL ~ 800 mg/dL ($\approx 20 \text{ mM}$) 내에서 선형성을 보이는 것이 적절하다 할 수 있다. 그림 4는 planar sensor에서 0.05 M phosphate buffer solution에 농도별로 cholesterol을 넣고 0.7 V (vs. SCE)의 일정한 potential을 가해 측정한 결과이다. 이 경우 10 mM ~ 100 mM cholesterol만이 측정할 수 있었다. 그 10 mM 이하의 농도에서는 noise가 심할 뿐 감도가 좋지 않았다.

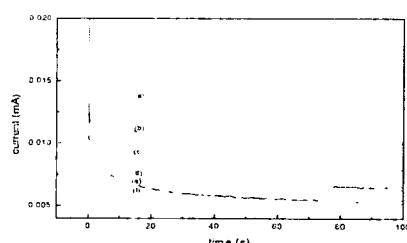


Fig. 5 Chronoamperograms of a porous silicon electrode in a phosphate buffer solution at 0.7V vs. SCE. (a) 50mM, (b) 30mM, (c) 10mM, (d) 6mM, (e) 3mM, (f) 1mM cholesterol solution

그림 5은 porous sensor에서 위와 동일한 조건에서 실험 후 얻은 결과이다. signal noise는 planar sensor에 비해 상대적으로 매우 낮고 저농도에서도 noise 없이 좋은 감도를 얻을 수 있었다.

그림 6은 cholesterol sensor의 결과적인 calibration

curve를 나타내었다. Current는 cholesterol 농도에 선형적으로 비례한다. planar sensor의 측정 sensitivity는 ca. $0.0857 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ (correlation coefficient $r=0.975$)이고, porous sensor의 sensitivity는 ca. $0.2656 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ (correlation coefficient $r=0.998$)였다. 즉, porous sensor의 sensitivity가 planar sensor에 비해 약 3.1배 증가되었다. 이 결과에서 보듯이, porous sensor를 이용했을 경우 sensitivity의 증가 뿐만 아니라 저농도에서도 좋은 감도를 얻을 수 있다.

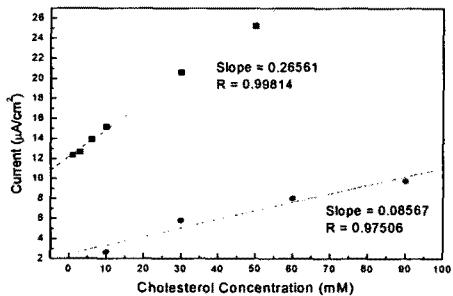


Fig. 6. Calibration curves of the cholesterol sensors. Sensitivity of the planar silicon electrode is ca. $0.0857 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ and that of the porous silicon electrode is ca. $0.2656 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$.

Screen-printed Pt electrode의 전극면적을 계산하기 위해 ferricyanide/ferrocyanide redox couple을 사용하여 여러 scan rate 하에서 CV를 측정하였다. 그럼 7와 9은 planar sensor와 porous sensor 각각의 CV diagram을 보여준다. 각각의 scan rate에 관계되는 peak current (i_p)는 그림 8과 10에 계산하여 plot하였다. 다음 식에서 보듯이, scan rate의 제곱은 peak current에 비례한다.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0^{1/2} v^{1/2}$$

이 식이 Randles-Sevcik equation이다.

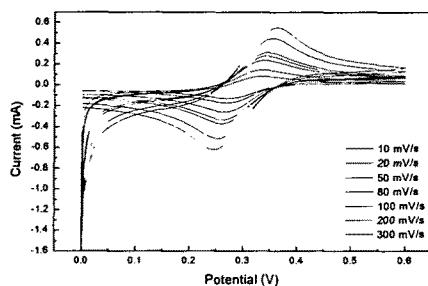


Fig. 7. CV diameters of Pt-deposited electrodes based on planar silicon substrates in 3M KCl solution containing 10mM ferricyanide at different scan rates; 10, 20, 50, 80, 100, 200 and 300 mV/s.

그림 8와 10에서 기울기가 peak current와 제곱근 scan rate의 비이다. planar sensor에서 slope은 0.03777 (correlation coefficient $r=0.9994$)로, 계산되어진 전극 면적은 0.1608 cm^2 였다.

Porous sensor에서의 slope은 0.11851 (correlation coefficient $r=0.999$)로, 전극면적은 0.5054 cm^2 였다. 즉, porous sensor의 전극면적이 planar sensor에 비해 약 3.1배 증가되었다. 결과적으로 porous sensor에서의 sensitivity 증가는 전극의 표면적의 증가에 의한 것이라

는 것을 알 수 있다.

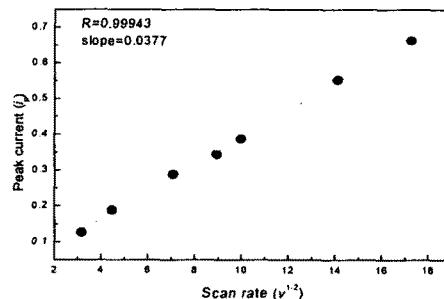


Fig. 8. the Randles-Sevcik's plot for planar based Pt thin film electrode

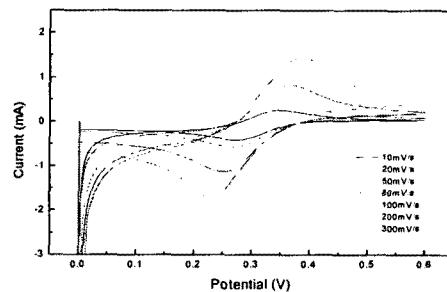


Fig. 9. CV diameters of Pt-deposited electrodes based on porous silicon substrates in 3M KCl solution containing 10mM ferricyanide at different scan rates; 10, 20, 50, 80, 100, 200 and 300 mV/s.

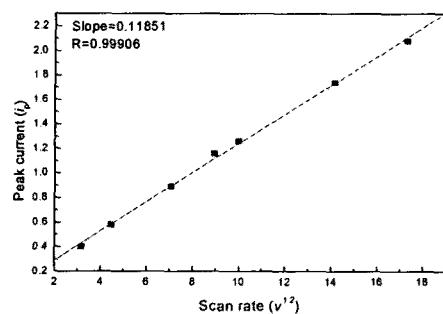


Fig. 10. the Randles-Sevcik's plot for planar based Pt thin film electrode

[참 고 문 헌]

- [1] De Quan, et. al., "Assembly of Laccase overPlatinum Oxide Surface and Application as an Amperometric Biosensor", Bull. Korean Chem. Soc., 23(3), 385-390, 2002
- [2] Thust, M., et al., "Enzyme immobilization on planar and porous silicon substrates for biosensor applications", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 7, 77-83, 1999
- [3] Gobi, K. V., et al., "Layer-by-layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol", Sensors and Actuators B, 80, 272-277, 2001