

# PVA를 이용한 Lab-on-a-chip type Glucose sensor설계 및 구현

이승로\*, 김기열\*, 이영태, 서희돈\*  
 영남대학교\*, 안동대학교

## The implementation of Lab-on-a-chip type Glucose sensor which uses PVA and design

S. R. Lee\*, G. Y. Kim\*, Y. T. Lee, and H. D. Seo\*  
 Yeungnam University\*, Andong National University

### Abstract

본 논문에서는 혈당측정기 제작에 있어 PDMS(Su-8)를 이용하였다. 이는 일종의 고분자로서 기계적 특성이 우수하고 제작이 간단하며, 가격이 저렴하고 다른 물질과의 접합이 용이하다. 혈액의 펌핑과 믹싱을 할 수 있도록 새로운 구조체를 설계하였으며 제안된 모델의 핵심 부분인 측정전극의 제작에 필요한 기초적인 실험을 수행하였다. 측정전극의 성능향상과 제작편의성, 저가격화를 위해 효소고정화방법으로 Electrospinning(전기방사)으로 제조된 PVA nanofiber web을 이용하였으며, 이는 중합도 Pn=1700, 비누화도 98%인 공업용으로 상용화된 값싼 제품이다. 따라서 이를 이용하면 측정용 전극의 효소고정화에 있어 저가격화를 이룰 수 있을 것으로 기대된다. 고정화된 전극분석을 위해 SEM(주사전자현미경)과 NMR(핵자기공명분광계), FT-IR(적외선분광분석)장비를 사용하였다. 그리고 기존의 효소고정화법(전기중합법)과의 응답특성을 비교분석하였다.

### 1. 서론

본 논문에서는 랩온어칩형 포도당 센서의 미소유체소자(micro-fluidics device)부분을 PDMS(Su-8)를 이용하여 3차원 구조물을 제작하고 포도당 측정용 효소전극을 형성한 유리판으로 구성된 구조체를 제작하였다. 이 용액분석소자는 혈액중의 포도당 농도를 측정하며, 챔버(chamber)와 마이크로펌프(micropump), 측정용 센서(sensor)로 구성되어있다. 본 시스템에서 펌프는 정량의 혈액을 챔버 내에 주입하는 것 이외에도, 챔버 내에서 발생하는 각종 반응을 촉진시키는 역할을 한다. 사용되어진 마이크로 펌프는 진동판위에 PZT디스크를 집착하는 형태의 Mechanical펌프를 제작했다.

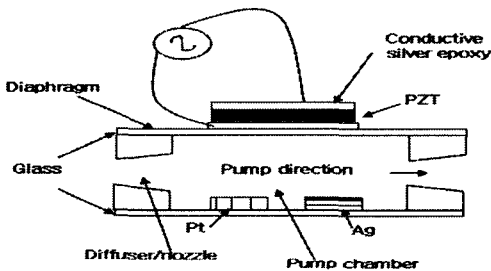


Fig 1. Lab-on-a-chip type glucose sensor

위 구조체를 제작하기위한 PDMS (Su-8)의 공정도는 Fig 2와 같고, Fig 3은 측정용 전극인 Pt(작

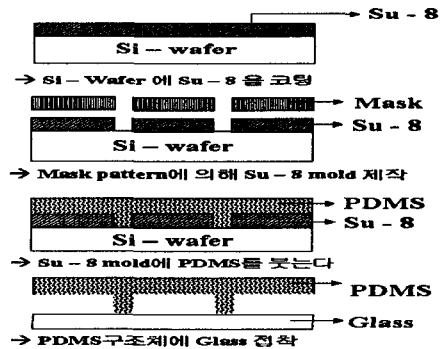


Fig 2. PDMS (Su-8)공정도  
 업전극)와 Ag(기준전극)를 Glass위에 제작한 모식도이다.

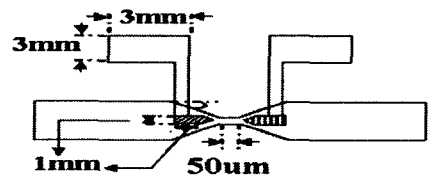
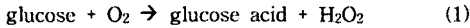


Fig 3. 측정용 전극의 모식도

포도당을 검출하는데 이용되는 포도당 산화 효소로는 Glucose oxidase(GOD)를 사용하였다. GOD는 포도당을 산화시키며 그 자신은 수소를 얻어 환원되고, 환원된 GOD는 포도당 내의 산소와 반응하여 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 발생시키고 자신은 산화 된다. 이러한 반응은 아래 식(1)과 같다.



여기서 기질은 Glucose이며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 전극활성물질이다. 아래 그림은 포도당 검출 반응과정을 도시하였다.

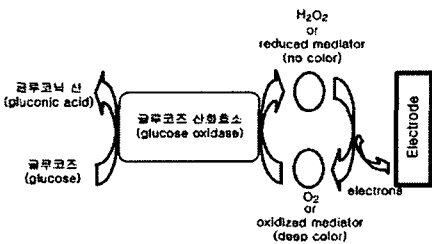


Fig 4. Glucose sensor의 원리

본 논문에서는 glucose측정용 미소 백금(Pt)전극 제작에 있어 전기 방사한 PVA nanofiber web을 사용하였다. 전기방사는 용융 또는 용매에 용해된 고분자 용액에 전기적인 힘을 사용하여 나노 섬유를 제조하는 공정이며, 표면장력에 의해 방사구에 해당하는 capillary tube끝에 매달려 있는 고분자 용액 미세방울에 고전압의 전기장을 가하게 되면, 전하가 액체표면에 유도되고 유도된 전하의 상호 반발력에 의한 힘이 표면장력과 반대방향으로 생기게 된다. 이와 같은 전기적 반발력에 의해 방사노즐 끝에 매달려 있는 고분자 용액의 미세방울은 테일러 콘(Taylor cone)으로 변형되고 전기적 반발력이 표면장력보다 강해지게 되면 전하를 띤 고분자용액 제트(jet)가 capillary에서 방출된다. 이 고분자 용액 제트는 공기 중을 날아가는 동안 용매는 휘발되고 전하를 띤 수십 ~ 수천nm 크기의 직경을 갖는 섬유가 3차원의 네트워크 구조로 적층되어 부직포 형태의 다공성 나노섬유 웹(web)을 형성하게 된다.

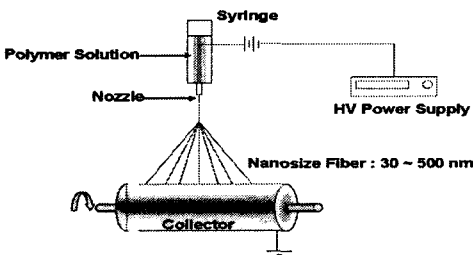


Fig 5. Electrospinning 모식도

PVA nanofiber web의 3차원 네트워크 망구조로 인해 Pt전극위의 고정화 효소를 안정적으로 고정시킬 수 있으며, PVA의 hydroxyl group과 효소의 amino group사이에 수소결합과 공유결합이 일어날 것으로 예상되고, web의 수분에 대한 높은 흡착성으로 인해 혈당측정 시 혈액의 물리적인 힘에 의해 고정화된 효소가 전극과의 결합력을 잃는 것을 방지하고 빠른 전류응답특성이 기대 되기 때문에, 본 논문에서 glucose측정 시 시료의 빠른 흡착성과 고정화 효소의 지속적인 안정성을 유지하기 위하여 고정화 효소인 GOD의 지지체로 채택하게 되었다.

## 2. 실험

### 2.1 시약 및 장비

생체적합성 고분자인 PVA[Pn(중합도)=1700, 비누화도 98%]를 3차 증류수에 10wt%로 녹여 방사하였고, 여기에 사용된 전기방사장치의 전압범위는 0 ~ 20kV이고, 집적판인 원형드럼은 100rpm까지 가능한 모터를 사용하였다. 방사에 사용된 capillary tube는 20mL의 용량으로, 튜브의 내경은 0.495mm이었다.

포도당 측정에 사용된 효소인 Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* (lyophilized powder, Type X-S, 50,000 units.g solid) sigma사 제품을 사용하였다. 분석에 사용된 표준물질은 Glucose 99.5%(GC). SigmaUltra사 제품을 사용하였다. 포도당량의 측정에는 반도체 소자 분석 장치인 EL-420을 사용하여 시간에 따른 전류변화를 측정하였다.

### 2.2 전극의 제작

작업전극(Working electrode)으로 백금(Pt)을 사용하였고, 기준전극(Reference electrode)으로 은(Ag)을 사용하였다. 전극 형성을 위해 유리플레이트위에 Mask Aliner로 Photolithograph공정 후 Sputter기로 Cr/Pt를 170Å/800Å을 증착 후 패터닝하였다. Cr은 유리판과 금속의 접착력 향상을 위해 사용하였으며, 은전극의 두께는 Cr/Ag를 170Å/1200Å 증착한 후 PR을 제거하여 lift-off법으로 형성하였다. 여기에 사용된 Photoregister는 lift-off를 용이하게 하기 위해 PDMS물질인 Su-8을 사용하였다. 기준전극을 제작하기 위해 FeCl<sub>3</sub> 용액에서 Ag를 AgCl로 변환시킨다. Ag-AgCl전극에서 AgCl은 가역적으로 Ag<sup>+</sup>와 Cl<sup>-</sup>이온이 서로 교환되기 때문에 이중층이 형성되지 않으므로 임상용 전극으로 가장 많이 사용되며 본 실험에 적용하였다.

### 2.3 PVA nanofiber web의 모세관수착(capillary sorption)을 사용한 효소 고정화방법

- ① Vial에 Pn=1700 PVA 1.0g과 3차 증류수 9.0mL를 70℃에서 2시간정도 교반시켜 완전히 녹인다.
- ② 상온으로 식힌 후 용액을 capillary tube에 넣고 전기방사기에 설치한다.
- ③ 인가전압 15kV를 가하고 집적롤러를 100rpm으로 회전시키고 집적거리를 15cm으로 하여 6시간동안 방사하여 nanofiber web을 얻는다.
- ④ Buffer solution을 만들기 위해 potassium phosphate, dibasic  $K_2HPO_4=174.18$ (분자량)과 100mL 증류수 혼합하였다.
- ⑤ potassium phosphate monobasic(potassium dihydrogen phosphate)  $K_2HPO_4=136.09$  1.36g과 100mL 증류수 혼합, ④+⑤를 혼합 후 pH 7.0으로 만든다. PPB solution pH7.0용액 완성한다.
- ⑥ GOD를 PPB solution과 v/v비로 혼합하여 0.1mg/mL, 5mg/mL의 GOD solution을 만든다.
- ⑦ Ag를 기준전극인 AgCl(염화은)으로 만들기 위해 Ferric chloride  $Fe_3Cl_6H_2O=270.30$ 을 0.025M으로 만들기 위해 증류수+X 혼합하고 산화시간은 7분 건조시간은 90℃에서 20분이었다.

⑧ 혈당측정용 Glucose는 SIGMA사 제품을 사용하였으며, 정량분석을 위해 당량비로 PPB solution과 D-(+)-Glucose와  $C_6H_{12}O_6$  180.2을 10mM, 50mM, 100mM 농도로 만들었다.

⑨ 전극위에 GOD용액을 일정량 도포 후 nanofiber web을 전극 크기와 같은 5X5 mm로 잘라 모세관수착(capillary sorption)시킨 후, 상온에서 2시간을 두어 web과 효소사이에 반응이 일어나도록 유도하였다.

아래 사진은 Electrospinner로 제작된 nanofiber web의 SEM(Scanning Electron Microscopy)사진이다. PVA nanofiber web은 고분자 체인들이 모여서 3차원 네트워크 망구조를 가진다. 또한 직경이 작아서 부피대비 표면적비가 극히 높으며, 제조된 web은 공극률이 매우 높고, 호흡성, 방풍성, 흡습성을 지니게 된다.

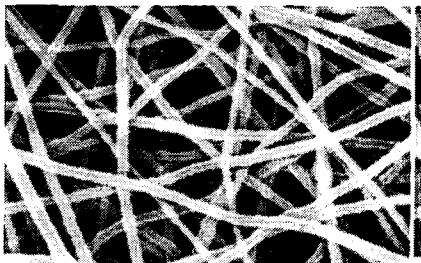


Fig 6. Pn=1700 PVA (10wt%), 15kV SEM

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 효소고정화법의 분석

Electrospinning으로 제조된 PVA nanofiber web (Pn=1700)과 GOD가 녹아있는 PPB용액과 측정전극과의 모세관 수착(capillary sorption)시킨 후 web과 효소, 그리고 전극사이의 결합을 알아보기 위해 NMR(핵자기공명분광계)를 이용하였다. 분석 tube에 PVA nanofiber web, GOD solution, 그리고 GOD가 함유된 web을  $D_2O$ (Deuterium-용매)에 녹여 비교분석하였다.

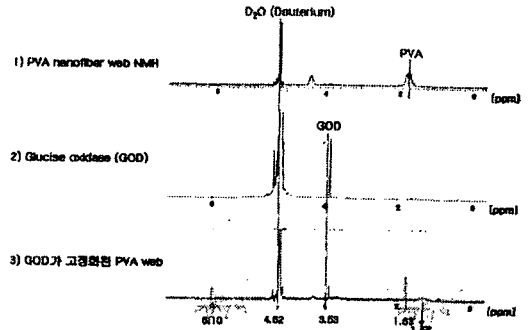


Fig 7. nano web과 GOD, GOD를 함유한 nano web의 NMR분석

위 그림의 4.62ppm에서 모두  $D_2O$ 피크가 나타나고, 1.63ppm에서 PVA 특정피크가 나타났다. 그리고, 3.53ppm에서 GOD의 특정피크가 나타났다. GOD를 함유한 web의 그래프를 보면 PVA와 GOD특정피크가 모두 나타나는 것으로 미루어 보아 PVA가 GOD를 물리적으로 가워 두고 있음을 알 수 있다.(Fig 11.참조)

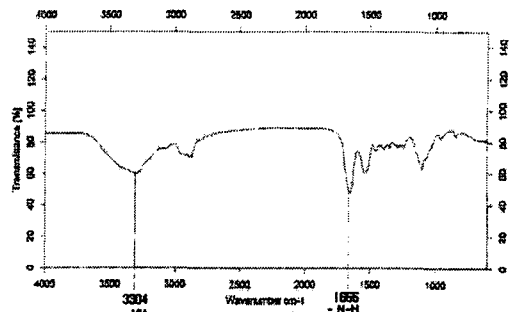


Fig 8. FT-IR로 분석한 GOD

또한, 1.63ppm에 나타났던 PVA 피크가 1.55ppm으로 이동되었고, 6.10ppm에서 새로운 피크가 나타나는 것으로 보아 PVA와 GOD사이에서 화학적 결합

(수소결합)에 의해 링 구조의 화합물이 나타남을 유추할 수 있다.

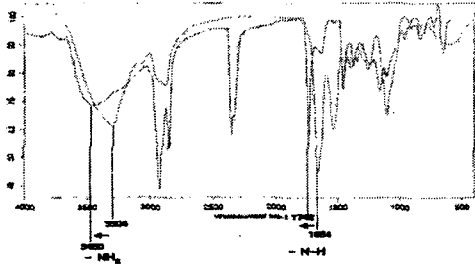


Fig 9. FT-IR로 분석한 GOD와 GOD를 함유한 nanofiber web

이를 정확하게 분석하기 위해 FT-IR(적외선분광분석)로 시료를 측정하였다.

분석결과 Fig 5.에서는 GOD에  $-NH_2$  가 들어있음을 알 수 있었으며, Fig 6.에서 GOD를 함유한 nanofiber web과 비교해보면 GOD의 작용기가 이동되었음을 알 수 있다. 이것으로 GOD의 작용기와 PVA의 작용기 사이에 화학적 결합이 일어나 링 구조의 화합물이 생성됨을 알 수 있다.

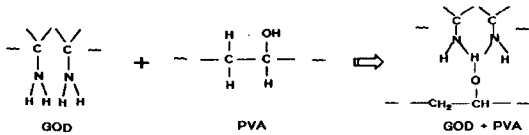


Fig 10. 화학적 결합이 일어나는 메카니즘

그리고, nanofiber web의 표면에 GOD가 물리적으로 결합이 되어있는가를 알아보기 위해 SEM(주사전자현미경)으로 web의 표면을 관찰하였다.

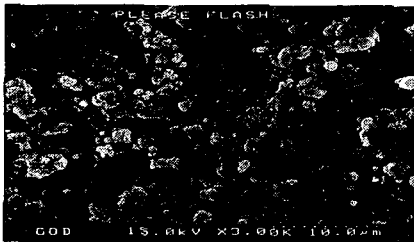


Fig 11. Pn= 1700 PVA(10%) + GOD(in PPB solution, pH=7.0 0.1M), 15kV SEM

위 SEM사진은 nano구조의 web이 GOD solution을 흡착되어 nano구조 사이에 들어가 물리적으로 잡혀있음을 볼 수 있다. 작은 점들은 GOD입을 알 수 있으며, 균일하게 효소가 고정화됨을 알 수 있다.

### 3.2 다른 효소 고정화방법과 비교분석

아래 그림은 전기중합법으로 효소를 고정화하여 포도당농도별(0mM, 10mM, 20mM, 50mM, 100mM, 200mM)로 측정된 결과이다. 효소 고정화시 GOD농도는 5mg/mL로 같게 하였고, glucose농도는 모두 100mM로 측정된 값이다. 측정 장비는EL-420을사용하였으며, 인가전압은 800mV로 두어 동일하게 비교측정 하였다.

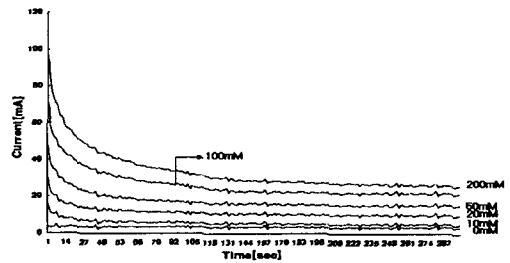


Fig 12. 전기중합법으로 효소를 전극에 고정화하여 측정된 glucose 농도에 따른 응답특성

전류곡선변화를 추이해보면 두 가지 효소 고정화방법 중 PVA nanofiber web을 이용한 것이 비교적 응답속도가 빠르고 선형적임을 볼 수 있다. 따라서 PVA nanofiber web을 이용하여 효소를 고정화하여 glucose농도에 따른 선형적인 응답특성을 아래 그림과 같이 얻을 수 있었다.

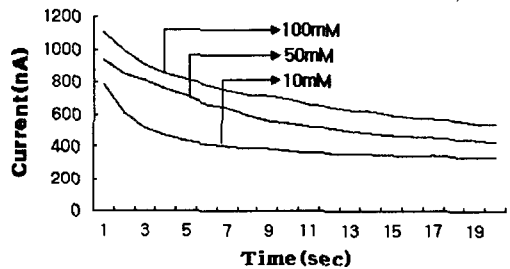


Fig 13. PVA nanofiber web을 이용해서 효소를 고정화하여 측정된 glucose 농도별 응답특성

위 그림에서 보듯이 PVA nanofiber web을 사용하면 효소가 안정적으로 고정되어 nano단위의 전류변화에도 빠른 응답특성과 선형적인 곡선이 검출됨을 볼 수 있다. 본 실험에 사용된 GOD의 농도는 아주 적은 양인 0.1mg/mL를 사용하였다.

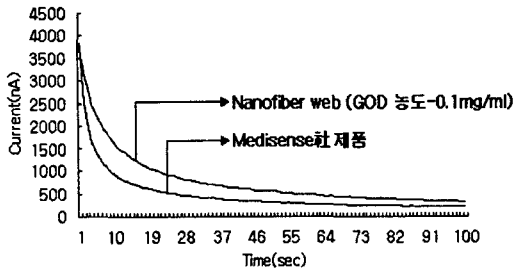


Fig14. PVA nanofiber web을 이용해서 효소를 고정화하여 glucose 0.1mM에서 측정된 응답특성과 Medisense社 제품의 응답특성 비교

위 그림은 현재 시판되고 있는 MEDISENSE社 제품과 PVA nanofiber web을 사용하여 측정된 결과이다. 비교적 높은 감도를 나타내는 것을 볼 수 있으나 응답속도에서는 약간의 차이가 있음을 알 수 있다.

#### 4. 결론

본 논문에서는 새로운 효소 고정화 방법인 PVA nanofiber web의 모세관 수착(capillary sorption)법을 사용하였으며 포도당 농도별 전류응답특성을 빠르고 선형적으로 검출 할 수 있었다. 기존의 효소 고정화방법과 비교분석해 보았으며 전기중합법으로 효소를 고정화할 시에는 동일용액에 재증합시 GOD의 농도가 감소하여 측정전극에 대한 고정화 효소량의 재현성에 문제가 있고, 줄-겔법을 사용할 경우에는 전극표면 뿐만 아니라 겔이 두꺼워질수록 반응하지 않고 낭비되는 GOD가 존재하므로 대량 생산시 부적합하다. 따라서, 본 논문에서 새로이 적용한 PVA nanofiber web의 모세관수착(capillary sorption)법을 적용하면 값비싼 GOD의 낭비요인을 막을 수 있고 web이 효소 고정화 지지체로서 충분한 역할을 하며 측정용 전극으로서 선형적이며 빠른 전류응답특성을 얻을 수 있었다. 또한, 효소 고정화시 사용된 PVA는 Electrospinner(전기방사기)를 사용하여 손쉽게 제조가 가능하고 중합도1700인 PVA는 공업용으로 보급된 비교적 값싼 제품에 착안하여 본 연구에 적용하였으며, 대량 생산 시 비용절감을 기대할 수 있다. 따라서 PVA nanofiber web 효소 고정화법을 사용한 측정용 전극의 적용을 위해서 전극의 사이즈와 전극간의 설계에 관한 연구가 수반되고 마이크로 구조의 시스템 즉, Lab-on-a-chip 형 글루코스 측정용 센서로서 적은 혈액으로 빠른 흡입속도와 응답속도, 그리고 최적

측정조건을 유지해 줄 수 있는 MEMS(Micro Electro Mechanical System)기술과 결합된다면 당뇨 환자들에게 혈액채취의 고통을 줄이고, 저렴하면서도 고성능의 혈당측정기를 보급할 수 있을 것이다.

#### 참고 문헌

- [1] B. G. Kim Proceedings of the 2nd Korea MEMS Conference(2000), pp219-224
- [2] 김지수, 백금호 전극에 전착하여 제작 한 효소전극의 특성, 1996
- [3] 이영태, 서회돈 센서학회지 제 10권, 제4호, pp232-238, 2001.
- [4] 이영태, 서회돈 센서학회지 제 14권, 제1호, pp320 Micro-stereolithography 기술을 이용한 유체소자 제작에 관한 연구,2003
- [5] C.H.Choi, Preparation and Characterization high Molecular Weight Poly(vinyl alcohol) Nanofabric obtained by Electrospinning.
- [6] 이영태, 한국전기전자재료학회지, 제 14권, 제 12호, pp994-1000, 2001
- [7] Jae Hyung Park, Ki Dong Park, You Han Bae, PDMS-based polyurethanes with MPEG grafts: synthesis, characterization and platelet adhesion study
- [8] Se-Ik Park\*, Sang Beom Jun, Sejin Park, Hee Chan Kim, Sung June Kim, A New Well-shaped Micro-machined Glucose Sensor Using Cl-Plasma Treated Ag/AgCl Reference Electrode