

PVA-SbQ 고분자 물질을 이용한 ISFET 尿酸센서

崔誠文 · 金稔秀[†] · 南東茲[†] · 孫炳基[†] · 金宜渚^{*}

啓明大學校 自然科學大學 化學科

[†]慶北大學校 센서기술연구센터

(1992. 1. 21 접수)

ISFET Urea Sensor Using PVA-SbQ Polymer

Sung-Moon Choi, Chang-Soo Kim[†], Dong-Hyun Nam[†], Byung-Ki Sohn[†], and Ui-Rak Kim^{*}

Department of Chemistry, Keimyung University, Taegu 703-701, Korea

[†]Sensor Technology Research Center, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

(Received January 21, 1992)

요 약. 반도체 수소이온센서인 pH-ISFET를 제조하고, 이를 ISFET 요소센서로 이용하기 위하여 pH-ISFET의 Si₃N₄ 막 위에 요소 분해효소인 urease를 감광성 고분자 물질인 PVA-SbQ를 이용하여 고정화하였다. 제조된 센서는 빠른 응답특성과 우수한 재현성을 보였으며, 약 1~50 mg/dl의 요소농도를 정량할 수 있었다. 또한 그 임상적용을 위한 기초연구로서 혈액 중에 존재하는 여러 가지 물질들이 센서의 출력에 미치는 영향을 조사하였으며, 혈장의 요소농도를 측정하여 현재 실용되고 있는 분광광도법의 결과와 비교하였다.

ABSTRACT. An ISFET urea sensor was fabricated by immobilizing the urease using photo-sensitive polymer, poly (vinyl alcohol)-SbQ on the H⁺ sensing Si₃N₄ thin film of pH-ISFET. The sensor could determine the urea concentration in the range of 1~50 mg/dl with fast response and good repeatability. For its application to clinical analysis, the interferences of the various materials which cause inhibition in urease catalytic reactions in blood was investigated. The results of the urea measurements in blood plasma using the ISFET urea sensor were compared with these of conventional spectrophotometric method.

서 론

바이오센서(biosensor)는 여러 가지 효소, 미생물, 항체와 항원, 오르가넬라, receptor, 그리고 동·식물의 조직 등을 이용하여 생체관련물질을 감지하고, 정량하는 소자로서 의료진단, 기초과학, 식품공학, 환경오염물질의 측정과 감시, 안전방제 등의 분야에서 광범위하게 사용되고 있다.

바이오센서의 구성은 측정하고자 하는 생체관련 물질과 직접 반응하여 물리적 또는 화학적 변화를 발생시키는 생체기능성막과 이 변화를 전기신호로 변환시키는 변환기(transducer)로 구성되어 있다. 본 연구에서는 생체기능성 막으로서 효소고정화막을, 변환기로서 ISFET를 사용하였다.

ISFET(ion-sensitive field-effect transistor)¹⁻³는

ISE(ion selective electrode)⁴⁻⁶의 이온감지 특성과 MISFET(metal-insulator-semiconductor field-effect transistor)의 전장효과 원리를 결합한 반도체 이온센서로서, 1970년 Bergveld¹가 신경생리학적 측정을 위한 반도체 소자로 고안한 아래 Matsuo⁷, Janata⁸, Smith 등⁹ 많은 사람들에 의하여 꾸준한 연구발전을 거듭하였다. ISFET는 직접회로 공정기술을 활용하여 제조¹⁰되므로 소형화, 규격화 및 대량생산이 가능하며, 극소형이면서 빠른 응답속도를 갖고 있기 때문에 기존의 ISE가 적용하기 어려운 생체내의 물질을 직접 측정하기에 매우 편리한 형태의 이온센서이다. 현재는 이온센서 뿐만 아니라 효소와 미생물을 ISFET에 고정화하여 여러 가지 생체관련물질을 측정하는 ISFET 바이오센서¹¹⁻¹⁷로 그 응용

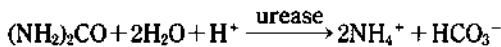
범위를 확대해 나가고 있다.

본 연구에서는 감광성 고분자물질인 poly(vinyl alcohol)-SbQ (stilbazolium group)^{18~21} 수용액에 urease를 용해하고, 광에 의한 가교화반응(photo cross-linking reaction)에 의하여 ISFET의 수소이온 감지막인 Si₃N₄ 위에 urease를 고정화하여 ISFET 요소센서를 제작하고, 그 감지 특성을 조사한 후 분광광도법으로 측정된 값과 비교 검토하였다.

이 론

ISFET 바이오센서의 원리. ISFET를 이용한 바이오센서는 Fig. 2와 같이 ISFET의 이온감지막 위에 특정 생체물질과 특이하게 반응하는 생체기능성막을 형성시킴으로서 제조된다. 이 바이오센서가 기질이 포함된 용액속에 들어가면 용액 중의 기질이 생체 기능성막과 화학적 반응을 일으켜 생성물이 생성되는데, 이것을 ISFET가 감지하여 전기적 신호로 바꾸어 준다. 그 생성물의 농도는 곧 기질의 농도에 비례하므로 ISFET 출력은 기질의 농도를 의미한다.

ISFET 요소센서의 경우, 생체 기능성막인 urease를 포함하는 효소 고정화막내로 용액내의 요소가 확산해 들어가면 다음과 같은 반응이 일어난다.



즉 수소이온 감소반응이 일어나게 되어 효소 고

정화막내의 pH값이 증가되는데 이를 바탕으로인 ISFET가 감지되어 용액내에서의 기질농도 즉 요소 농도를 검출하게 된다.

실 험

시약 및 기기. Urease(EC 3.5.1.5, from Jack Beans, 30 U/mg)와 urea; BSA(bovine serum albumin), amino acids, pyruvic acid, uric acid는 Sigma Chemical Co.제품을 그의 시약은 Aldrich, Wako 제품을 정제하지 않고 사용하였다. 또한 PVA-SbQ는 동양합성공업주식회사(Japan)에서 합성한 Spp-H-13 (PVA의 D.P(degree of polymerization)=1700, D.S (degree of saponification)=88%, SbQ 1.3 mmol% 함유)을 이용하였다.

고정화막의 두께와 막 표면의 균일성을 위하여 Spinner는 Kyowa Riken Co.(Japan)의 K-359SD-1을 이용하였으며, 광가교화반응을 위한 Mask Aligner는 Karl-Suss Co.(Germany)의 MJB55M2A를, 형성된 막의 두께 측정을 위한 α-step은 Tencor Instrument (U.S.A.)의 10-00510 alpha-step 100을 사용하였다. ISFET chip을 aluminum plate와 결선하기 위한 wire-bonder는 Xebex Co.의 ZB-202-L을 항온장치 (Thermostat)는 VWR Scientific의 VWR 1165를, pH 미터는 Orion expandable ion analyzer EA940을 사용하였으며, 측정에 이용한 기기로서 FLUKA 24 52 Datalogger, Hewlett Packard 3465A Digital Multi-meter와 Phillips Co. PM 8252A Y-t Recorder를 이용하였으며, Ag/AgCl 기준전극과 측정 회로는 자체 제작하였다.

ISFET 칩의 제조. Fig. 3은 ISFET의 제조를

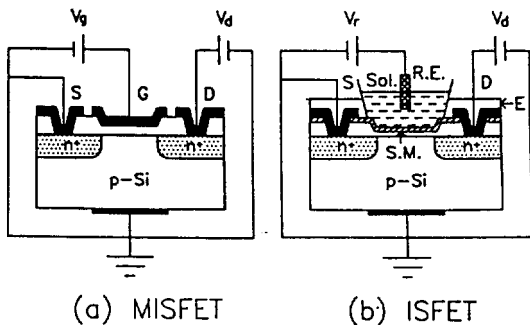


Fig. 1. Comparison of ISFET with MISFET. V_g: gate voltage, V_d: drain voltage, V_r: reference electrode voltage, S: source, G: gate, D: drain, Sol.: solution, E: encapsulant, S.M.: sensing membrane, R.E.: reference electrode, p-Si: p-type silicon wafer.

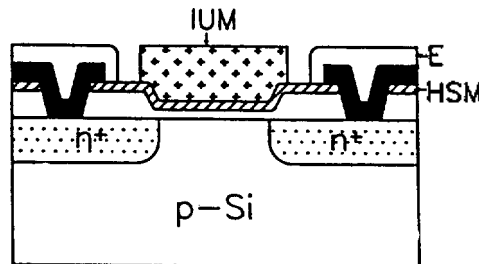


Fig. 2. Cross-sectional structure of the ISFET urea sensor. IUM: immobilized urease membrane, E: encapsulant, HSM: hydrogen ion sensing membrane.

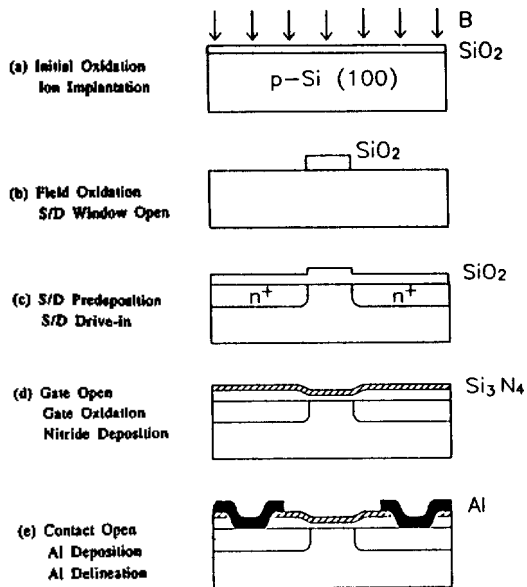


Fig. 3. Cross-sectional structure along the wafer process for ISFET.

위한 웨이퍼공정을 나타낸 것이다. 사용된 웨이퍼는 p형 실리콘이며, 저항율은 $6\sim 9\ \Omega\cdot\text{cm}$ 이고, 결정면은 (100)인 것을 이용하였다. 제조공정은 웨이퍼를 표준세척한 다음, Fig. 3의 (a)와 같이 100°C 에서 TCE(trichloroethylene) 산화법으로 약 $500\ \text{\AA}$ 의 산화막을 성장시킨 후 $100\ \text{keV}$ 의 에너지로 가속시킨 붕소이온을 $1.5\times 10^{12}\ \text{cm}^{-2}$ 양으로 주입시켰다. (b) 925°C 에서 습식산화법으로 약 $5000\ \text{\AA}$ 의 산화막을 성장시키고 소오스와 드레인 창을 열었다. (c) 900°C 에서 2분간 POCl_3 을 이용하여 인을 predeposition하고, 925°C 에서 50분간 drive-in 시켰으며, 이때의 접합깊이는 $0.89\ \mu\text{m}$ 였다. (d) 게이트 부분을 뜯은 후 1000°C 에서 TCE 산화법으로 약 $500\ \text{\AA}$ 의 게이트 절연막을 성장시키고, 1000°C 에서 $\text{N}_2:\text{O}_2:\text{TCE}=100:3:1$ 의 분위기에서 약 60분간 열처리하였다. 여기서 TCE는 산화막의 이동성 이온인 Na^+ 등을 제거하는 역할을 한다. 이 위에 수소이온 감지막으로 사용될 실리콘 질화막(Si_3N_4)을 800°C 에서 LPCVD(low pressure chemical vapour deposition)로 약 $700\ \text{\AA}$ 성장시켰다. (e) 전극형성을 위한 접촉부분을 뜯기 위해 실리콘 질화막을 플라즈마 식각한 뒤 남은 산화막은 $6:1\ \text{BHF}(6\text{H}_2\text{O}:1\ \text{buffered}$

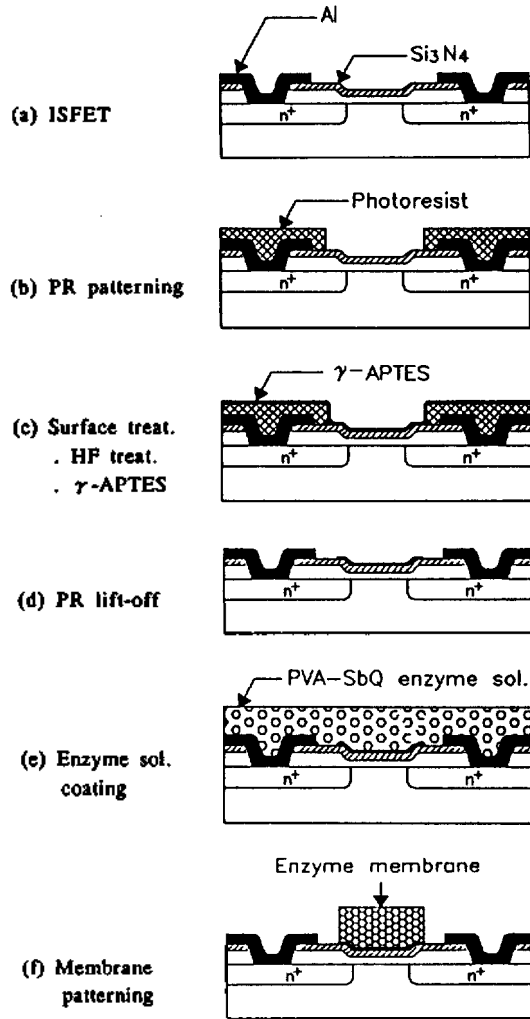


Fig. 4. Cross-sectional structure along the wafer process for PVA-SbQ enzyme membrane.

HF)로 식각하였다. 그리고 알루미늄 전극을 스퍼터링법(sputtering)으로 형성하고, 450°C 에서 30분간 열처리함으로써 웨이퍼 공정을 마쳤다. 칩의 크기는 $0.8\times 1.4\ \text{mm}$ 이고, 게이트는 $20\times 300\ \mu\text{m}$ 이다.

효소 고정화막의 형성. ISFET를 이용한 요소센서의 제조공정은 Fig. 4와 같다. (a) ISFET의 단면을 나타낸 것이다. (b) ISFET의 Si_3N_4 위에 positive PR(photoresist)을 $4500\ \text{rpm}$ 에서 40초 동안 도포한 후, 30분간 soft baking하였다. UV light로 ISFET의 게이트 부분에 35초간 노광한 후, positive PR developer를 이용하여 micro pool을 만들었다. (c) IS-

FET의 pH 감도를 증가시키기 위하여 Si_3N_4 표면을 50:1 HF 용액에 1분 동안 표면처리²²하고, Si_3N_4 표면과 효소 고정화막과의 부착성을 증대시키기 위하여 1% γ -APTES(γ -aminopropyltriethoxysilane) 용액에 15분간 dipping하였다^{16,23}. (d) 칩에 남아 있는 PR을 제거하기 위하여 acetone 용액내에서 1분 동안 초음파 세척기로 세척하였다. (e) 합성생리수(pH 7.4, 9.5 mM 인산완충용액, 이온강도=0.1652)²⁴로서 10% BSA 용액을 제조하여 이 용액 225 μl 에 10 mg의 urease와 PVA-SbQ 360 mg을 가한 후 voltex-mixer로 완전히 혼합하여, ISFET의 Si_3N_4 막 위에 3000 rpm, 40초간 spin-coating하고, 5시간 이상 진공 건조시킨 후 Mask aligner로 광가교화반응을 시켰다. (e) ISFET의 게이트 영역을 제외한 나머지 부분에 있는 효소막을 제거하기 위하여 중류수로 1분간 현상하였다. flow system에 적용하여 측정할 수 있는 소형 요소센서 프로브를 제작하기 위하여 요소센서를 alumina plate 위에 장착하고 wire-bon-

der를 이용하여 전기적 결선을 하였다. ISFET를 실리콘 고무로 게이트 부분을 제외한 나머지 부분을 용액으로부터 절연시키기 위하여 encapsulation하였다. 이를 원형 테이퍼(taper) 형태의 plastic tip에 삽입하여 epoxy로 고정하였다. Fig. 5는 제작된 요소센서 프로브의 측정단의 단면도이다. (a)는 용액 내의 전위를 일정하게 유지시키기 위하여 Ag/AgCl을 이용한 기준전극이며, (b)는 본 실험에서 이용한 ISFET 요소센서를 나타낸다. 완성된 소자를 합성생리수 용액에 담구어 4°C 냉장고에 보관 사용하였다.

측정방법. Fig. 6은 측정 시스템의 개략도를 나타낸 것이며, Fig. 7은 측정회로를 나타낸 것이다. ISFET의 I_{DS} (소오스와 드레인 사이의 전류)와 V_{DS} (소오스와 드레인 사이의 전위차)를 일정하게 고정시켜, V_{RS} (소오스에 대한 기준전극전압)의 변화분 ΔV_{RS} 를 측정하는 회로를 나타낸 것이다. 정전류원, CC1으로 I_{DS} 를 고정시키고, CC2(Ie)와 Re로 V_{DS} 를 고정시키면, 주어진 I_{DS} 와 V_{DS} 값에 의하여 V_{RS} 가 결정되어져 ISFET의 동작점이 정해진다. I_{DS} , V_{DS} 그리고 기준전극전압이 고정되어 있으므로, pH 변화에 의한 Si_3N_4 표면의 전기화학적 전위 변화분은 그대로 소오스전압의 변화분 ΔV_{RS} 가 되어, 순수한 전기화학적 전위변화분만을 검출할 수 있다. 모든 측정은 flow system을 이용하였으며, 용액의 온도는 항온조를 이용하여 인체와 같은 온도인 36°C를 유지시켰다.

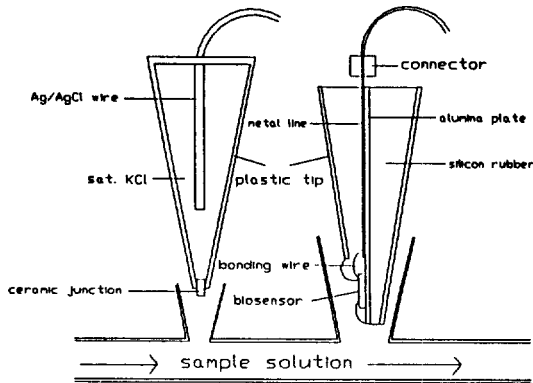


Fig. 5. Cross-sectional structure of the sensor probe and flow cell. (a) reference electrode, (b) ISFET urea sensor.

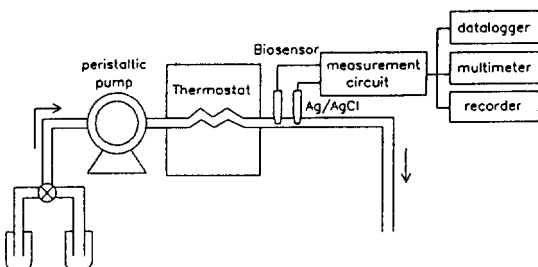


Fig. 6. Schematic diagram of measurement set.

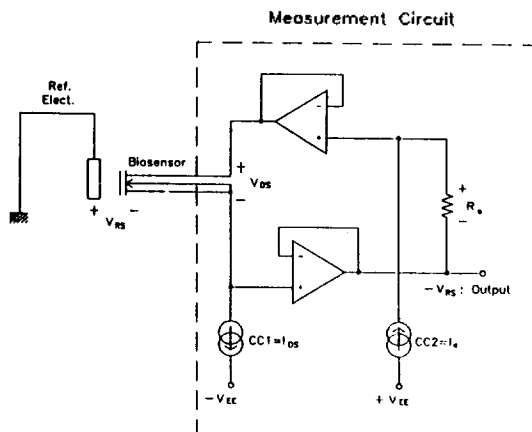


Fig. 7. Schematic diagram of measurement circuit.

측정에 사용한 용액은 인체의 혈액과 유사한 장력을 가지는 합성생리수로서 각 농도의 요소 표준 용액을 제조하였다. 요소센서를 측정장치에 장착시킨 후 요소 표준용액을 차례로 흘려보내 출력전압의 변화를 디지털 전압계와 Y-t recorder로 측정한다. 하나의 표준 요소용액을 측정한 후 합성생리수를 가하여 소자의 출력이 원래의 전압을 회복하면, 다른 농도의 표준 요소 용액을 흘리는 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

ISFET의 전류-전압 특성. Fig. 8은 제조된 ISFET 칩의 pH 7 용액내에서의 전류-전압 특성을 반도체소자 분석기인 HP4145B로 조사한 것이다. $V_D=1.2V$ 이상에서 포화영역으로 동작하는 전류

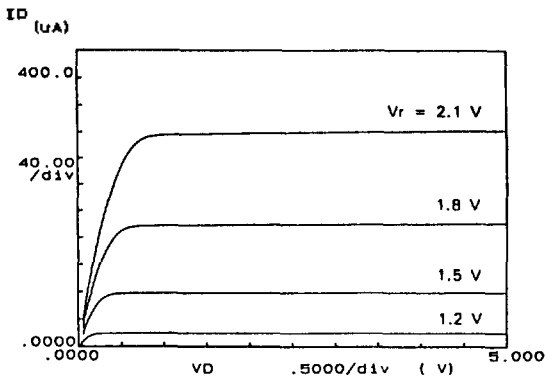


Fig. 8. I_D - V_D characteristics of the ISFET as a function of reference voltage.

전압 특성을 나타내고 있다. 이때 기준전극으로는 상용기준전극을 사용하였다.

ISFET의 pH 감도. Si_3N_4 수소이온 감지막을

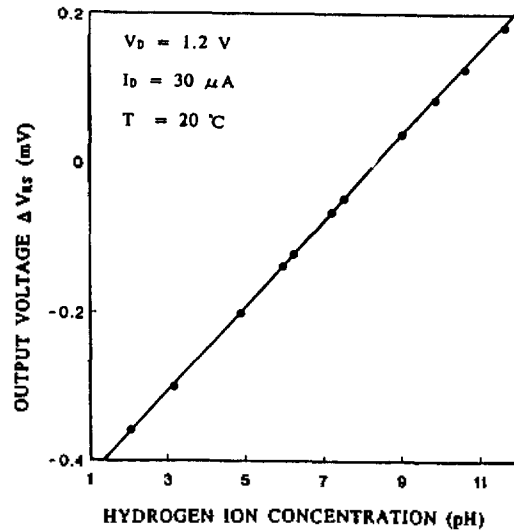


Fig. 9. pH sensitivity of the ISFET.

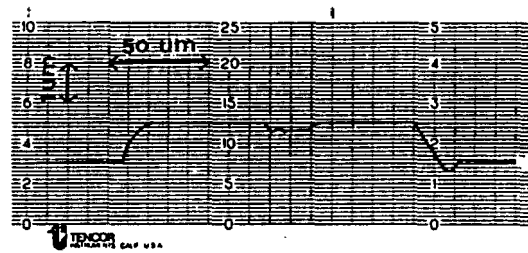


Fig. 10. α -step analysis for the membrane thickness measurement.

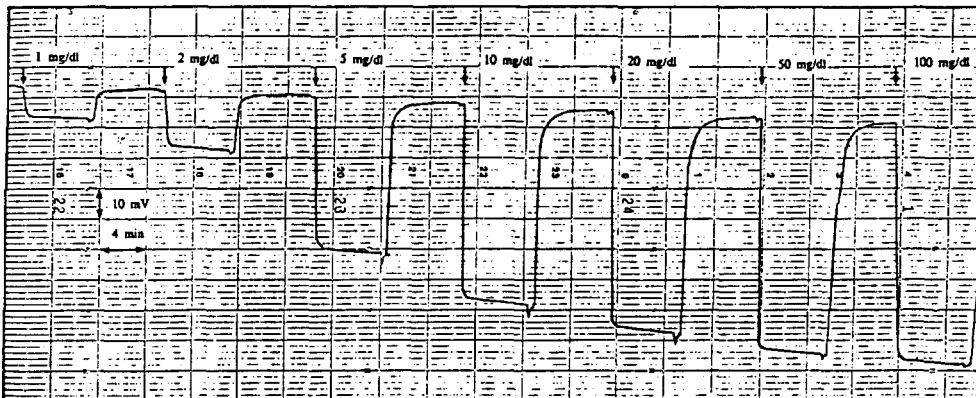


Fig. 11. Time responses of the ISFET urea sensor for various urea concentration.

가진 ISFET의 pH에 대한 응답을 Fig. 9에 나타내었다. ISFET의 pH에 대한 감도는 약 58 mV/pH로서 이론치인 59 mV/pH에 매우 가까운 특성을 지닐 수 있었다.

막의 두께. 효소 고정화막의 두께는 기질의 확산속도에 영향을 미치므로, 본 실험에서는 수용성 감광성 고분자 물질인 PVA-SbQ와 urease, BSA, 합성 생리수의 양에 의하여 조절하였다. Fig. 10은 ISFET 위에 형성된 urease 고정화막을 α -step으로 측정된 그림으로서 막의 두께는 약 1 μ m였다.

요소 농도에 따른 검정곡선. Fig. 11은 여러 가지 요소농도에 대한 요소센서의 응답시간을 보인 것이다. 센서의 감응시간은 요소농도에 따라 조금씩 차이를 보이나 약 30초에서 1분으로 현시적 측정이 가능할 정도로 빠르게 나타났다. Fig. 12는 각 요소 표준 농도에 대하여 시간에 따른 응답특성과 검정곡선을 나타낸 것이다. 센서의 정량범위는 약 1~50 mg/dl이고, 감응시간은 30초~1분으로 매우 빠른 특성을 보였다.

측정횟수에 따른 반복성. Fig. 13은 제조된 센서를 이용하여 요소 표준용액 10 mg/dl에서 측정횟수에 따른 반복성을 조사한 것이다. 50회 이상 측정한

결과, 출력전압의 변화는 거의 일정하였으며 감응시간 또한 변화 없었다.

혈액내 존재하는 물질들의 방해효과. 혈액내에서 여러 가지 아미노산과 유기대사물, 또 금속이온들이 존재²⁵하므로 이 물질들이 urease 효소반응에 방해효과를 일으켜 센서의 출력에 영향을 줄 수 있다. ISFET 요소센서를 이용하여 혈액에 존재하는 각종 물질들의 정상치를 요소 농도 15 mg/dl의 표준용액에 첨가하여 각 물질이 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. 그 결과, boric acid, lactic acid, pyruvic

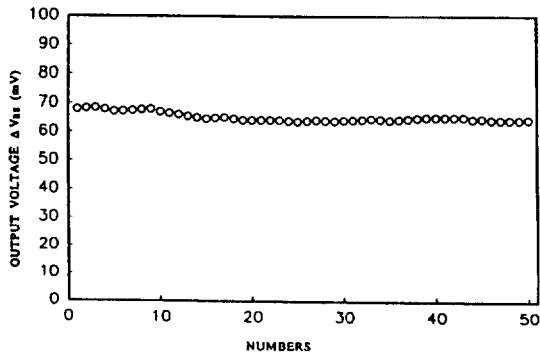


Fig. 13. Repeatability of the urea sensor.

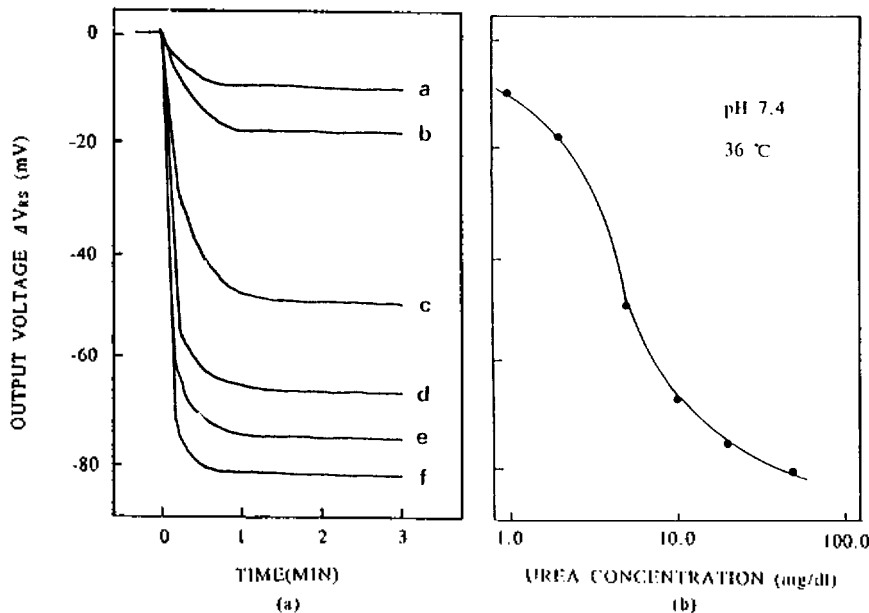


Fig. 12. (a) Typical response curves of the sensor for urea solutions. Urea concentrations were: a, 1; b, 2; c, 5; d, 10; e, 20; f, 50 mg/dl. (b) A calibration graph for urea determination with the sensor.

Table 1. The interference of the various components in blood with urea sensor output

Added components	Amounts (mg/dl)	Response (mV)	Δ mV
None*	—	75	0
Alanine	3.88	75	0
Isoleucine	0.88	74	-1
Methionine	0.35	75	0
Phenylalanine	1.30	75	0
Valine	2.68	75	0
Hydroxyproline	0.28	75	0
Fructose	3.50	75	0
Galactose	5.0	77	+2
Glucose	88.5	76	+1
Lactose	0.5	75	0
Sucrose	0.06	74	0
Boric acid	1.0	68	-7
Lactic acid	11.7	72	-3
Oxalic acid	0.6	72	-3
Pyruvic acid	0.6	72	-3
Uric acid	6.4	75	0
Creatine	0.55	74	-1
Cholesterol	225.0	72	-3
CaCl ₂	8.3	70	-5
MgCl ₂	2.0	77	+2
All ^b	—	70	-5

*None means the 15 mg/dl urea solution with no added components. ^bAll means the solution that contains all of the components in the table.

acid, cholesterol과 CaCl₂ 등의 물질은 urease 효소반응에 약간의 방해효과를 일으켰다.

분광광도법의 비교. 제조된 센서로 실제 혈액내의 요소농도²⁵를 측정하기 위하여 정상인의 혈액에 항응고제를 첨가하고, 원심분리하여 혈장(blood plasma)과 혈구로 분리하여 혈장을 이용하였다. 동일한 혈장을 6회 반복하여 측정하면서, 동시에 현재 병원에서 임상검사시 이용되고 있는 요소 측정용 진단시약을 사용하여 분광광도계로 측정하였다. Table 2는 두 방법에 의한 측정치를 비교한 것으로서, 본 실험에서 제조된 요소센서가 분광광도법과 장비 및 소모품(분석시약)이 고가이지만, ISFET 센서는 집적회로 제조공정을 통한 대량 생산이 가능하여 경제성이 있으며, disposable하고, portable한 장점이 있다. 또한 분광광도계는 환자의 혈액을 채혈하여 복잡한 전처리 과정을 거쳐야 하지만 ISFET 센서는

Table 2. The comparison between the results of the ISFET urea sensor and spectrophotometric method

No.	ISFET urea sensor(mg/dl)	Spectrophotometric method(mg/dl)
1	10.2	12.8
2	9.5	9.4
3	10.2	12.4
4	12.1	10.8
5	9.1	11.1
6	11.5	10.2

극소형, 초경량의 센서로서 앞으로 생체적용성 연구를 통하여 전처리 과정없이 생체 삽입 측정이 가능하리라 기대된다.

결 론

반도체 이온센서인 ISFET의 수소이온 감지막 위에 감광성 고분자인 PVA-SbQ를 이용한 urease 효소 고정화막을 만들어 ISFET 요소센서를 제조하고, 그 감지특성을 조사한 결과, 제조된 센서는 1~50 mg/dl의 요소농도 범위를 정량할 수 있었으며, 30 초~1분 정도의 빠른 응답특성과 우수한 재현성을 보였다.

혈액 중에 존재하는 여러 가지 물질들에 대하여 urease 효소반응에 미치는 간섭효과를 조사한 결과, boric acid, lactic acid, pyruvic acid, cholesterol 그리고 CaCl₂ 등의 물질은 약간의 방해 작용을 하는 것으로 나타났다. 혈장의 요소농도를 측정할 결과 현재 병원에서 실용되고 있는 분광광도법과 비교할 때 유사한 측정값을 얻을 수 있었다. 따라서 ISFET 요소센서는 임상에 직접 응용할 수 있다고 생각된다.

본 연구는 과학재단의 ERC Programme에 의하여 수행하였으며, 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. P. Bergveld, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-17**, 70 (1970).
2. 손병기, *대한전자공학회지*, **18**, 22 (1981).
3. T. Ito, H. Inagaki, and I. Igarashi, *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-35**, 56 (1988).

4. R. B. Buck, *Anal. Chem.*, **50**, 17 (1978).
5. G. H. Rricke, *Anal. Chem.*, **52**, 259 (1980).
6. P. L. Bailey, "Analysis with ion selective electrodes", 2nd ed., p. 62, Heyen & Sons Ltd., London, 1980.
7. T. Matsuo and K. D. Wise, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-21**, 485 (1974).
8. J. N. Zemel, International Electron Devices Meeting, Washington DC., p. 635, 1975.
9. J. Janata, *Sensors and Actuators*, **4**, 255 (1983).
10. L. Bousse, J. Shott, and J. D. Meindl, *IEEE Electron Device Lett.*, **9**, 44 (1988).
11. S. Caras and J. Janata, *Anal. Chem.*, **52**, 1935 (1980).
12. S. Caras and J. Janata, *Anal. Chem.*, **57**, 1917 (1985).
13. S. Caras and J. Janata, *Anal. Chem.*, **57**, 1920 (1985).
14. S. Caras and J. Janata, *Anal. Chem.*, **57**, 1924 (1985).
15. J. Kimura, T. Kuriyama, and Y. Kawana, *Sensors and Actuators*, **9**, 373 (1986).
16. Y. Miyahara and T. Morizumi, *Sensors and Actuators*, **7**, 1 (1985).
17. Y. Hanazato, M. Nakako, and S. Shiono, *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-33**, 47 (1986).
18. K. Ichimura and S. Watanabe, *J. Polymer Sci.: Polymer Chem. Ed.*, **18**, 613 (1980).
19. K. Ichimura and S. Watanabe, *J. Polymer Sci.: Polymer Chem. Ed.*, **18**, 891 (1980).
20. K. Ichimura and S. Watanabe, *J. Polymer Sci.: Polymer Chem. Ed.*, **20**, 1419 (1980).
21. K. Ichimura, *J. Polymer Sci.: Polymer Chem. Ed.*, **22**, 2817 (1982).
22. 서화일, 권대혁, 이종현, 손병기, 대한전자공학회지, **25**, 1358 (1988).
23. Y. Hanazato, M. Nakako, S. Shiono, and M. Maeda, *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-36**, 1303 (1989).
24. G. Palleschi, M.A. Nabirani, G.J. Lubrano, J.N. Ngwainhi, and G.G. Guilbault, *Anal. Biochem.*, **159**, 114 (1986).
25. 이귀녕, 김진규, "임상화학", 의학문화사, pp. 67~71, 747~790, 1988.
26. 이창규, "임상화학(이론과 실제)", 대학서림, pp. 365~366, 1985.