

SAM 코팅된 전극에서 ECL을 이용한 glucose 검출 시스템

유금표, 김윤호, 강문식, 홍석인, 민남기
고려대학교

Electrochemiluminescence-based detection system of glucose on SAM-coated electrode

Kum-Pyo Yoo, Yun-Ho Kim, Moon-Sik Kang, Suk-In Hong, Nam-Ki Min
Korea University

Abstract - 전기화학발광(ECL) 시스템은 높은 감도와 넓은 선형동작영역을 가지므로 분석화학에서 넓게 연구되고 있다. 그러나 포토멀티플러, 광검출기와 플루오로메터로 구성된 ECL 검출 시스템은 크기가 크고, 전력소모가 많으며, 고가인 단점이 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하기 위해 p+n 포토다이오드를 이용한 마이크로 ECL 시스템을 제작 과산화수소 농도를 50uM~10mM 범위에서 측정하였고, 글루코오스는 1mM~20mM 농도범위에서 측정하였다. 따라서 마이크로 ECL 시스템이 바이오센서 혹은 바이오 분석기로서의 가능성을 확인 하였다.

와 N-hydroxysulfosuccinimide(NHS)는 GOD의 고정화에 사용된다. PDMS(Sylgard 184)는 다우 코닝사에서 구매하였다.

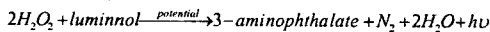
2.2 실험 장치

전류로 제어되는 LED(Totyda Gosei Co.)는 포토다이오드의 특성을 측정에 이용되고, 포토다이오드의 광전류는 전압전류측정기(HIP 34401A)와 VEE 프로그램(Agilent Co.)으로 측정하였다. ECL 측정은 potentiostat/galvanostat (EG&G Princeton Applied Research, Model 263A)와 IBM 컴퓨터를 구성한 전기화학 시스템으로 측정하였다. 수동펌프는 Harvard 제품이다.

1. 서 론

화학발광(CL)은 높은 감도와 선택성을 가지고 있는 분석 방법으로 알려져 있다.[1,4] ECL은 화학적 발광 방법에 비해 반응 시료가 적고, 제어가 간편하다.[2] ECL은 유기물과 무기물의 검출이 가능하다.[1]

CL에 비해 ECL은 반응 용액에 접촉된 전극에 전압을 인가하여, 빛을 검출하는 발광화학반응이다.[1] 반응 과정의 파장대는 420~430nm 이다. 루미놀의 ECL은 과산화수소가 있는 전극에 적당한 양전압을 가하여 반응시킬 수 있다.[3]



ECL은 전기화학적인 방법으로 저 농도의 과산화수소를 측정하여 선형 특성을 얻을 수 있다.[4] 또한 이 방법은 빠른 반응이기 때문에, 애노드 전극 표면에서 반응이 일어난다.

다양한 광검출기는 ECL 검출 방식을 사용한다. 그러나 대부분의 시스템은 포토멀티플러와 플루오로메터로 구성되어 부피가 크고 고가이다. 이러한 점을 개선하기 위해서, 반도체 공정으로 포토다이오드를 제작하고, 또한 MEMS기술로 시스템의 크기를 줄인다면, 적은 양의 시료와 적은 비용으로 시스템을 제작할 수 있다.

본 논문에서는 루미놀 형광체를 이용한 ECL반응을 통해 H₂O₂의 농도에 따른 ECL반응을 검출함으로써 빛을 이용한 검출방식을 제안하였으며, 포토다이오드와 PDMS를 이용한 마이크로-ECL 검출 시스템을 제작함으로써 시스템의 소형화를 제안한다. 또한, 최종적으로 제안한 센서의 검출기준을 포도당 센서의 H₂O₂농도범위로 선택하여, SAM 코팅된 Au전극위에 효소를 고정화하는 방식을 응용한 ECL검출을 측정함으로써, 포토다이오드를 이용한 광 검출용 ECL 바이오센서로서의 가능성을 제안한다.

2.3 p+n 포토다이오드 제작

웨이퍼는 4"로, (100) 방향이다. 저항은 1~10Ω·cm이고, P으로 도핑되었다. B는 주입공정으로 10keV 에너지로 1×10¹⁵cm⁻²로 주입하였다. 붕소에 의해 만들어진 p+과 n 영역의 공핍층의 깊이는 1.0779μm이다.[5] 주입된 B의 활성화를 위해 RTP 장비를 이용하여, 질소 분위기에서 1000℃에서 20초간 열확산 공정을 하였다.

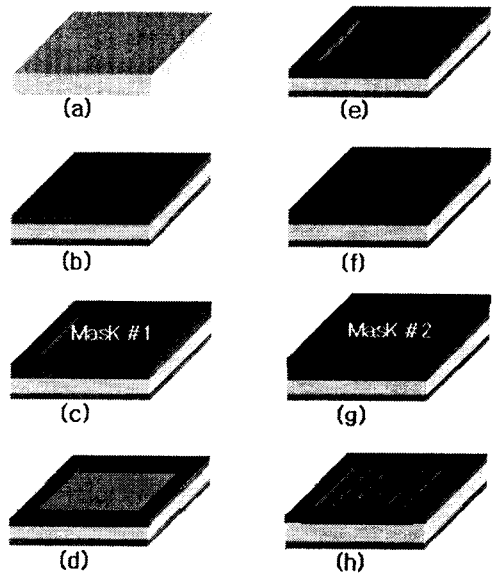


그림 1. 포토다이오드 제작과정 : (a) 초기세척, (b) 산화공정, (c) 식각공정, (d) 붕소(B) 주입 (e) 열확산공정 (f) 금속화 공정(Al), (g) Al 식각 (h) 포토다이오드

2. 본 론

2.1 반응물

30%로 희석된 H₂O₂는 대정화금에서 구입하고, 1mM~10mM의 농도로 준비한다. 포도당산화효소(GOD)와 루미놀은 시그마에서 구매하고, 루미놀은 탄산염 나트륨 용액에 녹여 (0.2M, pH 10.0, 25℃) 준비한다. 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]carbodiimide(EDC)

2.4 금 전극

기판은 4" 소다-라임 유리이고 두께는 1mm이다. Ti와 Au는 500Å/3000Å으로 증착하였다. 감광제(PR, AZ1512)로 사진공정을 진행하였고, Au는 요오드와 칼륨으로, Ti는 HF:H₂O(1:100)으로 각각 식각하였다. 마지막으로 PR은 AZ1512 remover 200으로 제거하였다.

2.5 미세 채널제작

기판은 4" 실리콘 웨이퍼이고, 채널은 후막형 감광제인 SU-8을 이용한 사진공정으로 제작하였다. 높이는 35μm이고, 넓이는 200μm이다. 완성된 마스터에 PDMS를 붓는다. 70℃에서 진공상태에서 1시간정도 굳힌다. 기판과 PDMS를 분리하면, PDMS 채널이 완성된다.

2.6 접 합

채널이 형성된 PDMS와 전극이 형성된 유리를 O₂ 플라즈마 처리를 하여, 이 두 개를 접합한다. 접합조건은 표 1과 같다.

	RF Power(W)	O ₂ (sccm)	Time (sec)
유리	50	1.5	60
PDMS	10	1.5	30

표 1. 유리 와 PDMS 접합 조건

2.7 SAM(Self-assembled monolayer)

피라나 용액(30% H₂O₂:H₂SO₄=1:3, 80℃)에서 약 5분으로 Au/Ti 전극이 증착된 유리를 세척한다. 에탄올과 희석하여 만든 3-mercaptopropionic 산 용액 2mM에 금 전극을 약 12시간 담근다. 12시간 후, 에탄올로 세척후 질소로 건조 시킨다.

2.8 포도당 산화 효소의 고정화

포도당 산화효소는 공유결합에 의해 금 전극에 형성된 SAM 위에 고정화 된다. 공유결합에 의해 고정화하기 위해서는 카복실기를 포함한 SAM으로 변형된 금전극이어야 한다. NHS (3mM; N-hydroxysulfosuccinimide)와 EDC (100mM; 1-ethyl-3-[3dimethylamino-propyl]carbodiimide)를 0.1M의 인산염 나트륨 용액(pH 7.4)에 희석하여 상온에서 1:1로 혼합하여, 금 전극을 약 3시간 담근 후, 인산염 나트륨 용액으로 세척한다. 인산염 나트륨 용액(pH 7.0) 1mM에 포도당 산화효소 용액 2.5mg/mL를 섞어 금 전극을 약 하루정도 담가둔다. 인산염 나트륨 용액으로 세척한다. 이와 같이 카복실기들은 NHS 에테르에 반응하게 되고 포도당의 아민기들은 NHS의 위치에 결합하게 된다.

3. 결 과

3.1 전극

ECL 반응에서 애노드와 캐소드 사이의 전계가 필요하다. 마이크로 시스템에서는 좁은 반응영역으로 전극 크기가 제한된다. 따라서 전극은 좁은 면적을 가져야하고, 강한 전기장이 형성되어야 되므로 인터디지트 전극이어야 한다.(그림 2)

그림 3은 루미놀과 과산화수소가 전압이 0~2.5V 가해질 때, 반응 전류를 보여 준다. 전압이 증가할 때 전류도 증가한다. 1.5V일 때, 반응이 활발하다. 1.5V 이상으로 전압을 가하면 전류가 감소하는 것을 볼 수 있다. 그러므로 입력 전압은 1.5V로 정하였다.

그림 4는 루미놀의 농도에 따른 ECL 강도를 나타내었다. 루미놀은 0.2M의 탄산염 나트륨 용액(pH 10, 25℃)에 섞어 1~7mM의 농도로 변화를 주었고, 과산화수소는 10mM로 고정하였다. ECL의 강도는 루미놀의 농도의 증가에 따라 증가하는 것을 볼 수 있다. 그러나 루미놀의 농도가 4mM과 5mM 사이를 지나면서 변화의 폭이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 반응 분위기내

에서 루미놀의 농도가 증가할수록 강한 빛을 검출할 수 있지만, 그 증가의 폭은 루미놀 용해도의 한계에 의해 감소하는 것을 나타낸다. 따라서 실험에 사용되는 루미놀은 5mM로 결정하였다.[3]

그림 5는 유속에 따른 ECL 강도의 변화이다. ECL의 강도는 유속의 증가에 따라 감소한다. 그러므로 최저 속도인 0.05ml/min으로 결정하였다.

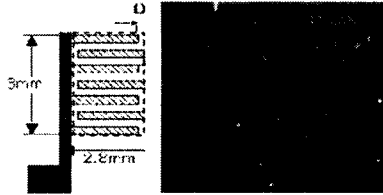


그림 2. ECL 반응 전극 모양

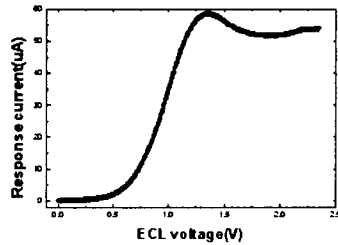


그림 3. 전압에 따른 ECL 강도 ; 루미놀:5mM, H₂O₂:10mM, 유속:0.05ml/min

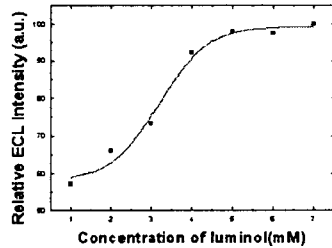


그림 4. 루미놀 농도에 따른 ECL 강도 ; H₂O₂:10mM, 유속:0.05ml/min, 인가전압:1.5V

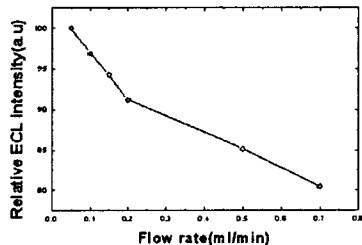


그림 5. 유속과 ECL 강도; 루미놀:5mM, H₂O₂:10mM, 인가전압:1.5V

3.2 p+n 포토다이오드 특성

그림 6은 포토다이오드의 특성 곡선이다. 역전압을 걸었을 때, 누설 전류는 3nA 이다. 전압이 증가할 때, 0.4V가 되었을 때부터 전류가 증가한다. 0.4V가 문턱 전압이다.

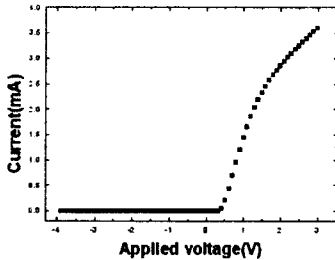


그림 6. 포토 다이오드의 특성 곡선

3.3 포토다이오드의 신뢰도

포토다이오드의 광전류의 크기는 인가된 빛의 파장에 의해 결정된다. 신뢰도(R_e)는 감도를 측정하는 것이다. 이 요소는 short circuit light current(I_{sc})를 단위 면적당 빛의 에너지(E_e)로 나누어 구한다.

$$R_e = \frac{I_{sc}}{E_e}$$

신뢰도는 A/W의 단위로 정의된다. 그림 7은 포토다이오드의 신뢰도를 측정한 것이다. $\lambda=639\text{nm}$ 에서 최고점이고, 0.3A/W이다. $\lambda=465\text{nm}$ 일 때는 0.14A/W로 측정되었다. 이다. 양자효율은 각각 58.22%에서 40.00%로 계산된다.

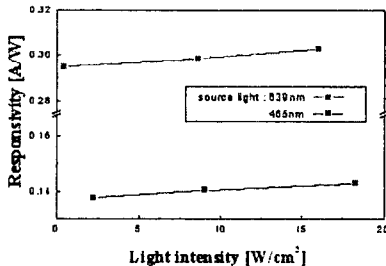


그림 7. 빛의 강도와 신뢰도

3.4 과산화수소 농도에 따른 응답

아래의 그림은 마이크로 채널에서 ECL을 검출한 결과이다. 과산화수소의 농도에 따라 광전류가 증가한다. 1mM 부터는 일정하게 증가한다. ECL의 강도를 통해서 과산화수소의 농도를 측정하였다.

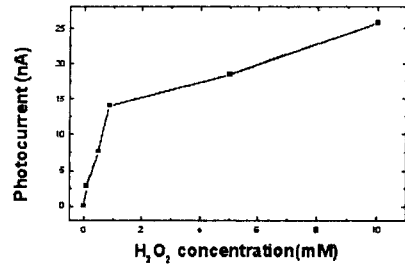


그림 8. H₂O₂의 농도에 따른 광전류 응답; 루미놀:5mM, 유속:0.05ml/min, 인가전압:1.5V

3.5 포도당 검출

과산화수소는 포도당의 농도에 따라 차등하게 발생한다. 그러므로 포도당의 농도를 과산화수소의 농도로 측정될 수 있다. 그림 9는 포도당의 농도에 따른 광전류 (ECL 강도) 곡선이다. 포도당의 농도는 1mM~10mM이고, 루미놀은 10mM로 혼합하였다. 이 그림은 그림 8과 유사한 결과를 나타낸다. ECL은 과산화수소의 농도일 때와 비슷하게 측정 된다. 시료는 0.95 μ l가 사용되었다.

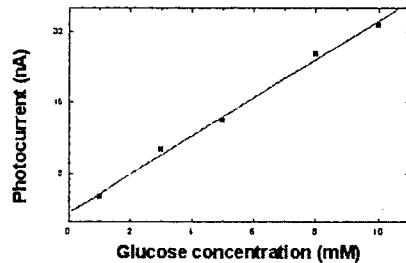


그림 9. 금 전극에서 포도당 농도에 따른 광전류; 루미놀:5mM, 유속:0.05ml/min, 인가전압:1.5V

4. 결 론

본 논문에서는 ECL을 이용한 micro-ECL 검출 시스템을 제작하여 고찰하였다. 교차형 전극은 적은 면적에서 강한 전계가 형성되어 선택하였고, ECL을 마이크로 시스템에 응용하기 위해, 전극의 인가전압(1.5V), 루미놀의 농도(pH 5, 5mM), 유속(0.05ml/min)을 결정하였다.

최종적으로 SAM 기술을 사용한 고정화와 포도당과 포도당 산화효소사이의 효소반응을 이용하여 포도당(0~10mM)을 과산화수소의 농도로 측정하였다. 광전류는 포도당의 농도가 증가할 때 일정하게 증가하였고, 이것으로 포도당의 농도 변화에 따른 ECL 검출 센서로의 응용 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 약 0.95 μ l라는 매우 미소량을 사용한 마이크로시스템에서 포토다이오드를 이용하여 ECL반응을 성공적으로 검출함으로써 포토다이오드의 광 검출을 이용한 바이오센서나 바이오검출시스템에 응용할 수 있는 소형화된 micro-ECL 시스템의 가능성을 확인할 수 있었다.

감 사 의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구
(R01-2002-000-00591-0) 지원으로 수행되었음.

[참 고 문 헌]

- [1] M.Y. Yang, C. Liu, X. H.,"Electrochemiluminescence assay for the detection of acridinium esters", *Analytica Chemical Acta*, Vol, 461, 141-146, 2002.
- [2] H. Wang, G. Xu, S. dong, " Electrochemiluminescence of dichlorotris(1,10-phenanthroline) ruthenium(II) with peroxydisulfate in purely aqueous solution at carbon paste electrode", *Microchemical Journal*, Vol. 72, 43-48, 2002.
- [3] L. Zhu, Y. Li, G. Zhu, "A novel flow through optical fiber biosensor for glucose based on luminol electrochemiluminescence", *Sensors and Actuators B*, Vol. 86, 209-214, 2002.
- [4] K. A. Fahrnich, M. Pravda, G. G. Guilbault, "Recent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis", *Talanta*, Vol.54, 531-559, 2001.
- [5] G. W. Neudeck, *The pn junction diode*, Addison-Wesley, 1989.
- [6] C. A. Marquette, L. J. Blum, "Luminol electrochemiluminescence-based fibre optic biosensors for flow injection analysis of glucose and lactate in natural samples", *Analytica Chemica Acta*, Vol. 381, 1-10, 1999.
- [7] B. D. Leca, A. M. Verdier, L. J. Blum, "Screen-printed electrode as disposable or reusable optical devices ofr luminol electrochemiluminescence", *Sensors and Acutators B*, Vol, 74, 190-193,2001.