

### Poly(3-methylthiophene)과 Polypyrrole을 전기 중합하여 제작한 전위차 요소센서의 특성 비교

박수현 · 진준형 · 민남기 · 홍석인  
고려대학교 생명공학원, 고려대학교 제어계측공학과, 고려대학교 화학공학과

### Characteristics of Potentiometric Urea Sensors Based on Poly(3-methylthiophene) and Polypyrrole Constructed by Electropolymerization

Suhyun Park · Joon Hyung Jin · Nam Ki Min · Suk In Hong  
Graduate School of Biotechnology, Department of Control and Instrumentation Engineering, and Department of Chemical Engineering, Korea University.

**Abstract** - 혈액 내의 요소 농도는 신장병 진단의 척도로서 정확한 측정이 필요하다. 요소의 농도는 전위차법을 이용하여 정확히 검출할 수 있으며 이를 위하여 효소를 고정화시킨 전극형 센서를 사용하였다. 전도성 고분자로서 P3MT(poly(3-methylthiophene))와 PPy(polypyrrole)를 효소 고정화에 이용하였다. PPy는 전기적 특성이 좋고 중합 및 효소의 고정화가 용이하며 중합 과정이 상대적으로 신속하고 비용도 저렴하다는 장점은 있으나, 다소 불안정하다. P3MT는 PPy와 마찬가지로 전극 상에 단량체가 전기적 산화에 의하여 중합되고 일반적으로 전해질 이온이 도우핑된 상태나 도우핑되지 않은 상태 모두에서 산소, 습도, 온도에 대하여 매우 안정하다.

본 연구에서는 3-methylthiophene과 pyrrole을 전기 중합하여 urease를 고정화한 요소센서의 특성(감도, 안정성, 직선성)을 비교하였다. P3MT를 이용한 센서와 PPy를 이용한 센서 각각에 대해 감도는 P3MT가 32.3mV/decade, PPy가 4.7mV/decade로서 P3MT가 우수하였고 직선성도 보다 뛰어났으며 순환 전압 전류 곡선을 분석한 결과 P3MT가 PPy보다 안정성도 우수한 특성을 보였다.

### 1. 서 론

현재, 바이오 센서는 의료분야 뿐만 아니라 환경, 식품 등 여러 계측분야에 응용이 시도되고 있다. 이중 의료용 바이오 센서는 기존의 기술로는 불가능한 각종 환자 상태의 in-line 계측, real-time 계측, In-vivo sensing을 위해 광범위한 연구 개발이 이루어지고 있다. 혈액은 인간의 건강에 관한 다수의 정보를 포함하고 있어 혈액 검사는 모든 질병의 진단에서 필수적이다. 이중 혈액내의 요소와 크레아티닌(creatinine) 농도 측정 은 신장이나 간장 질환 진단에서 극히 중요하기 때문에, 이들을 검출하는 바이오 센서에 관한 연구가 활발히 전개되고 있다<sup>1-8</sup>. 요소는 우레아제(urease)의 작용으로 가수 분해되어 암모늄 이온(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)과 탄산 이온(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)이 생성된다. 따라서 요소 센서는 고정화 우레아제와 이들 이온 또는 가스를 계측하는 전극을 결합해서 제작한다. 그러나 여기서 사용하는 암모늄 이온 전극이나 암모니아 가스 전극은 pH전극과 이온 투과성막이나 가스 투과성 막을 결합한 것으로서, 다른 이온이나 휘발성 화합물(예를 들면 아민)등의 방해를 받는 문제가 있다. 그래서, 암모니아 전극의 개량이 활발히 진행되고 있다. 공극(air gap)형의 암모니아 전극은 이온이나 휘발성 물질의 영향을 잘 받지 않는 것으로 되어 있다. 또 효소 반응에 의한 pH변화를 측정하여 요소를 계측하는 시스템이나, 반응 생성물인 이산화탄소를 측정하여 요소를 계측하는 시스템 등이 보고되고 있다. 그러나 이러한 형태의 요소 센서는 소형화가 어렵고 가격이 높다는 단점이 있다.

비교적 최근에는 Multienzyme 시스템을 적용하여

동시에 여러 가지의 기질을 측정할 수 있는 바이오센서 array가 보고되었으며<sup>9</sup>, surface acoustic wave(SAW)를 이용하여 진동수 변화와 전도도의 직선 관계로부터 요소의 농도를 측정하는 분석방법도 보고되었다<sup>10</sup>. Human 혈청을 시료로 하여 SAW 법으로 요소의 농도를 측정할 경우 감도가 약 0.08kHz/(μg/ml)<sup>10</sup>, 쥐 또는 토끼의 혈청을 상대로 ISFET를 이용하여 요소의 농도를 측정할 경우 5mV/mM<sup>11</sup> 로서 아직은 낮은 수준이며 특히, 혈청을 시료로 하는 경우 여러가지 다른 종류의 단백질, 무기질 등 저해요인이 많다.

한편, 전기 중합법은 지지전해질이나 단량체의 종류에 따라 필름의 성질을 변화시킬 수 있고 중합과 동시에 효소를 고정화할 수 있는 장점이 있어서 이를 이용하여 전도성 고분자 안으로 효소를 고정화한 연구가 여러 차례 보고되었다. 그러나 이러한 방법은 단량체와 효소의 농도가 매우 높아야 한다는 단점이 있어서 전극 표면에 단량체와 효소를 먼저 흡착시켜 건조하고 이후에 전기 중합함으로써 효소를 비가역적으로 고정화하는 방법이 고안되기도 하였다<sup>16</sup>. 일반적으로 기질의 농도는 효소측대반응에 의한 pH변화에 기인해서 나타나는 전압 또는 전류 변화를 측정함으로써 정확히 검출할 수 있다. 전도성 고분자로 가장 많은 연구가 이루어진 것은 PPy이며 PPy는 전기적 특성이 좋고 중합 및 효소의 고정화가 용이하며 중합 과정이 상대적으로 신속하고 비용도 저렴한 장점은 있으나, 특성이 불안정하다는 단점이 있다<sup>17</sup>. P3MT는 전도성 고분자로서 PPy와 마찬가지로 전극 상에 단량체가 전기적 산화에 의하여 중합되고 일반적으로 전해질 이온의 도우핑 유무에 관계없이 산소, 습도, 온도에 대하여 매우 안정하다<sup>18, 19</sup>.

본 연구에서는 요소를 검출하기 위한 전기화학형 효소 전극을 제작한다. Pt 전극 기질에 3-methylthiophene 및 pyrrole 등의 전도성 고분자를 전기 중합하여 urease를 고정화하고 기질의 농도에 따른 작업전극과 기준전극 사이의 전위 변화를 관찰한다. 아울러, 고분자에 따른 센서의 특성(감도, 안정성, 직선성)을 고찰한다.

### 2. 센서 전극 제작

전극 기질은 지름 3mm의 Pt RDE tip을 사용하였으며, 0.3μm 알루미늄과 파우더로 폴리싱한 다음 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에서 특성 피크를 관찰하고, 증류수로 여러 차례 세척하여 건조시킨 후 urease 1mg/(0.07cm<sup>2</sup>)을 전극 상에 loading하여 다시 건조시켰다. 이것을 작업 전극으로 하고 Pt wire를 상대전극, SCE를 기준전극으로 하여 고분자를 전기 중합하였는데, PPy의 경우는 지지전해질로서 0.05M의 NaClO<sub>4</sub>와 0.1M pyrrole을 포함한 수용액상에서 전기 중합하였고, P3MT의 경우에는 0.05M의 NaClO<sub>4</sub>와 0.1M 3-methylthiophene을 포함한 acetonitrile을 용매로 하는 유기액상에서 전기

중합하였다. 이때의 전위 범위는 SCE에 대해 -0.0442V ~ 1.6558V로 하였고 1.6558V에서 10분간 유지시켰으며, scan rate은 20mV/sec로 하였다. 모든 경우에서 수소이온 농도는 35°C pH7을 기준으로 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 감도와 직선성(Sensitivity and Linearity)

앞서 제작된 센서 전극을 1mM phosphate buffer 용액에서 24시간 4°C 냉장 보관 후 EG&G PARC M263A Potentiostat/Galvanostat으로 수용액상에서 센서 특성을 관찰하였으며, 온도는 35°C, 수소 이온 농도는 pH7에서 수행하였다.

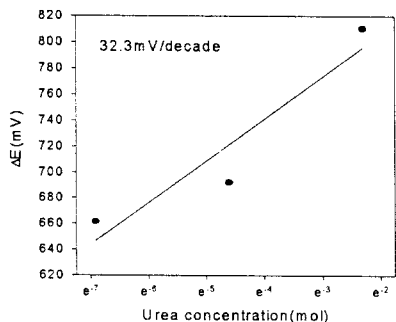


Fig. 1 Calibration curve for the potential response to urea of the P3MT based sensor electrode. Current was kept at  $1.0 \times 10^{-6}$ A and the potential difference was determined from 0sec to 1400sec.

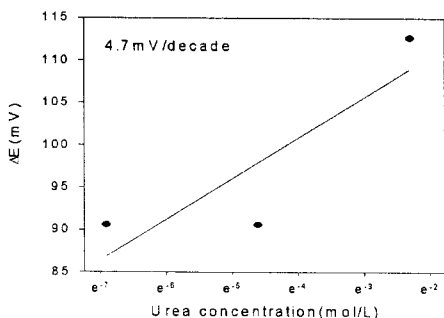


Fig. 2 Calibration curve for the potential response to urea of the PPy based sensor electrode. Current was kept at  $1.0 \times 10^{-6}$ A and the potential difference was determined from 0sec to 1400sec.

P3MT와 PPy를 사용하여 제작한 요소 센서의 요소에 대한 응답특성을 그림 1과 그림 2에 각각 보였다. P3MT에 대한 경우가 32.3mV/decade로서, 4.7mV/decade를 보인 PPy의 경우보다 7배정도 감도가 향상되었다. 직선성의 경우도 P3MT의 경우가 PPy의 경우보다 나은 특성을 보였다. 따라서, P3MT를 효소 고정화에 이용하는 것이 PPy를 이용하는 경우보다 Nernst 식을 보다 잘 따르는 전극 반응을 한다고 할 수 있다.

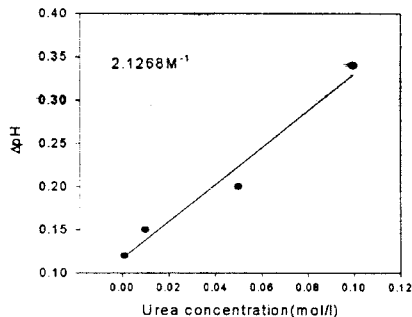
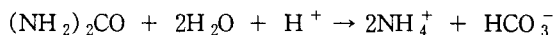


Fig. 3 Calibration curve for the pH variation to urea concentration of the P3MT based sensor. Current was kept at  $1.0 \times 10^{-6}$ A and the response time was 1400sec.

요소의 농도에 따른 전위 값의 변화는 요소의 가수 분해 반응의 결과 생기는 pH 변화에 의한 것인데 그 반응은 다음과 같다.



즉, 요소의 농도 증가에 비례하여 pH 값이 증가한다. 이러한 결과는 그림 3 과 그림 4에 나타내었다. pH에 대한 감도는 P3MT와 PPy를 이용한 경우에 대하여 각각  $1.037\text{M}^{-1}$ 과  $2.1228\text{M}^{-1}$ 로서 P3MT를 이용한 센서의 경우가 두 배 이상 큰 값을 보였으며 직선성도 PPy를 이용한 경우보다 우수하였다.

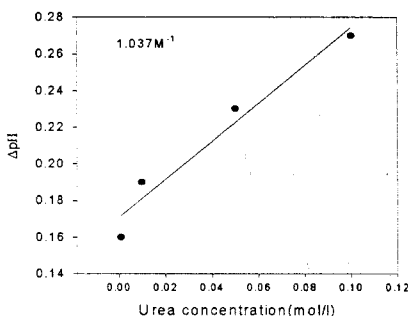


Fig. 4 Calibration curve for the pH variation to urea concentration of the PPy based sensor. Current was kept at  $1.0 \times 10^{-6}$ A and the response time was 1400sec.

#### 3.2 안정성(Stability)

P3MT와 PPy를 이용하여 만든 각 요소센서의 안정성을 반복적으로 전위를 scan 하였을 때 나타나는 순환 전압 전류 곡선(CV)으로써 비교 평가하였다. 0.05 mol/L의 Phosphate buffer에 0.001mol/L의 요소를 첨가한 시료 용액을 상대로 10번 scan하였고, 이때 전위 범위는 -0.2V ~ 1.5V, scan rate은 50mV/s로 하였다. 그 첫 번째와 마지막 10번째 CV 결과를 P3MT의 경우와 PPy의 경우를 구분하여 그림 5 와 그림 6에 나타내었다. P3MT를 이용하여 만든 요소센서

의 경우에는 처음과 마지막의 CV 형태나 산화 피크 전류 값이 서로 비슷하지만 PPy를 이용하여 제작한 요소 센서의 경우에는 CV의 형태나 산화 피크 전류의 값이 처음과 마지막에서 상당한 편차를 보임을 관찰할 수 있다. 여러 번의 반복적인 voltammetric scan에서 응답 특성이 거의 같게 관찰되는 것은 반응 생성물이 고분자 표면에 축적 되지 않아서 반응이 일어날 때 표면을 blocking하지 않기 때문인 것으로 생각된다.

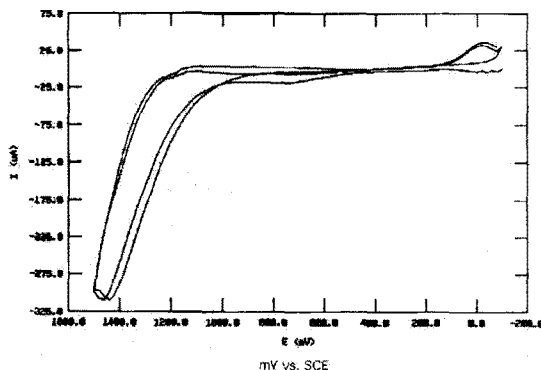


Fig. 5 Cyclic voltammogram of P3MT coated electrode obtained from 0.05mol/L phosphate buffer solution containing 0.001mol/L urea. Potential was swept between -0.2V and 1.5V vs. SCE at 50mV/s.

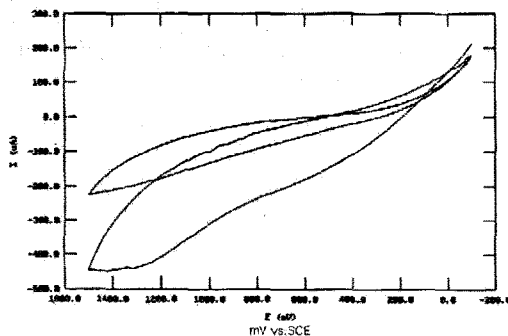


Fig. 6 Cyclic voltammogram of PPy coated electrode obtained from 0.05mol/L phosphate buffer solution containing 0.001mol/L urea. Potential was swept between -0.2V and 1.5V vs. SCE at 50mV/s.

Table 1 Comparison of stability between P3MT and PPy coated electrodes. The value of  $\Delta i_{a,max}$  was the anodic peak current difference of the first cycle and the tenth cycle.

	$\Delta i_{a,max} (\mu A)$	
	P3MT based sensor	PPy based sensor
1	0	226.15
2	6.52	79.41
3	11.54	46.04
4	3.85	46.04

표 1에서 위와 동일한 시료를 같은 조건에서 4번 측정하여 첫 번째와 마지막 10번째의 순환 전압 전류 곡선의 산화 피크 전류 차( $\Delta i_{a,max}$ )를 보였다. P3MT의 경우에는 작은 값으로 안정하였으나 PPy의 경우는 비록 횟수가 증가함에 따라 다소 안정화되는 경향을 보이긴 하였으나 P3MT에 비하여 매우 큰 값으로 불안정함을 보였다.

### 3. 결 론

전기 중합법을 이용하여 전도성 고분자인 P3MT와 PPy에 urease을 고정화한 요소 측정용 바이오센서를 제작하고 감도, 직선성, 안정성 등에 대한 이들의 특성을 비교 고찰하였다. 감도는 P3MT가 32.3mV/decade, PPy가 4.7mV/decade로서 P3MT가 더 우수하였고 기질(요소)의 농도에 대한 전위차도 PPy의 경우보다 직선적이었으며, 순환 전압 전류 곡선을 분석한 결과 역시 P3MT가 PPy보다 안정성이 뛰어났다. 이것은 아마도 P3MT를 구성하는 단량체가 PPy를 구성하는 단량체에 비하여 자유회전(free rotation)이 어렵기 때문인 것으로 생각된다. P3MT를 구성하는 3-methylthiophene은 3 위치에 methyl기를 갖고 있기 때문에 자유회전이 용이하지 않지만 pyrrole의 경우는 이와 같은 치환기를 갖고 있지 않으므로 자유회전이 가능하다. 또한, 고분자의 미세 유연학적 성질은 전해질에 의존하는 경향이 크기 때문에 그에 대한 보다 세밀한 연구가 필요하다고 생각되며 현재 진행 중에 있다.

### (참 고 문 헌)

- [1] N. Das, P. Prabhakar, and A. M. Kayastha, "Enzyme Etrapped inside the Reversed Micelle in the Fabrication of a New Urea Sensor", *Biotechnology & Bioengineering*, 54, No. 4, 329-332, 1997
- [2] C. Eggenstein, M. Borchardt, C. Diekmann, B. Grundig, C. Dumschat, K. Cammann, M. Knoll and F. Spener, "A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer", *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 33-41, 1999
- [3] F. Mizutani, S. Yabuki and Y. Sato, "Voltammetric enzyme sensor for urea using mercaptohydroquinone -modified gold electrode as the base transducer", *Biosensors & Bioelectronics*, 12, No.4, 321-328, 1997
- [4] D. G. Pijanowska, and W. Torbicz, "pH-ISFET based urea biosensor", *Sensors & Actuators*, 44, 370-376, 1997
- [5] T. Osaka, S. Komaba, M. Seyama, and K. Tanabe, "High-sensitibity urea sensor based on the composite film of electroinactive polypyrrole with polyion complex", *Sensors & Actuators*, 35-36, 463-469, 1996
- [6] S. B. Adeloju and S. J. Shaw, "Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea part 1. Incorporation of urease", *Analytica Chimica Acta*, 281, 611, 1993
- [7] S. B. Adeloju and S. J. Shaw, "Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea part 2. Analytical optimization", *Analytica Chimica Acta*, 289, 621, 1993
- [8] H. Kinoshita, M. Torimura, K. Kano, and T. Ikeda, "Peroxidase-Based Amperometric Sensor of Hydrogen Peroxide Generated in Oxidase Reaction: Application to Creatinine and Creatine Assay", *Electroanalysis*, 9, No.16, 1234-1238, 1997
- [9] H. Sangodkar, S. Sukeerthi, R.: S. Srinivasa, R.

- Lal, and A. Q. Contractor, "A Biosensor Array Based on Polyaniline". *Anal. Chem.* **68**, 779-783. 1996
- [10] L. Dezhong, G. Kai, C. Kang, L. Lihua, and Y. Shouzhuo, "Sensitibe Specialization Analysis of Urea in Human Blood by Surface Acoustic Wave Urea Sensor System". *Microchemical J.* **53**, 6-17. 1996
- [11] O. A. Boubriak, A. P. Soldatkin, N. F. Starodub, A. K. Sandrovsky, and A. K. El'skaya, "Determination of urea in blood serum by a urease biosensor based on an ion-sensitive field-effect transistor". *Sensors & Actuators*, 26-27, 429-431, 1995
- [12] S. Cosnier, "Electropolymerization of amphiphilic monomers for designing amperometric biosensors". *Electroanalysis*, **9**, 894. 1997
- [13] H. Yamato, M. Ohwa, and W. Wemet, "A Polypyrrole /Three-Enzyme Electrode for Creatinine Detection". *Anal. Chem.* **67**, 2776-2780.. 1995
- [14] P. N. Bartlett and P. R. Birkin, "The application of conducting lpolymers in biosensors". *Synthetic Metals*, **61**, 15. 1993
- [15] S. Komaba, M. Seyama, T. Momma, T. Osaka, "Potentiometric biosensor for urea based on electropolymerized electroinactive polypyrrole". *Electrochimica Acta*, **42**, 1996
- [16] S. Cosnier, "Fabrication of amperometric biosensors by entrapment of enzymes in functionalized polypyrrole films". *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **76**, 1000. 1998
- [17] V. M. Jovanovic et al., "Electrochemical and surface characterization of pH sensor based on Bisulfate-doped poly(pyrrole)". *Electronalysis*, **9**, 564. 1996
- [18] J. Wang and R. Li, "Highly stable voltammetric measurements of phenolic compounds at poly(3-methylthiophene)-coated glassy carbon electrodes". *Analytical Chemistry*, **61**, 2809. 1989
- [19] H. B. Mark et al, "The electrochemistry of neurotransmitters at conducting organic polymer electrode: electrocatalysis and analytical applications". *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **38**, 229. 1995