(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0057845
(43) 공개일자 2011년06월01일

(51) Int. Cl.
G01N 27/327 (2006.01) *G01N 33/49* (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0114419
(22) 출원일자 2009년11월25일
심사청구일자 2009년11월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
송민정
서울특별시 영등포구 대림2동 1076-4호 19통 1반
황성우
서울특별시 강남구 대치동 511 한보미도맨션 105-1407
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

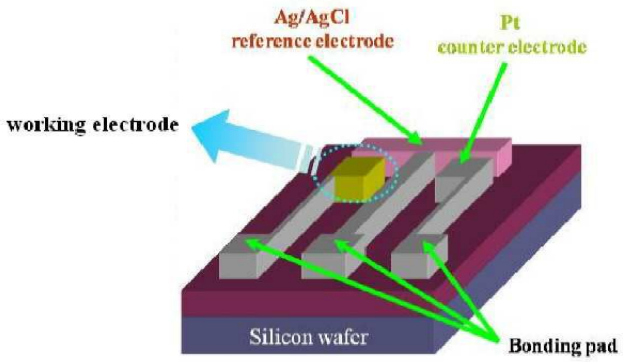
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극 및 그 제조 방법

(57) 요 약

본 발명은 고감도 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극 및 상기 다이아몬드 전극의 제조 방법, 상기 다이아몬드 전극을 포함하는 글루코오스 바이오센서에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 표면에 전도성 고분자의 나노와이어(nanowire)가 코팅되어 있으며, 상기 나노와이어에 효소가 고정되어 있는 다이아몬드 전극을 이용하여, 감응속도가 빠르고, 저농도의 글루코오스까지 검출이 가능한 고감도 글루코오스 바이오센서를 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

황동목

서울특별시 송파구 가락2동 극동아파트 4동 106호

임대순

서울특별시 강남구 개포동 140 주공아파트 201-104

특허청구의 범위

청구항 1

표면에 전도성 고분자로 이루어진 나노와이어가 형성되어 있으며, 상기 나노와이어에 효소가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전극은 보론이 도핑되어 있는 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 전도성 고분자는 폴리아세틸렌, 폴리아닐린, 폴리피롤, 폴리티오펜, 폴리설퍼나이트라이드로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 전도성 고분자는 폴리아닐린인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 효소는 글루코오스 옥시다아제인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 전도성 고분자의 나노와이어에 백금(Pt) 나노입자가 분산되어 있는 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 백금(Pt) 나노입자의 크기는 30 - 50 ㎚ 범위인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극.

청구항 8

실리콘 기재 표면에 보론 도핑된 나노다이아몬드 박막을 형성하는 단계;

상기 나노다이아몬드 박막 상에 전도성 고분자의 나노와이어를 형성하는 단계;

상기 전도성 고분자의 나노와이어에 백금(Pt) 나노 입자를 분산시키는 단계: 및

상기 나노와이어과 효소를 결합시켜 고정하는 단계를 포함하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 보론 도핑된 다이아몬드 박막을 형성하는 단계는

a) 나노다이아몬드 입자 표면의 정전하와 반대되는 극성을 갖는 음이온성 고분자로 코팅하는 단계;

b) 실리콘 기판을 상기 입자에 코팅된 고분자와 반대되는 극성을 갖는 양이온성 고분자로 표면처리하는 단계;

c) 상기 음이온성 고분자로 코팅된 나노입자가 분산된 용액에 상기 양이온성 고분자로 표면처리된 기판을 침지시키는 단계; 및

d) 상기 기판에 화학기상증착법을 이용하여 보론 도핑된 다이아몬드 박막을 성장시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 a) 단계의 음이온성 고분자는 폴리소듐 4-스타이렌설포네이트인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극의 제조 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 b) 단계의 양이온성 고분자는 폴리디알릴디메틸 암모늄 클로라이드인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극의 제조 방법.

청구항 12

기준 전극, 상대 전극 및 작업 전극을 포함하는 글루코오스 바이오센서에 있어서, 상기 작업 전극은 표면에 전도성 고분자로 이루어진 나노와이어가 형성되어 있으며, 효소가 고정되어 있는 보론-도핑된 다이아몬드 전극인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 기준 전극은 Ag/AgCl 전극인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 상대 전극은 백금 전극인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 작업 전극의 감도를 개선하여 매우 낮은 농도의 글루코오스까지 검출이 가능한 고감도 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 국내 바이오센서 중 90% 이상이 의료용 바이오센서로 혈당측정용이 대부분을 차지하고 있으며, 이러한 혈당 바이오센서의 국내 시장은 약 400억 원에 이르고, 당뇨환자 수가 매년 늘어남에 따라 시장 규모도 지속 확대될 것으로 예측되고 있다.

[0003] 바이오센서는 특정 물질을 그와 반응할 수 있는 물질을 전극 표면에 고정화하여 이를 전기적 신호로 바꿔 그의 성분이나 정량 분석하는 시스템이다. 이러한 바이오센서에 있어서, 전극 표면에 고정화되는 반응 관련 물질의 양은 바이오센서의 감도에 영향을 미치는 중요한 요인들 중 하나이다. 그러나 최근 들어 바이오센서가 점차 소형화되어짐에 따라 특정 물질과 반응할 수 있는 물질들을 고정화할 수 있는 면적도 작아지면서 고감도의 소형화

센서 개발의 심각한 한계가 나타나고 있다.

[0004] 또한 기존의 바이오센서는 전극 표면 처리를 통한 감도 향상에 중점을 두고 개발되어 왔다. 그러나, 암과 같이 질환들 중에는 단분자 물질까지도 검출이 불가피한 경우도 있다. 따라서, 다양한 질병에 대한 정확한 진단을 위해서는 고감도 못지않게 미량의 농도 검출과 재현성도 센서 개발에 있어 중요한 요소들이다. 따라서 본 발명에서는 고감도의 저농도 물질까지 검출이 가능하면서 재현성도 우수한 센서를 개발하였다.

[0005] 한편 전극 표면에 고정화되는 바이오물질의 양은 바이오센서의 감도에 영향을 미치는 중요한 요인들 중에 하나이기 때문에 이런 물질들을 고정화할 수 있는 유효면적 또한 고감도 센서 개발에 중요한 인자이다.

[0006] 이런 한계를 극복하기 위해, 나노 기술을 접목한 센서들이 개발되고 있는데, 이런 센서들 중 하나가 나노와이어를 이용한 것이다. 그러나 기존의 나노와이어들은 대부분 반도체를 이용한 것으로 고온, 고압 하에서 고가의 장비를 이용하여 합성되어야 하며, 이와 같은 반도체 나노와이어들의 대부분은 다공성의 멤브레인을 사용하지 않고서는 기판 위에서 수직으로 직접 합성하는 것이 쉽지 않다는 단점이 있었다. 반면 기존의 전도성 고분자를 이용한 바이오센서는 박막 구조가 많았으며, 이는 흡착을 이용하여 바이오 물질을 고정화함으로써 이들의 배향성 문제가 있었다. 또한 이들을 이용한 나노와이어 바이오센서는 반도체 나노와이어에 비하여 합성은 쉽지만 감도가 좋지 않은 문제점을 갖고 있었다.

[0007] 국내특허공개번호 제2000-8880호에는 고분자 음이온(AMPS)과 글루코스 옥시다아제(GOD)를 접합시킨 단백질 복합체를 전도성 고분자의 도펀트로 이용한 글루코오스 센서가 개시되어 있다. 종래의 글루코스 센서 제조에 사용된 단백질 고정화 방법의 문제점을 해결하기 위해, 상기 센서는 박막 전극 위에 고분자 박막 구조를 도핑한 형태의 센서 시스템을 구현하였다.

[0008] 또한 국내공개특허 제2005-104171호에는 Ag/AgCl 전극을 이용하여 글루코오스를 정량적으로 측정하는 방법이 개시되어 있으며, 국내공개특허 2004-26323호에는 중기공성 백금을 포함하는 바이오센서 및 이를 이용한 글루코오스 농도 측정방법이 개시되어 있다.

[0009] 그러나 상기 선행 발명들은 바이오센서에 효소를 고정화시킬 수 있는 전극 면적이 작아서 소형화가 어려울 뿐만 아니라 효소들의 배향성이 좋지 않기 때문에 전류의 흐름이 원활하지 않은 문제점이 있었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 감응 속도가 빠르고, 저농도의 글루코오스까지 검출이 가능한 고감도의 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 상기 다이아몬드 전극의 제조 방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 세 번째 과제는 상기 다이아몬드 전극을 포함하는 글루코오스 바이오센서를 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0013] 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 전도성 고분자로 이루어진 나노와이어(nanowire)가 형성되어 있으며, 상기 나노와이어에 효소가 고정되어 있는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 다이아몬드 전극은 보론이 도핑된 다이아몬드 전극인 것이 바람직하다.

[0015] 또한 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 전도성 고분자는 상기 폴리아세틸렌(polyacetylene), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리피롤(polypyrrole), 폴리티오펜(polythiophene), 폴리설퍼나이트라이드(poly sulfur nitride)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 이 중에서 폴리아닐린이 더욱 바람직하다.

[0016] 또한 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 효소는 글루코오스 옥시다아제인 것이 일반적이다.

[0017] 또한 본 발명의 또 다른 일실시예에 의하면, 상기 전도성 고분자의 나노와이어에는 백금(Pt) 나노입자가 분산되어 있는 것이 바람직하며, 백금(Pt) 나노입자의 크기는 30- 50 nm 범위인 것이 더욱 바람직하다.

[0018] 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 실리콘 기재 표면에 보론 도핑된 나노다이아몬드 박막을 형성하는 단계; 상기 나노다이아몬드 박막 상에 전도성 고분자의 나노와이어를 형성하는 단계; 상기 전도성 고분자의 나노와이어에 백금(Pt) 나노 입자를 분산시키는 단계: 및 상기 나노와이어와 효소를 결합시켜 고정하는 단계를 포함하는 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극의 제조 방법을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 보론 도핑된 다이아몬드 박막을 형성하는 단계는 a) 나노다이아몬드 입자 표면의 정전하와 반대되는 극성을 갖는 음이온성 고분자로 코팅하는 단계; b) 실리콘 기판을 상기 입자에 코팅된 고분자와 반대되는 극성을 갖는 양이온성 고분자로 표면처리하는 단계; c) 상기 음이온성 고분자로 코팅된 나노입자가 분산된 용액에 상기 양이온성 고분자로 표면처리된 기판을 침지시키는 단계; 및 d) 상기 기판에 화학기상증착법을 이용하여 보론 도핑된 다이아몬드 박막을 성장시키는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 상기 a) 단계의 음이온성 고분자는 폴리소듐 4-스타이렌설포네이트인 것이 바람직하고, 상기 b) 단계의 양이온성 고분자는 폴리디알릴디메틸 암모늄 클로라이드인 것이 바람직하다.

[0020] 상기 세 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 기준 전극, 상대 전극 및 작업 전극을 포함하는 글루코오스 바이오센서에 있어서, 상기 작업 전극은 표면에 전도성 고분자로 이루어진 나노와이어가 형성되어 있으며, 상기 나노와이어에 효소가 고정되어 있는 보론-도핑된 다이아몬드 전극인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서를 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 기준 전극은 Ag/AgCl 전극인 것이 바람직하고, 상기 상대 전극은 백금 전극인 것이 바람직하다.

효 과

[0022] 본 발명에 따른 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극은 실리콘 기재의 작업 전극상에 보론이 도핑된 다이아몬드 박막을 증착시키고, 백금이 분산된 전도성 고분자의 나노와이어를 다이아몬드 박막상에 도입함으로써, 글루코오스의 농도가 0.102 μM 정도의 매우 낮은 농도인 경우에도 검출이 가능한 고감도의 전기화학적 바이오센서를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 빠른 감응시간을 갖는 초고감도 바이오센서에 관한 것으로서, 나노테크놀로지와 바이오테크놀로지를 접목시킨 기술이다.

[0024] 본 발명의 실시예에 따른 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극은 표면에 전도성 고분자로 이루어진 나노와이어가 형성되어 있으며, 상기 나노와이어에 효소가 고정되어 있는 것이 특징이다. 이때, 상기 다이아몬드 전극은 보론이 도핑된 다이아몬드 전극인 것이 바람직하다.

[0025] 또한 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 전도성 고분자는 상기 폴리아세틸렌, 폴리아닐린, 폴리피롤, 폴리티오펜, 폴리설퍼나이트라이드로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 이때 폴리아닐린을 사용하는 것이 바람직하다.

[0026] 또한 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 효소는 글루코오스 옥시다아제인 것이 바람직하다.

[0027] 또한 본 발명의 또 다른 일실시예에 의하면, 상기 전도성 고분자의 나노와이어에는 백금(Pt) 나노입자가 분산되어 있는 것이 바람직하며, 백금(Pt) 나노입자의 크기는 30 - 50 ㎚ 범위인 것이 더욱 바람직하다.

[0028] 한편 본 발명의 일실시예에 따라 글루코오스 바이오센서용 다이아몬드 전극을 제조하는 방법은 실리콘 기재 표면에 보론 도핑된 나노다이아몬드 박막을 형성하는 단계; 상기 나노다이아몬드 박막 상에 전도성 고분자의 나노와이어를 형성하는 단계; 상기 전도성 고분자의 나노와이어에 백금(Pt) 나노 입자를 분산시키는 단계: 및 상기 나노와이어와 효소를 결합시켜 고정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0029] 이때, 상기 보론 도핑된 다이아몬드 박막을 형성하는 단계는 a) 나노다이아몬드 입자 표면의 정전하와 반대되는 극성을 갖는 음이온성 고분자로 코팅하는 단계; b) 실리콘 기판을 상기 입자에 코팅된 고분자와 반대되는 극성을 갖는 양이온성 고분자로 표면처리하는 단계; c) 상기 음이온성 고분자로 코팅된 나노입자가 분산된 용액에 상기 양이온성 고분자로 표면처리된 기판을 침지시키는 단계; 및 d) 상기 기판에 화학기상증착법을 이용하여 보론 도핑된 다이아몬드 박막을 성장시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 a) 단계의 음이온성 고

분자는 폴리소듐 4-스타이렌설포네이트인 것이 바람직하고, 상기 b) 단계의 양이온성 고분자는 폴리디알릴디메틸 암모늄 클로라이드인 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명은 또한 기준 전극, 상대 전극 및 작업 전극을 포함하는 글루코오스 바이오센서에 있어서, 상기 작업 전극은 표면에 전도성 고분자로 이루어진 나노와이어가 형성되어 있으며, 상기 나노와이어에 효소가 고정되어 있는 보론-도핑된 다이아몬드 전극인 것을 특징으로 하는 글루코오스 바이오센서를 제공한다. 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 기준 전극은 Ag/AgCl 전극인 것이 바람직하고, 상기 상대 전극은 백금 전극인 것이 바람직하다.

[0031] 다이아몬드는 생체 적합성 뿐 아니라, 화학 안정성, 열 전도성, 견고성, 광학적 특성이 우수하다. 그러나 다이아몬드 자체는 전기적 전류 전도가 안 되는 절연체이기 때문에, 보론을 가지고 도핑함으로써 반도체의 특성을 보이도록 하였다. 이와 같은 다이아몬드 전극의 기판은 높은 시그널-노이즈 비와 오랜 안정성, 높은 감도, 좋은 재현성 때문에, 기존 금이나 백금 등의 전극을 사용하였을 때보다 더 낮은 농도까지 검출이 가능하다.

[0032] 그러나 보론이 도핑된 다이아몬드 박막은 소수성을 띄므로, 친수성의 생체물질과 결합이 쉽지 않아 그에 따른 표면처리 기술이 요구된다. 또한 본 발명에서는 다이아몬드 박막 표면 처리와 전극면적을 개선하기 위하여 나노구조의 전도성 고분자를 도입하였다. 또 전도성 고분자 위에 백금 나노입자들을 분산시킴으로써 화학반응에 의해 생성된 전자 전달의 매개체 역할을 하였다. 이렇게 준비되어진 전극 위에 흡착 방법을 이용하여 바이오물질인 효소를 고정화함으로써 빠른 감응 속도와 저농도까지 감지할 수 있는 고감도의 바이오센서를 개발하였다.

[0033] 구체적으로 본 발명에서는 고감도의 저농도까지 검출이 가능한 센서를 개발하기 위하여 보론이 도핑된 다이아몬드 박막을 도입하였다. 또한, 보론이 도핑된 다이아몬드 박막은 소수성을 띄므로, 친수성의 생체물질과 결합이 쉽지 않아 대부분 표면 기능화를 주로 연구하고 적용하고 있다. 이 방법은 화학물질을 이용하는 방법으로 복잡하고 제한적이며 처리 시간이 길다. 따라서 본 발명은 극성/비극성 고분자 코팅 방법을 이용한 표면처리 기술을 적용하여 간단한 방법으로 이 문제를 해결하였다.

[0034] 또한 본 발명은 빠른 감응시간을 가지며, 저농도의 글루코오즈까지 검출할 수 있는 고감도의 전기화학적 바이오센서를 제공하기 위하여, 실리콘 기판 상에 전기화학적 방법을 이용하여 전도성 고분자로 나노와이어를 합성하여 그 면적을 극대화시킴으로써, 전극의 유효 표면적을 증가시킬 수 있었다. 본 발명에서는 전도성 고분자 나노와이어를 상온, 상압에서의 전기화학적 방법을 이용하여 다이아몬드 박막 위에 직접 합성하였으며, 감도 향상을 위해 이에 금속 나노입자, 바람직하게는 백금 입자를 분산시켜 화학반응에 의해 생성된 전자 전달의 매개체 역할을 하도록 했다. 일반적으로 금속막 자체는 쉽게 바이오물질들을 변이시켜 그의 활성을 저하시킨다고 알려져 있지만, 금속 나노입자에서는 쉽게 흡착된 바이오물질의 변성이 일어나지 않는다.

[0035] 또한 본 발명은 이렇게 준비된 백금 입자 표면에 많은 양의 바이오물질인 효소를 고정화함으로써 바이오물질인 효소를 고정함으로써 빠른 감응 시간과 저농도까지 감지할 수 있는 고감도의 바이오센서를 구현할 수 있었다.

[0036] 도 1은 본 발명에 따른 바이오센서의 구조도이다. 도면에 표시된 바와 같이, 좌측 전극이 작업 전극이며, 실리콘 기재에 다이아몬드 박막을 증착한 후 전도성 고분자 나노와이어을 형성하고, 그 위에 백금 나노입자를 분산시켰다. 한편 가운데 전극은 Ag/AgCl의 기준 전극이고 우측 전극은 백금(Pt) 상대전극을 나타낸다.

[0037] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이에 의해 제한되는 것은 아니다. 하기 실험에서, 모든 전류의 측정은 3개의 전극 셀이 연결된 auto-lab microAUTOBIII(Eco Chemie, 네덜란드)로 측정되었다. 본 발명의 일실시예에 따른 바이오센서의 전극은 백금(Pt) 상대전극, Ag/AgCl 기준전극 및 보론 도핑된 나노다이아몬드 작업 전극으로 구성된다.

[0038] 실시예 1: 다이아몬드 전극의 제조

[0039] 1 μm 두께의 열산화된 실리콘을 기재로 사용하여 나노다이아몬드를 합성했다. 먼저 나노다이아몬드 입자와 폴리소듐 4-스타이렌설포네이트(PSS; MW 70,000) 10% 수용액을 Attrition mill을 이용하여 5시간 동안 1000 rpm으로 혼합했다. 밀링 공정 후에, 양이온성 나노다이아몬드 입자는 음이온성 폴리소듐 4-스타이렌설포네이트로 코팅되었다.

[0040] 한편 10 부피% 폴리디아릴디메틸 암모늄 클로라이드 수용액에 실리콘 기재를 30분 동안 담갔다가, 탈이온수로 기재를 세척함으로써 열산화된 실리콘 웨이퍼(산화물 두께: 1 ㎛)를 양이온 고분자로 코팅하였다. 이 과정을 통하여 대부분의 양잉온성 고분자가 용해되고, 기재와 직접적인 정전기적으로 접촉된 가장 안쪽 층만이 남는다. 같은 방법으로, 음이온성 폴리소듐 4-스타이렌설포네이트로 코팅된 다이아몬드 나노크리스탈 시드를 양이온성 기재표면에 밀도있게 부착시켰다.

[0041] 결과적으로, 열적으로 산화된 실리콘 웨이퍼 표면상에 폴리디아릴디메틸 암모늄 클로라이드/폴리소듐 4-스타이렌설포네이트-나노다이아몬드(SiO_2/PDDA/PSS-ND) 구조의 시드층이 형성되었다. 상기 나노크리스탈 시드층으로부터, 핫필라멘트 화학적 기상 증착법(HFCVD)을 사용하여 보론-도핑된 폴리크리스탈린 다이아몬드 필름을 성장시켰다. $B_2H_6/CH_4/H_2$ 가스를 사용하였으며, B_2H_6, CH_4 및 H_2 의 유속은 각각 0.05 sccm, 1 sccm 및 100 sccm 이었다. 또한 증착 과정은 800℃에서 5시간동안 총압력 90 torr 로 수행되었다. 폴리크리스탈린 다이아몬드의 막의 두께는 약 1 ㎛ 였다.

[0042] 도 2에는 보론-도핑된 나노다이아몬드 전극의 SEM 이미지가 잘 나타나있다. 이때 측정된 보론-도핑된 나노다이아몬드 전극의 두께는 1 ㎛ 였다.

[0043] 실시예 2: 고분자 나노와이어 합성 및 백금 나노입자의 분산

[0044] 다음으로, 일정 전압하에서 전기화학적 증착법을 사용하여 아닐린 중합이 수행되었다. 0.2 M H_2SO_4와 0.1 M 아닐린을 포함하는 전해질 용액에서 1.5 V 조건으로 30분 동안 보론-도핑된 나노다이아몬드 전극 상에 폴리아닐린 나노와이어을 전기화학적으로 증착했다. 그 후 증류수로 세척한 다음 40℃ 오븐에서 하루 동안 건조시켰다.

[0045]

[0046] 그 다음 상기 전극을 0.5 M H_2SO_4 와 2.0 mM K_2PtCl_6 중에서 다중순환 전압전류방법(multi-cyclic voltammetry: CV)을 이용하여 50 mV s^{-1} 속도로 0.40 내지 -0.25 V 전압 조건에서 처리하여 폴리아닐린 나노와이어 중에 백금(Pt) 나노클러스터를 삽입시켰다. 이때 사용된 백금(Pt) 나노입자의 크기는 제한되지 않으나, 30- 50 nm 범위인 것이 바람직하다. 그 이유는 분산성이 우수하여, 바이오센서의 감도를 향상시키기 때문이다.

[0047] 이에 따라 보론-도핑된 다이아몬드/폴리아닐린 나노와이어/백금 나노입자를 포함하는 전극이 형성되었다. 최적화된 사이클수는 약 60이었다.

[0048] 도 3에는 본 발명에 따른 작업 전극의 제조 과정을 보여주는 순서도가 나타나있다. 또한 도 4에는 폴리아닐린 중합 및 효소 고정 과정에 대한 화학 반응식이 도시되어 있다.

[0049] 한편 도 5에는 백금 나노입자의 전기화학적 증착 전(a)과 후(b)를 보여주는 폴리아닐린 나노와이어의 네트워크를 보여주는 SEM 이미지가 나타나있다. 도 5a에서 확인할 수 있는 바와 같이, 폴리아닐린 나노와이어의 나노다공성 네트워크는 다수의 백금 나노입자들과 효소 고정을 위한 이상적인 표면을 제공할 뿐만 아니라, 활성 부위에 분석체를 더 많이 수송할 수 있고 더 쉽게 접근시킬 수 있다. 또한 도 5b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 백금 나노입자들은 폴리아닐린 나노와이어 표면에 잘 분산되어 부분적으로 삽입되어 있다. 이와 같이 잘 분산된 백금(Pt) 나노촉매는 효소 반응에 의해 생성된 과산화수소의 전기적산화를 위한 전기촉매적 활성을 증가시킬 수 있다.

[0050] 실시예 3: 효소고정

[0051] 글루코오스 옥시다이제 효소를 함유한 용액(1000 U/ml)에 담금으로써 백금 입자의 표면상에 효소를 직접 고정시켰다. 효소층이 형성된 후에, 전극을 인산완충용액 용액을 흘려주면서 헹구어 잔여 모노머 또는 약하게 연결된 효소 분자를 제거했다.

[0052] 시험예 1: 개질 전극의 감도 측정

[0053] 글루코오스 바이오센서의 반응은 효소 촉매 반응에서 생성된 H_2O_2의 전기화학적 산화와 관련되어 있다. 반응 메

카니즘은 아래와 같다.

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{GO_x} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

[0054]

[0055] 상기 반응에서 보여지는 바와 같이, 본 발명에서 관심이 되는 바이오분자는 글루코오스이며, 과산화수소는 환원 또는 산화반응의 부생성물이지만, 본 발명에 따른 센서는 과산화수소를 감지함으로써 글루코오스를 측정하게 된다.

[0056] 다시 말해서, 글루코오스는 글루코오스의 효소 촉매적 산화로부터 생성된 과산화수소의 전기화학적 감지에 의해 검출되는 간접적인 방식으로 정량화할 수 있다. 이때, 매트릭스에 분산된 백금 나노입자는 H_2O_2의 산화에 촉매작용을 하며, 센서의 감도를 높이게 된다.

[0057] 본 발명에 따른 폴리아닐린-나노와이어의 네트워크 구조는 수많은 백금-나노입자를 고정시킬 수 있는 이상적인 표면일 뿐만 아니라, 활성 부위에 분석물질을 더 많이 이동시키고, 더 쉽게 접근시킬 수 있다. 또한 본 발명에서 백금-나노입자는 잘 분산되어, 폴리아닐린-나노입자 표면에 부분적으로 삽입되어 있다.(도 3B) 따라서 잘 분산된 백금 나노촉매는 효소 반응에 의해 생성된 과산화수의 전기적 산화를 위한 전기촉매적 활성을 증가시킬 수 있다.

[0058] 도 6은 a) 글루코오스 용액이 없을 경우와, b) 2mM의 글루코오스 용액의 존재하에서 50 mV/s의 스캔 속도로 측정한 보론-도핑된 다이아몬드/폴리아닐린 나노와이어/글루코오스 전극의 전형적인 다중순환 전압전류(CV) 측정 결과이다. 글루코오스의 존재하에, 본 발명에 따라 개질된 전극의 CV 전류값은 산화 피크 전류의 증가에 따라 급격하게 변화했다. 이는 글루코오스에 대한 바이오센서의 전류 반응이 글루코오스 옥시다아제(GOx)의 촉매적 효과에 기인한 것임을 나타내며, 고정된 글루코오스 옥시다아제가 그 활성을 유지한다는 것을 보여준다. 다시 말해서, 글루코오스에 대한 전기화학적 촉매 특성을 보여준다.

[0059] 한편 +0.40 V vs. Ag/AgCl의 전압을 적용하여 50mM 인산완충용액 중에서 준비된 글루코오스 수용액 샘플을 사용하여, 본 발명에 따라 개질된 나노다이아몬드 전극 상에서 글루코오스의 전류를 측정했다.

[0060] 앞선 연구에서, 본 발명자는 금(Gold) 기재상에 백금 분산된 폴리아닐린 나노로도로 개질된 글루코오스 센서를 제조했으며, 이때 그래프의 선형 범위는 0.3 과 2.5 mM 사이였다. 이에 비해, 본 발명은 5.94 μM부터 0.514mM의 비교적 넓은 농도 범위에서 선형성을 나타내었으며, 기울기는 5.54 μA/mM (상관계수 r=0.9947)였다. 또한 검출한계는 0.102 μM로서 상당히 낮은 농도에서도 검출이 가능하였다. 본 측정 결과는 도 7에 도시하였다.

[0061] 이러한 결과로부터, 본 발명이 훨씬 더 낮은 농도의 글루코오스까지 검출할 수 있다는 것을 알 수 있으며, 나노다이아몬드 기재가 낮은 농도에서의 분석에 적합하다는 것을 확인할 수 있다. 또한 다이아몬드 박막 위에 전도성 고분자 나노와이어을 적용함으로써 표면 처리가 쉬워졌으며 다양한 방법으로 바이오물질 고정화가 가능해졌다. 또한 종래의 글루코오스 바이오센서에 비해 매우 높은 감도를 나타냈다. 이 결과로부터, 백금 나노입자가 분산된 전도성 고분자 나노선을 이용한 처리 방법이 센서의 감도를 크게 향상시키는 것을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 본 발명에 따른 글루코오스 바이오센서의 구조도이다.

[0063] 도 2는 보론 도핑된 나노다이아몬드의 SEM 이미지로서, 나노다이아몬드의 두께는 약 1㎛ 이다.

[0064] 도 3은 개질된 작업 전극의 제조 과정을 보여주는 순서도이다.

[0065] 도 4는 폴리아닐린 중합 및 효소 고정 과정에 대한 화학 반응식이 도시된 도면이다.

[0066] 도 5는 백금 나노입자의 전기화학적 증착 전(a)과 후(b)를 보여주는 폴리아닐린 나노와이어의 네트워크를 보여

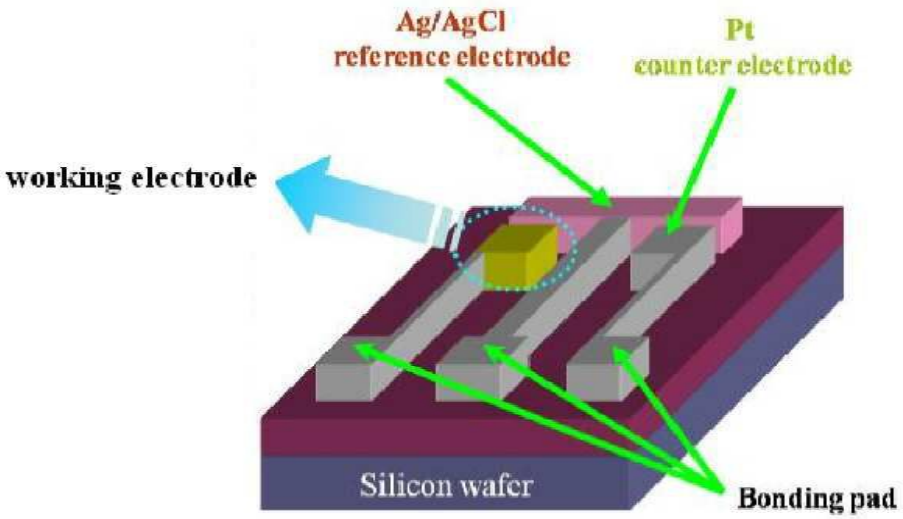
주는 SEM 이미지이다.

[0067] 도 6은 글루코오스가 없는 경우(실선)와 글루코오스가 있는 경우(점선)의 백금 분산된 폴리아닐린 나노와이어로 개질된 나노다이아몬드 전극의 순환 전류(Cyclic votammograms) 측정값을 나타낸 그래프이다.

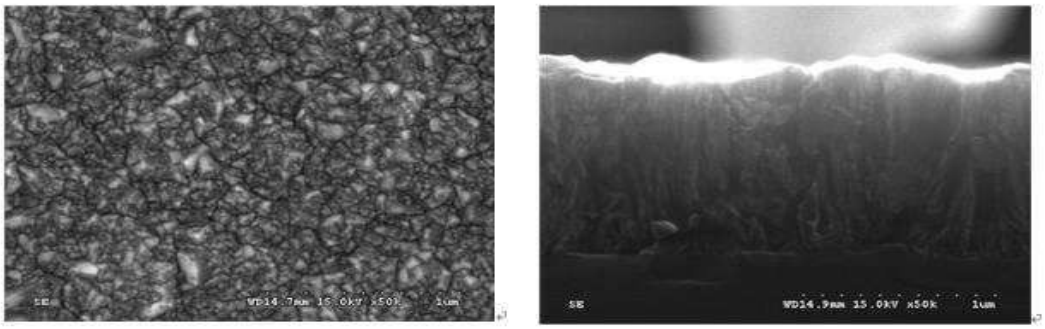
[0068] 도 7은 글루코오스 농도와 반응 전류의 변화를 보여주는 그래프로서, 내부 그래프는 글루코오스 농도가 $5.94x10^{-6}$ 부터 5.14×10^{-3} M 범위일 때의 센서의 교정 그래프이다.

도면

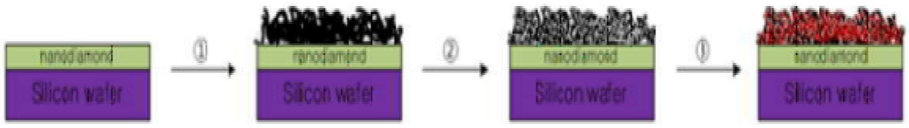
도면1



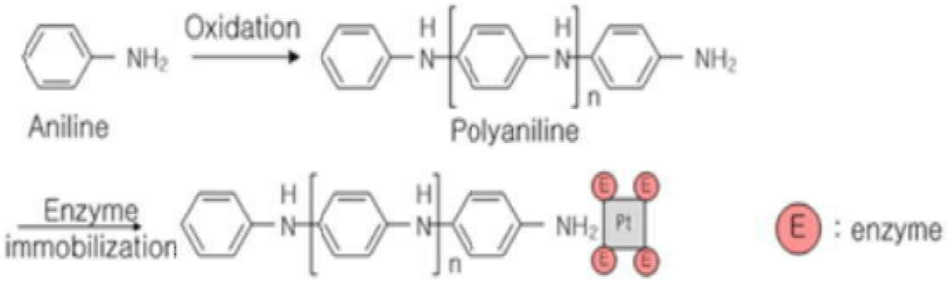
도면2



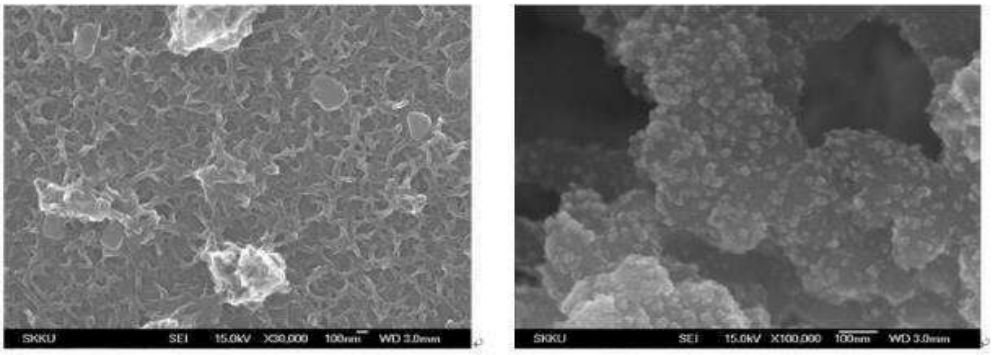
도면3


nanodiamond
Silicon wafer
①
②
③

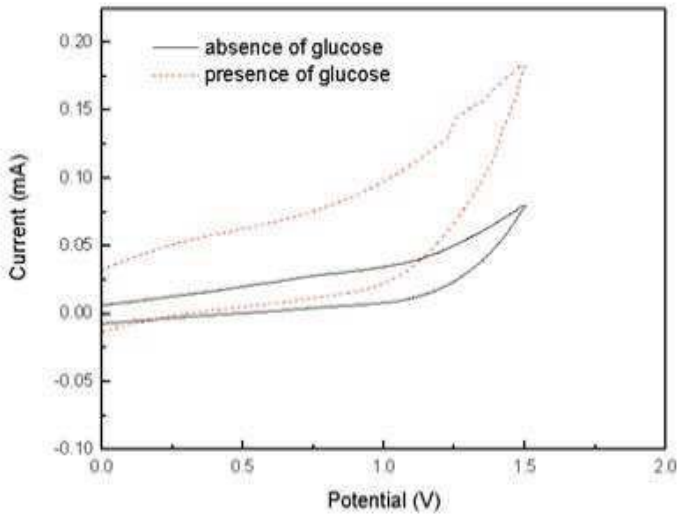
도면4


Oxidation
NH2
Aniline
Polyaniline
Enzyme
immobilization
Pt
E : enzyme

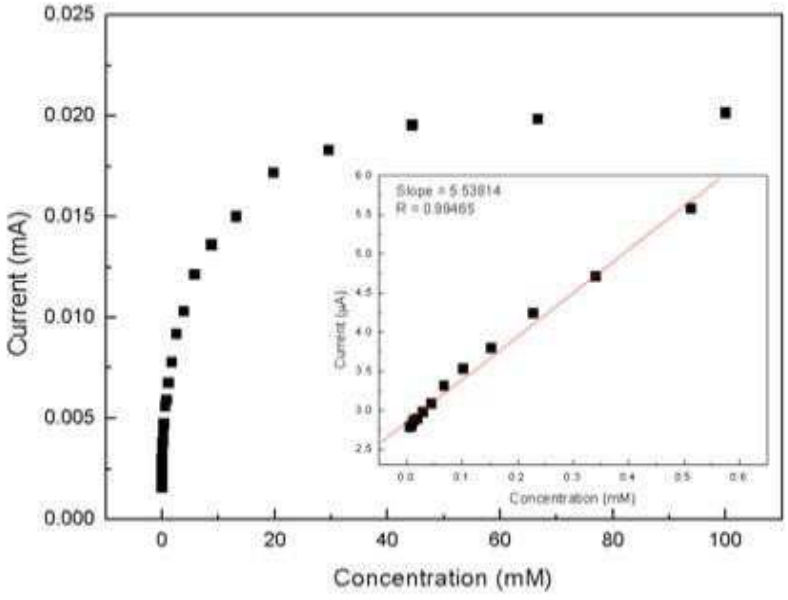
도면5



도면6


absence of glucose
presence of glucose
Current (mA)
Potential (V)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-0.10
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0

도면7


Current (mA)
Concentration (mM)
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
0
20
40
60
80
100
Slope = 5.53814
R = 0.99465
Current (μA)
Concentration (mM)