

PVA계 감광성 수용성 고분자의 합성 및 Lipid 센서에의 응용

박 이 순 · 김 기 현 · 하 기 룡* · 장 진 규**

경북대학교 고분자공학과, *계명대학교 화학공학과, **동의공업전문대학 화공과

(1993년 2월 18일 접수)

Synthesis of PVA Type Photosensitive Water Soluble Polymer and Application to Lipid Sensor

Lee Soon Park, Gi Hyeon Kim, Ki Ryong Ha*, and Jin Gyu Chang**

Department of Polymer Science, Kyungpook National University, Taegu, Korea

*Department of Chemical Engineering, Keimyung University, Taegu, Korea

**Department of Industrial Chemistry, Donggeui, Technical Junior College, Pusan, Korea

(Received February 18, 1993)

요 약 : Lithography 공정을 이용한 바이오 센서 감지막 형성을 위하여 수용성 고분자인 polyvinyl alcohol(PVA)에 감광성기인 4-[2-(4-formylphenyl)ethenyl]pyridinium methosulfate(SbQ)염을 결합시켜 수용성 감광성 고분자(PVA/SbQ)를 얻었다. PVA/SbQ치환율을 자외선(UV) 흡광법으로 정량하였으며, PVA/SbQ 수용액 농도 및 SbQ 치환율에 따른 박막의 두께에의 영향 및 가교 반응 특성을 조사하였다. PVA/SbQ 수용액(SbQ 1 mole%, 농도 10 wt%) 자체의 막형성 실험으로부터 스핀 코터의 회전수는 2,500~3,000 rpm, 진공 건조는 상온에서 30분, UV 조사시간은 20~30초, 증류수에서의 현상시간은 30초가 적정 조건임을 알았다. 상기 PVA/SbQ 수용액 200 μ L에 BSA 7.5 mg, lipase 10 mg을 포함하는 현탁액을 사용하여 Si_3N_4 박막형 pH-ISFET의 gate 부위에 감지막을 형성하였으며 이 lipid 센서는 triacetin에 대하여 10~100 mM 농도 범위에서 출력 전압이 직선성의 검정선을 나타내었다.

Abstract : For the biosensor membrane formation utilizing photolithography method, polyvinyl alcohol (PVA) was combined with 4-[2-(4-formylphenyl)ethenyl]pyridinium methosulfate(SbQ) through acetal linkage to give photosensitive water soluble polymer, PVA/SbQ. The degree of substitution of SbQ group in PVA was determined by ultraviolet(UV) spectrophotometry. The effect of concentration of PVA/SbQ in water and degree of substitution of SbQ on the thickness of film and other photolithographic properties were examined. From the film formation study on silicon chip using PVA/SbQ (SbQ 1 mole%, 10 wt%) aqueous solution, the spin coating speed of 2,500~3,000 rpm, vacuum drying time of 30 min at room temperature, UV irradiation time of 20~30 sec, developing time of 30 sec in distilled water were found to be optimum condition. Lipid sensor membrane was prepared on the gate area of pH-ISFET coated with Si_3N_4 thin film by photolithographic method using aqueous suspen-

sion of 7.5 mg of BSA and 10 mg of lipase in 200 μ L of above PVA/SbQ solution. This lipid sensor exhibited a linear calibration curve in the 10~100 mM range of triacetin as a lipid sample.

서 론

효소 등 생체 활성 물질이 가지는 우수한 분자 식별 능력을 이용한 바이오센서(biosensor)가 최근 많이 이용되고 있다.¹ 그 중에서 센서 크기의 최소화, 양산화 및 제품 규격화의 관점에서 반도체 제조 공정을 활용하는 FET(field effect transistor)형 반도체 바이오 센서가 주목을 받고 있다.² 바이오 센서의 구조는 보통 효소를 고정화한 감지막과 감지막에서 인식된 결과를 전기적 신호로 내보내는 변환기로 구성되어 있다.³

바이오 센서에 있어서 감지막의 형성은 감도(sensitivity), 감지 시간에 직접적인 영향을 줄 뿐 아니라 센서의 저장 및 운용 안정성에도 관계가 있다. 감지막에 효소를 안정화하는 몇 가지 방법중 효소와 직접 결합을 배제함으로써 효소에 주는 영향을 최소화 할 수 있고, 반도체 칩 위의 미소 부위에 패던 가능한 점 및 반도체 제조 공정에 적용 가능한 점 등을 들어 photolithography법에 의한 효소 고정화(entrapment) 방법이 유용하게 쓰인다. 이러한 목적으로 몇 종류의 감광성 수용성 고분자가 사용되었다. Nakako 등은 polyvinylpyrrolidone 수용액에 4,4'-diazidostilbene-2,2'-disulfonic acid, sodium salt 감광제를 첨가하고 광가교 반응을 통하여 감지막을 형성하였다.⁴ Gotoh 등은 polyvinylbutyral를 감지막 형성 고분자로 사용하였으며,⁵ Harrison 등은 광중합형 가소제와 PVC를 이용하여 valinomycin을 고정화한 K^+ 이온 센서에 대해 보고하였다.⁶ 그러나 감지막 물질로는 효소에 대한 독성이 적고 효소를 균일하게 분산시킬 수 있는 수용성 고분자를 사용함이 바람직하다. Y. Hanazato 등은 감광성 수용성로서 polyvinyl alcohol(PVA)를 기질 고분자로 하고 여기에 stilbazolium(SbQ) 감광성기를 도입하여 glucose oxidase를 고정화한 포도당 센서에 대하여 보고하였다.⁷ 본 연구에서는 PVA/SbQ 감광성 수용성 고분

자를 합성하고 이를 이용하여 lipid 분해 효소인 lipase를 고정화한 lipid 센서를 제조함에 있어서 lithography 공정 성질 및 센서 특성에 대하여 조사하였다.

실 험

시약 및 기기. 자외선에 의해 반응을 유발하는 감광성기인 1-methyl-4-(formylstyryl)pyridinium methosulfate(stibazolium 혹은 SbQ)의 합성에 필요한 terephthalaldehyde, picoline, dimethyl sulfate 등은 각각 시약급(Aldrich Chemical Co.)을 정제없이 사용하였으며, PVA는 Aldrich사의 시약급(88% hydrolyzed, $M_w=77,000\sim79,000$)을 사용하였다. 효소로는 lipase(L-9767, E.C. 3.1.1.3, 17,300 units/mg solid) 및 BSA(bovine serum albumin)은 Signia Chemical의 시약급을 사용하였다. 합성된 물질의 확인을 위하여 FT-IR(MIDAC), 1H NMR(60 MHz, Varian)을 사용하였으며, SbQ의 PVA에의 치환율 측정을 위해서는 Shimadzu UV-2100 spectrophotometer를 사용하였다.

감광성 수용성 고분자 PVA/SbQ를 이용한 막 형성 실험에는 스핀 코터, 진공 건조기 및 Karl-Suss사의 mask aligner를 사용하였다. 막막 형성 실험에서 현상용액으로는 탈 이온수를 사용하였으며, 건조된 막막의 두께 측정을 위해서는 Tencor Instrument사의 α -step을 사용하였다.

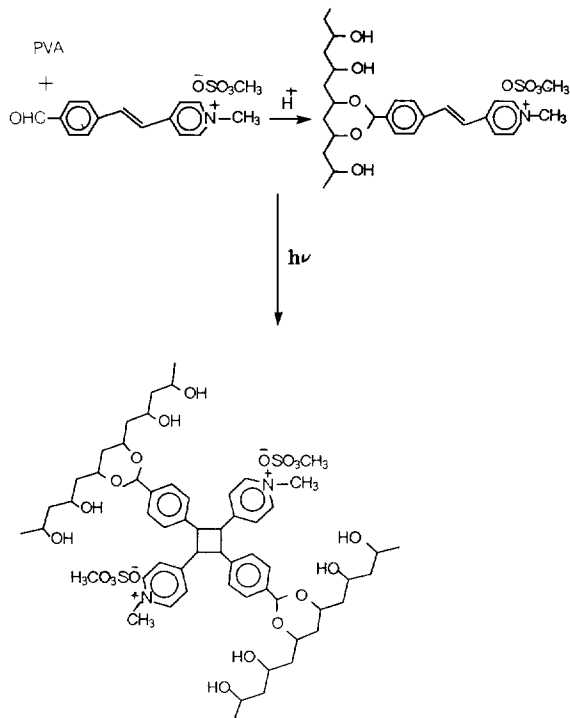
감광성 수용성 고분자의 합성

4-[2-(4-formylphenyl)ethenyl]pyridinium methosulfate(SbQ)염의 합성.^{4~10} 1 mol 당량의 γ -picoline과 2 mol 당량의 terephthalaldehyde를 acetic anhydride와 acetic acid 혼합 용매에 가하고 6시간 동안 125~130°C 정도로 온도를 유지한 채 reflux하면서 반응시켰다. 반응물을 뜨거운 채로 HCl 수용액에 가한 다음 미반응 terephthalaldehyde를 결정화 시

키고 이를 여과하여 제거하였다. 미반응 terephthalaldehyde 염을 제거한 모액을 35℃로 승온한 다음 잔류 terephthalaldehyde를 더 제거하기 위하여 벤젠으로 수회 추출한 후 남아있는 HCl을 10wt% NaOH 수용액을 가하여 중화(pH=7.0~7.4)시켰다. 이를 증류수로 2회 정도 세척하여 남아있는 acetic acid를 제거하였다. 여과된 결정을 ethyl acetate에 용해시키면 terephthalaldehyde의 양말단이 모두 γ -picoline과 결합한 1,4-bis[2-(4-pyridyl)ethenyl]benzene이 노랑색의 결정으로 석출되었는데 이것을 여과하여 제거하였다. 여과액을 건조시켜 4-[2-(4-formylphenyl)ethenyl]pyridine을 얻었으며, 이 반응의 수율은 50%이었다.

합성된 4-[2-(4-formylphenyl)ethenyl]pyridine을 다시 ethyl acetate용매에 용해시켜 약 1.2 mol 상당의 dimethyl sulfate를 가하고 2~3분 정도 교반 후 하루 정도 방치하면 감광성인 1-methyl-4-(formylstyryl)pyridinium methosulfate(SbQ)염 결정이 석출되었다. 이를 여과하여 분리하고 ethyl acetate로 세척해 미반응 4-[2-(4-formylphenyl)ethenyl]pyridine를 제거한 후 건조하였으며, 이 때의 수율은 70%이었다.

PVA/SbQ의 합성. 앞서 제조한 SbQ 0.5~1.5 g과 85% phosphoric acid 0.57 g을 6~12% PVA 수용액에 가하여 빛을 차단한 상태에서 약 44시간 정도 교반하면서 반응시킨 후 반응물 용액을 900 ml의 아세톤에 서서히 교반하면서 부어 SbQ 감광성기가 결합된 PVA/SbQ polymer를 침전시켰다. 상등액을 기울여 따르기(decantation)하여 버리고 얻어진 침전물에 포함된 PVA/SbQ를 정제하기 위하여 Soxhlet 장치를 사용하여 메탄올로 8시간 추출하였다. 정제된 PVA/SbQ는 빛이 차단된 상태에서 실온하에서 24시간 진공 건조하였다. 정제된 PVA/SbQ 감광성 고분자의 10 wt% 수용액을 제조하고 잔존하는 소량의 산(HCl)을 중화시키기 위하여 Orion Research사의 pH meter를 이용하여 2 wt% KOH 수용액을 사용하여 pH=7.0~7.4 정도로 중화시켰다. 이 반응의 수율은 50~60%였다.



Scheme. 1. Preparation and photocrosslinking of PVA having stilbazolium group.

결과 및 고찰

PVA/SbQ의 합성 및 SbQ 도입량. 10 wt%의 PVA/SbQ 감광성 고분자 수용액을 이용하여 실리콘 반도체 chip위에 스핀 코터를 사용하여 도포하고 진공 건조하여 얇은 막을 형성한 다음 mask를 장치한 UV 노광기(Karl-Suss사)를 사용하여 10~90초에 걸쳐 노광한 후 탈이온수를 현상액으로 사용하여 UV 광을 받지 않은 부분을 용해시켜 박막(negative pattern)을 형성하였다. PVA/SbQ를 이용한 막 형성과정을 반응식으로 나타내면 Scheme 1과 같다.

가교 전 및 후의 PVA/SbQ 박막의 IR 스펙트럼으로 부터 다른 흡수띠는 변화하지 않았으나, 1,700 cm^{-1} 부근에서 나타나는 alkene peak가 가교 반응 후에 보이지 않는 것으로 보아 Scheme 1에 나타난 것처럼 stilbazolium group(SbQ)이 photocyclodimerization 반응에 의해 가교화 되었음을 확인할 수

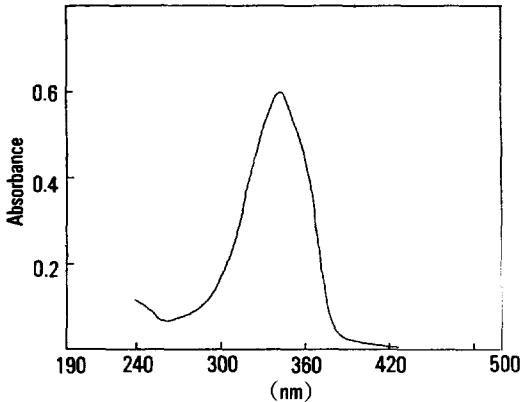


Fig. 1. UV absorbance of 1-methyl-4-(formylstyryl) pyridinium methosulfate.

있었다.

PVA는 수용성 고분자로서 분자량 및 검화정도가 다른 몇 가지 grade가 알려져 있으며, PVA의 -OH 기들 중 일부를 치환하여 SbQ를 도입할 때는 사용한 PVA의 종류 및 반응 조건에 따라 SbQ의 도입량이 달라지게 되므로 이의 정량이 문제가 된다. SbQ염 및 감광성기가 도입된 PVA/SbQ의 UV 스펙트럼을 각각 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타내었는데 이들로부터 PVA에 SbQ가 측쇄로 도입되어도 342 nm의 특성 흡수띠에는 변화가 없었다. 또 Fig. 2의 아래 부분에 점선으로 나타난 것과 같이 342 nm에서 PVA 자체는 SbQ의 UV 흡광도에 거의 영향이 없으므로 Fig. 3에 나타난 SbQ의 검정선을 이용하여 Fig. 2에 나타난 것과 같이 반응 조건을 달리하였을 때 PVA의 -OH에 대한 SbQ 도입량을 정량하였으며, 이를 요약하면 다음과 같다.

SbQ의 분자량 : 320 g/mol

PVA의 평균 분자량 : 78,000 g/mol

PVA의 평균 반복단위 수 = $(78,000 \text{ g/mol}) / (44 \text{ g/mol}) = 1,772$

PVA의 -OH group의 수 = $1772 \times 0.88 (\text{hydrolyzed}) = 1,559$

A : PVA-SbQ의 UV 흡광도

a : A 흡광도를 나타내는 PVA-SbQ의 농도(g/l)

b : A 흡광도를 나타내는 SbQ의 농도(g/l)

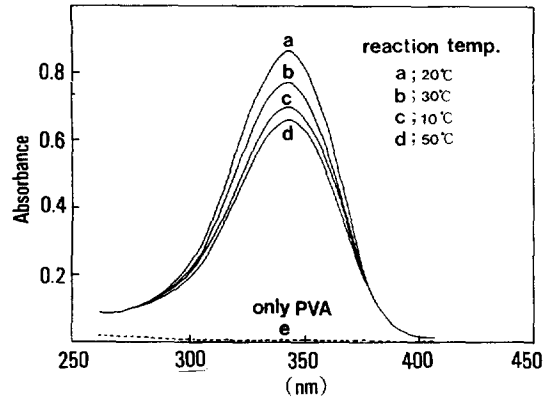


Fig. 2. UV absorbance of PVA having stilbazolium group (conc. = 1.25 g/l).

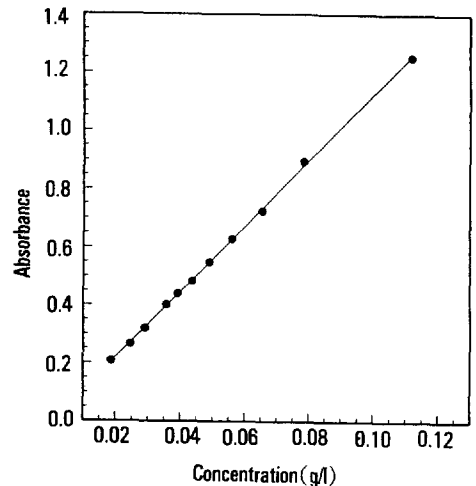


Fig. 3. UV absorbance vs. concentration of 1-methyl-4-(formylstyryl) pyridinium methosulfate (342 nm).

$$c : a - b \{ \text{PVA 만의 농도 (g/l)} \}$$

$$\text{SbQ의 도입량 (\%)} = (b \text{의 mol 수} \times 100) / (c \text{의 mol 수} \times 1,559)$$

Fig. 4은 반응온도에 따른 SbQ 흡광도(342 nm)와 도입량을 도시한 것으로서 20°C에서 SbQ의 도입량이 가장 많음을 나타내고 있으며 PVA의 -OH 100개당 20°C에서는 1.05개 정도, 50°C에서는 0.77개 정도의 SbQ가 도입되었음을 보여주고 있다.

SbQ 감광성기를 PVA에 결합시키는 과정^{8~14}에

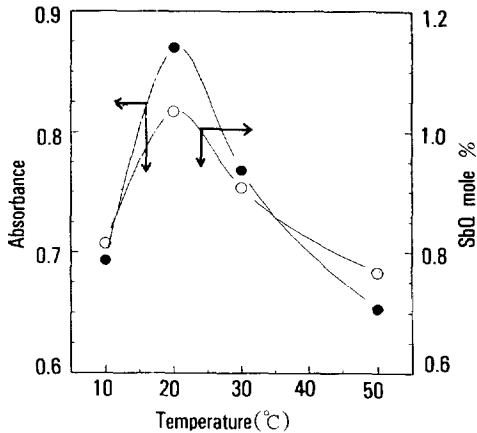


Fig. 4. Absorbance and SbQ mole % vs. reaction temperature (°C). (PVA/SbQ = 11.32/1.0, reaction time = 44 hrs)

있어서 한가지 중요한 점은 다른 감광성 고분자들이 많게는 10 mol% 까지 감광성기를 도입하여야 가교화 반응이⁸ 이루어 지는데 반하여 PVA에 stilbazolium group를 도입하면 약 0.8~1.0 mol%의 저농도의 감광성기만 도입하여도 UV광에 의해 가교화가 쉽게 그리고 견고하게 이루어질 수 있다는 점이다.^{6~17} 이것은 stilbazolium 자체가 소수성(hydrophobicity)이 강하므로 친수성인 PVA에 도입이 되면, 수용액 중에서 소수성 회합(hydrophobic association)이 일어나기 때문에 UV광에 의해서 photodimerization 반응이 매우 높은 수율로 진행되기 때문인 것으로 생각된다.

PVA/SbQ의 막 형성 성질. 통상의 반도체 공정에서 photoresist를 사용한 경우 80°C 정도의 건조기에 넣고 bake 하여 건조막을 형성하지만, 바이오 센서의 경우에는 polymer matrix 내에 효소가 있으므로 상온에서 진공 건조를 하여야 할 필요가 있다. PVA/SbQ의 상온 진공 건조는 30분~1시간 정도면 충분히 건조된 막이 형성되어 깨끗한 패턴이 얻어졌다. 다음으로 UV 조사 시간이 문제가 되는데 UV 조사 시간이 15초 이하이면 갈라지거나 일부가 와해된 패턴이 나타났으며 조사 시간을 20~30초 정도로 하였을 때 충분한 가교 반응이 이루어져 깨끗한 패턴이 형성되었다. 이상 일련의 막 형성 기초 실험으

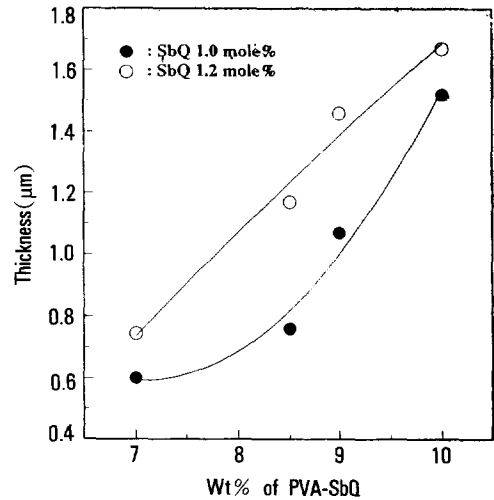


Fig. 5. Effect of PVA/SbQ wt% in PVA/SbQ aqueous solution on the film thickness (SbQ 1.0 mole % (●), SbQ 1.2 mole % (○)).

로부터 PVA/SbQ계의 최적 박막 형성 조건은 스핀 코터의 회전수 2,000~3,000 rpm, 진공 건조 시간은 30분~1시간, UV 조사 시간은 20~30초, 탈이온수에서의 현상 시간은 20~30초가 적당함을 알았다.

이와 같은 조건을 사용하여 PVA/SbQ의 농도 및 SbQ 도입량에 의한 영향을 보기 위하여 스핀 코터의 회전수를 3,000 rpm으로 고정하고 감광성기 SbQ를 1.0 및 1.2 mol% 도입한 감광성 수용성 고분자 PVA-SbQ의 수용액 농도를 7.0에서 10.0 wt%로 바꿀 때 생성된 필름의 두께 변화를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 7로부터 SbQ의 도입량이 1.2 mol%일 때 막의 두께가 1.0 mol% 보다 약간 더 두꺼워지며 1.2 mol%의 경우는 polymer의 wt%와 두께 사이에 좋은 직선 관계가 성립함을 볼 수 있으며 따라서 원하는 두께를 위한 적정 농도의 예측이 가능하였다.

다음으로 PVA-SbQ 수용액에 지질 분해 효소인 lipase와 BSA(bovine serum albumin)를 첨가하여 감지막 형성 조건을 조사하였다. PVA-SbQ 수용액 200 μL에 BSA 7.5 mg, lipase 10 mg를 넣고 vortex mixer로 10분간에 걸쳐서 잘 분산시킨 후 스핀 코터의 회전수를 3,000~6,000 rpm으로 변화시키면서 얻은

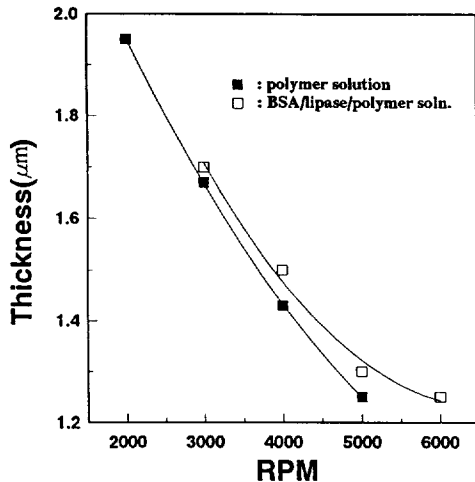


Fig. 6. Effect of spin coating speed on the film thickness of the polymer solution(■) and BSA/lipase/polymer solution(□) in the PVA-SbQ system.

감지막의 두께 변화를 효소를 넣지 않은 경우와 비교하여 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 6에서 BSA와 lipase를 첨가한 경우 막의 두께가 첨가하지 않은 경우보다 두껍게 나타났는데 이것은 현탁액의 점도 증가에 기인한 것으로 생각되었다.

Lipid 센서의 특성. Lipid 바이오 센서의 바탕 소자인 pH-ISFET는 문헌의 방법에 따라 제조된 것을 사용하였다.¹⁵ 효소 감지막을 pH-ISFET의 게이트 부분($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$) 위에 올리기 전에 먼저 SiO_2 를 제거하여 수소 이온 감도를 증가시키기 위하여 HF(1 : 50) 수용액으로 1분 정도 처리하고 탈 이온수로 세정하였다. PVA-SbQ 수용액 200 μL 에 BSA 7.5 mg, lipase 10 mg을 포함하는 현탁액을 pH-ISFET chip 위에 6,000 rpm의 회전수로 spin coating한 후 진공 데시케이터를 사용 45분 동안 진공 건조시켰다. 감광막이 도포된 chip을 Karl-Suss사제 mask aligner로 노광한 다음 게이트 이외의 부분을 탈 이온수로 용해 제거하였다. 이렇게 만든 소자를 잘라 헤더(header)에 붙이고 결선을 한 다음 게이트를 제외한 나머지 부분을 silicon rubber로 encapsulation하였다.

제조된 지질 센서를 이용한 지질 농도의 측정에

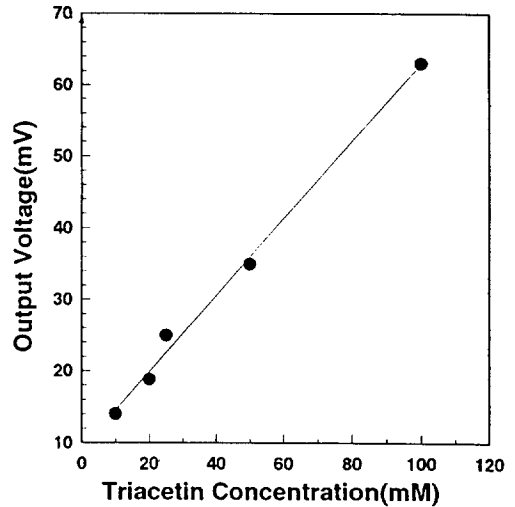


Fig. 7. The output voltage vs. triacetin concentrations (mM).

있어서 사용한 합성 생리수 용액은 탈 이온수 1L당 0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.008 M Na_2HPO_4 , 0.0015 M KH_2PO_4 를 포함하는 완충용액으로서 pH는 7.4이었고 기준 전극으로는 Ag/AgCl 전극을 사용하였다. 지질의 한 종류인 triacetin이 지질 센서의 lipase 효소와 반응하면 초산이 유리되고 이것이 pH-ISFET 바탕소자에 전압 변화를 일으키게 된다.^{7, 14, 15} Triacetin 50 mM에 대한 출력 전압은 35 mV로서 약 3분 후에 포화 상태에 도달하는 특성을 나타내었다.

Triacetin 농도(mM)와 출력 전압(mV)과의 관계는 Fig. 7에 나타낸 것과 같이 triacetin 농도 10~100 mM의 범위에 걸쳐 직선성을 나타내었으며 이로 부터 지질(triacetin) 센서의 작용을 확인할 수 있었다.

감사의 글 : 본 연구는 경북대 센서기술연구소의 연구비지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Garry A. Rechnitz, *Chem. Eng. News*, **24** (Sept. 5,

- 1988).
2. S. Moss and J. Janata, *Anal. Chem.*, **47**, 2238 (1975).
3. Anthony P. F. Turner, Isao karube and G. S. Wilson, "Biosensors, Fundamentals and Applications", Oxford Science, New York, P 471, (1986).
4. M. Nakako, Y. Hanazato, M. Maeda and S. Shiono, *Anal. Chim. Acta*, **185**, 179-185 (1986).
5. M. Gotoh, E. Tamiya, and I. Karube, *Sensors and Materials*, **1**, 25-33 (1988).
6. D. J. Harrison, A. Teclemariam, and L. Cunningham, *Anal. Chem.*, **61**, 246-251 (1989).
7. Y. Hanazato, M. Nakako and S. Shiono, *IEEE Electron Devices*, ED-33(1), 47-51 (1986).
8. Y. Higashi, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **18**, 613 (1980).
9. K. Ichimura and S. Watanabe, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **18**, 891 (1980).
10. K. Ichimura, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **20**, 1411 (1982).
11. K. Ichimura and S. Watanabe, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **20**, 1419 (1982).
12. K. Ichimura, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **22**, 2817 (1984).
13. K. Ichimura and S. Watanabe, Japan Kokai, 55-62 446 (1980).
14. K. Ichimura, U.S. Patent 4, 269, 941 (1981).
15. 손병기, 대한 전자 공학회지, 18권 5호, 22-29 (1981).
16. 安田 建二, 高分子 論文集, 47, 845 (Oct. 1990).
17. 松本 邦男, 高分子 論文集, 41, 221 (Apr. 1984).
18. K. Ichimura, 高分子, 33, 443 (1984).