

다공질 실리콘을 이용한 요소검출용 바이오 센서 제작

진준형, 강철구, 강문식, 송민정, 민남기, 홍석인
고려대학교

Fabrication and Characterization of Porous Silicon-based Urea Sensor Syst

Jin, Joon-Hyung, Kang, Chul-Goo, Kang, Moon Sik, Song, Min Jung, Min, Nam-Ki, Hong, S
Korea University

Abstract - 바이오 마이크로 시스템 및 바이오 MEMS 분야, 특히, 실리콘을 기질로 하는 바이오 센서 제작에서 반도체 공정 기술은 센서의 대량 생산과 초소형화를 위해서 반드시 필요한 기술이다. 그러나, 감지 전극의 마이크로화에 따른 센서의 감도 및 안정성 저하 문제는 해결해야 할 과제이다. 최근, 다공질 실리콘이 갖는 대면적이 실리콘 기질과 생체 고분자 (예; 단백질, 핵산 등) 간의 결합력을 향상시킬 수 있음이 알려지면서, 바이오 센서 분야에서, 새로운 형태의 드랜스듀서 재료로서의 다공질 실리콘에 대한 논의가 활발히 전개되고 있으며 또한, ISFET (Ion-Selective Field-Effect Transistors)와는 달리 다공질 실리콘 층은 저항이 크기 때문에 센서 제작 과정에서의 부가적인 절연막을 필요로 하지 않는다. 본 연구에서는, 백금을 증착한 다공질 실리콘 표면에 전도성 고분자로서 Polypyrrole (PPy) 필름과 생체 고분자 물질로서 Urease를 각각 전기화학적으로 흡착하였다. 다공질 실리콘 층의 형성을 위해 테플론 소재의 전기화학 전지에 불산 (49%), 에탄올 (95%), H₂O 혼합 용액을 넣고 실리콘 웨이퍼에 일정시간 수 mA의 산화 전류를 흘려주었으며, 약 200 A의 티타늄 박막과 2000 A의 백금 박막을 RF 스퍼터링하여 작업 전극을 제작하였고, 백금 박막 및 Ag를 기화 증착하여 제작한 Ag/AgCl 박막을 각각 상대 전극과 기준전극으로 하였다. 박막 전극의 표면 분석을 위해 SEM (Scanning Electron Microscopy), EDX (Energy Dispersive X-ray spectroscopy) 등을 이용하였다. 제작된 요소 센서로부터 요소 농도 범위 0.01 mmol/L ~ 100 mmol/L에서 약 0.2 mA/decade의 감도를 얻었다.

1. 서 론

반도체 공정 및 MEMS (Microelectromechanical systems) 기술을 이용한 의료용 바이오 마이크로시스템 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 동시에, 대면적의 다공질 실리콘 (porous silicon, PS)을 이용한 고감도의 초소형 기능성 전극도 다수 개발되었다 [1-4]. 특히, 의료용 바이오 센서는 전류량에 의존하지 않는 안정적인 기준전극이 필수적이기 때문에, 바이오 마이크로 시스템에 적용하기 위해서는 전극의 디자인 못지 않게 높은 안정성 및 재현성이 요구된다. 그러나, 전극이 마이크로화되면 일반적으로 감도 및 안정성이 떨어지고, 더욱이 박막화되는 경우 전극에 고정화한 각종 기능성 물질의 탈락 과정이 매우 수월해 진다는 단점이 있어, 몇몇 연구팀이 이에 대한 해결 방법을 제시한 바 있다 [5], [6]. 그러나 여전히, 내구성이나 재현성 및 복잡한 공정과정 등, 해결해야 할 문제가 남아 있다. 본 논문은 PS를 이용한 요소 감지전극 (PSUE) 및 Ag/AgCl 박막 기준전극 (TFRE)의 전기화학적 방법을 이용한 제작과 특성 분석을 제시하고, Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) 등을 이용한 표면 분석 결과를 보였다.

2. 실 험

2.1 다공질 실리콘 형성

봉소를 도우핑한 100 배향의 p형 실리콘 웨이퍼로써, 비저항이 14 ~ 17 $\Omega \cdot \text{cm}$ 인 것은 PSUE 제작에, 비저항이 1 ~ 10 $\Omega \cdot \text{cm}$ 인 것은 Ag/AgCl TFRE 제작에 사용하였다. PSUE의 경우, PS 형성을 위한 식각 전해질 용액의 조성은 부피비 기준으로 HF (49%) : C₂H₅OH (95%) : 2차 증류수 = 1 : 2 : 1로 하였고 -7 mA/cm²의 전류 밀도를 일정하게 유지하였다. 이때 얻은 PS 층의 깊이는 3 μm , 폭은 40 μm 였다. Ag/AgCl TFRE의 경우는, HF (49%) : C₂H₅OH (95%) : 2차 증류수 = 1 : 3 : 2의 전해질 용액에서 -5 mA/cm²의 전류 밀도를 인가하였을 때, 약 3.7 μm 깊이와 sub- μm 폭의 PS 층이 형성되었다.

2.2 Pt 및 Ag 박막전극 증착

박막 증착에 앞서, 200 A of Ti 층을 스퍼터링하여 PS 층과 박막층 간의 접착력을 향상시켰다. PSUE 제작을 위한 백금 박막 전극은 2000 A 두께로 스퍼터링하였는데, 이때 진공 챔버의 베이스 압력은 2×10^{-5} mbar 기판 온도는 100 $^{\circ}\text{C}$ 로 하였다. TFRE 제작을 위한 Ag 필름 증착은 두께 2000 Å로 하였다. 급속 증착에 이어 약 400 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 열처리 공정을 수행하였다.

2.3 AgCl 층 형성

1%의 FeCl₃ (Kanto Chemical Co., Inc.) 용액에 Ag가 증착된 다공질 실리콘을 1분간 넣고 AgCl 층을 형성시킨 다음, 증류수로 표면을 세척하고 24시간 동안 상온, 상압에서 건조시킨다. Ag/AgCl TFRE의 표면 색은 다양할 수 있으나, 세척 후에는 대개 분홍빛이 감도는 회색을 띤다.

2.4 Urease 고정화

전도성 고분자로서 polypyrrole (PPy)을 매트릭스로 하여 urease 분자를 백금 박막이 증착된 PS 표면에 고정화한다. Urease가 고정화 될 수 있는 것은 urease의 등전점이 4.9 정도이므로 중성 또는 알칼리성 용액에서 표면에 음 전하를 띠게 되는데 이때의 정전기적 인력에 의하여 양전압이 인가된 박막 전극 표면으로 이동할 수 있기 때문이다.

Pt 상대 전극과 SCE (saturated calomel electrode)를 기준 전극으로 하는 3 전극 전기화학 전지에서 산화적 전기중합법 (anodical electropolymerization)으로 Pt 박막에 PPy 필름을 코팅하였다. 전해질 수용액의 조성은 KNO₃ 0.1 mol/L, pyrrole 단량체 0.2 mol/L였으며, SCE를 기준으로 0에서 800 mV의 전위 범위에서 순환 전압 전류법 (Cyclic voltammetry)으로 10회 주사하여 검은색

의 PPy 필름 표면을 얻었다. 또한, 순환 전압전류 곡선으로부터 충전전류 (capacitive current)가 주사 횟수에 따라 증가함을 관찰함으로써 PPy 필름이 성장하고 있음을 확인하였다.

PPy 필름 전기중합에 이어, urease (EC 3.5.1.5, type IV, Jack beans, Sigma chemical Co)를 PPy 필름에 도우핑하였다. 1 mmol/L의 인산완충용액 (PBS)에 5 mg/mL 농도로 urease를 용해시켜 Pt 도우핑을 위한 전해질 용액을 제조하고 수소이온 농도를 중성으로 하였다. 중성 용액에서 urease 분자는 음으로 하전되기 때문에 600 mV의 양전압이 인가된 전극으로 이동하여 PPy 필름의 표면층에 도우핑 된다. 이때, 주어진 시간은 15분으로 하였다.

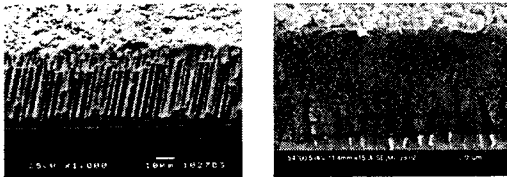
진공 증류한 pyrrole 단량체를 제외하고, 모든 시약은 정제 과정 없이 사용하였다.

3. 본 론

3.1 표면분석

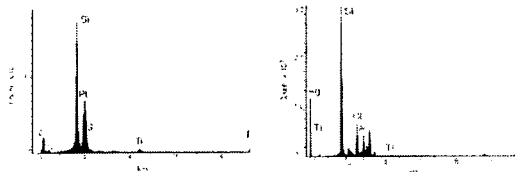
그림 1(a)에 PSUE의 단면에 대한 SEM 사진을 보았다. 깊이 40 μm , 폭 3 ~ 4 μm 의 PS 층을 관찰할 수 있으며, 약 10 μm 깊이까지 표면에 urease가 도우핑된 PPy 필름으로 매워져 있음을 볼 수 있다. 전극 표면에 생체 고분자가 견고하게 흡착되어 있는 PSUE로부터 향상된 안정성과 재현성을 기대할 수 있다.

그림 1(b)에는 Ag/AgCl TFRE의 단면에 대한 SEM 사진을 보았다. 일반적으로, Ag가 증착될 때, 표면이 알갱이의 형태로 성장하는 것은 기질 표면이 매끄럽지 못하기 때문이며, 사진에서 보는 바와 같이 PS 층에 Ag 박막을 증착하는 경우에도 PS의 거친 표면에 의해 sub- μm 지름의 알갱이 형태로 성장한다. 3.7 μm 두께의 PS 층위에 약 0.4 ~ 0.5 μm 의 Ag/AgCl 층이 보이며, PS의 거친 표면에 강하게 흡착되어 있음을 관찰할 수 있다.



(a) PSUE의 단면 (b) Ag/AgCl TFRE의 단면

그림 1. 서로 다른 조건에서 PS 층을 형성시키고 그 표면에 Pt와 Ag를 증착한 후, PPy와 urease 및 Ag/AgCl 층을 코팅하여 PSUE와 TFRE를 제작한 다음 얻은, 각각의 단면에 대한 SEM 사진.



(a) PSUE (b) Ag/AgCl TFRE

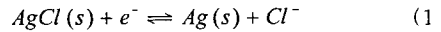
그림 2. 서로 다른 조건에서 PS 층을 형성시키고 그 표면에 Pt와 Ag를 증착한 후, PPy와 urease 및 Ag/AgCl 층을 코팅하여 PSUE와 TFRE를 제작한 다음 얻은, 각각에 대한 EDX 스펙트럼.

그림 2(a)는 PSUE 표면에 대한 EDX 스펙트럼 결

과이다. PPy 필름과 urease에 의한 탄소와 질소 피크가 낮은 에너지 영역에서 중첩되어 나타난다. Urease에 특징적이라 할 수 있는 S 피크도 보이며, 다공질 실리콘 층과 백금 박막에 의한 Si 및 Pt 피크가 강하게 나타난다. 그림 2(b)는 TFRE 표면에 대한 EDX 스펙트럼으로서, 수용액상에서 3회의 Nernst 응답특성 곡선을 얻은 후, 관찰한 결과이다. Ag와 Cl 피크가 강하게 나타나는 것으로 보아, Ag/AgCl 층이 탈착되지 않고 다공질 실리콘 표면에 견고하게 흡착되어 있음을 알 수 있다. 또한, 비록 약하게나마 Ti 피크와 다공질 실리콘 층에 의한 Si 피크가 강하게 나타난다.

3.2 Ag/AgCl TFRE의 Nernst 응답특성

Ag/AgCl TFRE에서의 반쪽 반응식은 다음과 같다.



식 (1)에 Nernst 식을 적용하면 식 (2)를 얻을 수 있다. Ag와 AgCl의 활동도 계수는 1로 할 수 있으므로 Nernst 식으로 표현된 (2)식에서 로그 항은 염소 음이온 농도만을 포함한다.

$$E = E^0 + \frac{0.0592}{1} \log \frac{1}{[\text{Cl}^-]} \quad (2)$$

이때, E는 전지전위, E₀는 표준 전지전위, [Cl⁻]는 염소 이온의 몰농도이다. 식 (2)로부터, 이론적으로, 전해질 용액에서 염소 이온의 농도가 10배 증가하면 전지전위가 59.2 mV 감소함을 알 수 있다.

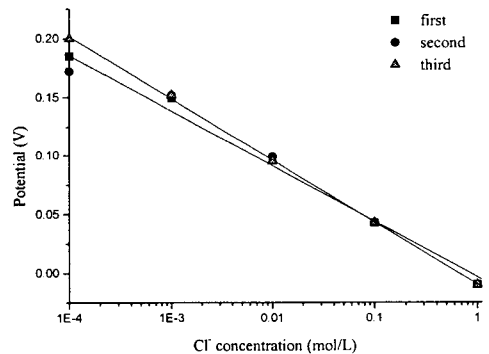


그림 3. PS에 형성된 Ag/AgCl TFRE의 Nernst 응답 특성곡선.

실제로, PS 표면에 제작된 Ag/AgCl TFRE의 경우, 그림 3에서 보는 바와 같이, 염소 음이온의 농도 범위가 10⁻⁴ mol/L에서 1 mol/L일 때, 전지전위의 염소 이온 농도에 대한 의존도가 약 50 mV/pCl⁻인 것으로 나타났다. 이것은 Nernst 식에 비교적 준하는 결과이며, 3차례의 동일한 실험으로부터 재현성이 우수한 결과를 얻었다. 비록, 저농도 영역에서 약간의 편차를 보이나, PS 구조에 의한 강한 흡착력이 Ag/AgCl TFRE의 성분 원소가 수용액 상으로 탈착되는 현상을 억제하여 높은 안정성과 재현성을 보임을 알 수 있다.

3.3 PSUE의 감도특성

그림 4는 PPy를 코팅한 PS 전극으로부터 얻은 선형 주사 전압전류 곡선 (linear sweep voltammogram)으로서, 이때, 전해질 용액의 조성은 KCl 0.1 mol/L, PBS 1 mmol/L이며, 수소이온 농도 7.4, 주사 속도는 20 mV/s로 하였다. Urease 도우핑을 하지 않은 전극이므로 그림에서 보는 바와 같이, 요소 농도에 대한 감도폭 보이

지 않고 있다. 반면, 그림 5에서 제시한 PSUE의 경우, 선형 주사 전압전류 곡선의 포화 전류 값이 요소 농도에 비례하여 증가한다. Ag/AgCl TFRE를 기준으로하여, 약 1.1 V에서 포화 전류 값이 나타났는데, 이때의 $E_{p/2}$ (half-peak potential) 값은 약 850 mV 였다.

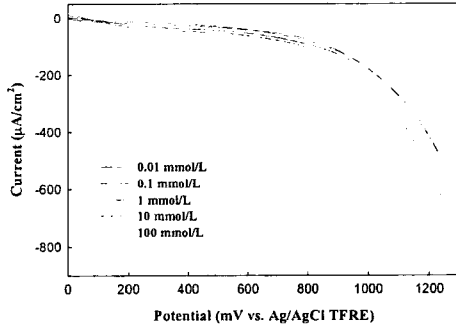


그림 4. Urease를 도우핑하지 않은 PPy 코팅 전극의 요소 농도에 따른 선형 전압전류 곡선. 주사 속도를 20 mV/s로 하고, 요소 농도를 0.01 mmol/L에서 100 mmol/L로 10배씩 증가시켜 가며 전압 전류 곡선을 얻은 결과 주어진 전압 범위에서 포화 전류가 나타나지 않았다.

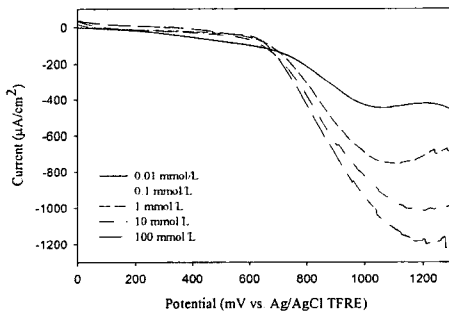


그림 5. PSUE의 요소 농도에 따른 선형 전압전류 곡선. 주사 속도를 20 mV/s로 하고, 요소 농도를 0.01 mmol/L에서 100 mmol/L로 10배씩 증가시켜 가며 전압 전류 곡선을 얻은 결과 약 1.1 V에서 포화 전류가 나타났다.

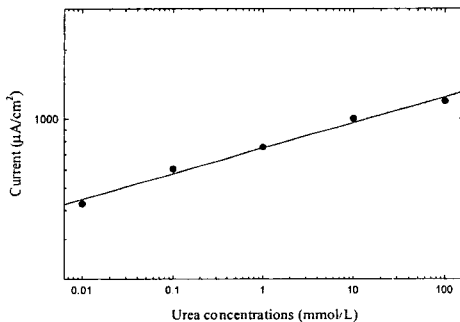


그림 6. 요소 농도에 따른 포화 전류량 변화에 대한 검정 곡선. 요소 농도 0.01 mmol/L ~ 100 mmol/L에서 약 200 $\mu\text{A}/\text{decade} \cdot \text{cm}^2$ 의 감도를 얻었다.

그림 6에서 요소 농도에 따른 포화 전류 값을 도시하였는데, 이들 사이에 선형적인 관계가 성립하는 것으로 보아 Cottrell 식이 잘 적용됨을 알 수 있고, 주어진 요소 농도 범위에서 약 191.5 $\mu\text{A}/\text{decade} \cdot \text{cm}^2$ 의 높은 감도를 얻었으며, 체내에서 요소 농도의 정상치가 수 mmol/L에서 수십 mmol/L 임을 감안하면 의학용 바이오센서로서의 응용도 가능할 것으로 기대된다.

4. 결 론

PS를 이용하여 안정하고 재현성있는 PSUE와 Ag/AgCl TFRE를 제작하였다. PS 표면의 대면적이 박막과 urease가 도우핑된 고분자 필름 및 AgCl 사이의 결합력을 강화시켜, 감도가 향상된 센서 전극을 제작할 수 있었으며, 특히, TFRE의 경우, 그 구성 성분이 탈착되는 기존의 문제점을 해결할 수 있었고 TFRE 표면 보호를 위한 보호층도 필요로 하지 않았다. 또한, Ag/AgCl TFRE의 EDX 스펙트럼 분석 결과 TFRE를 구성하는 성분이 여러 차례의 특성 분석 실험 후에도 탈착되지 않는 것으로 나타났다. PSUE의 EDX 스펙트럼 분석결과 urease가 도우핑된 PPy 필름으로 인한 탄소, 질소, 황에 대한 피크가 관찰되는 것으로 보아, PSUE 표면에 고정화된 필름도 견고하게 흡착되어 있음을 알 수 있었다. TFRE의 염소 음이온 농도에 대한 전지전위변화는 선형적이었으며, 그 기울기는 약 50 mV/pCl⁻로서 Nernst 식에 비교적 잘 적용되었다. TFRE를 기준으로 한 PSUE의 요소 농도 변화에 대한 포화 전류값 측정 결과 약 200 $\mu\text{A}/\text{decade} \cdot \text{cm}^2$ 의 감도를 얻을 수 있었다.

의학용 효소 센서, DNA 칩을 비롯한 실리콘을 기본으로 하는 바이오 마이크로 시스템 구축 분야에서 다공질 실리콘을 이용한 박막 기준전극 및 요소 검출용 센서 전극의 이용이 활발히 전개될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ1-PG3-31400-0083).

(참 고 문 헌)

- [1] J. H. Jin, N. K. Min, C. G. Kang, S. H. Park, and S. I. Hong, "Characteristics of urea sensor based on platinum deposited porous silicon", *Journal of the Korean Physical Society*, **39**, S67-S69, 2001.
- [2] N. K. Min, and C. G. Kang, "Optical switching phenomena in p-PSi n diodes", *Journal of the Korean Physical Society*, **37**, 923-926, 2000.
- [3] M. Thust, M. J. Schoning, P. Schroth, U. Malkoc, C. I. Dicker, A. Steffen, P. Kordos, and H. Luth, "Enzyme immobilization on planar and porous silicon substrates for biosensor applications", *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, **7**, 77-83, 1999.
- [4] Victor S.-Y. Lin, K. Motesarei, Keiki Pua S. Dancil, M. J. Sailor, and M. R. Ghadir, "A porous silicon-based optical interferometric biosensor", *Science*, **278**, 840-843, 1997.
- [5] U. Schnakenberg, T. Lisec, R. Hintsche, I. Kuna, A. Uhlig, and B. Wagner, "Novel potentiometric silicon sensor for medical devices" *Sensors and Actuators B*, **34**, 476-480, 1996.
- [6] M. J. Schoning, A. Kurowski, M. Thust, P. Kordos, J. W. Schultze, and H. Luth, "Capacitive microsensors for biochemical sensing based on porous silicon", *Sensors and Actuators B*, **64**, 59-64, 2000.