

## FEP 멤브레인을 이용한 용존 산소 측정용 Clark-type 센서 제작

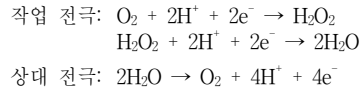
박정일<sup>1</sup>, 장중현<sup>1</sup>, 최명기<sup>1</sup>, 이동영<sup>2</sup>, 김영미<sup>2</sup>, 박정호<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>고려대학교 전기공학부, <sup>2</sup>울산의대 아산생명과학연구소

### Fabrication of Clark-type Sensor for Measuring Dissolved Oxygen Using FEP Membrane

Jungil Park<sup>1</sup>, Jong-hyeon Chang<sup>1</sup>, Myungki Choi<sup>1</sup>, Dong-young Lee<sup>2</sup>, Youngmi Kim<sup>2</sup>, and Jungho Pak<sup>1</sup>

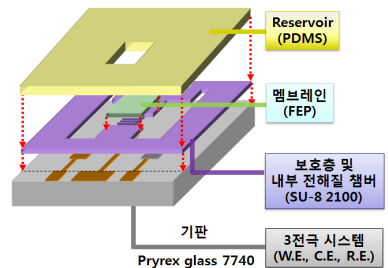
<sup>1</sup>Dept. of Electrical Engineering, Korea University, <sup>2</sup>Asan Institute for Life Sciences, University of Ulsan College of Medicine

**Abstract** - 본 논문에서는 미량의 세포를 포함한 용액 내에서 세포의 산소호흡량을 측정하기 위해 FEP(Fluorinated Ethylene Propylene)를 멤브레인으로 사용한 Clark-type 센서를 제안하였다. 제안된 Clark-type 센서는 3-전극 시스템을 구성하는 유리 기판, 산소를 선택적으로 투과시키는 FEP 멤브레인과 세포를 담을 수 있는 PDMS reservoir로 구성된다. 산소 센서의 3-전극 시스템에서 작업 전극과 상대 전극으로는 Au, 기준 전극으로는 Ag/AgCl을 사용하였다. 기준 전극은 Ag 전극을 0.1M KCl/Tris-HCl 용액에서 chlorination하여 표면에 AgCl이 형성되도록 하였고, OCP(Open Circuit Potential) test를 수행한 결과 2시간 동안 안정적인 OCP 특성을 보여 좋은 내구성을 가짐을 확인하였다. 또한, 산소 유무에 따른 cyclic voltammetry 그래프의 차이를 확인하고, amperometry로 감도 및 반응 시간, 선형성을 측정/분석하였다. 제작된 산소 센서는 40초의 90% 반응 시간과 0.994의 아주 좋은 선형 상관계수를 보여주었다.



#### 2.2 Clark-type 센서의 설계

그림 2는 제안된 Clark-type 센서의 모식도를 나타낸다. 센서의 전극 기판은 1.2cm x 2cm의 크기로 설계되었고 크게 3개의 층으로 구분된다. 첫 번째 층은 전압 인가 및 측정을 위한 작업 전극, 상대 전극, 기준 전극으로 구성된다. 작업 전극과 상대 전극은 Au를, 기준 전극은 Ag/AgCl 전극을 사용하였다. 두 번째 층은 내부 전해질 챔버 구성 및 전극선 절연을 위한 것으로 SU-8 2100(MicroChem Corp.) photoresist로 패터닝하였다. 이 때 두 영역으로 구분된 내부 전해질 챔버간 전해질 이동이 가능하도록 마이크로채널을 형성하였다. 세 번째 층은 측정 용액을 담는 reservoir로 PDMS를 사용하였다. Reservoir는 산소 센서의 작업 전극 위에 위치하도록 설계하였다.



<그림 2> 제안된 Clark-type 센서 구조

#### 2.3 Clark-type 센서 제작

제안된 Clark-type 센서의 제작 공정 순서는 다음과 같다. 먼저 유리 기판(Pyrex glass 7740 wafer)을 piranha 용액( $H_2SO_4 : H_2O_2 = 4 : 1$ )에서 5분간 세척하였다. 먼저 유리 기판에 작업 전극 및 상대 전극으로 사용하기 위해 Ti/Au를, 기준 전극으로 사용될 부분에는 Ti/Ag를 500Å/2500Å 두께로 증착한 후 패터닝하였다. 다음으로 전극선 절연 및 100µm 두께의 내부 전해질 챔버를 구성하기 위해 SU-8 2100 photoresist를 스핀코팅한 후 패터닝하였다. 기준 전극 Ag/AgCl을 형성하기 하기 위해 potentiostat(PC4/750, Gamry Instruments)을 이용하였고 0.1M KCl/Tris-HCl 용액 내에서 정전류 30nA을 10시간 동안 인가하여 chlorination함으로써 Ag 표면에 AgCl이 형성되도록 하였다[7]. 산소를 선택적으로 투과시키는 멤브레인으로 FEP(Fluorinated Ethylene Propylene, Strathkelvin Instruments)을 사용하였고 이를 작업 전극 위에 형성된 마이크로채널 위에 두어 PDMS reservoir와 연결되도록 하였다. 생체 적합한 PDMS reservoir는 base PDMS와 curing agent를 10 : 1의 질량비로 혼합한 후 Teflon으로 제작한 몰드에 부어, 75°C 오븐에서 25분간 굳혀 제작하였다. 실리콘 접착제(3145 Silicone adhesive, Dow Corning)를 이용하여 이를 전극이 패터닝된 기판과 접합하였다. 그림 3(b)는 제작된 Clark-type 센서를 보여준다.



(a) (b)  
 <그림 3> 제작된 Clark-type 센서 사진

## 1. 서 론

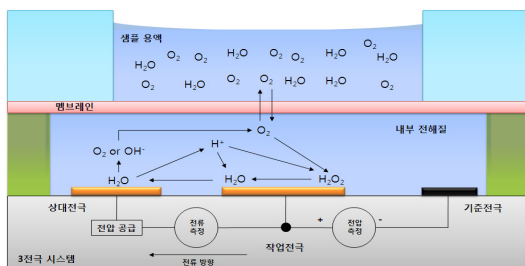
산소 호흡량은 생물학적 활성도를 측정하는데 아주 중요한 지표가 된다. 최근 들어 세포의 산소 호흡량이 대사 증후군의 발병원인으로 작용한다는 보고들이 발표되면서 세포의 산소 호흡량을 정확하게 정밀하게 측정할 수 있는 산소 센서의 개발이 요구된다[1, 2]. 산소를 측정할 수 있는 센서들 중에 Clark-type 산소센서는 전기화학적 센서로 재현성이 우수하고 센서마다 개별 편차가 매우 적고, 저농도의 산소 분석이 가능하여 임상 분석용 및 실시간 모니터링용으로 응용되고 있다. 또한, 최근 10년 동안 여러 연구자들이 혈액 내의 산소 분압 및 세포의 활성도를 측정할 수 있는 소형화된 Clark-type 센서를 제작하기 위해 연구를 진행해 왔다[3-5].

본 연구에서는 기존 연구에서 사용하였던 PP(polypropylene)보다 산소 투과율이 2배 이상 높은 FEP(Fluorinated Ethylene Propylene)을 멤브레인으로 사용하였다[6]. 기준 전극으로 사용될 박막형 Ag/AgCl 전극을 제작하고 그 내구성을 평가하였고, 이를 이용하여 Clark-type 센서를 설계하고 제작하였다. 제작한 Clark-type 센서는 산소 유무에 따른 CV(Cyclic Voltammetry) 그래프와 센서의 반응 시간, 산소 농도에 따른 전류값 변화를 측정하고 이를 평가/분석하였다.

## 2. 본 론

### 2.1 Clark-type 센서의 원리

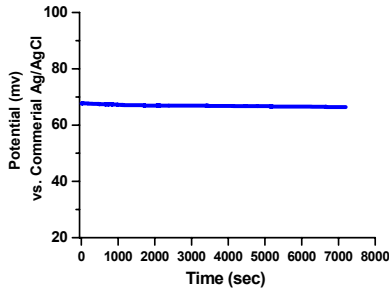
Clark-type 센서는 그림 1과 같이 전기화학적 측정을 위한 전해질과 전극이 존재하는 부분 및 샘플 용액을 담을 수 있는 reservoir와 산소를 선택적으로 투과하는 멤브레인으로 구분된 구조이다. 샘플 용액 내의 산소는 멤브레인을 투과하여 내부 전해질로 이동하고 작업 전극에서 환원 되는데, 이 때 발생한 용존 산소의 환원 전류를 측정하여 그 농도를 분석하는 것이다. 작업 전극 및 상대 전극에서 일어나는 용존 산소의 반응은 다음과 같다[5].



<그림 1> Clark-type 센서의 원리

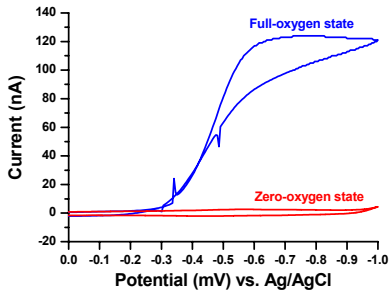
## 2.4 Clark-type 센서 특성 평가

Clark-type 센서 동작 시 기준 전극 Ag/AgCl은 중요한 영향을 미친다. 기준 전극 Ag/AgCl의 내구성 평가를 위해 0.1M KCl 용액에서 상용 Ag/AgCl 전극(RE-5B, Bioanalytical Systems Inc.)과 제작한 기준 전극 사이의 OCP(Open Circuit Potential)를 측정하였다[7]. 그림 4는 상용 Ag/AgCl 전극과 제작한 기준 전극 사이의 OCP 측정 결과로, 2시간 동안 약 68mV로 안정한 결과를 보인다. 세포의 산소호흡량을 측정하기 위한 Clark-type 센서의 동작 시간은 1시간 내외인 반면에 Ag/AgCl의 내구성은 2시간 이상 유지되어 내구성이 좋다고 판단할 수 있다.



<그림 4> 제작된 Ag/AgCl 전극 OCP 테스트 결과

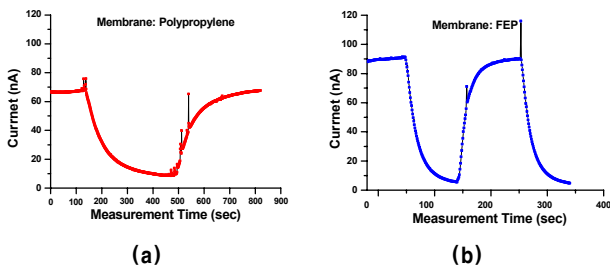
제작된 Clark-type 센서 내부 챔버에 내부 전해질 0.1M KCl을 채우고 reservoir에는 100 $\mu$ l의 측정 용액을 담아 CV로 산소가 포화 되었을 때(full-oxygen state; air-filled reservoir)와 산소가 없을 때(zero-oxygen state; 0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)의 측정 결과를 비교하였다. 50mV/s의 속도로 0 ~ -1.0V 범위에서 측정하였다. 그 결과, 그림 5과 같이 -0.8V에서 산소가 포화 되었을 때의 전류값은 124nA이고 산소가 없을 때는 2.5nA로, 미량의 측정 용액에서 산소 유무에 따른 환원전류의 차이가 약 50배로 나타나 용존 산소 측정센서로 사용할 수 있음을 확인하였다.



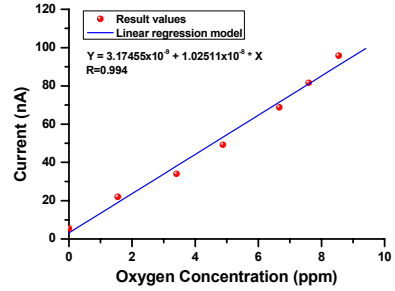
<그림 5> 산소 유무에 따른 CV 측정 결과 비교

그림 6은 산소 포화 상태와 무 산소 상태를 번갈아 변화시키면서, PP와 FEP를 멤브레인으로 사용한 Clark-type 센서의 반응 시간을 측정하는 그래프이다. PP 멤브레인을 사용하여 제작한 Clark-type 센서의 90% 반응 시간은 약 150초이고, FEP 멤브레인을 이용한 센서의 반응 시간은 약 40초로 관찰되었다. FEP을 사용한 센서의 90% 반응 시간이 PP의 경우 보다 3.5배 이상 빠른 결과를 얻었다.

그림 7은 산소가 포화된 deionized water와 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>를 혼합하여 산소 농도에 따른 제작된 Clark-type 센서의 환원 전류를 측정하는 결과를 보여준다. Clark-type 센서의 선형성(linearity)을 분석한 결과, 상관계수가 0.994로 높은 선형성을 보였다.



<그림 6> 제작된 Clark-type 센서의 반응 시간 측정 결과 비교; (a) PP, (b) FEP를 멤브레인으로 사용한 Clark-type 센서



<그림 7> 용존 산소 농도에 따른 환원 전류 크기 변화

## 3. 결론

본 논문에서는 세포의 산소 호흡량을 측정하기 위한 Clark-type 센서 제작에 기존 PP 멤브레인보다 산소 투과율이 2배 이상 높은 FEP 멤브레인을 사용하여 그 특성을 평가하였다. 제안한 Clark-type 센서는 반도체 공정을 이용하여 쉽게 제작할 수 있다. 내부 전해질 챔버는 두꺼운 photoresist인 SU-8 2100을 이용하여 구성하였고, 세포를 담을 수 있는 reservoir는 생체 적합한 PDMS를 사용하였다. 안정적인 전위를 측정하기 위해 Ag/AgCl 기준 전극을 제작하고 Clark-type 센서에 집적화하여 그 특성을 평가하였다. 그 결과, 산소 유무에 따른 환원 전류의 차이가 50배에 이르고, 센서의 반응 시간도 40초로 민감하게 나타났으며 또한 우수한 선형성을 나타내었다. 앞으로 안정도, 재현성, life-time 등 여러 가지 특성 분석이 추가된다면 Clark-type 센서는 단일 세포 혹은 아주 적은 양의 세포 배양액에서 세포의 활성도를 측정할 수 있는 바이오센서로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## [감사의 글]

이 논문은 한국과학재단 특정기초연구(R01-2006-000-11371-0)와 2007년도 과학기술부 국제과학기술협력재단(M60601010002-06E0101-00210)의 지원을 받아 수행되었습니다.

## [참고 문헌]

- [1] H. K. Lee, Y. M. Cho, Y. Y. Lee, and Y. K. Pak, "Mitochondria-based model for fetal origin of adult disease and insulin resistance," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1042, pp. 1-18, 2005.
- [2] B. B. Lowell and G. I. Schulman, "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes," *Science*, vol. 307, pp. 384-387, 2005.
- [3] X. Wang, H. Suzuki, K. Hayashi, T. Kaneko, and K. Sunagawa, "Microfabricated needle-type sensors for pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pH," *IEEE Sensors Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 11-18, 2006.
- [4] S. Kojima, M. Loughran, and H. Suzuki, "Microanalysis system for pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pH constructed with stacked modules," *IEEE Sensors Journal*, vol. 5, pp. 1120-1126, 2005.
- [5] G. W. McLaughlin, K. Braden, B. Franc, G. T. A. Kovacs, "Microfabricated solid-state dissolved oxygen sensor," *Sensors and Actuators B*, vol. 83, pp. 138-148, 2002.
- [6] J. Park, J.-H. Chang, M. Choi, D.-Y. Lee, Y. Kim, and J. Pak, "Fabrication and characterization of miniaturized Clark-type oxygen sensor for measuring dissolved oxygen," *The 9th Korean MEMS Conference*, pp. 491-494, 2007.
- [7] H. Suzuki, H. Ozawa, S. Sasaki, and I. Karube, "A novel thin-film Ag/AgCl anode structure for microfabricated Clark-type oxygen electrode," *Sensors and Actuators B*, vol. 53, pp. 140-146, 1998.