실리콘러버 지지체의 K^+와 Na^+ 선택성 고체형 전극을 이용한 자동혈액분석기의 개발에 대한 연구

강명성, 전우성, 김선관, 김대훈, 차근식*, 남학현*, 조한익**, 박성섭**

주식회사 CAS 부설 연구소 반도체 센서실 * 광운대학교 이과대학 화학과 ** 서울대학교 의과대학 임상병리과학교실

Studies on the Development of the Automatic Blood Analyzer with Silicone Rubber-Based Solid-State K^+- and Na^+-Selective Electrodes

Myungsung Kang, Woosung Jeon, Sun Kwan Kim, Deahoon Kim, Geun Sig Cha*, Hakhyun Nam*, Han-Ik Cho**, Sungsup Park**

R&D Center, CAS Corporation * Department of Chemistry, Kwangwoon University Seoul Korea
** Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine

ABSTRACT

Silicone Rubber (SR)-based potassium- and sodium-selective solid-state electrodes have been developed for the portable blood electrolyte analyzer system. The electrochemical performance of these electrodes have been evaluated with a static experimental setup and with the newly developed blood electrolyte analyzer system (model; HS603). It has been shown that their potentiometric properties are essentially comparable to those of PVC-based ion-selective electrodes, but with greatly improved lifetime (200 and 40 days for potassium and sodium sensors, respectively) and potential stability (within ±0.1 mV). Clinical tests have been performed with real serum samples and the results have been compared with those obtained from Ciba-Corning BGA 288 system; correlations were excellent, proving its practical utility as a new commercial system.

서 론

이온선택성전극(Ion Selective Electrode; ISE)을 이용한 전위차측정 분석법은 분광분석법과는 달리 시료의 색깔이나 탁도에 영향을 받지 않고 시료의 전처리 단계가 거의 필요 없으며 시료당 분석 단가가 저렴하다는 장점 때문에 임상시료, 공업시료 및 환경시료 등의 분석에 널리 응용되고 있다[1~3]. 또한, 이온선택성 전극은 선택성이 우수하고, 감응속도가 빠르며 전극의 제조가 용이하기 때문에 혈액이나 뇨(urine)중 전해질이온(K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-)들을 측정하는 자동혈액분석기의 검출기로 사용되고 있다[4,5]. 그러나, 현재 자동혈액 분석기에서 전해질 검출기로 쓰이는 ISE는 대부분 내부기준용액이 있는 재래식 이온선택성전극(Conventional Ion-Selective Electrode; CISE)으로서 소형화가 어렵기 때문에 현재 상용화되어 병원 임상실험실에서 사용되고 있는 대부분의 자동혈액분석기는 상당한 공간을 차지하는 탁상형(desktop type)으로 개발되어 있다. 이와 같은 탁상형 장비는 천재지변 등과 같은 불가항력적인 상황에서 사용이 불가능하고, 또한 최근 점차 널리 요구되고 있는 현장현시측정(point of care; POC)의 구현에도 상당한 어려움이 있다. 따라서 자동혈액분석기를 소형화하여 휴대용으로 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다[6,7].

최근의 전자 및 기계분야의 눈부신 발달에 힘입어 측정기기를 소형화하는 것은 용이하지만 휴대용 자동혈액분석기에 적합한 소형화된 전해질 검출기의 개발은 아직 완전히 해결되지 않은 연구과제로 남아있다[8,9]. 현재까지 알려진 소형 전해질 검출기는 내부기준용액이 없는 고체형 이온선택성전극(Solid-State Ion-Selective Electrodes; SSISE)이며, 따라서 이러한 종류의 전극들을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. SSISE가 이와 같이 주목받는 것은 구조적으로 소형화가 용이하며, 반도체 공정 등을 이용한 대량생산이 가능하므로 생산 및 판매가격을 낮출 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문이다[10]. 그러나, SSISE는 CISE와는 달리 내부기준용액이 없기 때문에 전기적 접촉이 고분자형 이온선택성 감지막(Ion-Selective

Membrane; ISM)과 전기전도기질(electronic conducting substrate)사이에서 직접 이루어진다. 그러므로, SSISE의 전기화학적 특성(감응기울기, 감응시간, 선택성, 수명 등)은 ISM의 구성성분인 고분자지지체(polymer matrix)의 물리화학적 성질(접착력, 전기저항, 유전율, 유리상 전이온도 등)에 따라 크게 영향을 받는다. 따라서 SSISE에 적합한 고분자지지체의 개발에 대한 연구가 CISE의 지지체로 널리 쓰였던 PVC(Poly Vinyl Chloride)[11], PU(Poly Urethane)[12], PVA(Poly Vinyl Acetate)[13]등과 같은 고분자 중합체(polymer)를 이용해 활발하게 이루어지고 있으나 CISE에 비하여 만족할만한 전기화학적 특성을 얻지 못했다. 특히, CISE의 지지체로 가장 널리 사용되는 PVC는 우수한 전기적 화학적 특성에도 불구하고, SSISE에 사용할 경우 접착력이 좋지 않아서 센서의 수명(2~3 일)이 짧으므로 실용적으로 사용하는데 에는 많은 어려움이 있다[14].

본 연구에서는 접착력 및 다른 물리화학적 성질은 우수하나 전기적 특성이 좋지 않아 아직까지 ISE의 지지체로 거의 사용되지 못했던 SR(Silicone Rubber)[15~17]을 지지체로 한 K^+와 Na^+ 선택성 SSISE형 이온전극 센서를 개발하고, 이 센서들의 특성에 알맞는 자동혈액분석기(HS603)를 자체 개발하였다. 본 개발품의 휴대용 자동혈액분석기로써의 응용가능성을 알아보기 위하여 실제 환자의 혈중 전해질 농도를 측정하였으며, 이 자료를 Ciba-Corning사의 제품(BGA 288)에서 얻은 자료와 상호 비교하였다.

혈액분석기 시스템

1. 이온센서의 제작 및 시약

본 연구에서 사용된 전극은 Al_2O_3 기판(40×40 ㎜)위에 Ag-Pd(10%)의 금속으로 그림 1의 (a)와 같이 실크프린팅(silk printing)한 후 850℃의 온도로 소결하여 제작하였다. 용액과의 절연을 위해 ISM과 접촉하는 금속부분과 연결부를 제외한 전극 전체를 PR(photoresistor)로 덮어 공기중에서 말린 후, ISM과 접촉할 금속부분을 0.5M-$FeCl_3$ 용액에 약 5분간 침적하여 Ag가 주성분인 금속위에 AgCl을 10㎛정도 되게 성장시켰다.

그리고, K^+와 Na^+ ISM은 지지체로 SR(Dow Corning, RTV-3140)을 사용하였고, 지지체 내부에서 K^+와 Na^+에 대해 선택적으로 감응하는 이온선택물질(ionophore)들은 Fluka사의 valinomycin과 ETH 2120(N,N,N′N′-Tetracyclohexyl-1,2-phenylenediacetamide)을 각각 사용하였다. 일반적으로 SR지지체에는 자체의 유리상 전이온도가 낮아서 가소제(plasticizer)를 사용하지 않아도 된다고 알려져 있으나 본 연구에서는 SR의 높은 저항을 낮추고 지지체 내에서 이온선택성물질의 용해도를 높이기 위하여 Fluka사의 bis(2-ethylhexyl)sebacate(DOS)와 bis(2-ethylhexyl)adipate (DOA)를 각각 가소제로 사용하여, 지지체 87 w/w %, 가소제 12 w/w %와 이온선택물질 1 w/w %를 THF(Tetrahydrofuran)에 녹여서 ISM을 제조하였다. 이온센서는 앞에서 언급한 전극의 금속부분에 K^+과 Na^+ ISM을 각각 도포한 후 7일 동안 경화시켜 제작하였다.

완충용액(buffer solution)은 생화학적 용도로 널리 쓰이는 HEPES(Sigma)를 사용하였고, 농도와 pH는 각각 0.05M와 7.4로 제조하였다. 실험에 필요한 용액제조에는 탈이온수(16㏁; Yamato WE-21)를 사용하였으며, 기타 ISM의 특성조사 실험에 사용된 여러 가지 보정용액 및 세척용액들은 모두 Sigma사의 특급시약을 사용하여 제조하였다. 혈액은 서울대학병원 임상병리과 응급검사실험실에서 실제 환자의 혈액을 측정하기 위해 원심분리한 혈청(serum)을 제공받았다.

2. 측정장치 및 실험방법

비호름계를 이용한 측정은 일반적인 전위차 측정장치를 통해 이루어졌다[14]. 전위차 측정장치는 작동전극(working electrode)과 기준전극(reference electrode)의 전위차를 측정하는 장치로써 고입력 임피던스 전압계(high impedance voltmeter)를 통해 측정되어 0.5초 간격으로 컴퓨터에 입력 저장된다.

본 연구에서 개발한 K^+(또는 Na^+) 이온센서를 임상평가하기 위하여 제작된 자동혈액분석기(HS603)의 구성도는 그림 2에서 보는 바와 같이 검출부, A/D 변환부, 조절부, 입,출력부, 중앙제어부, 전원부, 센서부, 표시부(display)등으로 구성되어 있다. 일반적으로 SR형 ISM을 사용한 이온센서의 입,출력 임피던스는 $10^8\Omega$ 이상이므로 안정된 센서출력 신호를 얻을 수 있도록 불필요한 특정 주파수대를 제거할수 있는

Low-pass 필터를 검출부에 사용하였고, 센서부와 임피던스 정합(impedance matching)을 위하여 고입력 임피던스(high input impedance)를 지닌 FET(Field Effect Transistor)형 Op-amp를 사용하였다. 이와 같은 방식으로 얻은 안정된 출력전압신호는 A/D 변환기(Analog Device, AD679; 14bit resolution)에 입력되어 디지탈 신호로 변환(128K/sec)된 후, 이 data는 I/O부의 8-bit microcontroller(Intel, M87C51)에 의하여 중앙제어부로 전송된다. 출력은 컬러모니터(color monitor)와 X-t레코더(Philips PM8252)로 기록하였다. 또한, 표준용액 및 세척용액과 혈액을 센서부로 운반하기 위하여 소형 two-way solenoid valve(Y.L.B, MST-01M6CTN)및 구동 토오크와 속도 조정이 용이한 stepping motor를 사용하여 연동펌프(peristaltic pump)를 구성하였다. 전체 시스템은 IBM 호환성 PC에서 운영되는 프로그램으로 제어하였다. 자동혈액분석장치에서 시료(혈액)와 용액의 흐름속도는 1.5㎖/min., 1회 시료 주입량은 0.5㎖로 하여 실험을 하였다. 보정용액과 시료를 주입하기 전에 잔여물(residue)에 의한 오차를 최소화하기 위해 공기세척법(air-wahing method)를 이용해 감지막 부분과 용액의 통로(path)를 세척하였다. 보정용액은 표 1의 조성으로 제조하였고, 바탕용액은 pH 7.4의 0.05M-HEPES를 사용하였다. 본 연구진이 제작한 자동혈액분석기에서 얻은 결과들은 Ciba-Corning사의 자동혈액분석기(BGA 288)에서 동일한 임상시료들에 대하여 측정하여 얻은 결과들과 비교하였다.

실험결과 및 고찰

SR 감지막을 사용한 K^+와 Na^+ 검출용 SSISE의 전기화학적 특성을 알아보기 위하여 비흐름계에서 K^+와 Na^+ 이온에 대한 선택계수(selectivity coefficient), 감응기울기(response slope) 및 전극의 수명(lifetime)을 조사하였다. SSISE가 혈액속에 있는 많은 전해질들 중에서 대상이온만을 선택적으로 검출하는 능력을 나타내는 선택계수값들은 서로가 주 방해이온종으로 작용하는 Na^+와 K^+ 이온에 대해서 분리용액법(separate solution method)을 이용해 얻었다. K^+전극의 Na^+에 대한 로그선택계수($\log K^{pot}_{K,Na}$)는 -4.72이었고, Na+전극의 K+에 대한 로그선택계수($\log K^{pot}_{Na,K}$)는 -1.44로 PVC형 ISE에서 얻은 값들과 거의 유사하게 나타났다[18,19]. 그림 3, 4는 각각 K^+와 Na^+의 임상학적 농도범위(K^+; 10^{-4}M ~ 10^{-2}M, Na^+; 10^{-3}M ~ 10^{-1}M)에서의 감응기울기를 날짜별로 측정하여 그 결과를 도시한 것이다. 이 농도범위에서 감응기울기의 값은 각각 58mV와 57mV로서 1가 양이온에 대한 이론값인 59.16mV[20]와 거의 일치할 뿐만아니라 PVC를 지지체로 한 CISE에서 구한 값과[21,22] 거의 유사하게 나타났다. 또한, 감응안정도(±0.1 mV이내) 및 감응속도와 재현성도 CISE와 비견할 만큼 우수하였다. 전극의 수명을 나타내는 시간의 경과에 따른 기울기의 변화를 살펴보면 모두 5주 이상이 지난 후의 기울기값이 초기 기울기 값의 90%이상으로 보통 7일 미만의 수명을 갖는 PVC형 SSISE보다 상당히 우수하였으며, 일반적으로 시간이 지나면서 보이는 선택성의 변화도 거의 나타나지 않았다. 표2에서 나타낸 바와 같이 K^+ 이온 검출용 SSISE의 경우 SR형 ISM의 금속전극 표면에 대한 접착력[23,24]이 PVC형 ISM의 것보다 상대적으로 대단히 뛰어난 것으로 보아 SSISE의 수명과 감지막의 접착력은 밀접한 관계를 가짐을 알 수 있다.

그림 5와 6은 본 연구진이 개발한 K^+와 Na^+ 검출용 자동혈액분석기의 보정용액과 임상시료인 혈액에 대한 감응 그래프이며, 그 결과를 X-t 레코더로 출력한 것이다. 그림에 나타난 바와 같이 1차(K^+ = 2 mM, Na^+ = 50 mM)와 2차 보정용액(K^+ = 5 mM, Na^+ = 130 mM)을 교대로 흘려주었을 때 K^+와 Na^+에 대한 감응안정도 및 감응속도 그리고 재현성은 비흐름계 실험에서 얻은 결과와 마찬가지로 우수하게 나타났다. 또한, 이 때의 전위차 차이도 각각 19.5mv와 20.7mv로 이론값과 상당히 유사하게 나타났다.

임상평가에 앞서 Ciba-Corning사의 자동혈액분석기(BGA 288)의 신뢰성과 적합성을 알아보기 위해 30분 간격으로 Nycomed사의 Seronorm과 Pathonorm을 혼합하여 서로 다른 세가지의 농도로 제조한 후 각각 10회씩 반복측정하는 within-run precision test를 하였다. BGA 288의 K^+와 Na^+ 이온센서의 정밀도는 CLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendment) 규정을[25] 모두 만족하였고, 정밀도 한계의 권장사항(CLIA의 1/4)과 유사한 표준편차를 나타냈다. 그림 7은 본 연구에서 개발한 SSISE를 이온센서로 사용한 자동혈액분석기와 Ciba-Corning사의 BGA288에서 측

정한 혈액중 Na^+와 K^+의 농도값에 대한 상관관계 그래프이다. 표 3은 상관관계측정에서 얻은 데이타를 서울대학교 의과대학 임상병리학과에서 임상학적인 통계처리를 위해 사용하는 SAS 프로그램을 통해 선형회귀분석으로 구한 값들로 본 연구에서 개발한 자동혈액분석기와 Ciba-Corning사의 BGA288과의 우수한 상관관계를 나타내고 있다.

결 론

본 연구를 통하여 제작된 SR을 지지체로 개발한 K^+와 Na^+ 이온 검출용 SSISEs와 자동혈액분석기에 대한 성과를 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 이온센서로써의 필수 조건인 우수한 감응성과 재현성을 갖는다.
2. PVC형 ISE와 거의 비슷한 전기화학적 특성을 갖는다.
3. PVC형 ISM에 비해 접착력이 상당히 우수하기 때문에 소형의 SSISE형 이온센서의 ISM으로 적합하다. 따라서, 이 이온센서를 이용하여 휴대용 자동혈액분석기의 개발이 한결 용이하게 되었으며, 또한 환경, 식품공학, 공업화학 분야에서 널리 쓰이는 이온분석기기들을 휴대용으로 개발하는 작업도 용이해졌다.

본 연구진은 현재 세계 최초로 혈액분석기의 이온센서로써의 이용이 가능한 SR형 K^+와 Na^+ 검출용 SSISE의 자체 개발에 성공하였으며, 곧 SR형 Ca^{2+}와 Cl^- 전해질 이온센서 뿐만아니라 요소센서, 산소 및 이산화탄소와 같은 용존기체 검출용 센서들도 추가 개발하여 임상학적으로 중요한 이온 및 혈액기체들을 탁상형에서 얻을 수 있는 자료와 동일한 값을 얻을 수 있으면서 현장현시측정할 수 있는 휴대용 자동혈액분석기를 제작할 예정이다[6].

참고문헌

1. R. W. Cattrall and I. C. Hamilton, "Coated-Wire Ion-Selective Electrodes" , Ion-Selective Electrode Rev., vol 6, pp. 126, 1984.
2. Stephan Dütch, Hans-Beat Jenny, Konrad J. Schlatter, Philippe M. J. Périsset, Gunther Wolff, Jean Thomas Clerc, Ernö Pretsch, and Wilhelm Simon, "Microprocessor-Controlled ex Vivo Monitoring of Sodium and Potassium Concentration in Undiluted Urine with Ion-Selective Electrodes" , Anal. Chem., Vol. 57, pp. 578-580, 1985.
3. Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, "Tietz Textbook of Clinical Chmistry" , 2nd Ed., pp. 166-168, W. B. Saunders Co., 1994.
4. M. L. Davies, C. J. Hamilton, S. M. Murphy and B. J. Tighe, "Polymer membranes in clinical sensor applications" , Biomaterials, Vol. 13, No. 14, 1992.
5. Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, "Tietz Textbook of Clinical Chemistry" ,2nd Ed., pp. 1354-1370, W. B. Saunders Co., 1994.
6. Thomas Mock, Douglas Morrison and Randall Yatscoff, "Evaluation of the i-STAT System: A Portable Chemistry Analyzer for the Measurement of Sodium, Potassium, Chloride, Urea, Glucose, and Hematocrit" , Clinical Biochemistry, Vol. 28, Apr., 1995.
7. Charles R. Handorf "Clinics in Laboratory Medicine" , Vol. 14, No. 3, pp. 464-465, W. B. Saunders Co., 1994.
8. R. W. Cattrall, H. Freiser, Anal. Chem. Vol. 46, pp. 2223-2224, 1971.
9. R. K. Meruva, E. Malinowska, R. W. Hower, R. B. Brown and M. E. Meyerhoff, Transducers '95, 217-D6, 855-862, 1995.
10. Peter D. Van Der Wal, Maria Skowronska-Ptasinska, Albert Van Den Berg, Piet Bergveld, Ernst J. R. Sudhölter and David N. Reinhoudt, "New membrane materials for potassium-selective field-effect tansistors" , Elsevier Anal. Chim. Acta, Vol. 231, pp. 41-52, 1990.
11. Johan Bobacka, Mary McCarrick, Andrzej Lewenstam and Ari Ivaska, "All Solid-State Poly(vinyl chloride) Membrane Ion-selective Electrodes With Poly(3-Octylthiophene) Solid Internal Contact" , Analyst, Vol. 119, pp. 1985-1991, 1994.

12. G. S. Cha, R. B. Brown, Sens. Actuators, B1, 281-285, 1990.
13. D. Liu, "Microfabricated Potentiometric Solid-State Ion/Biosensor Arrays", Ph. D. Dissertation, University of Michigan, USA, 1994.
14. Urs Oesch, Daniel Ammann and Wilhelm Simon, "Ion-Selective Membrane Electrodes for Clinical Use", Clin. Chem., Vol. 32, No. 8, pp. 1448-1459, 1986.
15. G. S. Cha, D. Liu, M. E. Meyerhoff, H. C. Cantor, A. R. Midgley, H. D. Goldberg, R. B. Brown, Anal. Chem., Vol 63, pp. 1666-1672, 1991.
16. H. D. Goldberg, Ph. D. Thesis, University of Michigan, USA, 1993.
17. M. Manjo, Timothy J. Rohm and George G. Guilbault, "An Investigation of Polyphenyl-Onium Bases and Other Materials for Phosphate Ion-Selective Electrodes", Anal. Chim. Acta., Vol. 77, pp. 19-27, 1975.
18. W. E. Morf, "The Principles of Ion-Selective Electrodes and of Membrane Transport", pp. 8, Elsevier Scientific Pub. Co., 1981.
19. Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, "Tietz Textbook of Clinical Chemistry", 2nd Ed., pp. 169-171, W. E. Saunders Co., 1994.
20. P. W. Atkins, "Physical Chemistry", 4th Ed., pp. 259-261, Oxford Univ. Press, 1990.
21. R. W. Cattrall, H. Freiser, Anal. Chem., Vol. 46, pp. 2223-2224, 1971.
22. G. Carmack, H. Freiser, Anal. Chem., Vol. 49, pp. 1577-1579, 1973.
23. T. Satchwill and D. J. Harrison, J. Electroanal. Chem., Vol. 202, pp. 75-81, 1986.
24. G. J. Moody, J. D. R. Thomas and J. M. Slater, Analst, Vol. 113, pp. 1703-1707, 1988.
25. Charles R. Handorf, "Clinics in Laboratory Medicine", Vol. 14, No. 3, pp. 506-507, W. B. Saunders Co., 1994.

	Number of sample	Matrix	Removed	Unremoved
Ultrasonic bath test	24	PVC	24	-
		SR	-	24
Scotch tape test	30	PVC	18	12
		SR	-	30

표 2. SR과 PVC를 지지체로 한 K^+ 이온 선택성 감지막의 접착력 비교

Table 2. Comparision of the adhesive strength for the SR- and PVC-based K^+ ion-selective membranes

(단위: mmol/ℓ)

		Na^+	K^+	Ca^{2+}	Cl^-
Potassium	STD. 1	130	2	1.2	103
	STD. 2	130	5	1.2	106
Sodium	STD. 1	50	8	1.2	50
	STD. 2	130	4	1.2	105

표 1. 보정용액의 조성

Table 1. compositions of calibration solutions

	Regression Line Statistics					
	n	Slope	Intercept	X_{min} (mmol/ℓ)	X_{max} (mmol/ℓ)	r (p-value)
K^+	50	0.97	0.51	2.74	0.73	0.99 (0.0001)
Na^+	69	0.98	-0.92	113.2	146.7	0.99 (0.0001)

표 3. HS603 자동혈액분석기와 Ciba-Corning사의 BGA 288과의 비교 평가

Table 3. Evaluation of the performance for the HS603 blood analyzer vs Ciba-Corning BGA 288

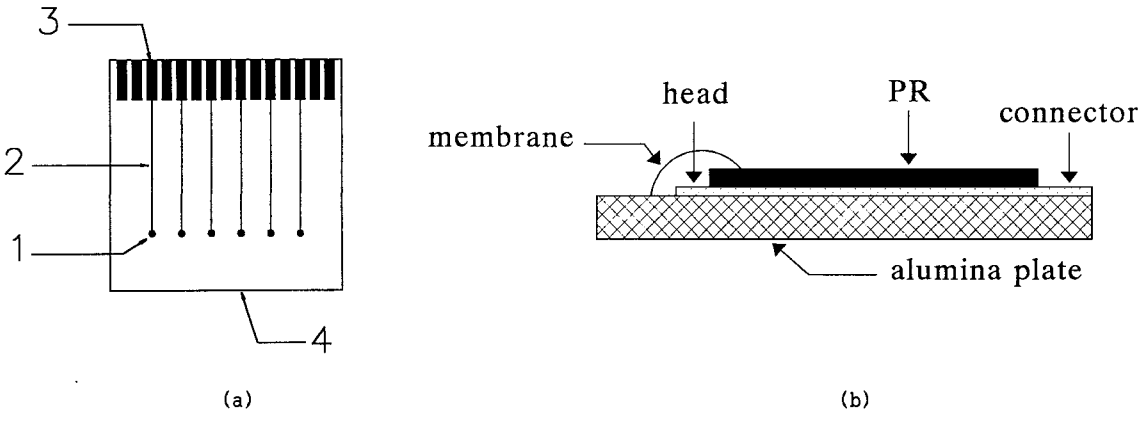


그림 1. 고체형 전극의 개념도; (a) 구조 (b) 단면도
1. head 2. lead line 3. connector 4. alumina plate
Figure 1. Schematic diagram of the solid-state electrode; (a) construction (b) cross-section
1. head 2. lead line 3. connector 4. alumina plate

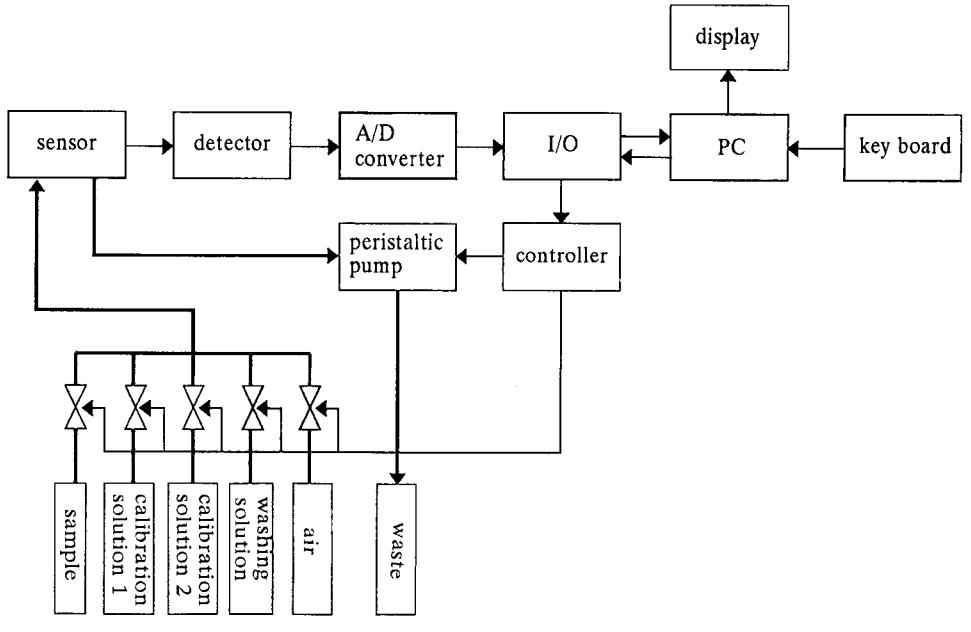


그림 2. 시스템의 블럭선도
Figure 2. Block diagram of the system

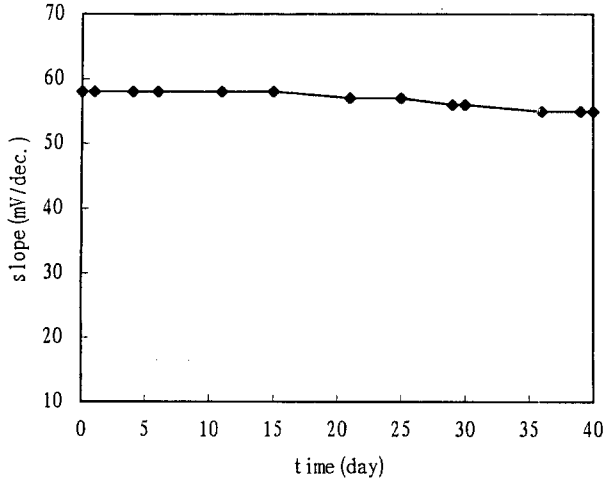


그림 3. 실리콘러버를 지지체로 한 potassium 선택성 고체형 전극의 수명

Figure 3. Lifetime of the SR-based solid-stste potassium-selective electrode

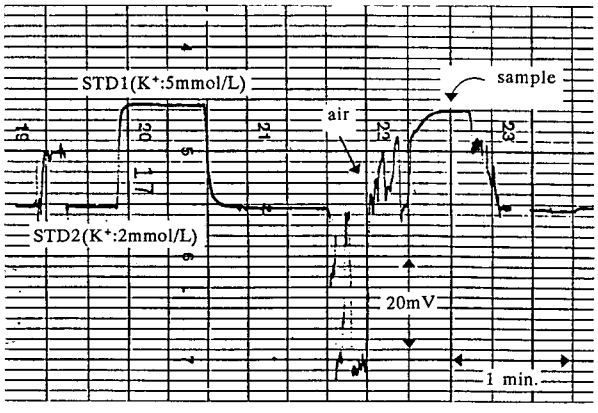


그림 5. HS603 자동혈액분석기에서 실리콘러버를 지지체로 한 K^+ 선택성 고체형 전극의 감응

Figure 5. Response of the SR-based solid-stste K^+-selective electrode for the HS603 automatic blood analyzer

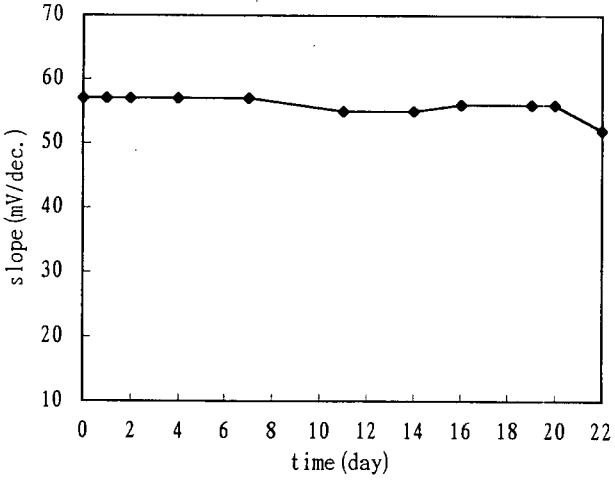


그림 4. 실리콘러버를 지지체로 한 sodium 선택성 고체형 전극의 수명

Figure 4. Lifetime of the SR-based solid-stste sodium-selective electrode

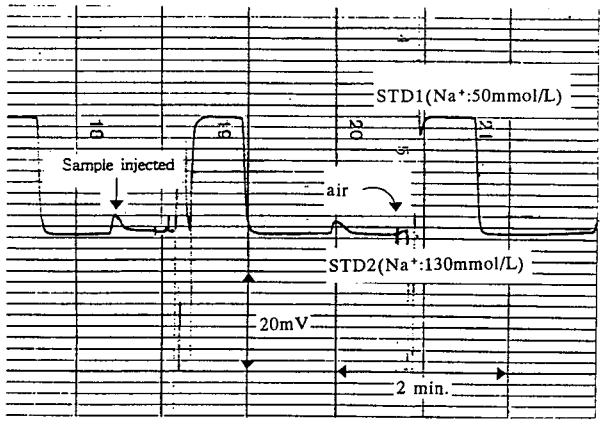
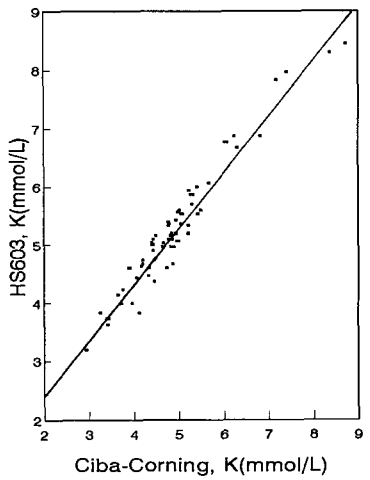


그림 6. HS603 자동혈액분석기에서 실리콘러버를 지지체로 한 Na^+ 선택성 고체형 전극의 감응

Figure 6. Response of the SR-based solid-stste Na^+-selective electrode for the HS603 automatic blood analyzer

(a)



(b)

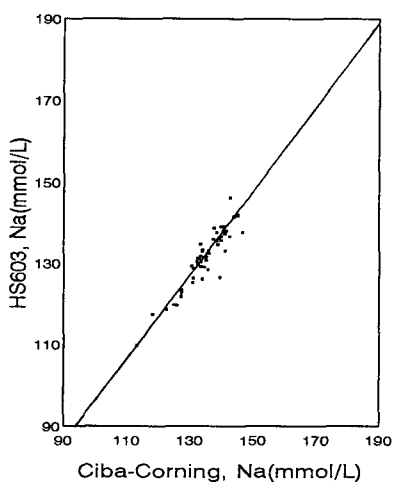


그림 7. HS603 자동혈액분석기와 Ciba-Corning사의 BGA 288로 부터 얻은 시료들의 측정값 비교; (a) K^+ (b) Na^+

Figure 7. Comparison of values for samples obtained with HS603 automatic blood analyzer vs Ciba-Corning BGA 288; (a) K^+ (b) Na^+