

마이크로 채널 내부의 Micro-LIF 측정을 위한 마이크로 레이저 평면빔과 혼합용매의 적용

윤상열[†] · 김재민* · 김경천*

Application of Micro-Thin Laser sheet and Mixed Solvent for Micro-LIF Measurement in a Microchannel

Sang Youl Yoon, Jae Min Kim and Kyung Chun Kim

Abstract

One most feasible way to measure the concentration field in the micro-channel is using micro-LIF(Laser Induced Fluorescence) method. However, an accurate concentration field at a given cross plane in a micro-channel has not been successfully achieved so far due to various limitations in the light illumination and fluorescence signal detection. The present study demonstrates a novel method to provide an ultra thin laser sheet beam having five(5) microns thickness by use of a micro focus laser line generator. The laser sheet beam illuminates an exact plane of concentration measurement field to increase the signal to noise ratio and considerably reduce the depth uncertainty. Nile Blue A was used as fluorescent dye for the present LIF measurement. The enhancement of the fluorescent intensity signals was performed by a solvent mixture of water (95%) and ethanol (EtOH)/methanol (MeOH) (5%) mixture. To reduce the rms errors resulted from the CCD electronic noise and other sources, an expansion of grid size was attempted from 1×1 to 3(3 or 5(5 pixel data windows and the pertinent signal-to-noise level has been noticeably increased accordingly.

Key Words : 마이크로 형광여기법(Micro LIF), 형광강도향상(Fluorescence intensity enhancement), 마이크로 레이저 평면빔(Micro laser sheet beam)

1. 서론

최근 마이크로 관련 기술향상, 응용분야의 확대와 더불어 다양한 시도와 연구가 이루어지고 있다. 이중 상당 부분은 micro-TAS, Lab-on-a-chip 등으로 불리는 소형화된 분석 시스템에 대한 것

이며, 대부분 생명, 의료, 화학분야와 관련되어 있다. 따라서 이러한 마이크로시스템은 분석/반응 물질의 이송, 저장, mixing, reaction 등의 역할을 담당하는 microfluidic device들로 구성되며, 이중 중요한 두 가지 역할은 mixing, reaction을 원활히 수행하기 위해 micro-mixer, micro-reactor 등이 설계, 개발되어 적용되고 있다. 그러나 이의 성능을 정량적으로 측정할 측정기법은 미흡한 실정이며 대부분 가시화에 의한 정성적 분석에 의존하고 있다. 따라서 농도장, 온도장 등을 정량적으로 측정할 수 있는 Micro-LIF기법의 필요성이 제기되고 있다. 그러나 마이크로시스템 자체의 미세한 구조의 특성에 의해 기존의 시도된 방법들은 모두

[†] 부산대학교, 기계공학부

E-mail : yoonsy@pusan.ac.kr

* 부산대학교, 기계공학부

volume illumination을 통한 시도들이었다. Shinohara 등은(2003년) 이러한 volume illumination을 통해 pH의 정량화를 시도한 바 있다. 그러나 이러한 광조사 방법에 의한 농도장의 측정은 2차원을 가정한 유동에 적용이 가능하며 측정영역 이외의 상하부 노이즈의 영향을 많이 받게되는 단점이 존재한다. 그러므로 3D flow를 응용한 대부분의 mixer등에는 이러한 광조사 방식에 의한 농도장의 측정에는 많은 한계와 측정오차를 가져오리라 판단된다. 따라서 본 연구에서는 단지 5 micron 두께를 가지는 레이저 평면광을 Microchannel 내부의 관심영역으로 조사하여 Micro-LIF 기법을 개발하고자 하였다. 또한 형광 신호의 특성을 향상하기 위해 혼합용매(물(95%)-에탄올/메탄올(5%))을 통한 형광신호의 증가를 통해 신호대잡음비를 높이고자 하였다. 또한 농도장의 단일분석영역의 1x1픽셀에서 3x3, 5x5로의 증가를 통해 CCD의 랜덤노이즈를 줄여 농도치의 정확도를 높이고자 하였다.

2. Micro laser sheet beam

본 연구의 목적 중 첫번째는 Micro laser sheet 빔을 사용하여 Micro-LIF 측정을 가능케하는 것이다. Fig. 1은 laser sheet test-datasheet를 나타내며 638nm파장을 가진다. 최대강도의 50%지점에서의 레이저 두께는 2.8 μ m, 13.5% 지점에서는 5.3 μ m의 두께를 가진다. 따라서 측정영역의 범위에 따른 각각의 objective렌즈의 초점깊이에 상관없이 항상 일정한 5 μ m 두께의 측정영역을 가지게 된다. 또한 Micro laser sheet의 Rayleigh range는 약 35 μ m 정도로 최소 빔 두께의 $\sqrt{2}$ 배(약 1.4)에 해당하는 지점까지의 영역을 의미한다. 이는 70 μ m정도의 영역이 7 μ m 이내의 두께를 가짐을 의미한다. 따라서 100 μ m 정도영역을 측정할 경우 10 μ m 이하의 두께를 가지는 레이저 평면빔에 의해 측정이 이루어짐을 알 수 있다.

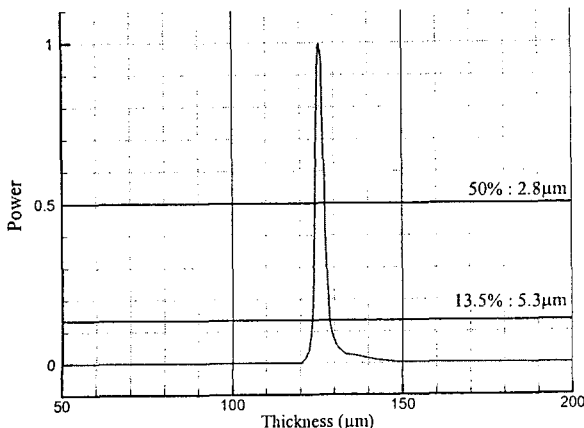


Fig. 1. Micro Laser light sheet test-datasheet

3. 혼합용매에 의한 형광강도 향상

본 연구의 두번째 목적은 혼합용매를 사용하여 형광강도를 향상시키고자하는 것이다. 마이크로 스케일 연구에 있어 낮은 형광강도는 하나의 문제점으로 지적되고 있으며, 이는 측정에 있어 정확도와도 관련된다. 그러나 순수한 용매에서의 형광 분자의 형광에 대한 연구는 많이 이루어져 있으나 상황이나 혼합용매에 녹아있는 형광분자의 특성은 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 Nile Blue A(C₄₀H₄₀N₆O₆S)를 물(95%)과 소량의 에탄올/메탄올(5%)로 혼합된 용매에 섞어 사용하였다. 우선 Water-Ethanol(Methanol) solvent에 대한 형광강도 변화에 대해 조사되었으며, Fig. 2은 동일 Nile Blue A 농도(102.3 μ M)에 대한 물-에탄올/메탄올 혼합액에서의 에탄올과 메탄올의 비율에 따른 형광강도의 변화를 나타낸다. 전체적으로 형광강도가 낮은 비율의 알코올의 첨가에도 현저히 증가됨을 알 수 있으며, 에탄올 혼합액의 경우 5%의 비율에서 43%정도의 형광강도 증가가 생겼으며, 메탄올의 경우는 28%정도의 증가를 보여주고 있다.

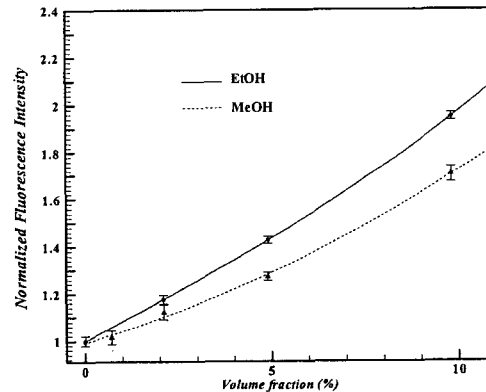


Fig. 2. Fluorescence intensity variation of Nile Blue A in solvent mixtures of water-EtOH/MeOH according to various volume fractions of EtOH/MeOH

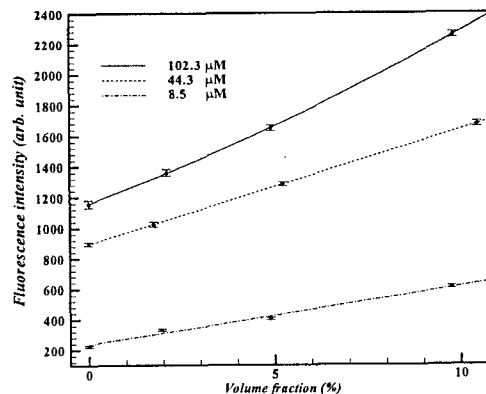


Fig. 3. Volume fraction of EtOH vs fluorescent intensity according to each concentration of Nile Blue A in solvent mixtures of water-EtOH

Fig. 3은 각각의 Nile Blue A 농도에서 Ethanol의 비율에 따른 형광강도의 변화를 보여준다. 전체적으로 순수한 물의 경우 보다 형광강도가 현저히 증가되었음을 알 수 있으며, 저농도의 경우 거의 선형적으로 강도가 증가하지만, 고농도의 경우 비선형적인 증가 경향을 보이고 있다. 이러한 형광 강도의 증가는 높은 polarity를 가진 물에 비해 낮은 polarity를 가진 알코올의 희석에 의한 효과와 물과 형광분자간의 Hydrogen bonding이 알코올에 의해 완화에 의해 전체적인 excited 상태의 에너지 준위가 상대적으로 높아진 결과이다.

3. 실험장치 및 방법

Fig. 4는 본 연구를 위한 시스템의 개략도와 사진을 나타낸다. 전체 시스템의 구성은 크게 12bit cooled CCD camera, long pass filter cube가 장착된 현미경, Micro laser line generator, syringe pump로 구성되었으며, Dark current noise를 최소화하여 측정오차를 줄이기 위해 12bit cooled ccd 카메라가 사용되었다. 또한 Micro laser sheet의 positioning을 위해 3축 micro-traversing stage, 3축 tilting stage가 사용되었다. Micro laser의 파장은 638nm이었으며, 이 파장에 최대의 흡수파장을 가지는 형광물질은 Nile Blue A, Alexa Fluor 633, TOTO 3 등이 있다. 본 연구에는 Biology, materials science 등에서 많이 사용되고 있는 Nile Blue A를 선택하였다. Nile Blue A는 Maximum excitation 파장이 635nm 정도로 레이저 파장과 일치하며, 또한 Maximum Emission 파장이 680nm 정도로 다른 형광물질에 비해 필터링이 용이하기 때문이다. 형광강도를 높이기 위해 5% ethanol을 첨가하여 사용하였다.

레이저 빛의 주변산란광을 없애고 형광물질로부터 여기된 형광빛만을 획득하기 위해 본 연구에서는 cut off가 665nm인 Long pass filter가 사용되었다. 이 필터를 사용하여 635nm 파장을 가지는 레이저 빛의 투과율을 0.01% 이하로 완전히 없앨 수 있었으며, 680nm 파장의 형광파장의 투과율은 90%정도였다.

본 연구를 위한 채널은 투과율이 높은 PDMS (Dow Corning Corp.)로 제작된 채널에 유리판을 bonding하여 제작되었다. 채널의 제작은 일반적인 MEMS Fabrication Process를 따랐으며 채널의 제작을 위해 높은 구조물의 제작이 가능한 SU-2100 Photo resist (MicroChem Corp.)를 Spin coating, Exposure, Development 등의 과정을 통해 150 μm 높이의 채널패턴을 형성시켜내었고, 이후 PDMS molding, plasma bonding을 통한 PDMS-Glass 접합을 통해 채널을 제작하여 본 연구에 사용하였다.

Fig. 5는 채널의 치수와 형상을 나타낸다. 채널의 옆면은 레이저 평면법의 원활한 조사와 왜곡의 최소화를 위해 최대한 채널벽면 근처까지 움푹 들어가게 설계되어 제작되었으며, 이때의 벽의 두께는 200 μm 이었으며, 채널의 높이는 150 μm 이었다. Main channel(500 μm)과 Cross channel(100 μm)을 통해 형광유체가 흐르도록 하였다. Micro-LIF 기법의 평가를 위해 102.3 μM 농도를 가진 형광유체를 주입하였다.

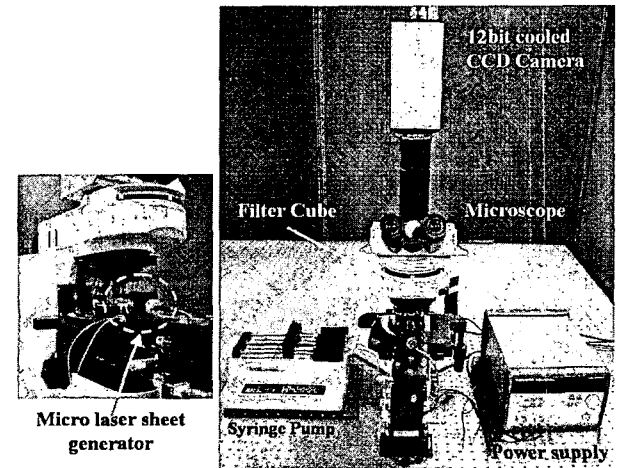
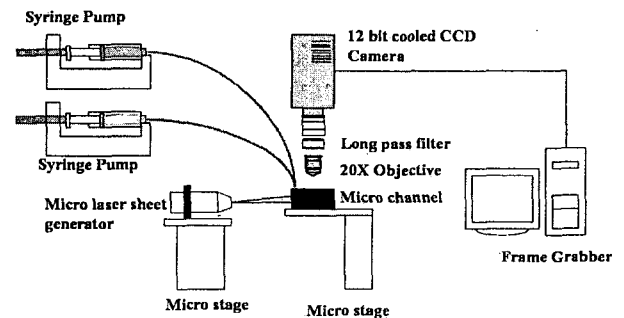


Fig. 4. Experimental Setup

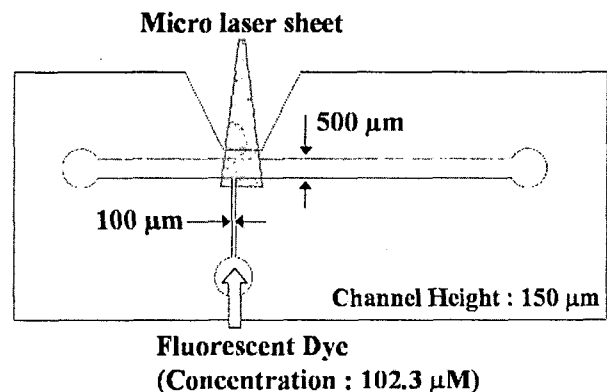


Fig. 5. Shape and dimension of micro-channel.

4. 농도장 측정 및 평가

Calibration은 물(95%)-에탄올(5%) 혼합물에 7가지의 다른 농도를 이용하여 수행되었다. 각 농도에 대해 20개 형광강도 값이 평균되어 사용되었으며, least square에 의한 4차 다항식으로 curve fitting하여 calibration 식을 찾아내었다. Fig. 6은 이미지상의 (560,560) 에서의 각 농도에 해당하는 이미지 강도 값과 이를 curve fitting한 그래프를 나타낸 것이다. 이러한 Calibration 과정은 이미지 전체에 걸쳐 각각의 픽셀 Point마다 행해졌으며 따라서 전체 백만개 정도의 calibration curve 식을 구하였다. Curve fitting 시 RMS Error는 $0.2\mu\text{M}$ 정도로 잘 일치함을 확인하였으며, 공간해상도는 340nm 정도였다.

농도값의 평가를 위해 $102.3\mu\text{M}$ 농도값을 가진 형광유체의 이미지를 획득하여 평가하였다. 순간형광강도값을 Fig. 7에 나타내었다. 전체적으로 불균일한 분포를 나타내고 있으며 이는 레이저 강도의 불균일에 의한 것이다. 앞서의 calibration식을 이용하여 Fig. 7의 점선으로 나타내어진 영역내에서 구한 농도장이 Fig. 8에 나타내어져 있다. 전체적으로 Fig. 7에 나타났던 불균일한 분포는 픽셀별의 calibration에 의해 제거되어졌음을 알 수 있으며 주입한 농도치와 일치함을 알 수 있다. 또한 calibration과 계산은 각 픽셀당 계산되었으며 CCD센서 등으로부터의 랜덤노이즈를 최소화하기 위해 1×1 , 3×3 , 5×5 픽셀 (0.34×0.34 , 1.03×1.03 , $1.72\mu\text{m}\times 1.72\mu\text{m}$)로의 계산영역을 확대/평균하여 비교하였다. 실제값과 계산값 사이의 RMS 에러가 1×1 에서는 $2.69\mu\text{M}$ (relative error: 2.63%), 3×3 에서 $0.94\mu\text{M}$ (0.89%), 5×5 에서 $0.56\mu\text{M}$ (0.54%). 확률분포를 통해 전체 값의 1×1 에서 95%가 5%이하의 relative errors를, 3×3 에서는 전체의 97%가 2% 이내, 5×5 에서는 전체 94%가 1%이하의 relative errors를 가짐을 확인하였다. 따라서 계산영역의 확장을 통해 랜덤노이즈를 줄여 농도계산의 정확도를 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

5. 결론

마이크로 평면법에 의해 Micro-LIF 측정이 가능함을 확인하였으며, 낮은 polarity 를 가진 용액을 혼합한 혼합용액(물-에탄올/메탄올)을 사용함으로써 형광강도신호를 향상시킬 수 있었다. 또한, 농도계산시 계산영역의 확장을 통해 계산의 정확도를 높일 수 있음을 확인할 수 있었다.

후 기

이 논문은 국가지정연구실사업(M10203000053-02J0000-02910)의 지원을 받아 연구되었음

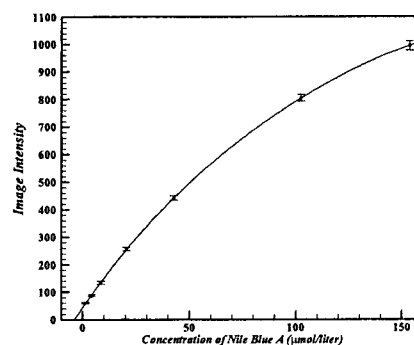


Fig. 6. 1×1 Calibration data and curve fit at (560,560) on the calibration image plane

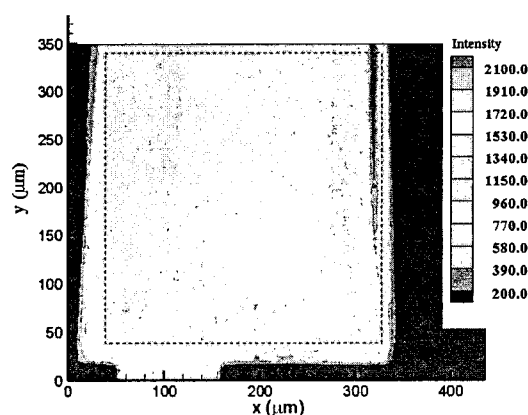


Fig. 7. Uncalibrated fluorescence intensity field

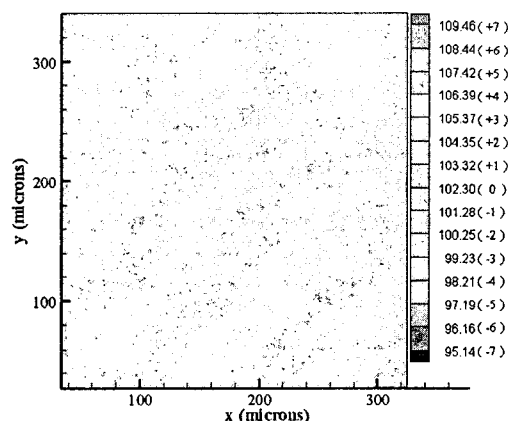


Fig. 8. Concentration field calculated from Fig. 10 (unit : $\mu\text{M}(\%)$)

참 고 문 헌

- 1) Shinohara, K., Sugii, Y., Okamoto, K., Hibara, A., Tokeshi, M., and Kitamori, T., 2003, "Micro-PIV and Micro-LIF Measurements of Chemically Reacting Flow in Micro Fluidic Device," Proc., 5th Int. Sym. on Particle Image Velocimetry, Pusan, Paper No. 3238.
- 2) Lakowicz, R. J., 1999, "Principles of Fluorescence Spectroscopy," 2nd Edition, Plenum press, New York.