

## A Study on the Microfabricated Clark-type Sensor for Measuring Dissolved Oxygen

朴正鎰\* · 張鍾賢\* · 崔溟琦\*\* · 李東永\*\*\* · 金永美§ · 朴政浩†

(Jungil Park · Jong-hyeon Chang · Myungki Choi · Dong-young Lee · Youngmi Kim · Jungho Pak)

**Abstract** - This paper presents a microfabricated Clark-type sensor which exactly can measure dissolved oxygen in the cell containing solution. We designed, fabricated, and characterized a microfabricated Clark-type oxygen sensor for measuring dissolved oxygen. The microfabricated oxygen sensor consists of 3-electrodes on a glass substrate, a FEP (Fluorinated ethylene propylene) oxygen-permeable membrane, and PDMS (Polydimethylsiloxane) reservoir for storing sample solution. Thin-film Ag/AgCl was employed as a reference electrode and its durability was verified by obtaining a stable open circuit potential for 2 hours against a commercial Ag/AgCl electrode and a stable cyclic voltammetry curve. Selectivity, response time, and linearity of the fabricated oxygen sensor were also verified well by cyclic voltammetry and amperometry depending. The fabricated oxygen sensor showed a 90% response time of 40sec and an excellent linearity with a correlation coefficient of 0.994.

**Key Words** : Clark-Type, Oxygen Sensor, Dissolved Oxygen, Mmembrane

### 1. 서 론

Clark-type 산소 센서는 1956년 Leland C. Clark에 의해 처음으로 발명된 후[1], 환경 및 의료 분야의 연구에 널리 이용되고 있다. Clark-type 센서는 전기화학적 센서로 재현성이 우수하고 센서마다 개별 편차가 매우 적고, 저농도의 산소 분석이 가능하여 바이오센서로 응용이 되고 있으며, 특히 환경 수질 분석용, 임상 진단용 및 실시간 모니터링용으로 응용되고 있다. 최근 들어 세포의 산소 호흡량이 생물학적 활성도를 측정하는데 아주 중요한 지표가 되고, 이로부터 대사 증후군의 발병 원인을 판단할 수 있다는 보고들이 발표되면서 세포의 산소 호흡량을 정확하고 정밀하게 측정할 수 있는 산소 센서의 개발이 요구된다[2, 3]. 최근 20년 동안에는 반도체 및 MEMS 기술과 접목하여 혈액 내의 산소 분압 및 세포의 활성도를 측정할 뿐만 아니라 수질의 용존 산소를 측정할 수 있는 소형화되고 다양한 Clark-type 센서가 연구되고 있다 [4-10].

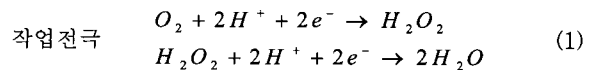
본 연구에서는 미량의 세포를 포함한 용액 내에서 세포의 호흡에 의한 산소소모량을 측정하여 세포의 활성도를 측정할

수 있는 초소형 Clark-type 센서를 제작하였다. 기존 전극으로 사용될 박막형 Ag/AgCl 전극을 제작하고 그 내구성을 평가하였고, 이를 Clark-type 센서에 집적화하였다. 제작한 Clark-type 센서를 이용하여 산소 유무에 따른 C-V (Cyclic Voltammetry) 그래프와 센서의 반응 시간, 산소 농도에 따른 전류값 변화를 측정하고 이를 평가 및 분석하였다.

### 2. 설계 및 제작

#### 2.1 Clark-type 센서 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 구성되어 있다. 측정 용액 내의 용존 산소는 멤브레인을 투과하여 내부 전해질로 이동하고, 이동한 산소는 음전위가 인가된 작업 전극에서 식 (1)의 반응으로 환원되고[11], 이 환원 전류를 측정함으로써 용존 산소의 농도를 분석할 수 있다. 여기서 환원 전류의 크기는 확산 방정식으로 예측할 수 있으며 작업 전극 표면에서의 산소 농도에 비례함을 식 (2)에서 알 수 있다[12].



$$I(t) = nFAP_m \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (2)$$

여기서  $n$ ,  $F$ ,  $A$ ,  $P_m$ 은 각각 전자의 수, Faraday 상수, 작

† 교신저자, 終身會員 : 高麗大 工大 電氣電子電波工學部 教授 · 工博

E-mail : pak@korea.ac.kr

\* 正 會 員 : 高麗大 工大 電氣工學科 博士課程

\*\* 學生會員 : 高麗大 工大 電氣工學科 碩士課程

\*\*\* 非 會 員 : 蔚山大 醫大 峨山生命科學研究所 學士

§ 非 會 員 : 蔚山大 醫大 峨山生命科學研究所 理博

接受日字 : 2007年 6月 11日

最終完了 : 2007年 7月 11日

업 전극의 면적, 멤브레인의 산소 투과율을 나타낸다.

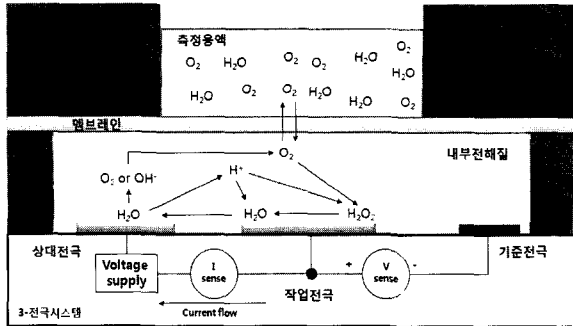


그림 1 Clark-type 센서의 원리 모식도  
Fig. 1 Schematic diagram for the reaction mechanism of a general Clark-type sensor

2.2 Clark-type 센서 설계

그림 2는 제안된 Clark-type 센서의 구조를 나타내는데 크게 3개의 층으로 구분된다. 전압 인가 및 측정을 위한 첫 번째 층은 1.2cm x 2cm의 크기의 유리 기판 (Pyrex glass 7740)을 기판으로 하고, 그 위에 작업 전극, 상대 전극, 기준 전극이 구성된 형태이다. 작업 전극과 상대 전극으로는 Au를, 기준 전극으로는 Ag/AgCl을 사용하였다. 내부 전해질 챔버 구성 및 전극선 절연을 위한 두 번째 층은 SU-8 2100 (MicroChem Corp.) photoresist로 패터닝하였다. 이때 산소를 선택적으로 투과하는 멤브레인과 작업 전극 사이에 블록을 두어 멤브레인이 처지는 것을 방지하고 두 영역으로 구분된 내부 전해질 챔버간 전해질 이동이 가능한 마이크로채널이 형성되도록 하였다. 측정 용액을 담은 reservoir로 이용되는 세 번째 층은 Teflon mold를 이용하여 PDMS (Polydimethylsiloxane, Sylgard 184)로 제작하였다.

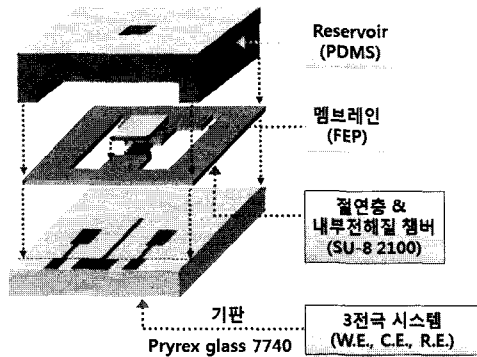


그림 2 제안된 Clark-type 센서 구조  
Fig. 2 Schematic diagram of the proposed Clark-type sensor

2.3 Clark-type 센서 제작

제안된 Clark-type 센서를 제작하기 위해 먼저 유리 기판을 piranha 용액 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 4 : 1)에서 5분간 세척하였다. 유리 기판에 작업 전극 및 상대 전극으로 사용하기 위해 e-beam/thermal evaporator로 Ti/Au를 500Å/2500Å 두께로 증착하고 mask aligner(MJB3, Karl Suss)를 이용하여 패터닝하였다. 이 후 같은 방법으로 기준 전극으로 사용할

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. Ag 전극에 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 [13]. 산소를 선택적으로 투과시키는 멤브레인으로 FEP (Fluorinated Ethylene Propylene, Strathkelvin Instruments)을 사용하였고 이를 작업 전극 위에 형성된 마이크로채널 위에 두어 PDMS reservoir의 측정 용액과 SU-8 chamber의 내부 전해질에 접촉되도록 하였다. 생체 적합한 PDMS reservoir는 base PDMS와 curing agent를 10 : 1의 질량비로 혼합한 후 Teflon으로 제작한 mold에 부어, 75°C 오븐에서 25분간 굳혀 제작하였다. 실리콘 접착제 (3145 Silicone adhesive, Dow Corning)를 이용하여 이를 전극이 패터닝된 기판과 접합하였다. 그림 3은 제작된 Clark-type 센서를 보여준다.

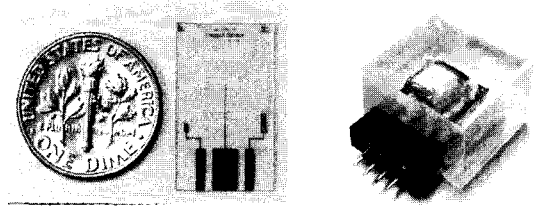


그림 3 제작된 Clark-type 센서의 사진  
Fig. 3 Photographs of the fabricated Clark-type sensor

3. 특성 평가

3.1 Ag/AgCl의 내구성 평가

Clark-type 센서 동작 시 기준 전극 Ag/AgCl은 중요한 영향을 미친다. 전류의 흐름이 없는 셀에서 상용 Ag/AgCl 전극 (RE-5B, Bioanalytical Systems Inc.)과 제작한 기준 전극 사이에서의 OCP (Open Circuit Potential)를 0.1M KCl 용액에서 측정하여 제작한 기준 전극의 내구성을 평가하였다[13, 14]. 그림 4(a)는 상용 Ag/AgCl 전극과 제작한 기준 전극 사이의 OCP 측정 결과로, 2시간 동안 약 68mV에서 거의 변화 없이 안정된 결과를 보인다. 세포의 산소흐름량을 측정하기 위한 Clark-type 센서의 측정 시간은 1시간 내외인 반면에 2시간 이상 안정적인 전위를 유지하므로 Ag/AgCl의 내구성이 좋다고 판단할 수 있다.

전류의 흐름이 있는 셀에서 제작한 기준 전극 Ag/AgCl을 평가하였다. 평가 방법은 작업 전극으로 Au를, 상대 전극으로 Pt wire를, 기준 전극으로 제작한 Ag/AgCl을 사용하여 10mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-3M KCl에서 -0.5 ~ 0.7 V 범위의 전압을 100mV/s의 속도로 10 cycles의 C-V를 측정하였다. 그 결과 그림 4(b)와 같이 10 cycles 동안 전류의 흔들림 현상이나 뿔 현상 없이 이상적인 가역반응을 얻었다. 상용 기준 전극과 제작한 기준 전극에서 피크 전류의 전위가 틀린 것은 Cl<sup>-</sup>의 농도차에 의해 생긴 것이다[15]. Nernst 방정식으로 계산하였을 때 이론적인 두 전위차는 84mV인데 실험적인 두 전위차는 평균 70mV이므로 이론적인 값과 유사하고, 이는 상용 기준전극과 거의 동일한 수행능력을 가졌다 할 수 있다.

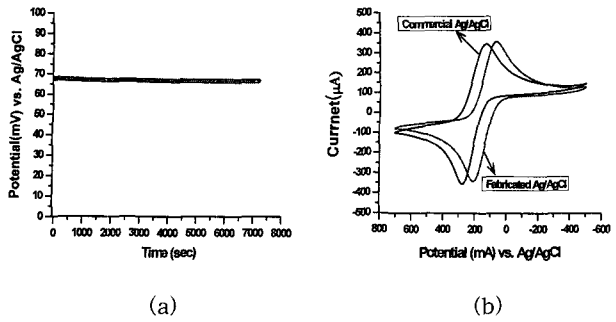


그림 4 (a) 제작된 Ag/AgCl 전극의 OCP 측정 결과 (전류의 흐름이 없을 경우), (b) 제작한 Ag/AgCl을 기준전극으로 사용하여 측정된 C-V 결과 (전류의 흐름이 있는 경우)

Fig. 4 (a) Open circuit potential plots for the fabricated Ag/AgCl (without current flow), (b) cyclic voltammogram using the fabricated Ag/AgCl as a reference electrode (with current flow)

3.2 제작한 Clark-type 센서의 Cyclic Voltammogram

제작된 Clark-type 센서의 내부 챔버에 0.1M KCl을 채우고 reservoir가 산소 포화 상태 일 때(full-oxygen state; air-filled reservoir)와 무 산소 상태 일 때(zero-oxygen state; 0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)의 C-V를 측정하였다(그림 5). 0 ~ -1.0V 범위에서 50mV/s의 속도로 1 cycle을 측정하였다. 산소 포화 상태인 경우, 산소 환원은 -0.3 ~ -1.0V 범위에서 일어나며 -0.8V에서 최대 환원 전류값을 보여주고 이때 전류값은 124nA이다. 산소가 없을 때, -0.8V에서 전류값 2.5nA로, 산소 유무에 따른 환원전류는 약 50배로 나타나 용존 산소 측정 센서로 사용할 수 있음을 확인하였다.

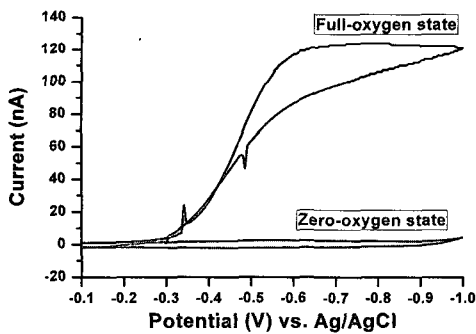


그림 5 산소 유무에 따른 C-V 측정 결과  
Fig. 5 Cyclic voltammogram of the fabricated Clark-type sensor with and without oxygen

3.3 제작한 Clark-type 센서의 재현성 및 반응 시간

그림 6은 산소 포화 상태와 무 산소 상태를 번갈아 변화시키면서 -0.8V에서 2시간 동안 Clark-type 센서의 재현성을 측정된 그래프이다. 산소 포화 상태에서 5분 동안 측정 후, 용존 산소가 없는 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 전류를 실시간으로 측정하였다. 무 산소 상태에서도 5분 동안 측정 후, 2 ~ 3 초 내로 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 용액을 제거하여 산소 포화 상태로 바꾸어

주었다. 포화상태에서 2시간 동안 측정된 환원전류의 평균값과 표준편차는 97.03nA와 1.37nA이고, 무 산소 상태에서 측정된 환원전류의 평균값과 표준편차는 3.25nA와 0.26nA로 관찰되었다. 비록 각 상태에서 환원전류는 미비하게 변하지만, 각 상태에서 측정된 전류의 차가 크고 2시간 동안 그 차이를 유지하며 각 상태에서의 표준편차가 작으므로 재현성이 판단할 수 있다. 제작한 Clark-type 센서의 90% 반응 시간은 40 초로 관찰되었다. 초소형 Clark-type 센서의 반응 시간은 많은 요소들에 영향을 받는데, 먼저 산소를 선택적으로 투과시키는 멤브레인의 종류 및 두께에 따라 산소 투과율이 다르기 때문에 반응 시간이 변하며, 산소를 환원시키는 작업 전극의 크기에 따라 반응 시간이 변한다[16, 17].

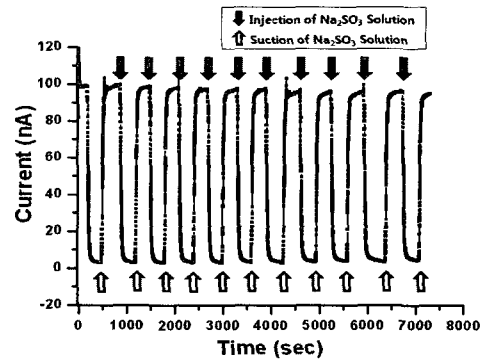


그림 6 제작된 Clark-type 센서의 재현성 결과  
Fig. 6 Reproducibility of the fabricated Clark-type sensor

3.4 제작한 Clark-type 센서의 선형성

그림 7은 산소가 포화된 deionized water와 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>을 혼합하여 산소농도에 따른 제작된 Clark-type 센서의 환원 전류를 측정하여 선형성 (linearity)을 분석한 결과, 상관계수 0.994로 높은 선형성을 보였다. 무 산소 상태에서 측정된 전류는 5nA였는데, 이 전류는 PDMS를 투과하여 유입된 산소 혹은 PDMS가 머금고 있는 산소, 상대 전극에서 재생성된 산소, 전해질을 넣어 주는 입구로 유입되는 산소 등의 원인에 의해서 0nA보다 높은 전류가 측정된 것으로 판단된다. 이 값은 실리콘 기판으로 제작된 산소센서로부터[4] 측정된 0nA의 전류보다 높긴 하지만, 8.5ppm(포화) 산소 농도에서 측정된 전류의 5% 정도이므로 두 전류의 차가 커서 그 사이의 용존 산소량의 정밀한 측정이 가능하리라 판단된다.

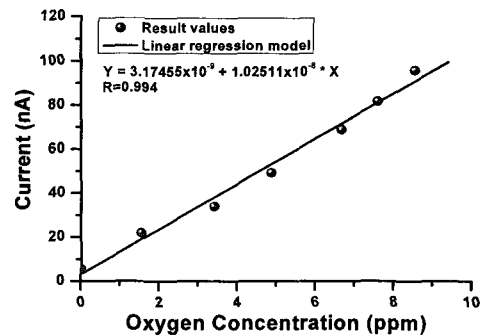


그림 7 제작된 Clark-type 센서의 선형성 결과  
Fig. 7 Linearity of the fabricated Clark-type sensor

#### 4. 결 론

본 논문에서는 세포의 산소 호흡량을 측정하기 위한 용존 산소 측정용 초소형 Clark-type 센서 설계 및 제작하고 그 특성을 분석하였다. 제안한 Clark-type 센서의 전극 기판은 반도체 공정과 MEMS 기술을 이용하여 쉽게 제작할 수 있었고, 세포 용액을 담을 수 있는 reservoir는 생체 적합한 PDMS를 이용하여 mold 기법으로 제작하였다. Clark-type 산소센서 전극 기판의 내부 전해질 챔버(두께: 100 $\mu$ m)는 SU-8 2100을 이용하여 구성하였다. 안정적인 전위 측정을 위해 Ag/AgCl 기준 전극을 제작하고 Clark-type 센서에 집적화하여 그 특성을 평가하였다. 그 결과, -0.8V에서 산소 유무에 따른 환원 전류는 50배에 이르고, 2시간 동안 좋은 재현성을 보였고, 센서의 90% 반응 시간도 40초로 나타났으며 또한 선형 상관계수 0.994로 우수한 선형성을 나타내었다. 또한 안정도, lifetime 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 2007년도 과학기술부의 재원으로 한국과학기술재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. R01-2006-000-11371-0).

#### 참 고 문 헌

- [1] L. C. Clark, "Electrochemical device for chemical analysis," US patent 2,913,386, 1956.
- [2] 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.
- [3] B. B. Lowell and G. I. Schulman, "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes," *Science*, vol. 307, pp. 384-387, 2005.
- [4] H. Suzuki, A. Sugama, and N. Kojima, "Micromachined Clark oxygen electrode," *Sensors and Actuators B*, vol. 10, pp. 91-98, 1993.
- [5] W. Glasspool and J. Atkinson, "A screen-printed amperometric dissolved oxygen sensor utilising an immobilised electrolyte gel and membrane," *Sensors and Actuators B*, vol. 48, pp. 308-317, 1998.
- [6] H. Suzuki, T. Hirakawa, S. Sasaki, and I. Karube, "An integrated module for sensing pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pH," *Analytica Chimica Acta*, vol. 405, pp. 57-65, 2000.
- [7] M. Wittkamp, G.-C. Chemnitz, K. Cammann, M. Rospert, and W. Mokwa, "Silicon thin film sensor for measurement of dissolved oxygen," *Sensors and Actuators B*, vol. 43, pp. 40-44, 1997.
- [8] C.-C. Wu, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue, "Fabrication of miniature Clark oxygen sensor integrated with microstructure," *Sensors and Actuators B*, vol. 110, pp. 342-349, 2005.
- [9] W. 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, pp. 11-18, 2006.
- [10] S. Kojima, M. Oughran, 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.
- [11] 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.
- [12] T.-J. Kim, T.-H. Jung, U.-H. Chung, and S.-I. Hong, "Simultaneous determination of oxygen transport characteristics of six membranes by hexagonal dissolved oxygen sensor systems," *Sensors and Actuators B*, vol. 72, pp. 11-20, 2001.
- [13] 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.
- [14] H. Suzuki, A. Hiratsuka, S. Sasaki, and I. Karube, "Problems associated with the thin-film Ag/AgCl reference electrode and a novel structure with improved durability," *Sensors and Actuators B*, vol. 46, pp. 104-113, 1998.
- [15] X. Sun and M. Wang, "Fabrication and characterization of planar reference electrode for on-chip electroanalysis," *Electrochimica Acta*, vol. 52, pp. 427-433, 2006.
- [16] J.-H. Lee and T.-J. Kim, "A study on oxygen permeability of polypropylene membranes and their temperature dependency using medical oxygen sensor," *Korean Journal Biotechnology and Bioengineering*, vol. 19, pp. 62-64, 2004.
- [17] H. Suzuki, T. Hirakawa, I. Watanabe, and Y. Kikuchi, "Determination of blood pO<sub>2</sub> using a micromachined Clark-type oxygen electrode," *Analytica Chimica Acta*, vol. 431, pp. 249-259, 2001.

저 자 소 개



**박 정 일(朴正鎰)**

1977년 11월 18일생. 2004년 고려대 전자 및정보공학부 졸업(학사), 2004년~현재 동 대학원 전기공학과 석·박사통합과정.

Tel : 02-3290-3238

Fax : 02-921-0544

E-mail : niipark@korea.ac.kr



**김 영 미(金永美)**

1960년 8월 29일생. 1983년 서울대 약학과 졸업(학사), 1985년 동 대학원 약학과 졸업(석사), 1991년 미국 Purdue대 생화학과 졸업(이학박사), 1991년~1995년 미국 Stanford 의과대학 Post-doc 및 연구교수, 1995년~1996년 서울대 약대 신의약품연구센터 연수연구원, 1996년~2002년 국립보건원 생명의학부 대사영양질환과 과장, 2002년~현재 울산의대 아산생명과학연구소 연구교수

Tel : 02-3010-4191

Fax : 02-3010-4182

E-mail : ymkimpak@amc.seoul.kr



**장 종 현(張鍾賢)**

1978년 12월 3일생. 2003년 고려대 전기 전자전파공학부 졸업(학사), 2005년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사), 2005년~현재 동 대학원 전기공학과 박사과정.

Tel : 02-3290-3238

Fax : 02-921-0544

E-mail : ican@korea.ac.kr



**최 명 기(崔溟琦)**

1978년 11월 6일생. 2005년 가톨릭대 물리학과 졸업(학사), 2006년~현재 고려대 대학원 전기공학과 석사과정.

Tel : 02-3290-3238

Fax : 02-921-0544

E-mail : protoss@korea.ac.kr



**박 정 호(朴政浩)**

1960년 2월 5일생. 1985년 미국 Purdue대 전기공학과 졸업(학사), 1988년 동 대학원 전기공학과 졸업(석사), 1992년 동 대학원 전기공학과 졸업(공학박사), 1992년~1995년 미국 Intel사 책임연구원, 1995년~현재 고려대 전기전자전파공학부 교수.

Tel : 02-3290-3238

Fax : 02-921-0544

E-mail : pak@korea.ac.kr



**이 동 영(李東永)**

1978년 8월 9일생. 2003년 한동대 생명식품과학부 졸업(학사), 2006년~현재 울산의대 아산생명과학연구소

Tel : 02-3010-4192

Fax : 02-3010-4182

E-mail : eastforever@naver.com