

[논문] - 비파괴검사학회지
*Journal of the Korean Society
 for Nondestructive Testing*
 Vol. 31, No. 5 (2011. 10)

압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 이용한 정량적 알파태아단백 검출

Quantitative Alpha Fetoprotein Detection with a Piezoelectric Microcantilever Mass Sensor

이상규*, 조종윤*, 이열호**, 전상민***, 차형준***, 문원규*†

Sangkyu Lee*, Jongyun Cho*, Yeolho Lee**, Sangmin Jeon***,
 Hyung Joon Cha*** and Wonkyu Moon*†

초 록 비표지 방식의 압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 이용하여 간세포암의 혈청표지물질인 알파태아단백(alpha fetoprotein, AFP)을 정상 농도인 10 ng/ml까지 정량적으로 검출하였다. 압전 마이크로캔틸레버 질량센서는 캔틸레버의 질량변화에 의하여 센서의 공진주파수가 변화되는 원리를 이용하여 센서에 붙은 물질의 질량을 측정하며, 센서의 공진주파수는 컨덕턴스 스펙트럼을 이용하여 전기적으로 측정한다. 제작된 센서는 공진 주파수가 약 1.34 MHz, 질량 민감도가 약 175 Hz/pg이며 단백질이 붙을 때 캔틸레버의 표면 스트레스 변화에 대한 센서의 공진 주파수 변화를 줄일 수 있도록 설계되어 질량센서로서 신뢰도를 높였다. ‘Dip and dry’ 방법으로 캔틸레버의 프로브 영역을 시약과 반응시켜서 AFP 항체를 고정화하고 AFP 항원을 검출하는 실험을 수행하였다. 10 ng/ml과 50 ng/ml농도의 항원에서 10분간 항원-항체 면역반응을 시켰을 때 센서에 검출된 항원의 질량이 각각 6.02 pg과 10.67 pg이다.

주요용어: 비표지, 압전 마이크로캔틸레버, 질량센서, 알파태아단백

Abstract Alpha fetoprotein(AFP), which is serological marker for hepatocellular carcinoma, was quantitatively measured by its normal concentration, 10 ng/ml, with a label-free piezoelectric microcantilever mass sensor. The principle of detection is based on changes in the resonant frequency of the piezoelectric microcantilever before and after target molecules are attached to it, and its resonant frequency is measured electrically using a conductance spectrum. The resonant frequency of the developed sensor is approximately 1.34 MHz and the mass sensitivity is approximately 175 Hz/pg. The sensor has high reliability as mass sensor by reducing the effect of surface stress on resonant frequency due to attached proteins. ‘Dip and dry’ technique was used to react the sensor with reagents for immobilizing AFP antibody on the sensor and detecting AFP antigen. The measured mass of the detected AFP antigen was 6.02 pg at the concentration of 10 ng/ml, and 10.67 pg at 50 ng/ml when the immunoreaction time was 10 min.

Keywords: Label-Free, Piezoelectric Microcantilever, Mass Sensor, Alpha Fetoprotein

1. 서 론

간세포암(Hepatocellular carcinoma)은 매년 약

25만 명의 사람을 사망으로 이르게 하는 중요한 암 질환 중 하나이며, 간세포암의 진단을 위하여 간세포암의 혈청표지물질인 알파태아단백(alpha

[접수일: 2011. 8. 3, 수정일: (1차: 2011. 8. 31, 2차: 2011. 9. 29), 게재확정일: 2011. 10. 7] *포항공과대학교 기계공학과, **삼성종합기술연구원, ***포항공과대학교 화학공학과, †Corresponding Author: Department of Mechanical Engineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea (E-mail: wkmoon@postech.ac.kr)

fetoprotein, AFP)을 환자의 혈청에서 검출하는 검사가 필요하다[1]. AFP의 정상 농도는 약 10 ng/ml 이므로 정확한 진단을 위해서는 이보다 낮은 농도에서도 AFP를 검출할 수 있는 센서가 요구된다.

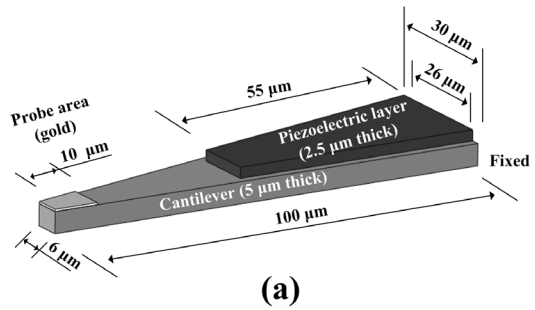
압전 마이크로캔틸레버 센서는 바이오센서로써 많은 장점을 가지고 있고 AFP를 정량적으로 검출하는데 적합하다. 압전 마이크로캔틸레버 센서를 이용하여 다양한 암 표지자를 검출하는 연구는 이미 활발하게 진행되고 있다[2]. 압전 마이크로캔틸레버 센서는 매우 높은 민감도를 가진 비표지 방식의 센서로써 그 크기가 매우 작으므로 휴대용 검사 장비로 개발이 가능하며 병렬검사가 가능하고 전기적으로 검출 신호를 측정할 수가 있다[3].

압전 마이크로캔틸레버 질량센서는 캔틸레버의 질량 변화에 의해 센서의 공진주파수가 변화되는 원리를 이용하여 센서에 붙은 타겟 단백질의 질량을 측정한다[4]. 센서에 붙은 타겟 물질에 의한 질량하중효과(mass loading effect) 뿐만 아니라 표면 스트레스 변화에 의해서도 마이크로캔틸레버 센서의 공진 주파수는 변화가 되는데 캔틸레버의 스프링 상수가 커질수록 표면 스트레스 변화에 의한 영향은 줄어드는 것으로 보고가 되었다[5, 6]. 압전 마이크로캔틸레버 센서를 질량센서로 사용할 때 측정 결과의 신뢰도를 향상시키기 위해서는 표면 스트레스 변화에 의한 영향을 줄여야 한다.

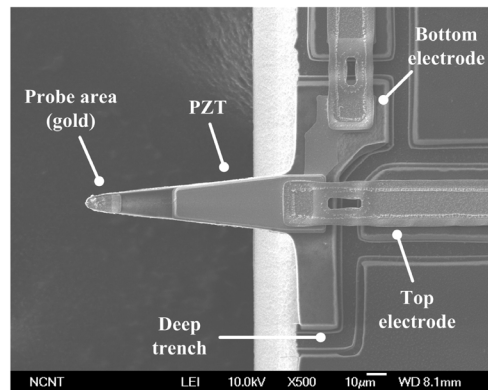
본 연구에서는 압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 이용하여 AFP를 정상농도인 10 ng/ml까지 검출하는 실험을 수행한다. 우선 해석 모델을 통해서 제작된 압전 마이크로캔틸레버 센서의 질량센서로써의 특성을 파악한다. 그리고 전기적으로 센서의 공진 주파수를 측정할 수 있고 ‘dip and dry’ 방법으로 센서와 시약이 반응할 수 있는 실험 장치를 구성하고 측정 환경 조건을 일정하게 유지한 상태에서 농도와 면역 반응 시간을 달리하여 AFP를 검출하는 실험을 진행한다.

2. 압전 마이크로캔틸레버 질량센서

압전 마이크로캔틸레버 질량센서는 저자들에 의해서 이전 연구에서 바이오센서로써 충분한 민감도와 신뢰도를 가질 수 있도록 설계되었고 일



(a)



(b)

Fig. 1 Schematic diagram (a) and scanning electron microscope image (b) of the developed piezoelectric microcantilever mass sensor

반적인 마이크로머신 공정기술을 이용하여 제작되었다[4,7].

센서의 기하학적 형상과 치수는 Fig. 1(a)에 나타나 있으며 제작된 센서의 전자현미경 사진이 Fig. 1(b)에 나타나 있다. 캔틸레버는 실리콘을 이용하여 높은 질량 민감도를 갖도록 삼각형 구조로 제작되었고[4], 압전 물질은 lead zirconate titanate(PZT)를 이용하였고 그 조성은 $Pb(Zr_{52}Ti_{48})O_3$ 이다.

2.1. 해석 모델

제작된 압전 마이크로캔틸레버의 첫 번째 공진 주파수 부근에서의 기계적 동특성을 분석하기 위하여 기계적 구조를 Fig. 2(a)와 같이 1 자유도 집중 매개변수(lumped parameter) 모델을 이용하여 해석할 수 있다. 모델로부터 첫 번째 공진주파수 f_0 , 등가 스프링 상수 K_{eff} , 등가 질량 M_{eff} 는 각각 다음 식과 같이 나타낼 수 있다[7].

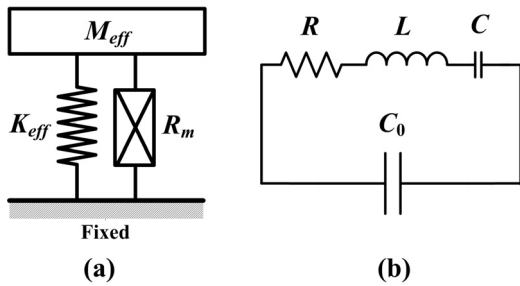


Fig. 2 Mechanical lumped parameter model (a) and equivalent circuit model (b) of the developed piezoelectric microcantilever mass sensor

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_{eff}}{M_{eff}}} \quad (1)$$

$$K_{eff} = \frac{2E_{strain}}{\delta_{max}^2} \quad (2)$$

$$M_{eff} = \frac{K_{eff}}{4\pi^2 f_0^2} \quad (3)$$

여기서 E_{strain} 은 압전 마이크로캔틸레버가 첫 번째 공진 모드로 진동할 때 갖는 최대 변형 에너지(strain energy)이며, δ_{max} 는 캔틸레버 자유단의 최대 변위이다.

센서의 기계적 구조 형상이 상대적으로 복잡하여 상용 유한요소해석 소프트웨어인 Comsol Multiphysics[®]를 이용하여 고유진동수 해석을 수행하였다. 해석결과로부터 첫 번째 공진 모드의 공진주파수 f_0 를 구하였고, 모드 해석 결과와 식 (2)를 이용하여 등가 스프링 상수 K_{eff} 를 계산하였다. 등가 질량 M_{eff} 는 앞서 얻은 f_0 와 K_{eff} 를 식(3)에 대입하여 구하였다[7].

식(1)-(3)으로부터 계산된 센서의 공진주파수, 등가 질량, 등가 스프링 상수의 값은 각각 1.34 MHz, 3.272 ng, 234 N/m 이다. 등가 기계 저항 R_m 은 해석적으로 구하기가 어렵고 센서의 동특성 실험 결과를 통해 추정할 수가 있다[7].

제작된 압전 마이크로캔틸레버 센서의 전기적 인 특성을 분석하기 위하여 Fig. 2(b)에 나타난 것과 같은 공진 주파수 근처에서 작동하는 압전 바이브레이터(piezoelectric vibrator)의 등가 회로 모델인 Van Dyke 모델을 이용할 수 있다[8-10]. 위 모델에서 C_0 는 고정 커패시턴스(clamped capacitance)이며, 동 저항(motional resistance) R , 인덕턴스(inductance) L , 동 커패시턴스(motional

capacitance) C 는 각각 다음 식과 같이 나타낼 수 있다[7].

$$R = \frac{R_m}{\phi^2} \quad (4)$$

$$L = \frac{M_{eff}}{\phi^2} \quad (5)$$

$$C = \frac{\phi^2}{K_{eff}} \quad (6)$$

여기서 ϕ 는 변환계수(transformation factor)이다.

센서의 컨덕턴스 스펙트럼 $G(\omega)$ 은 Van Dyke 모델로부터 다음과 같이 나타낼 수 있다[11].

$$G(\omega) = \frac{R}{R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2} \quad (7)$$

식(7)에서 컨덕턴스가 최대가 되는 주파수 ω_0 는 다음과 같이 계산이 된다.

$$\omega_0 = 2\pi f_0 = \frac{1}{\sqrt{LC}} = \sqrt{\frac{K_{eff}}{M_{eff}}} \quad (8)$$

즉, 식(8)로부터 압전 마이크로캔틸레버 센서의 공진 주파수는 센서의 컨덕턴스 스펙트럼에서 최대값을 가지는 주파수와 같으므로 전기적으로 센서의 공진 주파수를 얻을 수 있다.

2.2. 민감도

압전 마이크로캔틸레버 질량센서의 질량 민감도 S_m 는 다음과 같이 나타낼 수 있다[7].

$$S_m = \frac{df}{dm} = \frac{f_0}{2M_{eff}} \quad (9)$$

센서의 프로브 영역에 타겟 분자들이 균일하게 붙는다고 가정하면, 각 타겟 분자들의 질량 하중 효과가 캔틸레버 자유단에서 끝단으로 갈수록 줄어든다. 따라서 정확한 질량 민감도를 계산하기 위해서 이 영향을 고려한 보정상수를 식 (9)에 나타난 질량 민감도에 곱해야한다. 보정상수 α 는 다음과 같이 나타낸 식으로부터 계산할 수 있다.

$$\alpha(x) = \frac{\int_0^x v^2(\xi) \rho_{L,add}(\xi) d\xi}{v^2(0) m_{add}} \quad (10)$$

여기서 x 는 캔틸레버 자유단에서부터 시작되는 프로브 영역의 길이, v 는 캔틸레버의 모드 형상 함수(mode shape), $\rho_{L,add}$ 은 캔틸레버 길이 방향의 프로브 영역에 붙은 타겟 분자 질량의 선밀도 함수, m_{add} 는 프로브 영역에 붙은 타겟 분자의 질량이다. 식(10)으로부터 제작된 압전 마이크로 캔틸레버 센서의 보정 상수 α 는 0.848이며 제작된 센서의 보정된 질량 민감도는 175 Hz/pg으로 계산된다.

사각형 캔틸레버에 대해서 초기 표면 스트레스가 없는 경우로 가정하면 표면 스트레스 민감도는 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다[5].

$$S_s(x) = \frac{df}{f_0 ds} = \frac{3}{2} \frac{\beta}{K_{eff}} \quad (11)$$

여기서 s 는 표면 스트레스이고, β 는 센서의 기하학적 형상에 의해서 다음과 같이 결정되는 값이다[5].

$$\beta(x) = 5 \left[\frac{1}{12} \left(\frac{x}{l} \right)^4 - \frac{1}{10} \left(\frac{x}{l} \right)^5 + \frac{1}{18} \left(\frac{x}{l} \right)^6 - \frac{1}{63} \left(\frac{x}{l} \right)^7 + \frac{1}{504} \left(\frac{x}{l} \right)^8 \right] \quad (12)$$

식(11)로부터 캔틸레버의 스프링 계수가 클수록 표면 스트레스 민감도가 줄어들음을 알 수 있다.

Fig. 3은 식(11)을 이용하여 표면 스트레스 민감도를 프로브 영역이 캔틸레버 전면을 덮을 경우의 값에 대한 상대값으로 나타내어 비교한 결과 그래프이다. 프로브 영역이 증가할수록 표면 스트레스 민감도가 증가한다. 캔틸레버 센서를 질량 센서로 사용하기 위해서는 표면 스트레스 민감도를 최소화해야 하는데, 프로브 영역을 캔틸레버 길이의 1/10로 줄이고 캔틸레버의 자유단에 위치시키게 되면 프로브 영역이 캔틸레버 전면을 덮을 경우와 비교하여 표면 스트레스 민감도가 74% 감소한다.

제작된 압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 사각형 캔틸레버로 가정하고, 바이오 물질이 센서에 붙을 때 발생시키는 표면 스트레스 변화 값을 실험적으로 측정된 대표 값인 0.04 N/m로 추정하면[6] 식(11)로부터 표면 스트레스 변화에 대한 센서의 공진 주파수 변화가 약 11 Hz로 계산된다. 이 값은 실험적으로 측정되는 센서의 주파수 분해능 범위와 비슷하거나 그보다 작으므로 제작

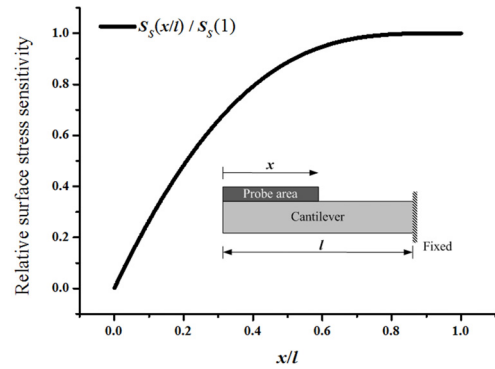


Fig. 3 Variations of relative surface stress sensitivity as the probe area of the rectangular cantilever increases

된 센서의 경우 표면 스트레스 변화에 대한 영향을 무시할 수 있다.

3. 실험

3.1. 실험 재료

센서를 세척하기 위한 용도로 이소프로필알코올(isopropyl alcohol), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol)을 사용하였다. 항체 고정화와 항원 검출 실험을 위하여 티올(thiol)기가 붙은 protein A/G(protein A/G-SH)는 protein A/G(BioVision Co.)와 2-iminothiolane hydrochloride(Sigma Co.)를 사용하여 Traut's reagent를 위한 지침서(number 26101, Thermo Scientific Co.)를 따라서 합성하여 만들었다. 그리고 Affymetrix Co.에서 구매한 pH 7.4인 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)과 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA), HBI(㈜)에서 구매한 AFP 항체 (AFP polyclonal antibody, goat)와 항원(1st international WHO standard for AFP, human)을 사용하였다.

3.2. 실험 장치 구성

압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 이용하여 AFP 항체를 검출하기 위한 실험장치가 Fig. 4에 나타나 있다. 압전 마이크로캔틸레버 센서는 상하로 이동 가능한 정밀 스테이지 위에 고정을 시키고 샘플 스테이지 위에 10 μ l 이하의 시약의 액적을 놓은 후 CCD 카메라 화면을 보며 센서

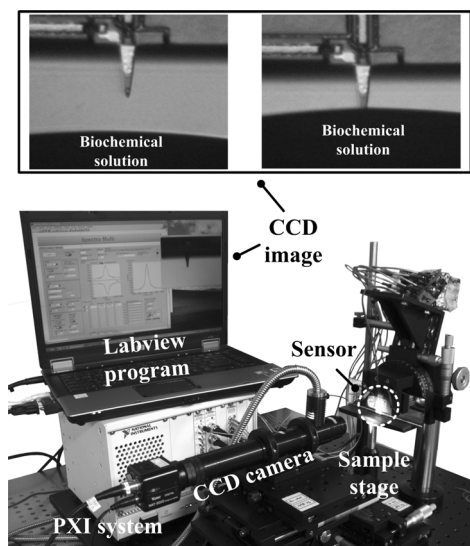


Fig. 4 Experimental setups for detection of AFP with piezoelectric microcantilever mass sensor using 'dip and dry' technique

의 프로브 영역인 캔틸레버 끝단만 액적에 담겨서 시약과 반응을 할 수 있도록 하였다. 컴퓨터 기반의 측정장치인 PXI 시스템과 랩뷰 프로그램(National Instruments Co.)을 통하여 센서의 컨덕턴스 스펙트럼을 측정하고 공진주파수를 구하였다. 실험은 항온항습기를 통하여 온도와 습도를 동일하게 유지한 상태로 수행하였다.

3.3. 실험 방법

AFP를 검출하는 과정은 Fig. 5에 도식적으로 나타나 있으며 자세한 과정은 Table 1에 정리되어 있다. 압전 마이크로캔틸레버 질량센서의 프로브 영역인 금 패턴 위의 유기물을 제거하고 세척하기 위하여 자외선(254 nm, UV-5D Short-Wave Lamp, Spectronics Co.) 클리닝과 wet 클리닝을 병행하였다. 그 다음 과정으로 비특이적 반응을 줄이기 위해서 캔틸레버에 BSA 처리를 하고, 항체 고정화를 위한 링커인 protein A/G-SH를 금 패턴 위에 선택적으로 붙인 후에 AFP 항체를 센서의 프로브 영역에 고정화했다. 측정 결과의 신뢰성을 확인하기 위해서 PBS를 이용한 대조실험(control test)을 진행한 후에 최종적으로 특정 농도에서 AFP 검출 실험을 수행 하였다. 각 과정에서 비특이적 결합을 최소화하기 위해 PBS와

증류수(de-ionized water)를 이용하여 센서를 세척하고 질소 가스로 센서를 건조시킨 후에 센서의 공진 주파수를 측정하였다.

Table 1 Procedures and time requirements in detection process of AFP

Procedures		Time (min)
Sensor cleaning	UV cleaning	30
	Isopropyl alcohol cleaning	10
	Ethanol cleaning	30
	Methanol cleaning	10
	DI water rinsing	5
BSA	BSA (0.01%)	30
	PBS rinsing	5
	DI rinsing	5
	N ₂ gas dry	1
Protein A/G-SH	Protein A/G-SH (5 µg/ml)	40
	PBS rinsing	5
	DI rinsing	5
	N ₂ gas dry	1
AFP antibody	AFP antibody (25 µg/ml)	30
	PBS rinsing	5
	DI rinsing	5
	N ₂ gas dry	1
Control test	PBS	10
	DI rinsing	5
	N ₂ gas dry	1
AFP antigen	AFP antigen	10
	PBS rinsing	5
	DI rinsing	5
	N ₂ gas dry	1

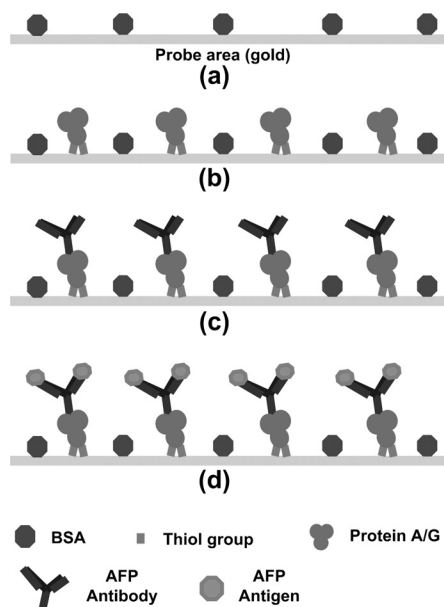


Fig. 5 Procedure for detection of AFP

4. 실험 결과 및 고찰

Fig. 6은 압전 마이크로캔틸레버 질량센서의 컨덕턴스 스펙트럼 데이터를 나타낸 그래프이다. Fig. 4에서 나타낸 실험 장치를 이용하여 얻은 데이터이며, 컨덕턴스 스펙트럼을 얻는데 약 20 초가 소요되고, 노이즈가 섞여있는 측정 데이터로부터 Lorentzian peak function[12]을 이용하여 피팅 곡선을 얻은 후에 컨덕턴스 최대값을 피팅 곡선에서 찾아서 센서의 공진 주파수를 구한다. 이 컨덕턴스 스펙트럼을 통하여 계산된 센서의 품질계수(quality factor)는 약 185 이다.

Fig. 7은 AFP 항체 고정화 과정에서 센서에 붙은 바이오 물질의 질량을 측정된 결과를 나타낸 것인데, BSA, protein A/G, AFP 항체가 각각 8.66 pg, 5.87 pg, 5.94 pg이 센서에 부착이 된 것으로 나타났다. 측정결과의 오차범위(표준편차)가 각각 47%, 22%, 17%로 BSA가 상대적으로 오차범위가 크게 나타났는데 이것은 BSA가 다른 단백질과는 달리 비특이적으로 캔틸레버 센서에 부착되기 때문에 똑같은 조건에서 반응을 하더라도 매번 부착되는 양이 차이가 크게 나는 것으로 사료된다.

Fig. 8은 AFP 항체가 고정된 압전 마이크로캔틸레버 센서를 이용하여 농도가 10 ng/ml과 50 ng/ml인 AFP 항원에 반응을 시켜서 검출된 AFP 항원의 질량을 나타낸 결과이다. 10분 동안 면역 반응을 한 경우에 10 ng/ml과 50 ng/ml에서 검출된 AFP 항원의 질량이 각각 6.02 pg, 10.67 pg 이다. PBS를 이용한 대조 실험 결과 값이 0.1 pg 으로 상대적으로 매우 작기 때문에 AFP 항원 검출 실험 결과는 상대적으로 신뢰도가 높은 것으로 사료된다.

센서의 프로브 영역의 면적과 고정된 AFP 항체의 질량이 거의 일정하고 면역 반응 시간을 10 분으로 유지하였기 때문에 검출된 AFP 항원의 질량은 AFP 항원의 농도에 의해서만 변화가 된다. 따라서 압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 이용하여 AFP 항원의 질량을 측정함으로써 AFP 항원의 농도를 측정하는 것이 가능하다.

면역 반응 시간을 5분 증가시킨 경우에 검출된 AFP 항원의 질량이 10 ng/ml에서는 29%, 50 ng/ml에서는 30%가 증가했다. 이 결과를 바탕으로 매우 낮은 농도 영역에서도 면역 반응시간을 좀 더

증가시켜서 농도별 측정이 가능할 것으로 판단되고, 압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 AFP의 정상 농도인 10 ng/ml이하에서도 AFP의 농도를 측정하는데 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

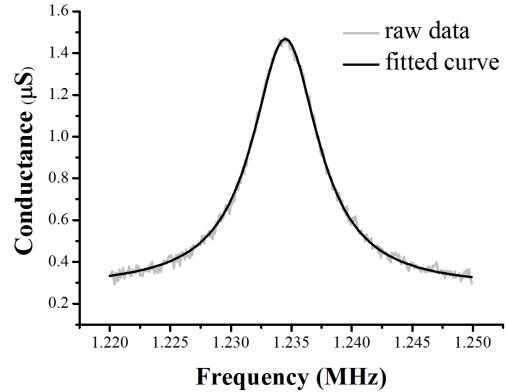


Fig. 6 Conductance spectrum of the developed piezoelectric microcantilever mass sensor

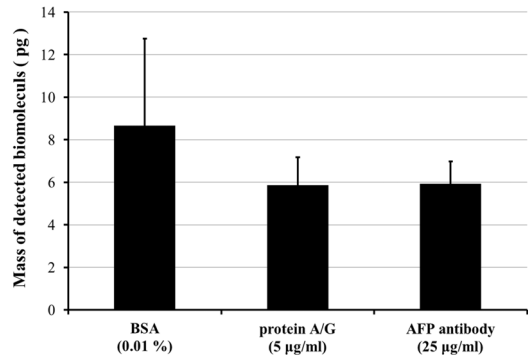


Fig. 7 Mass of attached biomolecules in the process of immobilizing AFP antibody.

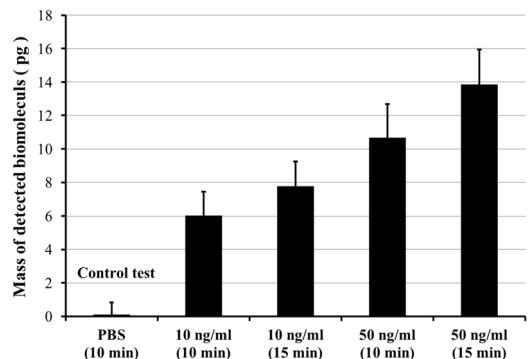


Fig. 8 Mass of detected AFP in the different concentration and reaction time

5. 결 론

본 연구에서는 압전 마이크로캔틸레버 질량센서를 이용하여 AFP의 정상 농도인 10 ng/ml에서 AFP를 정량적으로 검출하였다. 비표지 방식으로 검출된 AFP의 양은 전기적인 신호로 측정이 가능하며 센서의 크기가 작고 반응에 필요한 검체량이 매우 작아 앞으로 간세포암의 조기 진단에 개발된 센서를 활용할 수 있는 가능성이 높을 것으로 기대한다.

후 기

이 논문은 지식경제부 '산업원천기술개발사업'의 일환인 "POCT용 바이오 로봇 기술개발" 과제(10024720)와 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2011-0020435).

참고문헌

[1] M. Yuen and C. Lai, "Serological markers of liver cancer," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 19, pp. 91-99 (2005)

[2] S. Xu and R. Mutharasan, "Cantilever biosensors in drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, Vol. 4, pp. 1237-1251 (2009)

[3] K. S. Hwang, S. Lee, S. K. Kim, J. H. Lee, and T. S. Kim, "Micro- and nanocantilever devices and systems for biomolecule detection," *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol. 2, pp. 77-98 (2009)

[4] Y. Lee, G. Lim and W. Moon, "A piezoelectric micro-cantilever bio-sensor using the mass-micro-balancing technique with

self-excitation," *Microsystem Technologies*, Vol. 13, pp. 563-567 (2007)

[5] Q. Ren and Y. P. Zhao, "Influence of surface stress on frequency of microcantilever-based biosensors," *Microsystem Technologies*, Vol. 10, pp. 307-314 (2004)

[6] S. Shin, J. P. Kim, S. J. Sim and J. Lee, "A multisized piezoelectric microcantilever biosensor array for the quantitative analysis of mass and surface stress," *Applied Physics Letters*, Vol. 93, p. 102902 (2008)

[7] S. Lee, Y. Lee, H. Lee and W. Moon, "Improvements in electrical properties of piezoelectric microcantilever sensors by reducing parasitic effects," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 21, p. 085015 (2011)

[8] S. Sherrit, H. D. Wiederick, B. K. Mukherjee and M. Sayer, "An accurate equivalent circuit for the unloaded piezoelectric vibrator in the thickness mode," *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 30, pp. 2354-2363 (1997)

[9] "ANSI/IEEE Std 176-1987," in Standard on Piezoelectricity, ed (1987)

[10] B. G. Kim and Y. K. Park, "Characterization of component materials of the ultrasonic transducer," *Journal of the Korean Society for Nondestructive Testing*, Vol. 9, pp. 69-76 (1989)

[11] L. E. Kinsler, A. R. Frey, A. B. Coppens and J. V. Sanders, "Fundamentals of Acoustics," Fourth Ed. New York: Wiley (2000)

[12] <http://www.originlab.com/www/helponline/Origin/en/UserGuide/Lorentz.html>