

< 학술논문 >

DOI <http://dx.doi.org/10.3795/KSME-B.2015.39.12.921>

ISSN 1226-4881(Print)
2288-5324(Online)

마이크로 플루이딕 칩을 기반으로 한 크레아티닌 여과장치 §

이 석* · 신동규* · 응웬탄과** · 박우태*,**†

* 서울과학기술대학교 기계·자동차공학과, ** 서울과학기술대학교 의공학-바이오소재 융합협동과정

A Microfluidic Chip-Based Creatinine Filtration Device

Sack Lee*, Dong-Gyu Shin*, Thanh Qua Nguyen**, and Woo-Tae Park*,**†

* Dept. of Mechanical and Automotive Engineering, Seoul Nat'l Univ. of Science and Technology

** Convergence Institute of Biomedical Engineering and Biomaterials, Seoul Nat'l Univ. of Science and Technology

(Received April 14, 2015 ; Revised September 14, 2015 ; Accepted September 30, 2015)

Key Words: Microfluidic(마이크로 플루이딕), AAO(알루미늄 양극 산화물), Filtration(여과), Housing(하우징)

초록: 매년마다 신장질환으로 고통 받는 사람들이 증가하는 추세이다. 가장 흔한 치료법 중 하나는 혈액 투석인데, 이 방법은 많은 시간이 걸리고, 비용이 많이 드는 방법이다. 이러한 이유 때문에, 인공신장 연구의 중요성이 대두되고 있다. 혈액에서 크레아티닌을 여과하는 것은 신장의 주요 기능 중 하나이다. 우리는 이 기능에 초점을 맞춘 새로운 2 채널 마이크로 플루이딕 칩을 고안하였다. 두 개의 PDMS 층을 결합하기 위하여, 아크릴을 가공한 하우징 시스템이 개발하였으며, 이 방법은 여과막을 쉽게 바꿀 수 있다는 이점이 있다. 우리는 알루미늄 양극 산화물(AAO)을 여과막으로 사용하였다. 여과된 용액은 자페반응(Jaffe reaction)을 이용하여, 크레아티닌 농도별 흡광도 차이를 분석하였다. 크레아티닌의 양에 대한 표준식을 만들어, 측정된 데이터를 보간하여 여과된 용액의 농도를 확인하였다. 실험을 통하여 유량 및 크레아티닌 농도에 따른 여과율을 얻을 수 있었다.

Abstract: The number of people suffering from renal disease increases every year. One of the most common treatments (clinical care options) for renal diseases is hemodialysis. However it takes a long time and has a high cost. Therefore, the importance of artificial kidney research has risen. Filtering creatinine from blood is one of the prime renal functions. Thus, we designed a novel two channel microfluidic chip focused on that function. In order to bond the individual polydimethylsiloxane layers, we have developed a housing system using acrylic plastic frame. This method has significant advantages in changing filter membranes. We use anodic aluminum oxide for the filter membrane. We analyzed the difference in the absorbance values for various creatinine concentrations using the Jaffe reaction. For the purpose of acquiring a standard equation to quantify the creatinine concentration, we interpolated the measured data and confirmed the concentration of the filtered solution. Through this experiment, we determined how the filtration efficiency depended on the flow rate and creatinine concentration.

1. 서론

1.1 배경

매년마다 신장질환으로 고통 받는 사람들이 증가하고 있다.⁽¹⁾ 현재 신장질환의 치료법은 크게 혈액투석과 복막투석의 방법이 있다. 혈액투석은 피를 뽑아

체외에서 정제한 후 다시 체내로 보내는 방법이다. 이 방법은 매주 2~3 회 치료를 해야 하며 소요시간은 약 5 시간 정도 걸린다. 또한 병원으로 가서 실시해야 하고 식이조절 및 수분섭취도 해야 한다. 복막투석은 환자의 복막을 이용한 투석방법이다. 이 방법은 병원에 가야 하는 번거로움을 줄일 수 있지만 수술을 해야 한다. 또한 매일 3~4 회씩 실시해야 한다.

이처럼 현재 신장질환을 위한 치료법들은 시간이 많이 소모되고 비용이 많이 들어간다. Micro/Nano 기

§ 이 논문은 2015년도 대한기계학회 마이크로/나노공학 부문 춘계학술대회(2015. 5. 21-22., BEXCO) 발표논문임

† Corresponding Author, wtpark@seoultech.ac.kr

© 2015 The Korean Society of Mechanical Engineers

술이 발달함에 따라 lab-on a chip 기술을 활용한 인공 장기를 개발하는 연구가 활발해졌다. 실제로 인공 폐, 인공 간 등에 관한 여러 논문이 나오며 organ-on a chip 의 연구가 활발하게 진행 중이다.⁽²⁾

1.2 신장기능 및 지표

신장의 기능은 크게 2 가지로 볼 수 있다. 첫째는 크레아티닌, 요소 같은 노폐물을 배출하는 것이다. 둘째는 노폐물과 같이 여과된 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 같은 필수 성분을 다시 재흡수 하는 것이다. 일반적으로 신장의 기능을 평가하는 방법은 크게 2 가지가 있다. 혈액요소질소(BUN)는 혈중 요소를 측정하는 것으로, 요소는 간에서 아미노산과 암모니아에서 생성된다. 이렇게 생성된 요소는 신장을 통해 배설되므로 이 혈액 농도가 신기능 지표로 사용될 수 있다. 하지만 요소는 신기능 이외에 식이, 간 기능 변화 등에 따라서도 수치가 달라질 수 있으므로 혈액요소질소(BUN)만 가지고 신기능을 평가하기는 어렵다. 크레아티닌(creatinine)은 근육에서 크레아틴(creatine)으로부터 생성되며 요소와 달리 신장 기능 이외의 영향은 적어서 신기능을 평가하는 데에 더 유용하다.⁽³⁻⁵⁾

1.3 장치목적

크레아티닌을 여과하는 것은 신장의 주된 기능이다. PolyDimethylsiloxane(PDMS) 채널은 soft-lithography 를 통해서 제작하기가 쉽고 간편하며, 저렴한 가격 때문에 마이크로플루이딕 장치에서 널리 사용되고 있다.⁽⁶⁾ 본 연구에서는 크레아티닌을 여과하는 기능에 초점을 맞춰, PDMS 를 기반으로 한 두 개의 채널을 가지는 마이크로 플루이딕 칩을 만들었다.

2. 본 론

2.1 재료

2.1.1 마이크로 플루이딕 칩

마이크로 플루이딕 칩을 구현하기 위하여 PDMS 를 사용하였다. 2 채널 마이크로플루이딕 채널을 만들기 위해 마스크(Fig. 1)를 디자인한 후 4 인치 실리콘 웨이퍼 위에 포토리소그래피(SU-8 100 MicroChem Co. MA) 기술을 이용하여 마스터 몰드를 만들었다. 마이크로 채널의 크기는 200 μ m, 세로 75 μ m 로 디자인하였다.⁽⁷⁾ (Fig. 2)

PDMS base 와 Curing agent (Sylgard 184A, B Dow Corning)를 10:1 비율로 섞은 후 마스터 몰드 위에 부은 다음 hotplate 위에 올려 경화시켰다. 두 개의

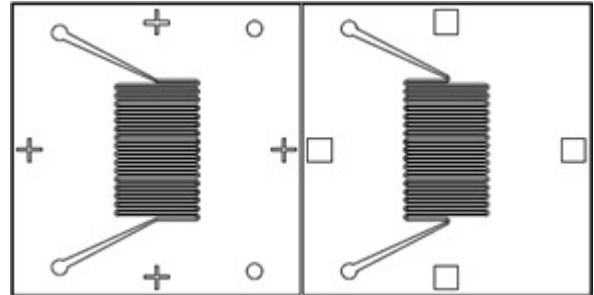


Fig. 1 The mask image of microfluidic chip. Cross & Square marks are used for alignment. Two circle marks are inlet and outlet of the bottom channel

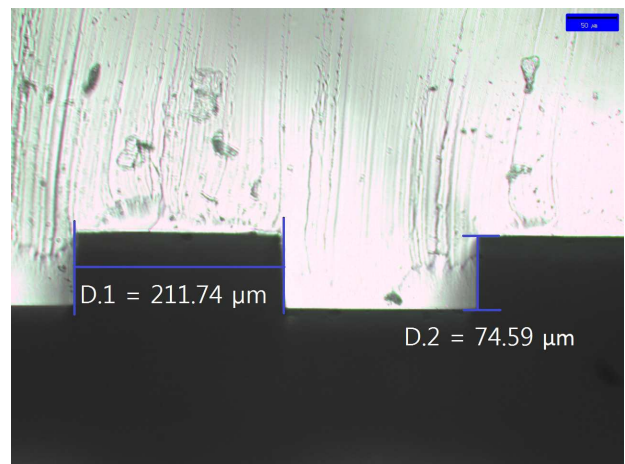


Fig. 2 The optical microscope image of the microfluidic chip's cross-sectional view. The width of channel is 211.74 μ m and the height of channel is 75 μ m

칩을 정확히 맞추기 위하여 십자가 마크와 사각형을 이용하였고, 2 개의 원형 표식을 이용하여 밑 채널의 입구와 출구를 만들었다.(Fig. 1)

2.1.2 막

필터로 사용한 물질은 알루미늄 양극 산화물(AAO)을 이용하였다. AAO(Anodisc 25, Whanman)의 특징은 앞면이 20nm, 뒷면이 200nm 인 기공이 존재하여 여과막 역할을 한다(Fig. 3). 기공의 크기가 20nm 이기 때문에 적혈구(6-8 μ m), 백혈구(8~10 μ m), 혈소판(2~3 μ m) 등 몸에 필요한 성분을 제외하고 크레아티닌(0.6nm)만 여과한다고 가정하였다.⁽⁸⁾ 기공의 크기와 높이의 비율이 클수록 즉 종횡비가 클수록 여과 효율이 떨어질 것이라 생각하였다. 우리가 사용한 필터는 앞면기공의 크기가 20nm 로 AAO 의 두께(68 μ m)에 비해 기공의 크기가 작아 여과하는데 어려움이 있어 보이지만, 1 μ m 정도만 20nm 의 기공을 가지고 그 이후엔 기공의 크기가 200nm 이기 때문에 이러한 문제를 해결할 수 있었다. (Fig. 4)

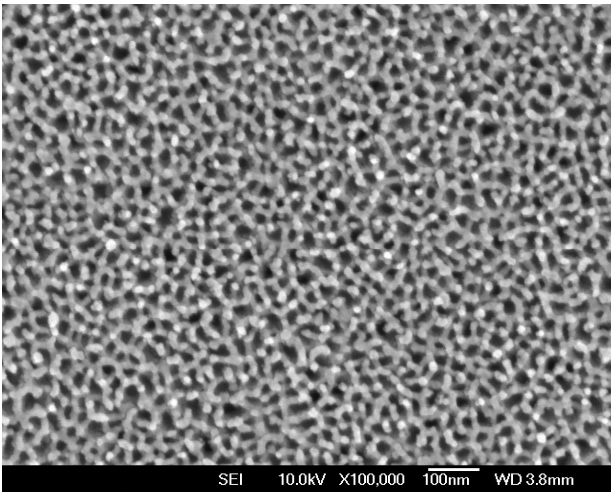


Fig. 3 Scanning electron micrograph image of the AAO surface. Each pore size is around 20nm

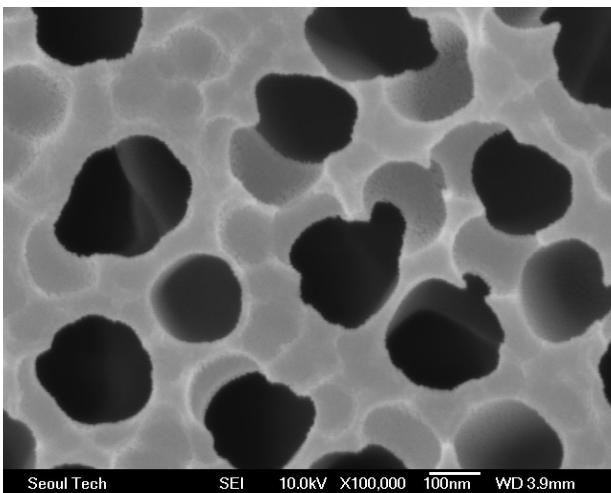


Fig. 4 Scanning electron micrograph image of the AAO back surface. Each pore size is around 200nm

2.1.3 하우징 시스템(Housing system)

Tae Goo Kang 등의 연구에서 영감을 얻어 우리는 PDMS 를 결합하기 위하여, 아크릴을 가공한 housing system 을 구축하였다.⁽⁹⁾ PDMS 를 결합하는 일반적인 방법은 플라즈마 처리를 이용하지만, AAO 의 polymer ring 때문에 플라즈마 처리를 하여도 2 개의 PDMS 의 결합이 이루어 지지 않았다. 이를 해결하기 위하여 2 개의 아크릴을 가공하여 볼트의 체결력을 기반으로 한 하우징 시스템을 개발하였다. (Fig. 5,6)

2.2 실험

2.2.1 자폐 반응

Jaffe 법(피크르산 알칼리법, alkaline picrate method) 은 크레아티닌이 알칼리 환경에서 피크르산(picrate)



Fig. 5 The mask of device that PDMS and AAO bonding by using Acrylic plastic frame

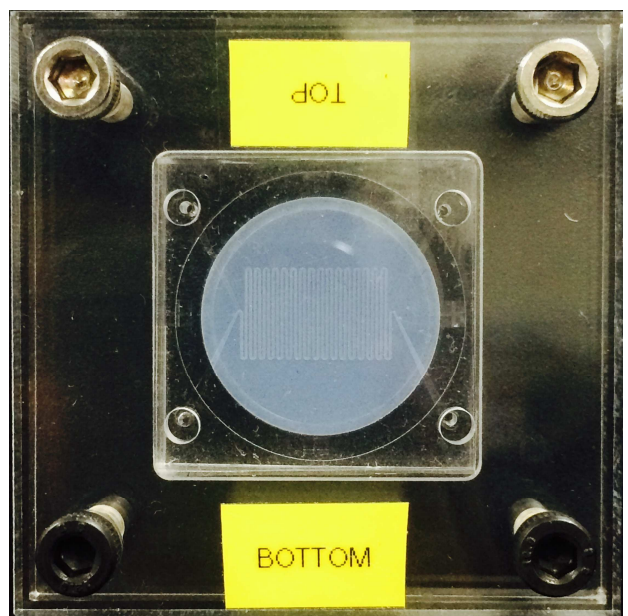


Fig. 6 The picture of device that PDMS and AAO bonding by using Acrylic plastic frame

과 반응하여 생성되는 다홍색 복합체를 500 nm 파장에서 흡광도를 측정하는 방법으로 1886 년 처음 소개되었다.⁽¹⁰⁾ 본 연구에서는 Jaffe 반응을 기반으로 한 Clinimate CRE 시약(SEKISUI MEDICAL CO. LTD) 을 이용하여 크레아티닌 용액의 농도를 측정할 수 있었다. 크레아티닌 용액과 CRE 발색액 1 을 1:31 의 비율로 혼합한 후, CRE 발색액 2 를 1:7 비율로 섞어 준 다음 UV-VIS Spectrophotometer 를 이용하여 505nm 와 600nm 의 흡광도를 측정한 다음 두 값의 차이를 통해 크레아티닌 용액의 농도를 알 수 있었다.

2.2.2 실험 장비 셋업

본 실험의 장비는 시린지 펌프, 시린지, 튜빙, 마이크로 플루이드 칩으로 구성되어 있다(Fig. 7). 2 개의 시린지를 이용하여 한 쪽에는 크레아티닌 용액과 다른 쪽에는 증류수를 이용하여 위, 아래 채널로 흘러 보내는 시스템이다. 확산을 통하여

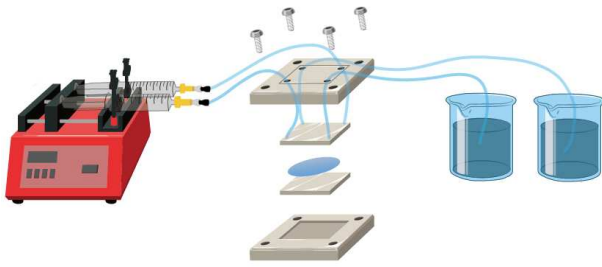


Fig. 7 A schematic diagram of the proposed microfluidic system for creatinine filtration

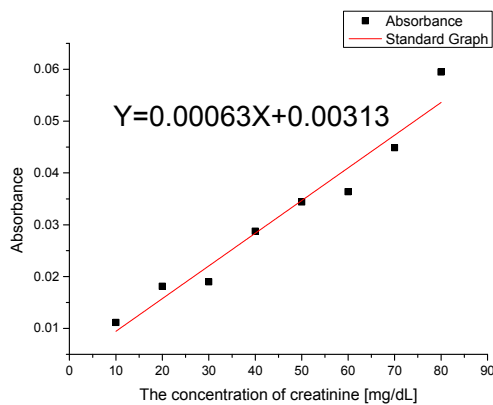


Fig. 8 The absorbance of each creatinine concentration & Standard graph using Lease Square method (Dilute with DI water)

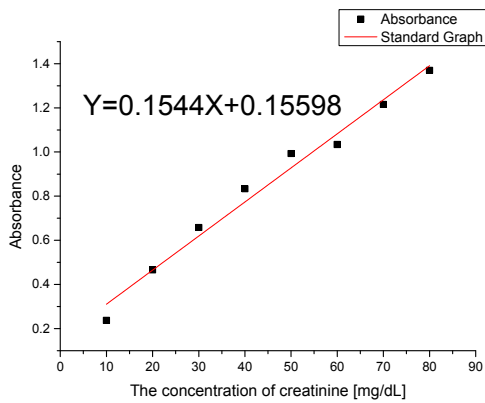


Fig. 9 The absorbance of each creatinine concentration & Standard graph using Lease Square method (No dilution)

크레아티닌이 얼마나 여과되는지 측정하는 시스템이다. 신장에서 일어나는 여과과정과 동일하게 증류수와 크레아티닌 용액을 역방향으로 흐르게 하여 크레아티닌의 확산 효율을 높였다.⁽⁹⁾

3. 결 과

3.1 표준 그래프

이번 실험을 통해서 크레아티닌 농도에 따른 흡

Table 1 The efficiency of each flow rate. (200mg/dl)

	505nm	600nm	Difference value	Efficiency (%)
2ml/hr	0.092151	0.023614	0.068537	51.93
0.2ml/hr	1.433097	0.0019935	1.4311035	41.29

Table 2 The efficiency of each concentration. (0.2ml/hr)

	505nm	600nm	Difference value	Efficiency (%)
200mg/dL	1.433097	0.0019935	1.4311035	41.29
60mg/dL	0.625155	0.009947	0.615208	49.57

광도에 대한 표준 그래프를 얻을 수 있었다. 원래 실험 전 목표는 10mg/dl 부터 200mg/dl 까지 10mg 씩 증가시킨 크레아티닌 용액을 이용하여 흡광도를 측정하여 그래프를 구하는 것이 목표였으나, 실험 장비와 Jaffe 시약의 한계로 인하여 50 배 희석하여 측정을 하였고 Fig. 8 에서와 같이 10mg/dl 부터 80mg/dl 까지 직선 보간이 되는 것을 확인하였다. 하지만 표준 그래프라고 보기엔 noise 가 있어서 10mg/dl 부터 80mg/dl 까지 희석하지 않고 크레아티닌 용액을 측정해 보았다. 아래의 Fig. 9 를 보면 알 수 있듯이 50 배 희석하여 측정하였을 때 보다 noise 가 눈에 띄게 줄어든 것을 확인할 수 있다. 50 배 희석할 경우 505nm, 600nm 의 흡광도 차이가 뚜렷하지 않았지만, 희석하지 않았을 경우 두 값의 차이가 농도에 따라 뚜렷하게 나타났다. 두 파장이 특정한 색에 민감하기 때문에 희석하지 않았을 때 noise 가 줄어든 것으로 보인다.

3.2 효율

본 실험을 통하여 유량과 농도에 따른 효율성을 보았다. 각각의 실험조건에 따라 실험을 3 번씩 진행하였다. Sample 을 통해 흡광도를 측정하여 평균 값을 얻은 후 표준 그래프에 대입하여 크레아티닌 이 여과된 양을 구할 수 있었다. 이 값을 통해 초기의 크레아티닌 농도와 여과된 크레아티닌 농도를 통하여 효율을 측정하였다. 그 결과 유량이 느려질수록 효율이 줄어들었고(Table 1), 농도가 줄어들었을 때 효율이 증가하는 것을 볼 수 있었다. (Table 2) 대체적으로 유량과 농도에 상관없이 약 50%의 효율을 얻을 수 있었다. 실험 결과 특정

유량까진 효율이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 유량이 빠를수록 저항을 이겨내고 기공을 통해 빠져나가는 크레아티닌 양이 증가한 것으로 볼 수 있다. 하지만 너무 빠른 유속에선 오히려 누수가 발생하는 현상을 볼 수 있었다. 실제로 3ml/hr 의 유속으로 실험한 결과, 누수가 발생하였고 이를 막기 위해 볼트의 체결력을 강하게 한 결과 AAO 가 깨지는 현상을 볼 수 있었다. 또한 농도가 낮을수록 여과 효율이 좋은 현상을 통해 표면적이 작기 때문에 특정 농도 이상에서는 효율이 오히려 떨어지는 것으로 볼 수 있다. 따라서 더 진한 농도의 크레아티닌을 실험할 경우 표면적을 넓히는 방법 즉, 채널의 길이를 더 늘림으로써 이를 해결할 수 있을 것으로 보인다.

4. 결 론

본 실험에서는 마이크로 플루이딕을 기반으로 한 크레아티닌 여과장치를 개발하여 실험을 진행하였다. 하우징 시스템을 통하여 PDMS 와 filter membrane 을 결합하는 어려움을 해결하였다. 본 실험에서는 유량과 농도에 따른 효율을 얻을 수 있었다. 따라서 앞으로 더 다양한 실험 조건을 이용한 실험을 계획 중이다. 위 채널과 아래 채널의 유량을 다르게 하여 실험을 진행할 예정이다. 현재 하우징 시스템에서 각 모서리에서만 고정을 하였기 때문에 굽힘이 생겨 채널을 막는 현상이 있었다. 이를 해결 하기 위하여 고정 부분을 추가할 계획이다. 이 시스템을 통해 향후 AAO 가 아닌 다른 막을 이용하여 높은 여과 효율을 갖는 적합한 막을 찾을 수 있기 때문에, 인공신장연구에 도움을 줄 수 있는 기대효과를 가져다 줄 것이다.

후 기

이 논문은 2013년도 한국연구재단 국제협력사업의 지원을 받아 연구되었습니다(NRF-2013K2A1B8054280).

참고문헌 (References)

- (1) Xue, J. L., Ma, J. Z., Louis, T. A. and Collins, A. J., 2001, "Forecast of the Number of Patients with End-Stage Renal Disease in the United States to the Year 2010," *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(12), pp. 2753~2758.
- (2) Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y. and Ingber, D. E., 2010, "Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip," *Science*, 328(5986), pp. 1662~1668.
- (3) Barr, D. B., Wilder, L. C., Caudill, S. P., Gonzalez, A. J., Needham, L. L. and Pirkle, J. L., 2005, "Urinary Creatinine Concentrations in the US Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements," *Environmental Health Perspectives*, 192-200.
- (4) Hill, R. H. Jr, Ashley, D. L., Head, S. L., Head, S. L. and Pirkle, J. L., 1995, "p-Dichlorobenzene Exposure Among 1 000 Adults in the United States," *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 50(4), pp. 277~280.
- (5) Shealy, D. B., Barr, J. R., Ashley, D. L., Patterson Jr, D. G., Camann, D. E. and Bond, A. E., 1997, "Correlation of Environmental Carbaryl Measurements with Serum and Urinary 1-Naphthol Measurements in a Farmer Applicator and His Family," *Environmental Health Perspectives*, 105(5), 510.
- (6) Zhang, J., Tan, K. L. and Gong, H. Q., 2001, "Characterization of the Polymerization of SU-8 Photoresist and Its Applications in Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS)," *Polymer Testing*, 20(6), pp. 693~701.
- (7) Shelby, J. P., White, J., Ganesan, K., Rathod, P. K. and Chiu, D. T., 2003, "A Microfluidic Model for Single-Cell Capillary Obstruction by Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), pp. 14618~14622.
- (8) Li, X., Chen, W., Liu, G., Lu, W. and Fu, J., 2014, "Continuous-Flow Microfluidic Blood Cell Sorting for Unprocessed Whole Blood Using Surface-Micromachined Microfiltration Membranes," *Lab on a Chip*, 14(14), pp. 2565~2575.
- (9) Kang, T. G., Yoon, Y. J., Ji, H., Lim, P. Y. and Chen, Y., 2014, "A Continuous Flow Micro Filtration Device for Plasma/Blood Separation Using Submicron Vertical Pillar Gap Structures," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 24(8), 087001.
- (10) Kaazempur-Mofrad, M. R., Vacanti, J. P., Krebs, N. J. and Borenstein, J. T., 2004, "A MEMS-Based Renal Replacement System," *In Proceedings of the Solid State Sensor, Actuator, and Microsystems Workshop*, pp. 6~10.