



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월06일
(11) 등록번호 10-2086107
(24) 등록일자 2020년03월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
B01L 3/02 (2013.01)
G01N 27/3335 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0062942(분할)
- (22) 출원일자 2018년05월31일
심사청구일자 2018년05월31일
- (65) 공개번호 10-2018-0082371
- (43) 공개일자 2018년07월18일
- (62) 원출원 특허 10-2014-0059191
원출원일자 2014년05월16일
심사청구일자 2016년07월19일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020140015428 A*
인용발명 : 강은지, 건국대학교 석사학위 논문 (2014.02.)*
Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 50(8), pp. 08LB13-1~08LB13-4 (2011.08.22.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
- (72) 발명자
박배호
서울특별시 강남구 압구정로61길 37, 한양아파트 7동 601호
손종완
서울특별시 송파구 중대로 24, 올림픽훼밀리타운 아파트 233동 1303호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김태선

전체 청구항 수 : 총 3 항

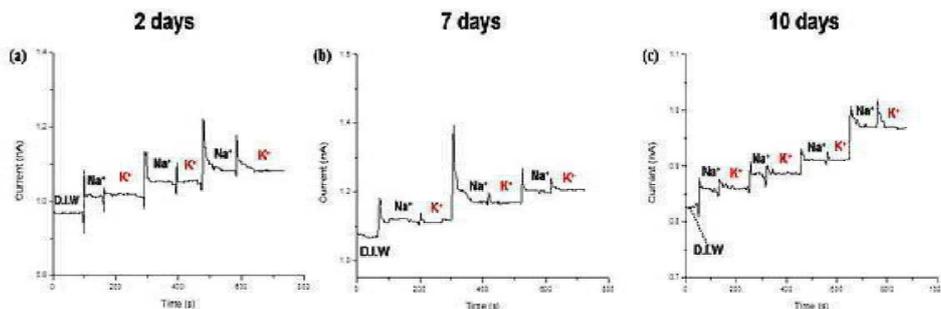
심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 포화된 이온감지물질질을 포함하는 막을 구비하는 나노피펫

(57) 요약

본 발명은 포화된 이온감지물질질을 포함하는 막을 구비하는 나노피펫, 이의 제조 방법 및 이를 포함하는 이온 측정 장치를 개시한다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

B01L 2300/0627 (2013.01)

B01L 2300/0645 (2013.01)

B01L 2300/0896 (2013.01)

B01L 2300/12 (2013.01)

(72) 발명자

토모히데타카미

서울 광진구 화양동1, 건국대학교 새천년관 b101

강은지

경기도 성남시 분당구 판교역로 49, 백현마을9단지
아파트 914동 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345204332

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리더연구자지원사업

연구과제명 2+ 차원융합 소자 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix), 가소제(plasticizer) 및 음이온 레펠러(anion repeller)를 함유하는 이온 선택성 막을 포함하는 이온-선택적 나노피펫에 있어서,

상기 이온감지물질은 감지하는 이온으로 사전에 포화되고,

상기 이온-선택적 나노피펫은 시료 내 이온감지물질을 포화시킨 이온과 동일한 이온과의 이온 교환을 통해 전류 시그널을 발생시킴으로써 선택적 이온 측정을 가능하게 하고

상기 이온은 칼륨 이온(K⁺), 나트륨 이온(Na⁺), 칼슘 이온(Ca²⁺), 망간 이온(Mn²⁺), 구리 이온(Cu²⁺), 세륨 이온(Ce²⁺) 및 수소 이온(H⁺)으로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택되고,

상기 이온감지물질은 사급 암모늄염(quaternary ammonium salt), 발리노마이신(valinomycin), 모넨신(monensin), 노낙틴(nonactin), 삼급아민(tertiary amine), 금속포르피린(metal porphyrin), 금속프탈로시아닌(metal phthalocyanine), 트리플루오로아세토펜론(trifluoroacetophenone), 크라운에테르(crown ether), 다이벤조-18-크라운-6(dibenzo-18-crown-6), 유기인계 이온감지물질 및 유기주석계 이온감지물질로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택되고,

상기 고분자 지지체는 실리콘 고무, 폴리(비스 페놀-A 카보네이트)와 폴리(디메틸사일옥세인)의 공중합체, 폴리(메틸메타크릴레이트)(PMMA), 폴리우레탄(PUR 또는 PU), 폴리에테르이미드(PEI) 및 폴리(비닐 클로라이드)(PVC)로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택되고,

상기 가소제는 비스(2-에틸헥실)세바케이트, 디옥틸 프탈레이트, 비스(1-부틸렌틸)아디페이트, 디옥틸 페닐포스페이트, 트리스(2-에틸헥실)에스테르, 및 디부틸 프탈레이트로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택되고,

상기 음이온 레펠러는 트리페닐 보론(triphenylboron), 트리스펜타플루오로페닐 보론(tris(pentafluorophenyl)boron) 및 트리스(3,5-디(트리플루오로메틸)페닐)보론(tris(3,5-di(trifluoromethyl)phenyl)boron)로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 것인, 이온-선택적 나노피펫.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이온 선택성 막은 상기 나노피펫의 길이 방향으로 중앙에 위치한 것을 특징으로 하는 것인, 이온-선택적 나노피펫.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이온 선택성 막은 상기 나노피펫 하부 원추형 생크에 위치한 것을 특징으로 하는 것인, 이온-선택적 나노피펫.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포화된 이온감지물질을 포함하는 막을 구비하는 나노피펫에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 나노피펫 내부에 이온 선택성 막을 포함하며, 상기 이온 선택성 막이 포화된 이온감지물질을 포함하여 이온 선택성을 나타내는 나노피펫에 관한 것이다

배경 기술

[0003] 이온 선택성 전극(Ion Selective Electrode, ISE)은 용액중의 특정이온에 선택적으로 응답하는 막을 갖는 일종의 막전극으로 이 막과 용액의 계면에 발생하는 전위를 측정함으로써 이온의 농도(활량)를 알 수 있다. 상기 이온 선택성 전극을 전위차법(potentiometric) 이온 센서라고 하기도 한다. 상기 이온 선택성 전극은 이온선택성 막(ion selective membrane)을 포함하는데, 상기 이온선택성 막은 상기 분석시료에 직접적으로 접하여 상기 특정 이온을 감지함으로써, 전압을 발생시키는 막으로 상기 이온 선택성 전극에서 가장 중요한 부분이다.

[0004] 이온 선택성 전극은 시료 용액 중에 존재하는 특정 이온의 농도를 측정할 수 있으므로, 식품 화학, 발효 공정, 환경 분석, 혈액투석(hemodialysis), 혈중 전해질 연속 자동 측정, 체외 순환 혈액(extracorporeal blood) 등의 임상 화학(clinical chemistry)과 같은 많은 분야에 사용되고 있다. 반면, 국소적인(local) 이온 농도는 나노 규모의 단위에서도 통제될 수 있는 나노피펫이 적용된 이온 전도 현미경(Scanning Ion-Conductance Microscope, SICM)을 사용하여 측정될 수 있으나, 상기 SICM은 전체적인 이온 커런트(current), 즉 총(total) 이온 커런트를 감지하기 때문에 특정 이온 분포를 확인하는 것이 쉽지 않다.

[0006] 기존의 ISE 방법은 검출하고자 하는 이온을 측정할 수는 있으나 피펫 팁 부분의 직경이 밀리미터(mm)단위로 크기가 매우 클 뿐만 아니라, 측정가능한 이온의 농도 범위도 크기 때문에 고농도 측정만 가능하다는 단점이 있었다. 그러나 이러한 사이즈 문제의 해결과 저농도에서도 이온 검출을 할 수 있도록 하기 위하여 최근에 이온 필터 전극(Ion Filter Electrode)이 개발되었다.

[0007] 상기 이온 필터 전극은 가소화된 PVC를 피펫 내부에 막의 형태로 만드는 방법으로서, 피펫 팁의 직경을 수백 나노미터까지 줄일 수 있다. 그러나, 이온 필터 전극은 사용 후 PVC 막내에 존재하는 이온감지물질을 재사용할 수 없으며, 세 가지 이상의 이온을 포함하는 수용액에서 원하는 한 종류의 이온을 측정할 수 없다는 문제가 있었다.

발명의 내용

[0009] 본 발명자들은 종래 이온 필터 전극의 문제점을 해결하기 위하여 나노피펫 내부에 포화된 이온감지물질을 갖는 이온 선택성 막을 적용함으로써, 원하는 1 이상의 이온을 선택적으로 검출할 수 있도록 하였다.

[0011] 제1측면에 따르면,

[0012] 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)를 함유하는 이온 선택성 막을 포함하고, 상기 이온감지물질은 포화된 것임을 특징으로 하는 이온-선택적 나노피펫이 개시된다.

[0013] 본 발명의 제1구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫은 나노피펫의 길이 방향으로 중앙에 위치한 이온 선택성 막(middle membrane collector)을 포함할 수 있다.

- [0014] 본 발명의 제2구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫은 나노피펫 하부 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막 (conical shank membrane collector)을 포함할 수 있다.
- [0016] 제2측면에 따르면,
- [0017] (A) 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)를 함유하는 막 형성 용액을 준비하는 단계;
- [0018] (B) 막 형성 용액을 나노피펫에 주입하여 이온 선택성 막을 형성하는 단계; 및
- [0019] (C) 막 내의 이온감지물질을 포화시키는 단계를 포함하는 이온-선택적 나노피펫의 제조방법이 개시된다.
- [0020] 본 발명의 제1구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은:
- [0021] (a) 이온감지물질, 고분자 지지체 및 가소제를 함유하는 막 형성 용액을 준비하는 단계;
- [0022] (b) 나노피펫의 상부에서 나노 피펫의 내부로 탈이온수를 주입하는 단계;
- [0023] (c) 상기 탈이온수 위에 상기 막 형성 용액을 주입하여 이온 선택성 막을 형성하는 단계; 및
- [0024] (d) 상기 이온 선택성 막 위에 전해질을 주입하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은 (e) 상기 나노피펫의 하부 팁 끝부분에 단계 (d)에서 주입한 전해질과 같은 농도의 용액을 주입하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 구현예에 따라 제조된 이온-선택적 나노피펫은 나노피펫의 길이 방향으로 중앙에 위치한 이온 선택성 막 (middle membrane collector)을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 제2구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은:
- [0028] (a) 이온감지물질, 고분자 지지체 및 가소제를 함유하는 막 형성 용액을 준비하는 단계;
- [0029] (b) 나노피펫의 팁 끝부분까지 상기 막 형성 용액을 주입하여 이온 선택성 막을 형성하는 단계; 및
- [0030] (c) 나노피펫의 상부에서 나노 피펫의 내부로 전해질을 주입하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은 (d) 상기 나노피펫의 하부 팁 끝부분을 단계 (c)에서 주입한 전해질과 같은 농도의 용액에 위치시키는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 구현예에 따라 제조된 이온-선택적 나노피펫은 나노피펫 하부 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막 (conical shank membrane collector)을 포함할 수 있다.
- [0034] 제3측면에 따르면,
- [0035] 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)를 함유하는 막을 포함하는 나노피펫, 내부용액과 접촉하는 내부전극, 외부용액과 접촉하는 상대전극(counter electrode), 및 상기 내부전극과 상대전극을 연결하는 측정회로를 포함하고, 상기 이온감지물질은 포화된 것임을 특징으로 하는 이온 측정 장치가 개시된다. 상기 측정회로는 IV 컨버터 (current-voltage converter), 상대전극에 대한 내부전극의 전압 차이를 전달하기 위한 증폭기(amplifier) 및 시그널을 검출하기 위한 검출기를 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 함유하는 막을 포함하는 나노피펫은 원하는 이온을 선택적으로 검출할 수 있다. 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 함유하는 막을 포함하는 나노피펫은 다수의 이온이 혼합된 시료 용액에서도 타겟 이온을 선택적으로 측정할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 함유하는 막을 포함하는 나노피펫은 재사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 본 발명에 따른 양이온-이온감지물질 복합체의 일 예를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 따른 중앙에 위치한 이온 선택성 막(middle membrane collector)의 이온교환원리를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에 따른 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막(conical shank membrane collector)의 이온교환원리를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명에 따른 중앙에 위치한 막(middle membrane)을 포함하는 이온-선택적 나노피펫의 제조방법을 나

타낸다.

도 5는 본 발명에 따른 원추형 생크에 위치한 막(conical shank membrane)을 포함하는 이온-선택적 나노피펫의 제조방법을 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 이온 선택성 전극의 일 예를 나타낸다.

도 7은 본 발명에 따라 제조된 나노피펫의 SEM 측정 결과를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 실험예 1에 따른 중간에 위치한 이온 막의 이온 선택성 측정 결과를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 실험예 1에 따른 원추형 생크에 위치한 이온 막의 이온 선택성 측정 결과를 나타낸다.

도 10는 본 발명의 실험예 2에 따른 원추형 생크에 위치한 칼륨 선택성 막의 재현성 확인 결과를 나타낸다.

도 11은 본 발명의 실험예 2에 위치한 원추형 생크에 위치한 나트륨 선택성 막의 재현성 확인 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"는 제한적이지 않다.
- [0042] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.
- [0043] 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0045] 제1측면에 따르면, 본 발명은 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)를 함유하는 이온 선택성 막(membrane collector)을 구비하고, 상기 이온감지물질은 포화된 것임을 특징으로 하는 이온-선택적 나노피펫을 제공한다.
- [0046] 본 명세서에서 사용된 용어 "이온"은 원자 또는 분자의 특정한 상태를 나타내는 것으로, 전자를 잃거나 얻어 전하를 띠는 원자 또는 분자를 의미한다. 양전하를 띤 이온을 양이온(cation), 음전하를 띤 이온을 음이온(anion)이라 한다. 상기 이온은 칼륨 이온(K^+), 나트륨 이온(Na^+), 칼슘 이온(Ca^{2+}), 망간 이온(Mn^{2+}), 구리 이온(Cu^{2+}), 세륨 이온(Ce^{2+}) 및 수소 이온(H^+)으로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 명세서에서 사용된 용어 "나노피펫"은 나노 크기의 원뿔형 팁 개구부, 예를 들면, 0.05 nm 내지 500 nm, 50 nm 내지 200 nm, 또는 100 nm 내지 150 nm의 팁 개구부를 갖는 중공의 자가지지성, 불활성, 비-생물학적 구조를 의미한다. 중공 구조는 예를 들면, 유리 또는 석영일 수 있고, 팁 개구부를 통과하는 유체를 그 내부에 보유할 수 있다. 나노피펫의 내부는 분석물의 비특이적 결합을 최소화하도록 선택되거나 변형될 수 있다. 나노피펫의 내부는 일반적으로 석영 또는 다른 생물학적 불활성 물질의 단일 층의 균일한 벽 두께를 갖는 연장된 원뿔의 형태이고, 나노피펫 내의 용액과 접촉하는 전극의 삽입을 허용하는 크기를 가질 수 있다. 본원에서 사용된 나노피펫은 일반적으로 하나의 구멍을 갖지만, 이중 구멍 모세관을 잡아당김으로써 다수의 동심 구멍을 갖는 나노피펫이 제조될 수 있다. 외경은 일반적으로 팁 영역에서 약 1 μm 미만일 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된 용어 "막" 또는 "이온 선택성 막"은 이온 선택성 전극(ISE)에 포함되어

분석시료에 직접적으로 접하여 특정 이온을 감지함으로써 이온교환에 의한 전류 시그널을 발생시키는 막을 의미하는 것으로, 상기 막은 일반적으로 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)로 이루어질 수 있다.

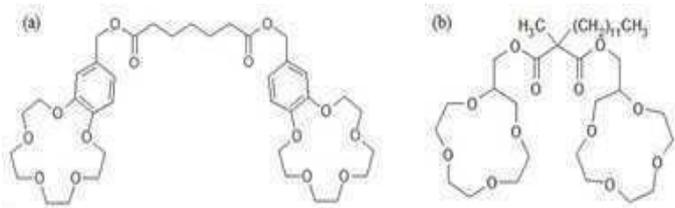
- [0049] 본 명세서에서 사용된 용어 "이온감지물질"은 특정 이온과 공유결합, 배위결합 반응 또는 이온교환 반응을 일으킬 수 있는 물질을 의미한다. 상기 이온감지물질은 사급 암모늄염(quaternary ammonium salt), 발리노마이신(valinomycin), 발리노마이신 유도체, 모넨신(monensin), 노낙틴(nonactin), 노낙틴 유도체, 삼급아민(tertiary amine), 금속포르피린(metal porphyrin), 금속프탈로시아닌(metal phthalocyanine), 트리플루오로아세토펜논(trifluoroacetophenone), 트리플루오로아세토펜논 유도체, 크라운에테르(crown ether), 다이벤조-18-크라운-6(dibenzo-18-crown-6), 유기인계 이온감지물질, 유기주석계 이온감지물질, ETH1778, ETH1062, ETH1001, ETH129, ETH149, ETH1644, ETH1117, ETH5214, ETH227 및 ETH157로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 의한 포화된 이온감지물질, 즉, 양이온-이온감지물질 복합체의 일 예를 도 1에 나타내고, 본 발명에 의한 양이온-이온감지물질 복합체를 포함하는 이온 선택성 막의 이온 교환 원리를 도 2에 나타내었다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된 용어 "포화된 이온감지물질"은 막 내의 이온감지물질이 양이온과 결합하여 "양이온-이온감지물질 복합체"를 형성한다는 것을 의미한다.
- [0052] 도 2에서 보는 바와 같이 이온감지물질이 감지하는 이온과 반응시켜 이미 포화된 이온감지물질은 이온 교환을 통해 시료 내에 해당 이온을 투과시켜 커런트를 발생시킴으로써, 선택적 이온의 측정을 가능하게 한다. 즉, 막 내의 이온감지물질에 포화되어 복합체를 형성하고 있는 이온과 같은 이온인 경우 이온교환을 통해 막을 통과하지만, 그렇지 않은 경우에는 이온교환은 발생하지 않고 반사하게 된다. 이에 따라 이온감지물질을 포화시킨 이온과 동일한 이온은 이온교환에 의한 활성(activity)으로 막을 통과하여 시그널이 발생하게 되고, 다른 이온을 가했을 경우에는 시그널이 검출되지 않는다.
- [0053] 따라서, 본 발명에 의한 포화된 이온감지물질을 포함하는 막을 구비하는 나노피켓의 경우 이온감지물질을 포화시키기 위해 사용되는 이온의 종류, 즉, 이온감지물질이 감지하는 이온의 종류에 따라 선택투과되는 이온의 종류를 조절할 수 있게 된다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 용어 "고분자 지지체"는 막을 구성하는 혼합 용액의 다른 성분들의 특성을 잘 유지할 수 있게 적절히 분산하여 유지하는 막의 구조체를 의미한다. 상기 고분자 지지체는 실리콘 고무, 폴리(비스 페놀-A 카보네이트)와 폴리(디메틸사일옥세인)의 공중합체, 폴리(메틸메타크릴레이트)(PMMA), 폴리우레탄(PUR 또는 PU), 폴리에테르이미드(PEI) 및 폴리(비닐 클로라이드)(PVC)로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 본 명세서에서 사용된 용어 "가소제"는 고분자 지지체의 경직성을 줄이기 위해 높은 비율로 사용되는 비휘발성 유기 용매를 의미한다. 상기 가소제는 *o*-니트로페닐 옥틸 에테르, 비스(2-에틸헥실)세바케이트, 디옥틸 프탈레이트, 비스(1-부틸헥틸)아디페이트, 디옥틸 페닐포스페이트, 트리스(2-에틸헥실)에스테르, *o*-니트로페닐 페닐포스페이트 및 디부틸 프탈레이트로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명에 따르면, 상기 이온 선택성 막은 음이온 레펠러(anion repeller)를 더욱 포함할 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서 사용된 용어 "음이온 레펠러"는 음이온을 반사해주는 역할을 하는 것으로, 음이온을 반사하여 양이온이 막 주위로 보다 쉽게 접근할 수 있도록 한다. 상기 음이온 레펠러는 트리페닐 보론(triphenylboron), 트리스펜타플루오로페닐 보론(tris(pentafluorophenyl)boron), 트리스(3,5-디(트리플루오로메틸)페닐)보론(tris(3,5-di(trifluoromethyl)phenyl)boron), 테트라페닐보레이트염(tetraphenylborate salt) 및 테트라키스(펜타플루오로페닐)보레이트염(tetrakis(pentafluorophenyl)borate salt)로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 제1구현예에 따르면, 상기 이온-선택적 나노피켓은 나노피켓의 길이 방향으로 중앙에 위치한 이온 선택성 막(middle membrane collector)을 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 제2구현예에 따르면, 상기 이온-선택적 나노피켓은 나노피켓 하부 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막(conical shank membrane collector)을 포함할 수 있다. 상기 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막의 이온 교환 원리를 도 3에 나타내었다.

[0062] 구체적으로, 나노피펫의 하부 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막의 이온교환도 상기 나노피펫의 길이방향으로 중앙에 위치한 이온 선택성 막의 이온교환과 같은 원리이다. 그러나, 상기 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막은 나노피펫 끝부분에 형성되어 시료용액이 첨가되는 동시에 이온교환이 발생되므로, 나노피펫의 길이 방향으로 중앙에 위치한 막의 이온교환 보다 더 빨리 이온교환 활성이 발생할 수 있고, 이에 따라 노이즈가 감소되고 더욱 안정된 시그널을 얻을 수 있다.

[0064] 제2측면에 따르면, 본 발명은 이온-선택적 나노피펫의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법은 (A) 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)를 함유하는 막 형성 용액을 준비하는 단계; (B) 막 형성 용액을 나노피펫에 주입하여 이온 선택성 막을 형성하는 단계; 및 (C) 이온 선택성 막 내의 이온감지물질을 포화시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명에 따른 막 형성 용액은 이온감지물질, 고분자 지지체 및 가소제를 함유하는 것으로, 음이온 레펠러(repeller)를 더욱 함유할 수도 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 막 형성 용액은 이온감지물질로서 bis(benzo-15-crown-5) 및/또는 bis(12-crown-4), 고분자 지지체로서 PCV, 가소제로서 *o*-니트로페닐 옥틸 에테르(*o*-nitrophenyloctylether) 및 음이온 레펠러로서 테트라페닐보레이트(tetraphenylborate)를 5 : 32 : 62 : 1의 비율로 혼합하여 제조될 수 있다. 상기 막 형성 용액은 테트라하이드로푸란(tetrahydrofuran)에 용해될 수 있다. 상기 이온감지물질 bis(benzo-15-crown-5) 및 bis(12-crown-4)의 화학구조를 각각 화학구조1(a) 및 화학구조2(b)에 나타내었다.

[0067] [화학구조 1]



[0068] 상기 화학구조를 참고하면, bis(benzo-15-crown-5) 및 bis(12-crown-4)의 고리부분은 산소결합으로 이루어짐으로써 음전하를 띠게 된다. 따라서, 칼륨 이온과 나트륨 이온이 상기 음전하 부분에 결합할 수 있다. 칼륨 이온의 크기는 약 152 pm이고 나트륨 이온의 크기는 약 116 pm이므로, 상기 크기에 따라 각각 bis(benzo-15-crown-5) 및 bis(12-crown-4)에 결합할 수 있다.

[0071] 본 발명의 제1구현예에 따른 상기 이온-선택적 나노피펫의 제조 방법은 (a) 이온감지물질, 고분자 지지체 및 가소제를 함유하는 막 형성 용액을 준비하는 단계; (b) 나노피펫의 상부에서 나노피펫의 내부로 탈이온수를 주입하는 단계; (c) 상기 탈이온수 위에 상기 막 형성 용액을 주입하여 이온 선택성 막을 형성하는 단계; 및 (d) 상기 이온 선택성 막 위에 전해질을 주입하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은 (e) 상기 나노피펫의 하부 팁 끝부분에 단계 (d)에서 주입한 전해질과 같은 농도의 용액을 주입하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 상기 구현예에 따라 제조된 이온-선택적 나노피펫은 나노피펫의 길이 방향으로 중앙에 위치한 막(middle membrane)을 포함할 수 있다. 상기 구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법을 도 4에 나타내었다.

[0073] 도 4를 참고하면, 우선 나노피펫의 상부에서 나노피펫의 하부 팁 부분까지 탈이온수를 주입한다. 상기 주입된 탈이온수 위에 막 형성 용액을 주입하고, 이를 건조시켜 이온 선택성 막을 형성한다. 상기 이온 선택성 막 내의 이온감지물질을 포화시키기 위하여 나노피펫에 전해질을 주입한 후, 상기 나노피펫의 하부 팁 끝부분에 상기 전해질과 같은 농도의 용액을 주입하면, 양쪽의 전해질 사이에 위치한 이온 선택성 막은 포화될 수 있다. 전해질에 존재하는 이온 (예를 들면, K⁺ 및/또는 Na⁺)들이 이온 선택성 막에 있는 이온감지물질과 결합하면서 하나의 복합체를 형성하므로 상기 이온감지물질이 포화된다. .

[0075] 본 발명의 제2구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은 (a) 이온감지물질, 고분자 지지체 및 가소제를 함유하는 막 형성 용액을 준비하는 단계; (b) 나노피펫의 팁 끝부분까지 상기 막 형성 용액을 주입하여 이온 선택성 막을 형성하는 단계; 및 (c) 나노피펫의 상부에서 나노피펫의 내부로 전해질을 주입하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법은 (d) 상기 나노피펫의 하부 팁 끝부분을 단계 (c)에서 주입한 전해질과 같은 농도의 용액에 위치시키는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 상기 구현예에 따라 제조된 이온-선택적 나노피펫은 나노피펫 하부 원추형 생크에 위치한 막(conical shank membrane)을 포함할 수 있

다. 상기 구현예에 따른 이온-선택적 나노피펫의 제조방법을 도 5에 나타내었다.

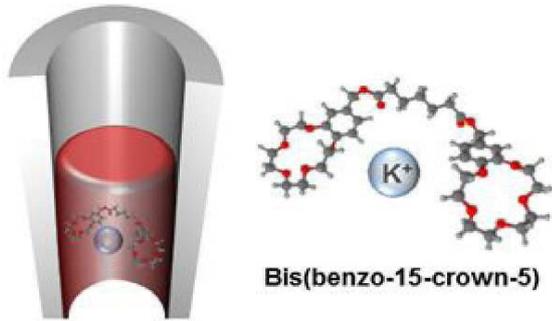
- [0077] 도 5를 참고하면, 우선 나노피펫에 막 형성 용액을 주입하고, 이를 건조시켜 이온 선택성 막을 형성한다. 상기 이온 선택성 막 내의 이온감지물질을 포화시키기 위하여 나노피펫의 상부에서 나노피펫의 내부로 전해질을 주입한 후, 상기 전해질과 같은 농도의 용액에 나노피펫의 하부 팁 끝부분을 위치시키면, 양쪽의 전해질 사이에 위치한 이온 선택성 막은 포화될 수 있다. 전해질에 존재하는 이온 (예를 들면, K⁺ 및/또는 Na⁺)들이 이온 선택성 막에 있는 이온감지물질과 결합하면서 하나의 복합체를 형성하므로 상기 이온 선택성 막은 포화될 수 있다.
- [0079] 제3측면에 따르면, 본 발명은 이온감지물질(ionophore), 고분자 지지체(matrix) 및 가소제(plasticizer)를 함유하는 막을 포함하는 나노피펫, 내부용액과 접촉하는 내부전극, 외부용액과 접촉하는 상대전극(counter electrode) 및 상기 내부전극과 상대전극을 연결하는 측정회로를 포함하고, 상기 이온감지물질은 포화된 것임을 특징으로 하는 이온 측정 장치를 제공한다. 상기 측정회로는 IV 컨버터 (current-voltage converter), 상대전극에 대한 내부전극의 전압 차이를 전달하기 위한 증폭기(amplifier) 및 시그널을 검출하기 위한 검출기를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 이온 측정 장치의 일 예를 도 6에 나타내었다.
- [0080] 본 명세서에서 사용된 용어 "내부 용액"은 이온 전류 시그널을 얻기 위한 전해질을 포함하는 용액을 의미한다. 상기 전해질은 유리이온을 함유하는 물질로서, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 칼로라이드, 포스페이트 및 비카르보네이트로 이루어진 군으로부터 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 또는 그 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] 본 명세서에서 사용된 용어 "외부 용액"은 측정하고자 하는 이온을 포함하는 시료용액을 의미하는 것으로, 살아 있는 세포, 혈장, 및 그 밖의 체액을 포함할 수 있다.
- [0082] 본 명세서에서 사용된 용어 "측정 회로"는 특정 이온 신호를 alternating current (AC)로 측정하는 것으로, 출력 전류는 입력 전압의 변화를 따르고, 전류의 작은 변화도 검출될 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 함유하는 막을 포함하는 나노피펫은 이온감지물질의 종류, 이온감지물질을 포화시키는 이온의 종류에 따라 원하는 이온을 선택적으로 검출할 수 있다. 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 함유하는 막을 포함하는 나노피펫은 다수의 이온을 갖는 시료용액에서 타겟 이온을 선택적으로 측정할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 함유하는 막을 포함하는 나노피펫은 피펫 내부의 막을 재사용할 수 있다.
- [0086] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0088] 실시예
- [0090] 실시예 1. 나노피펫의 제조
- [0091] 사용하여 필라멘트가 구비된 보로실리케이트유리 모세관(GD-1, Narishige)를 CO₂ 레이저를 기반으로 한 풀러 (Model P-2000, Sutter Instrument)을 사용하여 100 nm의 직경을 갖는 나노피펫을 제조하였다. 이때, 사용된 풀러 설정은 다음과 같다:
- [0092] Heat=350, Filament=3, Velocity=30, Delay=190, Pull=0; 및
- [0093] Heat=330, Filament=2, Velocity=27, Delay=180, Pull=250.
- [0094] 상기 제조된 나노피펫을 주사 전자 현미경(Scanning electron microscope, SEM)을 통하여 관찰하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0096] 실시예 2. 막 형성 용액의 제조
- [0097] 이온감지물질 [bis(12-crown-4) (Dojindo CAS 80403-59-4), PVC (Aldrich, CAS 9002-86-2), 가소제 [o-nitrophenyloctylether (Aldrich, CAS 3244-41-5)] 및 음이온 레펠러 (tetraphenylborate)를 중량비 5 : 32 : 62 : 1를 포함하는 막 형성 용액을 제조하였다. 또한, 이온감지물질로서 bis(benzo-15-crown-5) (Dojindo CAS 69271-98-3)]를 사용한 것을 제외하고는, 상기과 동일한 방법으로 막 형성 용액을 제조하였다.
- [0099] 실시예 3. 이온 선택성 전극(ion collector electrode)의 제조
- [0101] (1) 중간에 위치한 이온 선택성 막(Middle membrane collector)의 제조

- [0102] 실시예 1에서 제조된 나노피펫 2개를 준비하고, 탈이온수 (DI water)를 얇은 주사바늘을 이용하여 나노피펫의 상부에서 나노피펫의 하부 팁 끝부분까지 주입하였다. 그 다음, 나노피펫에 주입되어 있는 탈이온수 위에 실시예 2에서 제조한 막 형성 용액을 각각 넣고 2시간 동안 드라이박스(dry box)에서 냉각시켜 막을 형성하였다. 상기 막 위에 4×10^{-3} M의 염화칼륨(KCl) 및 염화나트륨(NaCl) 용액을 각각 주입하고, 동일한 용액을 나노피펫의 하부 팁 끝부분에 주입하였다. 그 다음, 이를 2일 동안 드라이박스에 보관하여, 칼륨 이온으로 포화된 칼륨 선택성 막 및 나트륨 이온으로 포화된 나트륨 선택성 막을 완성하였다.
- [0103] (2) 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막(Conical shank membrane collector)의 제조
- [0104] 실시예 1에서 제조된 나노피펫 2개를 준비하고, 상기 나노피펫 끝부분까지 실시예 2에서 제조한 막 형성 용액을 각각 주입한 후, 2시간 동안 드라이박스에서 냉각시켜 막을 형성하였다. 이때, 나노피펫 팁 부분을 탈이온수에 담구어, 막 형성 용액이 굳지 않도록 하였다. 그 다음, 막이 형성된 나노피펫의 상부에서 나노피펫의 내부로 4×10^{-3} M의 염화칼륨(KCl) 또는 염화나트륨(NaCl) 용액을 주입하고, 나노피펫 끝부분 또한 같은 농도의 용액에 잠기게 하였다. 그 다음, 이를 2일 동안 드라이박스에 보관하여, 칼륨 이온으로 포화된 칼륨 선택성 막 및 나트륨 이온으로 포화된 나트륨 선택성 막을 완성하였다.
- [0106] 실험예 1. 본 발명에 따른 포화된 이온감지물질을 포함하는 막을 구비하는 나노피펫의 이온 선택성 측정 결과
- [0108] (1) 중간에 위치한 이온 막의 이온 선택성 측정
- [0109] 도 6(a)에 도시한 저전류 이온 시그널 검출 시스템을 이용하고, 도 6(b)에 도시한 방법으로 외부용액을 주입하여 실시예 3(1)에서 제조한 칼륨 이온으로 포화된 칼륨 선택성 막 및 나트륨 이온으로 포화된 나트륨 선택성 막에 대한 칼륨 및 나트륨 이온의 시그널을 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8(a) 및 도 8(b)는 각각 칼륨 이온 및 나트륨 이온을 측정한 그래프이다.
- [0110] 도 8(a)로부터 알 수 있듯이, 칼륨 선택성 전극에 외부용액으로 0.1M KCl을 첨가한 경우, 시그널이 증가하였으나, 0.1M NaCl을 첨가하는 경우에는 시그널의 높이 변화가 거의 없었다. 도 8(b)로부터 알 수 있듯이, 나트륨 선택성 전극에 외부용액으로 0.1M NaCl을 첨가한 경우 시그널이 증가하였으나, 0.1M KCl을 첨가한 경우에는 시그널의 변화가 거의 없었다. 칼륨 선택성 막 및 나트륨 선택성 막의 노이즈에 대한 시그널의 비율(S/N)은 각각 1.75 및 1.06를 나타내었다.
- [0112] (2) 원추형 생크에 위치한 막의 이온 선택성 측정
- [0113] 실험예 1(1)에서와 동일한 방법을 사용하여 실시예 3(2)에서 제조한 칼륨 이온으로 포화된 칼륨 선택성 막 및 나트륨 이온으로 포화된 나트륨 선택성 막에 대한 칼륨 및 나트륨 이온의 시그널을 측정하고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9(a) 및 도 9(b)는 각각 칼륨이온 및 나트륨이온을 측정한 그래프이다.
- [0114] 도 9(a)로부터 알 수 있듯이, 칼륨 선택성 막에서 외부용액으로서 0.1M KCl을 첨가한 경우 시그널이 증가하였으나, 0.1M NaCl을 첨가한 경우에는 시그널의 변화가 거의 없었다. 도 9(b)로부터 알 수 있듯이, 나트륨 선택성 막에서 외부용액으로서 0.1M NaCl을 첨가한 경우 시그널이 증가하였으나, 0.1M KCl을 첨가한 경우에는 시그널의 변화가 거의 없었다. 상기 칼륨 선택성 막 및 나트륨 선택성 막의 노이즈에 대한 시그널의 비율(S/N)은 각각 21.68 및 16.57를 나타내었다.
- [0115] 상기로부터, 원추형 생크에 위치한 이온 선택성 막은 중간에 위치한 이온 선택성 막에 비해 S/N 비율이 약 15배 이상 증가하였음을 알 수 있다. 중간에 위치한 이온 선택성 막의 경우 나노피펫의 팁 부분에 전해질이 존재한다. 따라서, 외부용액 내의 이온이 막에 도달하기 이전에 나노피펫의 팁 부분에 존재하는 전해질에 의하여 노이즈가 발생된 것으로 확인된다.
- [0117] 실험예 2. 원추형 생크 막의 재현성(reproducibility) 확인
- [0118] 실험예 1과 동일한 방법을 사용하여, 실시예 3(2)에서 제조한 칼륨 선택성 막 및 이온 선택성 막 내의 이온감응성물질의 포화과정을 각각 2일, 7일 및 10일 동안 측정하고, 이를 도 10 및 도 11에 나타내었다.
- [0119] 상기 도 10 및 도 11로부터 알 수 있듯이, 원추형 생크 막의 경우 2일, 7일 및 10일 후에도 타겟 이온을 선택적으로 검출할 수 있음이 확인되었다.
- [0121] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수

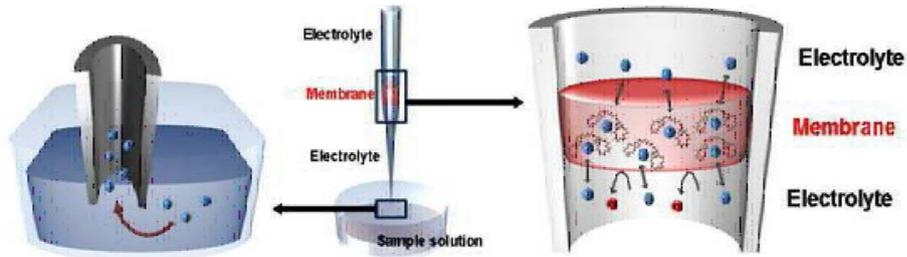
있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예는 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

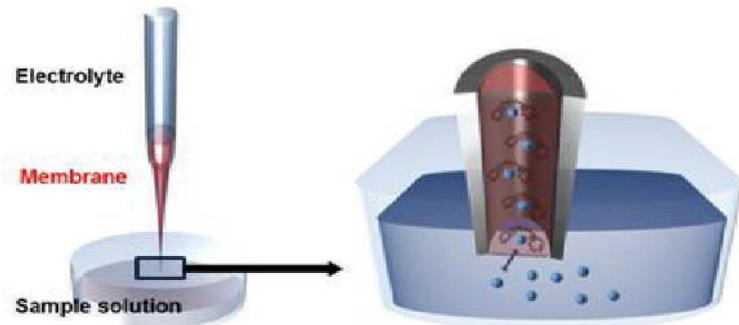
도면1



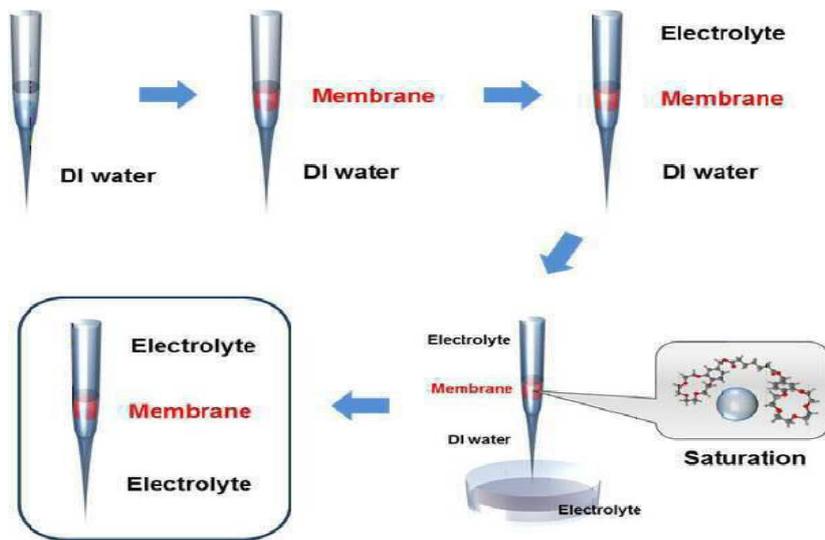
도면2



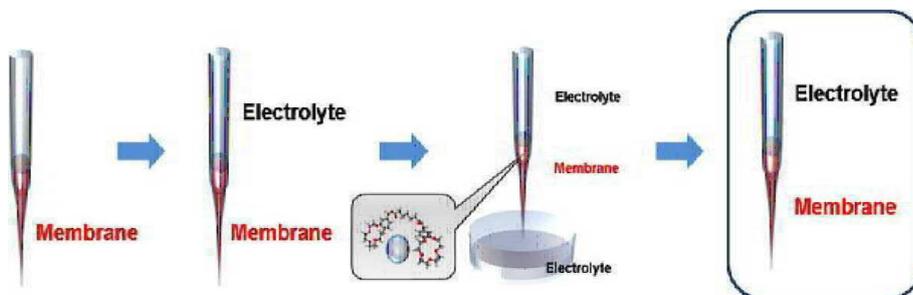
도면3



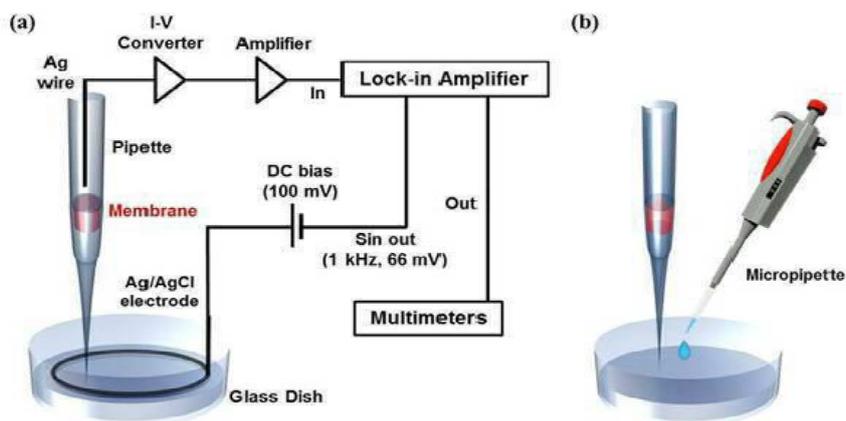
도면4



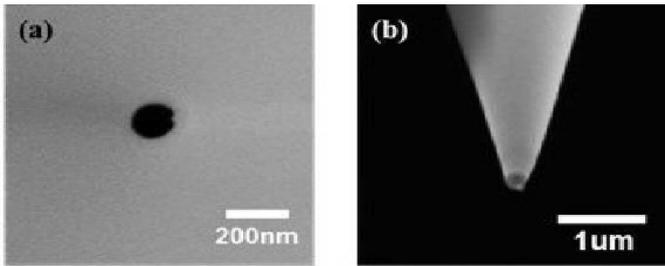
도면5



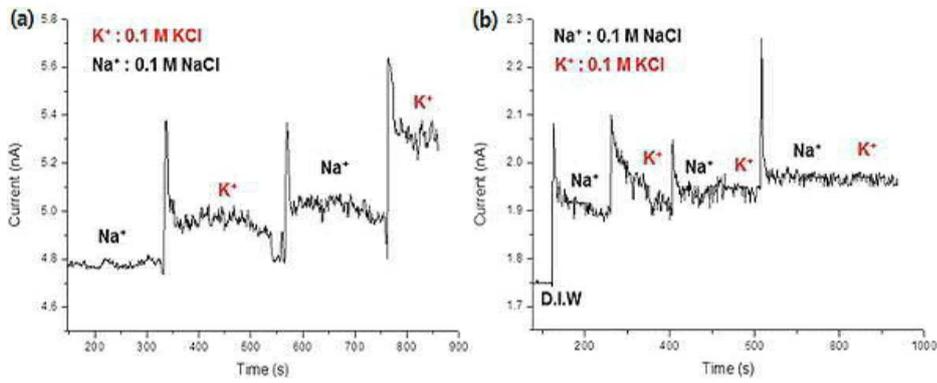
도면6



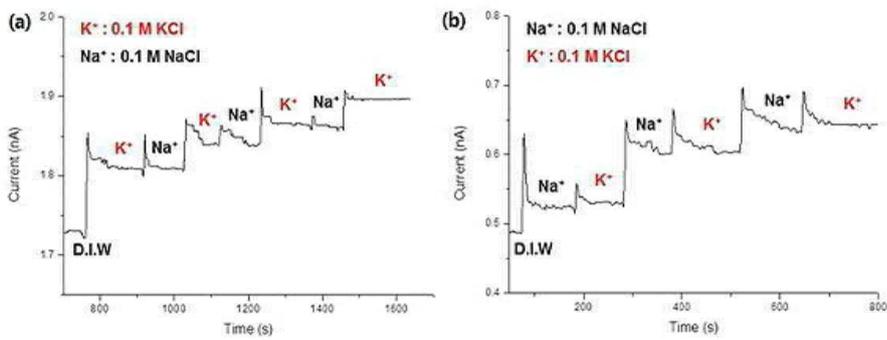
도면7



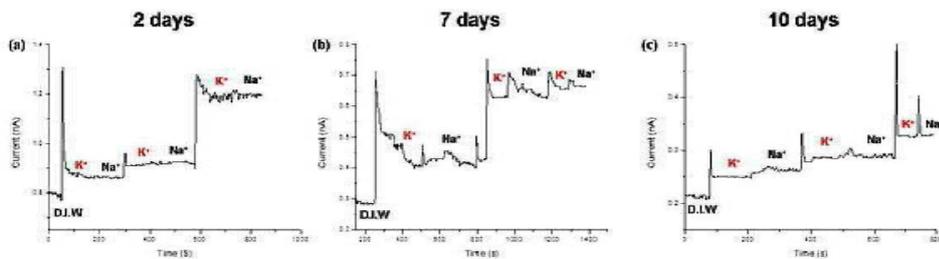
도면8



도면9



도면10



도면11

