

H⁺ 선택성 막 전극을 이용한 바이오센서의 감응 특성

김기묘[#] · 박성배^{*} · 황명석 · 허문희^{**} · 안문규

경성대학교 약학대학, ^{*}인제대학교 화학과, ^{**}부산지방식품의약품청

(Received July 29, 1996)

Characteristic Responses of Biosensor Based on H⁺-Selective Membrane Electrode

Ki-Myo Kim[#], Sung-Bae Park^{*}, Myoung-Seok Hwang,
Moon-Hye Hur^{**} and Moon-Kyu Ahn

College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

[#]Department of Chemistry, Inje University, Kimhae, Kyungnam 621-749, Korea

^{**}Pusan Regional Food Drug Administration, Pusan 608-736, Korea

Abstract—The H⁺-selective membrane consists of tridodecylamine, 2-nitrophenyl octyl ether and a little amount of additive in carboxylated PVC matrix, where penicillinase(Pcase) and glutaraldehyde may be covalently attached to the matrix. When the H⁺-selective electrode was used as a detector of biosensor, calibration curve calculated from Nernst equation was not linear. So we investigated the characteristic responses of the H⁺-selective electrode to the product H⁺ from hydrolysis of penicillin-G(Pc-G) and plotted calibration curve correlating potential to concentration of Pc-G linearly. The optimal concentration of buffer solution was theoretically calculated and was also experimented. We tried to explain the linear curve of potential to concentration of Pc-G by using Henderson-Hasselbalch equation. This method is more effective in calibration curve plotting than any other previous method. The results obtained may help in further developing pH electrodes with improved analytical performance.

Keywords □ H⁺-selective membrane, Nernst equation, Henderson-Hasselbalch equation.

초기 바이오센서는 각종 효소에 의해 특정 기질이 대사될 때 그 산물로서 H⁺, CO₂, NH₃ 등이 생성됨을 이용하여 pH 유리 전극에 효소를 고정화한 system으로 구성되었으며 효소 고정화의 효율성, 간편성을 꾀하고자 이온 선택성 전극을 이용하였다.¹⁻²⁾

효소의 반응 속도가 기질의 일정농도 범위에선 비례적으로 증가하며 그 이상에서는 비례적인 관계를 유지하지 못한다는 Michaelis-Menten 식과 이를 변형한 Lineweaver-Burk 식^{1,3)}, 물질의 확산에 있어서 막의 표면적과 농도 차이에 대한 물질확산의 비례 관계를 표현한 Fick의 확산 제1법칙¹⁾, 용액의 전위값이 기질

농도의 상용 대수에 비례한다는 Nernst 식⁴⁾, 전류량이 산화·환원 반응에 관여하는 기질의 양에 비례하는 Ilkovic 식⁴⁾, 등의 여러 기초 개념을 바탕으로 효소막과 감응막의 구성 및 두께^{5,6)}, glutaraldehyde 등으로 처리된 투석막 유무 및 그 역할⁷⁾, 효소 활성계의 환경⁸⁾ 등의 변수와 바이오센서의 감응성간의 상호 연관성을 살펴봄으로써 그 물리화학적 동향을 규명하고자 많은 노력이 있어왔다.

전위차측정법에 의한 대부분의 바이오센서들은 H⁺, CO₃²⁻, NH₄⁺ 선택성 ionophore인 tridodecylamine⁹⁾, p-butyl-trifluoroacetophenone¹⁰⁾, nonactin⁷⁾ 등을 각종 polymer 및 가소제와 함께 이온 선택성 막을 만든 후 그 막에 효소를 고정화시켜 사용한다. 이들은 H⁺, CO₃²⁻, NH₄⁺ 등의 활동도가 효소의 일정한 활성하에서

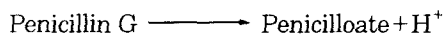
[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 051-620-4882 (팩스) 051-628-6540

기질의 양과 정비례 관계를 가진다는 전제하에서 정량한다. 그러나 H^+ 감응막을 이용한 바이오센서는 타 이온의 경우와는 달리 S자형 검량 곡선을 보이며 기질의 상용대수값이 전위값과 비례하지 않는 경우^{7,8,11,12)}도 있다. 비록 Macca 등¹³⁾이 flow system을 이용하여 직선성의 검량선을 얻은 바 있으나, flow rate의 변화에 따라 0.4~1.3 mM의 높은 농도의 범위를 가지며, 감응 기울기 또한 80~74 mV/dec.로 나타나 이상적인 Nernst slope와는 차이가 났다. 또한 H^+ 감응막으로 제작된 바이오센서를 사용할 경우, 바탕 전해질로 사용되는 완충용액의 농도는 다른 바이오센서의 경우에 비해 매우 묽은 것이 특징이다.

본 연구진들은 Nernst 식으로 기질농도의 상용대수와 전위값간의 관계를 사용하는 대신 기질 농도와 전위값간의 직접적인 비례 관계로부터 penicillin을 penicillinase에 의하여 가수분해하여 생성되는 $[H^+]$ 로부터 정량을 시도한 바 있다.¹⁴⁾

Penicillinase



또한 Olsson은 별도로 제작된 완충용액을 사용하여 여기에 일정량의 HCl을 점차적으로 첨가하였을 때 pH 변화가 HCl 농도와 비례관계를 가진다는 점에 착안하여 penicillin-V가 penicillinase에 의해 분해되어 생성된 $[H^+]$ 와 pH간의 직선성을 가정하여 이를 정량한 바¹⁵⁾ 있다. 이러한 기질 농도와 전위값간의 직접 비례 관계로부터 구하는 검량선 작성법에 대한 수치적 해석을 시도함으로써 기존법보다 쉬운 방법을 모색하고자 한다.

실험방법

시약 - Penicillin G (Pc-G), penicillinase (type II, Pcase) 등은 Sigma사, tetra-hydrofuran (THF), carboxylated poly(vinyl chloride) (PVC-COOH), 2-nitro-phenyloctyl ether (NPOE) 등은 Aldrich사, n-tridodecylamine(TDDA)은 Fluka사, sodium tetraphenylborate (NaTpB)는 Hayashi사 그리고 glutaraldehyde는 동경 TCI사에서 구입하여 사용하였고, 그의 시약들은 특급 시약을 사용하였으며, 증류수는 모두 Millipore Milli-Q system으로 탈염한 2차 증류수를 사용하였다. 완충용액은 3 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 용액을 사용하였다. 효소액은 0.05M potassium phosphate 완충용

액(pH 7.0)에 penicillinase를 녹여서 0.5 mg/10 μ L 용액으로 만들었다.

장치 - Potentiometer는 Orion사제의 920A를, pH 전극은 Orion사 제품 Model 9102BN Rose combination 유리 전극을, 그리고 온도 감응 센서는 Orion사 제품 Model 917005 ATC probe를 사용하였다. 전극 본체는 Phillips사의 IS-561, 기준 전극은 Orion사의 Ag/AgCl single junction 전극(Model 90-01-00)을 사용하였으며, 매초마다의 데이터를 얻기위해 Orion 920A를 386DX 컴퓨터에 연결하여 실험하였다.

바이오센서의 조립 - H^+ 선택성 막은 총 200 mg중 PVC-COOH 47.0%(w/w), NPOE 47.0%(w/w), TDDA 5.5%(w/w), NaTpB 0.5%(w/w)로 혼합하여 이를 THF에 녹인 후 유리관에 고정된 직경 22 mm인 유리관에 부어 하룻동안 방치하여 THF를 휘발시켜 만들었다. 이 막을 직경 7 mm로 잘라서 한쪽막 위에 5 μ L 효소액과 2.5 % glutaraldehyde 5 μ L를 떨어뜨리고 작은 막대로 잘 저어준 다음 4°C에서 24시간동안 방치하였다. 지시 전극의 내부충진용액으로는 0.02 M NaH_2PO_4 , 0.03 M Na_2HPO_4 와 0.015 M NaCl의 혼합액을 사용하였으며 바탕 전해질은 potassium phosphate 완충용액을 사용하였다. 사용전에 3 mM potassium phosphate 완충용액에 담귀서 결합되지 않은 glutaraldehyde와 효소를 제거하였으며, 사용하지 않을 때는 3 mM potassium phosphate 완충용액에 담귀 4°C에서 보관하였다.

측정 및 검량선 - 효소가 고정된 전극, 기준전극, 그리고 ATC probe를 상온(25.0±0.1°C)의 potassium phosphate 완충용액에 담귀서 전위값을 안정시킨 후 일정량의 Pc-G를 첨가하여 ±0.2 mV/min.의 안정된 전위값에 도달할 때까지 기다린 후 그 전위값을 측정하고, 이로부터 검량선을 작성한다.

결과 및 고찰

가스 혹은 이온 선택성 막을 이용한 바이오센서들은 모두 생체 성분이 기질을 대사하여 발생하는 산물인 H^+ , CO_2 , NH_3 등의 생성량을 측정한다. 이때 이들 산물의 양은 Eq. 1과 같이 모두 기질의 양에 비례한다.

$$[P] = k \cdot [S] \quad (1)$$

P: 대사 산물의 농도

S: 기질의 농도

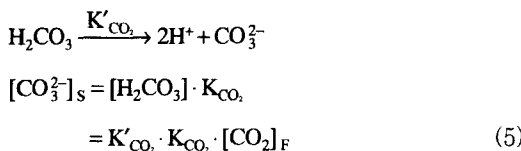
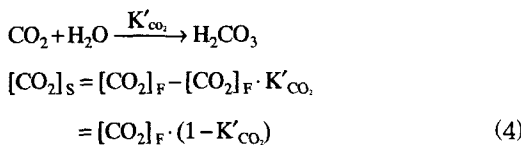
k: 비례 상수

그러므로 기질의 양은 직접 측정하는 대신 그 산물의 양을 측정함으로써 간접 정량한다. 측정시 전위값은 Nernst 식에 따라 그 대상물 농도의 상용대수에 비례하므로 Eq. 2와 같은 식을 얻게 된다.

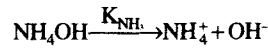
$$\begin{aligned} E(\text{mV}) &= \text{constant} + R \cdot \log(P) \\ &= \text{constant} + R \cdot \log((S) \cdot k) \\ &= \text{constant}' + R \cdot \log(S) \end{aligned} \quad (2)$$

R: 감응 기울기

이들 측정 산물의 양은 완충용액의 영향을 받는다. 가령, 기질이 효소에 의해 분해되어 생성되는 CO₂를 측정할 때 CO₂ 가스 투과막을 사용할 경우 원활한 CO₂ 생성을 위하여 중성이나 약산성 완충용액을 사용하며 CO₃²⁻ 감응 액체막은 약알칼리성 완충용액을 사용한다. 우선, 특정 기질(S)에 대한 효소 반응에서 반응 생성물(P)과 CO₂가 생성된다면(Eq. 3), 일부는 CO₂가 수용액중에서 H₂CO₃로 되어 실제 생성된 CO₂보다 적은 양이 CO₂ 가스센서로 감응될 것이고, 이렇게 생성된 H₂CO₃은 다시 해리를 하여 CO₃²⁻가 되면 CO₃²⁻ 선택성 전극으로 감응될 것이다. 어느 경우에서나 센서가 감지할 산물의 양 [CO₂]_S, [CO₃²⁻]_S은 처음 생성된 CO₂ 양([CO₂]_F)에 비례한다(Eq. 4, 5).



K_{CO₂}, K'_{CO₂} 등은 평형상수이며 [H⁺] 변화는 완충용액을 사용하였으므로 변수에서 제외하였다. NH₃ 센서의 경우, 기질로부터 효소에 의해 분해하여 생성되는 NH₃나 NH₄⁺의 량(6, 7)도 CO₂나 CO₃²⁻의 경우와 같이 계산된다.



$$[\text{NH}_3]_S = (1 - K'_{\text{NH}_3}) \cdot [\text{NH}_3]_F \quad (6)$$

$$[\text{NH}_4^+]_S = K'_{\text{NH}_3} \cdot K_{\text{NH}_4} \cdot [\text{NH}_3]_F \quad (7)$$

위와 같이 측정될 암모니아 및 탄산가스 혹은 그 이온은 완충용액에 대한 영향없이 처음 효소에 의해 생성된 가스의 양에 직접적으로 비례하므로 Eq. 2에 적용할 수 있다. 지금까지 CO₃²⁻, NH₄⁺를 측정 대상으로 하는 많은 바이오센서들은 기질의 일정 범위의 농도에 대한 상용대수에 일직선성을 보였다. 그러나 몇몇의 H⁺ 선택성 막을 이용한 바이오센서들은 직선성의 검량선을 얻기가 어려웠다. 한편 Olsson¹⁵⁾은 기질의 양이 pH의 변화에 대하여 직선성임을 이용하였으며 Kim 등¹⁴⁾은 penicillinase를 이용한 penicillin 정량에서 기질 농도에 대한 전위값간의 직선성을 이용한 바 있다. H⁺ 선택성 막을 사용한 바이오센서가 기존의 방법으로는 검량선을 직선적으로 얻기 어렵거나 직선을 나타내는 농도 범위가 좁은 것은 생성된 H⁺가 완충용액의 영향을 받기 때문으로 생각된다. 완충용액의 pH는 Henderson-Hasselbalch 식 (Eq. 8)에 의해 계산될 수 있다.

$$[\text{H}^+] = \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \cdot K_a \quad (8)$$

이 식을 바탕으로 하여 기질 농도 변화에 따른 [H⁺]와 pH의 변화를 완충 용액의 완충능에 벗어나지 않는 정도와 벗어나는 정도의 기질 농도 크기에 따라 검토하여보았다.

완충능에 벗어나지 않는 기질 농도 범위

효소 반응 후 생성되는 H⁺의 활동도를 [H⁺]_F라 하고, 계산상 효소막 표면에서는 확산은 거의 일어나지 않으며 일정량의 기질과 그에 대한 산물 [H⁺]_F는 일정량으로 존재하는 것으로 가정한다. [H⁺]_F가 [A⁻]를 초과하지 않는 적은 양일 때를 고려하여 Eq. 8을 [H⁺]_F에 대하여 풀어쓰면 Eq. 9와 같다.

$$\begin{aligned} [\text{H}^+]_S &= \frac{[\text{HA}] + [\text{H}^+]_F}{[\text{A}^-] - [\text{H}^+]_F} \cdot K_a \\ [\text{H}^+]_F &= \frac{[\text{H}^+]_S \cdot [\text{A}^-] - [\text{HA}] \cdot K_a}{[\text{H}^+]_S + K_a} \end{aligned} \quad (9)$$

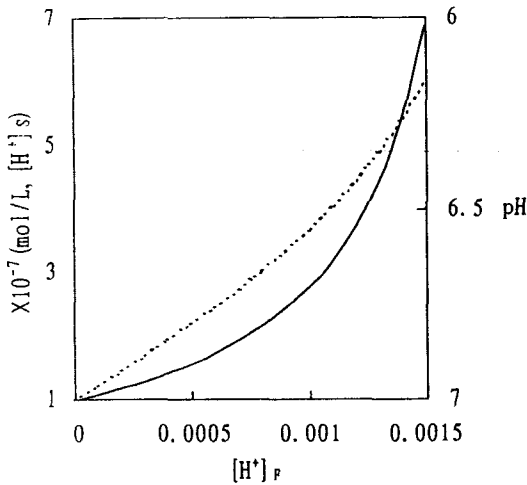


Fig. 1—Theoretical relationship between $[H^+]_F$ and $[H^+]_S$ or pH in 5 mM background buffer solution.
 Solid line : $[H^+]_F$ vs. $[H^+]_S$
 Dotted line : $[H^+]_F$ vs. pH.

$$= [A^-] - K \cdot \frac{C}{[H^+]_S + K_a}$$

$$\left(\text{단, } C = [HA] + [A^-]; K = \frac{K_a}{[H^+]_S + K_a} \right)$$

일정 기질에 대하여 생성된 $[H^+]_F$ 는 막 표면의 최종 $[H^+]_S$ (ISE막이 감응할 H^+ 활동도, $[H^+]_S$ 라 칭함)와 비례 관계를 가지지 못한다. 이는 곧 기질 대사 산물의 일정 비율의 양이 감응되어지는 것이 아니라는 것이다. 만일 완충용액의 농도가 5 mM이라고 가정하여 $[H^+]_F$ 에 대한 이론적인 $[H^+]_S$ 의 변화를 그린 Fig. 1를 살펴 보면 기질이 분해되어 생성된 $[H^+]_F$ 는 $[H^+]_S$ 와는 직선적 관계가 없으나 pH 변화와는 직선성에 가까운 관계를 보이고 있다.

H^+ 선택성 막은 반응 후 생성된 $[H^+]_F$ 를 바로 감응하는 것이 아니라 막 표면에서의 전체 pH 변화를 감응하는 것이다. 그리고 최종 안정상태에서의 전위값은 바탕용액 내 기질의 효소막으로의 확산 속도와 효소막내의 대사산물이 바탕용액 및 감응막으로의 확산 속도가 일정할 때이다. 이때 기질이 반응되어 생성된 $[H^+]_F$ 가 막 표면의 완충용액과의 반응으로 낮은 농도의 $[H^+]_S$ 로 변화게 되고 이것이 바탕용액의 $[H^+]$ 와의 농도차이 ($\Delta [H^+]$)에 비례적으로 확산되어 일부 빠져나가¹⁾ 보다 낮은 농도의 $[H^+]_S$ 가 남게된다. 이를 다음과 같

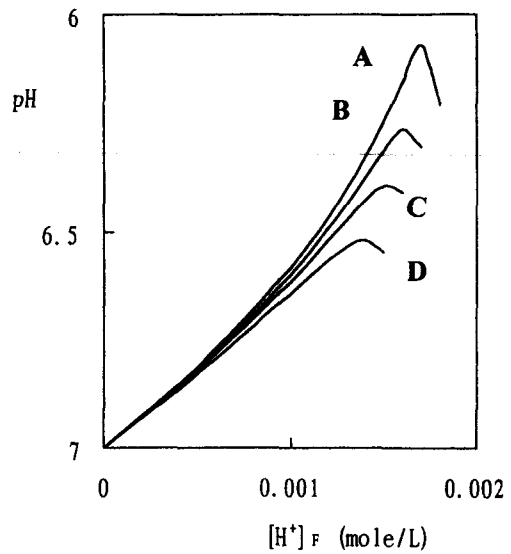


Fig. 2—Theoretical curves of pH vs. $[H^+]_F$ from different diffusion coefficient. This figure was plotted from equation 9(A) and 10(B, C, D). Diffusion coefficient (unit: $cm^2/sec.$) is 3.0×10^5 (A), 5.0×10^5 (B), 7.0×10^5 (C) and 1.0×10^6 (D). The pH and concentration of background buffer solution was 7 and 5 mM.

이 계산할 수 있다.

$$[H^+]'_S = [H^+]_S \{1 - ([H^+]_S - B_{[H^+]}) \cdot V_D\} \quad (10)$$

V_D : 확산 속도 비례 상수 Unit : L/mol

$B_{[H^+]}$: 바탕 완충 용액의 $[H^+]$

본 조건의 기질 농도 범위의 낮은 $[H^+]_F$ 농도에서는 $[H^+]_S$ 가 일정 상수에 근접된 작은 값을 나타내므로 $[H^+]_S$ 와 $[H^+]'_S$ 는 유사할 것으로 생각되며, 보다 높은 농도에서는 처음 $[H^+]_S$ 보다 적은 $[H^+]'_S$ 가 효소막에 존재할 것으로 생각된다. 바탕완충용액의 pH와 농도가 각각 7, 5 mM이라 가정하고 $[H^+]_F$ 에 대한 pH 변화를 이론적으로 도식하여 보면 Fig. 2와 같으며 특히 Fig. 2-A는 Eq. 9, Fig. 2-B~D는 Eq. 10에 따라 구한 것으로서 특히, Olsson¹⁵⁾이나 Kim 등¹⁴⁾이 농도와 전위값간의 직선성을 이용하여 검량선을 구한 결과(Fig. 4)가 Fig. 2-D에 가깝다는 것은 고농도 생성물의 확산이 일어난다는 것으로 생각된다. 아울러 Fig. 2에서 V_D 의 수치가 증가할수록 보다 직선성을 나타내고 있다. 그러나 높은 농도의 $[H^+]_F$ 에서는 농도 차이에 따른 확산의 증가로 pH가 크게되어 직선성이 아닌 수치적 문제점이

있다. 이것은 앞선 가정에서 기질의 효소막으로의 확산 유입이 고려되지 않았던 결과이다.

완충능에 벗어나는 기질 농도 범위

완충용액이 완충능을 벗어날만큼 [H⁺]_F가 많이 생성 될 경우 효소막내와 바탕용액간의 [H⁺] 농도의 큰 차이 로 [H⁺]_F가 바탕용액으로 일부 빠져나가며, 일부는 효 소막에 있는 완충 용액의 짝염기인 A와 중화반응을 일 으켜 바탕용액중의 A와의 농도차이를 유발시킴으로서 바탕용액중의 A가 다시 효소막으로 확산케하고, 중화반 응으로 형성된 HA는 바탕용액으로 확산되어나간다. 이 때 완충용액의 짝염기 A의 효소막내로의 확산, 유입량 은 형성된 [H⁺]_F에 의해 중화되는 A의 양에 의해 결정 된다. 그러나 [H⁺]_F이 상당히 큰 경우 중화되어 손실된 A만큼 다시 유입되어야하나 A의 즉각적인 확산이 이루 어지지 않아, 완충능에 벗어나지 않는 저농도 기질의 경 우에서와는 달리 일부 [H⁺]_F이 완충작용을 받지 않고 직 접 감응되어 완충용액에 대한 영향을 적게 받으며 이로 인한 급격한 pH 변화는 기존의 많은 바이오센서의 S자 형 검량선과 Nernstian slope와 무관한 높은 slope (70~80 mV/dec.)의 원인이 된 것으로 생각된다. 우선 기질에 대한 전위값의 변화 (y₁, y₂)를 도식화하기 위해 다음과 같은 가정을 세웠다. 기질 농도에 대하여 직접적 인 비례 관계를 가지는 경우 기질의 농도(x₁)가 10⁻⁵에서 10⁻²M로 변할 때 전위값이 200 mV 변하는 것으로 하며, 별도로 기질과 관계없이 막 표면의 [H⁺] 농도 (x₂)에 대 하여 감응 기울기가 60 mV/dec.이고, [H⁺]가 10⁻⁷M일

때 0 mV로 기준을 정하여 (Fig. 3) Eq. 11, 12 두 방정 식을 세웠다. 이때 x₂ 양은 완충용액과 반응하기 전인 효 소 대사산물의 양 [H⁺]_F와 동일한 것으로 간주한다.

$$y_1 = 200 \cdot 10^2 \cdot x_1 \tag{11}$$

$$y_2 = 420 + 60 \cdot \log x_2 \tag{12}$$

막 표면에서의 [H⁺]의 변화에 따른 전위값 (Fig. 4- A, Eq. 12)과 완충용액과의 관계를 고려한 전위값 (Fig. 4-B, Eq. 11)간의 차이는 [H⁺]_F양에 따라 변한 다 (Fig. 4-C). 만일 Eq. 12에서 특정 수치의 전위값 (y_a)이 다른 낮은 전위값(y_b)으로 Δt(mV)만큼 떨어졌 다고 가정하면 Eq. 13과 같은 식을 얻을 수 있다.

$$\begin{aligned} y_a - y_b &= 60 \cdot \log x_a - 60 \cdot \log x_b \\ &= 60 \cdot \log \frac{x_a}{x_b} \\ \Delta t &= 60 \cdot \log \frac{x_a}{x_b} \\ \frac{\Delta t}{60} &= \log \frac{x_a}{x_b} \\ \therefore x_b &= x_a \cdot 10^{-\frac{\Delta t}{60}} \end{aligned} \tag{13}$$

동시에 Δt가 일정하다면 초기의 x_a에 대한 일정 잔

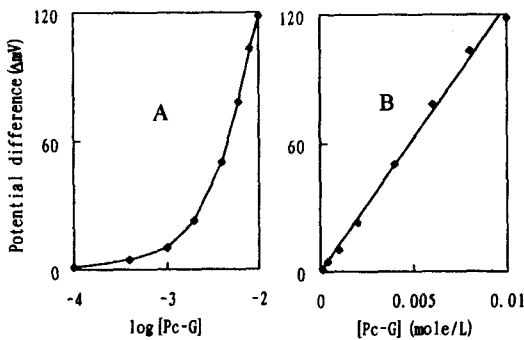


Fig. 3 — Calibration curves of Pc-G with PVC-COOH enzyme membrane. Curve A : ΔmV vs. log [Pc-G], Curve B : ΔmV vs. [Pc-G] (correlation coefficient r of curve B=0.9965) Background electrolyte was 5mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.0) (ref. 14)

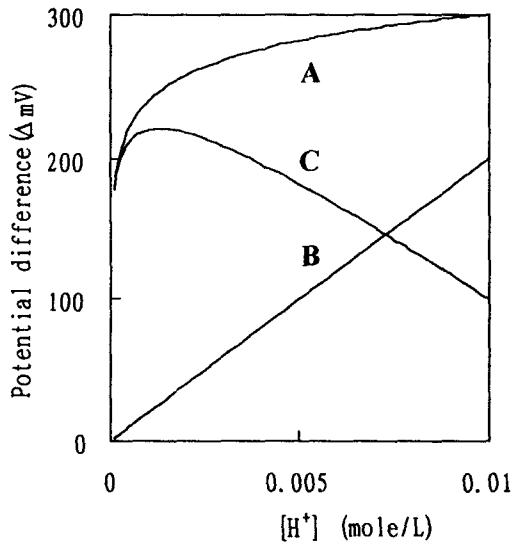


Fig. 4 — Theoretical potential difference versus [H⁺] as the substrate concentration is out of buffer capacity : C curve is the difference between curve A (not affected by buffer) and curve B (affected by buffer).

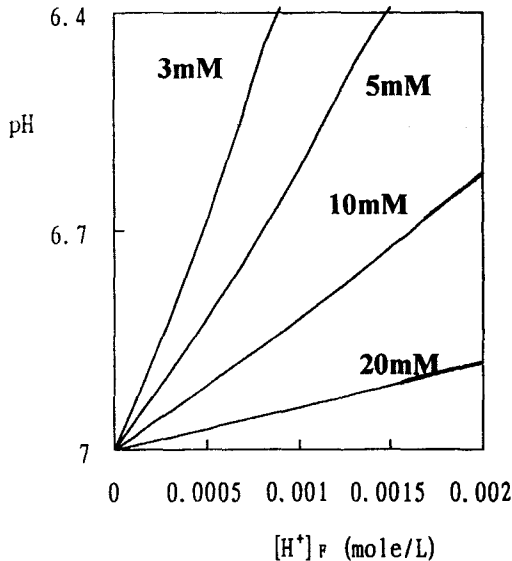


Fig. 5—Theoretical calibration curves from different concentration of buffer solution.

Values in figure are the concentration of buffer.

존비율($10^{-4}/60$)의 양인 x_0 만이 남아있는 것으로 해석된다. Fig. 4에서 1 mM 이하의 묽은 $[H^+]_F$ 의 양이 증가함에 따라 실제 생성된 $[H^+]_F$ 에 대한 전위값(A 곡선)과 완충용액에 의해 중화되어 감응되어진 전위값(B 곡선)간의 차이는 증가하나(C 곡선) 1 mM 부근 이상에서는 점차적으로 감소한다. 이 결과는 Eq. 13로부터 저농도에서는 처음 생성된 $[H^+]_F$ 에 대한 $[H^+]_S$ 의 비율이 점점 감소되고(\therefore C 곡선의 Δt 의 증가는 잔존 비율의 감소를 뜻한다), 고농도로 갈수록 $[H^+]_F$ 가 중화되지 않고 남아있는 부분이 증가되어 생성된 $[H^+]_F$ 에 대한 $[H^+]_S$ 의 비율이 증가되어 A 곡선에 가까워짐을 알 수 있다. 이는 본 기질 농도 범위 조건에서의 $[H^+]_F$ 의 증가에 따른 완충능의 감소, 즉 고농도의 $[H^+]_F$ 에 대한 완충용액중 A의 즉각적인 확산의 한계에 따른 잔존 $[H^+]_F$ 가 증가한다는 내용과 일치하는 것이다. 이와같이 완충용액에서의 효소 반응에 의한 pH의 감응은 여러가지 복잡한 변수로 인해 Nernst 식과는 별개의 결과가 나타나며 여러 논문^{7, 8, 11-12, 14}에서 발견되는 문제점과 일치하였다. 그러므로 H^+ 선택성 감응막을 이용한 바이오 센서는 완충용액에 의한 영향과 상용대수 처리에 대한 계산상의 복잡성을 피하여 전위값과 농도와의 정비례 관계를 이용하여 정량의 간편성을 살리는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

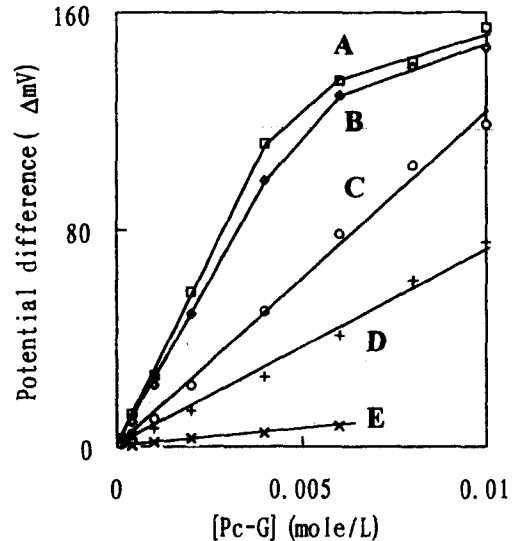


Fig. 6—Calibration curves for Pc-G obtained with enzyme electrode in different concentration potassium phosphate buffer solution (pH 7.0) Penicillinase was immobilized on PVC-COOH with glutaraldehyde.

(A: 1 mM, B: 3 mM, C: 5 mM, D: 10 mM, E: 30 mM)

이와같이 $[H^+]_F$ 가 완충용액의 영향을 받는다면 완충용액의 농도에 대한 영향을 고려해야 할 것이다. NH_4^+ , NH_3 gas, CO_3^{2-} , CO_2 gas 등을 대상으로 한 경우^{7, 16, 17} 바탕 전해질은 50 mM~0.1 M 정도의 완충용액을 사용하였으나 H^+ 를 대상으로 하는 경우 5 mM^{12, 14}, 1 mM^{7, 11, 18}, 0.2 mM⁸, 혹은 4.5×10^{-5} M¹³ 완충용액을 사용하였다. Fig. 5는 Fig. 2-C를 완충용액의 농도 변화에 대한 변수를 고려하여 다시 그린 것으로서 완충용액의 농도 증가에 따른 전위값의 변화는 적었으나 묽은 농도의 완충용액을 사용하는 것보다 직선에 가까운 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 지나친 완충용액의 농도 증가는 민감도의 저하를 초래하므로 적합치 못한 방법으로 생각되며 기존의 센서^{7, 8, 18}에서 묽은 완충용액을 사용한 것도 민감도에 대한 문제의 해결과 중화되는 H^+ 량의 감소에 따른 Nernst 식에의 근접을 위한 것으로 생각된다. Fig. 6은 실제 측정하여 얻은 결과로서 묽은 농도의 기질에 대한 높은 민감도를 얻기위하여는 묽은 농도의 완충용액을 사용해야 바람직할 것으로 생각되나 넓은 범위의 농도에 걸쳐 직선성을 얻기위하여는 완충용액의 농도를 3~5 mM 정도로 하는 것이 가장

적합한 것으로 생각된다.

감사의 말씀

박성배는 1996년도 인제대학교 학술연구구성비의 보조로 본 연구를 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Cass, A. E. G. : *Biosensors. A practical approach*, IRL press, U.S.A. (1990).
- 2) Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S. : *Biosensors, Fundamentals and applications*, Oxford Univ. U.S.A. (1987).
- 3) Stryer. : *Biochemistry*, 3th Ed., W. H. Freeman & Company (1988).
- 4) Braun, R. D. : *Introduction of instrumental analysis*, McGraw-Hill press, U.S.A. (1987).
- 5) Tse, P. H. S. and Gough, D. A. : Transient response of an enzyme electrode sensor for glucose. *Anal. Chem.* **59**, 2339 (1989).
- 6) Carr, P. W. : Fourier analysis of the transient response of potentiometric enzyme-electrode. *Anal. chem.* **49**, 799 (1977).
- 7) Cha, G. S. and Meyerhoff, M. E. : Potentiometric ion- and bio-selective electrodes based on asymmetric cellulose acetate membrane. *Talanta* **36**, 271 (1988).
- 8) Caras, S. D., Petelenz, D. and Janata, J. : pH-based on enzyme potentiometric sensors. Part 2. Glucose-sensitive Field effect transistor. *Anal. Chem.* **57**, 1920 (1985).
- 9) Schulthess, P., Shijo, Y., Pham, H. V., Pretsch, E., Ammann, D. and Simon, W. : A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecyl-amine as neutral carrier. *Anal. Chim. Acta* **131**, 111 (1981).
- 10) Meyerhoff, M. E., Pretsch, E., Welti, D. H. and Simon, W. : Role of trifluoro-acetophenones solvents and quaternary ammonium salts in carbonate-selective liquid membrane electrodes. *Anal. Chem.* **59**, 144 (1987).
- 11) Anzai, J. I., Shimada, M., Osa, T. and Chen, C. W. : Enzyme sensors based on coated-wire electrode. Use of carboxyl-substituted poly(vinyl chloride) as a support for immobilizing penicillinase. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 4133 (1987).
- 12) Anzai, J. I., Hashimoto, J. Y., Osa, T. and Matsuo, T. : Penicillin sensors based on an ion-sensitive field effect transistor coated with stearic acid and Langmuir-Boldgett membrane. *Anal. Sci.* **4**, 247 (1988).
- 13) Macca, C., Solda, L. and Palma, G. : Potentiometric biosensing of penicillins using a flow-through reactors with penicillinase or penicillin amidase immobilized by gamma-irradiation. *Anal. Lett.* **28**, 1735 (1995).
- 14) Kim, K. M., Kim, Y. H., Lee, E. Y., Hur, M. H. and Ahn, M. K. : Characteristics of enzyme sensors using carboxylated PVC for immobilizing penicillinase. *Yakhak Hoeji* **40**, 72 (1996).
- 15) Olsson, B. : A flow-injection system based on immobilized penicillinase and a linear pH-buffer for potentiometric determination of penicillin. *Anal. Chim. Acta* **209**, 123 (1988).
- 16) Kim, U. R., Park, S. S., Choi, S. M. and Park, Y. S. : The develop of immobilized enzyme electrode probes(II). *J. Inst. Nat. Sci.* **11**, 17 (1992).
- 17) Kim, U. R., Nam, K. J. and Choi, S. M. : The development of arginine-selective membrane electrode using tissue slices of the rose of Sharon. *J. Kor. Chem. Soc.* **36**, 753 (1992).
- 18) Liu, D., Meyerhoff, M. E., Goldberg, H. D. and Brown, R. B. : Potentiometric ion- and bioselective electrodes based on a symmetric polyurethane membrane. *Anal. Chim. Acta* **274**, 37 (1993).